

# RunX2 的真核表达载体的构建及其对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响

赵明 范楚玲 郭强 汪思应 李菲菲

**摘要** 目的 构建人 RunX2 真核表达载体,观察 RunX2 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响。方法 运用逆转录 PCR (RT-PCR) 扩增、酶切、连接等基因重组技术将人 RunX2 基因插入 pcDNA3.1 真核表达载体中;并经酶切、PCR、测序鉴定;将构建的 RunX2 真核表达载体瞬时转染 MCF-7 细胞,利用 Western blot 法检测 RunX2 蛋白表达,用 MTT 实验和细胞划痕实验检测其对乳腺癌细胞的生物学影响。结果 构建的 RunX2 真核表达载体在 MCF-7 细胞中高表达 RunX2 蛋白;发现高表达 RunX2 的 MCF-7 细胞活力增加,移动能力增强。结论 构建的 RunX2 真核表达载体能促进乳腺癌细胞的增殖和迁移。

**关键词** RunX2; 乳腺癌

**中图分类号** R 349.5

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)11-1593-04

RunX2 是一种参与成骨分化和骨发育的重要转录因子<sup>[1]</sup>。在乳腺组织中,RunX2 也参与某些基因的表达调控,在乳腺上皮细胞分化中发挥重要作用,并与乳腺肿瘤细胞株的侵袭性密切相关<sup>[2]</sup>。本课题组研究显示 RunX2 通过调节血管生成相关基因的表达促发乳腺癌细胞发生骨转移(待发表)。

2015-07-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81302319)

作者单位:安徽医科大学病理生理学教研室,合肥 230032

作者简介:赵明,男,硕士研究生;

汪思应,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: sywang@ahmu.edu.cn;

李菲菲,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 349711832@qq.com

这一结果提示 RunX2 可能成为乳腺癌骨转移的一个标志物。为进一步探讨 RunX2 与乳腺癌侵袭转移的关系,该研究利用亚克隆技术构建人 RunX2 真核表达载体,并通过瞬时转染至乳腺癌细胞 MCF-7 中,以探讨 RunX2 对乳腺癌细胞的影响,初步了解其在乳腺癌侵袭转移中的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** 人乳腺癌细胞系 MCF-7、MB-231 细胞由本室长期保存。培养条件:配制含有 DMEM、10% 胎牛血清(FBS)、1% 双抗(青霉素-链霉素)的完全培养基,将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养。

**1.2 主要试剂和仪器** 根据 NCBI Reference Sequence 软件分析设计 RunX2 引物,引物由 Invitrogen 公司合成,PCR 反应试剂、DNA 限制性内切酶及 DNA Marker 购于 TaKaRa 公司,DMEM、胰酶、FBS 均购于 Gibco 公司,Western blot 相关试剂购于上海生物工程有限公司,RunX2 抗体购于美国 Abcam 公司,PVDF 膜购于 Millipore 公司。PCR 仪为 BIO-RAD 公司产品。

**1.3 PCR 扩增** 提取人乳腺癌细胞 MB-231 的总 RNA,以此为模板行 RT-PCR 扩增 RunX2 片段。引物:上游 3'-CCG CTC GAG ATG GCA TCA AAC AGC CTC-5';下游 3'-TCC CCG CGG ATA TGG TCG CCA AAC AGA-5'(下划线部分为酶切位点)。PCR 反应体系:25 μl,变性温度 98℃ 10 s,退火温度 55℃ 5 s,延伸温度 72℃ 10 s,反应 35 个循环。PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳发现一条 1 kb 左右的片段。回收

reactive oxygen species (ROS), mitochondrial ROS were detected by flow cytometry. The activation of Caspase-3 was analyzed by Western blot. In inhibition experiment, washed platelets were pre-incubated mitochondrial ROS targeted antagonists Mito-TEMPO, and then stimulated with different concentration AMA. The apoptosis associated indicators were detected by flow cytometry. **Results** AMA dose-dependently induces depolarization of  $\Delta\Psi_m$ , PS exposure, Caspase-3 activation, and the production of intracellular ROS and mitochondrial ROS, but AMA does not induce platelet activation. Mito-TEMPO effectively reduces the depolarization of  $\Delta\Psi_m$ , PS exposure and the production of mitochondrial ROS which induced by the AMA. **Conclusion** AMA can induce platelet apoptosis, and mitochondria ROS may play an important role in the platelets apoptosis induced by the AMA.

