

论著·基础研究

## MACC1 基因 shRNA 慢病毒表达载体的构建及转染 MB-231 细胞

闵捷, 吕钢<sup>△</sup>, 王婷, 甘霖, 曾真, 王亚冬

(重庆市中医院乳腺甲状腺科, 重庆 400021)

**摘要:**目的 构建结肠癌转移相关基因 1(MACC1)RNAi 慢病毒表达载体, 并转染人乳腺癌细胞株 MB-231, 观察其最佳感染条件。方法 设计并合成 MACC1 基因特异性的 DNA 寡核苷酸, 连接到经 Age I 和 EcoR I 双酶切线性化的 pMAGic 慢病毒质粒载体中, 转化大肠埃希菌 DH5a 感受态细胞, 筛选阳性菌落、扩增后提取质粒, 进行 DNA 测序鉴定。用 293FT 细胞包装产生慢病毒, 感染 MB-231 细胞, 选择感染效率高、感染复数(MOI)低的感染条件。结果 PCR 与测序鉴定证实成功构建了 MACC1 RNAi 的慢病毒载体, 可以高效转染 MB-231 细胞, 其最佳感染条件为 MOI=40。结论 成功构建了 MACC1 RNAi 慢病毒表达载体, 其可高效感染 MB-231, 为进一步研究靶向 MACC1 RNAi 对乳腺癌细胞恶性生物学行为变化及基因治疗研究奠定了实验基础。

**关键词:**结肠癌转移相关基因 1; RNA 干扰; 慢病毒载体; 人乳腺癌细胞株 MB-231

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.12.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)12-1474-02

## Construction of lentiviral vector for shRNA of MACC1 gene and its transfection into MB-231

Min Jie, Lv Gang<sup>△</sup>, Wang Ting, Gan Lin, Zeng Zhen, Wang Yadong

(Department of Breast and Thyroid, Chongqing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

**Abstract: Objective** To construct a lentiviral vector for RNA interference(RNAi) of MACC1 gene and to detect the best transfection condition by transfected into MB-231 cells. **Methods** The siRNA was designed and converted into cDNA of shRNA (small hair pin RNA) of siRNA for MACC1 gene. The cDNA was synthesized and inserted into pMAGic lentiviral plasmid vector which was linearized by enzyme Age I and EcoR I. The recombinant plasmid was transformed into competent E. coli DH5a cells. The positive recombinant colony was selected by ampicillin medium agar and identified by DNA sequencing. The recombinant lentivirus was packaged into mature lentivirus by 293FT cells and used to infect MB-231 cells. To detected the transfection condition of high efficiency of infection and low multiplicity of infection. **Results** PCR and sequencing verified that the recombinant lentivirus plasmid MACC1-shRNA was successfully constructed. The best transfection condition was MOI=40 by transfected into MB-231. **Conclusion** The lentiviral RNAi expression vector targeting MACC1 gene is successfully constructed and it can infect MB-231 cells efficiently, which lays the experimental foundation for the research on the changes of malignant biological activity of tumor cell lines and gene therapy.

**Key words:** metastasis-associated in colon cancer 1; RNA interference; lentiviral vector MB-231

结肠癌转移相关基因 1 (metastasis-associated in colon cancer 1, MACC1) 是由 Stein 等<sup>[1]</sup>于 2009 年发现的与结肠癌侵袭、转移相关的新基因。MACC1 结合 MET 启动子后, 上调结肠癌中 MET 的表达, 促进癌细胞的侵袭和转移。MACC1 基因在肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 诱导的肿瘤侵袭、转移中发挥重要的作用。近几年, 人们在 MACC1 基因对肿瘤发生、发展及预后的影响进行了研究, 发现其极有可能成为治疗肿瘤转移的一个新靶点<sup>[2-3]</sup>。本实验通过构建干扰 MACC1 的慢病毒重组质粒, 感染乳腺癌细胞株 MB-231, 为在细胞水平研究 MACC1 参与乳腺癌发生、发展的机制提供实验基础。

