

网络出版时间:2017-6-16 11:46:00 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170616.1146.001.html

◇基础医学研究◇

miR-205 慢病毒表达载体的构建 及其对乳腺癌细胞作用的初步研究

范楚苓^{1,2}, 张萍¹, 孙彩虹¹, 钱晨¹, 戚博¹, 赵茹¹, 肖荣琴¹, 刘亚坤¹, 李菲菲¹

摘要 目的 构建 microRNA-205 (miR-205) 慢病毒表达载体, 感染乳腺癌细胞 MB231, 建立稳定表达 miR-205 的 MB231 细胞株, 观察其增殖能力的变化。**方法** 酶切慢病毒载体 GV369, 设计并合成 miR-205 引物, 通过 PCR 扩增目的基因连接到慢病毒载体上。对重组质粒双酶切鉴定, 进行慢病毒 hsa-miR-205 的包装和滴度测定。用构建好的慢病毒感染 MB231 细胞, 定量 PCR 检测细胞中 miR-205 表达水平的变化, MTT 和划痕实验观察过表达 miR-205 后 MB231 细胞增殖和迁移能力的变化。**结果** 测序显示, 目的基因连接慢病毒载体成功。慢病毒稳定感染了 MB231, 定量 PCR 结果显示, 感染 hsa-miR-205 的 MB231 中 miR-205 表达明显提高, MTT 和划痕实验结果显示感染后 MB231 的细胞增殖和迁移能力受到抑制。**结论** 成功构建了 miR-205 慢病毒表达载体, 并建立了稳定表达 miR-205 的细胞株 MB231, 显示其可能负调控乳腺癌细胞的恶性生物学行为, 为后期进一步研究 miR-205 的功能和机制奠定了基础。

关键词 miR-205; 慢病毒; 乳腺癌; 细胞增殖

中图分类号 R 363.16; R 363.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1099-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.001

microRNA 是一类非编码单链小分子 RNA, 由 21~23 个核苷酸组成, 其广泛存在于真核生物中, 通过与靶基因 mRNA 3'UTR 相结合, 导致靶 mRNA 降解或抑制蛋白质合成, 从而调控转录后基因的表达水平^[1]。已有研究^[2]报道, miR-205 在肿瘤的侵袭和转移发挥着重要的调控作用。在前列腺癌、头颈部鳞状细胞癌等肿瘤组织中, miR-205 的表达水平低于正常组织^[3]。恢复 miR-205 在前列腺癌细胞

中的表达, 会导致间质细胞重新向上皮细胞转化^[4], 上调 miR-205 表达水平能抑制乳腺癌细胞的增殖能力和肺转移^[5]。但其在乳腺癌干细胞中发挥的作用尚不明确。因此, 该研究旨在通过构建 miR-205 慢病毒载体^[6], 来建立 miR-205 过表达的乳腺癌细胞系, 从而为后期研究 miR-205 在乳腺癌中的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及质粒 人乳腺癌细胞 MB231 细胞株, 人胚肾上皮细胞 293T 细胞由美国合作实验室引进。GV369 质粒以及两种病毒包装辅助质粒 Helper 1.0、Helper 2.0 均由上海吉凯基因化学技术有限公司提供, 其中 GV369 载体的元件顺序为 Ubi-MCS-SV40-EGFP-IRES-puromycin, 克隆位点为 Age I / Nhe I。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM basic (1×) 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清 FBS(天津康源生物技术公司); 双抗 Penicillin-Streptomycin solution(美国 Hyclone 公司); OPTI-MEM、Lipofectamine3000(美国 Invitrogen 公司); 大肠杆菌 DH5α(北京 TransGen 公司); 嘌呤霉素(美国 Sigma 公司); 限制性内切酶、T4 连接酶(大连 TaKaRa 公司); TRIzol Reagent(北京康为试剂); MTT 试剂盒(南京凯基公司); Hairpin-it miRNAs RT-PCR Quantitation Kit 试剂盒(上海吉玛公司); 质粒提取试剂盒(美国 Axygen 公司); PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司); 荧光倒置显微镜(德国 ZEISS 公司); 细胞孵育箱、酶标仪(美国 Thermo 公司); 琼脂糖凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像分析仪 GL2200 Pro(上海汇佳科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与目的片段的扩增 在 Sanger microRNA 数据库 miRBase 中找到 hsa-miR-205 的成熟序列: 5'-GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC-3'。交

