

· 论 著 ·

RNAi 介导的 IBP 表达抑制对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞细胞骨架的影响*

陈忠蛟, 李 鹏, 杨明珍, 陈 安, 胡川阔[△]

(第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室, 重庆 400038)

摘要:目的 研究干扰素调节因子 4 结合蛋白 (IBP) 的表达抑制对人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中微丝、微管的影响。方法 设计并合成针对人 IBP mRNA 的 RNA 干扰 (RNAi) 序列, 构建 RNAi 慢病毒表达载体, 与包装质粒共转染人胚肾 293FT 细胞获得病毒颗粒, 以病毒感染 MDA-MB-231 细胞。采用免疫印迹及实时聚合酶链反应 (RT-PCR) 确定能有效抑制 IBP 的 RNAi 序列, 筛选出获得稳定感染的细胞株并进行微丝、微管染色。结果 成功构建了 IBP 特异性的 RNAi 慢病毒表达载体和对照载体, 对 MDA-MB-231 细胞 IBP 的沉默效率为 69.9%; 通过微丝、微管染色证实 IBP 表达下调后, 细胞形态出现明显变化, 细胞体增大, 丝状伪足减少, 片状伪足增多, 微管排列紊乱。结论 IBP 蛋白通过影响微管、微丝的排列而改变 MDA-MB-231 细胞生物学行为。

关键词: 转染; RNA 干扰; 慢病毒感染; 细胞骨架; 基因, IBP

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)01-0001-05

Effects of RNAi-mediated IBP expression inhibition on cytoskeleton of human breast cancer MDA-MB-231 cells*

Chen Zhongjiao, Li Peng, Yang Mengzhen, Chen An, Hu Chuanmin[△]

(Teaching and Research Section of Clinical Biochemistry, Department of Medical Laboratory Science,

Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of interferon regulatory factor-4 binding protein (IBP) expression inhibition on microfilament and microtubule of human breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** RNA interference (RNAi) sequences targeting human IBP mRNA were designed and synthesized. Lentiviral vectors expression RNAi were constructed and then were co-transfected with packaging plasmids into human embryonic kidney 293FT cells to obtain virus particles for infection of MDA-MB-231 cells. Western blot and real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) were employed to confirm the sequences which could inhibit IBP effectively. Cells with stable infection were screened out and then their microfilament and microtubule were subjected to staining. **Results** Lentiviral vector expression IBP-specific RNAi and control vector were constructed successfully. IBP-silence efficiency in MDA-MB-231 cells was 69.9%. Microfilament and microtubule staining confirmed that IBP expression in cells were down-regulated. Obvious morphological changes of cells were observed, such as increasing cell body, decreasing filopodia, increasing lamellipodia and disorder of microtubule arrangement. **Conclusion** IBP protein alter the biological behavior of MDA-MB-231 cells via influencing the arrangement of microtubules and microfilaments.

Key words: transfection; RNA interference; lentivirus infections; cytoskeleton; gene, IBP

干扰素调节因子 4 结合蛋白 (interferon regulatory factor-4 binding protein, IBP) 是 Pernis 研究小组于 2002 年利用酵母双杂交系统从人淋巴细胞 cDNA 文库中筛选出来的具有与干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor-4, IRF-4) 潜在结合作用的蛋白^[1]。研究发现 IBP 是在人免疫系统中大量表达并具有重要功能的蛋白质, 主要表达于 T 淋巴细胞中^[2]。除此之外, IBP 具有鸟苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factors, GEF) 的作用, 能够激活 Rho GTP 酶家族的部分成员^[3]。所有研究结果均提示 IBP 可参与细胞骨架的重构、细胞极化、细胞间的信息传递等多种重要过程^[4-5]。目前对 IBP 在人体其他组织和细胞中的表达及其功能的研究较少, 部分人乳腺癌细胞中有 IBP 高表达。为探讨 IBP 是否参与人乳腺癌

细胞的功能及分子机制的调节, 本研究以人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为模型, 通过表达 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 的慢病毒系统^[6], 建立 IBP 表达下调的稳定细胞株和对照细胞株^[7], 并对其进行微丝、微管染色, 发现 IBP 的缺失可导致细胞发生系统性骨架改变。本研究旨在确定 IBP 缺失对人乳腺癌细胞骨架改变的影响, 为后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 PLVTHM、PSPAX2、PMD2. G 质粒, 人胚肾 293FT 细胞株, 人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株及 IBP 鼠单克隆抗体 (克隆号 2-A2) 为第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室提供; 大肠杆菌菌株 DH5 α 、磷酸钙转染试剂、TUBULIN 鼠单克隆抗体、TUBULIN-Tracker Red (微管红色

