

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.001

Wip1 基因重组慢病毒表达载体的构建及其对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的影响研究*

李宗涛¹, 顾笑梅², 孙国贵³, 李娟², 张浩²

(1. 河北省唐山市工人医院乳腺外科 063000; 2. 河北省唐山市妇幼保健院妇产科 063000; 3. 河北省唐山市人民医院放疗科 063000)

[摘要] **目的** 构建 Wip1 基因重组慢病毒表达载体, 研究其对乳腺癌细胞生物学行为的影响。**方法** 以慢病毒感染方法将 Wip1 的短发夹状 RNA(shRNA) 转入乳腺癌 MCF-7 细胞。采用 qRT-PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)检测转染前后细胞 Wip1 mRNA、蛋白的表达, MTT 法、流式细胞术及 Transwell 侵袭实验检测 Wip1-shRNA 对 MCF-7 细胞增殖、凋亡、周期及侵袭转移的影响。筛选具有抑制 p53 基因表达的干扰 RNA 分子 p53dsRNA, 并分析其干扰后对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移的影响。**结果** 转染 48 h 后, Wip1-shRNA 组细胞荧光较强, NC-shRNA 组较弱。Wip1-shRNA 组细胞 Wip1 mRNA 和蛋白的表达分别为 0.291 ± 0.025 、 0.203 ± 0.021 与 NC-shRNA 组 0.954 ± 0.090 、 0.963 ± 0.092 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组各时间点细胞存活率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。NC-shRNA 组早期与晚期细胞的凋亡数少于 Wip1-shRNA 组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。NC-shRNA 组细胞 $G_0 + G_1$ 期、S 期细胞数分别为 53.5 ± 3.6 、 27.3 ± 1.5 , Wip1-shRNA 组分别为 72.3 ± 5.2 、 14.6 ± 0.8 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Transwell 侵袭转移结果表明, NC-shRNA 组细胞的穿膜数均多于 Wip1-shRNA 组($P < 0.05$)。对照组细胞中 p53 mRNA 的表达、细胞侵袭转移的穿膜数与 p53dsRNA 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RNA 干扰可有效抑制乳腺癌 MCF-7 细胞 Wip1 表达, Wip1 可能通过调控蛋白表达影响乳腺癌细胞增殖、凋亡、周期与侵袭转移, p53dsRNA 干扰 p53 基因下调后增加乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移的能力。

[关键词] Wip1; 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 基因转染**[中图分类号]** R73**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)33-4609-04

Construction of Wip1 gene recombinant lentiviral expression vector and its effects on breast cancer MCF-7 cell biological behavior*

Li Zongtao¹, Gu Xiaomei², Sun Guogui³, Li Juan², Zhang Hao²

(1. Department of Breast Surgery, Tangshan Municipal Worker's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, Tangshan Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Tangshan Municipal People's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To construct the Wip1 gene recombinant lentiviral expression vector and to investigate its effects on breast cancer cell biological behaviors. **Methods** Wip1 gene short hairpin RNAs (shRNA) was transfected into breast cancer MCF-7 cells through lentiviral infection method. Wip1 mRNA and protein expressions before and after transfection were detected by using qRT-PCR and Western blotting. The effects of Wip1-shRNA on the proliferation, apoptosis, cell cycle, invasion and metastasis in MCF-7 cells were determined by using the MTT assay, flow cytometry and transwell invasion test. Interfering RNA molecule p53dsRNA inhibiting p53 gene expression (p53 dsRNA) was screened, and the effect of p53 inhibition on MCF-7 cells invasion and metastasis was analyzed. **Results** After transfection for 48 h, the cellular fluorescence in the Wip1-shRNA group was stronger, while which in the NC-shRNA group was weaker. Cellular Wip1 mRNA and protein expressions in the Wip1 shRNA group were 0.291 ± 0.025 and 0.203 ± 0.021 respectively, which in the NC-shRNA group were 0.954 ± 0.090 and 0.963 ± 0.092 respectively, the difference between the two groups was statistically significant($P < 0.05$). The cellular survival rate at various time points had statistical difference between the two groups($P < 0.05$). The early and late cell apoptosis number in the NC-shRNA group was less than that in the Wip1-shRNA group, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The cells numbers at phase $G_0 + G_1$ and phase S in the NC-shRNA group were 53.5 ± 3.6 and 27.3 ± 1.5 respectively, which in the Wip-shRNA group were 72.3 ± 5.2 and 14.6 ± 0.8 respectively, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The Transwell invasion and metastasis results showed that the cell transmembrane number in the NC-shRNA group was more than that in the Wip1-shRNA group($P < 0.05$). The cellular p53 mRNA and protein expression had statistical difference between the control group and p53dsRNA group($P < 0.05$). **Conclusion** RNA interference can effectively suppress Wip1 expression in MCF-7 cells. Wip1 may affect the proliferation, apoptosis, cell cycle, invasion and metastasis of breast cancer cells by modulating protein expression. p53dsRNA increases the invasion and metastasis ability of breast cancer MCF-7 cells by interfering p53 gene down-regulation.

