文章编号:1000-5404(2006)05-0465-04

论著

重组人源MPG基因真核表达载体构建及转染非小细胞肺癌多药耐药细胞的研究

余时沧,钱桂生,黄桂君,李玉英,陆卫忠,陈维中,李 瑾 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 构建人N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶(N-methylpurine DNA glycosylase, MPG)基因真核表达载体,并研究其在稳定转染的人非小细胞肺癌多药耐药细胞中的表达情况。**方法** 应用分子克隆技术构建pCMV-Script/MPG重组真核表达载体;应用脂质体介导的基因转染技术将其导入人非小细胞肺癌多药耐药细胞株A549/CDDP内;应用G418筛选稳定表达的转染细胞;应用PCR检测pCMV-Script载体上的NEO^r基因,应用RT-PCR及Western blot检测MPG基因的表达。**结果** 构建产物经限制性酶切分析及基因序列测定证实为pCMV-Script/MPG重组表达载体;转染pCMV-Script/MPG载体组(MP组)及转染pCMV-Script载体组(P组)细胞内检测到NEO^r基因,未转染组(C组)则未检测到;MP组细胞内MPG mRNA水平较P组及C组细胞显著增高($P<0.01$);MP组细胞内MPG蛋白质水平较P组及C组细胞显著增高($P<0.01$)。**结论** 成功地构建了人MPG基因表达载体,并在人非小细胞肺癌多药耐药细胞A549/CDDP获得了稳定、高效的表达。

关键词:N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶;载体;基因表达;肺癌;多药耐药
中图法分类号:R394-33;R730.59;R734.2 **文献标识码**:A

Construction of human MPG eukaryotic expression vector and expression in human non small cell lung cancer multidrug resistance cell line

YU Shi-cang, QIAN Gui-sheng, HUANG Gui-jun, LI Yu-ying, LU Wei-zhong, CHEN Wei-zhong, LI Jin (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct human N-methylpurine DNA glycosylase (MPG) eukaryotic expression vector and explore its expression levels in stable transfected human non small cell lung cancer multidrug resistance cell line. **Methods** Recombinant eukaryotic expression vector pCMV-Script/MPG was constructed by moleculer cloning technique, then transfected into human non small cell lung cancer multidrug resistance cell line A549/CDDP by Lipofectamine 2000. In the stable transfected cells which were screened out by G418, NEO^r gene on pCMV-Script vector was detected by PCR and the expression levels of MPG were determined by RT-PCR and Western blotting. **Results** The MPG eukaryotic expression vector was manifested by restriction endonuclease digestion and gene sequencing. The PCR product of NEO^r gene was detected in cells transfected with pCMV-Script/MPG vector or pCMV-Script vector. The mRNA and level of MPG was higher in cells transfected with pCMV-Script/MPG vector (5.11 ± 0.1) than that in cells transfected with pCMV-Script vector (2.02 ± 0.08) and without transfection (2.00 ± 0.2) ($P<0.01$), so did the protein level of MPG. **Conclusion** Human MPG eukaryotic expression vector was constructed successfully and expressed in a stable and high efficiency manner in human non small cell lung cancer multidrug resistance cell line A549/CDDP.

Key words: N-methylpurine DNA glycosylase; vector; gene expression; lung cancer; multidrug resistance

化疗是肺癌综合治疗的重要手段之一,但多药耐药则是限制化疗效果提高的一个重要因素。近年来,一系列研究表明,肺癌的化疗耐药,尤其是各种直接破坏DNA的化疗药物(铂类、环磷酰胺、异环磷酰胺、氮芥等)所导致的耐药,同DNA损伤后修复增强密切相关[1-4]。从干扰肺癌细胞DNA损伤修复出发,从而逆转肺癌化疗多药耐药,是一种可行的策略。碱基切除

作者简介:余时沧(1973-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事肺癌耐药相关方面的研究。电话:(023)66689108, E-mail:yushicang@163.com
通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603, E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-07-12;修回日期:2005-12-11