## 1 材料与方法

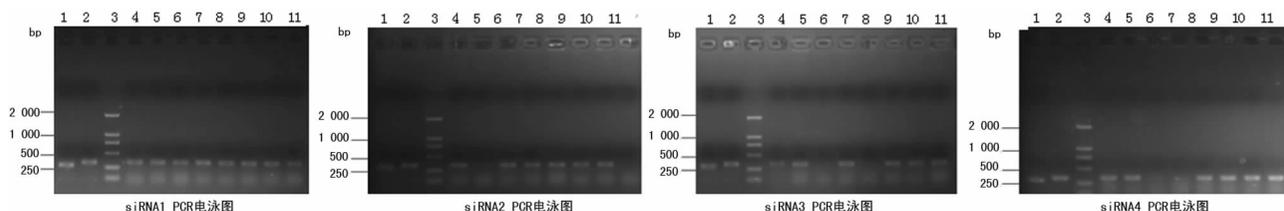
**1.1 材料** (1) 主要试剂及设备: pMagic7.1 (上海生博); DH5a 感受态细胞、Taq 酶、DNA 回收试剂盒、Age I、EcoR I 及 T4 DNAligase (宝生物); RNases 抑制剂、质粒提取试剂盒 (Promega); Lipofectamine2000, Trizo (Invitrogen); 引物合成 (上海捷瑞生物); 阳性克隆测序 (华大基因); 荧光显微镜 (奥林帕斯 3.3RTV); 恒温培养箱 (实时 PCR (RT-PCR) (ABI 7500 型))。 (2) 细胞株及其培养: 人乳腺癌细胞株 MB-231 为重庆医

科大学附属第一医院眼科实验室保存。

## 1.2 方法

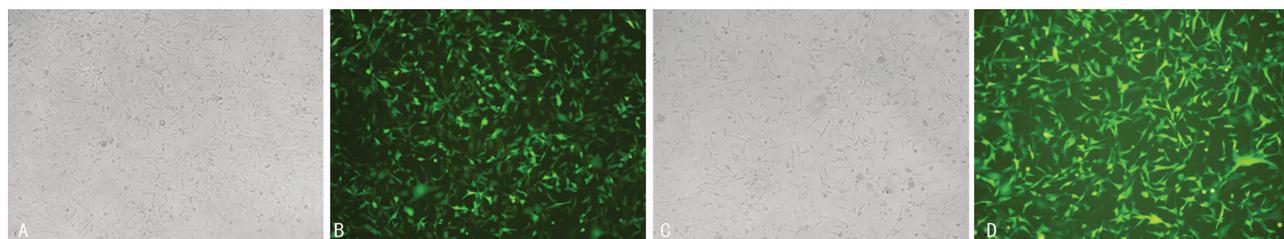
**1.2.1 构建表达 shRNA 的慢病毒载体** siRNA 设计根据 NCBI 数据库中人 MACC1 序列 (NCBINo. (NM\_182762.3)), 选取长度为 19 bp 的 4 个特异性寡核苷酸作为靶序列, 编号为 siRNA1 (GCT CCC AGT CCT TCC ATA A); siRNA2 (GGA TCT AAG CAT TGA AGA A); siRNA3 (GCA GCA AGC ACA TCT TCA A); siRNA4 (GCG TCA AGC AAA TGT ATA A)。选取一个无关阴性对照序列: siRNA7 (TTC TCC GAA CGT GTC ACG T)。Age I 和 EcoR I 双酶切 pMagic 7.1 载体使之线性化, 将退火的双链 oligo 与线性化干扰载体, 在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16 °C 连接过夜, 之后转化大肠埃希菌 DH5a 感受态细胞, 筛选阳性菌落、扩增后提取质粒, 行 PCR 及测序鉴定。菌落 PCR 鉴定: Primer (+): hU6-F2 TAC GAT ACA AGG CTG TTA GAG AG; Primer (-): pM-RCTA TTA ATA ACT AAT GCA TGG C。

**1.2.2 慢病毒包装及滴度测定** 用脂质体转染包装细胞 293FT 以获得重组的慢病毒。293FT 细胞培养, 取对数生长期细胞进行实验。用 10 cm 清洁细胞培养皿, 种板密度为 2×



1:阴性对照;2:阳性对照;3:DL 2000 DNA 标记物;4~11 挑取的 8 个转化子。

图 1 PCR 扩增产物电泳图



A:白光(MOI=10);B:荧光(MOI=10);C:白光(MOI=40);D:荧光(MOI=40)。

图 2 慢病毒感染 MB-231 细胞图片(×100)

10<sup>7</sup> 个/10 mL,10%胎牛血清完全培养液培养,次日细胞融合度为 90%~95%时即用于转染;取灭菌离心管,加入所制备的 DNA 混合液,再加入相应体积的 Opti-MEM 液,利用 Lipofectamine2000 共转染 293FT 细胞,转染 8 h 后更换为完全培养液,重新放回培养箱。培养 48 h 后,收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液,超速离心机离心,PBS 重悬病毒沉淀,将病毒液移出、分装、保存于 -80 ℃。滴度测定:取一支病毒液转染 293FT 细胞,感染后 72 h,提取细胞 DNA,RT-PCR 法测定滴度。