[Key words] Wip1; breast neoplasms; apoptosis; gene silencing

* 基金项目: 2015 年度河北省医学科研重点课题计划(20150953)。 作者简介: 李宗涛(1978—), 副主任医师, 博士, 主要从事乳腺癌及各种乳腺良性疾病的诊断、治疗研究。

慢病毒属逆转录病毒科,是以 HIV-1 为基础发展起来的基因治疗载体。其能够在人和动物的细胞系或原代细胞中高效地导入目的基因或者 RNA 干扰,效果维持时间长并且很稳定,可以在宿主细胞中成功整合目的基因,目的基因随着机体细胞进行分裂增殖,还可以对非分裂的细胞进行整合。

全球每年新增乳腺癌患者 120 万,每年死亡人数约 50 万人,我国主要城市近 10 年来发病率增长了 37%。目前,乳腺癌目前已成为严重威胁妇女健康的第一大杀手,其早期诊断、恶性程度分析及预后判断是当今研究的热点。

本文采用慢病毒感染方法将 Wip1 的短发夹状 RNA (shRNA) 转入乳腺癌 MCF-7 细胞,采用 qRT-PCR 和蛋白质印迹法(Western blot)检测转染前后细胞 Wip1 mRNA、蛋白的表达,MTT 法、流式细胞术及 Transwell 侵袭实验检测 Wip1-shRNA 对 MCF-7 细胞增殖、凋亡、周期及侵袭转移的影响,给临床治疗乳腺癌及预后的判断带来新的可能。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 乳腺癌 MCF-7 细胞购自中科院肿瘤医院细胞库;以 pLenti-puro-shWip1-eGFP 为质粒和载体,针对 Wip1 对 shRNA 干扰的慢病毒重组质粒予以构建,并实现 Wip1-shRNA 及阴性对照 shRNA(NC-shRNA)慢病毒的包装;病毒载体购自广州赛业生物科技有限公司,引物设计及合成由上海生工生物工程技术有限公司提供。qRT-PCR 试剂盒购自北京索来宝公司;兔抗人单克隆抗体 Wip1、p53 购自美国 Abcam 公司;p53dsRNA 合成由广州锐博生物有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与慢病毒感染 感染前 1 d 将乳腺癌 MCF-7 细胞以每孔 10^5 个接种于 24 孔板中,待细胞生长达 80% 范围时把慢病毒稀释液(含 NC-shRNA 或 Wip1-shRNA 质粒)1 mL 加入。在感染病毒 12 h 之后,把病毒液吸去并将 DMEM 培养基 1 mL 加入予以继续培养。感染病毒 48 h 之后,对带有绿色荧光的细胞在荧光显微镜下加以挑取,从而克隆扩大培养。实验分为空转染组(NC-shRNA 组)、转染组(Wip1-shRNA 组)。

1.2.2 RNA 提取与 qRT-PCR Wip1 按 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明逆转录成 cDNA,进行 PCR 扩增。Wip1 上游引物:5'-TTC CCC ATG TTC TAC ACC ACC AG-3',下游引物:5'-TGA GGG TAT GAC TAC ACC TTG GAC-3';GAPDH 上游引物:5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3',下游引物:5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CC-3'。PCR 反应条件:95 °C 预变性 60 s,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 45 s,40 个循环。利用琼脂糖凝胶电泳成像系统成像,表达量以 Wip1 和 GAPDH 电泳条带灰度比值表示。