表 1 RNAi 引物序列

RNAi		引物序列
RNAi-1	正义链	5'-CGC GTC CCC GTT CAT CTG GAC ATT CCA GTG TTT CAA FAF AAC ACT GGA ATG TCC AGA TGA ACT TTT TGG ATC CGG AAA T-3'
	反义链	5'-CGA TTT CCG GAT CCA AAA AGT TCA TCT GGA CAT TCC AGT GTT CTC TTG AAA CAC TGG AAT GTC CAG ATG AAC GGG GA-3'
RNAi-2	正义链	5'-CGC GTC CCC ATT CAA GTG TTT CAC GTT GTT GTT CAA GAG ACA CCA ACG TGA AAC ACT GGA ATT TTT TGG ATC CGG AAA T-3'
	反义链	5'-CGA TTT CCG GAT CCA AAA AAT TCC AGT GTT TCA CGT TGG TGT CTC TTG AAC ACC AAC GTG AAA CAC TGG AAT GGG GA-3'
对照	正义链	5'-CGC GTC CCC GAA ATG TAC TGC GCG TGG ACA CTT TCA AGA GAG TCT CCA CGC GCA GTA CAA TTT CTT TTT GGA TCC GGA AAT-3'
	反义链	5'-CGA TTT CCG GAT CCA AAA AGA AAT GTA CTG CGC GTG GGA GAC TCC TTG AAG TCT CCA CGC GCA GTA CAT TTC GGG GA-3'

荧光探针)购自海口市碧云天生物技术研究所;普通质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、去内毒素质粒 DNA 大量提取试剂盒及 RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶和 T₄ 连接酶购自日本 TAKARA 公司;Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 GIBCO 公司;高扩增效率实时聚合酶链反应(real time-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;Alexa Fluor 647 Phalloidin 购自美国 Invitrogen 公司。

1.2 RNAi 慢病毒表达载体的构建 根据基因信息设计合成 3 对针对 *IBP* mRNA 的 RNAi 寡核苷酸序列,见表 1。将 3 对 Oligo DNA 退火形成双链 DNA 与双酶切后的 PLVTHM 慢病毒载体进行连接反应,随后转化感受态大肠杆菌并挑选阳性的重组克隆进行测序鉴定。

1.3 慢病毒包装 将 293FT 细胞以 2.0×10^6 个/皿的密度接种于 60 mm 培养皿中,使用含 10% 胎牛血清、非必需氨基酸、丙酮酸钠、谷氨酰胺的新鲜 DMEM 完全培养基培养。当细胞生长至 80% ~ 90% 融合时,将重组的病毒载体 PLVTHM-R1、PLVTHM-R2、PLVTHM-对照与包装质粒 PSPAX2 和穿梭质粒 PMD2. G 用磷酸钙共转染至病毒包装 293FT 细胞,培养 7 h 后弃去含有转染混和物的培养基,加入新鲜的培养基继续培养。48 h 后收集细胞上清液,离心以去除细胞碎片,采用 0.45 μ m 滤器(美国 Millipore 公司)过滤后分装,置于 -80 °C 冰箱中保存。取 1 mL 病毒溶液采用 10 倍稀释后感染以 1.0×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板的 MDA-MB-231 细胞,继续培养 48 h 后通过慢病毒载体上绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 的荧光观察感染效果。

1.4 RNAi 效果验证 收集病毒感染 48 h 的细胞,提取细胞蛋白,应用免疫印迹方法验证 *IBP* RNAi 慢病毒对 MDA-MB-231 细胞 *IBP* 蛋白表达的抑制效果:采用小鼠 *IBP* 单克隆抗体(1:1 000 稀释)进行蛋白印迹检测,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GADPH)蛋白作为内参。RT-PCR 检测分析病毒感染后 MDA-MB-231 细胞 *IBP* mRNA 的表达情况:收集病毒感染 48 h 的细胞,提取总

