

文章编号:1000-5404(2014)20-2083-04

论著

高表达 Twist 基因促进人乳腺癌细胞 MCF-7 干细胞样细胞富集和迁移

周明莉, 杨佳佳, 唐石伏, 杨丽, 张海龙, 杜燕娥, 文思阳, 柳满然 (400016 重庆, 重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室)

[摘要] **目的** 探讨人乳腺癌细胞系 MCF-7 中高表达 Twist 基因对 MCF-7 干细胞特性细胞的影响。**方法** 构建重组质粒 pBABE-puro-myc-Twist, HEK293T 细胞包装逆转录病毒, 并感染 MCF-7 细胞, 通过筛选获得成功转入 Twist 的 MCF-7/Twist 细胞和 MCF-7/Vector 对照细胞, 再通过长程无血清悬浮培养方法富集具有干细胞特性的乳腺细胞小球 (Mammosphere), 并通过 Western blot 法检测 myc-Twist 及 Twist 诱导后富集的 Mammosphere 相关 CSC 蛋白标记的表达, Transwell 法检测细胞的迁移能力。**结果** 成功构建逆转录病毒质粒 pBABE-puro-myc-Twist; Twist 基因在靶细胞内稳定表达; 长程无血清悬浮培养富集出具有干细胞特性的 Mammosphere; MCF-7/Twist 细胞肿瘤干细胞样细胞富集能力增强 ($P < 0.05$); myc-Twist、Twist 及 SOX2、OCT4 蛋白在 MCF-7/Twist Mammosphere 细胞中表达上调; MCF-7/Twist Mammosphere 细胞迁移能力增加 ($P < 0.05$)。**结论** Twist 促进 MCF-7 肿瘤干细胞样细胞富集能力增强, 并促进其迁移。

[关键词] Twist; 乳腺细胞小球; 人乳腺癌细胞 MCF-7

[中图分类号] R73-35; R737.9; R329.2*8

[文献标志码] A

Overexpression of Twist gene promotes cancer stem-like cell enrichment and cell migration ability in MCF-7 human breast cancer cells

Zhou Mingli, Yang Jiajia, Tang Shifu, Yang Li, Zhang Hailong, Du Yan'e, Weng Siyang, Liu Manran (College of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To overexpress Twist gene in MCF-7 human breast cancer cells and investigate its effect on cancer stem-like cell (CSC) in MCF-7. **Methods** Recombinant plasmid pBABE-puro-myc-Twist was constructed and retrovirus was packaged in HEK293T cells. MCF-7 cells were transfected with the retrovirus carrying Twist gene or the controls. MCF-7/Twist cells and MCF-7/Vector control cells were selected. Mammospheres with characteristics of stem-like cells were collected by long term serum-free suspension cultivation. The expressions of myc-Twist and CSC marker proteins induced by Twist in MCF-7/Twist mammospheres and MCF-7/Vector mammospheres were determined by qRT-PCR and Western blotting. Cell migration was analyzed by Transwell assay. **Results** Twist gene was efficiently delivered into MCF-7 cells, resulting in the stable expression of Twist mRNA. Mammospheres with characteristics of stem-like cells were collected by long term serum-free suspension cultivation. CSC enrichment was enhanced notably in MCF-7/Twist cells ($P < 0.05$). The expressions of myc-Twist, Twist and CSC marker proteins SOX2 and OCT4 were upregulated in MCF-7/Twist mammospheres and cell migration was enhanced ($P < 0.05$). **Conclusion** Twist plays an important role in enhancing CSC enrichment and promoting cell migration in MCF-7 cells.

[Key words] Twist; mammosphere; human breast cancer cell line MCF-7

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(31171336) and the Fund for Doctorial Program of Colleges and Universities of Ministry of Education (20125503110001). Corresponding author: Liu Manran; E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31171336);教育部高等学校博士点基金(20125503110001)

[通信作者] 柳满然, E-mail: mliu-hncq@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1503.027.html>(2014-08-21)

Twist 是与肿瘤发生、发展密切相关的核转录因子。其异常高表达是癌细胞侵袭转移的重要原因之一,并在许多实体肿瘤中得到证实^[1]。肿瘤干细胞样细胞(cancer stem-like cells, CSCs)是存在于肿瘤组织

