网络出版时间: 2016 - 5 - 9 15: 43: 10 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34. 1065. R. 20160509. 1543. 028. html

慢病毒介导的 FoxA1 高表达 对乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖凋亡探究

郑 璐 汤 铜 钱 波 周连帮 万圣云 张 磊 史加宁 李 佳

摘要 目的 利用慢病毒载体,构建乳腺癌 MCF-7 高表达 FoxA1 细胞株,并初步探究 FoxA1 对乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖凋亡的影响。方法 将 FoxA1 基因重组构建慢病毒载体穿梭质粒 EX-Z1010-LV201 经 PCR 和测序后在脂质体 Lipofectamine2000 介导下转染 293T 细胞包装慢病毒,嘌呤霉素筛选出稳定转染的细胞,Real-Time PCR 法检测稳定转染MCF-7 细胞株中 FoxA1 基因的表达水平,MTT 及流式细胞术对比高表达 FoxA1 细胞株与对照细胞株增殖凋亡差异。结果 PCR 扩增和测序结果证实成功构建 FoxA1 慢病毒载体并包装慢病毒,成功筛选出 FoxA1 高表达的乳腺癌 MCF-7 细胞系。MTT 及流式细胞术结果显示:与对照组比较,上调FoxA1 乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖下降,凋亡率增加。结论成功构建了重组慢病毒载体,并筛选出稳定高表达 FoxA1 的MCF-7 细胞株,FoxA1 可能参与了乳腺癌 MCF-7 细胞株增殖周亡调控,为下一步进行其机制探讨提供了依据。

关键词 FoxA1; 慢病毒载体; MCF-7; 增殖凋亡中图分类号 R 346

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2016)06 - 0822 - 06

根据美国癌症协会(ACS)估计 美国 2014 年确 诊的乳腺浸润性癌约235 030例 新确诊的乳腺癌病 例约 62 980 例 死于的患者约 40 430 例^[1] ,另外约 64 640 例妇女在同年被诊断患有乳腺原位癌^[2] ,乳腺癌已成为美国妇女最常见的恶性肿瘤 ,在过去的几十年乳腺癌的发病率逐年上升 ,而死亡率呈现下降趋势 ,这得益于对乳腺癌早期发现和更加有效的治疗。FoxA1(Forkhead box A1)属于 Fox 转录因子家族成员之一^[3] ,又名肝核因子 3(HNF-3α) ,因其是从肝脏中纯化而命名。已有报道^[4-6]显示 FoxA1 在人体许多组织中如乳腺、前列腺、甲状腺、膀胱、食管、胰腺和肝等部位的组织普遍表达 ,在雌激素受体阳性的 luminal 型乳腺癌中 FoxA1 尤其有很高的表达 ,并且具有较好的分化和药物敏感性 ,有望成为分

2016-03-04 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1308085 QH152)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院普外科 /合肥 230601

作者简介: 郑 璐 女 硕士 医师;

汤 铜,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: tt20164@126.com

子分型及预后判断的一个标志物,提示了其在乳腺癌中的潜在的研究价值。慢病毒(Lentivirus)属于逆转录病毒科(Rerrovidae)。这类病毒因含有逆转录酶,故称为逆转录病毒^[7]。而慢病毒载体(Lentivirus vectors)与其他逆转录病毒载体相比,具有可携带目的基因片段大、目的基因表达时间长、可侵染分裂细胞及非分裂细胞、不易诱发宿主免疫排斥反应等优点。该研究拟用慢病毒载体介导,构建稳定过表达 FoxA1 的 MCF-7 乳腺癌细胞株,为研究该基因对ER(+)的乳腺癌细胞株作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 生物安全柜(北京 AIRTECH 公 司); 荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); CO。培养 箱(德国 Thermo 公司);质粒抽提试剂盒、Rotorgene Real-Time PCR 仪(美国 Qiagen 公司); GIS-2009 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司); 乳腺癌 MCF-7 细胞株由中国科学技术大生命科学院朱涛教 授惠赠; DMEM 培养基 + 10% FBS、Trypsin-EDTA Solution (0.05% Trypsin-EDTA) (南京 Corning 公 司); 胎牛血清、胰酶和 DMEM 培养基(德国 Gibco 公司);嘌呤霉素(日本 Sigma 公司);6 孔板(美国 BD 公司); 293T 细胞、Lipofectamine2000、RNAzol RT RNA Isolation Reagent: GeneCopoeia (Cat. No. E01010A); First Strand cDNA Synthesis Kit: GeneCopoeia (Cat. No. C0210A); All-in-OneTM Q-PCR Mix: GeneCopoeia (Cat. No. AOPR-0200) Primer synthesis (美国 Invitrogen 公司); M-MLV 逆转录酶和 dNTP (美国 PROMEGA 公司); OligodT(上海生工公司); Marker(加拿大 Fermentas 公司); Age I 酶(美国 NEB 公司); 慢病毒表达载体穿梭质粒 EX-Z1010-LV201、Lentivirus-病毒液: LP-Z1010-Lv202-C0010、 LP-NEG-Lv202-0200(广州复能公司); Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 凋亡检测试剂盒(美国 Beckman 公司)。

