

网络出版时间:2016/1/28 14:23:10 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.028.html

MTA2 基因敲除抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株增殖和迁移能力

翁 伟¹,徐元宏¹,宋晓菲²

摘要 目的 探讨人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 MTA2 基因敲减后,人乳腺癌生物学特性的改变。**方法** 体外化学合成 MTA2 序列特异性的 shRNA,经慢病毒转染人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 后,挑选出稳定低表达 MTA2 的细胞株。收集敲除了 MTA2 的细胞,定量实时荧光 PCR(qRT-PCR)、Western blot 法分别检测 MTA2 mRNA 和蛋白的抑制水平。采用 CCK-8 法、Transwell 迁移实验以及划痕实验观察敲减 MTA2 对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移能力的影响,体外利用裸鼠荷瘤实验进一步观察 MTA2 敲除后乳腺癌生长、转移能力的变化。**结果** MTA2 的 shRNA 有效地抑制了 MTA2 mRNA 和蛋白水平($P < 0.05$)。shRNA 干扰 MTA2 组的 MDA-MB-231 细胞,细胞增殖能力显著降低($P < 0.05$);细胞侵袭、迁移能力明显降低($P < 0.05$);裸鼠荷瘤实验中 MTA2 下调组瘤体明显更小,而且肺部转移灶明显减少($P < 0.05$)。**结论** MTA2 被稳定干扰后,乳腺癌的某些恶性生物学行为能有效抑制;表明 MTA2 与乳腺癌的生长、转移有一定关系。

关键词 RNA 干扰;MTA2;乳腺癌;生长;转移

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)03-0373-05

转移相关基因家族(metastasis-associated gene family, MTA)家族包含 3 个成员,MTA1、MTA2 和 MTA3。MTA1 在很多肿瘤中高表达,如乳腺癌、食管癌、胰腺癌和肝细胞肝癌等^[1],并且参与了肿瘤的转移和浸润^[2-3]。MTA2 在蛋白结构上与 MTA1 具有很高的同源性,并且与核小体重构及组蛋白去乙酰化酶 NuDR 复合物有关^[4-5]。因此 MTA2 也可能参与了实体肿瘤的生长及转移。RNA 干扰技术可以有效地在转录后水平沉默基因,是一种具有高度特异性、高效性以及自我维持能力的技术,目前已

成为基因沉默疗法更为理想的工具^[6]。该研究组体外化学合成 MTA2 的 shRNA,进行慢病毒包装,构建稳定低表达 MTA2 基因的细胞株 MDA-MB-231。通过该细胞系与未感染慢病毒的细胞进行细胞增殖和转移能力的对比,以及裸鼠荷瘤实验中两组裸鼠瘤体大小及肺部转移灶的差别,观察 MTA2 干扰后人乳腺癌生物学特性的改变。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231(中科院细胞库);MTA2、 β -actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成;RNA TRIzol(美国 Invitrogen 公司);PrimerScript RT reagent Kit、SYBR Premix EX TagTM试剂(日本 TaKaRa 公司);小鼠抗人单克隆抗体 MTA2、 β -actin 以及羊抗鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司);NC shRNA 以及特异性干扰 MTA2 的 shRNA 序列由上海吉凯公司合成;MTA2 的 shRNA 序列为 5'-CCCTCTTGAATGAGACAGATACTCCGACTATCTGTCTCATTCAAGAGGG-3';Transwell 小室(美国 Corning 公司);Matrigel 胶(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 定量实时荧光 PCR(qRT-PCR)法检测 MTA2 的 mRNA 表达 转染后 48 h 收集细胞,按 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA,经 PrimeScript RT reagent Kit 合成 cDNA。然后使用 SYBR Premix EX-TaqTM试剂,进行荧光 PCR 定量检测。MTA2 上游引物:5'-TGTACCGGCTGGGAGATTAC-3',下游引物:5'-TGAGGCTACTAGAAATGTCCCTG-3'。 β -actin 为内参,上游引物:5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3',下游引物:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。反应条件为:94 °C 预变性 3 s,94 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,共 40 个循环。Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环,空白对照组与实验组及阴性对照组的比较以 MTA2 荧光定量结果的 Ct 值减去 β -actin 的 Ct 值得 Δ Ct,以空白对照组 RNA 的 Δ Ct 作为校正数,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值为 MTA2 基因的相对表达量。

