

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.005

沉默 p65 基因对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞周期的影响

王 玲¹, 赵连梅², 张 超², 单保恩^{1,2}

Effects of Silencing p65 Gene on Cell Cycle Distribution of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

WANG Ling¹, ZHAO Lian-mei², ZHANG Chao², SHAN Bao-en^{1,2}

1. Scientific Research Center, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. Hebei Key Laboratory of Gene Diagnosis, Prevention and Therapy, The Fourth Hospital of Hebei Medical University

Corresponding Author: SHAN Bao-en, E-mail: shanbaoen@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To study the effects of p65 microRNA (miRNA) on cell cycle distribution of human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Methods** p65-targeted miRNA was designed and transfected into MDA-MB-231 cells via lipofectamineTM 2000 mediation. The level of p65 mRNA expression was detected by RT-PCR. NF- κ B binding activity of MDA-MB-231 cells was measured by electrophoresis' mobility shift assay (EMSA). Cell cycle distribution was further detected by flow cytometry (FCM). Expression of cyclinD1, CDK4 and p21 proteins were determined by Western blot after transfection. **Results** p65 miRNA expression plasmid was constructed successfully and led to decrease expression level of p65 mRNA dramatically in MDA-MB-231 cells. EMSA assay showed that NF- κ B binding activity of MDA-MB-231 cells was inhibited significantly, and lower than that of miR-neg and blank control group ($P < 0.05$). 48 h after transfection, p65 miRNA increased the cell number in G₀/G₁ phase and decreased the cell proportion in S and G₂/M phase ($P < 0.05$). Western blot analyzed results furtherly confirmed that cyclinD1 protein was inhibited in p65 miRNA-transfected cells, while p21 protein increased after transfection. **Conclusion** Silencing p65 gene by miRNA was able to arrest MDA-MB-231 cells phase at G₀/G₁ phase, which might be mediated by downregulation of cyclinD1 and upregulation of p21.

Key words: Breast cancer; miRNA; p65; Cell cycle

摘要:目的 研究 miRNA(microRNA)沉默 p65 基因后对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响。**方法** 用 pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR 载体构建 p65 miRNA 表达质粒,转染 MDA-MB-231 细胞,用 RT-PCR 检测转染前后各组细胞中 p65 mRNA 表达变化;凝胶电泳迁移率改变分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)实验研究转染前后细胞中 NF- κ B 结合活性的变化;流式细胞术(Flow cytometry, FCM)观察转染前后细胞周期分布的变化;Western blot 法检测转染前后细胞周期相关因子 cyclinD1、CDK4、p21 蛋白表达的变化。**结果** p65 miRNA 质粒明显下调 MDA-MB-231 细胞中 p65 mRNA 的表达水平,并显著抑制细胞中 NF- κ B 的结合活性($P < 0.05$)。FCM 结果显示,转染组细胞 G₀/G₁ 期细胞比例显著增加,S、G₂/M 期细胞比例明显下降($P < 0.05$);Western blot 分析结果显示,沉默 p65 基因后细胞中 cyclinD1 蛋白表达下调,p21 蛋白表达增加。**结论** p65 miRNA 可以显著降低 p65 mRNA 的表达,诱导乳腺癌细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞,可能是通过降低 cyclinD1 蛋白,上调 p21 蛋白表达而实现的。

关键词: 乳腺癌;miRNA;p65;细胞周期**中图分类号:** R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1236-05**收稿日期:** 2011-03-09; **修回日期:** 2011-06-17**基金项目:** 河北省科学技术研究与发展计划资助项目 (10276167)**作者单位:** 1. 050011 石家庄,河北医科大学第四医院科研中心 河北省肿瘤研究所免疫室;2. 河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室**通信作者:** 单保恩, E-mail: shanbaoen@yahoo.com.cn**作者简介:** 王玲(1981-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤免疫学研究

0 引言

乳腺癌是女性常见的一种高度异质性的恶性肿瘤,已成为威胁女性健康的“头号杀手”^[1-2]。其中,75%~80%的乳腺癌为激素依赖型,10%~15%为雌、孕激素受体及 HER2 均为阴性的乳腺癌。由于后者没有针对性靶点,临床多采用常规化疗和放疗,

