

实时定量 PCR 实验,在两株细胞内分别针对两个蛋白重要的信号分子进行研究,结果显示,细胞共转染 IFN- λ R1 与 TRAF6,IFN- λ R1 可以抑制 TRAF6 诱导的 NF- κ B 的激活,TRAF6 可以抑制 IFN- λ 1 结合 IFN- λ R1 后对 IRSE 的激活并进而抑制下游 OAS1、Mx1 基因的表达。上述结果为 TRAF6 作为 IFN- λ 受体信号通路中新的相互作用蛋白提供了新的实验依据。至于 IFN- λ R1 与 TRAF6 相互作用影响 NF- κ B 和 IFN 应答通路的分子机制,以及这种对细胞信号通路的影响如何介入 IFN- λ 抗病毒、抗肿瘤细胞增殖和调节免疫的生物学活性需要深入研究。

参考文献

- 1 Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al.* IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68
- 2 Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77
- 3 Ank N, West H, Bartholdy C, *et al.* Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo[J]. *J Virol*, 2006, 80(9): 4501-4509
- 4 Xie YF, Cui YB, Hui XW, *et al.* Interaction of IFNlambdaR1 with

- TRAF6 regulates NF- κ B activation and IFNlambdaR1 stability [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11): 3371-3379
- 5 Denti S, Sirri A, Cheli A, *et al.* RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 13027-13034
 - 6 Uze G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family[J]. *Biochimie*, 2007, 89(6-7): 729-734
 - 7 Novak AJ, Grote DM, Ziesmer SC, *et al.* A role for IFN-lambda1 in multiple myeloma B cell growth[J]. *Leukemia*, 2008, 22(12): 2240-2246
 - 8 Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2010, 30(8): 555-564
 - 9 Zhang W, He T, Wang Q, *et al.* IL-1 receptor-associated kinase-2 genetic variant rs708035 increases NF- κ B activity through promoting TRAF6 ubiquitination[J]. *J Biol Chem*, 2014
 - 10 Wang X, Ha T, Zou J, *et al.* MicroRNA-125b protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via targeting p53-mediated apoptotic signalling and TRAF6[J]. *Cardiovasc Res*, 2014
 - 11 Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, *et al.* TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF- κ B and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5674
 - 12 Liu H, Tamashiro S, Baritaki S, *et al.* TRAF6 activation in multiple myeloma: a potential therapeutic target[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2012, 12(3): 155-163 (收稿日期: 2014-04-11)
(修回日期: 2014-04-25)

Mus81 对人乳腺癌 SKBR3 增殖、侵袭和迁移的影响

吴云路 钱颖 吕娟 严秋月 董学君

摘要 目的 研究 Mus81 过表达对人乳腺癌 SKBR3 增殖、侵袭和迁移能力的影响。方法 从相应甘油菌中抽提 Mus81 过表达质粒和阴性对照质粒,通过 Lipofectamine® 2000 脂质体转染人乳腺癌 SKBR3 细胞。分别利用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 Mus81 过表达效果,CKK-8 增殖实验检测过表达前后细胞增殖能力变化,Transwell 侵袭实验检测过表达前后细胞侵袭能力变化,Transwell 迁移实验和细胞划痕实验检测过表达前后细胞迁移能力变化。结果 RT-PCR 和 Western blot 法表明 Mus81 基因过表达效果良好。Mus81 过表达后,增殖实验结果显示实验组细胞增殖速度明显低于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 侵袭实验显示,实验组细胞每高倍视野平均穿膜个数低于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 迁移实验显示,实验组细胞每高倍视野平均穿膜个数同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。细胞划痕实验结果显示,实验组划痕愈合率同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Mus81 过表达抑制了人乳腺癌 SKBR3 细胞的增殖,降低了细胞的侵袭能力,但对 SKBR3 细胞迁移能力没有明显影响。

关键词 Mus81 乳腺癌 增殖 侵袭 迁移

[中图分类号] R737 [文献标识码] A

基金项目:浙江省重点科技创新团队(2012R10048-09);浙江省医药卫生平台重点基金资助项目(2013ZDA024)