1.2.3 Western blot 提取转染前后细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白质浓度。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳实现蛋白的分离,进行固相支持体(聚偏氟乙烯膜)室温封闭蛋白质 1 h,分别与 Wip1 抗体、p53 抗体和 GAPDH 抗体(稀释均为 1:500)反应过夜(4 °C),荧光二抗(稀释 1:2 000)进行 1 h 室温孵育。扫描显像由红外激光成像系统实现,表达量通过目的条带与 GAPDH 条带灰度比值表示。

1.2.4 MTT 法 取处于对数生长期接种密度 70%~80% NC-shRNA 组、Wip1-shRNA 组细胞按每孔 5 000 个细胞、每孔体积 200 μ L 在 96 孔培养板内予以接种。终止培养时间为 24、48、72、96 h。5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L 在培养终止前 4 h 加入,继续培养 4 h,除去培养基,每孔加入 200 μ L DMSO,予以振荡直到结晶溶解为止。利用全自动酶标仪检测各孔吸光度(A)值,490 nm 为其检测波长,620 nm 为其参考波长。细胞存活率(%)=实验组 A 值/对照组 A 值 \times 100%。

1.2.5 细胞凋亡、周期实验 细胞凋亡:选择对数生长期接种密度 70%~80% NC-shRNA 组、Wip1-shRNA 组细胞。把细胞消化、收集,用预冷的 4 °C 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,以 1 mL 结合缓冲液将细胞重新悬浮,浓度每毫升 1×10^6 ,在 5 mL 流式管中加入 100 μ L 细胞悬液,每管加入 10 μ L 碘化丙啶,并进行 15 min 的均匀避光。细胞周期:取处于对数生长期接种密度 70%~80% NC-shRNA 组、Wip1-shRNA 组细胞。将细胞消化、收集,用预冷的 4 °C PBS 冲洗 2 次,使其浓度为每毫升 1×10^6 ,在 5 mL 流式管中加入 195 μ L 的细胞悬液,每管加入 Annexin V-FITC 5 μ L 和 PI 的 10 μ L 碘化丙啶,并进行 15 min 的均匀避光。采用流式细胞仪上机检测。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 聚碳酸酯微孔滤膜上铺 Matrigel 凝胶(8.4 g/L) 50 μ L 或无 Matrigel 凝胶聚碳酸酯微孔滤膜,NC-shRNA 组、Wip1-shRNA 组细胞均以无血清培养基制成细胞悬液(每毫升 1×10^6 个);各取 50 μ L 在小室进行移入,800 μ L 10% DMEM 完全培养基在下室加入;培养 18 h 后,用棉签把滤膜上室面的细胞刮除,在下室面的细胞实现侵袭并黏附,使用 4%多聚甲醛固定,进行 20 min 0.1%结晶紫的染色。每张膜中央部分和周围部分各随机取 5 个视野,计数每个视野内的穿过 8 μ m 微孔的细胞数。肿瘤细胞的侵袭能力用每个视野的平均数表示。

1.2.7 p53dsRNA 沉默效应的鉴定 在 p53dsRNA 中筛选出能够沉默基因且效应最强的一个 siRNA 序列用于之后共转染的实验。将 p53dsRNA 稀释后与 Lipofectamine2000 试剂混合,形成 siRNA/Lipofectamine2000 复合物,再将转染复合物加入到乳腺癌 MCF-7 细胞与 Opi-MEM 培养液的培养板中,siRNA 浓度为 50 nmol,总体积为 2 mL。6 h 后换含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液继续培养,48 h 后提取总 RNA,行 qRT-PCR 观察 p53 沉默效应。

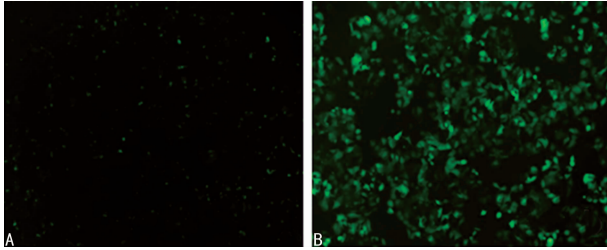
1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-Way ANOVA、Independent-Samples *t* 检验。各实验进行 3 次重复,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒感染筛选稳定表达细胞株及其对细胞 Wip1 mRNA 和蛋白的表达影响 转染 48 h 后,Wip1-shRNA 组细胞转染率都在 85% 以上,荧光较强;NC-shRNA 组细胞转染率只有 20% 左右,荧光较弱,见图 1。Wip1-shRNA 组细胞 Wip1 mRNA 和蛋白表达分别为 0.291 ± 0.025 、 0.203 ± 0.021 与 NC-shRNA 组 0.954 ± 0.090 、 0.963 ± 0.092 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Wip1-shRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、凋亡、周期、侵袭转移的影响 两组各时间点细胞存活率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。NC-shRNA 组早期与晚期细胞的凋

