

eIF3g差异表达的乳腺癌细胞模型的建立

李春春 陈丽红 叶景佳 张行 曹江*

(浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心, 杭州 310009)

摘要 真核翻译起始因子3的亚单位eIF3g在一些多药耐药肿瘤细胞中表达上调。背景相近而eIF3g表达有明显差异的肿瘤细胞模型的建立对阐明其作用及机制有重要意义。该研究利用四环素调控的Tet-On Advanced诱导表达系统, 分别构建了可诱导过表达外源性eIF3g和表达eIF3g人工microRNA的载体, 并包装为相应的慢病毒, 将慢病毒分别感染乳腺癌细胞Bcap37, 经400 $\mu\text{g/mL}$ G418和0.4 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin筛选后, 分别获得稳定转染的乳腺癌细胞克隆Bcap37/Tet-On-eIF3g和Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR。将这些细胞克隆分别在1 $\mu\text{g/mL}$ DOX的作用下诱导培养72 h, 用Western blot检测eIF3g的表达。结果显示, Bcap37/Tet-On-eIF3g中eIF3g表达明显增加, Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR中eIF3g表达抑制明显。该工作成功建立了可诱导外源性eIF3g过表达和抑制内源性eIF3g表达的乳腺癌细胞模型, 为进一步的研究打下了基础。

关键词 eIF3g; 差异表达; 乳腺癌; 细胞模型

eIF3g是真核细胞翻译起始因子3(eukaryotic translation initiation factor 3, eIF3)的一个亚基^[1]。有研究表明, 并非所有目前已发现的eIF3的13个亚基都是其蛋白翻译起始功能所必需的^[2], eIF3g(又称eIF3s4、p42/44)不是eIF3的功能核心成员, 但在翻译终止后的再起始中为必需^[3], 在结合有核帽结合蛋白的复合物(nuclear cap-binding protein complex) CBP80/20的mRNA翻译中也需要有eIF3g参与^[4]。

从已有的研究报道可以知道, 在肿瘤细胞中, eIF3的各个组成亚基既可以从组成完整的eIF3的角度在蛋白质合成的调控中发挥重要作用^[5], 也可以通过各种方式发挥其他方面的作用^[6]。我们发现耐药肿瘤细胞中eIF3g的表达明显升高^[7], 为了进一步研究eIF3g对肿瘤细胞的作用和分子机制, 需要建立背景相对一致而eIF3g表达有差异的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌种与质粒 人乳腺癌细胞Bcap37、慢病毒包装用293T细胞、大肠杆菌DH5 α (均由浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心保存); 带有eIF3g全长cDNA的质粒pGEM-T Easy-eIF3g(由本课题组构建保存^[8])。

1.1.2 主要试剂 RPMI1640培养液、DMEM高糖培养液、胎牛血清(FBS)为Hyclone公司产品; 无

四环素胎牛血清(Tet System Approved FBS)、Lenti-X™ Tet-On Advanced Inducible Expression System均为Clontech公司产品; 0.25%的胰酶-EDTA为北京索来宝科技有限公司产品; Puromycin、Polybrene、DMSO、强力霉素(DOX)均为Sigma-Aldrich公司产品; G418为Amresco公司产品; Gel Extraction Kit、Plasmid Midi Kit均为QIAGEN公司产品; pGEM-T Easy Vector试剂盒、GoTaq DNA聚合酶均为Promega公司产品; 1 Kb Plus DNA Ladder、琼脂糖等为Invitrogen公司产品; 兔抗人eIF3g抗体等为Bethyl Laboratories公司产品; HRP-羊抗兔IgG抗体购自中杉金桥公司; HRP-GAPDH抗体购自康成生物公司; 各种限制性内切酶及工具酶均为New England Biolabs公司产品; PVDF膜、DC蛋白定量试剂盒为Bio-Rad公司产品; Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate化学发光底物为Millipore公司产品。

1.2 方法

1.2.1 eIF3g过表达载体的构建 用EcoR I酶切将eIF3g cDNA从pGEM-T Easy-eIF3g上切下, 用EcoR I将pLVX-Tight-Puro载体酶切后用碱性磷酸酶处理, 将二者回收纯化后16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜, 转化大肠杆菌DH5 α , 提取转化子质粒, 用EcoR I酶切鉴定是否有

