

# PIN1 反义核酸对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及周期的影响

周金华,朱涛,李红雨,徐钢,卢运萍,马丁

Effect of PIN1 Antisense Nucleotide on Cell Proliferation and Cycle of Human Mammary Cancer Cell Line MCF-7

ZHOU Jin-hua, ZHU Tao, LI Hong-yu, XU Gang, LU Yun-ping, MA Ding

Molecular Tumor Center, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: MA Ding, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

**Abstract :Objective** To observe the effect of PIN1 antisense nucleotide on cell proliferation and cycle of human mammary cancer cell line MCF-7. **Methods** The eukaryotic vector named pPINas, expressing PIN1 antisense nucleotide, was constructed. MCF-7 was transfected with pPINas and selected in the culture with G418. The selected clone MCF-7PINas was checked for expression of PIN1 by RT-PCR and Western blot. The proliferation of cells and the change of cell cycle in clone MCF-7PINas were investigated by MTT and Flow Cytometry respectively. **Results** The expression of PIN1 at mRNA and protein level in MCF-7PINas clone was down-regulated remarkably. MTT showed the proliferation of MCF-7PINas was retarded obviously contrasting to MCF-7 ( $P < 0.05$ ). But the cell cycle distribution had no significant change ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Since blocking PIN1 expression with antisense nucleotide could depress the proliferation activity of MCF-7 remarkably, PIN1 may be a potential target of gene therapy for human mammary cancer.

**Key words** :PIN1; Antisense nucleotide; Mammary cancer

**摘要**:目的 本研究利用 PIN1 反义核酸阻断乳腺癌 MCF-7 细胞中 PIN1 表达,观察其对增殖及周期的影响。方法 构建 PIN1 反义核酸真核表达质粒 pPIN1as,用脂质体转染法将重组质粒转染 MCF-7 细胞,G418 筛选稳定表达重组质粒的克隆,RT-PCR 检测 PIN1 基因表达水平,Western blot 检测 PIN1 蛋白的表达,MTT 检测细胞增殖状况,流式细胞术检测细胞周期。结果 稳定表达 PIN1 反义核酸的 MCF-7 细胞内 PIN1 基因表达在 mRNA 水平和蛋白水平都显著降低;MTT 实验显示 MCF-7PINas 细胞的增殖速度较 MCF-7 细胞明显减慢( $P < 0.05$ ),但 FCM 显示 MCF-7PINas 细胞和 MCF-7 细胞的周期分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 阻断 PIN1 可以显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活性,提示 PIN1 可能成为乳腺癌基因治疗的新的靶点。

**关键词**:PIN1;反义核酸;乳腺癌

中图分类号:R737.9 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)12-0917-04

## 0 引言

PIN1 (Peptidyl-Prolyl Cis/ Trans Isomerase, NIMA-interacting, 1) 是一种肽脯氨酰顺反异构酶,能够特异性地识别磷酸化后的丝/苏脯氨酰基序,使蛋白质发生顺反异构反应,从而调节蛋白的功能,这种磷酸化后的顺反调节机制在细胞增殖和分化等许多细胞进程的调控中起了关键性的作用<sup>[1]</sup>。近年来

发现 PIN1 在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、宫颈癌等许多肿瘤中高表达<sup>[2-4]</sup>。因此,有学者认为 PIN1 可能成为癌症治疗的新靶点<sup>[3]</sup>。本文应用反义核酸技术,构建了携带 PIN1 反义核酸的真核表达载体 pPINas,转染乳腺癌 MCF-7 细胞,观察细胞的增殖活性和细胞周期改变情况,探讨 PIN1 反义核酸用于乳腺癌基因治疗的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

MCF-7 细胞株购自 ATCC 并由本实验常规保存,真核表达载体 pcDNA 3.1 (+) 购自 Invitrogen 公司。各种限制性内切酶购自大连宝生物公司,脂

收稿日期:2006-12-05;修回日期:2007-03-02

基金项目:国家 973 重点基础科学基金资助项目 (2002CB513107)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤生物医学中心

通讯作者:马丁, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

质体转染试剂 Lipofectamine2000 为 Invitrogen 公司产品, T4DNA 连接酶及 Trizol 试剂、鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV)、耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)均购自 Promega 公司。兔抗人 PIN1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。G418 购自 Sigma 公司。所有引物均用 Oligo 软件自行设计。PCR 引物合成及 DNA 测序由上海英骏生物技术公司完成。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养和 PIN1 反义核酸真核表达质粒的构建