修复(base excision repair, BER)途径是哺乳动物细胞重要的DNA损伤修复机制,包括受损碱基的切除和正确碱基的连接两个主要过程,正常情况下两个过程处于动态平衡中,如果切除过程的活性超过连接过程,将在DNA链上留下许多脱碱基位点,引起单链或双链断裂[5-7]。N-甲基化嘌呤DNA糖基化酶(N-methylpurine DNA glycosylase,MPG)是该修复途径的启动酶,负责识别并将受损的碱基从DNA链上切除,而肺癌耐药细胞在化疗药物的反复作用下,会导致受损碱基的累积,这将为MPG提供更多的切割位点。因此,如果能在肺癌多药耐药细胞内外源性地表达过量的MPG,将可能在DNA链上形成许多不能及时封闭的缺口,导致DNA链断裂,从而发生DNA损伤诱导的细胞凋亡(DNA damage induced apoptosis,DDIA)[8]。本研究拟构建人MPG重组真核表达载体并转染人非小细胞肺癌多药耐药细胞系A549/CDDP,以期通过在肺癌耐药细胞内过度表达MPG,来达到打破BER途径切割与连接之间平衡的目的,从而诱导肺癌耐药细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 非小细胞肺癌多药耐药细胞系A549/CDDP为我所前期诱导成功[9]。细胞于RMPI1640培养基(Hyclone公司,美国)中,内含10%小牛血清(Gibco公司,美国),及青霉素100 U/ml,链霉素100 U/ml,顺铂2 μg/ml,置37 ℃恒温,5% CO_2,95%空气孵箱内培养。

1.1.2 载体及cDNA 真核表达载体pCMV-Sript及专用宿主菌XL1-Blue MRF'购自美国Stratagene公司。装载有人MPG基因cDNA全长的pOTB7质粒购自美国典型培养物保藏中心(GenBank编号:BC014991)。

1.1.3 主要试剂 总DNA、RNA抽提试剂Tripure购自瑞士Roche公司,逆转录酶、RNA酶抑制剂、随机引物、T_4 DNA连接酶、质粒小量抽提试剂盒、质粒中量制备试剂盒购自美国Promega公司,NEO^r、MPG及GAPDH扩增引物由上海基康公司合成,Ex*Taq*酶、dNTP、限制性内切酶*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ购自大连TaKaRa公司,DNA凝胶回收试剂盒购自北京博大泰克公司,Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司,G418购自美国Gibco公司,Opti-MEM培养基购自美国Life Technologies公司,琼脂糖购自西班牙Biowest公司,RIPA裂解液购自上海生工公司,山羊抗人MPG多克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司,HRP标记兔抗山羊lgG、封闭用兔血清、DAB显色试剂盒均购自武汉博士德公司,λDNA(*Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切)Marker、SD012Marker购自北京鼎国公司。低分子量蛋白质Marker购自中国科学院上海生物化学所。其余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 构建人MPG基因表达载体(pCMV-Script/MPG)

1.2.1.1 人MPG基因cDNA片段的获得 复苏装载pOTB7质粒(人MPG基因cDNA全长连于*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ之间)的载体菌,抽提质粒,以*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切,得到人MPG基因cDNA片段。

1.2.1.2 pCMV-Script/MPG重组表达载体的构建 将真核表达载体pCMV-Script以*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切,与人MPG基因cDNA片段以T_4 DNA连接酶连接过夜。连接产物以氯化钙法转化感受态细菌XL1-Blue MRF',筛选抗性克隆,小量提取质粒,酶切鉴定无误,送大连宝生物公司测序,测序结果经同源性比对确认。得到pCMV-Script/MPG重组表达载体。按质粒中量制备试剂盒说明书制备去除内毒素的重组质粒用于基因转染。