中一类致癌性较强的细胞类型,在肿瘤发生、发展中发挥着极其重要的作用^[2-3]。CSCs 与治疗耐受、肿瘤复发及肿瘤患者的预后有关^[4]。Twist 可能通过调节某些调控机制赋予肿瘤细胞以 CSCs 特性,从而在远处转移组织形成新的肿瘤^[5],其具体的分子机制目前还不清楚。本研究构建携带 Twist 基因的逆转录病毒载体质粒,经 HEK293T 细胞包装逆转录病毒,感染人 MCF-7 乳腺癌细胞,通过筛选建立稳定表达 Twist 的乳腺癌细胞株,并通过长程无血清悬浮培养的方法富集具有干细胞特性的细胞^[6-8],为进一步研究 Twist 对低侵袭性乳腺癌细胞中具有干细胞特性的细胞生物学功能的影响,以及促进乳腺癌细胞侵袭转移及其机制,提供了较为理想的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

MCF-7 乳腺癌细胞系、人胚肾上皮细胞系 293T 细胞、pcDNA3/myc-Twist、逆转录病毒质粒 pBABE-puro 和包装质粒 pAmpho、感受态大肠杆菌 DH5 α 由本校临床检验诊断学教育部重点实验室保存。各种限制性内切酶 T4 DNA ligase、牛小肠碱性磷酸酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)、DNA marker、总 RNA 提取试剂盒、聚合酶和反转录试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;胶回收和质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品;CaPO₄转染试剂为本实验室制备;嘌呤霉素购自重庆鼎国生物技术有限公司;DMEM/F12 培养基和 RPMI1640 培养基均为 Gibco 公司产品;胎牛血清、胰岛素和 EGF、bFGF、B27、TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司产品;BSA 为 Sigma 公司产品;蛋白裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术研究所;小鼠抗人 Twist 抗体为 Abcom 公司产品;小鼠抗人 c-myc 标签抗体为 Bioworld 公司产品;兔抗人 SOX2 抗体;兔抗人 OCT4 抗体为生工生物公司产品;小鼠抗人 β -actin 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;ECL 化学发光试剂盒、8 μ m 孔径大小 Transwell[®] 小室为 Millipore 公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 携带 Twist 基因的逆转录病毒表达载体质粒构建 HindIII 和 Xba I 双酶切 pcDNA3/myc-Twist 质粒,琼脂糖凝胶电泳回收鉴定 myc-Twist, T₄ DNA 聚合酶平端化。EcoRI 单酶切 pBABE 载体(Vector),对回收的片段平端化及去磷酸化。T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接片段,5 μ L 转化到大肠杆菌感受态 DH5 α 中,37% 过夜培养。扩增阳性单克隆菌落,接种于含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。提取质粒, BamHI / Sal I 双酶切鉴定重组逆转录病毒质粒。测序正确,将质粒命名为 pBABE-myc-Twist。

1.2.2 携带 Twist 基因重组逆转录病毒的包装 取对数生长期 HEK293T 细胞接种于 6 孔板内,18 ~ 24 h 后, pBABE-myc-Twist 质粒和包装质粒 pAmpho 通过 CaPO₄ 转染试剂共转染致 HEK293T 细胞,同时将 pBABE-puro 质粒和包装质粒 pAmpho 转染另外一组 HEK293T 细胞作为空载对照组。12 ~ 14 h 后更换

成完全培养基,36 h 收集含逆转录病毒颗粒的细胞上清,并更换新鲜培养基,再过 24 h 后第 2 次收集细胞上清。离心收集病毒上清,用孔径为 0.45 μ m 的醋酸纤维素滤膜过滤病毒上清液,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 稳定表达 Twist 蛋白的 MCF-7 细胞的构建 MCF-7 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板内,培养 14 h 后,培养基更换成病毒上清液(含 polybrene 5 μ g/mL),同时设空载体对照组和不加病毒的空白对照组。经 2 次感染 48 h 后,换用完全培养基,同时开始加入 puromycin(2.5 mg/L)筛选。7 d 后,将 puromycin 的浓度维持在 1.25 mg/L 直至 14 d,正常传代。感染 Twist 逆转录病毒的细胞,命名为 MCF-7/Twist 细胞;感染空载体病毒的对照细胞,命名为 MCF-7/Vector 细胞。

1.2.4 qRT-PCR 检测 Twist mRNA 的表达 逆转录病毒感染细胞后继续培养到第 4 周, TRIzol 法提取 MCF-7/Twist, MCF-7/Vector 各组细胞的总 RNA,逆转录反应依说明书步骤进行。以所获得的 cDNA 为模板,进行定量 PCR 反应。Twist 上游引物为 5'-GGAGTCCGCACTTACGAG-3',下游引物为 5'-TCTG-GAGGACCTGGTAGAGG-3',扩增片段长度为 201 bp。