**Key words** platelets; apoptosis; antimycin A; mitochondria; reactive oxygen species

酶切后经测序鉴定。

**1.4 人 RunX2 真核表达载体的构建** 将上述 1 kb 左右的片段回收酶切后用 T4 DNA 连接酶链接于 pcDNA3.1 真核表达载体,链接产物做小规模细菌转化,PCR 及双酶切后经测序鉴定证实。

**1.5 pcDNA3.1-RunX2 瞬时转染 MCF-7 细胞**  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 90 mm 平皿,待贴壁后长至 70% 密度时进行转染 pcDNA 3.1-RunX2 质粒 10  $\mu$ g、脂质体 12  $\mu$ l 与无血清 opti-MEM 混匀后轻覆细胞,转染 6 h 后换成含 10% FBS 的 DMEM 培养 48 h,加入细胞蛋白裂解液 RIPA (97.5% PBS、1% NP40、0.5% 脱氧胆酸钠、0.1% SDS) 冰上裂解 30 min,4  $^{\circ}$ C 离心取上清液,提取总蛋白(10  $\mu$ g/组)。经 10% SDS-PAGE 胶分离后,电转(200 mA、120 min)至 PVDF 膜上。膜用 TBST (20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween 20) 封闭,3 h 后置于含抗 RunX2 抗体(1:1 000)的 TBST 中 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,再加入相应结合的二抗后与 ECL 发光检测剂结合显示结果。

**1.6 细胞生物学检测**

**1.6.1 MTT 法检测细胞活力** 将 pcDNA3.1-RunX2 真核表达质粒瞬时转染至 MCF-7 细胞中,促使细胞中的 RunX2 表达上调,通过 MTT 实验检测其细胞活力的变化,常规的消化、计数处于对数生长期的各实验组细胞,并将细胞接种于 96 孔板中,按照每孔 2 000 个细胞进行接种,每种细胞设置 5 个复孔。分别标记为 0、24、48 h,共 3 块板,将 96 孔板放入培养箱中,待细胞贴壁后,取 0 h 的 96 孔板,在避光条件下加入 MTT 溶液后继续孵育 4 h 后收取 0 h 的板,将上清液倒去,每孔加入 DMSO 溶解结晶,混匀,酶标仪检测 550 nm 处光密度(optical density, OD)值。第 2 天相同时间加 MTT,收板后测 OD 值,以此类推。每组实验均重复 3 次。

**1.6.2 细胞划痕实验** 通过细胞划痕实验检测其细胞移动能力的变化,取 6 孔板于生物安全柜内操作,用直尺在每孔底部至少划三条线作为标记,然后消化对数期生长的细胞,接种于 6 孔板内,每孔约  $3 \times 10^5$  个细胞。将 6 孔板放入细胞培养箱培养 24 h,待细胞达到 80% 以上的融合率时,将细胞置于生物安全柜内操作。用 20  $\mu$ l 白枪头垂直于 6 孔板横线划痕,至少划三道痕。用 PBS 轻洗去划下的细胞,于相差显微镜下拍照,记为 0 h。放入细胞培养箱中培养,每隔 24 h,在同一位置拍照,以观察细胞的移动情况。每组实验重复 3 次。

**2 结果**

**2.1 构建人 RunX2 真核表达载体** 首先用逆转录 PCR(RT-PCR)法得到 RunX2 的基因片段,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳发现一条 1 kb 左右的片段,见图 1。将上述 1 kb 左右的片段回收酶切后用 T4 DNA 连接酶链接于 pcDNA3.1 真核表达载体,链接产物做小规模细菌转化,PCR 及 EcoR I 和 Sac II 双酶切后经测序鉴定证实,见图 2。