1.2.2 基因转染及筛选 转染前将人非小细胞肺癌多药耐药细胞系A549/CDDP转移至6孔板,待其处于对数生长期时按照Lipofectamine 2000说明书进行pCMV-Script/MPG表达载体的转染,记为MP组,同时取pCMV-Script载体转染组(记为P组)及未转染组(记为C组)作为对照。G418筛选浓度500 μg/ml,维持浓度200 μg/ml。12 d可见阳性克隆形成,传代扩大培养。

1.2.3 转染基因表达水平的检测

1.2.3.1 载体转染鉴定 PCR检测pCMV-Script载体上的NEO^r基因 按照Tripure说明步骤常规抽提总DNA。测DNA浓度和纯度后,取1 μg总DNA进行PCR反应,引物序列、退火温度及产物长度见表1。各取5 μl PCR产物,以含0.5 μg/ml溴化乙啶的1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,AlphaImager™2200型凝胶成像系统成像,AlphaEase FC软件分析电泳结果。

1.2.3.2 RT-PCR检测MPG mRNA的转录水平 按Tripure说明常规抽提总RNA。测其浓度和纯度后,取200 ng行逆转录反应,反应条件:室温10 min,37 ℃ 30 min,95 ℃ 5 min。取逆转录产物4 μl行PCR反应,引物序列、退火温度及产物长度见表1。内参照为GAPDH,引物序列、退火温度及产物长度见表1。反应结束后,各取5 μl PCR产物,以含0.5 μg/ml溴化乙啶的1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,AlphaImager™2200型成像系统成像,AlphaEase FC软件分析电泳结果,计算每一样品与其内参照物GAPDH的相对含量,重复3次。mRNA相对含量以$\bar{x} \pm s$表示。

表1 引物序列及退火温度

产物	引物序列	长度	退火温度(℃)
NEO^r	Primer1: 5'-CACTGAAGCGGGA GGGACT-3'	492 bp	64 ℃
	Primer2: 5'-GCGGCGATACCGTAAAGCAC-3'		
MPG	Primer3: 5'-GTCCTAGTCCGGCGACTTCC-3'	603 bp	64 ℃
	Primer4: 5'-TCAGGCCTGTGTGTCCTGCTCAG-CCACTCTG-3'		
GAPDH	Primer5: 5'-CCATGGAGAAGG CTGGGG-3'	195 bp	56 ℃
	Primer6: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'		

1.2.3.3 Western blot检测细胞内MPG蛋白表达水平 按RIPA裂解液说明常规抽提细胞总蛋白,考马斯亮蓝法测各组样品浓度,各取样品300 μg上样,12.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转膜,与山羊抗人MPG多克隆抗体(1∶2 000)4 ℃孵育过夜,兔抗山羊IgG(1∶1 000)室温作用1 h;DAB暗中显色20 min,AlphaImager™2200型成像系统成像,AlphaEase FC软件分析印迹结果,重复3次。

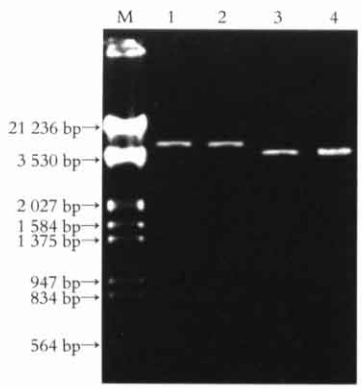
1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件包进行 t 检验。

2　结果

2.1　pCMV-Script/MPG 表达载体鉴定

2.1.1　限制性酶切初步鉴定　　以 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ单酶切 pCMV-Script/MPG 表达载体，分别获得长约 5.3 kb 的片段；以 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切 pCMV-Script/MPG 表达载体，获得 4.3 kb 和 1 kb 片段各一；以 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切 pCMV-Script 空载体，获得 4.3 kb 片段（图 1）。