1.2.5 长程无血清悬浮乳腺细胞小球(Mammosphere)培养 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ /mL 单个细胞悬浮接种于含 B27(2%)、EGF(20 ng/mL)、bFGF(20 ng/mL)、BSA(0.4%)和胰岛素(5 μ g/mL)的 DMEM/F12 培养基中,在 6 孔板中常规培养,36 ~ 48 h 后收集细胞上清,室温 500 r/min 离心 5 min 收集上清中悬浮生长细胞, $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ /mL 继续在无血清培养基中悬浮培养,每 2 ~ 3 天半换液和全换液交替进行,每 7 天用 0.25% (含 0.05% EDTA)的胰酶消化 Mammosphere 成单个细胞继续在无血清培养基中培养,每次消化后再培养得到的 Mammosphere 依次记为第 1 代和第 2 代 Mammosphere, MCF-7/Twist 和 MCF-7/Vector 细胞培养得到的 Mammosphere 分别记为 MCF-7/Twist Mammosphere 和 MCF-7/Vector Mammosphere, 21 d 后显微镜下计数直径大于 60 μ m 的 Mammosphere, 计算其成球能力并收集 Mammosphere 用于后续实验。

1.2.6 Western blot 检测 Twist、myc-Twist 和 CSC 标记蛋白表达 收集 MCF-7/Twist、MCF-7/Vector 以及 MCF-7/Twist Mammosphere、MCF-7/Vector Mammosphere 细胞后,用预冷的 RAPI 裂解液裂解各组细胞。离心收集裂解上清液,BCA 法测定各组蛋白浓度;取等量蛋白上样 SDS-PAGE 分离蛋白,转至 0.45 μ m 的 PVDF 膜,封闭,加入小鼠抗人 Twist 一抗(1:50)、小鼠抗人 myc-Twist 一抗(1:3 000)和小鼠抗人的 β -actin 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:1 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;再次洗膜,ECL 化学发光显色。检测 CSC 标记蛋白步骤同上,兔抗人 SOX2 一抗(1:500),兔抗人 OCT4 一抗(1:300);二抗用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:1 000); β -actin 作为内参。

1.2.7 Transwell 检测细胞迁移 消化、离心、计数 MCF-7/Twist Mammosphere 和 MCF-7/Vector Mammosphere 细胞后,将 200 μ L 无血清细胞悬液(含 2×10^4 个细胞)加入 Transwell 上室,同时在 Transwell 下室加入 500 μ L 1640 完全培养基,常规条件下培养 48 h。结晶紫染色,镜检。

1.3 统计学分析

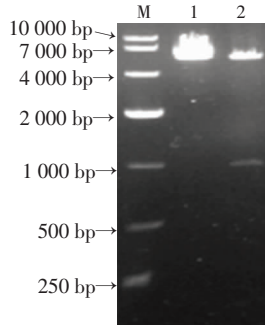
采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析。两独立样本资

料组间数据采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 Twist 基因重组逆转录病毒质粒的鉴定

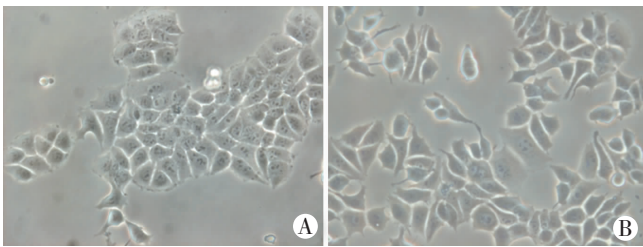
pBABE-puro Vector 载体和重组逆转录病毒质粒 pBABE-myc-Twist 经 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切后,可见接近 1 kb 大小片段,与 myc-Twist 理论值相符;pBABE-myc-Twist 经测序鉴定正确, Twist 成功克隆到 pBABE-puro Vector 载体上。鉴定结果见图 1。



M:DNA 标准;1:pBABE-puro Vector 载体;2:pBABE- myc-Twist 重组质粒
图1 酶切鉴定 pBABE- myc-Twist 重组质粒

2.2 puromycin 筛选得到细胞株 MCF-7/Vector、MCF-7/Twist

采用 $CaPO_4$ 转染的方法得到病毒上清,感染 MCF-7 细胞 puromycin 筛选培养 2 周。MCF-7/Twist 细胞形态较 MCF-7/Vector 细胞形态略为梭形且为不典型的成堆、成团生长(图 2)。



A:MCF-7/Vector;B:MCF-7/Twist

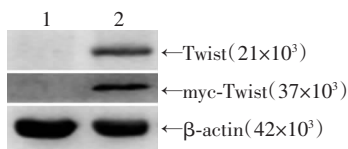
图2 经 puromycin 筛选培养 2 周后的阳性细胞 (相差显微镜 $\times 200$)

