文章编号:1000-5404(2014)21-2187-04

论著

过表达 Bmi-1 基因对乳腺癌细胞株 BT474 侵袭转移能力的影响

李海玉[1,2],宋方洲[1,2],卜友泉[1,2],易发平[1,2],朱慧芳[1,2],汪长东[1,2],刘革力[1,2],武向梅[1,3] (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:分子医学与肿瘤研究中心[1],生物化学与分子生物学教研室[2],生理学教研室[3])

[摘要] **目的** 建立过表达 Bmi-1 的乳腺癌稳定细胞株,检测过表达 Bmi-1 对该肿瘤细胞株侵袭转移能力的影响,探讨 Bmi-1 与乳腺癌转移的相关性。**方法** 根据 GenBank 中人源 Bmi-1 的 mRNA 序列,设计引物,构建 Bmi-1 真核表达载体 GV144-Bmi-1,将其转染乳腺癌细胞株 BT474,G418 筛选建立过表达 Bmi-1 的稳定细胞株。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 Bmi-1 的 mRNA 和蛋白表达水平,Matrigel 和 Transwell 侵袭小室模型检测转染和未转染 BT474 细胞体外侵袭和转移能力的变化,荧光定量 PCR 和 Western blot 检测细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的变化。**结果** 成功构建人源 Bmi-1 真核表达载体 GV144-Bmi-1,转染 BT474 细胞后,获得稳定转染细胞株。实时荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与空载体组相比,实验组 Bmi-1 的 mRNA 和蛋白表达水平明显增高($P<0.05$)。Bmi-1 过表达后,迁移能力明显增强、穿膜细胞数明显增多,MMP-2、MM-9 mRNA 和蛋白表达水平显著增强($P<0.05$)。**结论** 过表达 Bmi-1 稳定细胞株构建成功,Bmi-1 表达上调可显著提高乳腺癌细胞的体外侵袭转移能力。

[关键词] 乳腺癌;Bmi-1;BT474;过表达;侵袭转移
[中图法分类号] R394.2; R73-37; R737.9 [文献标志码] A

Effects of over-expression of Bmi-1 on invasion and metastasis in human mammary carcinoma cell line BT474

Li Haiyu[1,2], Song Fangzhou[1,2], Bu Youquan[1,2], Yi Faping[1,2], Zhu Huifang[1,2], Wang Changdong[1,2], Liu Geli[1,2], Wu Xiangmei[1,3] ([1]Chongqing Molecular Medical and Cancer Research Center, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [3]Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a stable breast cancer cell line with over-expression of human Bmi-1 gene and investigate the effects of Bmi-1 over-expression on the invasion and metastasis in human breast cancer BT474 cells. **Methods** A pair of primers of Bmi-1 was designed according to the mRNA sequence in GenBank, and then an eukaryotic expression vector GV144-Bmi-1 was constructed. Human breast cancer BT474 cells were transfected with GV144-Bmi-1 and then treated with G418 to screen the cells with stable expression of Bmi-1. The mRNA and protein expression of Bmi-1 was detected by QRT-PCR and Western blotting. The invasion and metastatic ability of the BT474 cells with or without Bmi-1 over-expression were determined by Matrigel invasion assay and Transwell migration assay. The expression of MMP-2 and -9 was also detected at the mRNA and protein levels. **Results** The eukaryotic expression vector GV144-Bmi-1 was successfully constructed. A cell line with stable over-expression of Bmi-1 was obtained in BT474 cells. qRT-PCR and Western blotting indicated that the expression of Bmi-1 was significantly higher in the GV144-Bmi-1 over-expression group than in the control group ($P<0.05$). The cells with stable over-expression of Bmi-1 showed significantly enhanced migration ability with more cells moved from the upper chamber into the lower, and obviously increased expression of MMP-2 and -9 at the mRNA and protein levels ($P<0.05$). **Conclusion** A stable cell line with a persistent over-expression of Bmi-1 gene is established. Bmi-1 over-expression increases the ability of invasion and metastasis in human breast cancer BT474 cells.