1.2 细胞培养 乳腺癌 MCF-7 细胞株培养于 DMEM 培养液(另含有 10% 胎牛血清、100 μg /ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素) ,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养。

1.3 FoxA1 表达载体的构建

- **1.3.1** 引物设计及合成 上游引物: 5′-GCGGTAG-GCGTGTACGGT-3′,下游引物: 5′-CTGGAATAGCT-CAGAGGC-3′。
- 1.3.2 重组慢病毒载体质粒的构建 将含目的基因的表达质粒 ,利用 PCR 技术扩增 ,用 Not I 酶切载体 EX-Z1010-LV201 ,琼脂糖凝胶电泳进行分离纯化。然后将 Afl II 质粒载体酶切产物与 rFoxA1 的酶切产物分别琼脂糖凝胶电泳 ,回收试剂盒将电泳产物纯化。将上一步纯化后的 2 个产物 4 $^{\circ}$ C 过夜进行连接 ,转化感受态细胞 ,采用 PCR 鉴定细菌阳性克隆 ,质粒测序送往广州复能公司。
- 1.4 慢病毒包装及滴度测定 将 12 μg EX-Z1010-LV201 质粒与相应体积的 Opti-MEM 充分混合,再 与相应体积的 DNA-Lipofectamine 2000 混合均匀 室 温下温育 20 min 将混合液均匀滴至含有 293T 细胞 的培养皿中,于37 ℃、5% CO,培养箱中培养。培养 约6~8 h 后弃去混合液,加入含血清的完全培养 基 ,于 37 ℃、5% CO, 培养箱内继续培养 36~48 h。 吸取上清液 4 000 r/min、4 ℃ 离心 10 min ,以 0.45 μm 滤器过上清液于 40 ml 超速离心管中。再次 25 000 r/min 4 ℃离心 20 min ,冰 PBS 重悬病毒沉 淀 A ℃溶解后过夜。以 15 μl 每管分装病毒液 ,置 干-80 ℃冰箱中长期保存。慢病毒液依次按10倍 梯度稀释为6个浓度后,分别感染293T细胞,细胞 培养于 DMEM 培养液 约 3 周左右弃去培养液 PBS 反复漂洗后 结晶紫染色 倒置显微镜观察细胞克隆 数目。
- 1.5 病毒感染及稳转株的筛选 将 MCF-7 细胞计数后铺到 6 孔板中培养,各孔加入 2 ml DMEM 培养基(添加 10% FBS、青霉素 链霉素双抗溶液),在5% CO₂条件下,37 ℃培养 24 h。铺板 24 h 后每孔加入 LP-Z1010-Lv202-C0010 50 μl 慢病毒,LP-NEG-Lv202-0200 加入 20 μl 慢病毒到 MCF-7 细胞中,混匀后于 37 ℃、5% CO₂培养 48 h。感染 48 h 后,观察慢病毒侵染结果,拍摄细胞荧光图片。用胰酶消化感染过的细胞并转移至 6 孔板(每块 6 孔板对应一种慢病毒,留出 1 孔用于阴性对照细胞),以含 2 μg/ml 嘌呤霉素的 DMEM 培养基(添加 10% FBS、青霉素 链霉素双抗溶液)进行药筛培养。连续加药培养 12 d(嘌呤霉素浓度 2 μg/ml),待细胞长满后,收取样品进行后续检测。