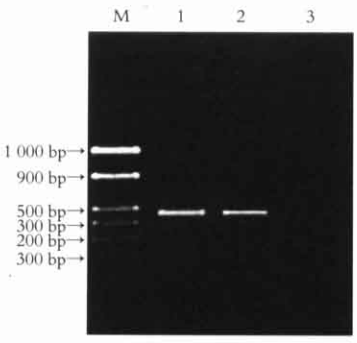
M：标准（λDNA，*Eco*R Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切）；1：pCMV-Script（*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切）；2：pCMV-Script/MPG（*Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切）；3：pCMV-Script/MPG（*Xho* Ⅰ 双酶切）；4：pCMV-Script/MPG（*Eco*R Ⅰ 双酶切）

图 1　重组载体酶切鉴定

2.1.2　基因序列测定　　构建的 pCMV-Script/MPG 表达载体经限制性酶切初步鉴定后，送大连 TaKaRa 公司进行基因测序，测序结果经同源性比对无误。

2.2　pCMV-Script/MPG 表达载体在人非小细胞肺癌 A549/CDDP 中的表达

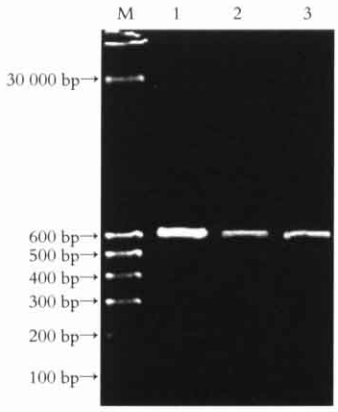
2.2.1　pCMV-Script 载体上 NEO^r 基因的检测　　PCR 产物电泳结果，见图 2。MP 组、P 组可见 NEO^r 基因扩增产物，C 组无 NEO^r 基因扩增产物。



M：标准 SD-012；1：C 组；2：P 组；3：MP 组

图 2　NEO^r 基因 PCR 检测结果

2.2.2　MPG 在转录水平的表达　　RT-PCR 产物电泳结果见图 3，603 bp 处可见 MPG 扩增产物，195 bp 处可见 GAPDH 扩增产物。分析各组 mRNA 相对含量见表 2。



M：标准 SD-002；1：MP 组；2：P 组；3：C 组

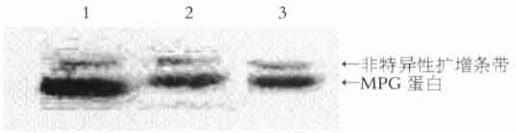
图 3　MPG 基因表达 RT-PCR 检测结果

表 2　各组细胞 MPG mRNA 相对表达量

组别	样品 1	样品 2	样品 3	$\bar{x} \pm s$
MP	5.15	4.98	5.20	5.11 ± 0.1^a
P	2.01	2.11	1.95	2.02 ± 0.08^b
C	1.80	2.20	2.01	2.00 ± 0.2

a：$P<0.01$，与 P 组比较，b：$P<0.01$，与 C 组比较

2.2.3　MPG 在翻译水平的表达　　Western-blot 结果见图 4，在 36×10^3 处可见 MPG，约 39×10^3 处可见一非特异性扩增条带。



1：MP 组；2：P 组；3：C 组

图 4　各组细胞 MPG Western-blot 结果

3　讨论

人 MPG 基因 cDNA 片段的可通过以下两种方法获得：①购买商品化的 MPG cDNA 克隆。②通过 RT-PCR 得到。考虑到 RT-PCR 扩增的忠实性受模板、引物、循环次数以及 DNA 聚合酶等多种因素影响，在通常条件下，将 200 bp 的靶序列扩增 30 个循环，即使忠实性很高的 pfu 酶引起的突变频率也达 0.3%[10]。因此，我们选择了前者，在装载有人 MPG 基因 cDNA 的质粒载体上，通过限制性酶切直接获得 MPG 基因 cDNA 片段，用于真核表达载体的构建，简化了实验步骤，提高了准确性。