作者单位:325035 温州医科大学检验医学院、生命科学学院(吴云路、钱颖、严秋月、董学君);312000 浙江省绍兴市人民医院、浙江大学绍兴医院临床检验中心(吕娟、董学君)

通讯作者:董学君,电子信箱:dxj9666@163.com

Effects of Mus81 on Proliferation, Invasion and Migration of Human Breast Cancer SKBR3. Wu Yunlu, Qian Ying, Lu Juan, et al. School of Laboratory Medicine and Life Science of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325035, China

Abstract Objective To investigate the effects of Mus81 overexpression on proliferation, invasion and migration ability of human breast cancer SKBR3 cells. **Methods** SKBR3 breast cancer cells were transfected using Lipofectamine® 2000 with the plasmids containing over-expression Mus81 or negative ones from the glycerin bacteria. The overexpression of Mus81 gene was determined by RT-PCR and Western blot. Changes in cell proliferation was detected by CCK-8 proliferation assay. The changes of invasion and migration ability before and after transfection were evaluated using Transwell invasion assay, Transwell migration assay and wound assay. **Results** The results of RT-PCR and Western blot confirmed Mus81 gene overexpressed successfully. The proliferation rate of the experimental group was significantly lower than the control group ($P < 0.05$). Transwell invasion assay indicated that the experimental group exhibited a decrease in the number of cells invading the lower chamber, compared to the control group ($P < 0.05$). Transwell migration assay and wound assay did not displayed statistically significant difference. **Conclusion** Mus81 overexpression inhibited the proliferation and decreased invasion ability of human breast cancer SKBR3 cells, but had no significant effect on SKBR3 cell migration.

Key words Mus81; Breast cancer; Proliferation; Invasion; Migration

乳腺癌是女性最常见的肿瘤之一,其在欧美国家居女性恶性肿瘤的首位,在我国也呈逐年上升的趋势。乳腺癌的形成过程一直是研究者研究的热点,虽然具体的机制尚未阐明,但是乳腺癌细胞的侵袭和转移是促使乳腺癌发生转移,最终导致患者死亡的主要原因^[1]。Mus81 基因是近年来发现的一种 DNA 修复基因,可确保 DNA 的正常复制^[2]。值得注意的是, Mus81 还作为一种重要的抑癌基因^[3]。Mus81 的表达水平同乳腺癌临床等级划分的关系提示其参与了乳腺癌的侵袭和迁移过程,然而至今尚未见相关研究予以证实^[4]。为此,本实验以 Mus81 低表达的人乳腺癌 SKBR3 细胞株为研究对象,通过 Lipofectamine® 2000 转染 Mus81 过表达质粒和阴性对照质粒,对比转染前后 SKBR3 细胞增殖、侵袭和迁移能力的变化,以期探讨 Mus81 同乳腺癌增殖、侵袭和迁移的关系,并初步了解 Mus81 在乳腺癌发展过程中的可能作用。

材料与方法

1. 材料: Mus81 低表达人乳腺癌细胞株 SKBR3 由本实验室保存,含有 Mus81 过表达质粒以及阴性对照质粒的甘油菌委托上海吉凯基因构建及测序(载体信息 pGCMV/MCS/ IRES/EGFP/Neo),无内毒素质粒抽提试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒以及 $2 \times$ Taq PCR Master Mix 购自 Biomiga 公司,转染试剂 Lipofectamine® 2000 购自 Invitrogen 公司,TRIzol 购自 Ambion 公司,引物由生工生物工程(上海)合成,胎牛血清购自 Gibco 公司,RPMI-1640 培养基购自 HyClone 公司, LB 培养基购自 MP 公司,细胞培养板以及 Transwell 小室均购自 Corning 公司, Matrigel™ 基膜基质胶购自 BD 公司,细胞增殖及毒性检测试剂盒(CCK-8)购自凯基生物、 β -actin 兔抗人单克隆抗体、Mus81 兔抗人多克隆抗体、以及羊抗兔二抗均购自 Abcam 公司、ECL 化学发光 A、B 液购自 Beyotime 公司。