2015-12-08 接收

基金项目:安徽省科技创新公共服务平台项目(编号:PT20081011)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

²铜陵市人民医院输血科,铜陵 244009

作者简介:翁 伟,男,主管检验师;

徐元宏,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:xyhong1964@163.com

1.2.2 Western blot 法检测 用 RIPA 和 PMSF 提取转染 48 h 的各组培养细胞总蛋白。BCA 法定蛋白浓度。经 12% SDS-PAGE 胶电泳后转膜,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加一抗 4 ℃ 孵育过夜。次日加二抗 37 ℃ 温育 1 h,ECL 发光液显色。以 β -actin 为内参。

1.2.3 荧光显微镜观察转染效率 参照吉凯基因提供的说明书,在转染后 8 h 荧光显微镜下观察转染效率。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞增殖能力 正常和感染了病毒的 MDA-MB-231 细胞分别混悬,按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板。分别于培养后 1、2、3、4、5 d 为检测点。每次检测前,在培养液中每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂,37 ℃ 温箱孵育 2 h,然后用酶标仪检测 450 nm 处吸光度值。吸光度值代表细胞增殖情况。

1.2.5 划痕试验 取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,按 1×10^5 个孔接种于 6 孔板,温育 24 h 后分别加入浓度 50 nmol 含有 Lv-shNC (阳性对照组) 或 Lv-shMTA2 (实验组) 的培养基,继续培养 24 h 后细胞已铺满 6 孔板,利用枪头尖在细胞培养液表面划一条划痕(长约为 2 cm),继续培养 12、24 h 后镜下观察各组 MDA-MB-231 细胞迁移变化情况。

1.2.6 Transwell 侵袭试验 将 Matrigel 胶(50 μ l/孔)均匀地铺在 Transwell 小室膜上,收集转染 48 h 后的各组细胞 2×10^5 个,用 200 μ l 无血清 1640 培养液稀释后接种到小室中,将小室置于加有 600 μ l 15% FBS 1640 培养液的 24 孔板内,37 ℃、5% CO₂ 孵育 72 h 后取出小室,小心擦掉小室细胞,磷酸盐

缓冲液(PBS)洗 3 次,4% 多聚甲醛固定,Giemsa 染色,显微镜下计数 5 个视野的细胞数,求出每个视野的平均穿膜细胞数。

1.2.7 裸鼠荷瘤实验 将分别感染了 Lv-shNC 和 Lv-shMTA2 病毒颗粒的 MDA-MB-231 细胞混悬,以 200 μ l/支的细胞悬液注射入乳腺脂肪垫。两组裸鼠除注射的细胞悬液不同外,操作一致。以后每隔 3 d 检测一次裸鼠荷瘤的瘤体大小。到第 30 天将两组裸鼠安乐死。分别解剖,观察计数肺部转移灶情况。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 qRT-PCR 及 Western blot 法检测 shRNA 干扰 MTA2 基因及蛋白的表达 分别感染了含 Lv-shNC 和 Lv-shMTA2 的病毒颗粒转 MDA-MB-231 细胞内,当细胞生长密度达到约 70% 时,在荧光显微镜下观察:计数 100 个细胞,其中有绿色荧光的约占 80%。见图 1。转染后 48 h 分别收集细胞的总 RNA 和总蛋白,经 qRT-PCR 分析可见实验组 MTA2 相对量 (1.090 ± 0.098) 较阴性对照组 (0.205 ± 0.004) 显著降低 ($t = 20.18, P < 0.05$)。见图 2。Western blot 法检测实验组和阴性对照组 MTA2 蛋白水平也表明,实验组的 MTA2 水平显著降低。见图 3。提示 MTA2 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞内被明显敲除。