收稿日期: 2012-09-17 接受日期: 2012-09-26

国家自然科学基金(No.81172516)资助项目

*通讯作者。Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn

片段插入,用*Pst* I酶切进一步确定片段插入方向。连接正确者命名为pLVX-Tight-Puro-eIF3g。

1.2.2 针对人eIF3g的人工microRNA前体的克隆及表达载体的构建 利用PCR法合成5'端和3'端分别带有*Bgl* II和*Bam*H I酶切位点的人工microRNA前体的工作参考文献[9]进行,经纯化回收的PCR产物与pGEM-T Easy载体连接于16 °C过夜,转化后提取转化子质粒,用*Bam*H I和*Bgl* II双酶切鉴定,有142 bp插入片段的阳性克隆进行DNA测序。将测序证实正确的人工microRNA前体序列进行再次串联连接,得到3个串联连接的人工microRNA前体序列,插入pLVX-Tight-Puro载体的*Bam*H I位点,转化后提取转化子质粒,用*Bam*H I和*Xho* I酶切鉴定,选取正确的克隆,命名为pLVX-Tight-Puro-3×eIF3g-miR。

1.2.3 慢病毒包装 包装用293T细胞培养在含有10%FBS的高糖DMEM中,按 8×10^6 /皿接种于10 cm培养皿中,培养过夜,用于转染。转染采用Lenti-X™ Tet-On Advanced Inducible Expression System,按照说明书上的要求,分别配制质粒pLVX-Tet-on advanced、pLVX-Tight-Puro-eIF3g、pLVX-Tight-Puro-3×eIF3g-miR三种转染体系,并分别将这三种转染体系滴加到293T细胞培养皿中以包装三种慢病毒,轻轻混匀,37 °C,5% CO₂培养箱中培养6 h后更换培养液,继续培养48 h后,500×g离心10 min后收集上清,用0.45 μm过滤器过滤后使用截留分子量100 kDa的超滤管进行4 000×g、4 °C离心浓缩,浓缩后的病毒分装后保存于-80 °C冰箱。

1.2.4 Bcap37细胞的感染 Bcap37细胞培养在含10%无四环素的胎牛血清的RPMI1640培养液中,取生长状态良好的Bcap37细胞以每孔 6×10^5 接种于6孔板中,培养16~18 h。设立2个实验组,1个对照组。实验组1加入pLVX-Tet-on Advanced和pLVX-Tight-Puro-eIF3g两种慢病毒,实验组2加入pLVX-Tet-on Advanced和pLVX-Tight-Puro-3×eIF3g-miR两种慢病毒,对照组不加病毒。以400 μg/mL G418和0.4 μg/mL Puromycin共同筛选具有抗性的稳定转染克隆。稳定转染eIF3g过表达载体的细胞命名为Bcap37/Tet-on-eIF3g,稳定转染eIF3g人工microRNA表达载体的细胞命名为Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR。

1.2.5 Western blot检测eIF3g表达 将筛选出的Bcap37/Tet-on-eIF3g细胞和Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR细胞分别接种到6孔板中,同一克隆来源细胞分为

诱导(1 μg/mL DOX)和不诱导两种情况,72 h后收集细胞,冰上裂解于三去污裂解液(0.5 mol/L Tris-HCL(pH8.0), 0.15 mol/L NaCl, 0.2 g/L叠氮钠, 1 g/L SDS, 100 mg/L苯甲基磺酰氟(PMSF), 1 mg/L Aprotinin, 1 mL/L Nonidet P-40(NP-40), 5 g/L去氧胆酸钠), 13 000 r/min, 4 °C离心20 min,上清液用DC蛋白定量试剂盒定量后,各取5 μg总蛋白进行10% SDS-PAGE电泳并转移到PVDF膜上,3% BSA中室温封闭1 h,兔抗人eIF3g一抗(1:10 000)于4 °C结合过夜, TBST洗膜3次后加入有HRP标记的山羊抗兔的二抗(1:5 000)室温结合1 h, TBST洗涤后,加入化学发光底物显带。内参检测使用有HRP标记的GAPDH抗体(1:5 000)室温结合1 h,同样在TBST洗涤后,加入化学发光底物显带,使用Quantity One分析软件(Bio-Rad Laboratories)对条带进行灰度计算,分析各样品eIF3g相对表达(eIF3g灰度值/GAPDH灰度值)及DOX诱导后eIF3g表达变化。

