

MCF10A - Er - Src 诱导转化模型的构建

任 雪 程谟斌 张 业 沈珞琲

摘 要 **目的** 构建能够被他莫西芬(tamoxifen, TAM)激活的 MCF10A - Er - Src 诱导转化模型。**方法** 利用 PCR 扩增法分别获得雌激素受体配体结合结构域序列(hbER)和 Src 序列,并将其分别插入到改造后的反转录病毒表达载体 pMSCV - FLAG - HA 中,构建 ER - Src 融合蛋白表达质粒。包装 pMSCV - ER - Src - FLAG - HA 重组反转录病毒,感染 MCF10A,利用基因组 PCR 和 Western blot 法筛选能够稳定表达外源融合蛋白 ER - Src 的细胞系。利用免疫沉淀(IP)和 Western blot 法验证 TAM 对稳转细胞系的激活,并观察细胞形态变化。**结果** 构建的 MCF10A - Er - Src 细胞系能够稳定表达 ER - Src 融合蛋白。TAM 能诱使 Src 第 416 位酪氨酸发生磷酸化,从而激活 Src,使 MCF10A - Er - Src 发生转化。**结论** 成功获得能够被 TAM 诱导激活的 MCF10A - Er - Src 转化模型。

关键词 人乳腺表皮细胞 雌激素受体配体结合结构域 - Src 融合蛋白 他莫西芬 细胞转化

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Construction of an Inducible Transformation Model Consisting of Nontransformed MCF - 10A Containing Er - Src. Ren Xue, Cheng Mobin, Zhang Ye, Shen Yufei. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences CAMS & PUMC, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To construct a transformation model consisting of non - transformed MCF - 10A containing Er - Src, which can be induced to transform by tamoxifen (TAM). **Methods** To construct ER - Src, DNA sequences encoding the hormone binding domain of the HE14 allele of the human estrogen receptor (hbER) were fused to the Schmidt Ruppin A form of v - Src and cloned into the pMSCV - FLAG - HA retrovirus expression vector. MCF - 10A were infected with retrovirus expressing ER - Src, and cells were tested for expression of ER - Src by genome PCR and Western blot. The activation of ER - Src was examined by immunoprecipitation and Western blot, and the changes of morphological transformation of MCF10A - Er - Src after induction of TAM was observed. **Results** MCF10A can stably express ER - Src. Src Y416 was phosphorylated after induction of TAM, and the activation of ER - Src lead to the transformation of MCF10A - Er - Src. **Conclusion** The inducible transformation model of MCF10A - Er - Src was successfully constructed.

Key words Human mammary epithelial cells(MCF10A); ER - Src; Tamoxifen; Cell transformation

近年来,乳腺癌的发生率和病死率呈逐年上升趋势,严重威胁女性健康。越来越多的研究表明乳腺癌干细胞在乳腺癌的发生、发展中起着重要的作用^[1]。肿瘤发生侵袭和转移的过程中往往也发生了上皮间质转化,使上皮细胞获得间叶细胞的特点,获得肿瘤干细胞的特征^[2]。MCF10A 是永生化的相对正常的乳腺上皮细胞系,其核型稳定,接近二倍体,并且 MCF10A 为雌激素受体阴性,没有发生转化,不具有成瘤性^[3]。但是在特殊培养条件或体外诱导条件下, MCF10A 能够发生转化,具有成瘤性^[4]。利用

MCF10A 构建诱导分化模型,能够模拟上皮间质转化过程,为探究上皮细胞癌变过程中是否会产生乳腺癌干细胞奠定基础。

本研究旨在构建能够被雌激素类似物他莫西芬激活的 MCF10A - Er - Src 稳转细胞系,即 MCF10A 诱导转化模型,为乳腺癌相关研究奠定基础。

材料与方法

1. 细胞:MCF10A 购自 ATCC 细胞中心, HEK293T 为本组保存。

2. 质粒:pMSCV - FLAG - HA、pCMV - VSV - G、pCMV - Gga - Pol 和 pCMV - 3Tag - 7 - hER 为本组保存, pLNCX chick v - src 购自 Addgene 公司。