亡数为(5.4±0.6)%, Wip1-shRNA 组为(17.6±0.9)%, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 3。NC-shRNA 组细胞 G₀+G₁ 期、S 期细胞数分别为 53.5±3.6、27.3±1.5, Wip1-shRNA 组分别为 72.3±5.2、14.6±0.8, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 4。Transwell 侵袭结果表明, NC-shRNA 组细胞的穿膜数为 106.0±11.0, Wip1-shRNA 组为 49.0±6.0, 差异有统计学意义($P<0.05$); Transwell 转移结果表明, NC-shRNA 组细胞的穿膜数为 96.0±9.0, Wip1-shRNA 组为 42.0±4.01, 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 5。



A: NC-shRNA 组; B: Wip1-shRNA 组

图 1 两组转染情况 (荧光 ×100)

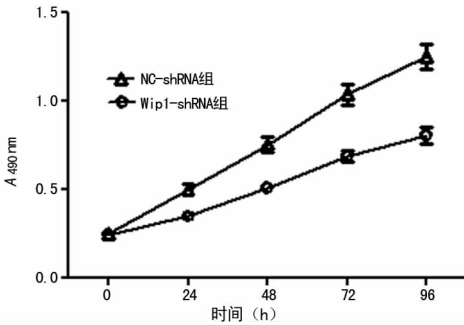
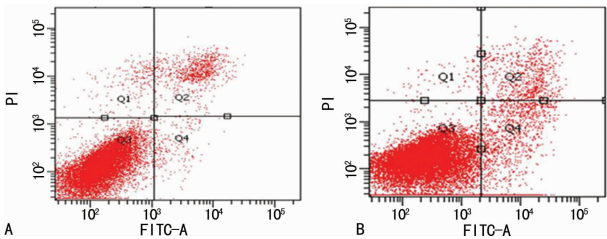
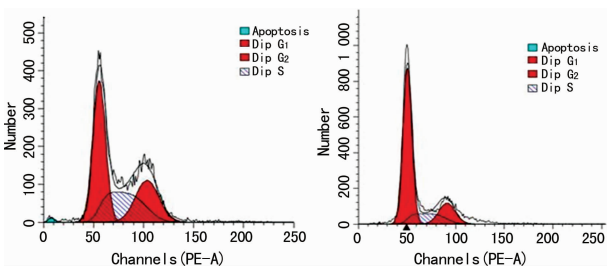


图 2 Wip1-shRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞存活率的影响



A: NC-shRNA 组; B: Wip1-shRNA 组

图 3 流式细胞术检测乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡情况



A: NC-shRNA 组; B: Wip1-shRNA 组

图 4 流式细胞术检测乳腺癌 MCF-7 细胞周期情况

2.3 Wip1-shRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞 p53 蛋白的表达影响 NC-shRNA 组细胞中 p53 蛋白表达的相对表达量为 0.765±0.067, Wip1-shRNA 组为 0.315±0.033, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 6。

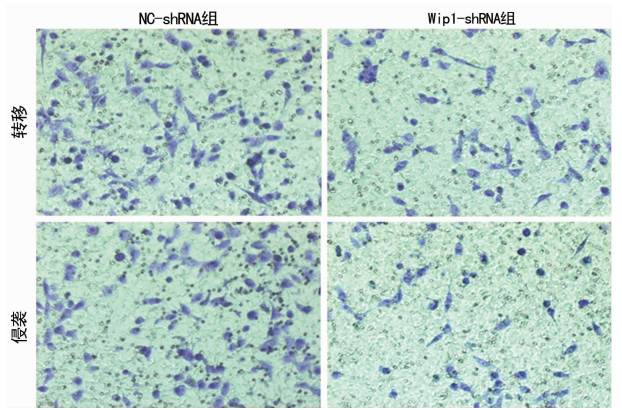


图 5 Transwell 检测乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移情况 (×100)