2.3 qRT-PCR 鉴定 MCF-7 细胞内 Twist mRNA 表达

qRT-PCR 检测到逆转录病毒感染 MCF-7 细胞 2 周后的 MCF-7/Twist 细胞内有 Twist mRNA 表达(0.767 ± 0.090),而在 MCF-7/Vector 细胞内呈阴性,过表达组的 mRNA 表达量较空白对照组的 mRNA 表达量显著增高($P < 0.05$)。

2.4 Western Blot 鉴定 MCF-7 细胞内 myc-Twist 标签蛋白和 Twist 蛋白表达

Western blot 检测结果显示,MCF-7/Twist 中 Twist 蛋白和 myc-Twist 标签蛋白表达差异显著(图 3)。

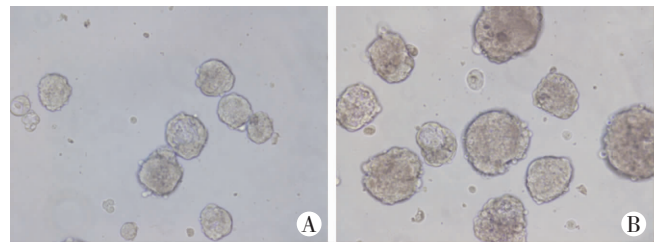


1:MCF-7/Vector;2:MCF-7/Twist

图3 Western blot 检测 Twist 蛋白和 myc-Twist 标签蛋白的表达

2.5 长程无血清悬浮培养富集具有干细胞特性的 Mammosphere

用含细胞因子的无血清悬浮培养基经过 3 周的筛选得到悬浮成球生长的第 2 代 MCF-7/Twist Mammosphere 和 MCF-7/Vector Mammosphere,显微镜下计数直径大于 $50 \mu m$ 的 Mammosphere 并计算其成球能力,其中 MCF-7/Twist 细胞富集得到的 Mammosphere 数量(23 ± 0.8)较 MCF-7/Vector Mammosphere 的数量(14.0 ± 1.4)多,且体积大,两组成球细胞数比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

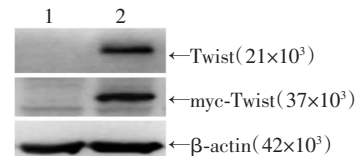


A:MCF-7/Vector Mammosphere;B:MCF-7/Twist Mammosphere;

图4 MCF-7 高表达 Twist 后细胞成球能力的改变 (相差显微镜 $\times 200$)

2.6 myc-Twist 标签蛋白和 Twist 蛋白在 MCF-7/Twist Mammosphere 内稳定表达

Western blot 检测到用含细胞因子的无血清悬浮培养基经过 3 周的筛选得到悬浮成球生长的第 2 代 MCF-7/Twist Mammosphere 内 myc-Twist 标签蛋白和 Twist 蛋白的表达,而 MCF-7/Vector Mammosphere 内未见蛋白表达(图 5)。

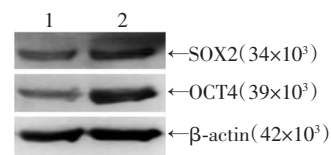


1:MCF-7/Vector Mammosphere;2:MCF-7/Twist Mammosphere

图5 Western blot 检测 Twist 蛋白和 myc-Twist 蛋白的表达

2.7 Twist 诱导 Mammosphere 相关 CSC 蛋白标记变化

Western blot 检测到 MCF-7/Twist Mammosphere 中相关 CSC 蛋白 SOX2 和 OCT4 标记蛋白表达高于 MCF-7/Vector Mammosphere(图 6)。

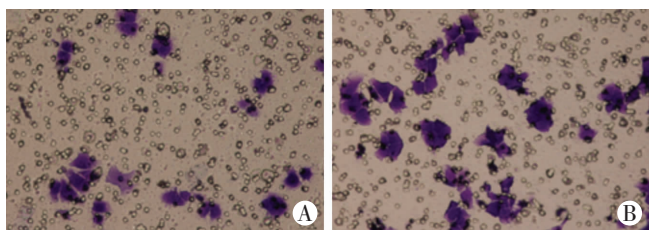


1:MCF-7/Vector Mammosphere;2:MCF-7/Twist Mammosphere

图6 Western blot 检测 CSC 标志蛋白的表达

2.8 Twist 促进具有干细胞特性的 Mammosphere 细胞迁移增强

Transwell 检测到 MCF-7/Twist Mammosphere 的迁移细胞数(187.0 ± 5.6)较 MCF-7/Vector Mammosphere 的迁移细胞数(78.0 ± 3.6)显著增加($P < 0.05$,图 7)。