3. 试剂:DMEM 培养基、DMEM/F12 培养基和表皮生长因子 EGF 购自 Gibco 公司;马血清、胎牛血清购自 Biochrom AG 公司;氢化可的松(hydrocortisone)、霍乱毒素(cholera toxin)、胰岛素(insulin)、他莫西芬(Tamoxifen)、基因转染增强剂(po-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31371305)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:张业, 电子信箱: yezhang@pumc.edu.cn; 沈珞琲, 电子信箱: yfshen@pumc.edu.cn

lybrene)、嘌呤霉素 (puromycin)、FLAG 抗体和 FLAG - Ezview M2 珠子购自 Sigma 公司;p - c - Src (Tyr416) 抗体、HA 抗体和 β - actin 抗体购自 Santa Cruz Biotech 公司;GAPDH 抗体购自 Abcam 公司;内切酶 Xho I、Hpa I、EcoR I, Primer Star, dNTP Mix 和 T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 公司;Vigofect 转染试剂购自威格拉斯公司;BCA 法测定蛋白浓度试剂盒购自 Pierce 公司;辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 和抗兔 IgG 购自 MBL 公司。

4. 细胞培养: HEK293T 细胞系培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)。MCF10A 细胞系培养于 DMEM/F12 培养基(含 5% 马血清, 20ng/ml EGF, 0.5 μ g/ml hydrocortisone, 100ng/ml cholera toxin, 10 μ g/ml insulin, 100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)。培养条件均为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。构建的 MCF10A - Er - Src 和 MCF10A - pMSCV 稳转细胞系培养条件与 MCF10A 相同。当稳转细胞系细胞汇合至 50% 左右时, 加入 TAM 至终浓度 1 μ mol/L 诱导其发生转化。

5. 质粒构建: 以 pCMV - 3Tag - 7 - hER 为模板, 设计带有 Xho I 酶切位点和 kozak 序列的 hbER 正向引物: 5' - CCGCTCGAGGCCACCAT GTCTGCTGGAGACATGA - 3', 带有 Hpa I 酶切位点的 hbER 反向引物: 5' - CCGGTTAACGA CCGTGGCAGGGAAC - 3', 进行 PCR 反应; PCR 产物和 pMSCV - FLAG - HA 空载体经 Xho I 和 Hpa I 酶切后连接, 构建 pMSCV - hbER - FLAG - HA。再以 pLNCX chick v - src 为模板, 设计带有 Hpa I 酶切位点的 Src 正向引物: 5' - CCGGT TAACGGGAGTAGCAAGAGCAAGCCTAA - 3', 带有 EcoR I 酶切位点的反向引物: 5' - CCGGAATTCGGCCTGCAGGTACT - CAAAAGTG - 3', 进行 PCR 反应; PCR 产物和 pMSCV - hbER - FLAG - HA 经 Hpa I 和 EcoR I 酶切后连接, 构建 pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA。鉴定后大量制备质粒于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

6. 细胞转染: 按照威格拉斯公司 Vigofect 高效转染试剂说明书进行。

7. 包装病毒并感染 MCF10A: 将 pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA、pCMV - Gag - Pol 和 pCMV - VSV - G 以 7:3:1 的比例转染对数期生长至汇合度 90% 左右的 HEK293T 细胞, 转染 24h 后更换新鲜培养基 4 ~ 5ml, 并于换液 24h 后收集培养基上清(含重组病毒), 含重组病毒的培养基与 MCF10A 完全培养基 1:1 混合, 并加入 Polybrene 至终浓度为 8 μ g/ml, 感染汇合度 50% ~ 70% 的 MCF10A, 在感染 12h 后更换新鲜培养基, 48h 后加入 Puromycin 至终浓度 4 μ g/ml, 进行筛选。

8. 基因组 DNA 提取: 收集细胞并 TE 重悬细胞(5 $\times$ 10⁷ 个/毫升), 加入细胞裂解液(5 $\times$ 10⁷ 个/10 毫升)。细胞裂解液配方: 10mmol/L Tris - HCl(pH 8.0), 0.5% SDS, 0.1mmol/L EDTA(pH 8.0)。加入蛋白酶 K 至终浓度为 100 μ g/ml, 50 $^{\circ}$ C 过夜。向其中加入等体积酚, 上下混匀 10min, 6500r/min 15min, 重复酚抽提两次, 再氯仿/异戊醇抽提两次。加入 2 倍

体积无水乙醇和 0.2 倍体积 10mol/L NH₄Ac, 混匀, 4 $^{\circ}$ C, 30min。用牙签挑出 DNA, 70% 乙醇洗涤两次, 晾干, TE 溶解, 加入 RNA 酶至终浓度为 50 μ g/ml。测定基因组浓度。