2. 方法:(1) Mus81 过表达质粒以及阴性对照质粒的抽提:将含有 Mus81 过表达质粒以及阴性对照质粒甘油菌从 -80°C 冰箱中取出融化,取少量细菌接种在 LB 筛选平板上(含 $50\mu\text{g/ml}$ 硫酸卡那霉素), 37°C 、5% CO_2 培养 48h 后挑取单克隆菌落接种在 3ml LB 液体培养基中(含 $25\mu\text{g/ml}$ 硫酸卡那霉素), 200r/min , 37°C 摇菌 24h。离心收集菌体,按照无内毒素质粒抽提试剂盒(BIOMIGA)操作手册提取 Mus81 过表达质粒以及阴性对照质粒,提取出的质粒用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo 公司)测定浓度。过表达质粒由上海吉凯基因测序确认。(2) 细胞培养及转染:人乳腺癌细胞株 SKBR3 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 37°C 、5% CO_2 条件下培养,每 2~3 天传代 1 次。于转染前 1 天,消化离心 SKBR3 细胞,并重悬计数。6 孔板每孔接种 SKBR3 细胞 1×10^6 个,在上述培养条件下培养 24h 后,细胞汇合度达到 90%~95%,即可进行转染。实验设实验组和对照组,实验组和对照组分别用 $10\mu\text{l}$ Lipofectamine® 2000 转染 $4\mu\text{g}$ Mus81 过表达质粒或者 $4\mu\text{g}$ 阴性对照质粒,转染 6h 后更换为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基,继续培养 24h,使 Mus81 基因充分表达,并于荧光显微镜下初步观察转染效果。(3) RT-PCR 检测转染后 Mus81 mRNA 表达水平:用 TRIzol 分别提取实验组和对照组细胞总 RNA,所提总 RNA 用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo 公司)测定浓度, OD260/OD280 比值为 1.7~2.0 为最佳。按照 cDNA 第 1 链合成试剂盒(BIOMIGA)操作手册反转录合成 cDNA。之后进行 PCR 反应,以 β -actin 为内参。Mus81 上游引物: $5' - \text{TGTGGACATTGCGAGAC} - 3'$,下游引物: $5' - \text{GCTGAGGTTGTGGACGGA} - 3'$ (产物长度 319bp); β -actin 上游引物: $5' - \text{ACCCACACTGTGCCATCTAC} - 3'$,下游引物: $5' - \text{TCGGTGAGGATCTTCATGAGGTA} - 3'$ (产物长度 108bp)。PCR 反应体系 $20\mu\text{l}$,包括 cDNA $1\mu\text{l}$,上下游引物各 $1\mu\text{l}$, $2 \times$ Master Mix $10\mu\text{l}$, ddH₂O $7\mu\text{l}$; PCR 反应条件: 94°C 预变性 2min,然后 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s, 35 个循环,最后 72°C 终延伸 5min。取 $5\mu\text{l}$ PCR 终产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。使用 ChemiDoc™

XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)进行灰度扫描、Quantity One-4.6.2 分析结果。以 Mus81 基因条带与 β -actin 基因条带的光密度比值作为 Mus81 的相对表达量。(4) Western blot 法检测转染后 Mus81 蛋白表达水平:分别配制 10% 的 SDS-PAGE 分离胶和 5% 的 SDS-PAGE 浓缩胶,用 RIPA 裂解液分别提取实验组和对照组细胞总蛋白,并用 Anthos 2010 酶标仪测定蛋白浓度,根据蛋白浓度调整蛋白样品体积,使总蛋白上样量为 120 微克/孔。接通电源,100V 恒压 SDS-PAGE 电泳 2h,300mA 恒流转膜 1h。取出 PVDF 膜,丽春红染色后小心切下所需条带,5% BSA 室温封闭 2h 后 TBST 洗涤。之后分别加入兔抗人 α -Mus81 (1:1000)、 β -actin 兔抗人 α - β (1:3000),4℃ 孵育过夜后 TBST 洗涤。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:10000),室温孵育 1h 后 TBST 洗涤。之后滴加 ECL 化学发光 A、B 液 (Beyotime),曝光、显影、定影。使用 ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统进行灰度扫描、Quantity One-4.6.2 分析结果。以 Mus81 蛋白条带与 β -actin 蛋白条带的光密度比值作为 Mus81 的相对表达量。(5) CCK-8 细胞增殖实验检测细胞增殖速率变化:按照之前的转染方案,分别转染实验组和对照组细胞。各组细胞消化离心计数,于 96 孔板每孔接种细胞 2000 个,终体积 100 μ l,37℃,5% CO₂ 条件下培养。细胞贴壁后记为 0h,利用 CCK-8 分别测定 0、24、48、72h 各孔 OD 值,绘制增殖曲线。每组 3 个复孔,实验独立重复 3 次。(6) Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力变化:按照之前的转染方案,分别转染实验组和对照组细胞。Transwell 侵袭实验按照以下方案进行:Matrigel 基质胶 1:5 稀释,均匀铺在 Transwell 上室内,于 37℃ 放置 30min,使基质胶凝固。各组细胞消化、离心、计数,于 Transwell 上室内加入细胞约 80000 个,同时加入不含胎牛血清的 1640 培养基 200 μ l,下室内加入 600 μ l 1640 全培养基。培养 24h 后,固定(甲醇和乙酸体积比 3:1)15min,Giemsa 染色 10min,倒置显微镜下观察实验结果,计数每组上中下左右,5 个视野内的细胞,取平均值。(7) Transwell 迁移实验和划痕实验检测细胞迁移能力变化:Transwell 迁移实验方案省略 Matrigel 铺胶这一步骤,其余同 Transwell 侵袭实验方案相同。细胞划痕实验按照以下方案进行:按照之前的转染方案,分别转染实验组和对照组细胞,于 37℃,5% CO₂ 条件下培养 24h。用 10 μ l 的移液器吸头,在各组细胞上划 1 条直线。PBS 洗去划线后脱落的细胞,各组细胞加入 1640 无血清培养基 2ml,于倒置显微镜下记录 0h,24h 各组细胞划痕宽度,划痕愈合率(%) = (0h 划痕宽度 - 24h 划痕宽度) / 0h 划痕宽度 $\times$ 100%。

3. 统计学方法:所有实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,两组间均值比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. Mus81 过表达质粒的测序结果:将测序结果同 PrimerBank 中 Mus81 cDNA 序列进行比对,确定质粒中的 Mus81 序列正确无误,可以进行后续试验(图

1)。

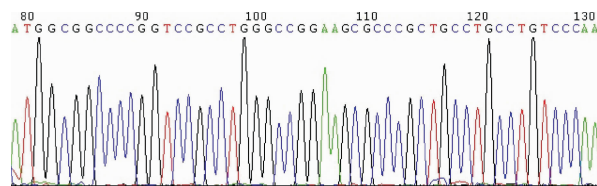


图 1 Mus81 过表达质粒部分测序结果

2. 荧光显微镜下观察荧光强度:于转染 24h 之后,荧光显微镜下初步观察荧光强度,观察到转染之后细胞荧光较强,提示转染效果良好(图 2)。

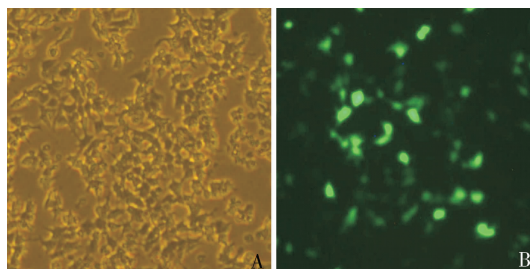


图 2 重组质粒转染 SKBR3 细胞

24h 后显微镜下观察 ($\times 40$)

A. Mus81 过表达白光; B. Mus81 过表达绿色荧光

3. RT-PCR 检测转染后 Mus81 mRNA 表达水平:琼脂糖上相应位置出现特异性条带, Mus81 引物产物长度为 319bp, β -actin 引物产物长度为 108bp。灰度扫描后,用 Quantity One-4.6.2 软件分析,同阴性组相比,实验组 Mus81 mRNA 表达水平明显提高(图 3),提示过表达效果良好。

4. Western blot 法检测转染后 Mus81 蛋白表达水平:曝光后胶片相应位置出现特异性条带, Mus81 和 β -actin 蛋白的相对分子质量分别为 66kDa 和 42kDa。灰度扫描后,用 Quantity One-4.6.2 软件分析,同阴性组相比,实验组 Mus81 蛋白表达水平明显提高(图 4),提示过表达效果良好。