2 结果

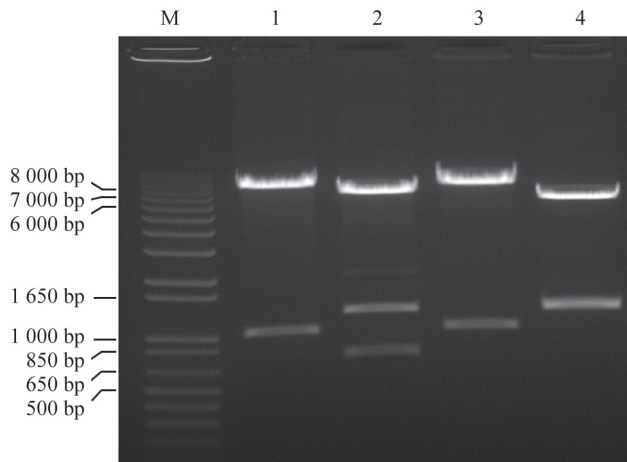
2.1 eIF3g诱导表达载体的构建与鉴定

pLVX-Tight-Puro与目的基因片段eIF3g连接后,用*Eco*R I酶切和*Pst* I酶切两种酶切方法鉴定。用*Eco*R I酶切可得到大小为969 bp和7 790 bp的两条带,表明有片段插入。用*Pst* I单酶切鉴定插入片段方向,正向插入可得到737 bp、1 235 bp、6 807 bp的三条带,反向插入得到大小为1 235 bp、1 284 bp、6 260 bp的三条带(1 235 bp与1 284 bp片段大小接近,基本重合),因此可以确定插入片段的方向。图1结果表明,1号克隆为正向插入,目的基因片段eIF3g成功插入到pLVX-Tight-Puro载体上,2号克隆为反向插入。

2.2 eIF3g-microRNA诱导表达载体的构建

利用两轮PCR扩增得到约142 bp产物,将其连接到pGEM-T Easy载体后,用*Bam*H I和*Bgl* II双酶切鉴定可切出约142 bp的片段(图2)。阳性克隆经测序,序列为:5'-AGA TCT GAT CCA AGA AGG TAT ATT GCT GTT GAC AGT GAG CGC GGT CAT CAA CGG AAA CAT AAA TAG TGA AGC CAC AGA TGT ATT TAT GTT TCC GTT GAT GAC CTT GCC TAC TGC CTC GGA CTT CAA GGG CTA CGA TGG ATC C-3',与设计序列完全一致。带有3个串联的人工microRNA前体的载体pGEM-T Easy用*Bam*H I和*Bgl* II双酶切进行鉴定,得到414 bp、3 015 bp的两条带(图2)。

pLVX-Tight-Puro-3×eIF3g-miR重组质粒经*Xho* I和*Bam*H I双酶切及*Bgl* II单酶切两种方法鉴定。经*Xho* I和*Bam*H I双酶切得到两条带,反向插入得到大小为

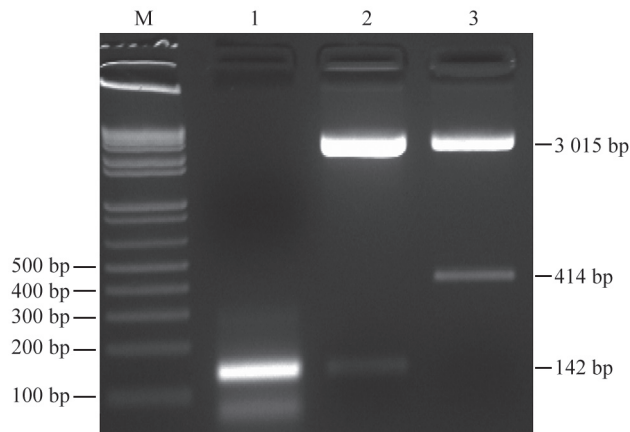


M: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: 1号克隆*Eco*R I酶切; 2: 1号克隆*Pst* I酶切; 3: 2号克隆*Eco*R I酶切; 4: 2号克隆*Pst* I酶切。

M: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: plasmid of clone 1 digested by *Eco*R I; 2: plasmid of clone 1 digested by *Pst* I; 3: plasmid of clone 2 digested by *Eco*R I; 4: plasmid of clone 2 digested by *Pst* I.