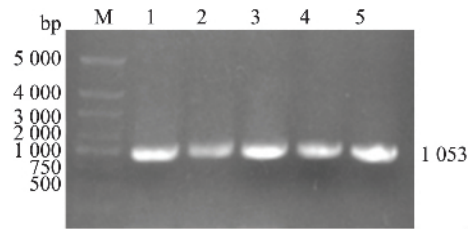


图 1 RunX2 片段 1% 琼脂糖凝胶电泳图  
M: DNA Marker( DL5 000); 1~5: 不同的 RunX2 片段

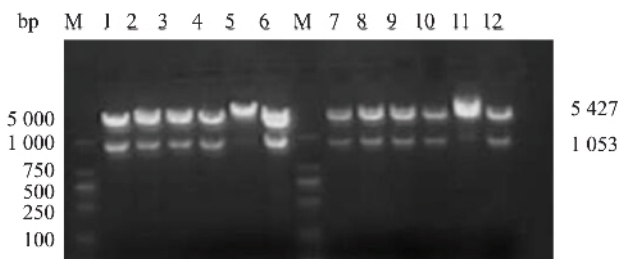


图 2 酶切鉴定图  
M: DNA Marker ( DL 5 000); 1、2、3、4、6、7、8、9、10、12: 阳性克隆的酶切鉴定; 5、11: 阴性克隆的酶切鉴定

**2.2 转染 pcDNA3.1-RunX2 的细胞高表达 RunX2**

pcDNA3.1-RunX2 瞬时转染至低表达 RunX2 的 MCF-7 细胞中,转染后 48 h Western blot 检测发现转染细胞中 RunX2 高表达,由图可以看出转染组中的 RunX2 蛋白表达高于未转染组。见图 3。

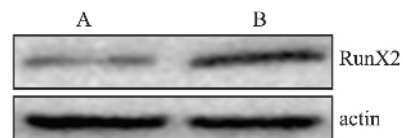


图 3 pcDNA3.1-RunX2 转染至 MCF-7 细胞后 Western blot 检测图  
A: 未转染组; B: 转染组

**2.3 RunX2 促进人乳腺癌细胞的活力及移动能力**

将构建好的 pcDNA3.1-RunX2 瞬时转染至 MCF-7 细胞中,转染 48 h 后通过 Western blot 检测其转染效率,见图 3。收集细胞,MTT 法检测其细胞活力发

现,与未转染组相比,转染组细胞活力明显增加。与未转染组相比,转染组增殖能力增加,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图4。通过划痕实验检测其移动能力发现,与未转染组相比,转染组的MCF-7细胞移动能力明显增加。与未转染组相比,24 h划痕内迁移细胞数目明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图5。