RNA,参照 TOYOBO 高扩增效率 RT-PCR 试剂盒说明,用 Oligo(dT)₂₀ 引物逆转录。参照 RealMasterMix(SYBR Green)试剂盒说明,对细胞 *IBP* 蛋白的表达进行荧光定量分析。实验中使用的 *IBP* mRNA 的上游引物和 *GADPH* mRNA 内参引物序列,见表 2。

表 2 *IBP* 和 *GADPH* mRNA 的引物序列

基因		引物序列
<i>IBP</i>	正义链	5'-GAA AGC TCG GCG AGA TGA AG-3'
	反义链	5'-GAT GTA GCG CTC CTG CTC CT-3'
<i>GADPH</i>	正义链	5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'
	反义链	5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'

1.5 细胞骨架染色 将 *IBP* 蛋白低表达细胞和阴性对照细胞以 1.0×10^4 个/孔的密度接种于 12 孔板中(内置经无菌处理的盖玻片),每孔添加 DMEM 完全培养基至 0.5 mL。常规培养 2 d 后,采用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)漂洗 3 次;加入免疫荧光固定液,37 °C 固定 30 min, PBS 漂洗 3 次;每孔加入 1 mL 破膜液洗 3 次, PBS 漂洗 2 次;用免疫荧光封闭液于 37 °C 封闭 30 min;加入 Alexa Fluor 647 Phalloidin 工作液和 TUBULIN-Tracker Red 工作液,37 °C 避光孵育 30 min, PBS 洗 3 次;再用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-di-amidino-2-phenylindole, DAPI)工作液避光孵育 3 min, PBS 洗 3 次,将玻片上的液体吸干,用抗荧光淬灭封片剂封片, FV-1000 共聚焦激光扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)(日本 Olympus 公司)进行观察。

1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RNAi 慢病毒表达载体的构建 将 3 对 *IBP* mRNA 的 RNAi 序列进行退火形成双链 DNA,与酶切后的 PLVTHM 慢病毒载体连接,转化感受态大肠杆菌并挑选阳性的重组克隆,测序鉴定显示序列无误,见图 1。

2.2 慢病毒感染 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,

激光共聚焦下观察各孔中细胞 GFP 的表达量,结果显示慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞的效率达 90% 以上,病毒感染成功,见图 2。

2.3 RNAi 效果验证 采用免疫印迹及 RT-PCR 检测 MDA-MB-231 细胞、阴性对照细胞及 RNAi-IBP-231 细胞的 IBP 蛋白和 mRNA 的表达情况,结果显示, RNAi-IBP-231 细胞中 IBP 蛋白的表达量明显下调 ($P < 0.01$),见图 3 左; RNAi-IBP-

231 细胞的 IBP mRNA 表达量显著降低 ($P < 0.01$),沉默效率为 69.9%,见图 3 中; 3 种细胞中 GADPH 的表达量无明显差异 ($P > 0.05$),见图 3 右。

2.4 细胞骨架染色 通过微丝、微管染色证实, IBP 表达下调后,细胞形态出现明显变化,细胞体增大,丝状伪足减少,片状伪足增多,微管排列紊乱,失去正常 MDA-MB-231 细胞典型形态。见图 4、5。