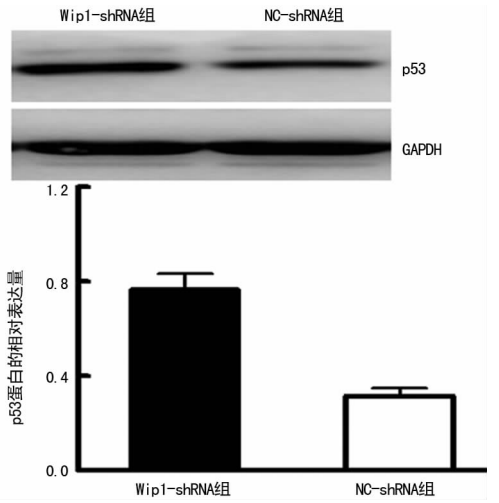


图 6 Western blot 检测乳腺癌 MCF-7 细胞 p53 蛋白的表达

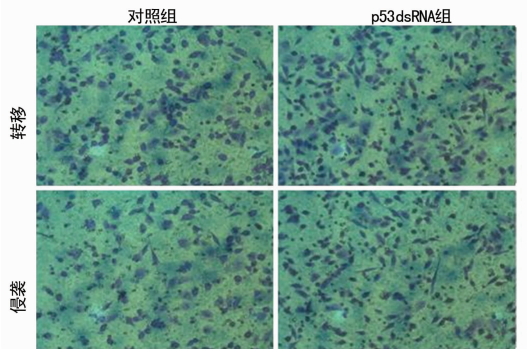
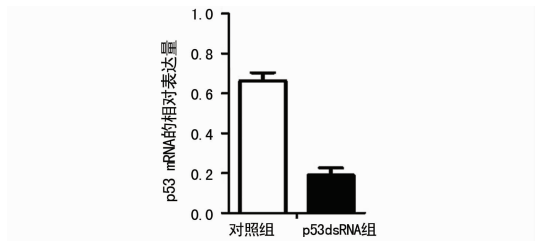


图 7 p53dsRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞侵袭转移的影响 (×200)

2.4 p53dsRNA 对乳腺癌 MCF-7 细胞 p53mRNA 表达及侵袭转移的影响 对照组、p53dsRNA 组细胞 p53 mRNA 的相对表达量分别为 0.663±0.047、0.190±0.013, 差异有统计学

意义($P < 0.05$); 对照组细胞侵袭转移的穿膜数分别为 135.0 ± 14.0 、 104.0 ± 9.0 , p53dsRNA 组分别为 155.0 ± 16.0 、 108.0 ± 7.0 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨 论

Wip1 与 Wild-type-p53 密切相关, 受到 Wild-p53 的诱导, 参与到 DNA 的损伤修复过程中, 并发挥重要的作用^[1]。Wip1 在人类卵巢癌、乳腺癌、髓母细胞瘤和神经母细胞瘤中都有较高的表达水平^[2]。主要定位于 17 号染色体, 参与肿瘤细胞增殖、分化、抗凋亡等过程。对于 Wip1 来说, 它能够实现抑癌基因的抑制, 导致癌症的发生, 并和多种原癌基因具有协同作用^[3]。有研究显示, Wip1 能够脱磷酸化 H2AX 并使检测点修复得到促进, 加大肿瘤细胞的增殖速度^[4]。除此之外, 从某种程度上来说肿瘤发生、发展受到 Wip1 同 NF- κ B、BRCA1-IRIS^[5] 基因相互作用, 并且在各种肿瘤中 Wip1 的高表达, 对 p53 起负反馈调控作用可以通过 p38MAPK/p53 信号通路来实现^[6], 同时具备诱导 p53 突变等特点^[7]。以 Wip1 为靶点的基因治疗研究开始列入人们的计划, 利用 RNA 基因干扰技术沉默髓母细胞瘤 D283 细胞实现 Wip1 的高表达, 增高了 p53 的表达水平, 使肿瘤细胞凋亡得到诱导^[2]。对于其介导的基因来说, 其表达作用具备持续且稳定的特点, 在宿主细胞基因组中目的基因能够实现整合, 同时它的分裂随细胞基因组的分裂同时进行^[8]。