9. 基因组 DNA PCR: 根据反转录病毒载体骨架设计两对 PCR 引物。(1) 正向引物: 5' - CGCCAGTCTCCGATAGA - 3', 反向引物: 5' - GTTCCAAACCGAAAGCAA - 3'。(2) 正向引物: 5' - AATATGGGCCAAACAGGA - 3', 反向引物: 5' - ACGCAGTCTATCGGAGGA - 3'。以上述提取的基因组 DNA 为模板进行 PCR 技术检测。

10. 蛋白提取及 Western blot 法检测: 收集细胞并提取总蛋白, SDS - PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 将胶上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜(FLAG 抗体稀释度为 1:10000, p - c - Src 抗体稀释度 1:2000, HA 抗体稀释度 1:2000, GAPDH 抗体稀释度 1:5000, β - actin 抗体稀释度 1:2000), 二抗室温孵育 1h(二抗稀释度为 1:5000), ECL 法显影检测蛋白表达。

11. 免疫沉淀: 将收集的细胞裂解液与抗 FLAG M2 珠子 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。离心弃上清, 收集 M2 珠子, 并用冰预冷的 TBS 洗 M2 珠子, 4 $^{\circ}$ C, 8100 $\times$ g 1min, 共洗涤 3 次。最后向 M2 珠子中加入适量的 SDS - PAGE 电泳上样 buffer, 煮沸 5min 变性, 用于 Western blot 法分析。

结 果

1. 质粒的构建和鉴定: 构建得到的 pMSCV - hbER - FLAG - HA 经双酶切法鉴定插入片段大小。Xho I 和 Hpa I 双酶切后, 电泳可见 1.0kb 片段; pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA 经双酶切法鉴定插入片段大小。Xho I 和 EcoR I 双酶切后, 电泳可见 1.7kb 片段(图 1), 证明 ER - Src 片段成功插入 pMSCV - FLAG - HA 载体。将 pMSCV - hbER - Src -

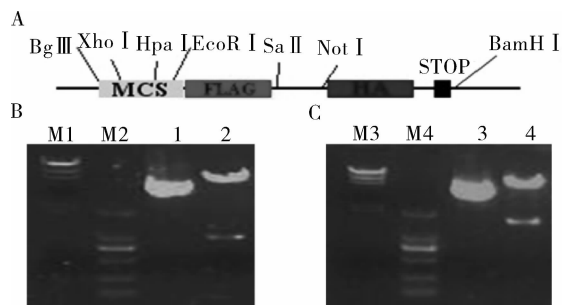


图 1 pMSCV - hbER - FLAG - HA 和 pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA 的酶切鉴定

A. pMSCV - FLAG - HA 载体示意图; B. pMSCV - hbER - FLAG - HA 经 Xho I 和 Hpa I 双酶切图谱; M1. λ DNA/Hind III marker; M2. DL2000 DNA marker; 1. pMSCV - hbER - FLAG - HA; 2. pMSCV - hbER - FLAG - HA 双酶切; C. pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA 经 Xho I 和 EcoR I 双酶切图谱; M3. λ DNA/Hind III marker; M4. DL2000 DNA marker; 3. pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA; 4. pMSCV - hbER - Src - FLAG - HA 双酶切

FLAG-HA 质粒送生工公司测序鉴定,无缺失和突变,证明 ER-Src 表达质粒构建成功。

2. pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA 质粒的表达:将质粒 pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA 和 pMSCV-FLAG-HA 分别转染汇合度为 80%~90% 的 HEK293T 细胞,6h 后更换新鲜培养基,48h 后收集细胞裂解液。使用 FLAG、HA 抗体进行 Western blot 法实验,检测 pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA 表达水平。结果显示,pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA 能够在哺乳动物细胞中正常表达(图 2)。