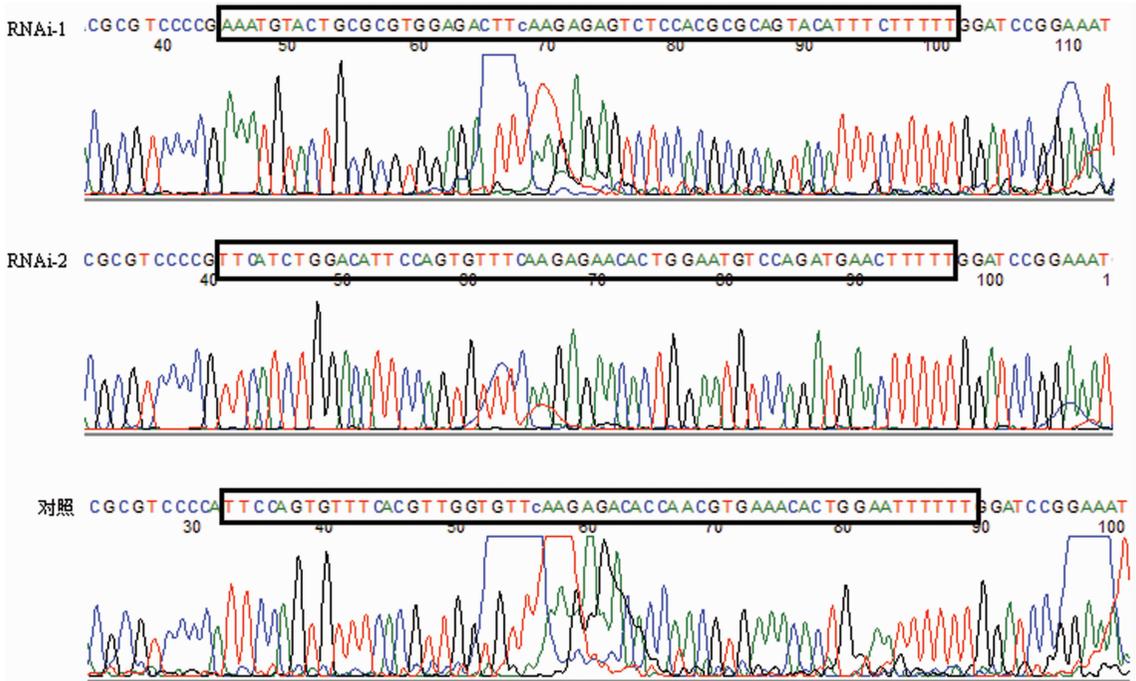


图 1 RNAi 慢病毒表达载体测序鉴定图

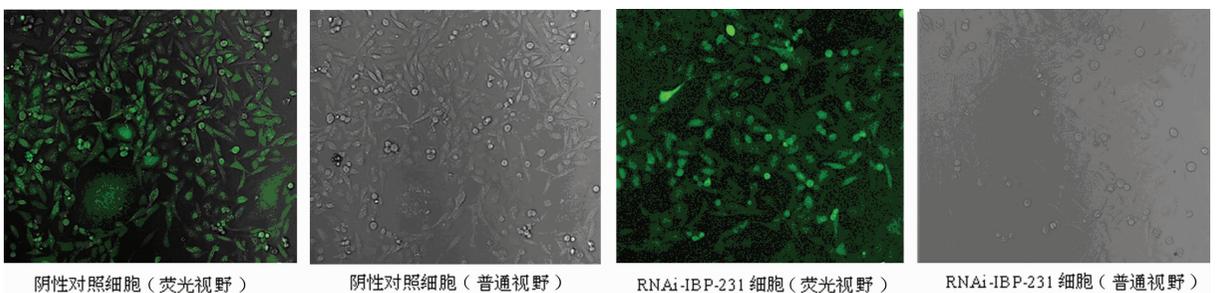