缺乏有效的治疗手段。MDA-MB-231 细胞株是一种高侵袭性,雌、孕激素受体均为阴性的乳腺癌细胞,是研究该类乳腺癌理想的肿瘤细胞模型。我们前期的研究发现,NF- κ B 信号通路在该细胞中异常活化,并与细胞的生物学活性密切相关^[3-4]。其中 p65 是 NF- κ B 复合物中发挥转录激活的关键分子,沉默该基因可以抑制 MDA-MB-231 细胞增殖,但确切的机制仍不明确。本实验通过 miRNA (microRNA) 技术干扰 p65 基因,深入探讨其对细胞周期分布的影响及潜在的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株购自中国科学院细胞库上海保藏中心。胎牛血清购自杭州四季青公司。高糖型 DMEM 培养液购自 Gibco 公司。Trizol 试剂、脂质体 LipofectamineTM 2000、Opti-MEM[®] I 无血清培养液购自美国 Invitrogen 公司。M-MLV 反转录试剂盒购自美国 Fermentas 公司,引物及探针合成由上海生物工程技术服务有限公司提供。非放射性凝胶电泳迁移率改变分析 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。兔抗人 cyclinD1、CDK4、p21、GAPDH 多克隆抗体,购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 p65 miRNA 序列的设计和制备

根据美国国立生物技术信息中心数据库中 p65 基因序列[NM_021975]转录 RNA 的作用位置,设计 4 对针对 p65 基因的 miRNA 干扰序列,序列分别为: 5'-TGCTGCATGGTGGGAACTCATCATAGTTTTGGCCACTGACTGACTATGATGATTCACCATG (p65 miRNA-1)、5'-TGCGTTCACTCCTGAAAGGAGGCCGTTTTGGCCACTGACTGACGGCTCCTCAGGAGATGAA (p65 miRNA-2)、5'-TGCTGATCCGGTGACGATCGTCTGTAGTTTTGGCCACTGACTGACTACAGACGCGTCACCGGAT (p65 miRNA-3)、5'-TGCTGATCCGGTGACGATCGTCTGTAGTTTTGGCCACTGACTGACTACAGACGCGTCACCGGAT (p65 miRNA-4),此 4 条 miRNA 序列经 BLAST 检索,确认与 p65 基因以外的人类已知基因序列无同源性。同时,合成与目的基因无同源性的阴性对照序列 miR-neg,以上寡核苷酸链均由美国 Invitrogen 公司合成并负责与线性表达质粒 pcDNATM 6.2-GW/EmGFP-miR 合成环形的重组质粒。

1.3 细胞培养及转染

用含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 u/ml)、链霉素 (100 μ g/ml) 的 DMEM 完全培养液,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下进行培养。倒置显微镜下观察细胞生长状态,细胞生长呈 70%~80% 融合状态时,收集对数生长期细胞进行实验。

实验分为未转染组 (blank control),阴性对照质粒组 (miR-neg) 以及转染组 (p65 miRNA-1、p65 miRNA-2、p65 miRNA-3、p65 miRNA-4)。转染前将 MDA-MB-231 细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,然后吸尽上清液,用 Opti-MEM[®] I 无血清培养液将 24 孔板中的细胞漂洗 2 次。实验组加入 1 ml 转染混合液 (含 2 μ g 待转质粒和 1 μ l LipofectamineTM 2000),培养 12 h 后,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液洗细胞 3 遍,加 1 ml 完全 DMEM 培养液 (含 10% 小牛血清、双抗生素) 继续培养。经过预试验发现,p65 miRNA-1 干扰序列的沉默效果最好,我们使用该序列进行后续实验,并简称为 p65 miRNA。

