



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.05.005

过表达 maspin 对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响

李艳琦, 张同存, 孙雪光, 廖兴华, 王楠, 罗学刚
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 通过构建 maspin 表达质粒, 在人乳腺癌 MCF-7 细胞中过表达 maspin, 研究 maspin 对 MCF-7 细胞增殖率及凋亡率的影响. MTT 检测实验表明, 过表达 maspin 能够剂量依赖性抑制 MCF-7 细胞的增殖率. 采用 TUNEL 法和流式细胞术检测 maspin 对 MCF-7 细胞凋亡的影响, 结果表明过表达 maspin 可促进 MCF-7 细胞凋亡进而抑制其增殖.

关键词: 乳腺癌; MCF-7 细胞; maspin; 凋亡

中图分类号: R737.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2014)05-0020-04

Effect of Overexpressing Maspin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell MCF-7

LI Yanqi, ZHANG Tongcun, SUN Xueguang, LIAO Xinghua, WANG Nan, LUO Xuegang
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: By constructing maspin expression plasmid, the effects of overexpressed maspin on the proliferation and apoptosis of human breast cancer cell MCF-7 were studied. The proliferation of MCF-7 cells was observed with MTT. The results show that the overexpression of maspin inhibited MCF-7 cell's proliferation in a dose dependent manner. The apoptosis of MCF-7 cells was observed with TUNEL and flow cytometry. The results indicate that the maspin overexpression could promote the apoptosis of MCF-7 cell and thereby inhibit cellular proliferation.

Key words: breast cancer; MCF-7 cells; maspin; apoptosis

乳腺癌是具有高发率和死亡率的恶性肿瘤之一^[1]. 乳腺癌的发生和发展是多基因突变的结果, 这包括原癌基因的激活和抑癌基因的失活^[2]. maspin 是一种新型的非经典丝氨酸蛋白酶抑制剂, 作为一个肿瘤抑制基因, 它能在体内抑制肿瘤的生长和迁移^[3-4]. maspin 已经被证明能够抑制细胞运动性、侵袭和迁移^[5-6]. 然而, maspin 对细胞增殖和凋亡的影响还没有被研究清楚. 本文构建了 maspin 的表达质粒, 探索过表达 maspin 对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响, 这将为 maspin 在乳腺癌治疗方面的应用提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 低糖培养基, Gibico 公司; 胎牛血清, 天

津康源生物技术有限公司; 空载质粒 pcDNA3.1, 本实验室保藏; Fast Pfu DNA 聚合酶、质粒抽提试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; Kpn I 限制性内切酶、Xho I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DeadEndTM 荧光测定 TUNEL 系统, Promega 生物技术有限公司; M-MLV 逆转录酶、Turbo 转染试剂、Trizol 裂解液, 上海英骏生物技术有限公司; 胶回收试剂盒、DM2000 Plus DNA Marker, 北京康为世纪生物科技有限公司; maspin 一抗, Abcam 公司; MTT, 北京索莱宝科技有限公司; Annexin V 细胞凋亡检测试剂盒, 天津三箭生物技术有限公司.

1.2 细胞株和细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞为本实验室保藏. 在含体积分数 10% 灭活胎牛血清的 DMEM 低糖

收稿日期: 2013-12-05; 修回日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31071126, 31000343)

作者简介: 李艳琦(1989—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 张同存, 教授, tony@tust.edu.cn.

培养液中,于 37 °C、CO₂ 体积分数 5% 条件下培养. 用体积分数 0.25% 的胰酶进行消化传代.

1.3 质粒构建

收集培养的人乳腺癌细胞株 MCF-7 细胞,提取总 RNA 后按 M-MLV 逆转录酶说明书逆转录成 cDNA. 以此 cDNA 为模板,以 NCBI 上提供的 maspin mRNA 序列(NM_002639.4)设计包含 maspin 基因全长和 *Kpn* I/*Xho* I 双酶位点的引物,上游引物 5'-CAGGGGTACCATGGATGCCCT-3',下游引物 5'-GCCACTCGAGTTAAGGAGAACAGAATT-3',PCR 扩增产物长度为 1 148 bp 的 maspin 基因.

将目的基因正向插入到 pcDNA3.1 载体的 *Kpn* I 和 *Xho* I 克隆位点,构建表达质粒 maspin/pcDNA3.1,并经内切酶和测序证实.