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20125503110012);教育部高等学校博士学科点新教师基金(20115503120007);重庆市自然科学基金(CSTC2011jjA10035)
[通信作者] 武向梅,电话:(023)68485991,E-mail: xmwu80@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0828.001.html(2014-09-18)

[**Key words**] breast cancer; Bmi-1; BT-474 cells; over-expression; invasion and metastasis

Supported by the Special Scientific Research Fund for Doctoral Program of Colleges and Universities of Ministry of Education (20125503110012), the Fund for New Teachers of Doctoral Program of Colleges and Universities of Ministry of Education (20115503120007), and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA10035). Corresponding author: Wu Xiangmei, Tel:86-23-68485991, E-mail:xmwu80@163.com

乳腺癌是一种常见的严重危害女性身心健康的恶性肿瘤。数据显示,每年全球有120万妇女患乳腺癌,有50万死于该病。在北美、西欧等发达国家,女性恶性肿瘤中乳腺癌的发病率居首位[1-3]。而在中国,发病率更是逐年攀升,并有年轻化趋势。现在对乳腺癌的治疗,主要结合手术、化疗及放疗等治疗手段,虽然有了很大的进步,但乳腺癌预后仍较差,且对复发转移的乳腺癌治疗效果十分有限。

Bmi-1基因是1991年在鼠淋巴细胞中发现的多梳基因(polycomb group genes, PcG)家族的重要成员之一[4]。Bmi-1广泛表达于多种肿瘤中,并与肿瘤的发生发展密切相关,例如乳腺癌[5]、前列腺癌[6]、胰腺癌[7]等。在乳腺癌中Bmi-1的mRNA及蛋白水平均高表达,且Bmi-1与乳腺癌进展相关。为了进一步研究Bmi-1在乳腺癌侵袭迁移中发挥的作用,我们利用低表达Bmi-1的乳腺癌细胞株BT-474构建Bmi-1过表达的稳定细胞株,研究Bmi-1过表达对乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响,探讨乳腺癌治疗的新靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与载体

人乳腺癌细胞BT-474购于中国科学院上海细胞库。GV144质粒载体购自上海吉凯生物公司。

1.2 试剂

DMEM培养基、胎牛血清购自HyClone公司。RT-PCR试剂盒、qRT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。GV144质粒载体(上海吉凯生物公司);*Xho* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ、T_4 DNA连接酶、DL2000 DNA Marker、质粒提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒、DNA小量胶回收纯化试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品;G418(Sigma);Total RNA提取试剂盒购自OMEGA公司。Opti-MEM、Lipofectamine LTX购自Invitrogen公司。Bmi-1、β-actin的引物由上海生工生物公司合成。小鼠抗人的Bmi-1单克隆抗体购自Upstate公司,小鼠抗人β-actin单克隆抗体购自鼎国公司,E-cadherin抗体及N-cadherin抗体HRP标记的羊抗鼠IgG购自Santa Cruz公司。Matrigel胶购自Bio-Rad公司,Transwell小室购自Millipore公司。

1.3 GV144-Bmi-1载体的构建

根据GenBank中Bmi-1的mRNA序列,设计如下引物:上游5′-GCTGTACAAGTCCGGACTCAGAT-3′,下游5′-CCGGATC-TAGATAACTGATCATAA-3′。上游引物的5′末端引入*Xho* Ⅰ的酶切位点,下游引物的5′末端引入*Bam*H Ⅰ酶切位点。以cDNA为模板,通过PCR扩增获取Bmi-1目的基因,PCR扩增产物与质粒GV144的酶切、连接、转化和重组质粒的筛选按照文献[8],对重组质粒进行双酶切和DNA测序鉴定。

1.4 细胞培养及稳定过表达细胞系的建立

BT474细胞采用含10%胎牛血清的DMEM培养基,置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱中培养。待细胞密度约80%时给细胞,使用Lipofectamine LTX将构建好的GV144空载体和GV144-Bmi-1质粒转染到BT474细胞,转染GV144空载体为对照组,转染GV144-Bmi-1质粒为实验组。转染24 h后给细胞中加入G418(300 mg/L)筛选14 d,获得稳定表达Bmi-1的细胞株。

1.5 实时荧光定量PCR检测mRNA表达水平

GV144空载体和GV144-Bmi-1质粒转染BT474细胞培养48 h,RNA提取试剂盒提取Total RNA,核酸浓度测定仪测定其浓度和纯度,按TaKaRa逆转录反应说明书合成cDNA,用于扩增Bmi-1 cDNA,上游引物为:5′-GACCACTACTGAATATAAGG-3′,下游引物为:5′-CATTTGTCAGTCCATCTCTC-3′;β-actin的上游引物为:5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′,下游引物为:5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′。cDNA产物10倍稀释后以β-actin为内参进行实时荧光定量PCR,反应条件为95 ℃预变性5 min;95 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s,72 ℃ 5 min(39个循环);反应结束建立溶解曲线。同一实验独立重复3次,实验数据分析采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。