收获对数生长期的 MCF-7 乳腺癌细胞, Trizol 一步法提取细胞总 RNA, 逆转录反应获得 cDNA。从 Genbank 获得 PIN1 mRNA 全长及编码区序列(Accession No. NM\_006221), 设计扩增反义基因的引物: 上游: 5'-GCTCTAGACTGCGGCA GGA GGGAA GA TG-3', 下游: 5'-CGG GATCCTC-A GTGCGGA GGA TGA TGTG-3', 下划线分别为 *XbaI* 和 *BamHI* 的酶切位点, PCR 产物长度为 513 bp。纯化后的 PCR 产物和 pcDNA 3.1(+ )质粒分别用 *XbaI* 和 *BamHI* 双酶切, 玻璃奶法从琼脂糖凝胶中分离回收, 室温下连接 3 h, 连接产物转化感受态细胞, 铺板挑取阳性克隆, 命名为 pPIN1as, 经酶切鉴定片断大小无误, 送测序结果显示插入片断完全正确。

### 1.2.2 表达重组质粒的 MCF-7 细胞亚克隆的筛选及鉴定

采用 Lipofectamine2000 脂质体转染法, 将重组质粒 pPIN1as 和 pcDNA 3.1 分别转染 MCF-7 细胞。G418 筛选阳性克隆, 用套环法挑取单克隆行扩大培养。鉴定阳性克隆方法为 RT-PCR 检测细胞中的 Neo 基因表达。Neo 基因检测引物序列: 上游: 5'-AGAGGCTA TTCGGCTA TG AC-3', 下游: 5'-GCTTCA GTGACAACGTCGA G-3'。PCR 产物长度为 211 bp, 表达反义重组质粒的阳性克隆命名为 MCF-7PIN1as, 转染空载体的阳性克隆命名为 MCF-7pcDNA。

### 1.2.3 RT-PCR 检测 PIN1 mRNA 表达

用于 PIN1 基因表达检测的引物: 上游: 5'-TCA GGC-CGA GTGTACTAC-3', 下游: 5'-CGGA GGA T-GATGTGGA TG-3'。产物长度为 428 bp, 同时以 GAPDH 作为对照。用图像扫描分析系统 HPIAS-1000 测定各条带光密度值(AOD), 计算 PIN1 与 GAPDH 之比。

### 1.2.4 Western blot 检测 PIN1 蛋白的表达

收集分组处理的细胞, 裂解细胞提取总蛋白并蛋白定量, 取 100  $\mu$ g 蛋白质样品经电泳, 转膜, 封闭, 依次与 PIN1 一抗、二抗反应, 用 ECL 增强化学发光显色系统显色。测定各条带灰度值, 计算 PIN1 与  $\alpha$ -actin

之比, 比较三组细胞中 PIN1 蛋白表达。

### 1.2.5 MTT 检测筛选后细胞和正常细胞生长曲线

制备分组处理的单细胞悬液, 按  $3 \times 10^3$  / 孔的细胞密度分批接种于 96 孔板中, 以细胞开始贴壁生长定为 0 h, 培养 24、48、72、96、120 h 后分别往每孔中加入浓度为 5 mg/ml 的 MTT 20  $\mu$ l, 继续培养 4 h 后平板离心, 弃培养液, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO 轻摇 15 min 溶解甲臞结晶, 酶标仪测定各孔 570 nm 处吸光度值<sup>[5]</sup>。每组设 4 个复孔, 计算同组处理样品  $A_{570}$  平均值, 绘制细胞生长曲线。

### 1.2.6 流式细胞术检测细胞周期分布

收获细胞, PBS 洗一遍后用 75% 乙醇固定并置-20 过夜, 常规 PI 染色, 流式细胞仪检测细胞周期。

### 1.2.7 统计学分析

所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 精确到两位小数, 应用 SPSS 12.0 版统计软件进行 *t* 检验和方差分析。

## 2 结果

### 2.1 反义基因真核表达质粒的酶切和鉴定

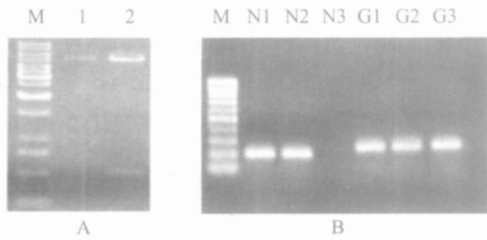
以 MCF-7 细胞的 cDNA 为模板, 利用 5' 端含有 *XbaI* 和 *BamHI* 的引物扩增出长度为 513 bp 的 PIN1 cDNA 片断, 酶切后连接到真核表达载体 pcDNA3.1 上, 转化 DH5 宿主菌, 得到阳性克隆。pcDNA3.1 和 pPINas 分别经 *XbaI* 和 *BamHI* 双酶切后行电泳, pPINas 酶切电泳后在 5 366 bp 和 503 bp 处分别可见载体片断和插入的 PIN1 的反义核酸片断, 见图 1。测序结果显示定向插入序列完全正确, 表明成功构建了 pPIN1as 反义重组质粒。