1.4 质粒转染和 RT-PCR 检测 maspin mRNA 水平的表达

用 Turbofect™ 细胞转染试剂将 4 μg 表达质粒 maspin/pcDNA3.1 按质粒与转染试剂(μg : μL) 1 : 2 的比例转染到 MCF-7 细胞中. 对照组为未处理组和转染空白质粒组. 将细胞以 2 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中培养 12 h 后,将质粒-脂质体复合物转染至细胞中,在无血清的培养液中培养 6 h 后换新鲜含血清培养液,继续培养 18 h. 而后分别收集正常培养、转染空质粒和转染表达质粒细胞,提取总 RNA 后逆转录成 cDNA. 以此为模板进行 PCR 反应. maspin 上游引物 5'-AGTGGGTGCTAAAGGTGA-3',下游引物 5'-GAGCCGCTTGATTAGTTT-3',扩增产物大小 148 bp. 内参 GAPDH 由英骏生物技术有限公司合成,上游引物 5'-ATTCAACGGCAGTCAAGG-3',下游引物 5'-GCAGAAGGGGCGGAGATGA-3',产物大小 213 bp. 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色. 用 BioRad 图像分析仪成像并进行半定量分析,以测定目的基因的表达水平.

1.5 Western blot 检测 maspin 蛋白水平的表达

分别收集正常培养、转染空质粒和表达质粒 48 h 后细胞提取总蛋白,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样本. 将蛋白样本转移至 NC 膜上. 牛奶封闭液 37 °C 封闭 NC 膜 1 h,maspin 一抗(兔抗,1 : 1 000)4 °C 孵育过夜. 弃一抗,用 PBS 洗膜 3 次,加入红外(700 或 800 nm)荧光染料标记的二抗(山羊抗兔,1 : 5 000),避光平稳摇动,室温 1.5 h. 弃二抗,用 PBS 洗膜 3 次,利用 odyssey 远红外成像系统(LICOR 公司)扫膜.

1.6 MTT 法检测细胞增殖率

取对数生长期的 MCF-7 细胞,调整浓度为 10⁴ mL⁻¹,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL. 培养 12 h 后弃去培养基,对照组转染 pcDNA3.1,实验组梯度转染 maspin/pcDNA3.1(0.05、0.15、0.20 μg),每组设 5 个平行孔. 在无血清的培养液中培养 6 h 后换新鲜含血清培养液,继续培养 18 h. 用 PBS 洗 2 次,每孔加入质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL 和无血清培养液 80 μL. 继续培养 4 h 后弃去上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,振荡使紫色结晶物充分溶解. 在酶标仪上测定波长 490 nm 处各孔的吸光度 *A*,并按式(1)计算细胞增殖率.

$$\text{细胞增殖率} = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}}{A_{\text{对照组}} - A_{\text{调零组}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡情况

取 MCF-7 细胞接种于 24 孔培养板中,培养 12 h 后分别转染 pcDNA3.1、maspin/pcDNA3.1,质粒质量为 1 μg,质粒与转染试剂比例(μg : μL)为 1 : 2,24 h 后吸去培养基,用 PBS 洗涤 3 次. 加入 4% 多聚甲醛溶液,4 °C 放置 25 min. 加入 PBS,放置 5 min,重复 2 次. 加入体积分数 0.25% 的 Triton X-100 溶液,放置 20 min. 加入 PBS,室温放置 5 min,重复 2 次. 吸干孔板中液体,用 100 μL 平衡缓冲液覆盖细胞,室温放置 10 min. 吸掉大部分平衡缓冲液,加入 50 μL rTdT 孵育缓冲液,37 °C 避光放置 1 h. 将 300 μL 2 × SSC 加入孔板,室温放置 15 min. 加入 PBS,放置 5 min,重复 2 次. 加入 300 μL DAPI 溶液,室温放置 15 min. 加入 PBS,室温放置 5 min,重复 2 次. 立即在共聚焦显微镜(OLYMPUS 公司)下观察细胞的凋亡情况.

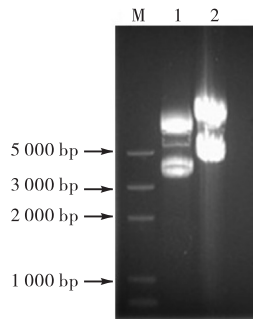
1.8 流式细胞术检测细胞凋亡情况

分别转染 pcDNA3.1、maspin/pcDNA3.1,质粒质量为 8 μg,质粒与转染试剂比例(μg : μL)为 1 : 2,而后分别收集正常细胞,转染 pcDNA3.1 的细胞、转染 maspin/pcDNA3.1 的细胞,800 g 离心 10 min,弃上清液. 冰 PBS 洗细胞 1 次. 用 1 mL Binding Buffer 悬浮细胞,300 g 离心 10 min,弃上清液. 用 1 mL Binding Buffer 重悬细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁶ mL⁻¹,取 100 μL 细胞悬液加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻振荡混匀,室温避光孵育 10 min,再加入 5 μL PI,室温避光孵育 5 min,补加 400 μL Binding Buffer,轻轻振荡混匀,1 h 内进行流式细胞定量分析,检测细胞凋亡情况.