1.6 Western blot检测蛋白的表达水平

转染48 h后分别收集各组细胞,按碧云天公司蛋白提取说明书进行,采用BCA法测定蛋白浓度。取40 μg/孔蛋白样品上样,经12% SDS-PAGE后,将目的蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭2 h,与一抗(Bmi-1、β-actin)4 ℃摇床孵育过夜,TBST洗3次,每次10 min,再分别与相应HRP标记的二抗室温孵育2 h,ECL化学发光。

1.7 Matrigel检测BT-474细胞侵袭能力

将Matrigel胶置于4 ℃过夜,用无血清预冷的RPMI1640培养基按8∶1稀释Matrigel胶混匀,每孔60 μL均匀铺在24孔Transwell上室的聚碳酸酯膜上,37 ℃孵育1 h。收集转染48 h后的各组细胞,计数后按2×10^4/孔接种于上室。将小室放于24孔板中,上室加入200 μL无血清DMEM培养基,下室加800 μL含10%胎牛血清的DMEM培养基,37 ℃、5% CO_2 RT-PCR培养24 h后取出小室,用棉签擦掉上室细胞,PBS洗3次,800 μL甲醇固定30 min,结晶紫染色15 min,PBS冲洗干净,室温风干。显微镜下取5个视野计数,取其平均值,实验独立重复3次。

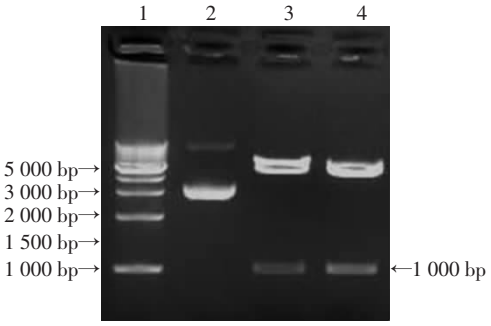
1.8 统计学处理

应用SPSS 19.0统计分析软件,数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间均数比较应用单因素方差分析。

2 结果

2.1 GV144-Bmi-1 真核表达载体的构建

通过 Bmi-1 特异引物应用 PCR 方法扩增出 Bmi-1 基因的 cDNA，然后分别将载体质粒 GV144 及目的基因用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切，连接转化入 DH5α 感受态细胞中，小量抽提质粒，分别用 *Bam*H Ⅰ + *Xho* Ⅰ做酶切鉴定（图 1）。表明目的片段已插入到表达载体中，对鉴定正确的重组克隆进行测序验证，测序后与 GenBank 登记的人 Bmi-1 基因同源序列完全相同即为人 GV144-Bmi-1 质粒。



1：DL5000 Marker；2：GV144；3、4：GV144-Bmi-1

图 1 GV144-Bmi-1 质粒双酶切电泳结果

2.2 稳定过表达 Bmi-1 的 BT474 细胞系的建立

将 GV144-Bmi-1 与空载体 GV144 转染 BT474 细胞，经 G418 筛选 14 d 后获得稳定表达 GV144 和 GV144-Bmi-1 的细胞系。实时荧光定量 PCR 检测发现 Bmi-1 mRNA 表达量明显增加（$P<0.05$），与对照相比增加了 9.0 ± 0.8，见图 1。Western blot 检测发现 Bmi-1 蛋白表达也明显增加，见图 2。

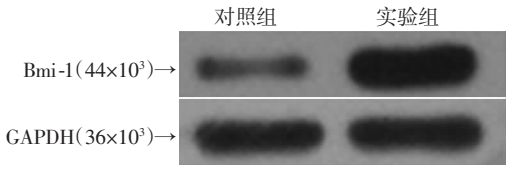
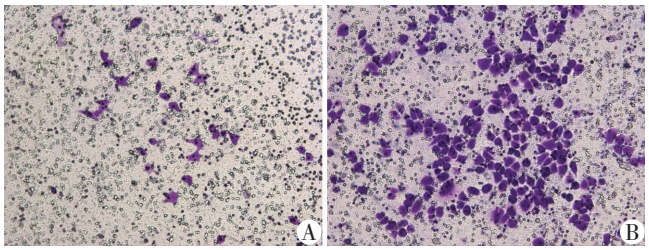


图 2 稳定表达 Bmi-1 BT474 细胞的 Western blot 检测结果

2.3 过表达 Bmi-1 对 BT474 细胞侵袭的影响

与对照组相比，实验组穿过人工基质胶的间质化 BT474 细胞的数目分别为（18.7 ± 5.6）、（156.5 ± 8.3），实验组侵袭细胞数明显高于对照组（$P<0.05$），见图 3。