2017-04-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81302319); 安徽省自然科学基金(编号: 1308085MH121); 国家级大学生创新创业训练计划项目(编号: 201510366013)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

²皖西卫生职业学院, 六安 237005

作者简介: 范楚苓, 女, 硕士研究生;

李菲菲, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfei717@yahoo.com.cn

由上海吉凯基因生物公司进行合成。正向引物 mir-205-F: 5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTAGGCCTTTGGCAGGTAATG-3', 反向引物 mir-205-R: 5'-CACACATTCCACAGGCTAGTGCTACGGTGGTGGCGGCGGC GGT-3', 下划线部分为酶切位点, 正向引物酶切位点为 Age I, 反向引物酶切位点为 Nhe I。以此序列为模板进行扩增, 得到目的片段。总体系为 25 μ l: 5 \times PS Buffer 5 μ l, dNTP Mix 2 μ l, 正向引物 0.5 μ l, 反向引物 0.5 μ l, cDNA 模板 0.5 μ l, PrimeSTAR HS DNA polymerase 0.25 μ l, ddH₂O 16.25 μ l。反应条件为预变性 98 $^{\circ}$ C、5 min, 98 $^{\circ}$ C、10 s, 55 $^{\circ}$ C、10 s, 72 $^{\circ}$ C、10 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 8 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 miR-205 慢病毒表达载体的构建和鉴定

将上述扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并纯化后, 回收目的片段。用 Age I、Nhe I 双酶切 GV369 载体后, 用 T4 连接酶将目的片段和载体 37 $^{\circ}$ C 水浴连接。将连接产物加入感受态细胞后, 涂于 LB 固体培养基 (Amp 抗性) 平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 14 h。选取菌落进行 PCR 鉴定, 阳性克隆菌液送公司测序鉴定, 鉴定结果与数据库进行比对分析。

1.2.3 miR-205 慢病毒的包装和滴度测定

慢病毒的包装: 病毒包装过程中需要用到 3 种质粒, 包括上述已构建好的携带 miR-205 的载体以及 2 个病毒包装辅助质粒, 将这 3 个质粒共转染 293T 细胞。转染前 24 h, 用胰酶消化 293T 细胞, 重新接种于培养皿中, 待细胞密度达到 70% ~ 80% 时可以进行转染。转染前 2 h 更换成无血清的培养基。将 1.5 ml EP 管中加入 20 μ g GV369 质粒, 15 μ g pHelper 1.0, 10 μ g pHelper 2.0, 与 Lipofectamine 3000 试剂均匀混合, 总体积为 1 ml。室温下温育 15 min 后, 加入 293T 细胞中, 混匀, 于细胞箱中培养。6 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗 1 次, 洗去残余转染混合物, 加入含 10% FBS 的培养基, 继续培养 48 ~ 72 h, 观察 GFP 表达情况。转染 48 h 后, 收集细胞上清液, 7 500 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 除去细胞碎片。用 0.45 μ m 的滤器过滤, 得到病毒原液, 分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

慢病毒滴度测定: 荧光法测定前 1 天, 将 293T 细胞铺于 96 孔板, 每孔 4×10^4 个细胞, 体积 100 μ l。根据预期的病毒滴度, 准备 8 个无菌 EP 管, 每管加入 90 μ l 无血清培养基, 取 10 μ l 病毒原液加入第一管, 混匀后取 10 μ l 加到第二管中, 继续重复上述相同操作直到最后一管。将细胞培养板里的培养基换成病毒稀释液, 培养箱中培养 24 h 后, 加入 100