2 结果与分析

2.1 maspin/pcDNA3.1 表达质粒的鉴定

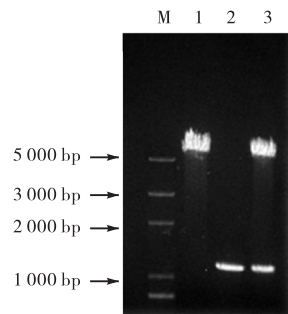
以提取的 cDNA 为模板克隆 maspin 基因片段, 将纯化后的 PCR 产物双酶切后连接到表达载体 pcDNA3.1 上, 构建出表达质粒 maspin/pcDNA3.1 (图 1). 表达质粒 maspin/pcDNA3.1 经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切后得到载体片段和 maspin 基因片段, 初步证明 maspin 基因被插入到空载质粒中 (图 2). 测序鉴定结果表明 maspin 已成功连接到载体 pcDNA3.1 上, 无突变, 与 NCBI 相应序列一致.



M. DNA marker; 1. pcDNA3.1 空载质粒; 2. maspin 表达质粒

图 1 表达质粒 maspin 的电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of plasmid maspin



M. DNA marker; 1. 双酶切的 pcDNA3.1; 2. PCR 产物; 3. 双酶切的 maspin 表达质粒

图 2 表达质粒 maspin 的酶切验证

Fig. 2 Restriction digest confirmation of plasmid maspin

2.2 maspin/pcDNA3.1 转染 MCF-7 细胞后 maspin mRNA 表达变化

为了检测转染后 maspin 是否得到了表达, 采用了半定量 RT-PCR 检测 maspin mRNA 表达情况, 结果如图 3 所示. 由图 3 可知: 未转染组和转染空载质粒组 maspin mRNA 无表达; 而 maspin/pcDNA3.1 转染组与前二者比较 maspin mRNA 表达明显增强. 这说明转染 maspin/pcDNA3.1 表达质粒后 maspin 能在

mRNA 水平进行过表达, 且转入空载质粒不影响 maspin 在 mRNA 水平的表达.

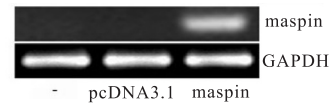


图 3 转染前后 maspin mRNA 表达变化

Fig. 3 Changes of maspin mRNA expression after transfection

2.3 maspin/pcDNA3.1 转染 MCF-7 细胞后 maspin 蛋白表达变化

为了检测转染后 maspin 是否得到了表达, 采用了半定量 RT-PCR 检测 maspin 蛋白表达情况, 结果如图 4 所示. 由图 4 可知: 未转染组和转染空载质粒组 maspin 蛋白无表达; 而 maspin/pcDNA3.1 转染组与前二者比较 maspin 蛋白表达明显增强. 这说明转染 maspin/pcDNA3.1 表达质粒后 maspin 能在蛋白水平进行过表达, 且转入空载质粒不影响 maspin 在蛋白水平的表达.

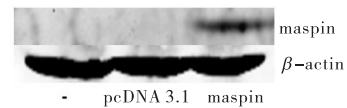


图 4 转染前后 maspin 蛋白表达变化

Fig. 4 Changes of maspin protein expression after transfection

2.4 转染 maspin 对 MCF-7 细胞增殖的影响

利用 MTT 法检测转染空载质粒 pcDNA3.1 和梯度转染 maspin/pcDNA3.1 表达质粒后 MCF-7 细胞的增殖能力, 结果见表 1. 由表 1 可知: 细胞表达 maspin 蛋白后增殖能力明显降低, 且抑制效应呈现剂量依赖性变化. 提示过表达 maspin 能抑制 MCF-7 细胞的增殖.

表 1 MTT 检测细胞增殖情况

Tab. 1 Proliferation of MCF-7 cells tested with MTT assay

| 组别 | 细胞增殖率/% |
|----------------|-------------|
| pcDNA3.1 | 100.0 ± 1.3 |
| 0.05 μg maspin | 88.8 ± 2.2 |
| 0.15 μg maspin | 84.6 ± 7.2 |
| 0.20 μg maspin | 74.4 ± 4.8 |

2.5 TUNEL 检测转染 maspin 后 MCF-7 细胞的凋亡

MCF-7 细胞分别经空载质粒 pcDNA3.1 和表达质粒 maspin/pcDNA3.1 转染 24 h 后, 利用 TUNEL 观察细胞凋亡率的变化. 随机选取 10 个视野进行观察并经统计软件计算凋亡率. TUNEL 检测细胞凋亡

情况如图 5 所示. 由图 5 可知 DAPI 所染的为细胞核, 右侧染料所染为凋亡细胞. 与转染空载质粒组相比, 转染表达质粒组细胞凋亡数量升高了约 9 倍.