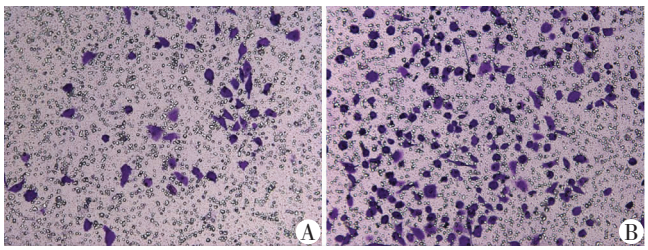


A：对照组；B：实验组

图 3 Transwell 侵袭实验检测 BT474 细胞 Bmi-1 过表达后侵袭能力（结晶紫 ×100）

2.4 过表达 Bmi-1 对 BT474 细胞迁移能力的影响

显微镜下计数对照组和实验组穿过 Transwell 上室的细胞数，并进行统计分析，结果显示，与对照组相比，实验组穿过小室的细胞数分别为（56.4 ± 6.7），（183.1 ± 8.3）。说明 Bmi-1 基因过表达后，BT474 细胞的迁移能力明显增加（$P<0.05$），见图 4。

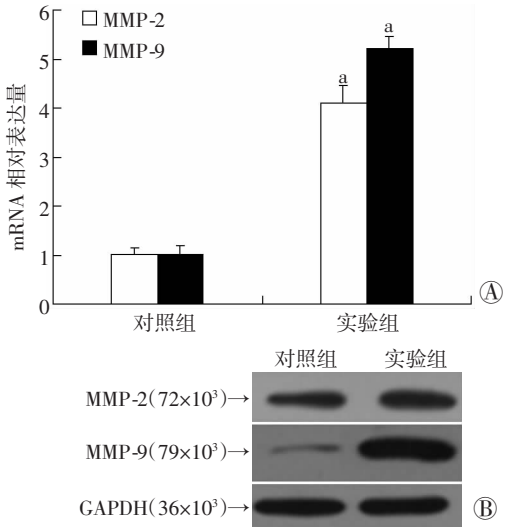


A：对照组；B：实验组

图 4 Transwell 实验检测 BT474 细胞 Bmi-1 过表达后转移能力（结晶紫 ×100）

2.5 过表达 Bmi-1 对 BT474 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白的影响

qRT-PCR 和 Western blot 法检测结果显示，实验组与对照组相比，MMP-2、MMP-9 mRNA 和蛋白表达水平显著增强（$P<0.05$），见图 5。



a：$P<0.05$，与对照组比较

图 5 qRT-PCR（A）和 Western blot（B）检测 BT474 细胞 Bmi-1 过表达后 MMP-2、MMP-9 变化

3 讨论

乳腺癌是一种常见的严重危害女性身心健康的恶性肿瘤。虽然现在对乳腺癌的治疗有了很大的进步，但肿瘤局部浸润和远处转移是影响手术效果和生存期的主要原因。因此，研究阐明乳腺癌侵袭转移的分子机制，寻找新的分子靶点具有重要意义。已往的研究揭示肿瘤浸润和转移是一个复杂的多步骤的连续过程，包括癌细胞在原发部位的生长以及向周围组织的

侵袭和远处转移等一系列过程,其中肿瘤细胞的恶性增殖和细胞外基质降解是重要步骤,但有关调控肿瘤细胞浸润和转移的分子机制尚不清楚。

Bmi-1 基因是转录抑制因子多梳基因家族 PcG 的成员,位于染色体 10p12 的位置,通过形成多梳抑制复合体 1 对染色质进行修饰而抑制下游目的基因的表达。正常情况下,在胚胎和多种成体干细胞中均有表达,在维持正常神经干细胞、造血干细胞、肠干细胞和乳腺干细胞的自我更新中起着关键性作用[9-13]。在乳腺癌组织中 Bmi-1 的 mRNA 及蛋白表达水平均较高,Bmi-1 的高表达与临床分期、腋窝淋巴结转移及雌激素受体阳性状况等具有明显的正相关性,表明 Bmi-1 在乳腺癌晚期发生浸润转移的过程中可能起重要作用[13-16]。Bmi-1 可能成为预测乳腺癌高度转移的新分子标志物,有望成为乳腺癌转移生物治疗的一个新的基因靶点。