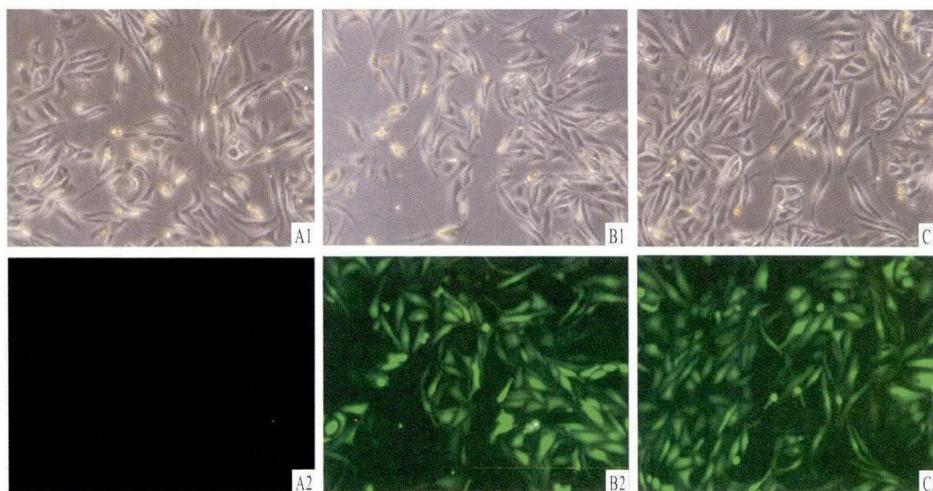


图1 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞感染慢病毒后感染效率 $\times 100$

A:空白对照组;B:Lv-shNC;C:Lv-shMTA2;1:白光;2:荧光

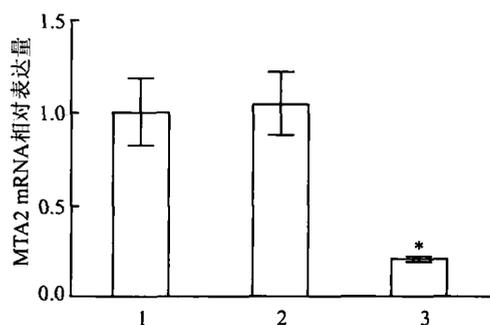


图2 qRT-PCR法检测乳腺癌细胞MTA2敲减后mRNA表达

1:空白对照组;2:Lv-shNC;3:Lv-shMTA2;与空白对照组比较:* $P < 0.05$

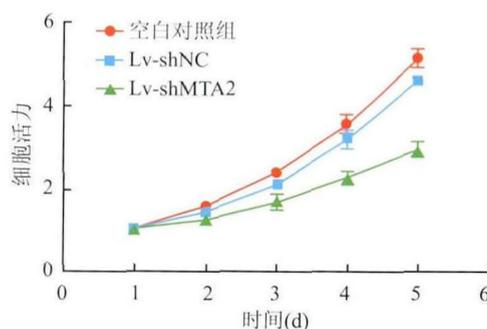


图4 CCK-8法检测转染shRNA后MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖活性与空白对照组比较:* $P < 0.05$

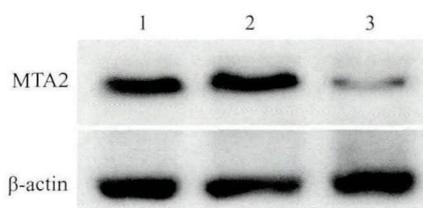


图3 Western blot法检测乳腺癌细胞中MTA2敲减后蛋白表达

1:空白对照组;2:Lv-shNC;3:Lv-shMTA2

2.2 MTA2干扰后MDA-MB-231细胞增殖能力检测

CCK-8法显示,阴性对照组与实验组在第二个监测点(第2天)时开始出现明显差异,表现为实验组细胞增殖能力明显降低,到第5天时实验组细胞吸光度值为 (4.67 ± 0.09) ,而阴性对照组为 (2.47 ± 0.12) ,实验组约为阴性对照组细胞活力的一半($F = 9.220, P < 0.05$)。见图4。

2.3 MTA2敲除后细胞侵袭、迁移能力的变化

划痕试验显示,随着时间的推移,阴性对照组愈合速度

较实验组快(图5);Transwell迁移试验显示,在高倍镜视野下,阴性对照组的细胞数目显著高于实验组 $[(591.0 \pm 32.1) vs (237.0 \pm 20.4), P < 0.05]$,见图6。因此,MTA2被敲减后,MDA-MB-231细胞的侵袭、迁移能力明显降低。