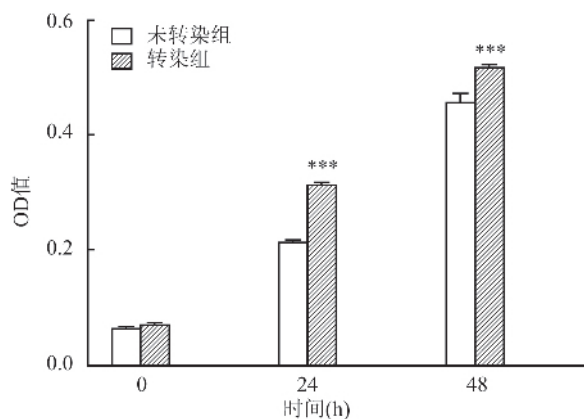


图4 MTT法检测细胞活力的变化  
与同一时间的未转染组比较: \*\*\*  $P < 0.001$

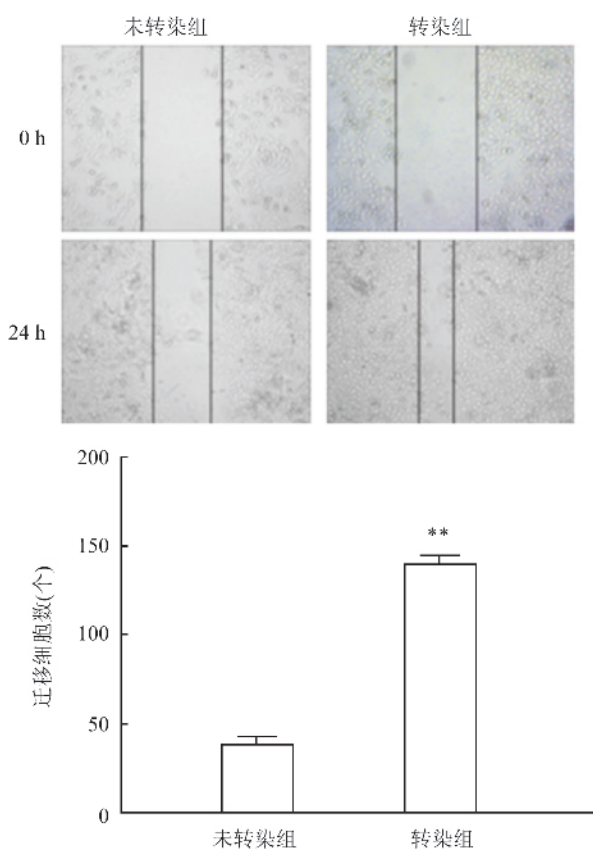


图5 细胞划痕实验检测细胞移动能力  
与未转染组比较: \*\*  $P < 0.01$

### 3 讨论

RunX2 不仅调节成骨细胞分化,而且与乳腺癌发生骨转移密切相关<sup>[3]</sup>。RunX2 通过调节血管生成相关基因的表达促发乳腺癌细胞发生骨转移。骨涎蛋白(BSP)与导管内转移性乳腺癌相关,可能在诱导乳腺癌细胞定向骨转移过程中发挥作用,骨桥蛋白(OPN)可以介导乳腺癌骨转移中肿瘤细胞与骨组织表面的连接,并且与骨转移中破骨细胞引发骨吸收活性增加相关。RunX2 是骨髓间质干细胞成骨分化和骨发育的重要转录因子,它通过促进溶骨作用、肿瘤血管新生等多个途径转移癌细胞的生长<sup>[4-6]</sup>。RunX2 已被证明在成骨与骨肉瘤的发生发展过程中起重要作用<sup>[7]</sup>。Runx2 还被报道在临床预后差的乳腺癌中高表达<sup>[8]</sup>。最近,McDonald et al<sup>[9]</sup>发现 Runx2 的高表达与雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、HER2 阴性乳腺癌显著相关,并且高表达 RunX2 的患者比阴性或低表达的患者存活率低。此外,在非小细胞肺癌患者中,较高的 RunX2 的表达与肿瘤的进展和转移显著相关。在上皮性卵巢癌中,多种与侵袭和转移有关的基因由于 RunX2 的敲除而被抑制。对乳腺癌的研究<sup>[10-13]</sup>显示,参与骨侵袭的几个基因,如血管内皮生长因子、基质金属蛋白酶(MMPs)、VEGF、OPN 和 BSP 都是通过 RunX2 调节的,表明这个转录因子可能有助于乳腺肿瘤骨转移。这与本实验中提到的 RunX2 沉默降低转移性乳腺癌细胞系 MB-231 细胞的迁移和侵袭能力一致。此外,RunX2 亦可调节 MMPs 家族中的其他基因,在 MDA-MB-231 中,利用小干扰 RNA 沉默 RunX2 表达可降低 MMP-9 的表达,并减弱癌细胞的侵袭能力,提示 RunX2 与乳腺癌转移密切相关<sup>[14]</sup>。

RunX2 在乳腺癌的侵袭转移中的作用机制仍存争议。但是,在 RunX2 所表达的 MDA-MB-231 细胞株中,以上骨细胞分化效应并未出现。研究<sup>[15]</sup>表明,在 MDA-MB-231 细胞株中,RunX2 调节 OPN 基因的表达,并可持续激活 BSP 使其表达异常,抑制 RunX2 的表达可导致 OPN 和 BSP 的表达明显下调,提示 RunX2 在乳腺癌转移中发挥着重要作用。多数学者认为,RunX2 能够调节一系列基因的转录进而影响乳腺癌细胞的侵袭能力,在乳腺癌发生骨转移的过程中起重要作用,且与其预后密切相关。