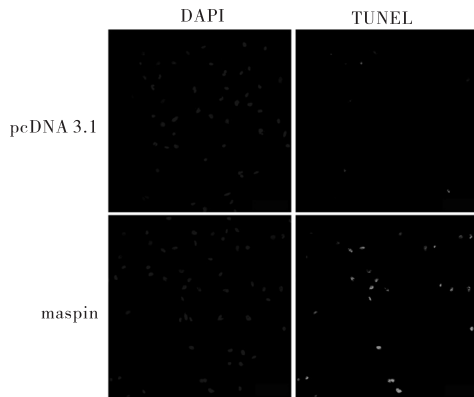


图 5 TUNEL 检测细胞凋亡情况

Fig. 5 Apoptosis of MCF-7 cells detected with TUNEL assay

2.6 流式细胞术检测转染 maspin 后 MCF-7 细胞的凋亡

应用 AnnexinV-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡, 横坐标是 Annexin-V FITC, 纵坐标是 PI, 正常活细胞分布在流式细胞分析图的左下区, 早期凋亡细胞分布在流式细胞分析图的右下区, 晚期凋亡或坏死细胞分布在流式细胞分析图的右上区, 坏死细胞分布在流式细胞分析图的左上区, 图 6 结果显示转染重组质粒组与转染空载质粒组 MCF-7 细胞早期凋亡、晚期凋亡或坏死率均明显增加.

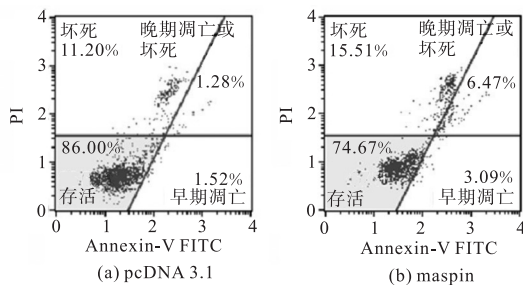


图 6 流式细胞分析图

Fig. 6 Diagram of flow cytometry analysis

3 讨论

maspin 作为丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族的一个非抑制剂成员, 在多种癌症类型中发挥抑癌作用^[7]. maspin 的抗肿瘤影响是抑制肿瘤细胞的侵袭, 增强对细胞外基质的粘附, 增强对凋亡的敏感性, 抑制新生血管的形成^[5-6]. 然而, 关于 maspin 在影响 MCF-7 细胞的增殖与凋亡的研究目前比较少.

maspin 能够在正常的乳腺或前列腺上皮细胞中表达, 然而其在肿瘤细胞中表达减少或丧失^[8]. maspin 基因在乳腺癌细胞中的表达缺失不是因为 maspin 基因的缺失或重排^[9], 这表明在乳腺癌发展过程中可能有转录水平的因素来调节 maspin 的表达.

凋亡是一种主要的细胞自我消亡过程, 它被认为是一种阻止乳腺癌细胞发展的有效途径. 作为抗肿瘤药物的凋亡诱导物已经引起了广泛关注, 其中的一些已经被应用于临床^[10]. 它可能是肿瘤治疗中一种非常有前景的治疗途径. 先前的报道^[6]已经证明 maspin 在功能上可能与乳腺癌细胞的凋亡有关, 能够使乳腺癌细胞对十字孢碱引起的细胞凋亡更为敏感. 而且, 5-杂氮脱氧胞苷 (5-aza-dc) 和曲古柳菌素 (TSA) 能引起细胞凋亡, 并且在这个过程中伴随的 maspin 的重新表达也可能与凋亡有关^[11]. maspin 作为一种新型的 E2F1 调节基因, 表明它可能参与 E2F1 引起的细胞凋亡, 尤其是 E2F1 和化学药剂共同引起的凋亡^[12]. 先前的一些报道^[5]还阐明 maspin 能引起 Bax 和 P21 的表达来调节乳腺癌细胞的凋亡. 本文也证明了过表达 maspin 能够诱导 MCF-7 细胞的凋亡, 从而可以剂量依赖性地抑制 MCF-7 细胞的增殖. 以上结果提示 maspin 对肿瘤的调节方式是多样化的, 并可能与肿瘤的种类有密切关系.

本实验研究表明 maspin 能抑制 MCF-7 细胞的增殖并引起其凋亡, 所以 maspin 可能在乳腺癌细胞凋亡中起重要作用, 并有希望成为一种以凋亡为基础的乳腺癌治疗的改良药剂, 但其具体机制还应进一步研究.

参考文献:

- [1] Yanagawa M, Ikemoto K, Kawauchi S, et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype[J]. BMC Research Notes, 2012, 25 (5) : 376.
- [2] Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells[J]. Genes & Development, 2001, 15 (1) : 50-65.
- [3] Sheng S, Carey J, Seftor E A, et al. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93 (21) : 11669-11674.

(下转第 47 页)