### 2.2 PIN1 反义重组质粒及空质粒转染阳性细胞亚克隆的筛选、鉴定

用脂质体法将反义重组质粒和对照空质粒分别转染 MCF-7 细胞, 含 G418 的完全培养基培养直到挑出阳性克隆, 反义重组质粒组和空白质粒组的阳性克隆中均检测出较高的 Neo 基因表达, 而正常 MCF-7 细胞中则无 Neo 基因表达, 见图 1, 说明成功筛选出稳定表达重组质粒的 MCF-7 细胞亚克隆。

### 2.3 转染反义重组质粒对 MCF-7 细胞 PIN1 基因表达的影响

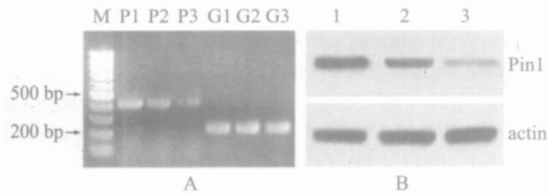
RT-PCR 和 Western blot 分别用于检测 mRNA 水平和蛋白质水平的表达。RT-PCR 显示转染反义质粒后 PIN1 mRNA 表达水平比未转染组明显下降, 相对积分吸光度值显示下降了 64.7%; Western blot 显示转染反义质粒后 PIN1 蛋白质表达水平也比未转染组显著下降, 相对积分吸光度值显示下降了 57%, 而转染空质粒组 PIN1 表达在 mRNA 水平和蛋白水平与未转染组差异均无统计学意义, 见图 2。



(A) M:1kb DNA marker; 1 :digested pcDNA3.1 ;2: digested pPINas  
 (B) M: 100bp DNA marker; N: Neo; G: GAPDH; 1: pPINas transfected; 2: pcDNA3.1 transfected; 3: not transfected

图 1 重组质粒酶切鉴定结果及 G418 筛选后阳性克隆 Neo 表达鉴定结果

Fig 1 Identification of recombinant pPINas by restrictive enzyme digestion and MCF7PINas by checking the expression of Neo



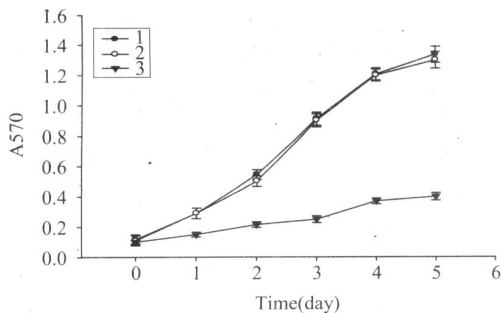
M:100bp DNA Marker; P: PIN1; G: GAPDH; 1: not transfected; 2: pcDNA3.1 transfected; 3: PinAS transfected

图 2 三组细胞中 PIN1 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达情况

Fig 2 The expressions of PIN1 at mRNA and protein level in different cells

2.4 转染反义重组质粒对 MCF-7 细胞增殖的影响

MTT 法测定结果显示,转染反义质粒组 MCF-7 细胞增殖速度明显减慢,与未转染组比较差异有统计学意义,转染空质粒组与未转染组相比差异无统计学意义。结果证明,PIN1 表达水平的下降可以导致细胞增殖速度明显减慢,见图 3。



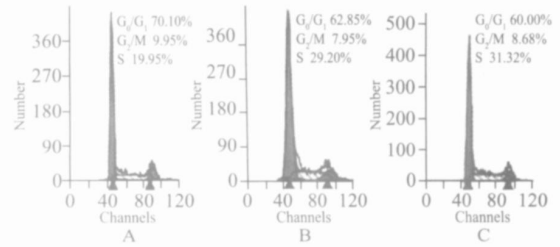
1: not transfected; 2: pcDNA3.1 transfected; 3: PinAS transfected

图 3 三组细胞的生长曲线图

Fig 3 The growth curve of different cells

2.5 转染反义重组质粒对 MCF-7 细胞周期的影响

结果显示:转染反义质粒组、转染空质粒组、未转染组三组细胞细胞周期分布无明显差异,见图 4。



A : PinAS transfected; B: pcDNA3.1 transfected; C: not transfected

图 4 三组细胞的细胞周期分布图

Fig 4 The cell cycle distribution of different cells

3 讨论

依赖 PIN1 催化的丝/苏-脯氨酰顺反异构转变是新发现的蛋白磷酸化后信号转导机制,在 G<sub>2</sub>/M 期转换、G<sub>1</sub>/S 期转换、M 期进程和 G<sub>0</sub> 期进入 G<sub>1</sub> 期等细胞周期事件中发挥重要作用<sup>[6,11]</sup>。在多种致癌信号通路中,众多癌信号分子含有共同的丝/苏-脯氨酰基序,其磷酸化后被激活,但活性很低且不稳定易降解。PIN1 可特异地识别该磷酸化的丝/苏-脯氨酰并催化构型转变,使该类蛋白被充分激活且不被降解,故 PIN1 可加强和放大多种致癌信号,被称为肿瘤发生发展的催化分子。另一方面,PIN1 本身的表达水平和功能活性也可以在致癌通路得以上调。例如在 Neu/ Ras 介导的乳腺上皮细胞的转化和乳腺肿瘤发生中,PIN1 是 E2F 的一个靶基因,同时,PIN1 又能促进 Rb 的磷酸化和 E2F 的释放<sup>[6,11]</sup>。