**1.2.3 重组慢病毒感染 MB-231 最佳感染条件为:**感染效率高(>90%)、感染复数(MOI)值低。将 MB-231 细胞按 40%的融合度接种到 24 孔板。MB-231 细胞配成 1.84×10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液,待铺板;每孔铺 500 μL,即 9.2×10<sup>4</sup> 个/孔。12~20 h 后感染病毒,根据 MOI 值,加入对应量的病毒。加入 polybrene,24 h 后更换培养基,感染后 72 h 行荧光拍照,分析慢病毒感染 MB-231 细胞株后的感染效率,确定最佳感染条件。

**2 结 果**

**2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定** PCR 条带大小:连接入 vshRNA 片段的阳性克隆 PCR 片段大小为 331 bp;没有连接入 vshRNA 片段的空载体克隆 PCR 片段大小为 285 bp,表明目的片段已插入载体中。经过测序证实插入序列与 shRNA 序列完全一致,结果显示 MACC1 shRNA 表达载体和阴性对照载体构建成功。PCR 扩增产物电泳图片,见图 1。

**2.2 慢病毒载体的包装及滴度测定** 提取质粒,将慢病毒包装系统中质粒共转染 293FT 细胞,48 h 后收集上清液;病毒感染 72 h 后,测定滴度为 1×10<sup>8</sup> TU/mL,结果显示有大量质粒转入 293FT 细胞,病毒成功包装。

**2.3 慢病毒感染 MB-231 细胞** 感染时将病毒按不同的 MOI 数(MOI=5、MOI=10、MOI=20、MOI=40、MOI=80)加入到 MB-231 细胞中,其感染效率分别为 50.00%、60.00%、65.00%、90.00%、100.00%。MOI=40 时感染效率可达到 90.00%。MOI=10、MOI=40 时慢病毒感染 MB-231 细胞图片,见图 2。

**3 讨 论**

MACC1 是通过全基因表达分析,在结肠癌的原发灶和转

移灶中发现并命名的一个新基因。MACC1 基因定位于人类染色体 7p21.1,含 6 个内含子和 7 个外显子,其内含子和外显子的结合符合 ATGC 规则。人类 MACC1 基因包含多个核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNP),SNP 是第 3 代 DNA 水平遗传多态性标记,其广泛应用于药物设计和基因研究中,在临床上具有重大意义<sup>[2]</sup>。

MACC1 是与肿瘤发生、发展密切相关的基因。Arlt 等<sup>[4]</sup>研究发现,在腺瘤组织与正常组织中 MACC1 的表达水平差异无统计学意义(P>0.05),而在恶性肿瘤中其表达水平明显高于良性肿瘤及正常组织,发生远处转移的肿瘤组织中 MACC1 表达水平高于未发生转移的肿瘤组织。可能 MACC1 表达水平的提高发生在良性到恶性的转化过程中,其表达水平的高低可反映肿瘤原发灶促使肿瘤发生远处转移能力的强弱。随着近几年研究的进展,MACC1 已成为一个能诊断结肠癌转移以及预测结肠癌患者无病生存期的独立指标,该基因的发现为抑制结肠癌的转移开辟了新路径<sup>[4-6]</sup>。

MACC1 不仅与结肠癌发生、发展关系密切,而且在其他的恶性肿瘤中也起着重要的作用。有研究显示,MACC1 在肝癌、胃癌、肺癌、卵巢癌中高表达,且其表达与肿瘤侵袭、转移呈正相关<sup>[7-9]</sup>。MACC1 作为一个新发现的基因,其促进恶性肿瘤形成和转移的作用已引起了研究者广泛的重视,但目前为止国内外少有与乳腺癌相关的 MACC1 报道。MACC1 是 HGF/c-Met 信号转导通路的重要调节因子,可以在转录水平上增强 c-Met 的表达进而促进肿瘤细胞的增殖、浸润和转移。已有研究显示,在乳腺恶性肿瘤中,Met 有较高的表达<sup>[10]</sup>。作为 MACC1 调节的重要信号通路——HGF/c-Met 信号通路、HGF 及其受体 c-Met 的过表达同样存在于乳腺恶性肿瘤中,且其过表达与乳腺肿瘤的形成及恶性进展关系密切<sup>[11-13]</sup>。因此推测,MACC1 在乳腺癌的转移、侵袭中发挥重要作用。

为了进一步研究 MACC1 在乳腺癌发生、发展中的作用,本实验以 MACC1 基因为靶基因,应用 RNA 干扰技术,设计 4 个特异性 shRNA 序列,一个无关序列作为阴性对照,共构建 5 对慢病毒干扰载体,经 PCR 鉴定阳性克隆得到 331 bp 条带,阴性克隆得到 285 bp 条带,表明目的片段已插入载体中,DNA 测序证实插入片段与设计的靶序列一致,因(下转第 1479 页)