1.6 FoxA1 高表达检测

- 1.6.1 RNA 抽提 先离心收集细胞 约($5 \sim 10$) × 10^6 细胞数加 1 ml TRIzol 反复吹打裂解细胞。每 1 ml TRIzol 中加入 200 μl 氯仿 ,盖上盖子 ,振荡混匀约 15 s ,室温静置 $2 \sim 5$ min ,然后 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ 离心约 15 min 轻柔取出离心管 ,小心吸取最上层上清液约 450 μl(每 1 ml TRIzol 的吸取量)至事先预备好的一支含有 600 μl 冷冻异丙醇的新离心管中 ,上下颠倒混匀 , -20 $^{\circ}$ 静置至少 30 min ,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ 离心 10 min。 弃上清液 ,加入 500 μl 冷冻的 75% 乙醇溶液 ,混匀后 12 000 r/min、4 $^{\circ}$ 离心 5 min ,弃去上清液 ,再次离心 吸弃上清液。将沉淀自然风干 ,加入约 $30 \sim 50$ μl DEPC 水溶解沉淀 ,贴上标签 -80 $^{\circ}$ 保存备用。
- 1.6.2 反转录反应 解冻 First Strand cDNA Synthesis Kit 的试剂 混匀 应用逆转录试剂盒合成 cD-NA 反应条件如下: $42 \, ^{\circ} \mathbb{C} \, \sqrt{30} \, \min \, 95 \, ^{\circ} \mathbb{C}$ 变性 5 min , $4 \, ^{\circ} \mathbb{C} \, \mathbb{U} \, \sqrt{5} \, \min$.
- 1.6.3 Real-Time PCR 实验 两细胞株 cDNA 产物进行 Real-Time PCR 实验 ,反应条件如下: 首先 95 $^{\circ}$ % $^{\circ}$ min , 然后 95 $^{\circ}$ 变性 30 s , 60 $^{\circ}$ 退火 15 s ,共循环 40 次 ,最后绘制熔解曲线 ,按照 SYBR Green 染料 Rotor-gene 3000 设置。实验结果按照 $2^{-\Delta\Delta C_1}$ 方法计算: 目的基因拷贝数 $2^{-\Delta\Delta C_1}$ = $2^{-(\Delta C_1 \equiv 0)}$,每个基因同时设复孔 3 个 重复 3 次。
- 1.7 MTT 法检测 FoxA1 上调后 MCF-7 增殖水平改变 取对数生长期含目的基因稳转株 LP-Z1010—Lv202-C0010 和对照病毒稳转株 LP-NEG-Lv202-0200 按5 000个/孔接种于 96 孔板 ,共接种 5 板 ,每组9 孔 ,另取 1 孔为对照 ,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 ,分别取 24、48、72、96、120 h 各时间点 1 板 ,每孔各加入 20 $^{\circ}$ μl(5 mg/ml) MTT ,继续培养 4 h ,终止培养 ,去除孔内上清液 ,每孔加入 150 $^{\circ}$ μl DMSO ,震荡 10 min ,选择 490 nm 波长 ,在酶标仪上测定各孔光密度(optical density ,OD) 值 ,重复 3 次 ,取平均值。
- 1.8 流式细胞术检测 FoxA1 上调后 MCF-7 凋亡水平改变 按50 000个/孔接种于6 孔板 培养72 h后 按 AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit 凋亡检测试剂盒步骤检测两组细胞株凋亡差异,分别记录含目的基因稳转株 LP-Z1010-Lv202-C0010 和对照病毒稳转株(LP-NEG-Lv202-0200) 早期凋亡(An+PI-) 及晚期凋亡(An+PI-) 细胞总百分率 重复3次 取平均值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,若服从正态分布资料,两组均数间的比较采用两组独立样本 t 检验,若为偏态分布资料,两组均数间的比较采用两独立样本非参数检验。