5. Mus81 过表达对 SKBR3 细胞增殖速率的影响:向各孔中加入 10 μ l CCK-8 检测液,37℃ 下孵育 1h,酶标仪在 450nm 波长处检测每孔 OD 值,根据 CCK-8 测定结果绘制实验组和对照组细胞增殖曲线。结果表明,实验组 SKBR3 细胞增殖速率明显低于对照组 ($P < 0.05$,图 5)。

6. Mus81 过表达对 SKBR3 细胞侵袭能力的影响:细胞加入 24h 后,吸去上室内残留培养基,固定、染色,擦去上室内着色细胞,倒置显微镜下观察,计数每组上中下左右,5 个视野内的细胞,取平均值。Tr-

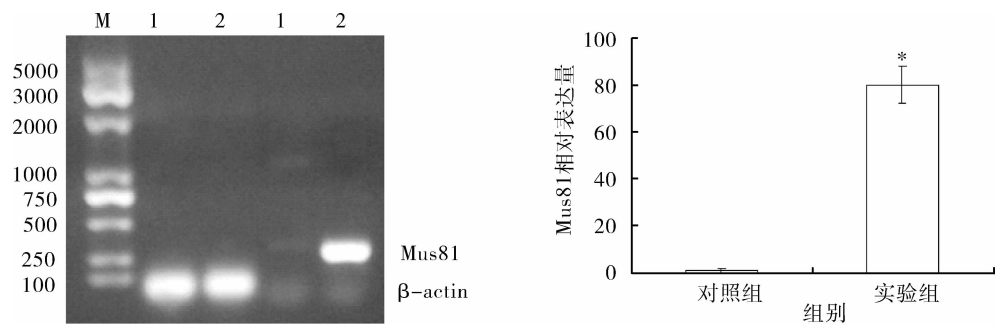


图 3 重组质粒转染 SKBR3 细胞 24h 后 RT-PCR 结果
M. DNA marker; 1. 对照组; 2. 实验组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

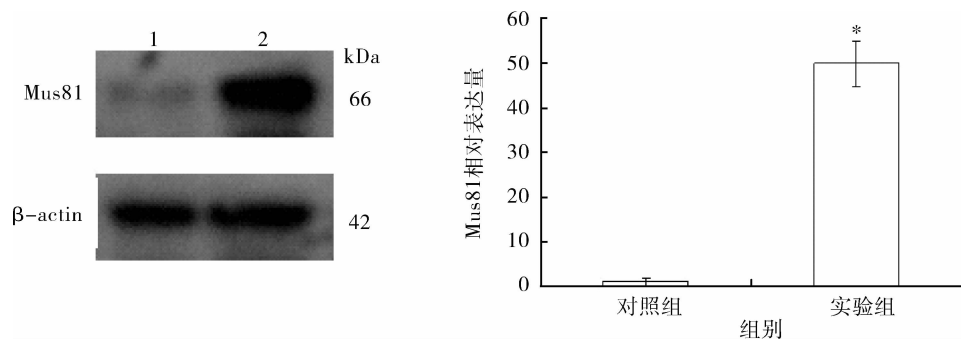


图 4 重组质粒转染 SKBR3 细胞 24h 后 Western blot 法结果
M. DNA 分子质量标准; 1. 对照组; 2. 实验组; 与对照组相比, * $P < 0.05$

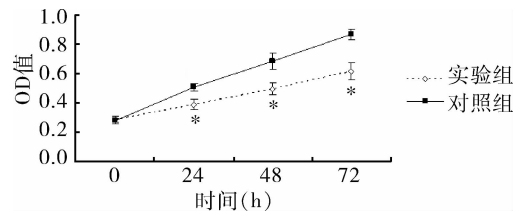


图 5 实验组和对照组细胞增殖曲线
与对照组相比, * $P < 0.05$

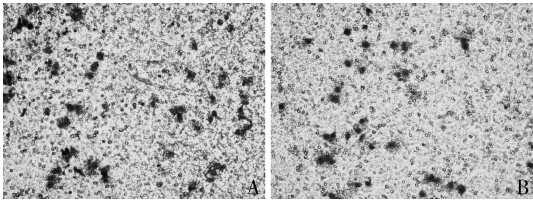


图 6 重组质粒转染 SKBR3 细胞 24h 后
Transwell 侵袭显微镜下观察 (Giemsa 染色, $\times 100$)
A. Transwell 侵袭实验对照组; B. Transwell 侵袭实验实验组; 箭头
所示为穿过基膜的细胞