A: MCF-7/Vector Mammosphere; B: MCF-7/Twist Mammosphere

图7 Transwell 检测 MCF-7/Vector Mammosphere 和 MCF-7/Twist Mammosphere 细胞迁移能力 (相差显微镜 ×200)

3 讨论

肿瘤干细胞样细胞是存在于肿瘤细胞中具有自我更新能力和无限增殖潜能的细胞群体,这一细胞群体最先在血液肿瘤中被发现,随后在实体肿瘤中也发现其对肿瘤的远处转移,复发和对药物治疗的耐受有密切关系^[2]。有报道 Twist 参与调控肿瘤发生发展过程中重要的 EMT 过程,与肿瘤细胞获得迁移和远处转移能力有密切联系^[9]。近年来,已有 Snail 等转录因子参与肿瘤细胞获得干细胞样特性,并参与肿瘤的转移,复发的生物学过程的报道^[10]。故 Twist 是否参与肿瘤细胞获得干细胞特性及其作用机制尚待研究。

本研究成功构建 Twist 逆转录病毒真核表达质粒,建立了稳定表达 Twist 的人乳腺癌细胞表达模型,并通过长程无血清悬浮培养的方法富集具有干细胞特性的 Mammosphere,以明确 Twist 促肿瘤干细胞样细胞富集和迁移的作用。本研究发现,高表达 Twist 基因的人乳腺癌细胞 MCF-7 的肿瘤干细胞样细胞富集能力明显增强 ($P < 0.05$);肿瘤干细胞样细胞生物标志 SOX2 和 OCT4 的表达也较高于对照组;细胞的迁移能力显著增强 ($P < 0.05$)。本研究提示 Twist 参与了调控肿瘤细胞获得干细胞特性,以及其促进肿瘤细胞迁移,其分子生物学机制有待进一步研究。

近年来,多项研究显示 Twist 通过直接或间接方式诱导下游相关基因的表达,参与 EMT 转化等生理过程^[11-12], Twist 可能赋予细胞以肿瘤干细胞特性,如肿瘤干细胞样细胞增加、Mammosphere 形成能力增强^[13];具有多向、双向和单向分化的间质干细胞克隆,失去 Twist 的表达则丧失相应的分化能力^[14]。这提示肿瘤细胞可能通过肿瘤干细胞发生远处转移。但是 Twist 是通过何种调控机制调控肿瘤细胞获得干细胞特性并且发生远处转移尚不清楚,本研究在已有研究的基础上为研究 Twist 调控肿瘤干细胞在乳腺肿瘤发生发展过程中所起的作用建立了理想的细胞模型。

综上所述, Twist 促进肿瘤干细胞样细胞的富集获得肿瘤干细胞样特性和迁移能力增强,为进一步探讨 Twist 和肿瘤干细胞样细胞在乳腺肿瘤发生、发展过程中的作用及其机制的研究奠定了初步的实验基础。

参考文献:

- [1] Liu A N, Zhu Z H, Chang S J, *et al.* Twist expression associated with the epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1/2): 195-203.
- [2] Visvader J E, Lindeman G J. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10): 755-768.
- [3] 林叔陈, 张凤春, 张雁云, 等. 乳腺癌干细胞的研究进展 [J]. *肿瘤*, 2008, 28(8): 719-722.
- [4] Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna G L, *et al.* Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(24): 8205-8212.
- [5] Mani S A, Guo W, Liao M J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. *Cell*, 2008, 133(4): 704-715.
- [6] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, *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.
- [7] Vesuna F, Lisok A, Kimble B, *et al.* Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression [J]. *Neoplasia*, 2009, 11(12): 1318-1328.
- [8] Shaw F L, Harrison H, Spence K, *et al.* A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2012, 17(2): 111-117.
- [9] Yang J, Mani S A, Donaher J L, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- [10] Kurrey N K, Jalgaonkar S P, Joglekar A V, *et al.* Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(9): 2059-2068.
- [11] Yang M H, Hsu D S, Wang H W, *et al.* Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(10): 982-992.
- [12] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer [J]. *Nature*, 2007, 449(7163): 682-688.
- [13] Liu M, Casimiro M C, Wang C, *et al.* p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(45): 19035-19039.
- [14] Russell K C, Phinney D G, Lacey M R, *et al.* *In vitro* high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment [J]. *Stem Cells*, 2010, 28(4): 788-798.

(收稿:2014-04-16;修回:2014-05-12)

(编辑 汪勤俭)