2 结果

2.1 FoxA1 质粒构建 rFoxA1 扩增的条带处于 1 000 bp 与2 000 bp 之间 ,大约为1 400 bp ,与目的条带相符 ,见图 1。



图 1 目的基因 rFoxA1 PCR 扩增产物电泳 M: Marker; 1、2、3: rFoxA1 的目的基因片段

- 2.1 FoxA1 过表达慢病毒构建 将 FoxA1 基因重组构建慢病毒载体穿梭质粒 EX-Z1010-LV201 ,载体结构图及酶切质粒结果见图 2、3。
- 2.2 MCF-7 细胞 FoxA1 高表达体系建立
- 2.2.1 荧光倒置显微镜观察慢病毒转染 转染细胞株于荧光倒置显微镜观察细胞生长状态及转染效率 ,见细胞生长状态良好 ,转染后细胞荧光强度高 ,见图 4。
- 2.2.2 Real-Time PCR 法检测对照及稳转株表达 采用 Real-Time PCR 法检测对照及稳转株内参基因 GAPDH 及基因 FoxA1 mRNA 水平表达情况 分别绘制扩增曲线及熔解曲线 见图 5。
- 2.2.3 FoxA1 表达量分析结果 针对载体 pEZ-Lv202 设计特异性引物进行反转录 ,目的稳转株 LP-

Z1010-Lv202 中 FoxA1 的表达量为对照稳转株 LP-NEG-Lv202 的 46. 19 倍 ,见表 1。

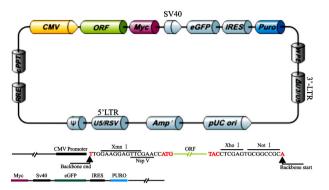


图 2 慢病毒 EX-Z1010-Lv202 载体

表 1 Real-Time PCR 法检测对照及稳转株表达结果

_	荧光强 度 Ct 值	荧光强 度 Ct 值	FoxA1 突变 体相对于	相对于对照稳定	FoxA1 突变 体表达
项目	平均值	平均值	GAPDH 的	村思想走 株差异	差异倍数
	(FOXA1)	(GAPDH)	表达量(ΔCt)	($\Delta\Delta$ Ct)	$(2^{-\Delta\Delta Ct})$
目的稳转株	25.87	18.59	7. 28	-5.53	46. 19
LP-Z1010-Lv202-C0010 对照稳转株	32.58	19.77	12.81	0.00	1.00
LP-NEG-Lv202-0200	32.30	17.77	12.01	0.00	1.00
乳腺癌细胞(MCF-7)	38.24	23.86	14.38		

- **2.3** FoxA1 表达量上调后 MCF-7 增殖水平改变 MTT 结果显示,第 2 天(t=20.280,P<0.01)、第 3 天(t=9.473,P<0.01)、第 4 天(t=12.742,P<0.01)、第 5 天(t=8.892,P<0.01) FoxA1 过表达细胞株增殖水平均较对照细胞株下降,可见 FoxA1 高表达可下调 MCF-7 细胞株增殖水平(t=4.472,P<0.01),见图 6。
- 2.4 FoxA1 表达量上调后 MCF-7 凋亡水平改变

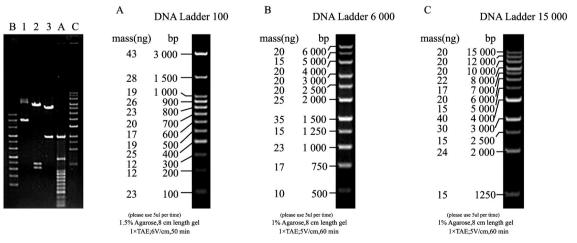


图 3 酶切鉴定的电泳结果

Lane M: 100(A)、6 000(B)、15 000(C) bp DNA Ladder; 1: 慢病毒 EX-Z1010-lv202; 2: 慢病毒 EX-Z1010-lv202NotI 酶切结果 共有 3 条预期酶切条带(7 872、1 036、1 171 bp); 3: EX-Z1010-lv202 AfI II 酶切结果 共有 2 条预期酶切条带(2 960、7 119 bp)

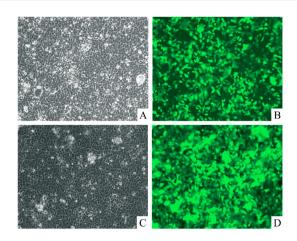


图 4 稳转株细胞及荧光照片 ×100

A: 细胞照片; B: 含目的基因稳转株(LP-Z1010-Lv202-C0010) 荧光照片; C: 细胞照片; D: 对照病毒稳转株(LP-NEG-Lv202-0200) 荧光照片