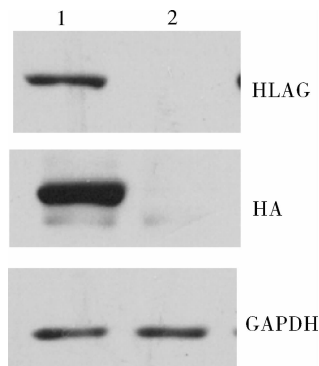


图 2 pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA 质粒表达鉴定

1. pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA; 2. pMSCV-FLAG-HA

3. MCF10A-Er-Src 细胞系构建及鉴定:利用 pMSCV-hbER-Src-FLAG-HA、pCMV-Gag-Pol 和 pCMV-VSV-G 构建重组病毒,感染 MCF10A,加入 Puromycin 筛选细胞,初步获得阳性细胞克隆。为了进一步鉴定细胞是否成功转入 ER-Src,进行基因组 PCR 和 Western blot 法实验。提取细胞系基因组 DNA,利用根据 pMSCV-FLAG-HA 载体骨架设计的两对引物,进行基因组 PCR,分别得到大小约为 500bp 和 250bp 的片段,表明重组病毒的基因组片段成功整合到 MCF10A 细胞。收集细胞系裂解液,Western blot 法实验检测 ER-Src 融合蛋白表达。结果表明 ER-Src 能够在细胞中稳定表达。以上结果证明 MCF10A-Er-Src 细胞系和 MCF10A-pMSCV 细胞系构建成功(图 3)。

4. TAM 诱导 MCF10A-Er-Src 转化:当稳转细胞系汇合度为 50% 左右时,向细胞中加入 TAM 至终浓度 $1\mu\text{mol/L}$ 进行诱导。36h 后收集细胞裂解液,用抗 FLAG M2 珠子进行 IP 实验,IP 得到的样品进行 Western blot 法实验。结果显示 TAM 诱使 Src 发生了磷酸化(图 4A)。为进一步验证 Src 发生磷酸化的位点,用 Src 特异位点磷酸化抗体 p-c-Src (Tyr416)

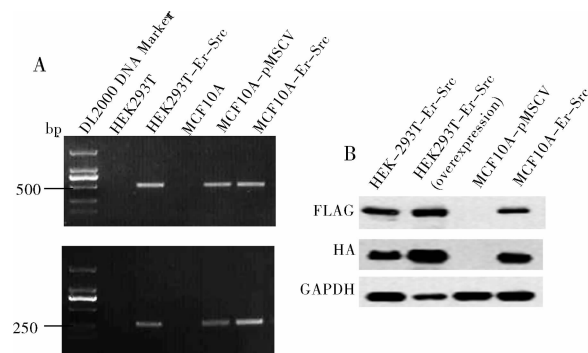


图 3 MCF10A-Er-Src 稳定细胞系鉴定

A. 基因组 PCR 图谱; B. 细胞表达 ER-Src 的 Western blot 法检测

进行 Western blot 法实验,结果显示 Src 416 位酪氨酸发生磷酸化,证明 Src 被激活。诱导 36h 后停止 TAM 诱导,细胞系在正常培养基中恢复培养 24h 后,收集细胞裂解液进行 Western blot 法实验。结果显示 TAM 诱导 Src 激活后停止诱导,其磷酸化水平会显著降低,证明 Src 的激活作用依赖于 TAM(图 4B)。TAM 诱导过程中,MCF10A-Er-Src 细胞系形态发生变化,细胞不再均匀贴壁生长而是呈集落生长,并相互叠层(图 4C)。证明 MCF10A-Er-Src 在 TAM 诱导下发生了转化。

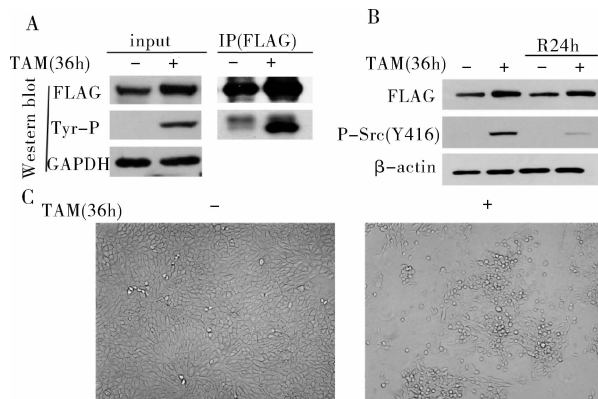


图 4 TAM 诱导 MCF10A-Er-Src 分化

A. TAM 诱导 Src Tyr 磷酸化; B. TAM 诱导 Src Y416 磷酸化;
C. TAM 诱导 MCF10A-Er-Src 转化($\times 100$)

讨 论

乳腺癌是女性恶性肿瘤中发生率以及病死率最高的肿瘤之一,且发病人群中年轻患者逐年增多。目前治疗乳腺癌的手段主要有手术、化疗、放疗等,但是治疗效果不佳,容易复发。越来越多的研究表明,肿瘤是由一群具有遗传异质性的细胞组成,其中一部分细胞具有干细胞样的特点,能够自我更新并分化,具有很高的致瘤性,并且对抗癌治疗不敏感,这类