图1 eIF3g诱导表达载体的酶切鉴定

Fig.1 Characterization of eIF3g expression vectors by restriction endonuclease digestion

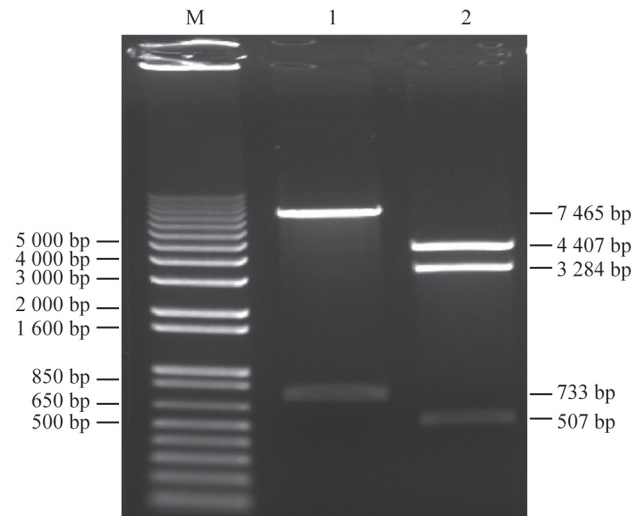


M: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: 人工microRNA前体PCR产物; 2: pGEM-T Easy-eIF3g-miR *Bam*H I和*Bgl* II双酶切; 3: pGEM-T Easy-3×eIF3g-miR *Bam*H I和*Bgl* II双酶切。

M: 1 Kb Plus DNA ladder; 1: PCR product of artificial microRNA precursor; 2: pGEM-T Easy-eIF3g-miR digested by *Bam*H I and *Bgl* II; 3: pGEM-T Easy-3×eIF3g-miR digested by *Bam*H I and *Bgl* II.

图2 针对人eIF3g的人工microRNA前体的克隆的酶切鉴定
Fig.2 Cloning of artificial microRNA precursor targeting human eIF3g by restriction endonuclease digestion

325 bp、7 873 bp的两条带,正向插入可得到733 bp、7 465 bp的两条带;经*Bgl* II单酶切,得到507 bp、3 284 bp、4 407 bp的三条带,从图3的酶切结果可以看出,载体构建成功。



M: 1 Kb Plus DNA Ladder; 1: pLVX-Tight-puro-3×eIF3g-miR的*Xho* I和*Bam*H I双酶切; 2: pLVX-Tight-puro-3×eIF3g-miR的*Bgl* II酶切。

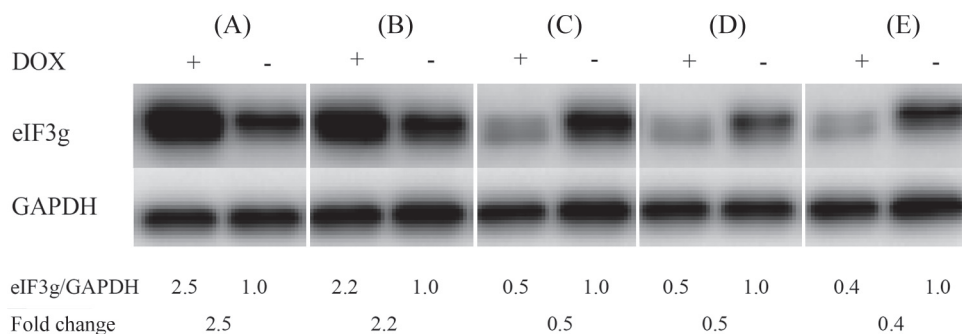
M: 1 Kb plus DNA Ladder; 1: pLVX-Tight-puro-3×eIF3g-miR digested by *Xho* I and *Bam*H I; 2: pLVX-Tight-puro-3×eIF3g-miR digested by *Bgl* II.