μ l 完全培养基, 4 d 后, 观察荧光表达情况。计算病毒原液滴度, 公式为: 病毒滴度 (TU/ml) = GFP 阳性细胞数/稀释倍数。

1.2.4 miR-205 慢病毒感染乳腺癌细胞 MB231

先进行 MB231 细胞株病毒感染预实验, 将 MB231 按 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 当细胞融合度达到 30% 时开始病毒感染, 这里本研究设置了 4 组进行实验: ① DMEM + 慢病毒组; ② DMEM + Polybrene + 慢病毒组; ③ ENi.S + 慢病毒组; ④ ENi.S + Polybrene + 慢病毒组。按照以上分组分别加入 96 孔板中, 8 h 后换液, 72 h 后观察 GFP 表达情况, 从而选择出最佳的感染条件。预实验得到的结果是在 DMEM + Polybrene + 慢病毒的条件, 感染指数 MOI 值为 1×10^7 (MOI = 10), 感染效果最佳。于是用得到的条件进行正式感染 MB231 细胞, 感染前 1 d 将 MB231 细胞用胰酶消化, 按 3×10^4 /孔接种于 24 孔板中, 24 h 后当细胞融合度达到 30% 时, 弃去原培养基, 将 440 μ l DMEM + 10 μ l hsa-miR-205 + 50 μ l Polybrene 加入 EP 管混匀后加入相应的孔中。14 h 后, 将培养基换成含 10% FBS 的 DMEM 培养基。继续培养 72 h 后, 显微镜下观察细胞的荧光表达情况。接着用嘌呤霉素进行药物筛选, 挑取单个细胞克隆, 逐级进行扩大培养, 直至建立稳定感染的 MB231 细胞系。

1.2.5 qPCR 检测稳定感染 MB231 细胞中 miR-205 的表达水平

将稳定感染的 MB231 细胞用 TRIzol 提取细胞的总 RNA, 进行 qRT-PCR 反应。qRT-PCR 反应体系: 2 \times Real-Time PCR Master Mix (SYBR) 10 μ l, miRNA specific Primer set (10 μ mol/L) 0.4 μ l, ROX reference dye 0.4 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.2 μ l, miRNA RT product 2 μ l, 补足 H₂O 至 20 μ l。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C、12 s, 62 $^{\circ}$ C、40 s, 40 个循环。每个样品设置 3 个副孔, 重复 3 次, 得出样品的 Δ Ct 值, 计算相对表达比率 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。

1.2.6 MTT 实验检测稳定感染 MB231 细胞的增殖能力

将处于对数生长期的 MB231 细胞消化按 2.5×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 共 4 块板, 分别为 0、24、48、72 h 组, 每个板设有 3 组, 空白对照, 阴性对照和 hsa-miR-205 组, 每块板设置一个调零孔。分别于上述 4 个时间点, 在相应的板加入 50 μ l 稀释好的 MTT, 继续孵育 4 h 后, 避光收板, 弃去上清液, 加入 100 μ l DMSO, 在摇床上避光摇晃 15 min, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定其光吸收值, 重复 3 次取平均