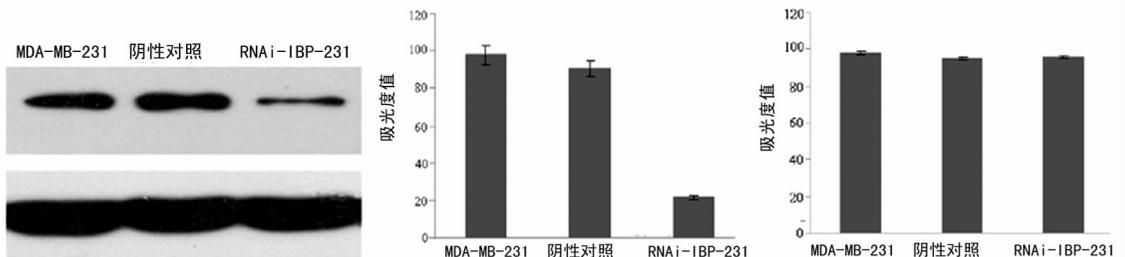
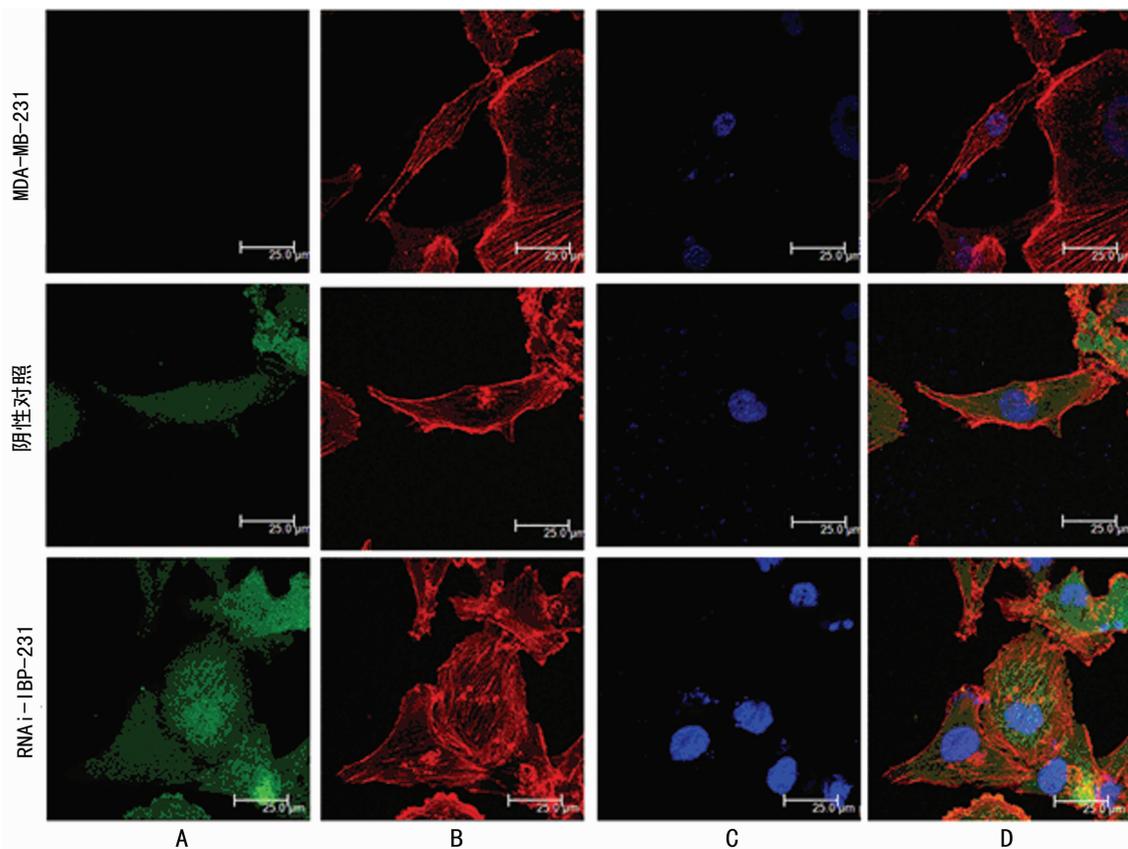