图3 eIF3g人工microRNA诱导表达载体的酶切鉴定

Fig.3 Characterization of expression vector of artificial microRNA targeting eIF3g by restriction endonuclease digestion

2.3 Bcap37/Tet-on-eIF3g与Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR细胞株的鉴定

提取经DOX诱导的与未经DOX诱导的Bcap37/Tet-on-eIF3g与Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR的总蛋白,利用Western blot检测其eIF3g表达水平,结果见图4。从图中可以看出,Bcap37/Tet-on-eIF3g细胞在1 μg/mL DOX诱导培养72 h后,eIF3g的表达水平明显比未经诱导的高,其中A克隆诱导到达效率(升高约2.5倍)略高于B克隆(升高约2.2倍);Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR在1 μg/mL DOX诱导培养72 h后,eIF3g的表达水平明显比未经诱导的低,其中E克隆诱导表达的人工microRNA对eIF3g表达的抑制效率(降至原表达水平的约0.4倍)高于C克隆和D克隆(均降至原表达水平的约0.5倍)。这表明可诱导eIF3g表达上调和可诱导eIF3g表达下调的细胞模型已经建立,可供进一步研究使用。



A、B: Bcap37/Tet-on-eIF3g细胞克隆, C-E: Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR细胞克隆。

A,B: Bcap37/Tet-on-eIF3g cell clones; C-E: Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR cell clones.

图4 不同细胞克隆的eIF3g的表达

Fig.4 eIF3g expression of different cell clones

3 讨论

eIF3g是eIF3的一个亚基,我们在利用蛋白质组学方法研究肿瘤细胞多药耐药表达相关蛋白的工作中发现,多药耐药细胞K562/ADR和敏感细胞K562相比eIF3g的表达差异极其明显^[7,10],因此推测eIF3g可能和肿瘤的多药耐药具有相关性。目前,人们对eIF3g的认识仅限于其在蛋白翻译起始因子3中的作用^[11],与肿瘤的关系尚无人研究,但是从对eIF3的其他多个亚基在各种肿瘤中的表达有增高或降低等异常现象及相关作用研究来看,eIF3的众多亚基与肿瘤的发生、进展是密切相关的^[6]。eIF3a在癌组织中表达明显高于正常对照组织^[12-13],在肠癌中也异常过度表达;eIF3e的表达水平可以作为评价早期非小细胞型肺癌肿瘤预后的独立指标^[14];eIF3f在胰腺肿瘤细胞和黑色素瘤细胞中都有降低的现象^[15-16],下调eIF3f的表达可使肿瘤细胞凋亡减少^[17];eIF3h和MYC共扩增可以增强非小细胞肺癌细胞对化疗药物吉非替尼的敏感性^[18];eIF3i的过表达能促进mTOR(mammalian target of rapamycin,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)的信号传导,从而加快肿瘤细胞的生长^[19]。因此,研究eIF3g与肿瘤细胞的关系具有重要意义。

研究一个基因编码的蛋白在细胞中的作用,一般是通过对一些背景相似但目的基因表达有明显差异的细胞进行分析来了解,通常可以在细胞中过量表达该基因产物或抑制该基因表达来研究其对细胞的影响。我们曾利用哺乳动物组成型表达载体pcDNA3.1(+进行了eIF3g的过表达和表达抑制实验,结果过表达eIF3g的细胞能够筛选出稳定转染

细胞克隆,其生长与未转染细胞相比明显加快;而eIF3g表达受抑制的实验无法得到稳定转染克隆,分析其原因可能是eIF3g对细胞生长来说是一个极其重要的基因,抑制其表达将使细胞无法生长。采用诱导型表达载体将能避免这一问题。

四环素基因表达调控系统(Tet系统)是一个经典的、常用的外源基因诱导表达系统,能够通过培养基中加入或者去掉四环素来调控目的基因的表达,分为Tet激活系统(Tet on)和Tet抑制系统(Tet off)。Tet on系统是一个高效、低毒、具有严密开关功能的基因调控系统。该系统包括了四环素控制的转录激活因子rtTA和四环素反应性元件TRE,将目的基因构建在TRE下游,在有四环素存在时rtTA可与TRE结合启动下游目的基因的转录,而当不存在四环素时,rtTA不能与TRE结合,下游目的基因也就不表达,所以Tet系统可应用于具有细胞毒性的基因研究及肿瘤的基因治疗研究中^[20]。