2.4 MTA2干扰后肿瘤大小及肺部转移灶的改变

为了在体内研究MTA2干扰后乳腺癌生长的改变以及乳腺癌转移到肺部的转移灶变化情况,进行了裸鼠荷瘤实验。结果表明,转染了shMTA2后,小鼠负荷的肿瘤大小明显较阴性对照组小。而在计数肺部转移灶时显示,阴性对照组有4只裸鼠出现了肺部转移灶(4/6),这4只裸鼠肺部转移灶个数分别为32、45、15、40个。实验组6只裸鼠则有3只出现了肺部转移灶(3/6),3只裸鼠肺部转移灶个数分别为9、10、4个。说明MTA2干扰后,乳腺癌细胞的肺转移能力也明显被抑制($P < 0.05$)。见图7。

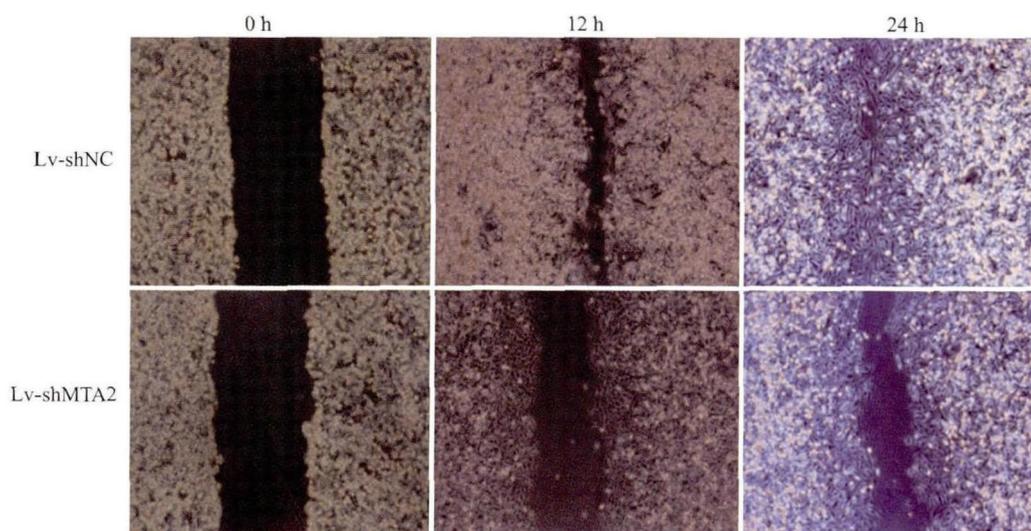


图5 乳腺癌细胞中MTA2敲减后,划痕实验检测细胞的迁移能力 $\times 100$

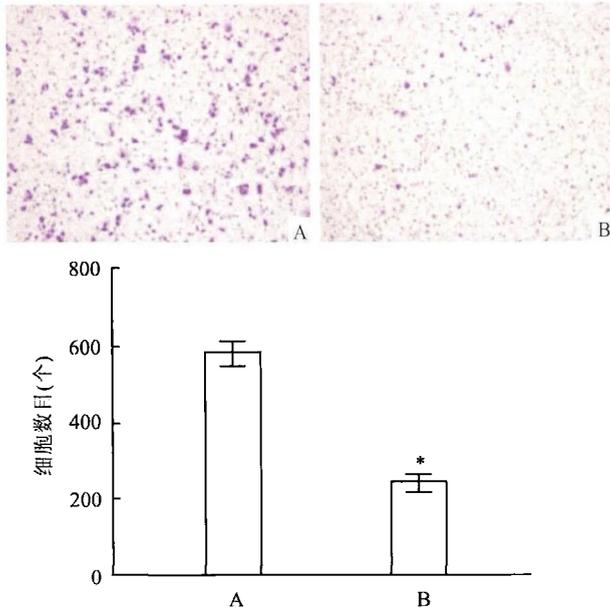


图6 MTA2 敲减后,Transwell 实验检测细胞的迁移能力 ×100
A: Lv-shNC; B: Lv-shMTA2; 与 Lv-shNC 比较: * P < 0.05