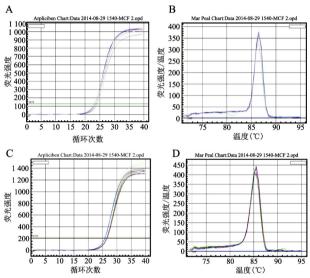


图 5 Real-Time PCR 法检测内参基因 GAPDH 及目的基因 FoxAl A: GAPDH 基因扩增曲线; B: GAPDH 基因扩增后熔解曲线; C: FoxAl 基因扩增曲线; D: FoxAl 基因扩增后熔解曲线

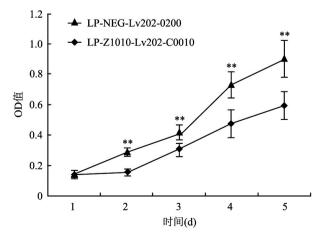


图 6 MTT 法比较两细胞株增殖差异(n=3 x±s) 与 LP-Z1010-Lv202-C0010 比较: **P < 0.01

根据流式细胞术检测 LP-Z1010-Lv202-C0010 及 LP-NEG-Lv202-0200 凋亡率分别为(5.10 ± 0.37)% (3.50 ± 0.26) % 较对照细胞株 FoxA1 高表达可上调 MCF-7 细胞株凋亡率(Z=-2.309 P=0.021) ,见图 7。

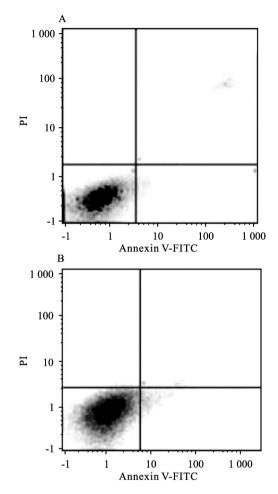


图 7 流式细胞术检测两细胞株凋亡(n = 3 x ± s) A: LP-Z1010-Lv202-C0010; B: LP-NEG-Lv202-0200

3 讨论

Fox 家族基因又称叉头基因自 1989 年最早在果蝇中被发现,各种不同的种属逐渐被人们认识,目前根据其结合区域的相似性,在不同种属中已发现100 多个 Fox 家族成员,包括 FoxA-FoxS,分属于 17个不同亚族。其家族的特征性结构称为叉头盒(Fork-head box),其特征结构的 DNA 结合区域为具有进化保守性的 110 个氨基酸组成。该特征结构位于蛋白质的核心区域,由 3 个 α 螺旋和 2 个翼状的环形结构组成,外观形似蝴蝶,故又称为带翼的螺旋区域(DBD)。FoxA 家族包括 FoxA1-Fox3 3 个亚群,因其最早从小鼠肝细胞中被发现,故又名肝核心因子(HNF)。以 FoxA1 为代表,在人类染色体上,

FoxA1 定位于 14q21.1 其核心区域位于 N-端 ,又称 叉头区域或翼状螺旋域(WHD) 结构(H1-S1-H2-H3-S2-L1-S3-L2),包括 3 个 β -折叠 S α -螺旋 H 和 2 个循环形成的螺旋般的翅膀 [S] 。

FoxA 与 DNA 的结合区域类似于组蛋白 H 结构 、C-端能够与组蛋白 H3、H4 作用,FoxA 通过与染色质相关作用,可以替代组蛋白 H1 功能,使染色质结构松散,同时还参与了组蛋白 H3 第 4 个赖氨酸的单二甲基化和 DNA 去甲基化过程^[9]。这些特征结构使 FoxA 能够与染色质紧密结合,并且即使在缺乏其他染色质修饰酶情况下,也能够松解核小体。FoxA 还可以提高染色质对其它转录因子的募集能力,同时通过招募其它转录因子并联合 ATP 酶,进一步使染色质结构松解,因此,FoxA 被誉为"先锋因子"^[10]。