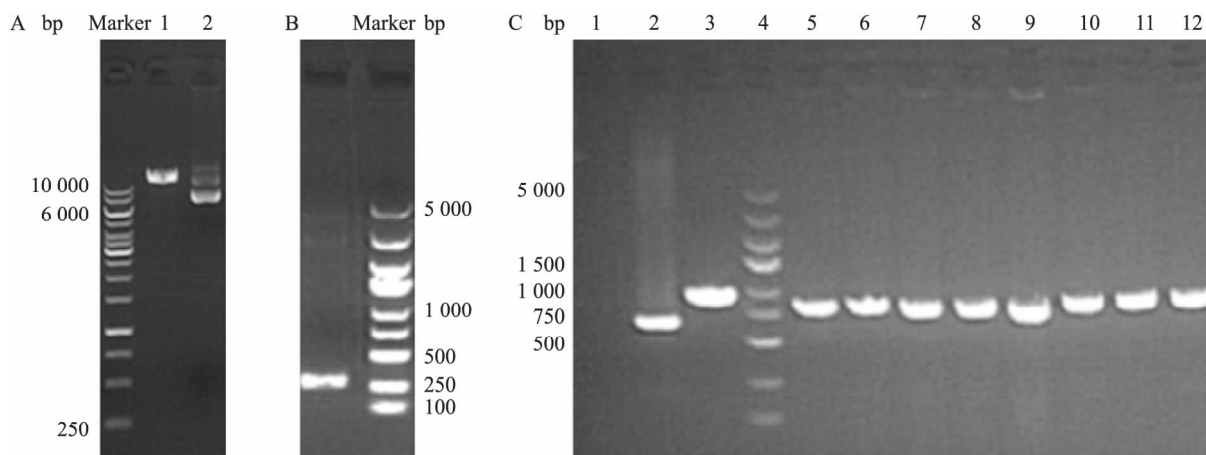


图1 慢病毒载体构建 PCR 结果

A: GV369 载体酶切后琼脂糖凝胶电泳图(1: 载体酶切产物; 2: 未酶切载体); B: PCR 扩增 miR-205 目的片段后电泳图; C: 重组慢病毒载体的酶切鉴定(1: ddH₂O; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 5~12: 转化子)

值。

1.2.7 划痕实验检测细胞体外迁移能力 用记号笔、直尺在 6 孔板背面划横线,取 MB231 细胞消化后按 5×10^5 /ml 接种于 6 孔板中。过夜后,用枪头比着直尺,垂直划线,尽量垂直于背后所划的横线。用 PBS 冲洗 2 遍后,加入无血清培养基。24、48 h 后显微镜下拍照观察,每次拍照前先用 PBS 清洗,再加入无血清培养基继续培养。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果

2.1 hsa-miR-205 重组质粒的构建与鉴定 选择 Age I、Nhe I 对由上海吉凯基因公司提供的 GV369 载体进行酶切,琼脂糖凝胶电泳(图 1A)显示载体酶切成功。用 PCR 扩增出 miR-205 目的片段,电泳结果(图 1B),产物大小为 268 bp。将酶切的载体和 PCR 产物进行连接,转化。选取菌落进行 PCR 鉴定(图 1C),将阳性克隆送公司测序。经测序,5~12 均正确,与 NCBI 数据库的序列一致。将正确的克隆菌液扩大培养,进行质粒抽提。

2.2 慢病毒的包装与滴度测定 本研究采用携带 hsa-miR-205 的 GV369 载体质粒,与两种病毒包装辅助质粒共转染 293T 细胞,培养 48 h 后观察细胞 GFP 表达情况,镜下看几乎所有细胞均有表达,证明慢病毒包装成功。接着收集细胞上清液,4℃离心,过滤后于 -80℃ 冰箱分装保存。根据预期病毒滴度,用 DMEM 10 倍梯度稀释病毒原液,感染 293T 细胞,4 d 后观察荧光表达情况(图 2),滴度检测为 1E

