文章编号:1000-5404(2010)21-2277-04

论著

RNAi 沉默 IBP 基因表达对乳腺癌细胞的抑制作用

简从相[1,3],熊 剑[1],李 鹏[2],申 涛[1],常慧君[1],胡川闽[2],周继祥[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院口腔科[1],医学检验系临床生物化学教研室[2];610083 成都,成都军区总医院口腔科[3])

【摘要】 目的 构建 IRF-4 结合蛋白(IBP)基因 RNA 干扰(RNAi)的真核表达载体,观察其对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞内 IBP 基因表达及细胞增殖和侵袭力的影响。方法 以 IBP 为靶基因,以 pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR 质粒为载体,设计构建4对重组体,并进行 DNA 测序鉴定。重组载体转染 MDA-MB-231 细胞后,选择转染效果最好的1对重组体建立稳定转染的细胞株,经 RT-PCR 和 Western blot 检测重组表达质粒对 IBP mRNA 和蛋白表达的抑制效果;MTT 法检测对各组细胞生长的影响;细胞体外侵袭实验测定对侵袭力的影响。结果 重组体测序结果与目的序列完全一致;重组体转染 MDA-MB-231 细胞后 IBP 的 mRNA 和蛋白表达降低约 70%;IBP 表达下调后乳腺癌细胞增殖减缓($P<0.05$);同时体外侵袭实验显示转染后乳腺癌发生迁移细胞数明显低于未转染组和空质粒对照组[分别为(25±7)、(67±6)、(68±5),$P<0.05$]。结论 下调 IBP 能有效降低乳腺癌细胞的增殖和侵袭力。

【关键词】 IRF-4 结合蛋白;RNA 干扰;乳腺癌;增殖;侵袭力
【中图法分类号】 R34;R73-37;R737.9 【文献标志码】 A

Inhibitory effect of RNAi-silenced IBP gene expression in breast cancer cells

Jian Congxiang[1,3], Xiong Jian[1], Li Peng[2], Shen Tao[1], Chang Huijun[1], Hu Chuanmin[2], Zhou Jixiang[1] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, [2]Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Department of Stomatology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

【Abstract】 Objective To construct the IRF-4 binding protein (IBP) eukaryotic expression vector for RNA interference and to observe its effect on proliferation and invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells. Methods Four pairs of recombinant vectors were designed and established using IBP as the target gene and plasmid pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR as the vector, and the sequence of DNA was identified. After the recombinant plasmid was transfected into the cultured MDA-MB-231 cells, the most efficient expression vector was chosen to establish cell lines. Inhibitory effect of recombinant plasmid on expression of IBP mRNA and protein was detected by real-time PCR and Western blotting, respectively. The inhibitory effect of recombinant plasmid on cell growth was detected by MTT assay. The invasion of MDA-MB-231 cells was identified by cell invasion assay. Results The sequence of recombinant plasmid was consistent with that of the designed vector. The expression of IBP mRNA and protein was decreased about 70% in recombinant expression vector transfected into MDA-MB-231 cells. The proliferation of breast cancer cells was reduced with the decreased expression of IBP ($P<0.05$). The invasion assay demonstrated that the number of breast cancer cells was significantly lower in transfection group than in non-transfected and blank control groups (25 ± 7 *vs* 67 ± 6 and 68 ± 5, $P<0.05$). Conclusion Down-regulation of IBP expression can significantly decrease the proliferation and invasion of breast cancer cells.