国内对 FoxA1 研究的文献较少,研究[11-12]报 道: 转录因子 FoxA1 在人体多种组织中,如: 甲状 腺、肺、白血病、乳腺、肝、膀胱、胰和前列腺等中均可 检测到其表达,并可以和大约一百多个启动子结合, 共同调节细胞信号及细胞周期。研究[13]显示 FoxA1 在肺癌、白血病、分化型甲状腺癌、乳腺癌、胰 腺癌和转移性前列腺癌组织中高表达。研究[14]证 实乳腺癌细胞中,FoxA1 可以与多个雌激素受体结 合位点相关作用 其与雌激素受体共同对下游靶基 因的转录进行调控。乳腺癌细胞株普遍高表达 FoxA1 ER 阳性乳腺癌患者高表达 FoxA1 往往预示 较好的预后。最新的报道^[15]显示 ,FoxA1 同样能够 与甲基化相关的增强子结合 解开其致密结构 促进 多种基因的表达上调。FoxA1 是否参与调控全基因 组甲基化信号传导通路 ,能否通过改变 FoxA1 表达 来调控肿瘤相关基因的甲基化状态,进而干扰相关 癌基因及抑癌基因的表达是本课题组研究的方向。

参考文献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics 2014 [J]. CA Cancer J Clin 2014 64(1):9-29.
- [2] Desantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics 2013

- [J]. CA Cancer J Clin , 2014 64(1):52-62.
- [3] Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes [J]. Cancer Lett 2013, 328 (2):198-206.
- [4] 郑 璐 汤 铜 浅 波. FoxA 家族在肿瘤发生发展中的作用研究进展[J]. 癌症进展 2014 ,12(1):40-3.
- [5] Zheng L, Qian B, Tian D, et al. FOXA1 positively regulated gene expression by changing gene methylation status in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015 8(1):96 – 106
- [6] Nakshatri H , Badve S. FOXA1 in breast cancer [J]. Expert Rev Mol Med 2009 ,11: e8.
- [7] Nagano M , Shinohara T , Avarbock M R , et al. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells [J]. FEBS Lett , 2000 , 475(1): 7 10.
- [8] Lalmansingh A S ,Karmakar S ,Jin Y ,et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins [J]. Biochim Biophys Acta 2012 ,18(19):707 -15.
- [9] Katoh M ,Igarashi M ,Fukuda H ,et al. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes [J]. Cancer Lett 2013 ,17(9): 198-206.
- [10] Sekiya T, Muthurajan U M, Luger K, et al. Nucleosome-binding affinity as a primary determinant of the nuclear mobility of the pioneer transcription factor FoxA [J]. Genes Dev, 2009, 23(7): 804-9.
- [11] Lin L, Miller C T, Contreras J I, et al. The hepatocyte nuclear factor 3 alphagene, HNF3alpha (FOXA1), on chromosome band 14q13 is amplified and overexpressed in esophageal and lung adenocarcinomas [J]. Cancer Res., 2002. 62(18): 5273-9.
- [12] Wolf I , Bose S , Williamson E A , et al. FOXA1: Growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer [J]. Int J Cancer , 2007 , 120(5): 1013 – 22.
- [13] Robbins C M, Tembe W A, Baker A, et al. Copy number and targeted mutational analysis reveals novel so-matic events in metastatic prostate tumors [J]. Genome Res, 2011, 21(1): 47-55.
- [14] Belikov S Oberg C , Jaaskelainen T , et al. FoxA1 corrupts the antiandrogenic effect of bicalutamide but only weakly attenuates the effect of MDV3100 [J]. Mol Cell Endocrinol , 2013 ,365(1):95 –107.
- [15] Sérandour A A, Avner S, Percevault F, et al. Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers [J]. Genome Res. 2011, 21(4): 555-65.

Overexpression of FoxA1 by an adenoviral vector and its effects on cell cycle and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells

Zheng Lu ,Tang Tong ,Qian Bo , et al

(Dept of General Surgery The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601)

Abstract *Objective* To investigate the effects of FoxA1 overexpression on proliferation and apoptosis of human

网络出版时间: 2016 - 5 - 9 15: 43: 10 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34. 1065. R. 20160509. 1543. 030. html