本实验成功构建 Bmi-1 过表达的质粒,并将其转染乳腺癌细胞株 BT474,过表达 BT474 细胞中 Bmi-1 基因的表达,进一步对转染后细胞生物学特性进行分析研究。Transwell 侵袭转移实验表明 Bmi-1 基因过表达能明显增加乳腺癌细胞的侵袭转移能力,说明 Bmi-1 在乳腺癌的侵袭迁移的恶性发生发展中有重要作用。Bmi-1 可能通过不同的途径在转录或翻译水平调控与乳腺癌浸润转移相关基因的表达。一方面,Bmi-1 作为细胞癌基因,被激活后高表达于乳腺癌细胞中,参与调控细胞的分裂。高表达 Bmi-1 的细胞通过抑制 $p16^{INK4a}$ 表达,延长细胞的增殖周期,阻止细胞凋亡[13]。在转基因鼠中,Bmi-1 表达抑制导致其神经功能上的缺失,还引起淋巴细胞的细胞周期严重停滞,而过表达 Bmi-1 的转基因鼠则引发了鼠的淋巴瘤[14]。因此,有可能因为 Bmi-1 下调 $p16^{INK4a}$ 的表达而导致乳腺癌细胞周期延长,增殖旺盛。另一方面,Bmi-1 也可能在蛋白水平直接与肿瘤浸润转移相关因子发生作用。Bmi-1 基因在乳腺癌侵袭迁移中的具体作用机制及调控的下游靶基因尚需进一步的研究。

Transwell 细胞侵袭实验表明 Bmi-1 基因过表达能明显增加癌细胞的侵袭能力,侵袭相关蛋白 MMP-2、MMP-9 表达增多,细胞的粘附功能增加,提示 Bmi-1 基因过表达可能会导致上皮细胞结构不稳定,促进癌细胞播散和肿瘤发展。

总而言之,本研究说明 Bmi-1 在乳腺癌的侵袭迁移的恶性发生发展中有重要作用。Bmi-1 的过表达,可以明显促进乳腺癌细胞系 BT474 的侵袭、迁移能力。但是,Bmi-1 基因在乳腺癌发生发展中的作用,及其在侵袭迁移中的作用机制及调控的下游靶基因尚需进一步的研究。

参考文献:

[1] van-Lohuizen M, Verbeek S, Scheijen B, *et al*. Identification of cooperating oncogenes in E mu-myc transgenic mice by provirus tagging [J]. Cell, 1991, 65(5): 737-752.

[2] Joensuu K, Hagstrom J, Leidenius M, *et al*. Bmi-1, c-myc, and Snail expression in primary breast cancers and their metastases——elevated Bmi-1 expression in late breast cancer relapses[J]. Virchows Arch, 2011, 459(1): 31-39.

[3] Lukacs R U, Memarzadeh S, Wu H, *et al*. Bmi-1 is a crucial regulator of prostate stem cell self-renewal and malignant transformation[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(6): 682-693.

[4] Kim J H, Yoon S Y, Jeong S H, *et al*. Overexpression of Bmi-1 oncoprotein correlates with axillary lymph node metastases in invasive ductal breast cancer[J]. Breast, 2004, 13(5): 383-388.

[5] Song W, Tao K, Li H, *et al*. Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(7): 1754-1760.

[6] Cui H, Hu B, Li T, *et al*. Bmi-1 is essential for the tumorigenicity of neuroblastoma cells[J]. Am J Pathol, 2007, 170(4): 1370-1378.

[7] Li H, Song F, Chen X, *et al*. Bmi-1 regulates epithelial-to-mesenchymal transition to promote migration and invasion of breast cancer cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(6): 3057-3064.

[8] Wu J, Hu D, Yang G, *et al*. Down-regulation of BMI-1 cooperates with artemisinin on growth inhibition of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(7): 1938-1948.

[9] Yang J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829.

[10] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.

[11] Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 15-33.

[12] Birchmeier W, Birchmeier C. Epithelial-mesenchymal transitions in development and tumor progression[J]. EXS, 1995, 74: 1-15.

[13] Onder T T, Gupta P B, Mani S A, *et al*. Loss of E-cadherin promotes metastasis *via* multiple downstream transcriptional pathways [J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3645-3654.

[14] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, *et al*. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells[J]. Semin Cancer Biol, 2012, 22(3): 194-207.

[15] Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2009, 28(1/2): 151-166.

[16] Song L B, Zeng M S, Liao W T, *et al*. Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(12): 6225-6232.

(**收稿**:2014-05-04;**修回**:2014-07-18)

(编辑 郭建秀)