+9 TU/ml。

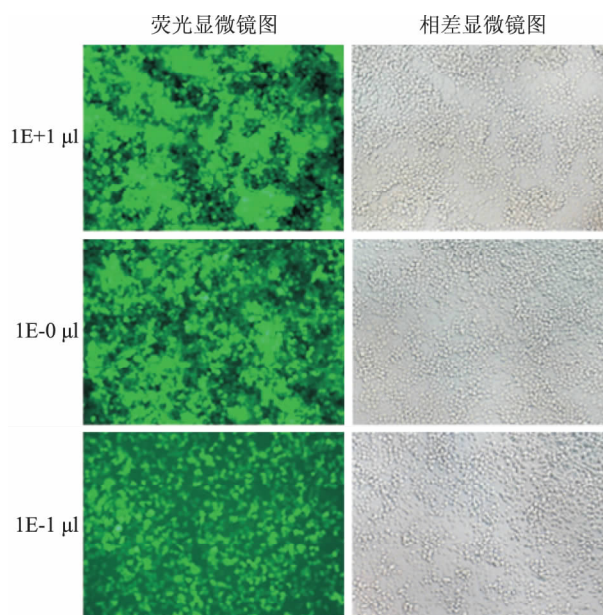


图2 不同浓度梯度的重组慢病毒感染 239T 细胞 ×200

2.3 慢病毒稳定感染 MB231 细胞及感染后 miR-205 表达水平的检测 采用预实验感染条件感染 MB231 细胞,获得稳定过表达 miR-205 的 MB231 细胞株。本研究将过表达 miR-205 慢病毒颗粒(Lv-miR-205)和阴性对照病毒颗粒(Lv-nc)分别感染 MB231 细胞,72 h 后观察 GFP 表达情况,并用嘌呤霉素筛选 2~3 周,获得稳定过表达 miR-205 的 MB231 细胞株。镜下可见 MB231 细胞中 85% 以上均有 GFP 表达,且细胞状态良好(图 3A)。将细胞传代培养后,收集细胞提取 RNA,经逆转录获得 cDNA 后,进行 qRT-PCR 反应。结果显示(图 3B),稳定转染 hsa-miR-205-3p 的 MB231 细胞较其他阴性

对照组, miR-205 的表达水平明显增高, 差异有统计学意义($F = 106.500, P = 0.006$)。

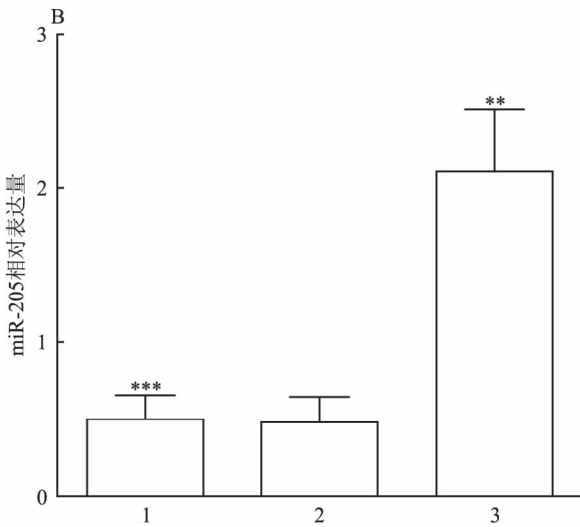
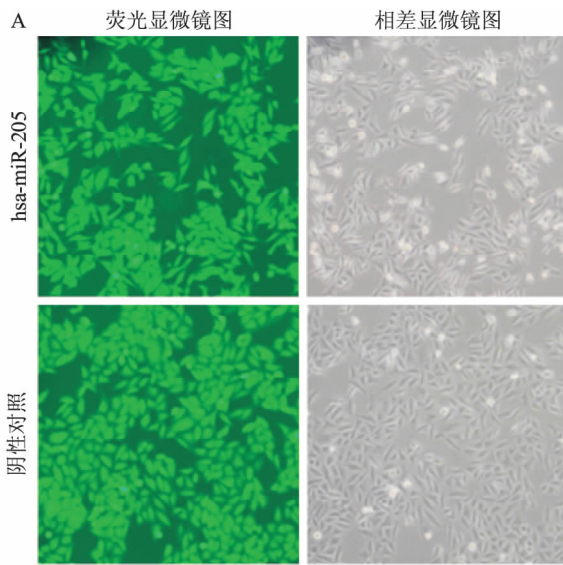


图3 MB231 细胞感染慢病毒的效率检测 ×200

A: 重组慢病毒质粒感染 MB231 细胞感染效率; B: Real-time qPCR 检测 miR-205 的表达水平; 1: 空白对照组; 2: 阴性对照组; 3: hsa-miR-205 组; 与阴性对照组相比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 过表达 miR-205 对乳腺癌细胞 MB231 的增殖的影响 通过 MTT 实验检测过表达 miR-205 的 MB231 细胞增殖情况(图 4)。hsa-miR-205 组在 48、72 h 2 个时间点的增殖能力较空白对照组、阴性对照组均有减弱, 差异有统计学意义(0.415 ± 0.032 vs 0.443 ± 0.010 、 0.051 ± 0.020 vs 0.665 ± 0.060 、 0.049 ± 0.060 vs 0.611 ± 0.070 , $F = 12.283$ 、 $17.763, P = 0.005$ 、 0.001)。