【Key words】 IRF-4 binding protein; RNA interference; breast cancer; proliferation; invasion

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901458) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5027).
Corresponding author: Zhou Jixiang, Tel: 86-23-68765333, E-mail: Zhoujx6518@sina.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30901458);重庆市自然科学基金(CSTC 2009BB5027)
【通信作者】 周继祥,电话:(023)68765333,E-mail:Zhoujx6518@sina.com

IRF-4 结合蛋白(IRF-4 binding protein, IBP)是 Gupta 等[1]于2003年通过酵母双杂交技术从人淋巴结 cDNA 文库中筛选出的一个与 IRF-4 具有结合作用

的蛋白。先前的研究发现IBP主要表达于T淋巴细胞并发挥着重要作用，新近发现IBP具有鸟苷酸交换因子(guanine exchange foutor，GEF)活性，能够激活Rho GTPase家族的部分成员：Rac1，Cdc42，RhoA[2]。Rho GTPase在肿瘤的发生与发展过程中有着重要的作用，RhoGTPase通过调节肿瘤细胞基因转录活性、细胞分裂、细胞凋亡及肿瘤细胞与周围基质细胞间相互作用从而影响肿瘤的演进[3]。近来有学者发现IBP高表达于结肠癌及乳腺癌的肿瘤细胞中[4,5]，为深入探讨IBP基因在肿瘤发生、发展过程中的作用机制，我们设计构建了作用于IBP的RNAi真核细胞表达载体，以乳腺癌细胞株MDA-MB-231为工具细胞，构建了IBP RNA干扰MDA-MB-231的细胞系，探讨IBP基因的靶向抑制对乳腺癌细胞增殖和侵袭力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株、菌株与质粒载体 乳腺癌细胞株MDA-MB-231为实验室保存；大肠杆菌*E. coli.* DH5α（本实验室冻存）；质粒载体pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR购自上海英俊生物技术有限公司。

1.1.2 试剂 载体构建试剂盒BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、G418及ECM均购自Invitrogen公司，DMEM高糖培养基，青链霉素，小牛血清均购自GIBCO，兔抗人IBP多克隆抗体[4]为实验室制备，β-actin鼠单抗，羊抗兔IgG HRP，羊抗鼠IgG HRP，BCA蛋白浓度测定试剂盒，ECL plus Western blotting Detection System试剂盒均购自碧云天，引物由上海英俊公司合成，限制性内切酶均购自TAKARA，转染试剂购自英俊公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、DNA片段纯化试剂盒和LB培养基均购自Invitrogen公司。

1.1.3 主要仪器设备 紫外可见分光光度计为Bio Rad公司产品，电泳仪(Mini PROTEAN 3cell)为Bio Rad公司产品，PCR仪为Biometra公司产品。荧光倒置显微镜为OLYMPUS公司产品。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的转化与质粒提取 大肠杆菌*E. coli*DH5α感受态细胞的制备与转化用氯化钙法制备，质粒提取按照试剂盒说明进行，提取DNA的吸光度值为1.8～2.0时用于实验。

1.2.2 载体构建 根据IBP编码基因核苷酸序列(基因号GI：AY241694)，按照Tuschl设计原则，用美国Ambion公司的在线设计工具siRNA Target Finder软件(网址：http：//www.ambion.com/sirnaca.html)设计针对IBP的19-mer siRNA靶位点，合成22-mer DNA寡核苷酸，其中sense oligo 3′端19-mer为IBP特异片断，antisense寡核苷酸3′端18-mer为特异序列的互补序列。根据IBP基因序列设计并合成4对miRNA寡核苷酸(表1)，由上海英骏公司合成。

将4对oligo分别退火成双链DNA。然后用载体构建试剂盒进行重组克隆，将4对双链的miRNA oligo分别插入到miRNA表达载体pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR中，构建4个miRNA表达质粒，并转化至感受态细菌DH5α，将得到的阳性克隆进行DNA测序以进一步验证。