在本研究中,我们使用基于四环素调控的新一代的Tet-On Advanced诱导表达系统,由调控载体(pLVX-Tet-On)和反应载体(pLVX-Tight-Puro)组成。我们在反应载体pLVX-Tight-Puro分别插入目的基因eIF3g和eIF3g-microRNA。pLVX-Tet-On载体表达四环素调控的反式激活因子rtTA-Advanced,反应载体上的反应元件包含P_{Tight},P_{Tight}由经过改良的Tet反应元件(TRE_{mod})连接到经过改良的最小的CMV启动子(PminCMVΔ)而组成,可以控制下游目的基因的表达。当DOX存在时,rtTA-Advanced结合到P_{Tight},激活下游目的基因eIF3g和eIF3g-microRNA的表达;当DOX不存在时,rtTA-Advanced就不能结合到P_{Tight},

下游目的基因也就不能表达。Tet-On Advanced 诱导表达系统在以下几个方面优于其他可诱导真核表达系统。首先,它能够极其严密地调控目的基因的表达。在本实验中,我们配合使用无四环素的胎牛血清,最大程度地防止泄漏表达的发生。在细胞的感染与筛选过程中,未加入DOX诱导,就可以使eIF3g的人工microRNA不表达,细胞可以正常生长,如果有人工microRNA分子表达,影响细胞的蛋白合成而使细胞不能正常生长。第二,具有高度特异性表达。rtTA-Advanced与P_{Tight}的结合是高度特异的,不会激活细胞中除目的基因以外的其他基因的表达。第三,目的基因具有较高的绝对表达水平。Tet系统的最大表达水平可高于CMV启动子或其他启动子。第四,定位效应强。DOX能够很好地特异地与反式激活因子结合,并具有较强的诱导效应。

从本研究的结果来看,我们利用这一诱导表达系统得到的可诱导外源性eIF3g过表达和抑制内源性eIF3g表达的两种乳腺癌细胞,诱导表达效果均较理想:稳定转染诱导型过表达eIF3g和抑制eIF3g表达载体的两种细胞的多个克隆,其细胞内的eIF3g在蛋白水平的表达在诱导前后均相差两倍以上。这两种细胞模型的成功建立,为进一步研究eIF3g与肿瘤细胞的关系及相关的分子机制打下了基础。

参考文献 (References)