1.4 RT-PCR 法检测 p65 miRNA 干扰效率

转染 24、48 h 后,分别收集各组细胞,用 Trizol 试剂分别提取各细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。p65 扩增产物大小为 460 bp,引物序列上游: 5'-GGCGAGAGGAGCACAGATAC-3'; 下游: 5'-ATCTTGAGCTCGGCAGTGTT-3'。 β -actin 扩增产物大小为 838 bp,引物序列上游: 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'; 下游: 5'-CGTCATCCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'。p65 反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环。72℃ 5 min, 4℃ 终止。 β -actin 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环。72℃ 5 min, 4℃ 终止。产物条带用凝胶成像系统照相并进行灰度分析。目的片段的相对表达量计算公式为: 目的基因的灰度值/ β -actin 的灰度值。

1.5 EMSA 法检测 NF- κ B 结合活性

设计双链寡核苷酸含有公认的 NF- κ B 结合位点的探针,NF- κ B DNA 探针序列如下: 正义链 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3',反义链 3'-TCAACTCCC CTGAAAGGGTCCG-5'。在每条链 5' 末端进行生物素标记。合成 DNA 双链, -20℃ 保存备用。用非放射性 EMSA 检测试剂盒检测不同组细胞 NF- κ B 的 DNA 结合活性,具体操作按试剂盒说明书进行操作。

1.6 FCM 检测细胞周期

收集转染 48 h 后的各组细胞,用 PBS 缓冲液洗涤并重新悬浮细胞于 70% 乙醇中,4℃ 固定 2 h, RNA 酶 37℃ 处理 1 h,与 PI 染液室温反应 10 min,流式细胞仪检测,应用流式直方图分析软件测定不同时期细胞比例。

1.7 Western blot 法检测 cyclinD1、CDK4、p21 蛋白的表达

收集转染 48 h 后的各组细胞,提取细胞总蛋白,按照试剂盒的操作步骤进行蛋白定量。取 30 μ g 蛋白进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,依示目的蛋白相对分子质量的标记蛋白分离条带,切下电泳后含目的蛋白的胶。电转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,于室温封闭 2 h。将封闭后的 PVDF 膜置入 TTBS 适当稀释的一抗(cyclinD1、CDK4、p21、GAPDH)溶液中,4℃ 缓慢摇动过夜。室温洗膜,将 PVDF 膜置入适量以 TTBS 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗溶液中,于室温反应 2 h。ECL 化学发光后,在暗室内将 X 光片置于保鲜膜上,曝光。冲洗 X 光片,拍照扫描。

1.8 统计学方法

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行组间及组内方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞 p65 mRNA 表达水平的影响

细胞转染 24 h 时,转染组细胞中 p65 mRNA 的表达水平开始下降;48 h 时,转染组细胞几乎检测不到 p65 mRNA 的条带,见图 1。p65 灰度值结果显示:转染组细胞 p65 mRNA 的表达水平较 miR-neg 组和 blank control 组显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。48 h 时,p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞中 p65 基因的抑制率约可达 80%。

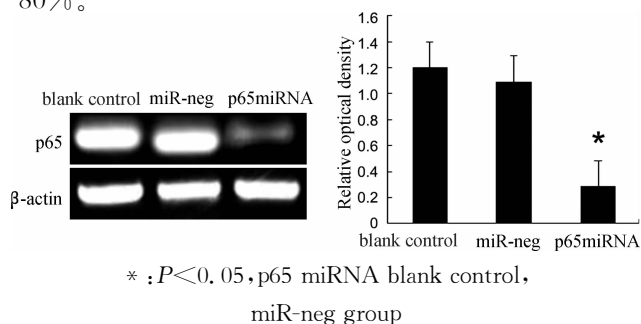


图 1 转染 48 h 后 p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞中 p65 mRNA 表达的影响

Figure 1 Expression of p65 mRNA in MDA-MB-231 cells after p65miRNA transfection for 48 h

2.2 转染 p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞 NF- κ B 结合活性的影响

EMSA 法检测转染 24 h 后不同组细胞中 NF- κ B 结合活性的情况,结果显示,与 miR-neg、未转染组相比,转染组细胞的 DNA-蛋白质复合物区带明显变浅,提示沉默 p65 基因可以降低 MDA-MB-231 细胞中 NF- κ B 的结合活性,见图 2。

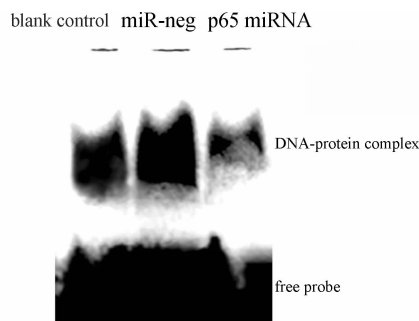


图 2 转染 24 h 后 p65 miRNA 对 MDA-MB-231 细胞中 NF- κ B 结合活性的影响

Figure 2 The level of NF- κ B binding activity in MDA-MB-231 cells after p65 miRNA transfection for 24 h

2.3 转染 p65 miRNA 对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响

FCM 结果显示,转染 p65 miRNA 48 h 后,转染组细胞 G_0/G_1 期细胞比例显著高于 miR-neg 组和未转染组细胞($P < 0.05$);而 S 期及 G_2/M 期细胞比例下降,明显低于两个对照组($P < 0.05$)。提示 p65 miRNA 可使 MDA-MB-231 细胞阻滞在 G_0/G_1 期,见图 3,表 1。

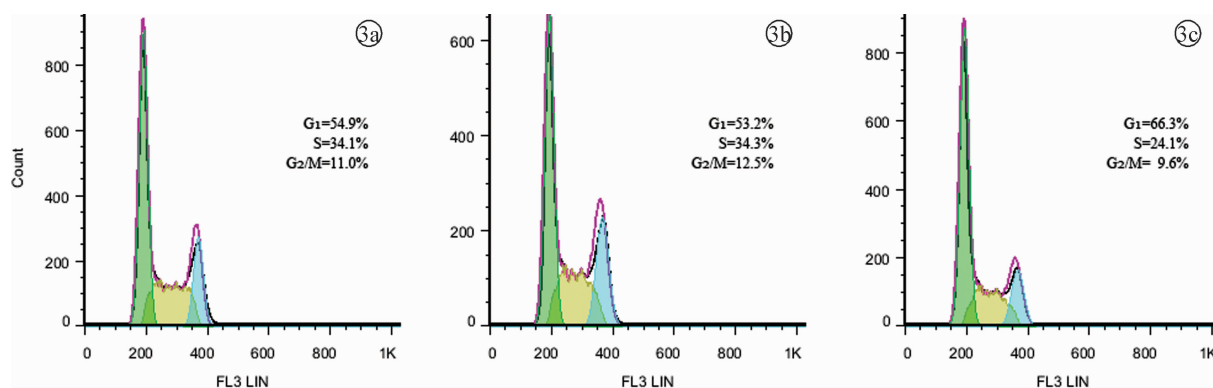
表 1 转染 p65miRNA 48 h 后对 MDA-MB-231 细胞周期分布的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Groups	G_0/G_1 (%)	G_2/M (%)	S (%)
blank control	53.12 $\pm$ 4.98	12.86 $\pm$ 2.11	34.02 $\pm$ 3.52
miR-neg	56.21 $\pm$ 3.09	11.27 $\pm$ 3.19	32.52 $\pm$ 3.16
p65 miRNA	65.18 $\pm$ 7.21*	9.56 $\pm$ 1.05*	25.26 $\pm$ 2.78*

Note: *: $P < 0.05$, p65 miRNA vs. blank control, miR-neg group

2.4 转染 p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞周期相关分子表达的影响

Western blot 结果显示,与 miR-neg 组和 blank control 组细胞相比,p65 miRNA 组细胞在转染 48 h 后 cyclinD1 蛋白表达明显低于两个对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);而 CDK4 蛋白在各组之间表达差异无统计学意义($P > 0.05$);转染组细胞 p21 蛋白表达明显高于两个对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。



3a: blank control group; 3b: miR-neg group; 3c: p65 miRNA group

图 3 转染 48 h 后 p65miRNA 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

Figure 3 Cell cycle distribution of breast cancer cells MDA-MB-231 after p65miRNA transfection for 48 h

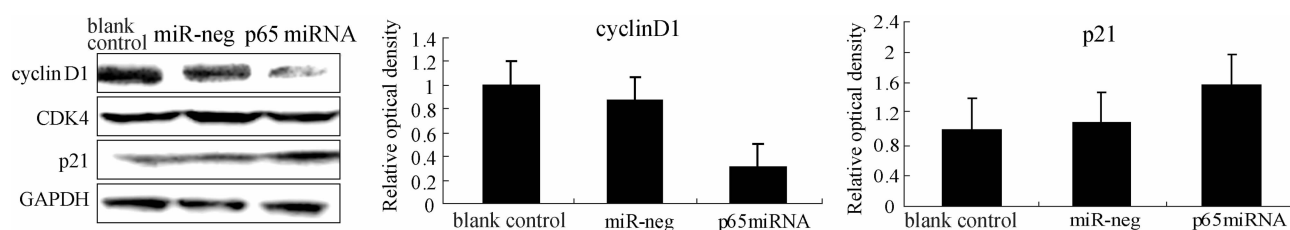


图 4 转染 p65 miRNA 后 MDA-MB-231 细胞中 cyclinD1、CDK4、p21 蛋白的表达

Figure 4 Expression of cyclinD1, CDK4 and p21 in MDA-MB-231 cells after p65 miRNA transfection

3 讨论

NF- κ B 是一种具有多向性调节作用的核转录因子^[5],其中 p50/p65 是最早被发现的,也是 NF- κ B 成员中主要发挥生理作用的二聚体。Sovak 等^[6]早在 1997 年就发现 NF- κ B 的异常核内表达和乳腺癌的发生紧密相关。Biswas 等^[7-8]报道,在雌激素受体阴性的乳腺癌中 NF- κ B 活性显著高于雌激素受体阳性乳腺癌,尤其在组织分化差、且伴有淋巴结转移的浸润性导管癌中 NF- κ B 活性更高。因此,NF- κ B 构成性活化可能是雌激素受体阴性乳腺癌易产生化疗耐药性的一个主要原因。体外实验证实,采用 NF- κ B siRNA 处理,120 h 后乳腺癌细胞数量减少 30%^[9]。我室的前期研究也发现,塞来昔布可以通过抑制 NF- κ B 转录活性,从而抑制 MDA-MB-231 细胞增殖、诱导细胞的凋亡^[3-4]。

本实验采用 miRNA 干扰技术构建靶向 p65 miRNA 的表达载体,其中 pcDNATM 6. 2-GW/EmGFP-miR 质粒载体含有 pol II 启动子,便于细胞内转录 miRNA 以及今后筛选稳定干涉后的细胞^[10]。我们设计针对 p65 的 miRNA 真核载体,转染乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后,细胞 p65 mRNA 表达基本消失。EMSA 实验结果提示 p65 miRNA 在短时间内可以显著降低 MDA-MB-231 细胞中 NF- κ B DNA 的结合活性,说明我们从不同水平验

证了 p65 miRNA 的沉默效果。

细胞周期检测结果显示 p65 miRNA 转染 MDA-MB-231 细胞后 G_0/G_1 期细胞增多,进入 S 期细胞减少,表明靶向沉默 p65 基因可使 MDA-MB-231 细胞增殖受阻,出现了 G_0/G_1 期阻滞。NF- κ B 在组织细胞癌变的过程中起着重要作用,特别是 p65 亚基可反式激活很多基因,如血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶(MMP)、黏附分子(ICAM-1)、抗凋亡基因(Bcl-2 家族)等,进而调节肿瘤细胞的增殖、凋亡抵抗、血管形成、侵袭转移和耐药等生物学行为^[11]。在众多接受 NF- κ B 调控的基因中,cyclinD1 就是其下游的一个靶基因,它的基因启动子上有 NF- κ B、AP1 等顺式调控元件,可以接受它们的调控^[12-13]。cyclin D1 与 G_1 期密切相关,是细胞周期进程的启动子,在细胞周期调节过程中起正性调节的作用,其含量及活化程度在细胞增殖周期卡点 G_1/S 期转换过程中起限速作用^[14-15]。我们发现沉默 p65 基因后,cyclinD1 蛋白表达显著下降,表明 p65 基因可能通过调节 NF- κ B 的活性,下调了其下游的靶基因 cyclinD1,使细胞停滞在 G_0/G_1 期从而抑制细胞进入 DNA 合成期和有丝分裂期。CDK4 是一种可以和 cyclinD1 等结合形成复合物、促进细胞从 G_1 期进入 S 期的细胞周期蛋白依赖性激酶。随着 CDK4 的活化,可以启动 S 期相

关基因的转录,引起细胞分裂或转化。实验结果发现,转染 p65 miRNA 并没有对 CDK4 分子的表达产生明显的影响。但是我们发现 p21 蛋白的表达随着 p65 基因的下调而增加。p21 是一种细胞周期抑制蛋白,它可以结合并抑制 p53 的转录活性,阻止损伤的 DNA 复制,防止肿瘤细胞的增殖^[16]。

本研究提示,利用 miRNA 干扰技术阻断 p65 基因的表达能改变 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的生物学行为、诱导 MDA-MB-231 细胞发生 G₀/G₁ 周期阻滞,主要是通过下调 cyclinD1 分子、上调 p21 蛋白的表达而实现的。以上研究结果表明,p65 可能在乳腺癌发病机制中起着重要的作用,并与乳腺癌的发生、发展有着一定的相关性。

参考文献:

- [1] Autier P, Héry C, Haukka J, et al. Advanced breast cancer and breast cancer mortality in randomized controlled trials on mammography screening [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(35): 5919-5923.
- [2] McCracken M, Olsen M, Chen MS Jr, et al. Cancer incidence, mortality, and associated risk factors among Asian Americans of Chinese, Filipino, Vietnamese, Korean, and Japanese ethnicities[J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(4): 190-205.
- [3] 王玲, 刘丽宏, 单保恩, 等. Celecoxib 下调 NF- κ B 信号通路促进人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的体外研究[J]. *癌症*, 2009, 28(6): 569-574.
- [4] 王玲, 张奇, 单保恩, 等. 塞来昔布通过阻断 NF- κ B 信号通路诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞周期阻滞的相关研究[J]. *中国癌症杂志*, 2009, 19(1): 33-38.
- [5] Boersma MC, Meffert MK. Novel roles for the NF-kappaB signaling pathway in regulating neuronal function[J]. *Sci Signal*, 2008, 1(6): pe7.
- [6] Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer[J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(12): 2952-2960.
- [7] Biswas DK, Dai SC, Cruz A, et al. The nuclear factor kappa B (NF-kappa B): a potential therapeutic target for estrogen receptor negative breast cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18): 10386-10391.
- [8] Singh S, Shi Q, Bailey ST, et al. Nuclear factor-kappaB activation: a molecular therapeutic target for estrogen receptor-negative and epidermal growth factor receptor family receptor-positive human breast cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(7): 1973-1982.
- [9] Monks NR, Pardee AB. Targeting the NF-kappa B pathway in estrogen receptor negative MDA-MB-231 breast cancer cells using small inhibitory RNAs[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(1): 221-233.
- [10] Wang QZ, Xu W, Habib N, et al. Potential uses of microRNA in lung cancer diagnosis, prognosis, and therapy[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(4): 572-594.
- [11] Wang S, Liu Z, Wang L, et al. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(5): 327-334.
- [12] Hinz M, Krappmann D, Eichten A, et al. NF- κ B function in growth control: Regulation of cyclin D1 expression and G₀/G₁-to-S-phase transition[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(4): 2690-2698.
- [13] Liao DJ, Thakur A, Wu J, et al. Perspectives on c-Myc, CyclinD1, and their interaction in cancer formation, progression, and response to chemotherapy[J]. *Crit Rev Oncog*, 2007, 13(2): 93-158.
- [14] Sgambato A, Han EK, Zhang YJ, et al. Deregulated expression of cyclin D1 and other cell cycle-related genes in carcinogen-induced rat mammary tumors[J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(9): 2193-2198.
- [15] Rudas M, Lehnert M, Huynh A, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1767-1774.
- [16] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6): 400-414.

[编辑:黄国玲;校对:周永红]