表1 miRNA oligo序列

miRNA寡核苷酸		序列
SR119-1-正义		5′- TGCTGATTCCAGTGTTTCACGTTGGTGTTTTGGCCACTGACTGACACCAACGTAACACTGGAAT -3′
	反义	5′- CCTGATTCCAGTGTTACGTTGGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACCAACGTGAAACACTGGAATC -3′
SR119-2-正义		5′- TGCTGTTCATCTGGACATTCCAGTGTGTTTTGGCCACTGACTGACACACTGGAGTCCAGATGAA -3′
	反义	5′- CCTGTTCATCTGGACTCCAGTGTGTCAGTCAGTGGCCAAAACACACTGGAATGTCCAGATGAAC -3′
SR119-3-正义		5′- TGCTGAATTGGATGCATCAGCCGGTTGTTTTGGCCACTGACTGACAACCGGCTTGCATCCAATT -3′
	反义	5′- CCTGAATTGGATGCAAGCCGGTTGTCAGTCAGTGGCCAAAACAACCGGCTGATGCATCCAATTC -3′
SR119-4-正义		5′- TGCTGTTATCTCCAGGCTCAATTGGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCCAATTGCCTGGAGATAA -3′
	反义	5′- CCTGTTATCTCCAGGCAATTGGAGTCAGTCAGTGGCCAAAACTCCAATTGAGCCTGGAGATAAC -3′

1.2.3 质粒转染MDA-MB-231细胞 在6孔板中接种细胞，接种量为1×10^5个/孔，等细胞长到融合度为80%～90%进行转染。参照脂质体转染说明书，分别将干扰质粒SR119-1、SR119-2、SR119-3、SR119-4，pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR转入乳腺癌细胞株MDA-MB-231，其中pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR为空质粒对照。

1.2.4 转染后细胞的稳定筛选 转染24 h后，观察质粒荧光转染效果，根据荧光强度的高低筛选荧光强度最强的干扰质粒进行后续实验。胰酶消化荧光强度最强的干扰组细胞制备细胞悬液，接种细胞于一新24孔板，继续培养24 h。按照500 mg/L的浓度加入G418筛选试剂进行筛选。筛选11 d后，荧光显微镜观察细胞荧光强度，并以有限稀释法进行克隆化培养。选择克隆化96孔板中荧光强度高的单个克隆扩大培养。

1.2.5 RT-PCR验证干扰效果 采用Trizol试剂法提取扩大培养后细胞的总RNA，逆转录成cDNA，进行PCR，以β-actin作为内参，图片用Glyko BandScan Version进行灰度扫描，根据IBP条带的灰度百分比和β-actin的灰度百分比之间的灰度比值确定干扰效果。

1.2.6 Western blot验证干扰效果 全细胞蛋白裂解液裂解扩大培养后细胞，取上清进行蛋白定量(BCA法)，各样品取60 μg的蛋白量加样到7.5%的SDS-PAGE蛋白电泳；电转移蛋白质到PVDF膜，恒压18 V电转，时间45 min。5%脱脂奶粉封闭；与IBP多克隆抗体(1∶2 000)或鼠源β-actin单抗(1∶2 000)室温孵育2 h；PBST洗膜后加入羊抗兔IgG HRP抗体(1∶10 000)或羊抗鼠IgG HRP(1∶10 000)室温孵育1 h；TBST洗膜；ECL plus Western blot Detection System试剂盒检测蛋白表达水平。

1.2.7 MTT法检测细胞增殖 将稳定筛选得到的细胞系以及未转染的MDA-MB-231细胞进行分组，分组情况为：未转染组、pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR转染组、pcDNA™6.2-GW/

EmGFPmiR- SR119-2 转染组。取对数生长期的细胞以 5×10^3/孔接种 96 孔板,继续培养 0、1、2、3、4、5、6 d 后分别加入 5 g/L MTT 20 μl,37 ℃避光孵育 4 h,弃去培养基,加入 150 μl 二甲基亚砜,微震器上振荡 10 min 使结晶融解。经酶联检测仪上于 490 nm 波长检测 OD 值。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.8 侵袭小室实验 采用 Transwell 侵袭小室检测瘤细胞侵袭力。1∶7.5(ECM∶DMEM)的体积比例包被基底膜,在 Transwell 小室外加入 400 μl 按照 1∶1混合的条件培养液与完全 DMEM 培养液;以无血清培养液制备调整细胞浓度至 2.5×10^5/ml,按照 100 μl/小室的浓度将细胞加至 Transwell 小室内孔。37 ℃培养 24 h 后,取出 Transwell 小室,PBS 冲洗,用棉签擦去微孔膜上层的细胞,4% 多聚甲醛固定 30 min,蒸馏水洗涤 2×2 min,苏木精染 15 min,自来水冲洗 10 min,蒸馏水再洗涤 1 遍,95% 乙醇 5 s,伊红染色液染色 1 min,以手术刀片小心切下微孔膜,封片后立即于光镜下观察并计数。每个样品计数 10 个视野,计算平均细胞数。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

实验资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析。

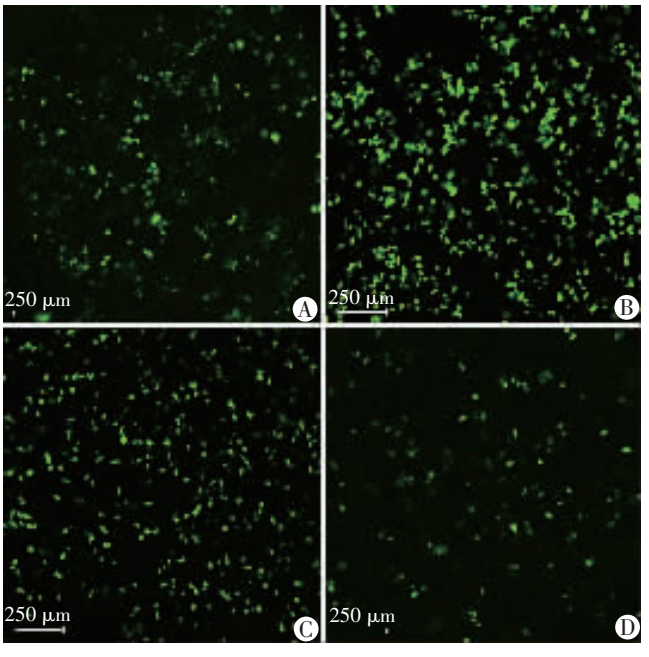
2 结果

2.1 干扰质粒的测序验证

得到的 4 组质粒 SR119-1、SR119-2、SR119-3、SR119-4 经测序,结果显示与设计 DNA 片段完全一致,结果符合设计要求。

2.2 转染后细胞的荧光筛选

4 组重组质粒分别转染 MDA-MB-231 细胞 48 h 后在荧光显微镜下观察转染效果(图 1)。荧光强度显示:SR119-2 荧光最强、转染效果最好。故选择 SR119-2 进行后续实验。

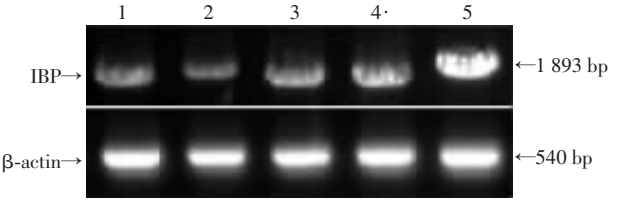


A:SR119-1;B:SR119-2;C:SR119-3;D:SR119-4

图 1 MDA-MB-231 细胞转染重组质粒 48 h 后 EGFP 荧光表达 (倒置荧光显微镜)

2.3 RT-PCR 检测 mRNA 水平的干扰效果

为了进一步验证 4 组重组质粒的干扰效果。分别提取 SR119-1、SR119-2、SR119-3、SR119-4 转染组细胞的总 RNA,采用 RT-PCR 的方法检测各组细胞的 IBP 的 mRNA 表达。然后对电泳条带进行灰度扫描,计算干扰条带与相应内参条带(β-actin)的灰度比值,灰度比值显示其中 SR119-2 组干扰效果最好,其干扰效果与对照组相比可达到 70%(图 2)。