answell 侵袭实验结果显示, 实验组 (29.80 ± 4.09) 细胞每高倍视野平均穿膜个数低于对照组 (39.80 ± 3.96), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1、图 6)。

表 1 重组质粒转染 SKBR3 细胞 24h 后 Transwell
侵袭和迁移实验结果 ($\times 100$)

实验项目	对照组	实验组
侵袭实验	39.80 ± 3.96	29.80 ± 4.09
迁移实验	27.60 ± 5.73	23.60 ± 5.08

7. Mus81 过表达对 SKBR3 细胞迁移能力的影响: Transwell 迁移实验结果显示, 实验组 (23.60 ± 5.08) 细胞每高倍视野平均穿膜个数同对照组 (27.60 ± 5.73) 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$,

表 1、图 7)。细胞划痕实验结果显示, 实验组 ($32.35\% \pm 2.6\%$) 划痕愈合率同对照组 ($35.57\% \pm 1.8\%$) 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 8)。

讨 论

Mus81 由 Interthal 等^[5] 在 2000 年首先发现, 命名为对乙烷磺酸盐及紫外线敏感的第 81 号独立基因 (MMS and UV sensitive isolate number 81, Mus81)。Mus81 作为一种 DNA 修复基因, 可清除异常 DNA 片段, 以维护细胞核正常功能^[6]。

值得注意的是 Mus81 不仅具有 DNA 修复的功能, 而且还是一种抑癌基因。MePherson 等^[3] 发现,

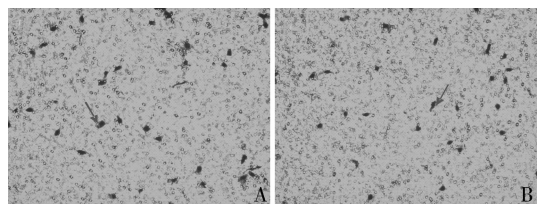


图7 重组质粒转染 SKBR3 细胞 24h 后 Transwell 迁移实验显微镜下观察 (Giemsa 染色, $\times 100$)

A. Transwell 迁移实验对照组; B. Transwell 迁移实验实验组; 箭头所示为穿过基膜的细胞

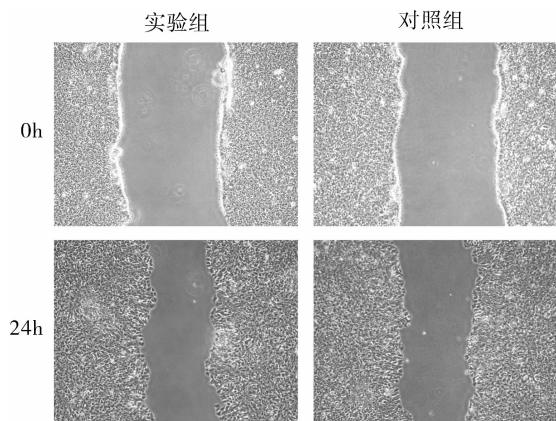


图8 实验组和对照组细胞划痕实验显微镜下观察 (Giemsa 染色, $\times 40$)

敲除 Mus81 等位基因的小鼠同野生型小鼠相比,容易形成各种自发性肿瘤。此后又有研究者陆续发现在星形细胞瘤、肝癌、喉癌组织中 Mus81 呈低表达状态,并且其表达量随着肿瘤恶性程度的增高而降低,这提示 Mus81 普遍参与着了不同肿瘤的发生发展^[7-9]。最近已有研究证明 Mus81 在乳腺癌组织中的表达水平同样其低于相应癌旁组织,结合之前相关报道, Mus81 的表达水平在高侵袭转移潜能的肝癌中下降的更为明显,且其低表达与肿瘤结节数目及静脉侵犯等反映肝癌侵袭转移的临床病理特征密切相关,这也提示 Mus81 可能参与了肝癌的侵袭迁移过程,结合 Mus81 在乳腺癌肿瘤组织中同样低表达以及 Mus81 的表达水平同乳腺癌临床等级划分的关系,笔者推测 Mus81 可能同样参与着乳腺癌的侵袭和迁移过程,但至今尚未发现相关报道予以证实^[4,10]。