骨保护素/脱蛋白骨 对兔前交叉韧带重建腱 - 骨早期愈合的影响

管林聪 邹国耀 唐志宏 宋恩鸿 魏 冰

摘要 目的 探讨骨保护素(OPG)/脱蛋白骨(DPB)复合物对兔前交叉韧带(ACL)重建腱-骨早期愈合的影响。方法制备OPG/DPB复合物。80只实验兔随机分为4组(n=20)即OPG、DPB、OPG/DPB及对照组均建立ACL重建模型。实验组腱-骨界面分别相应植入OPG、DPB及OPG/DPB对照组不做处理。术后4、8、12周取材行病理观察及生物力学检测。结果 术后各时间点、OPG/DPB组腱-骨界面成熟度、Sharpey纤维数量及移植肌腱抗拉性能优于其余3组。结论 OPG/DPB复合物可显著促进ACL重建术后腱-骨早期愈合。

关键词 骨保护素;脱蛋白骨;复合物;前交叉韧带;重建中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2016)06 - 0827 - 05

前交叉韧带(anterior cruciate ligament ,ACL) 是稳定膝关节的重要结构 ,一旦损伤常造成膝关节松动进而影响功能。治疗方法首选 ACL 重建 ,但部分

2016-01-18 接收

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号: 2014GXNSFAA118239) 作者单位: 桂林医学院附属医院脊柱骨病外科 桂林 541001 作者简介: 管林聪 男 硕士研究生;

> 邹国耀,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhouguoyao2000@aliyun.com

患者术后腱 - 骨愈合不良影响手术效果。能否解决腱 - 骨愈合不良问题成为评判 ACL 重建是否成功的重要指标^[1]。骨保护素(osteoprotegerin ,OPG) 有促进骨愈合作用,可应用于 ACL 重建术提高手术效果,但由于"滑液灌注效应"等的影响,腱 - 骨界面中单纯应用 OPG 易流失。脱蛋白骨(deproteinized bone ,DPB) 为目前研究成熟的具有缓释功能的载体材料,该实验将 OPG 复合于 DPB 后植入 ACL 重建动物模型中,观察其对腱 - 骨早期愈合的影响,旨在为临床提供促进腱 - 骨愈合理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 OPG/DPB 复合物制作 根据丁真奇 等 $^{[2]}$ 方法制备 DPB ,经洗涤、捣碎、环氧乙烷消毒备用。将 DPB 与 OPG(北京博奥森生物技术有限公司,编号: EA- $^{[2]}$ 016 $^{[0]}$ 0.5 mg ,冻干粉剂) 水溶液混合后真空条件下置于 $^{[2]}$ 0 低温 $^{[4]}$ 4 $^{[4]}$ 6 h,使 OPG 水溶液充分吸附于 DPB ,即制作成 OPG/DPB 复合物,置于 $^{[4]}$ 6 冰箱常压保存备用。

1.1.2 动物分组 80 只清洁级健康成年新西兰大

breast cancer cell line MCF-7 by constructing high-level expression vetor FoxA1 for MCF-7 cell line. *Methods*FoxA1 gene was amplified by PCR to construct the recombinant shuttle plasmid EX-Z1010-LV201. After DNA sequence analysis, the recombinant lentiviral package plasmid was transfected into 293T cells by Lipofectamine 2000 to construct packed lentivirus. Stable transfected cell lines were selected out by puromycin. The FoxA1 protein expression level of stable MCF-7 cell line was detected by real-time PCR method. Differences of cell proliferation and cell apoptosis between FoxA1 overexpressed cell line and empty vector cell lines were determined by MTT assay and FCM. *Results* The recombinant FoxA1 lentiviral vectors and packed lentivirus were confirmed by PCR and DNA sequencing, and MCF-7 cell lines transfected by packed lentivirus which stably overexpress FoxA1 were successfully selected. MTT and FCM results presented a significant decrease of cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cell lines with up-regulated FoxA1. Conversely, more obvious apoptosis was presented in MCF-7 cell lines with up-regulated FoxA1 than the control group. *Conclusion* FoxA1 is successfully selected and MCF-7 cell lines are transfected by packed lentivirus which are stably overexpressed. FoxA1 is involved in some important intracellular process of breast cancer cell line MCF-7, such as cell proliferation and apoptosis. This research provides a valid evidence for further investigation on its mechanism.

Key words FoxA1; lentiviral vector; MCF-7 cell line; cell proliferation and apoptosis