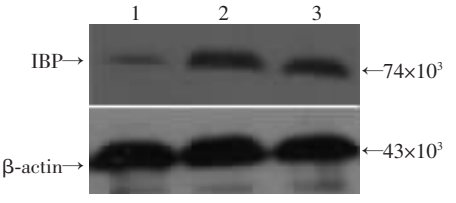


1:SR119-1 转染组;2:SR119-2 转染组;3:SR119-3 转染组;4:SR119-4 转染组;5:未转染质粒组

图 2 pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR- SR119-2 对 MDA-MB-231 细胞 IBP mRNA 表达的影响

2.4 Western blot 检测蛋白水平的干扰效果

为验证 SR119-2 的干扰效果。分别提取未转染质粒组、空质粒对照组(pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR 质粒转染细胞组)及干扰组(pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR- SR119-2 质粒转染细胞组)细胞的总蛋白,采用 Western blot 的方法在蛋白水平上检测各组细胞 IBP 的表达,然后对条带进行灰度扫描,计算干扰条带与相应内参条带(β-actin)的灰度比值,灰度比值显示:其干扰效果与未转染质粒组及空质粒对照组相比可达到约 70%(图 3)。



1:干扰组;2:未转染质粒组;3:空质粒对照组

图 3 pcDNA™6.2-GW/EmGFPmiR-IBP 对 MDA-MB-231 细胞 IBP 蛋白表达的影响

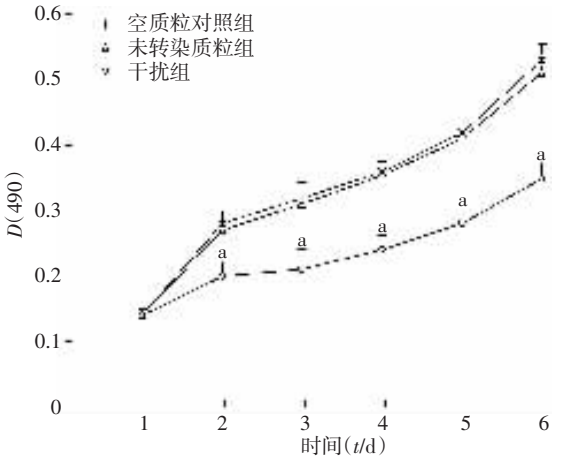
2.5 IBP-siRNA 对 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用

为探讨 IBP-siRNA 后对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞的生长能力的影响,我们采用 MTT 法检测未转染质粒组、空质粒对照组及干扰组细胞的增殖能力,在同时培养 2、3、4、5、6 d 后,MTT 法检测各组的吸光度值并进行统计学分析。结果显示:未转染质粒组与空质粒对照组间无统计学差异($P>0.05$);干扰组明显低于空质粒对照组($P<0.05$);表明 siIBP 沉默 IBP 后 MDA-MB-231 细胞的生长速度明显变慢(图 4)。

2.6 IBP 表达对乳腺癌细胞侵袭性的影响

我们采用 Transwell 实验探讨 IBP-siRNA 后对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 细胞的侵袭性的影响,在对 Transwell 滤膜下层细胞进行伊红染色后,对 10 个视野细胞数量计数,结果显示:

空质粒对照组：(68±5)个细胞/视野；未转染质粒组：(67±6)个细胞/视野；干扰组：(25±7)个细胞/视野。结果显示：和空质粒对照组及未转染组相比干扰组发生迁移的细胞数量明显减少有统计学意义($P<0.05$)。



a：$P<0.05$，与空质粒对照组比较

图4 shRNA质粒载体对MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖的影响

3 讨论

既往研究表明：IBP在免疫突触形成、维持免疫内环境稳定、T淋巴细胞激活及Th1/Th2极化中发挥着重要的作用[6,7]。但近来有学者发现：由于IBP与GEF家族分子的结构十分相似，同样也可以激活Rho家族分子：Rac1、Cdc42与RhoA，而Rac1、Cdc42与RhoA在乳腺癌增殖及转移中发挥重要作用[8,9]，但目前有关IBP分子与肿瘤发生、发展及转移的研究尚不深入，因此探讨IBP分子在乳腺癌增殖及转移过程中的作用具有一定的现实意义。