本实验以 Mus81 低表达的人乳腺癌 SKBR3 细胞株为研究对象,通过 Lipofectamine[®] 2000 转染 Mus81 过表达质粒和阴性对照质粒,对比转染前后 SKBR3 细胞增殖、侵袭和迁移能力的变化,在 Mus81 过表达之后,实验组细胞增殖速率明显低于对照组 ($P <$

0.05)。Transwell 侵袭实验显示,实验组 SKBR3 细胞每高倍视野平均穿膜个数低于对照组 ($P < 0.05$)。Transwell 迁移实验组 SKBR3 细胞每高倍视野平均穿膜个数同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。划痕实验同样表明,实验组划痕愈合率同对照组相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 Mus81 过表达可以抑制人乳腺癌 SKBR3 细胞的增殖,降低 SKBR3 细胞的侵袭能力,但并未发现 Mus81 对 SKBR3 细胞迁移能力具有显著影响。以上实验基本符合 Mus81 具有抑癌功能这一结论,提示 Mus81 表达降低可能是乳腺癌组织不断生长进而侵犯相邻正常组织的重要因素。Mus81 发挥抑癌作用的具体机制尚在研究中,笔者推测可能的机制为, Mus81 作为一种 DNA 修复基因具有维护基因稳定性,及时修复 DNA 损伤的功能, Mus81 的表达下调使得细胞不能及时清除 DNA 损伤,从而积累各种染色体异常和基因突变,最终导致正常细胞癌变,而癌变的肿瘤细胞不断获得新的恶性表型,使得肿瘤的恶性程度不断增加,并最终侵犯相邻正常组织。

乳腺癌是世界范围内威胁女性健康的主要肿瘤之一,在我国也呈逐年上升的趋势。乳腺癌细胞的侵袭和迁移是促使乳腺癌发生转移,最终导致患者死亡的主要原因,同时也是患者手术及化疗之后乳腺癌复发的主要原因^[1,11]。乳腺癌侵袭和迁移的影响因素和相关机制一直是国内外研究热点,层粘连蛋白就是其中之一,近期有研究报道,层粘连蛋白-511 (LM-511)在乳腺癌的侵袭和迁移过程中起着重要的调控作用,而且效果强于其他层粘连蛋白^[12]。这一结论已引起了广泛的关注, Mus81 基因与 LM-511 是否存在相互关系,有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Fiorio Pla A, Gkika D. Emerging role of TRP channels in cell migration: from tumor vascularization to metastasis [J]. Front Physiol, 2013, 5(4):311
- 2 Muñoz - Galván S, Tous C, Blanco MG, *et al.* Distinct roles of Mus81, Yen1, Slx1 - Slx4, and Rad1 nucleases in the repair of replication - born double - strand breaks by sister chromatid exchange [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(9):1592 - 1603
- 3 McPherson JP, Lemmers B, Chahwan R, *et al.* Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression [J]. Science, 2004, 304(5678):1822 - 1826
- 4 钱颖, 张帆, 倪晓妍, 等. Mus81 基因在乳腺癌中的表达及其意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6):1313
- 5 Interthal H, Heyer WD. MUS81 encodes a novel helix - hairpin - helix protein involved in the response to UV - and methylation - in-