本研究构建的 RunX2 真核表达载体通过瞬时转染至乳腺癌细胞 MCF-7 中,并通过 Western blot 检测发现转染后的细胞高表达 RunX2,说明成功构

建了 pcDNA3.1-RunX2 真核表达载体。MTT 实验证实过表达 RunX2 促进了细胞增殖,但是划痕试验中,划痕愈合是因为增殖促进划痕愈合还是因为过表达 RunX2 促进细胞迁移尚未明确,在后续的实验中将通过 Transwell 实验进一步验证。

### 参考文献

- [1] Cohen M M Jr. Perspectives on RUNX genes: an update[J]. *Am J Med Genet Part A*, 2009, 149A: 2629-46.
- [2] Nagaraja G M, Othman M, Fox B P, et al. Gene expression signatures and biomarkers of noninvasive and invasive breast cancer cells: comprehensive profiles by representational difference analysis, microarrays and proteomics[J]. *Oncogene*, 2006, 25(16): 2328-38.
- [3] Ching N O, Frenkel B. The RUNX family in breast cancer: relationships with estrogen signaling[J]. *Oncogene*, 2013, 32(17): 2121-30.
- [4] Gordon J A, Sodek J, Hunter G K, et al. Bone sialoprotein stimulates focal adhesion-related signaling pathways: role in migration and survival of breast and prostate cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(6): 1118-28.
- [5] Dougall W C. Molecular pathways: osteoclast-dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(2): 326-35.
- [6] Koch U, Krause M, Baumann M, et al. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures: radiation oncology perspective[J]. *Semin Cancer Biol* 2010, 20(2): 116-24.
- [7] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. *Osfr/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation[J]. *Cell*, 1997, 89(5): 747-54.
- [8] Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, et al. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2670-5.
- [9] McDonald L, Ferrari N, Terry A, et al. RunX2 correlates with subtype-specific breast cancer in a human tissue microarray, and ectopic expression of Runx2 perturbs differentiation in the mouse mammary gland[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(5): 525-34.
- [10] Li H, Zhou R J, Zhang G Q, et al. Clinical significance of RUNX2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year follow-up study[J]. *Tumour Biol* 2013, 34(3): 1807-12.
- [11] Li W, Xu S, Lin S, et al. Over expression of runt-related transcription factor-2 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 456-534.
- [12] Pratap J, Lian J B, Javed A, et al. Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell in interactions with bone[J]. *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25(4): 589-600.
- [13] Pratap J, Wixted J J, Gaur T, et al. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(19): 7795-802.
- [14] Leong D T, Lim J, Goh X, et al. Cancer-related ectopic expression of the bone-related transcription factor RUNX2 in non-osseous metastatic tumor cells is linked to cell proliferation and motility[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(5): R89.
- [15] Onodera Y, Miki Y, Suzuki T, et al. Runx2 in human breast carcinoma: its potential roles in cancer progression[J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(12): 2670-5.

## Construction of RunX2 eukaryotic expression vector and study the proliferations and migrations effective of RunX2 on breast cancer cells

Zhao Ming, Fan Chulin, Guo Qiang et al

(Dept of Pathophysiology Anhui Medical University Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the biology effect of RunX2 gene after constructing the eukaryotic expression vector of human RunX2 in breast cancer cells. **Methods** By the recombinant techniques such as PCR amplification, digestion, ligation, the human RunX2 gene was inserted into the eukaryotic expression vector of pcDNA3.1, and then it was identified by restriction enzyme digestion, RT-PCR, sequencing. Eukaryotic expression vector of human RunX2 gene was transiently transfected into MCF-7 cells. Western blot analysis was applied to detect the expression of RunX2 protein in breast cancer cells MCF-7; MTT assay and wound healing assay were used to detect the cells proliferation and invasion of MCF-7. **Results** Our result showed that the eukaryotic expression vector of RunX2 was highly expressed RunX2 protein in MCF-7 cells, the cell proliferation and migration abilities were enhanced in MCF-7 cells with high expression of RunX2 protein. **Conclusion** RunX2 constructs eukaryotic expression vector and promotes malignant behavior of breast cancer cells.

**Key words** RunX2; breast cancer