众所周知：许多与细胞增殖和凋亡相关的调控基因在肿瘤发生、发展的过程中，均存在异常表达现象。IBP基因特异性地在乳腺癌组织中高表达，而其在正常乳腺组织中不表达[5]，提示IBP的异常表达与乳腺癌的发生、发展有关。本研究利用ShRNA技术构建了IBP低表达乳腺癌细胞模型，通过细胞增殖试验证实：选择性地抑制IBP基因可显著降低乳腺癌细胞的增殖水平，说明IBP与众多GEF分子的功能相似，也有促细胞增殖作用，与乳腺癌的发生、发展有着重要的联系。

乳腺癌的预后与其转移性密切相关，发生转移是导致乳腺癌治疗失败的重要原因[10,11]，但目前关于乳腺癌转移的机制研究尚不够深入，本实验我们进行了Trans-well小室试验以探讨IBP与乳腺癌侵袭性的关系，实验结果显示RNAi下调IBP的表达抑制乳腺癌的侵袭力，说明IBP在乳腺癌的转移中发挥重要的作用[12]。

本实验中利用真核表达载体构建的shRNA重组质粒干扰IBP的表达，以MDA-MB-231细胞为平台，验证了IBP的干扰效果，并通过G418的筛选，建立了IBP干扰的稳定的乳腺癌细胞系，为深入研究IBP在乳腺癌的发生、发展过程中的分子作用机制打下了基础。并通过增殖实验及Trans-well小室试验研究发现：在乳腺癌细胞中下调IBP的表达能抑制乳腺癌细胞的生长及转移，这就提示：IBP可能作为一个癌基因在乳腺癌的发生、发展过程中发生作用，深入研究IBP在乳腺癌中的作用及机制有望使IBP成为乳腺癌的新的相关特异性标志物和基因治疗的新靶点；有望对乳腺癌的早期诊断和有效治疗产生一定的影响。

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] Mavrakis K J, McKinlay K J, Jones P, *et al*. DEF6, a novel PH-DH-like domain protein, is an upstream activator of the Rho GTPases Rac1, Cdc42, and RhoA [J]. Exp Cell Res, 2004, 294(2): 335-344.

[3] Vega F M, Ridley A J. Rho GTPases in cancer cell biology [J]. FEBS Lett, 2008, 582(14): 2093-2101.

[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] 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.

[6] 周玉，胡川闽. IRF-4结合蛋白——一个新的Th2极性分化相关分子[J]. 免疫学杂志，2006，22(5)：580-583.

[7] 张竹君，周玉，李鹏，等. 一个新的高保守自身免疫反应相关分子IRF-4结合蛋白多克隆抗体制备[J]. 第三军医大学学报，2008，30(13)：1242-1245.

[8] Merajver S D, Usmani S Z. Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2005, 10(4): 291-298.

[9] 刘浩，曹友德，叶维霞，等. miR-206抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞Cdc42蛋白表达及其对细胞骨架的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(6)：568-571.

[10] 郑科，厉红元，苏新良，等. CXCR7/CXCL12对人乳腺癌细胞侵袭和黏附能力的影响[J]. 第三军医大学学报，2010，32(1)：63-66.

[11] Maughan K L, Lutterbie M A, Ham P S. Treatment of breast cancer [J]. Am Fam Physician, 2010, 81(11): 1339-1346.

[12] 吴建兵，傅华群，黄龙璋，等. siRNA干扰骨形态发生蛋白2对肝癌SMMC7721细胞迁移和侵袭能力的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(23)：2330-2333.

（收稿：2010-08-03 修回：2010-08-21）

（编辑 王 红）