细胞被称作肿瘤干细胞^[1,5,6]。因此,肿瘤干细胞在肿瘤的形成中起着重要的作用,很可能是肿瘤形成和转移、治疗效果不佳、预后差的关键原因。现已证实多种恶性肿瘤中存在相应的肿瘤干细胞,例如脑瘤、肺癌、前列腺癌、结肠癌以及黑色素瘤等^[7-15]。随着研究的进展,有理由认为肿瘤干细胞可能是导致恶性肿瘤复发和转移的根本原因。因此,构建肿瘤干细胞诱导模型,对于探究肿瘤的形成,调控肿瘤的发生等方面有重要意义。

上皮间质转化是一个重要的发育过程,目前很多研究表明在肿瘤发生侵袭和转移的过程中往往也发生了上皮间质转化^[16]。研究结果显示,诱导永生化人乳腺表皮细胞发生间质转化,能够使这些细胞获得间叶细胞的特点,表达干细胞的分子标记,并具有很强的肿瘤形成能力,提示诱导乳腺上皮细胞发生上皮间质转化,很可能使细胞获得干细胞的特征^[2]。据此猜测,在上皮细胞癌变过程中很可能也会产生肿瘤干细胞。

本研究利用 MCF10A 构建了 MCF10A - Er - Src 稳转细胞系。添加雌激素类似物 TAM 后其能够与 MCF10A - Er - Src 细胞系的雌激素受体结合,促使 Src 发生二聚化,并磷酸化,进而激活下游通路(如 NF - κ B),使 MCF10A - Er - Src 发生转化^[17,18]。MCF10A 是永生化的乳腺上皮细胞系,在诱导转化过程中,细胞形态发生变化,由典型的上皮细胞的贴壁生长,向间叶细胞转变,呈集落生长,已经初步具备间叶细胞特征。根据文献报道,MCF10A 发生转化以后,细胞能够在软琼脂中形成克隆,并且能够在裸鼠成瘤实验中形成肿瘤,流式分析其中部分细胞已经具有乳腺癌干细胞标志 CD24⁻CD44⁺,表明 MCF10A 在上皮间质转化过程中获得了乳腺癌干细胞的标志^[19]。本研究为继续研究细胞间质转化和肿瘤干细胞形成提供了重要依据,为揭示肿瘤形成和探究乳腺癌靶向治疗奠定了基础。

参考文献

- 1 Ponti DA, Costa N, Zaffaroni, *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5506 - 5511
- 2 Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al.* The epithelial - mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704 - 715
- 3 Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, *et al.* Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell

- line, MCF - 10 [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(18): 6075 - 6086
- 4 Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF - 10A mammary epithelial acini grown in three - dimensional basement membrane cultures [J]. *Methods*, 2003, 30(3): 256 - 268
- 5 Allegra E, Trapasso S. Cancer stem cells in head and neck cancer [J]. *Onco Targets Ther*, 2012, 5: 375 - 383
- 6 Ablett MP, Singh JK, Clarke RB. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? [J]. *Eur J Cancer*, 2012, 48(14): 2104 - 2016
- 7 Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5821 - 5828
- 8 Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells [J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 396 - 401
- 9 Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer [J]. *Cell*, 2005, 121(6): 823 - 835
- 10 Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504 - 514
- 11 Collins AT, Berry PA, Hyde C, *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(23): 10946 - 10951
- 12 Patrawala L, Calhoun T, Schneider - Broussard R, *et al.* Highly purified CD44⁺ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells [J]. *Oncogene*, 2006, 25(12): 1696 - 1708
- 13 O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, *et al.* A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123): 106 - 110
- 14 Fang D, Nguyen TK, Leishear K, *et al.* A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9328 - 9337
- 15 Schatton T, Murphy GF, Frank NY, *et al.* Identification of cells initiating human melanomas [J]. *Nature*, 2008, 451(7176): 345 - 349
- 16 Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application [J]. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 759 - 806
- 17 Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF - κ B, Lin28, Let - 7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation [J]. *Cell*, 2009, 139(4): 693 - 706
- 18 Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, *et al.* Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non - stem cancer cells via IL6 secretion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(4): 1397 - 1402
- 19 Hirsch HA, Iliopoulos D, Tschlis PN, *et al.* Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7507 - 7511

(收稿日期:2014 - 04 - 14)

(修回日期:2014 - 04 - 25)