2.5 过表达 miR-205 对乳腺癌细胞 MB231 的迁移的影响 通过划痕实验分析过表达 miR-205 的 MB231 细胞的迁移能力(图 5), 结果显示: 在过表达

miR-205 之后, 细胞愈合的速度明显低于阴性对照($t = 8.071, P = 0.025$), 说明 miR-205 对乳腺癌细胞 MB231 的迁移具有抑制作用。

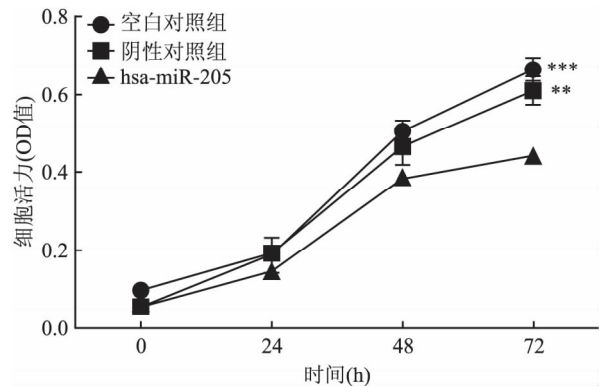


图4 过表达 miR-205 对 MB231 增殖的影响 与 hsa-miR-205 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

乳腺癌由于复发和转移率高, 是女性最常见的恶性肿瘤, 且一般发现时都属于中晚期, 严重的威胁了女性的生命和健康。与其他肿瘤相同的是, 乳腺癌的发生和转移是一个极其复杂的过程, 其包括: 肿瘤细胞自身的生长优势, 癌细胞对细胞外基质和基底膜的降解与破坏, 细胞骨架重构引起细胞运动与迁移, 细胞因子诱导的癌细胞器官特异性定向归巢, 以及肿瘤血管和淋巴管生成等多个步骤。每一步都受到多种因素的精密调控, 目前发现的主要调控因素有: ① 调节细胞外基质和基底膜成分的蛋白酶, 目前研究较多的有基质金属蛋白酶家族, 组织蛋白酶 D 等几种; ② 促癌细胞趋化、迁移及黏附的细胞因子, 血管内皮生长因子等; ③ 多种分子对肿瘤细胞生长的介导作用; ④ 乳腺癌干细胞的作用^[7-8]。

乳腺癌干细胞是最早被鉴别和发现的实体瘤干细胞, 其与乳腺癌的侵袭和转移密切相关。多项研究^[9]显示, microRNA 共同参与肿瘤干细胞的形成和侵袭等多个调控过程。目前已发现几十种影响乳腺癌生长转移的 microRNA, 新近研究^[10]显示一些 microRNA 可以通过调节肿瘤干细胞的恶性生物学行为参与肿瘤的侵袭性生长。但是目前显示的参与乳腺癌干细胞调控的 microRNA 并不多。

miR-205 在多种肿瘤中异常表达, 参与了不同肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移等过程。在食管癌、卵巢癌、肺癌等肿瘤组织中, miR-205 发挥着癌基因的作用, 而在前列腺癌、黑色素瘤、乳腺癌等肿瘤组织中, miR-205 则发挥着抑癌基因的作用^[11-13]。

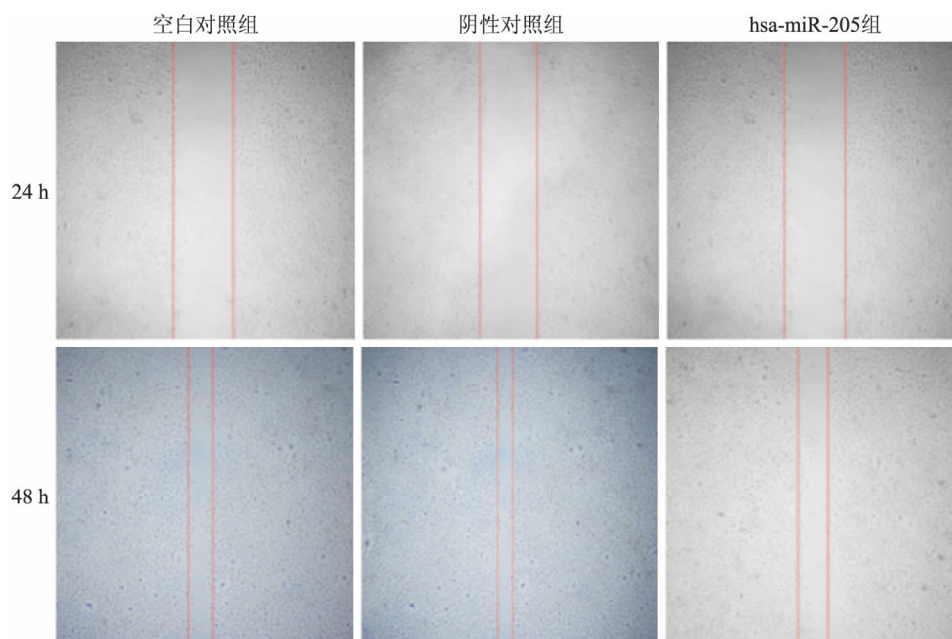


图5 过表达 miR-205 对 MB231 迁移能力的影响

上调 miR-205 表达能够抑制乳腺癌细胞的增殖能力和肺转移^[14],但是 miR-205 在乳腺癌干细胞中的作用机制尚不清楚。因此本研究通过构建过表达 miR-205 慢病毒载体,以实现乳腺癌细胞的稳定转染。

本实验以 hsa-miR-205 序列为模板,PCR 扩增目的片段,连接到经酶切的慢病毒载体 GV369 上,测序正确后进行慢病毒包装及滴度测定;用构建好的 miR-205 慢病毒载体感染 MB231 细胞,建立 miR-205 过表达的稳定细胞株;经细胞行为学检测显示,miR-205 过表达后 MB231 细胞的增殖和迁移能力明显受到了抑制。上述研究结果为后期进一步深入研究 miR-205 对乳腺癌发生发展的作用机制打下了良好的基础。

参考文献

- [1] Ghelani H S, Rachchh M A, Gokani R H. MicroRNAs as newer therapeutic targets: a big hope from a tiny player [J]. J Pharmacol Pharmacother, 2012, 3(3) : 217 - 27.
- [2] Greene S B, Herschkowitz J I, Rosen J M. The ups and downs of miR-205: identifying the roles of miR-205 in mammary gland development and breast cancer [J]. RNA Biol, 2010, 7(3) : 300 - 4.
- [3] 候新新, 赵 萌, 张贵宇. miR-205 与肿瘤 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2012, 39(10) : 732 - 4.
- [4] Puhr M, Hoefler J, Schäfer G, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205 [J]. Am J Pathol, 2012, 181(6) : 2188 - 201.
- [5] Dar A A, Majid S, de Semir D, et al. miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence *via* regulation of E2F1 protein [J]. J Biol Chem, 2011, 286(19) : 16606 - 14.
- [6] 董 伟, 刘媛媛, 陈志军, 等. hsa-miR-100-3p 抑制剂慢病毒表达载体稳定感染 BEAS-2B 细胞株的建立 [J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 20(2) : 188 - 92.
- [7] Incardona F, Doroudchi M M, Ismail N, et al. Registered report: Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization [J]. Elife, 2015, 4: e06938.
- [8] Chen J, Yao Y, Gong C, et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis *via* PTPN13 [J]. Cancer Cell, 2011, 19(4) : 541 - 55.
- [9] Bertoli G, Cava C, Castiglioni I, et al. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer [J]. Theranostics, 2015, 5(10) : 1122 - 43.
- [10] Feifei N, Mingzhi Z, Yanyun Z, et al. MicroRNA expression analysis of mammospheres cultured from human breast cancers [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(11) : 1937 - 44.
- [11] Zhang C, Long F, Wan J, et al. MicroRNA-205 acts as a tumor suppressor in osteosarcoma *via* targeting RUNX2 [J]. Oncol Rep, 2016, 35(6) : 3275 - 84.
- [12] Bhatnagar N, Li X, Padi S K, et al. Downregulation of miR-205 and miR-31 confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis in prostate cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2010, 1: e105.
- [13] Wang L, Wang J. MicroRNA-mediated breast cancer metastasis from primary site to distant organs [J]. Oncogene, 2012, 31(20) : 2499 - 511.
- [14] Dar A A, Majid S, de Semir D, et al. miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence *via* regulation of E2F1 protein [J]. J Biol Chem, 2011, 286(19) : 16606 - 14.

沉默信息调节因子 2 在人骨关节炎软骨组织及细胞中的表达

饶先亮¹, 常俊¹, 方晓², 王涛², 尹宗生¹

摘要 **目的** 检测沉默信息调节因子 2(SIRT2) 在人软骨中的表达, 探讨其在骨关节炎(OA)与正常软骨组织及细胞中表达的差异性。**方法** 选取临床 20 例骨关节炎关节软骨, 为 OA 组; 另取 10 例正常关节软骨, 为对照组。免疫荧光染色法检测 SIRT2 在两组软骨组织的表达分布及表达情况。分离软骨细胞并进行细胞传代培养, 甲苯胺蓝染色进行细胞鉴定, Western blot 法检测软骨组织及细胞中 SIRT2 的表达情况。**结果** 免疫荧光染色结果显示 SIRT2 表达于软骨组织中, 分布在细胞核与细胞质中, OA 组 SIRT2 阳性细胞率较对照组明显降低($P < 0.01$); Western blot 结果显示 OA 组软骨组织中 SIRT2 表达显著低于对照组($P < 0.01$), 软骨细胞

中 SIRT2 的表达亦显著低于对照组($P < 0.01$)。**结论** SIRT2 在人类软骨组织中有表达, 具体表达在细胞核与细胞质中, SIRT2 表达降低可能导致骨关节炎的发生及进展。

关键词 骨关节炎; 软骨组织; 免疫荧光; 沉默信息调节因子 2
中图分类号 R 684.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1104-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.002

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)是一种较为常见的退行性关节病变, 尤其膝关节受累最为常见, 主要表现为关节疼痛及关节活动障碍, 年龄与肥胖被认为是最主要的危险因素, 随着寿命增加, OA 的发病率呈现显著上升趋势^[1]。虽然 OA 确切的发病机制尚不明确, 但越来越多的证据表明软骨老化及细胞衰老在 OA 发生发展中起着重要作用。沉默信息调节因子 2(silent information regulator of transcription 2, SIRT2)是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖的组蛋白去乙酰酶, 作为 Sirtuin 家族(SIRT1~SIRT7)成员之

2017-04-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81171173); 安徽医科大学校科学研究基金(编号: 2015xkj042)

作者单位: ¹安徽医科大学第四附属医院骨外科, 合肥 230022

²安徽医科大学第一附属医院关节与骨肿瘤外科, 合肥 230022

作者简介: 饶先亮, 男, 硕士研究生;

尹宗生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yinzongsheng1961@sina.com

Construction of lentiviral vector of miR-205 and primarily investigation of its effect on breast cancer cell

Fan Chuling^{1,2}, Zhang Ping¹, Sun Caihong¹, et al

(¹School of Basic Medical, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237005)

Abstract Objective To construct a lentivirus vector of microRNA-205(miR-205), and transfect into MB231 cell line, to establish a stable cell line expressing miR-205. **Methods** Design and synthesis miR-205 primers, the target gene was amplified by PCR, and connect to the lentivirus expression plasmid. Packaging and testing virus drops Lv-miR-205, after the double enzyme digestion of the recombinant plasmid. Infecting MB231 cells with the Lv-miR-205, then detect the expression of miR-205 by Real Time qPCR and access the cell proliferation and migration by MTT assay and wound-healing assay. **Results** The DNA sequencing prove that the lentivirus vector was constructed successfully. Lv-miR-205 stablized infect MB231 cells, the expression of miR-205 elevated apparently, cell proliferation and migration was inhibited sharply. **Conclusion** The miR-205 lentiviral expression vector is successfully constructed and the cell line MB231 stably expressing miR-205 is established, which indicate that it could negatively regulate the malignant biological behavior of breast cancer cells, and laid the foundation for the further study of the function and mechanism of miR-205.

Key words miR-205; lentivirus; breast cancer; cell proliferation