对于慢病毒来说, 它属于逆转录病毒科亚科的一种, 属于 RNA 病毒的范畴, 逆转录病毒的特性明显, 基因组在经逆转录后可以在宿主 DNA 上整合, 其增殖随宿主细胞的增殖而进行, 另外具备使非分裂细胞感染、转移基因片段容量大、持续性强的基因表达、宿主免疫反应不易诱发等优点^[9]。目前, 在真核系统基因转移慢病毒载体方面, 它作为工具已经备受青睐^[9]。跟传统的逆转录病毒载体相比, 慢性病毒载体具有整合基因不发生重排及高感染率等优点^[1], 另外其高效转录、宿主范围广、高效表达及高效整合的特点也值得关注。它不仅可以对分裂和非分裂细胞感染, 同时对于静止细胞还能够实现感染^[10]。在进行改构之后, 寄主细胞的死亡或者在宿主内增殖的情况都不会出现, 细胞在感染和转化后可以实现传代增殖^[11]。因此利用慢病毒作载体, 将动物细胞的基因型改变, 并遗传到子代, 成为生物领域干预基因实验的重要方法^[12]。

本研究显示, 慢病毒载体可以对 Wip1 mRNA、蛋白的表达起到有效地抑制, 同时可以使细胞周期的变化得到明显改变, 细胞生长也会因此受到抑制。且 p53dsRNA 对 MCF-7 细胞 p53 mRNA 表达及侵袭转移也能产生影响。相关研究显示: 对于 Wip1 shRNA 慢病毒载体来说, 它对于 MCF-7 细胞内 Wip1 的表达水平可以做到有效沉默, 同时也会抑制乳腺癌细胞恶性增殖的特性^[13]。有研究显示, Wip1 的基因沉默明显抑制了乳腺癌细胞的迁移及侵袭能力, 进一步为 Wip1 在乳腺癌组织中表达规律及其是否参与乳腺癌的发生、发展均有积极的指导作用, 为肿瘤新的靶向治疗提供了理论依据。Parssinen 等^[11] 研究中有相关报道。

Wip1 shRNA 慢病毒载体可以做到有效沉默, 同时在抑制细胞恶性增殖方面效果明显。在恶性肿瘤的研究中, Wip1 RNA 干预技术是乳腺癌靶向治疗的新技术, 是肿瘤治疗方面研究的重点。

参考文献

- [1] Rossi M, Demidov ON, Anderson CW, et al. Induction of PPM1D following DNA-damaging treatments through a conserved p53 response element coincides with a shift in the use of transcription initiation sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(22): 7168-7180.
- [2] Moon SH, Lin L, Zhang X, et al. Wild-type p53 induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17): 12935-12947.
- [3] Yu E, Ahn YS, Jang SJ, et al. Overexpression of the Wip1 gene abrogates the p38 MAPK/p53/Wip1 pathway and silences p16 expression in human breast cancers [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 101(3): 269-278.
- [4] Castellino RC, De Bortoli M, Lu X, et al. Medulloblastomas overexpress the p53-inactivating oncogene WIP1/PPM1D[J]. *J Neurooncol*, 2008, 86(3): 245-256.
- [5] Lu X, Nguyen TA, Moon SH, et al. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2): 123-135.
- [6] Cha H, Lowe JM, Li H, et al. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 4112-4122.
- [7] Macurek L, Lindqvist A, Voets O, et al. Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gamma-H2AX to promote checkpoint inhibition [J]. *Oncogene*, 2010, 29(15): 2281-2291.
- [8] Chew J, Biswas S, Shreeram S, et al. WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(5): 659-666.
- [9] Chock K, Allison JM, Elshamy WM. BRCA1-IRIS overexpression abrogates UV-induced p38MAPK/p53 and promotes proliferation of damaged cells[J]. *Oncogene*, 2010, 29(38): 5274-5285.
- [10] Baxter EW, Milner J. p53 regulates LIF expression in human medulloblastoma cells [J]. *J Neuro Oncol*, 2009, 97(3): 373-382.
- [11] Parssinen J, Alarmo EL, Karhu R, et al. PPM1D silencing by RNA interference inhibits Proliferation and induces apoptosis in breast cancer cell lines with wild-type P53 [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 182(1): 33-39.
- [12] Liu T, Xu F, Du X, et al. Establishment and characterization of multi-drug resistance prostate carcinoma-initiation stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 10(5): 425-426.
- [13] Maddalena B, Armando F, Massimo R, et al. Reducing the risk of overdiagnosis in lung cancer: A support from molecular biology [J]. *Cell Physiol*, 2011, 226(9): 2213-2214.