- 1 Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11(2): 113-27.
- 2 Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J* 2007; 26(14): 3373-83.
- 3 Cuchalová L, Kouba T, Herrmannová A, Dányi I, Chiu WL, Valásek L. The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning. *Mol Cell Biol* 2010; 30(19): 4671-86.
- 4 Choe J, Oh N, Park S, Lee YK, Song OK, Locker N, *et al.* Translation initiation on mRNAs bound by nuclear cap-binding protein complex CBP80/20 requires interaction between CBP80/20-dependent translation initiation factor and eukaryotic translation initiation factor 3g. *J Biol Chem* 2012; 287(22): 18500-9.
- 5 Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(4): 254-66.
- 6 褚丽莎, 宋向阳, 曹江. 真核翻译起始因子3与肿瘤. *医学分子生物学杂志*(Chu Lisha, Song Xiangyang, Cao Jiang. *Eukaryotic translation initiation factor 3 and tumor. Journal of Medical Molecular Biology*) 2010; 7(1): 86-9.
- 7 Zhu F, Wang Y, Zeng S, Fu X, Wang L, Cao J. Involvement of annexin A1 in multidrug resistance of K562/ADR cells identified by the proteomic study. *OMICS* 2009; 13(6): 467-76.
- 8 魏群, 朱逢佳, 王以, 陈萍, 王林波, 曹江. (His)6-eIF3s4融合蛋白在人乳腺癌细胞Bcap37中的表达. *细胞与分子免疫学杂志*(Wei Qun, Zhu Fengjia, Wang Yi, Chen Ping, Wang Linbo, Cao Jiang. *Expression of (His)6-eIF3s4 fusion protein in human breast cancer cell Bcap37. Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2007; 23(7): 627-32.
- 9 褚丽莎, 韩娜, 宋向阳, 曹江. 诱导型eIF3g人工microRNA表达载体的构建及应用. *细胞与分子免疫学杂志*(Chu Lisha, Han Na, Song Xiangyang, Cao Jiang. *Construction and application of inducible artificial microRNA expression vector targeting eIF3g gene. Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2011; 27(2): 135-8.
- 10 王以, 曹江, 曾苏. K562耐药细胞的建立及相关蛋白表达改变的研究. *实验生物学报*(Wang Yi, Cao Jiang, Zeng Su. *Development of a K562 multidrug-resistant cell line and study on proteins with altered expression. Acta Biologicae Experimentalis Sinica*) 2003; 36(5): 342-6.
- 11 Herrmannová A, Daujotyte D, Yang JC, Cuchalová L, Gorrec F, Wagner S, *et al.* Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a state and proper translation pre-initiation complex assembly. *Nucl Acids Res* 2012; 40(5): 2294-311.
- 12 Bachmann F, Bänziger R, Burger MM. Cloning of a novel protein overexpressed in human mammary carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57(5): 988-94.
- 13 Haybaeck J, O'Connor T, Spilka R, Spizzo G, Ensinger Ch, Mikuz G, *et al.* Overexpression of p150, a part of the large subunit of the eukaryotic translation initiation factor 3, in colon cancer. *Anticancer Res* 2010; 30(4): 1047-55.
- 14 Buttitta F, Martella C, Barassi F, Felicioni L, Salvatore S, Rosini S, *et al.* Int6 expression can predict survival in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005; 11(9): 3198-204.
- 15 Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Cunningham JT, Nelson MA, *et al.* Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Mol Carcinog* 2008; 47(3): 235-44.
- 16 Doldan A, Chandramouli A, Shanas R, Bhattacharyya A, Leong SP, Nelson MA, *et al.* Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. *Mol Carcinog* 2008; 47(10): 806-13.
- 17 Shi J, Kahle A, Hershey JW, Honchak BM, Warneke JA, Leong SP, *et al.* Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f deregulates translation and apoptosis in tumor cells. *Oncogene* 2006; 25(35): 4923-36.
- 18 Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Rossi E, Gajapathy S, Valente M, Drabkin H, *et al.* MYC and eIF3H coamplification significantly improve response and survival of non-small cell lung cancer patients (NSCLC) treated with gefitinib. *J Thorac Oncol* 2009; 4(4): 472-8.
- 19 Ahlemann M, Zeidler R, Lang S, Mack B, Münz M, Gires O. Carcinoma-associated eIF3i overexpression facilitates mTOR-dependent growth transformation. *Mol Carcinog* 2006; 45(12): 957-67.
- 20 Peng J, Jordan VC. Expression of estrogen receptor alpha with a Tetoff adenoviral system induces G₀/G₁ cell cycle arrest in SKBr3 breast cancer cells. *Int J Oncol* 2010; 36(2): 451-8.

Establishment of Breast Cancer Cell Models with Inducible Differential eIF3g Expressions

Li Chunchun, Chen Lihong, Ye Jingjia, Zhang Xing, Cao Jiang*

(Clinical Research Center, the 2nd Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract eIF3g, one of the subunits of eukaryotic translation initiation factor 3 complex, is over expressed in some multidrug resistant cancer cells. Establishment of cancer cell models with similar background but significantly different expression patterns of eIF3g is important for elucidating its roles and mechanisms. The tetracycline-inducible expression system Tet-On Advanced was used in this work. Vectors with cDNA of eIF3g full coding region and artificial microRNA targeting eIF3g were constructed and packed into recombinant lentiviruses and used to infect human breast cancer cell Bcap37. Stably-transfected clones were obtained after co-selection by 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 and 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin, namely Bcap37/Tet-On-eIF3g and Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR, respectively. Western blot was used to examine the expression of eIF3g in these clones before and after induction with doxycycline (DOX). The results showed that DOX treatment could significantly up-regulate the expression of eIF3g in Bcap37/Tet-On-eIF3g cells and down-regulate the expression of eIF3g in Bcap37/Tet-On-eIF3gmiR cells. Breast cancer cell models with inducible differential eIF3g expression were therefore established, and this provides the basis for further investigation on eIF3g.

Key words eIF3g; differential expression; breast cancer; cell model

Received: September 17, 2012 Accepted: September 26, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81172516)

*Corresponding author. Tel: 86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn