肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001400

可诱导型 PLK1 shRNA 的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系的建立及 PLK1 敲低对细胞增殖的影响

薛　慧，郭　欣，李　娜，李志红，彭　帆，肖方祥，袁成福
（三峡大学医学院，宜昌　443002）

【摘　要】**目的**：建立稳定表达可诱导型 polo 样激酶 1（polo-like kinase 1，PLK1）小发夹 RNA（small hairpin RNA，shRNA）的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系并研究 PLK1 敲低对 MDA-MB-231 细胞增殖、细胞周期的影响并探讨其可能的机制。**方法**：根据siRNA的原理设计 2 对靶向 PLK1 的 shRNA 序列，构建慢病毒表达质粒（PLK1 shRNA 重组质粒）；先用 pLV-tTR/KRAB-Red 空载体制备慢病毒并感染 MDA-MB-231 细胞；在此基础上再用 PLK1 shRNA 重组质粒制备慢病毒并感染上述 MDA-MB-231 细胞；对上述 2 次慢病毒感染的 MDA-MB-231 细胞用强力霉素（doxycycline，DOX）处理 96 h 后，用 qRT-PCR 及 Western blot 检测PLK1 mRNA 及蛋白的表达；用 MTT 法检测细胞增殖；用流式细胞术及碘化吡啶（PI）染色检测细胞周期。**结果**：成功构建靶向PLK1 的 shRNA 慢病毒表达质粒，包装出慢病毒并感染 MDA-MB-231 细胞；成功建立稳定表达可诱导型 PLK1 shRNA 的MDA-MB-231 细胞系，通过 DOX 诱导，可明显抑制该细胞系中 PLK1 在 mRNA 及蛋白水平的表达（$P<0.01$）；PLK1 敲低可明显抑制MDA-MB-231 细胞的增殖（$P<0.05$）；流式细胞术检测发现 PLK1 敲低可阻滞 MDA-MB-231 细胞于 G2/M 期（$P<0.05$）。**结论**：DOX 诱导的 PLK1 敲低可明显抑制 MDA-MB-231 细胞增殖并阻滞细胞于 G2/M 期；经 PLK1 介导的肿瘤生物学行为变化，其机制可能涉及 ERK1/2/Fra1/ZEB1 信号通路。

【关键词】polo 样激酶 1；可诱导型 shRNA；乳腺癌
【中图分类号】R737.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-01-13

Establishment of MDA-MB-231 cell line stably expressing inducible shRNA targeting PLK1 and effects of PLK1 knockdown on cell proliferation of MDA-MB-231 cells

Xue Hui, Guo Xin, Li Na, Li Zhihong, Peng Fan, Xiao Fangxiang, Yuan Chengfu
(*College of Medical Science, China Three Gorges University*)

【Abstract】***Objective***: To establish MDA-MB-231 cell line stably expressing inducible small hairpin RNA(shRNA) targeting polo-like kinase 1(PLK1), to explore the effects of PLK1 knockdown on cell proliferation and cell cycle in MDA-MB-231 cells as well as to explore its possible mechanism. ***Methods***: Two oligonucleotides targeting PLK1 were synthesized and cloned into lentivirus expression plasmid pLVTHM according to siRNA principle(named PLK1 shRNA). MDA-MB-231 cells were infected at first with lentivirus prepared by pLV-tTR/KRAB-Red empty vector, and then infected with another lentivirus prepared by PLK1 shRNA recombinant plasmid. MDA-MB-231 cells infected with aforementioned lentivirus were treated with doxycycline(DOX) for 96 hours, the expression of PLK1 mRNA and protein was determined by real time PCR(qRT-PCR) and Western blot respectively. MTT method was used to determine cell proliferation and flow cytometry and PI staining were used to detect cell cycle. ***Results***: The lentivirus expression plasmids containing PLK1 shRNA were constructed successfully, and MDA-MB-231 cells were infected with the lentivirus prepared by the aforementioned plasmids. MDA-MB-231 cell line expressing stably inducible shRNA targeting PLK1 was established successfully and PLK1 expression levels were decreased obviously at mRNA and protein levels after induction by DOX ($P<0.01$). PLK1 knockdown could obviously inhibit the prolif-

作者介绍：薛　慧，Email：340319417@qq.com，
研究方向：肿瘤基础研究。
通信作者：袁成福，Email：yuancf46@ctgu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81550029、30800410）；湖北省自然科学基金资助项目（编号：2015CFB198）；三峡大学人才启动基金资助项目（编号：KJ2014B064）；肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室（三峡大学）开放基金资助项目（编号：2015KZL02）；宜昌市科学技术局资助项目（编号：A16-301-31）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170919.1547.004.html（2017-09-19）

eration of MDA-MB-231 cells and arrest the cell cycle in G2/M phase ($P<0.05$). ***Conclusions***: PLK1 knockdown induced by DOX could inhibit MDA-MB-231 cell proliferation and arrest cell cycle in G2/M phase, its possible mechanism may involve in ERK1/2/Fra1/ZEB1 signal pathway.

[Key words]polo-like kinase 1; inducible shRNA; breast cancer

乳腺癌(breast cancer)是女性中最常见的恶性肿瘤，是威胁广大女性健康最为严重的疾病之一，已成为女性健康的头号杀手。全世界每年约有 50 万女性死于乳腺癌；我国每年因乳腺癌死亡的病例占全世界的 9.6%[1]。因此，深入研究乳腺癌发生发展的分子机制具有重要的理论和现实意义[2]。

polo 样激酶 1(polo-like kinase 1，PLK1)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶[3]。人类 PLK1 是哺乳动物 PLK 家族 4 个成员(PLK1、PLK2、PLK3、PLK4)之一；该基因定位于染色体 16p12.2，包含 10 个外显子，编码 603 个氨基酸。PLK1 分子包含位于其 N 末端保守的激酶催化结构域及位于 C 末端特征性 polo 盒结构域(polo-box domain，PBD)[4-6]。

较多研究已表明 PLK1 在人类多种类型肿瘤组织中高表达，如乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、食管癌、卵巢癌等[7-8]，提示 PLK1 可能与癌症的发生、发展等过程密切相关。为研究 PLK1 在乳腺癌中的确切作用及分子机制，本研究建立可诱导型PLK1 小发夹 RNA(small hairpin RNA，shRNA)的 MDA-MB-231 细胞系并观察 PLK1 敲低对细胞增殖、细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞及 293T 细胞(中国典型培养物保藏中心)；DMEM 培养基及胎牛血清(Gibco 公司)；PLK1 及 β-actin 抗体(Abcam 公司)；TRIzol 试剂(Invitrogen 公司)；MMLV 逆转录试剂盒(Promega 公司)；实时定量 PCR 试剂盒(Applied Biosystems 公司)；MTT 试剂(Amresco 公司)；*Mlu* Ⅰ、*Cla* Ⅰ及 *Xba* Ⅰ等限制性内切酶(New England Biolabs 公司)；pLV-tTR/KRAB-Red、pLVTHM、psPAX2、pMD2.G 等质粒为瑞士日内瓦大学 Didier Trono 教授惠赠，其中 pLV-tTR/KRAB-Red、pLVTHM 为慢病毒表达质粒，空载体大小分别为 11 085 bp 及 11 985 bp；pLV-tTR/KRAB-Red 质粒上带有融合蛋白 tTR/KRAB-Red，从而表达红色荧光；pLVTHM 质粒带有诱导型表达系统(TetO 系统)及绿色荧光蛋白 GFP，该载体的 H1 启动子可驱动靶基因 shRNA 的表达，因此，该载体可用于构建针对靶基因 shRNA 的慢病毒表达质粒，其两端的酶切位点分别为 *Cla* Ⅰ及 *Mlu* Ⅰ；psPAX2 为慢病毒制备中的包装质粒，大小为 10 703 bp；pMD2.G 为慢病毒包装过程中外壳质粒，大小为 5 824 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 MDA-MB-231 细胞、293T 细胞置于 DMEM 培养基(含 10%牛血清)中，于 37 ℃、5%CO_2 培养箱中培养。

1.2.2 PLK1 shRNA 的设计 根据 shRNA 的设计原则，在 PLK1 cDNA 上选择 2 个目标序列(表 1)，在其两端分别加入 *Mlu* Ⅰ及 *Cla* Ⅰ酶切位点。

1.2.3 PLK1 shRNA 慢病毒表达载体构建 pLVTHM 载体用 *Mlu* Ⅰ及 *Cla* Ⅰ双酶切并胶回收；将公司合成并退火的上述 shRNA 片段用 T4 DNA 连接酶连接到酶切后的 pLVTHM 载体，22 ℃连接过夜后转化到 DH5α 感受态细胞，扩增培养并用碱裂解法提取质粒后经酶切及测序鉴定，从而构建 PLK1 shRNA1、PLK1 shRNA2 质粒。由于阴性对照 NC shRNA 质粒前期已成功构建并保存于本实验室，在此不重复构建。

1.2.4 慢病毒制备 将质粒 pLV-tTR/KRAB-Red 与 psPAX2、pMD2.G 共转染 293T 细胞，8 h 后更换新鲜培养基，24 h 后用 0.45 μm 滤器过滤细胞培养液，滤液感染 MDA-MB-231 细胞。如上所述，将测序正确的 PLK1 shRNA1、PLK1 shRNA2 及 NC shRNA 质粒分别与 psPAX2、pMD2.G 质粒共转染 293T 细

表 1 PLK1 shRNA 序列

Tab.1 The sequence of PLK1 shRNA

shRNA	PLK1 shRNA 序列
PLK1 shRNA1	5'-CGCGCCGGAGATTGTGCCTAAGTCTCTCTCGAGAGAGACTTAGGCACAATCTTTTTTG-3'
	3'-GGCCTCTAACACGGATTCAGAGAGAGCTCTCTCTGAATCCGTGTTAGAAAAAACGC-5'
PLK1 shRNA2	5'-CGCGCCGGCAACCAAAGTCGAATATGACTCGAGTCATATTCGACTTTGGTTGTTTTTG-3'
	3'-GGCCGTTGGTTTCAGCTTATACTGAGCTCAGTATAAGCTGAAACCAACAAAAACGC-5'

胞，如上收集病毒滤液并再次感染 MDA-MB-231 细胞。

1.2.5 PLK1 mRNA 表达的检测 用 2 mg/L 的强力霉素（doxycycline，DOX）诱导上述病毒感染的 MDA-MB-231 细胞，96 h 后提取总 RNA 并逆转录为 cDNA；用实时荧光定量PCR 检测 PLK1 mRNA 的表达，上述实验重复 3 次，用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 方法计算 PLK1 mRNA 的相对表达水平。所用 PLK1 上游引物：5'-TGATGGCAGCCGTGACCTA-3'，下游引物：5'-GGCGGTATGTGCCGGAAGT-3'；GAPDH 上游引物：5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'，下游引物：5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。

1.2.6 PLK1 等蛋白表达的检测 用 DOX 诱导上述 2 次病毒感染的 MDA-MB-231 细胞 96 h，提取总蛋白，用 Western blot 检测 PLK1 等蛋白的表达，实验重复 3 次。

1.2.7 细胞增殖的检测 将 2 次慢病毒感染的 MDA-MB-231 细胞接种到 96 孔板（5×10^3 个/孔）中；设立 NC shRNA组、PLK1 shRNA1 组、PLK1 shRNA2 组，每组重复 5 孔；经 DOX 诱导 1、2、3、4 和 5 d 后分别用 MTT 法（5 g/L MTT），检测其 570 nm 吸光度（absorbance，A）值，实验重复 3 次。

1.2.8 细胞周期分析 用 DOX 诱导上述 2 次病毒感染的 MDA-MB-231 细胞 4 d 后，收集细胞经冰冷的 70%乙醇固定过夜后，用 5 μg/mL RNase A 及 50 μg/mL 碘化吡啶（PI）37 ℃孵育 30 min 后，用 FACScan 流式细胞仪检测及 ModFit LT 软件分析，实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件，所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。增殖实验数据采用重复测量方差分析；其余不同组别间数据采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD-t法；同一组别诱导组与未诱导组之间的比较采用配对样本 t 检验。检验水准为 α=0.05。

2 结 果

2.1 靶向 PLK1 的 shRNA 慢病毒表达载体的鉴定

根据文献[4]描述，连接后的重组质粒用 *Xba* Ⅰ及 *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定，切下的片段实际大小约为 528 bp；连接后的重组质粒比未连接的空载体大约 35 bp。所得酶切产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳显示重组质粒双酶切鉴定正确（图 1）；重组质粒进一步经测序鉴定正确，插入序列无碱基突变。鉴定正确的重组质粒分别命名为 PLK1 shRNA1、PLK1 shRNA2。

2.2 DOX 诱导后 PLK1 mRNA 及蛋白的表达

各组中 DOX 诱导和未诱导后经 qRT-PCR 检测所得 PLK1 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 值见表 2。可见在 PLK1 shRNA1 及 PLK1 shRNA2 组中，经 DOX 诱导后，PLK1 mRNA 的表达均得到明显抑制（P<0.05，表 2）；而在 NC shRNA 组中，经 DOX 诱导后，PLK1 mRNA 表达变化无统计学意义（t=0.658，P=0.578，表2）。

各组中 DOX 诱导和未诱导后 PLK1 蛋白表达的 Western blot 代表性结果如图 2 所示，其 PLK1/β-actin 值的比较见表 3。可见在 PLK1 shRNA1 及 PLK1 shRNA2 组中，经 DOX 诱导后，PLK1 蛋白的表达均得到明显抑制（P<0.05，表 3 及图 2）；而在 NC shRNA 组中，经 DOX 诱导后，PLK1 蛋白的表达变化无统计学意义（t=0.214，P=0.851，表 3 及图 2）。

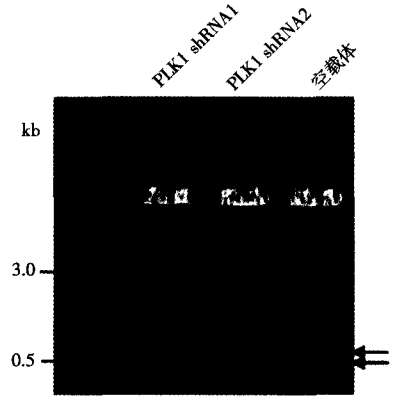


图 1 PLK1 shRNA 重组质粒的 *Xba* Ⅰ及 *Eco*R Ⅰ双酶切鉴定

Fig.1 Double-restriction endonuclease digestion analysis of PLK1 shRNA by *Xba* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ

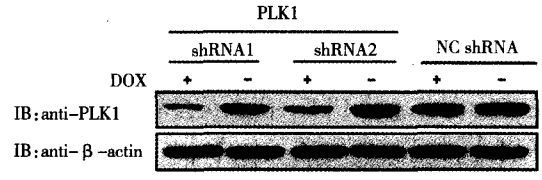


图 2 DOX 诱导慢病毒感染的 MDA-MB-231 细胞后 PLK1 蛋白的表达

Fig.2 PLK1 protein expression was determined by western blot in MDA-MB-231 cells infected with lentivirus and induced with DOX

表 2 各组中 PLK1 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 值比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Mean PLK1 mRNA $2^{-\Delta\Delta Q}$ value in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	DOX未诱导	DOX诱导	t 值	P 值
NC shRNA	1.000 ± 0.000	0.987 ± 0.035	0.658	0.578
PLK1 shRNA1	0.983 ± 0.115[a]	0.190 ± 0.060[b]	24.949	0.002
PLK1 shRNA2	0.993 ± 0.085[a]	0.220 ± 0.070[b]	8.640	0.013
F 值	0.031	98.224	-	-
P 值	0.970	0.000	-	-

注：a，与 NC shRNA 组比较，P>0.05；b，与 NC shRNA 组比较，P<0.05

表 3 各组中 PLK1/β-actin 值的比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Mean ratio of PLK1/β-actin in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	DOX未诱导	DOX诱导	t 值	P 值
NC shRNA	0.992 ± 0.068	1.010 ± 0.074	0.214	0.851
PLK1 shRNA1	0.970 ± 0.135[a]	0.105 ± 0.034[b]	42.251	0.001
PLK1 shRNA2	1.010 ± 0.063[a]	0.153 ± 0.064[b]	9.930	0.010
F 值	0.193	136.339	-	-
P 值	0.829	0.000	-	-

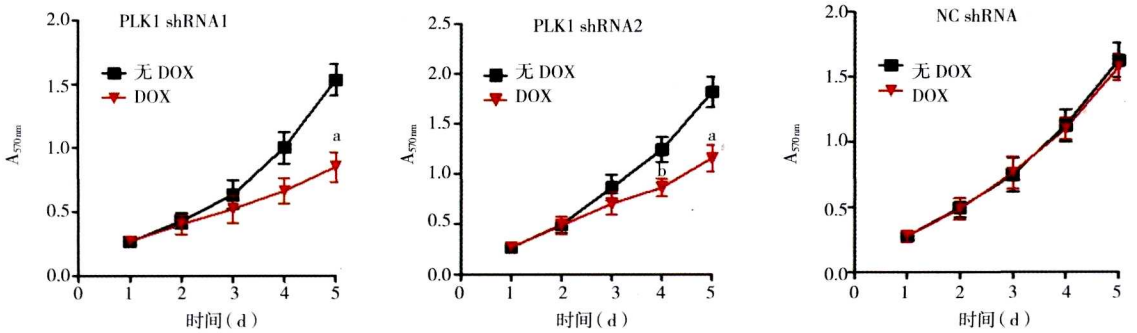
注：a，与 NC shRNA 组比较，P>0.05；b：与 NC shRNA 组比较，P<0.05

2.3 PLK1 敲低对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

如图 3 所示，与 NC shRNA 组相比，在 PLK1 shRNA1 及 PLK1 shRNA2 组中，经 DOX 诱导 4 d，PLK1 敲低后的细胞增殖均有不同程度的降低。重复测量方差分析显示：PLK1 shRNA1、PLK1 shRNA2 及 NC shRNA 组间比较，差异有统计学意义（F=316.930，P=0.000）；3 组中 DOX 处理及未处理各时间点比较，差异有统计学意义（F=279.411，P=0.000）；分组与时间点的交互作用比较，差异也有统计学意义（F=67.232，P=0.000）。在 PLK1 shRNA1 组中，经 DOX 诱导第 5 天，处理和未处理组的 $A_{570\ nm}$ 值分别为（0.848 ± 0.117）、（1.531 ± 0.123）；经 LSD-t 检验得知，当用 DOX 诱导 PLK1 表达降低后，MDA-MB-231 细胞增殖得到明显抑制（t=48.061，P=0.000，图 3）。在 PLK1 shRNA2 组中，经 DOX 诱导第 5 天，处理和未处理组的 $A_{570\ nm}$ 值分别为（1.153 ± 0.133）、（1.812 ± 0.155）；经 LSD-t 检验得知，当用 DOX 诱导 PLK1 表达降低后，MDA-MB-231 细胞增殖得到明显抑制（t=31.602，P=0.000，图 3）；而在阴性对照组中，处理和未处理组的 $A_{570\ nm}$ 值分别为（1.569 ± 0.101）、（1.622 ± 0.132）；经 LSD-t 检验得知，当 DOX 诱导第 5 天，MDA-MB-231 细胞增殖没有明显变化（t=0.372，P=0.581，图 3）。

2.4 PLK1 敲低对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

各组中 DOX 诱导 PLK1 表达降低对细胞周期影响的代表性结果如图 4 所示；其 G2/M 期细胞含量的比较见表 4。可见在 PLK1 shRNA1 组中，经 DOX 诱导 4 d 后，MDA-MB-231 的 G2/M 期细胞含量明显增多（F=7.019，P=0.020，图 4 及表 4）；同样，在 PLK1 shRNA2 组中，经 DOX 诱导 4 d 后，MDA-MB-231 的 G2/M 期细胞含量亦明显增多（t=4.975，P=0.038，图 4 及表 4）；而在 NC shRNA 组中，经 DOX 诱导 4 d 和未诱导的 G2/M 期细胞含量无明显变化（t=0.034，P=0.976，图 4 及表 4）。



与无 DOX 组比较，a：P < 0.01，b：P < 0.05

图 3 MTT 法检测 PLK1 敲低对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig.3 Effects of PLK1 knockdown on MDA-MB-231 cell proliferation were determined by MTT

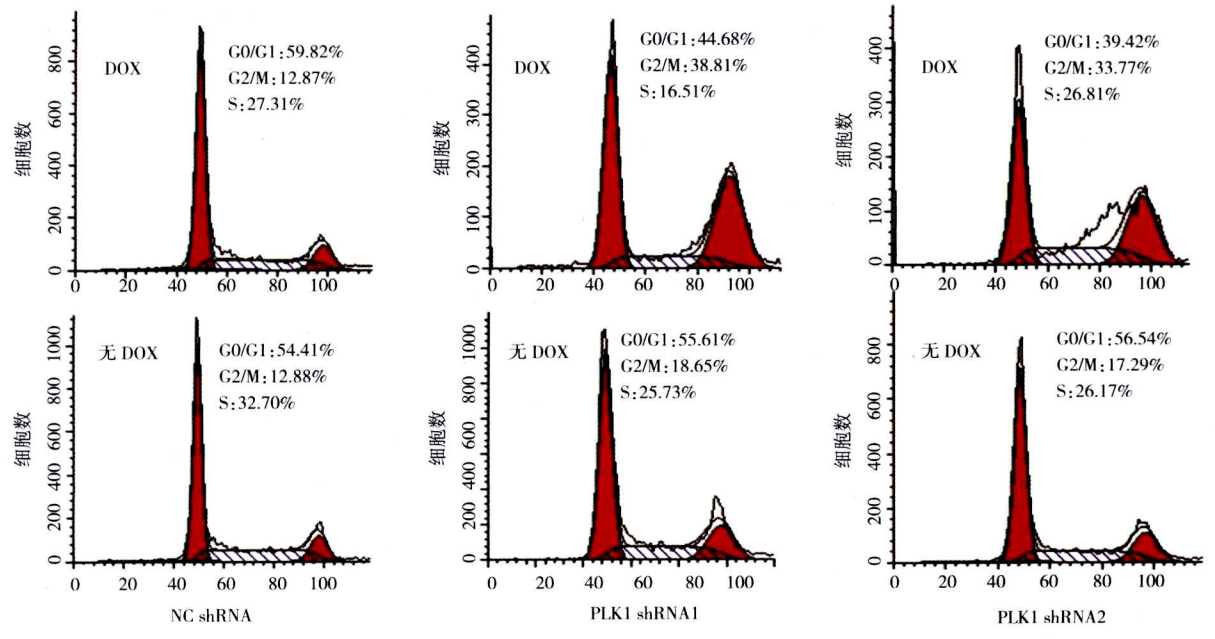


图 4 流式细胞术检测 PLK1 敲低对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

Fig.4 Effects of PLK1 knockdown on MDA-MB-231 cell cycle were determined by flow cytometry

表 4 各组中 G2/M 期细胞含量比较（%，$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Mean cell account in G2/M phase（%，$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	DOX未诱导	DOX诱导	t 值	P 值
NC shRNA	12.780 ± 2.410	12.840 ± 3.070	0.034	0.976
PLK1 shRNA1	13.110 ± 4.880[a]	38.570 ± 5.190[b]	7.019	0.020
PLK1 shRNA2	12.950 ± 3.790[a]	36.870 ± 6.420[b]	4.975	0.038
F 值	0.006	24.397	-	-
P 值	0.994	0.001	-	-

注：a，与 NC shRNA 组比较，P>0.05；b：与 NC shRNA 组比较，P<0.05

表 5 各组中相对蛋白表达的比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5 Mean value of relative protein expression in each group（$\bar{x}\pm s$，n=3）

分组	PLK1/β-actin	p-ERK1/2/β-actin	ERK1/2/β-actin	Fra1/β-actin	ZEB1/β-actin
NC shRNA	0.951 ± 0.139	1.210 ± 0.150	1.480 ± 0.056	1.507 ± 0.105	1.620 ± 0.090
PLK1 shRNA1	0.133 ± 0.035[a]	0.217 ± 0.110[a]	1.497 ± 0.076[b]	0.420 ± 0.110[a]	0.527 ± 0.105[a]
PLK1shRNA2	0.167 ± 0.035[a]	0.200 ± 0.090[a]	1.487 ± 0.085[b]	0.470 ± 0.090[a]	0.583 ± 0.105[a]
F 值	88.329	70.452	0.039	108.443	113.035
P 值	0.000	0.003	0.962	0.001	0.001

注：a，与 NC shRNA 组比较，P<0.05；b：与 NC shRNA 组比较，P>0.05

2.5 PLK1 敲低对其他部分相关蛋白表达的影响

在建立的稳定细胞系中，经 DOX 诱导 4 d 后，在 NC shRNA、PLK1 shRNA1 及 PLK1shRNA2 各组中，部分相关蛋白的表达如图 5 所示；蛋白 PLK1/β-actin、p-ERK1/2/β-actin、ERK1/2/β-actin、Fra1/β-actin、ZEB1/β-actin 的比值见表 5。由图 5 及表 5 可见：经 DOX 诱导 PLK1 表达抑制后，与 NC shRNA 组比较，磷酸化的 ERK1/2(p-ERK1/2)表达明显下调（F=70.452，P=0.003）；Fra1 的表达（F=108.443，P=0.001）及 ZEB1 的表达（F=113.035，P=0.001）均明显下调，表明经 PLK1介导的肿瘤生物学变化可能涉及 ERK1/2/Fra1/ZEB1 信号通路。

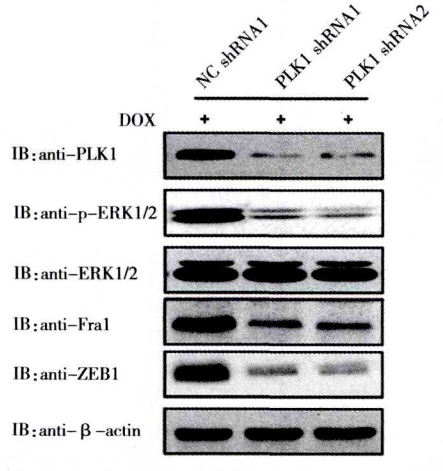


图 5 Western blot 检测 PLK1 敲低对其他部分相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of PLK1 knockdown on the expression of other associated proteins

3 讨 论

PLK1 是细胞分裂的主要调节者，它调控细胞分裂中的多个重要事件，如有丝分裂的进入、中心体的成熟等过程[9]。PLK1 通过调控有丝分裂中多个转录因子活性，从而调控一系列有丝分裂靶基因表达，进而使有丝分裂顺利进行。鉴于 PLK1 在细胞分裂调控中的重要作用，研究者们对其在肿瘤中的作用表现出浓厚兴趣。目前，PLK1 在乳腺癌中的研究主要归纳如下[10-11]：①PLK1 与乳腺癌的发生发展、浸润转移密切相关，但其作用机制仍不清楚；②PLK1 抑制剂的研究：PLK1 抑制剂可提高乳腺癌药物治疗的敏感性；③PLK1 与乳腺癌预后：鉴于PLK1 在乳腺癌中呈现高表达，具有潜在预后价值。

为研究 PLK1 在乳腺癌中的确切作用及分子机制，本研究建立可诱导型 PLK1 shRNA 的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系并观察 PLK1 敲低对细胞增殖及细胞周期的影响。由于慢病毒（lentivirus，LV）宿主范围广，可感染分裂期及非分裂期细胞；并可整合到宿主细胞基因组而使其携带的基因长期稳定表达。因此，慢病毒成为目前基因功能研究较理想的载体工具。pLV-tTR/KRAB-Red 是一种慢病毒

表达载体(空载体),其上带有融合蛋白 tTR-KRAB;pLVTHM 是另一个表达目的基因 shRNA 的慢病毒表达载体(驱动 shRNA 的启动子为 H1 启动子),该载体带有 TetO 系统。当细胞首先被 pLV-tTR/KRAB-Red 慢病毒感染后,再被 pLVTHM 慢病毒感染,此时 pLVTHM 上的 TetO 与 pLV-tTR/KRAB-Red 上的 tTR-KRAB 结合,使 TetO 位点上下游 3 kb 范围的表达得以封闭,因此 H1 启动子驱动的目的基因shRNA 不能表达;当细胞中加入 DOX 后,TetO 将与 DOX结合,使 TetO 与 tTR-KRAB 的结合得以解离,从而使 TetO 位点上下游 3 kb 范围的封闭得以解除,使 H1 启动子驱动的目的基因 shRNA 得以表达。因此,该系统为 DOX 诱导的目的基因 shRNA 诱导型表达系统[12-14]。

本研究中,MDA-MB-231 细胞在感染 pLV-tTR/KRAB-Red 慢病毒的基础上,再感染携带有 PLK1 shRNA 的 pLVTHM 慢病毒;上述 MDA-MB-231 细胞系在加入 DOX 诱导后,能使 PLK1 在 mRNA 及蛋白水平的表达得到明显抑制,而 NC shRNA 组 PLK1的表达没有明显变化,表明稳定表达可诱导型 PLK1 shRNA 的 MDA-MB-231 细胞系成功构建,为进一步研究 PLK1 在乳腺癌中的作用及深入研究其分子机制奠定良好基础。

参 考 文 献

[1] Fan L,Strasser-Weippl K,Li JJ,et al. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncol,2014,15(7):e279-e289.

[2] Padmanabhan P,Goggi J,Bejot R,et al. Molecular targeting of breast cancer:imaging and therapy[J]. Curr Pharm Biotechnol,2011,12(4):528-538.

[3] Barr FA,Silljé HH,Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2004,5(6):429-440.

[4] Park JE,Soung NK,Johmura Y,et al. Polo-box domain:a versatile mediator of polo-like kinase function[J]. Cell Mol Life Sci,2010,67(12):1957-1970.

[5] Cogswell JP,Brown CE,Bisi JE,et al. Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function[J]. Cell Growth Differ,2000,11(12):615-623.

[6] Mundt KE,Golsteyn RM,Lane HA,et al. On the regulation and function of human polo-like kinase 1(PLK1):effects of overexpression on cell cycle progression[J]. Biochem Biophys Res Commun,1997,239(2):377-385.

[7] Weichert W,Kristiansen G,Winzer KJ,et al. Polo-like kinase isoforms in breast cancer:expression patterns and prognostic implications[J]. Virchows Arch,2005,446(4):442-450.

[8] Yuan C,Wang L,Zhou L,et al. The function of FOXO1 in the late phase of the cell cycle is suppressed by PLK1-mediated phosphorylation[J]. Cell Cycle,2014,13(5):807-819.

[9] Fu Z,Malureanu L,Huang J,et al. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression[J]. Nat Cell Biol,2008,10(9):1076-1082.

[10] Rizki A,Mott JD,Bissell MJ. Polo-like kinase 1 is involved in invasion through extracellular matrix[J]. Cancer Res,2007,67(23):11106-11110.

[11] 鞠吉雨,于文静,高志芹,等. PLK1 稳定 β-catenin 促进食管鳞癌细胞上皮间质转化[J]. 中国药理学通报,2014,30(12):1748-1751.

[12] Wiznerowicz M,Trono D. Conditional suppression of cellular gene:lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference[J]. J Virol,2003,77(16):8957-8961.

[13] He X,Ee PL,Coon JS,et al. Alternative splicing of the multidrug resistance protein 1/ATP binding cassette transporter subfamily gene in ovarian cancer creates functional splice variants and is associated with increased expression of the splicing factors PTB and SRp20[J]. Clin Cancer Res,2004,10(14):4652-4660.

[14] Agus DB,Alexander JF,Arap W,et al. A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells[J]. Sci Rep,2013,3:1449.

（责任编辑:冉明会）