图 2 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞的形态学表现



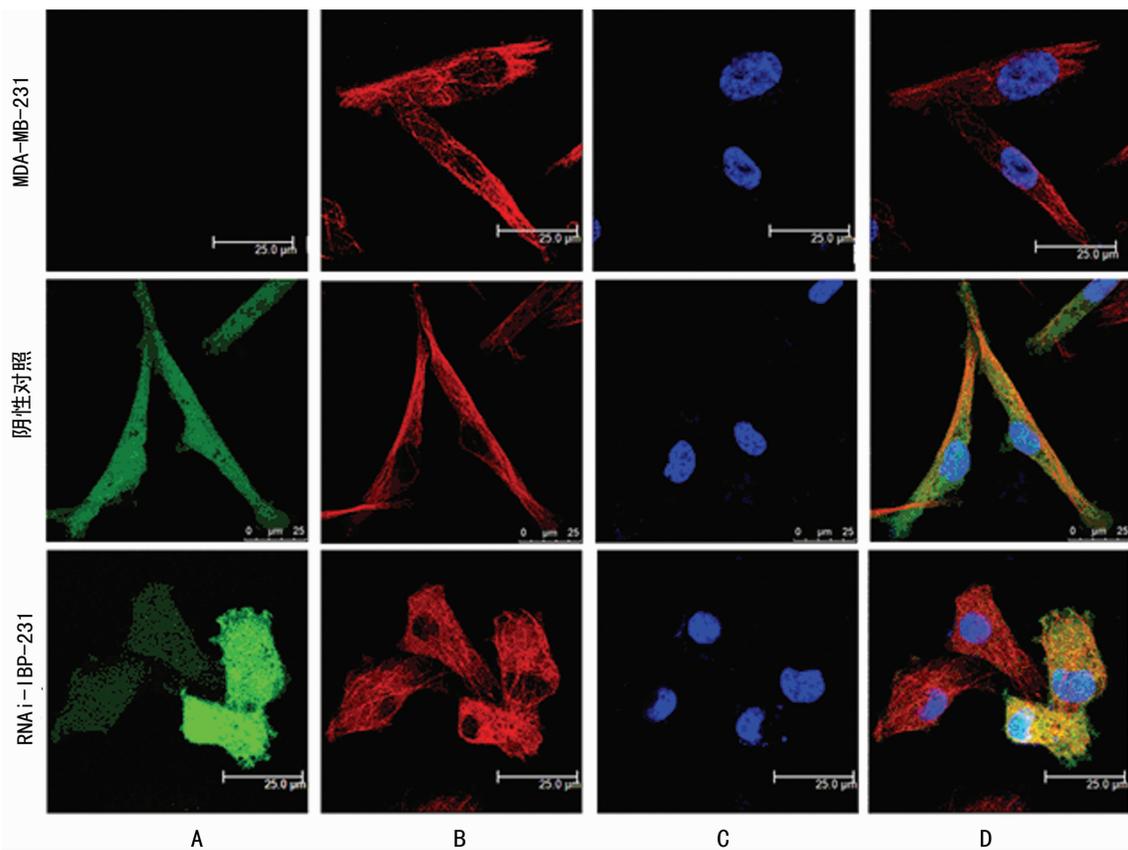
左: IBP 蛋白表达的免疫印迹验证; 中: IBP mRNA 表达的 RT-PCR 验证; 右: GAPDH 表达的 RT-PCR 检测。MDA-MB-231 为未感染慢病毒的 MDA-MB-231 细胞; 阴性对照为感染含有无关对照序列慢病毒的 MDA-MB-231 细胞; RNAi-IBP-231 为感染含有 IBP RNAi 慢病毒的 MDA-MB-231 细胞。

图 3 IBP RNAi 慢病毒感染 MDA-MB-231 细胞的基因沉默验证



A: 细胞自身荧光; B: 细胞微丝染色; C: 细胞核染色; D: 细胞自身荧光、微丝染色、细胞核共染色。

图 4 细胞微丝的荧光染色



A: 细胞自身荧光; B: 细胞微管染色; C: 细胞核染色; D: 细胞自身荧光、微管染色、细胞核共染色。

图 5 细胞微管的荧光染色

3 讨 论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,虽然现代医学对乳腺癌的综合治疗取得了重要进展,但仍有 30% 以上的患者死于肿瘤复发和转移,淋巴道与血道转移是导致乳腺癌治疗失败的主要原因。肿瘤细胞侵袭及转移发生的前提是细胞本身在基质中运动能力的改变^[6]。研究乳腺癌侵袭、转移的机制,寻找新的乳腺癌早期转移标志物及治疗靶点已成为目前乳腺癌诊疗研究中关注的重要问题。

IBP 是 Pernis 研究小组于 2002 年利用酵母双杂交系统从人淋巴细胞 cDNA 文库中筛选出来的具有与 IRF-4 潜在结合作用的蛋白^[1]。目前国际上对 IBP 的研究主要集中于免疫系统,并发现免疫系统中存在 IBP 的大量表达^[8]。2009 年第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室发现 IBP 是一个与人乳腺癌发生、发展密切相关的重要分子^[9]。IBP 作为一种与 GEF 家族具有相似结构的蛋白分子,GEF 是改变细胞骨架组装,调控细胞迁移的关键因子,参与肿瘤细胞的转移^[10-11]。GEF 的作用可激活 Rho GTP 酶家族的部分成员,其中包括细胞分裂周期蛋白 42 (cell division cycle 42, Cdc42)、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac1) 和 Rho A 分子^[12]。Rho A 能够参与黏着斑复合体 (focal adhesion complexes, FAC) 的组装;Cdc42 可促进丝状伪足形成;Rac1 可促进层状伪足和胞膜皱褶形成。FAC 是促细胞迁移的重要成分之一,而伪足形成和细胞形态改变是侵袭转移的起始步骤,由于整合素、Rho GTP 酶蛋白家族、GEF 活性及与激活型 Rac1 结合,进而影响了细胞骨架和转移。由于 IBP 和 GEF 家族分子有相似结构,人们认为 IBP 具有 GEF 特性,可激活 Rho 家族,改变细胞骨架。细胞骨架是真核细胞内蛋白质组成的复杂网状结构,是横越在真核细胞细胞核和细胞膜内侧的一种纤维蛋白基质,它由微丝、微管和中间纤维组成。其中,微管具有维持细胞形态、参与细胞收缩与伪足运动等功能;微丝具有参与肌肉的形成、脏器、肌体及血管等的运动。研究发现微丝、微管骨架与许多细胞功能相关,肿瘤的转移与细胞骨架功能有密切联系^[13-14]。