- lence of gout derived from administrative health data in Aotearoa New Zealand[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2012, 51(5):901-909.
- [4] Kuo CF, See LC, Luo SF, et al. Gout; an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2010, 49(7):141-146.
- [5] So A. Developments in the scientific and clinical understanding of gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(5):221-227.
- [6] Roddy E, Doherty M. Epidemiology of gout[J]. *Arthritis Res Ther*, 2010, 12(6):223-234.
- [7] Dehghan A, Kottgen A, Yang Q, et al. Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout; a genome-wide association study[J]. *Lancet*, 2008, 372(9654):1953-1961.
- [8] 刘越, 吕社民. 单核苷酸多态性影响基因功能的机制[J]. *生命的化学*, 2008, 28(2):214-216.
- [9] Wu M, Du ZW, Liu JN, et al. Improved allele-specific polymerase chain reaction for single nucleotide polymorphism genotyping[J]. *Chem Res*, 2010, 26(2):259-262.
- [10] Chen H, Morrell PL, Toleno DM, et al. Allele-specific PCR can improve the efficiency of experimental resolution of heterozygotes in resequencing studies[J]. *Mol Ecol Resour*, 2010, 10(4):647-658.
- [11] Wang K, Zhang JT, Yun YX, et al. Improvement on PCR-CT PP; a SNP genotyping approach based on mismatch technique[J]. *Hereditas*, 2011, 33(2):182-188.
- [12] Wolf C, Rentsch J, Hübner P. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA; a reliable method for species identification[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(4):1350-1355.
- [13] Kermekchiev MB, Kirilova LI, Vail EE, et al. Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(5):e40.
- [14] Zhang Z, Kermekchiev MB, Barnes WM. Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of Taq[J]. *J Mol Diagn*, 2010, 12(2):152-161.
- [15] Kane A, Matsubara K, Nakamura H, et al. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from Bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification[J]. *J Forensic Sci*, 1994, 39(2):362-372.
- [16] Al-soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(2):485-493.

(收稿日期:2013-09-13 修回日期:2013-12-22)

(上接第 1475 页)

此确定本研究成功构建了 MACC1 慢病毒干扰载体,并能有效感染 MB-231 细胞,尤其是提高 MOI 值可以提高细胞的感染率,但对细胞状态可能产生影响。因此,本研究认为 MB-231 细胞的最佳感染条件为 MOI=40,本研究选择感染效率高(>90%),MCI 值低的感染条件,为进一步研究 MACC1 在乳腺癌中的作用及后续动物基因治疗奠定了实验基础。

#### 参考文献:

- [1] Stein U, Walther W, Arlt F, et al. MACC1 a newly identified key regulator of HGF-MET signaling predicts colon cancer metastasis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(1):59-67.
- [2] Stein U, Dahlmann M, Walther W, et al. MACC1-more than metastasis Facts and predictions about a novel gene [J]. *J Mol Med*, 2010, 88(1):11-18.
- [3] Shirahata A, Sakata M, Kitamura Y, et al. MACC1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(9):3441-3444.
- [4] Arlt F, Stein U. Colon cancer metastasis MACC1 and Met as metastatic pacemakers[J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 41(12):2356-2359.
- [5] Shirahata A, Shinmura K, Kitamura Y, et al. MACC1 as a maker for advanced colorectal carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7):2689-2692.
- [6] Stein U, Burock S, Herrmann P, et al. Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49249.
- [7] 刘清泉,刘青光,答献峰,等. MACC1 基因在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2010, 39(1):22-24, 28.
- [8] 王妮娜,谢剑明,郑大勇,等. 稳定表达 MACC1 的胃癌 BGC-823/pBaBb-puro-MACC1 细胞株的建立及其肿瘤相关基因的研究基因[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(3):312-316.
- [9] Hu X, Fu X, Wen S, et al. Prognostic value of MACC1 and c-met expressions in non-small cell lung cancer[J]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 2012, 15(7):399-403.
- [10] Raghav KP, Wang W, Liu S, et al. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(8):2269-2277.
- [11] El-Attar HA, Sheta MI. Hepatocyte growth factor profile with breast cancer[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2011, 54(3):509-513.
- [12] Locatelli A, Lofgren KA, Daniel AR, et al. Mechanisms of HGF/Met signaling to Brk and Sam68 in breast cancer progression[J]. *Horm Cancer*, 2012, 3(1/2):14-25.
- [13] 王婧男,张楠,赵建强,等. 乳腺癌中 HGF 及其受体 c-met 的表达与淋巴管生成及淋巴道转移的关系[J]. *山东大学学报:医学版*, 2010, 48(3):90-93.

(收稿日期:2013-10-08 修回日期:2013-12-22)