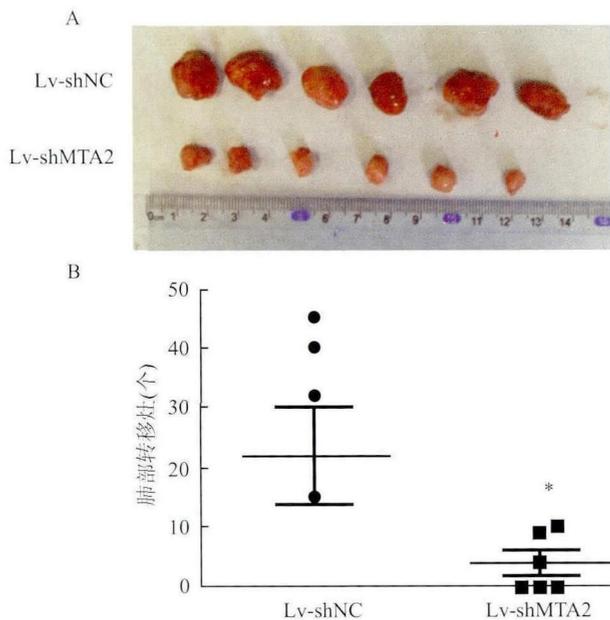


图7 MTA2 干扰后,裸鼠乳腺癌模型中瘤体大小(A)及肺部转移灶(B)情况
与 Lv-shNC 比较: * P < 0.05

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,在我国位居女性恶性肿瘤发生率的首位。据 GLOBOCAN 2008 统计,乳腺癌新发病例占 2011 年所有肿瘤的 23%,并且占有所有肿瘤致死病例的 14%^[7]。可见,乳腺癌严重威胁女性的健康,因此探索乳腺癌的发病机制及寻求临床治疗的分子靶点对乳腺癌的诊断

及防治有重要意义。目前 RNA 技术是分子水平研究疾病的常用手段,RNA 干扰技术的发现及其应用于乳腺癌的基因治疗带来了新的思路^[6]。

肿瘤转移是目前肿瘤治疗的关键障碍。肿瘤的转移包括很多步骤,涉及很多分子表达的改变^[8-11]。这些分子主要与肿瘤转移及分子黏附相关。研究^[10]显示,敲除黏附分子 plakoglobin,显著降低了乳腺癌的侵袭能力。此外,C 末端结合蛋白 2 (CtBP2) 也被认为与乳腺癌的迁移有关^[10-11]。研究^[1-3]显示,MTA1 在多种实体肿瘤中呈高表达,并且与肿瘤的转移和侵袭有关。结构上 MTA2 与 MTA1 类似,因此也被广泛研究。MTA2 首先被发现在宫颈癌中高表达^[4]。此后,MTA2 相继被发现在卵巢上皮癌、肝细胞肝癌、非小细胞肺癌存在异常表达,且与肿瘤的浸润性表型相关,如肿瘤更大、预后更差以及淋巴结转移等^[12-14]。但是虽然 MTA2 与 MTA1 结构类似,MTA1 在乳腺癌中已被证实与肿瘤转移有关,有关于 MTA2 在乳腺癌中的作用却很少有报道。

本研究结果显示,MTA2 特异性 shRNA 处理后,细胞的增殖能力明显受限,到第 5 天时,实验组约为阴性对照组细胞数目的一半。而进一步的 Transwell 实验显示,MTA2 敲除后,MDA-MB-231 细胞的侵袭、迁移能力也明显受抑制,说明癌细胞的生长和增殖能力均下降。裸鼠荷瘤实验显示,感染特异性干扰 MTA2 的 RNA 病毒后,瘤体较小,且肺部转移灶明显减少,这与体外实验结果一致,表明抑制 MTA2 后,乳腺癌的生长和转移能力受限,进一步说明 MTA2 有促进乳腺癌生长、转移的能力。