为证实 IBP 可以改变人乳腺癌细胞的骨架形态,本课题选择自身高表达 IBP 的人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞作为研究对象,设计并合成 IBP 的 RNAi 靶序列,利用慢病毒技术,构建 IBP 低表达的稳定细胞模型。通过微丝、微管染色,发现 IBP 低表达细胞的形态发生明显变化,微管排列紊乱,失去正常的 MDA-MB-231 细胞形态,提示 IBP 参与了细胞骨架重构。结合以上结果,作者推测 IBP 与乳腺癌的转移相关,其原因可能是通过参与乳腺癌细胞骨架重构影响乳腺癌细胞的迁移。然而,是 IBP 的表达促进了乳腺癌细胞转移,还是乳腺癌细胞转移促进 IBP 表达,以及其中的分子机制需要进一步研究证实。

参考文献:

[1] Gupta S, Lee A, Hu C, et al. Molecular cloning of IBP, a SWAP-70 homologous GEF, which is highly expressed in the immune system[J]. Hum Immunol, 2003, 64(4): 389-

401.

- [2] 周玉,李鹏,李淑慧,等. siRNA 介导的 IBP 表达抑制对 T 细胞凋亡的影响[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(3): 248-251.
- [3] Gupta S, Fanzo JC, Hu C, et al. T cell receptor engagement leads to the recruitment of IBP, a novel guanine nucleotide exchange factor, to the immunological synapse [J]. J Biol Chem, 2003, 278(44): 43541-43549.
- [4] Zhang Z, Wang Q, Li P, et al. Overexpression of the Interferon regulatory factor 4-binding protein in human colorectal cancer and its clinical significance [J]. Cancer Epidemiol, 2009, 33(2): 130-136.
- [5] Tanaka Y, Bi K, Kitamura R, et al. SWAP-70-like adapter of T cells, an adapter protein that regulates early TCR-initiated signaling in Th2 lineage cells [J]. Immunity, 2003, 18(3): 403-414.
- [6] 叶礼红,舒晓春,邬伟民,等. TIEG 特异的 siRNA 慢病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(9): 2568-2572.
- [7] 唐卫军,张辛平,邹洪元,等. Skp2 基因表达下调对 HepG2 细胞生物学特性及 SP1 和 p27 蛋白表达的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 18-22.
- [8] Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way [J]. Dev Biol, 2004, 265(1): 23-32.
- [9] Li P, Zhang Z, Wang Q, et al. The ectopic expression of IFN regulatory factor 4-binding protein is correlated with the malignant behavior of human breast cancer cells [J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9(7/8): 1002-1009.
- [10] Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility [J]. Exp Cell Res, 2004, 301(1): 43-49.
- [11] Sakurai-Yageta M, Recchi C, Le Dez G, et al. The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA [J]. J Cell Biol, 2008, 181(6): 985-998.
- [12] Oka T, Ihara S, Fukui Y. Cooperation of DEF6 with activated Rac in regulating cell morphology [J]. J Biol Chem, 2007, 282(3): 2011-2018.
- [13] Morifuji M, Taniguchi S, Sakai H, et al. Differential expression of cytokeratin after orthotopic implantation of newly established human tongue cancer cell lines of defined metastatic ability [J]. Am J Pathol, 2000, 156(4): 1317-1326.
- [14] Kamech N, Seif R. Effect of microtubule disorganizing or overstabilizing drugs on the proliferation of rat 3T3 cells and their virally induced transformed derivatives [J]. Cancer Res, 1988, 48(17): 4892-4896.