- duced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 263(5): 812 - 827
- 6 Chang JH, Kim JJ, Choi JM, *et al.* Crystal structure of the Mus81 - Emel complex[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(8): 1093 - 1106
- 7 Jiang Z, Hu J, Li XG, *et al.* Expression analyses of 27 DNA repair genes in astrocytoma by TaqMan low - density array[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 409(2): 112 - 117
- 8 Wu F, Liu SY, Tao YM, *et al.* Decreased expression of methyl methan sulfonate and ultraviolet - sensitive gene clone 81 (Mus81) is correlated with a poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer*, 2008, 112(9): 2002 - 2010
- 9 李婵媛, 王淑云, 袁海明. MUS81 基因在喉癌中的突变和表达 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2008, 25(5): 560 - 565
- 10 Shimada K, Sano T, Sakamoto Y, *et al.* A long - term follow - up and management study of hepatocellular carcinoma patients surviving for 10 years or longer after curative hepatectomy[J]. *Cancer*, 2005, 104(9): 1939 - 1947
- 11 O'Connor K, Chen M. Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion[J]. *Small GTPases*, 2013, 10(4): 3
- 12 Pouliot N, Kusuma N. Laminin - 511: a multi - functional adhesion protein regulating cell migration, tumor invasion and metastasis[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(1): 142 - 149
- (收稿日期: 2014 - 03 - 21)
- (修回日期: 2014 - 03 - 31)

HRSP12 慢病毒表达载体的构建及对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及增殖的影响

谭 宽 张 璇 马晓璐 黄秉仁 陈 虹 陈 等

摘 要 **目的** 构建热反应蛋白 12(heat - responsive protein 12, HRSP12)慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 包装慢病毒颗粒并感染宫颈癌细胞 HeLa, 分析过表达的 HRSP12 对 HeLa 细胞凋亡和增殖的影响。**方法** 用反转录 PCR 扩增 HRSP12 全长编码顺序, 构建慢病毒表达载体, 利用人胚肾细胞 HEK293T 包装重组的慢病毒颗粒, 感染 HeLa 细胞, 用蛋白免疫印迹法检测剪切的半胱氨酸/天冬氨酸蛋白水解酶 - 3(caspase - 3)并用 MTS 比色法检测 HeLa 细胞增殖的情况。**结果** 编码全长 HRSP12 的 cDNA 片段为 414bp, 克隆至 pWPI - linker 载体成功构建了慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 包装的慢病毒颗粒能够高效感染 HeLa 细胞, 在细胞内表达 Flag - HRSP12 融合蛋白。HRSP12 的过表达能够引起 HeLa 细胞 caspase - 3 的剪切体增多, 能够抑制 HeLa 细胞的增殖。**结论** 成功构建了慢病毒表达载体 pWPI - HRSP12, 初步结果表明, HRSP12 可能具有诱导 HeLa 细胞凋亡、抑制细胞增殖的活性, 为进一步研究 HRSP12 的生物功能奠定了基础。

关键词 HRSP12 慢病毒载体 细胞凋亡

[中图分类号] R34 [文献标识码] A

Construction of a Lentiviral Vector Carrying HRSP12 Gene and Its Effect on HeLa Cell Apoptosis and Proliferation. Tan Kuan, Zhang Xuan, Ma Xiaoli, Huang Bingren, Chen Hong, Chen Deng. *National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China*

Abstract **Objective** To construct a lentiviral vector pWPI - HRSP12 which was packaged into lentiviral particles and infected cervical carcinoma cell line HeLa and to analyze the effect of HRSP12 over - expressing on cell apoptosis and proliferation. **Methods** HRSP12 full length coding sequence was amplified by reverse transcription PCR and lentiviral vector pWPI - HRSP12 was constructed. Next, recombinant virus particles were harvested from the culture medium of packaging cell HEK293T. Western blot was used to analyze the expression of Caspase3 and MTS was applied to analyze the cell proliferation. **Results** It was showed that the lentiviral particles infected HeLa cells with high efficiency and the expressed fusion protein flag - HRSP12 was also detected by Western blot. In addition, the over - expressed HRSP12 lead to the increase of cleaved - Caspase3 in HeLa cells. What's more, the over - expressed HRSP12 can inhibit the proliferation of HeLa cell. **Conclusion** A lentiviral expression vector pWPI - HRSP12 was successfully constructed, and the results showed that over - expressed HRSP12 may induces HeLa cells apoptosis and inhibits their proliferation, and these will lay a solid founda-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81272229)

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: 陈等, 电子信箱: chendeng2001@hotmail.com