MTA2 在肿瘤的调节机制还不清楚。研究^[4]显示,MTA2 是 NuRD 复合物的的重要组成部分。其功能很可能与 NuRD 密切相关。研究^[15]显示 MTA2 促进胃癌促进生长和转移,并且受转录蛋白 sp1 调节。因此,进一步研究 MTA2 促进乳腺癌转移的机制将有利于为乳腺癌转移的防治提供新的思路。

参考文献

- [1] Toh Y, Nicolson G L. The role of the MTA family and their encoded proteins in human cancers; molecular functions and clinical implications [J]. Clin Exp Metastasis, 2009, 26(3): 215 - 27.
- [2] Hofer M D, Menke A, Genze F, et al. Expression of MTA1 promotes motility and invasiveness of PANC-1 pancreatic carcinoma cells [J]. Br J Cancer, 2004, 90(2): 455 - 62.
- [3] Qian H, Lu N, Xue L, et al. Reduced MTA1 expression by RNAi inhibits *in vitro* invasion and migration of esophageal squamous cell

- carcinoma cell line[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(8):653-62.
- [4] Zhang Y, Ng H H, Erdjument-Bromage H, et al. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(15):1924-35.
- [5] Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology [J]. *Nucl Recept Signal*, 2007, 5:e010.
- [6] 张峰, 刘晔, 刘三光, 等. RNA 干预研究及其在肿瘤基因治疗中的应用[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(3):381-2.
- [7] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [8] Palmer T D, Ashby W J, Lewis J D, et al. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(8):568-81.
- [9] Valastyan S, Weinberg R A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms[J]. *Cell*, 2011, 147(2):275-92.
- [10] Holen I, Whitworth J, Nutter F, et al. Loss of plakoglobin promotes decreased cell-cell contact, increased invasion, and breast cancer cell dissemination *in vivo* [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(3):R86.
- [11] Wang Y, Liu F, Mao F, et al. Interaction with cyclin H/cyclin-dependent kinase 7 (CCNH/CDK7) stabilizes C-terminal binding protein 2 (CtBP2) and promotes cancer cell migration[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13):9028-34.
- [12] Ji Y, Zhang P, Lu Y, et al. Expression of MTA2 gene in ovarian epithelial cancer and its clinical implication[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2006, 26(3):359-62.
- [13] Lee H, Ryu S H, Hong S S, et al. Overexpression of metastasis-associated protein 2 is associated with hepatocellular carcinoma size and differentiation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(8):1445-50.
- [14] Liu S L, Han Y, Zhang Y, et al. Expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) might predict proliferation in non-small cell lung cancer[J]. *Target Oncol*, 2012, 7(2):135-43.
- [15] Zhou C, Ji J, Cai Q, et al. MTA2 promotes gastric cancer cells invasion and is transcriptionally regulated by Sp1 [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1):102-6.

Inhibition of MTA2 suppresses the proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells

Weng Wei¹, Xu Yuanhong¹, Song Xiaofei²

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Blood Transfusion, Tongling First People's Hospital, Tongling 244009)

Abstract Objective To study the expression and role of metastasis-associated tumor gene family 2 (MTA2) in human breast cancer. **Methods** The shRNA sequence targeting human MTA2 gene was designed and chemically synthesized, then we constructed MDA-MB-231 cell lines that stably expressed the specific shRNA against MTA2, mRNA and protein levels of MTA2 were detected by quantitative Real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot, respectively. CCK-8 and Transwell assay were performed to detect the MDA-MB-231 cell viability and metastasis *in vitro*, xenograft model was constructed to investigate cancerous cell growth and metastasis ability *in vivo*. **Results** Knockdown of MTA2 by lentivirus-delivered shRNA against MTA2 (Lv-shMAT2) significantly reduced mRNA and protein levels of MTA2 in MDA-MB-231 cell line ($P < 0.05$). Lv-shMAT2 significantly slowed down cell proliferation and invasion. Furthermore, depletion of MAT2 significantly limited tumor growth and tumor transfer to lung in a xenograft model. **Conclusion** Depletion of MTA2 could significantly inhibit human breast cancer cell growth and metastasis, implying that MTA2 might be involved in the progression of breast cancer.

Key words RNA interference; MTA2; breast cancer; growth; metastasis