本文应用反义核酸技术,成功构建了 PIN1 反义核酸的真核表达载体,利用阳离子脂质体介导将其转染 MCF-7 细胞并筛选出稳定表达 PIN1 反义核酸的 MCF-7 细胞亚克隆,用于探讨 PIN1 反义核酸用于治疗乳腺癌的可能性,同时为进一步研究 PIN1 在乳腺癌中的作用奠定实验基础。

结果显示,PIN1 反义核酸可显著下调 MCF-7 细胞中 PIN1 的表达,并明显抑制 MCF-7 细胞的增殖。我们在进行稳定筛选时,从未转染 MCF-7 细胞全部死亡后到挑出稳定表达 PIN1 反义核酸的细胞克隆延长到 3.5 周。细胞增殖受到抑制可能与以下原因有关:(1) 由于 PIN1 功能被阻断,在肿瘤细胞中致癌信号不能产生级联放大作用,致癌通路被阻断,有助于恢复细胞内信号稳态,逆转肿瘤细胞的恶性表型,趋向于恢复正常表型;(2) 阻断 PIN1 功能

造成 MCF-7 PINas 细胞各个周期运行的缺陷,延长了细胞周期时间<sup>[12]</sup>,使相同时间内细胞增殖数量降低。

尽管 MCF-7PIN1AS 细胞的增殖速度明显减慢,但我们用流式细胞仪检测显示:与正常 MCF-7 细胞相比,MCF-7PIN1AS 细胞周期分布没有明显改变,与文献报道一致<sup>[12]</sup>。分析可能与下列因素有关:(1)细胞内仍有较低水平的 PIN1 表达;(2)某些与 PIN1 同一家族的蛋白如 Par14 可能部分代偿 PIN1 的功能,由于 PIN1 的降低使细胞周期运行出现多位点缺陷,但又不足以造成完全阻滞,使得细胞周期各时相按比例延长,而那些未及代偿的细胞在转染后数天或在稳定筛选过程中,已发生凋亡。同时有文献报道:抑制 PIN1 基因可引起细胞 M 期阻滞和诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。PIN1 对细胞周期的影响及其机制尚待进一步研究。

我们的研究表明,利用 PIN1 反义核酸可以显著地抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖,因此,PIN1 有可能成为乳腺癌基因治疗的新靶点。

#### 参考文献:

- [1] Lu KP. Pinnig down cell signaling, cancer and Alzheimer's disease[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(4):200-209.
- [2] Bao L, Kimzey A, Sauter G, et al. Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers [J]. Am J Pathol, 2004, 164(5):1727-1737.
- [3] Ryo A, Liou YC, Lu KP, et al. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutics target in cancer [J]. J Cell Sci, 2003, 116(5):773-783.
- [4] Li HY, Xu Q, Zhu T, et al. Expression and clinical significance of pin1 and cyclin d1 in cervical cancer cell lines and cervical epithelial tissues[J]. Ai Zheng, 2006, 25(3):367-372.
- [5] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 第2版. 西安:世界图书出版公司, 2003. 250-252.
- [6] Crenshaw DG, Yang J, Means AR, et al. The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1 [J]. EMBO J, 1998, 17(5):1315-1327.
- [7] Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, et al. Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(3):658-663.
- [8] Lu KP, Hanes SD, Hunter, T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis [J]. Nature, 1996, 380(6574):544-547.
- [9] Shen M, Stukenberg PT, Kirschner MW, et al. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis specific phosphoproteins [J]. Genes Dev, 1998, 12(5):706-720.
- [10] You H, Zheng H, Murray SA, et al. IGF-1 induces Pin1 expression in romoting cell cycle S-phase entry [J]. J Cell Biochem, 2002, 84(2):211-216.
- [11] Ryo A, Liou YC, Wulf G, et al. PIN1 is an E2F target gene essential for Neu/ Ras-induced transformation of mammary epithelial cells [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(15):5281-5295.
- [12] Atchison FW, Capel B, Means AR. Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation [J]. Development, 2003, 130(15):3579-3586.
- [13] Lu KP, Liou YC, Zhou XZ. Pinnig down proline-directed phosphorylation signaling [J]. Trends Cell Biol, 2002, 12(4):164-172.

[编辑:贺文;校对:刘红武]