本研究选用的基础载体是 Stratagene 公司新近推出的 pCMV-Script 真核表达载体，该载体源于高拷贝的 pUC18 质粒，具有超强型的人巨细胞病毒早期启动子 CMV，多克隆位点两侧有 T3 和 T7 启动子，使插入的外源 DNA 的每一条链都能在体外进行转录，尤其适用于哺乳动物细胞蛋白表达。该载体可以在其专用宿主菌 XL1-Blue MRF′中大量扩增，具有 15 个常用酶切位点[11]。研究者曾经用该载体与目前最常用的真核蛋白表达载体 pCDNA3.1(+/-)进行绿色荧光蛋白的表达比较中发现，pCMV-Script 组表达量显著高于 pCDNA3.1(+/-)组。该载体体积小，全长仅仅 4 300 bp，低于 pCDNA3.1(+/-)(全长为 5 428/5 427 bp)，理论上能够获得更高的转染效率。

要打破 MPG 酶的切割与下游各酶连接之间的平衡，MPG 酶的表达量至关重要，既往研究表明，外源性地使 MPG 表达量提高 2 倍，即导致了中国仓鼠卵巢细胞对烷化剂的敏感性显著增强[12]。本研究结果显示，MP 组 MPG mRNA 表达量分别为 P 组和 C 组的 2.5、2.6 倍，高于国外报道，Western-blot 结果显示，MP 组蛋白质表达量也高于 P 组和 C 组。另外，最近研究表明，当 MPG 表达量足够高的时候，将会失去底物特异性，也就是说，也会切割正常的、未受损伤的碱基[13]，那么则可能在 DNA 链上留下更多的脱碱基位点，使下游酶很难及时封闭 DNA 链上的缺口，增加了 DNA 双链断裂发生的几率。

本研究成功地构建了人 MPG 基因重组真核表达载体，并获得了稳定、高效表达 MPG 的人非小细胞肺癌多药耐药细胞系 A549/CDDP/MPG。为进一步研究外源性高表达 MPG，是否能够诱导人非小细胞肺癌多药耐药细胞系 A549/CDDP 凋亡，恢复其对化疗药物的敏感性，奠定了实验基础。

参考文献：

[1] ROSELL R, LORD R V, TARON M, *et al*. DNA repair and cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2002, 38(3): 217-227.

[2] RAJEWSKY M F, MULLER R. DNA repair and the cell cycle as targets in cancer therapy[M]// ALISON M R, eds. The cancer handbook. London: Nature publishing Group, 2002: 1507-1519.

[3] ROSELL R, TARON M, BARNADAS A, *et al*. Nucleotide excision repair pathways involved in Cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Control, 2003, 10(4): 297-305.

[4] KAINA B, CHRISTMANN M. DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs[J]. Int J Clin Pharmacol Ther, 2002, 40(8): 354-367.

[5] CALLEJA F, JANSEN J G, VRIELING H, *et al*. Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of rat N-alkylpurine-DNA glycosylase[J]. Mutat Res, 1999, 425(2): 185-194.

[6] YANG N, GALICK H, WALLACE S S. Attempted base excision repair of ionizing radiation damage in human lymphoblastoid cells produces lethal and mutagenic double strand breaks[J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(10): 1323-1334.

[7] YANG N, CHAUDHRY M A, WALLACE S S. Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells[J]. DNA Repair (Amst), 2006, 5(1): 43-51.

[8] NORBURY C J, ZHIVOTOVSKY B. DNA damage-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2004, 23(16): 2797-2808.

[9] 陈 杰，白春学，钱桂生，等. A549/CDDP 多药耐药细胞系的建立. 中国肺癌杂志，2003，13(2)：186-187.

[10] 迪芬巴赫 C W，德维克斯勒 G S 著. PCR 技术实验指南[M]. 黄培堂，俞炜源，陈添弥，等译. 北京：科学出版社，1998：23-33.

[11] 萨姆布鲁克 J，拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂等译. 北京：科学出版社，2002：883.

[12] IBEANU G, HARTENSTEIN B, DUNN W C, *et al*. Overexpression of human DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase results in the increased removal of N-methylpurines in DNA without a concomitant increase in resistance to alkylating agents in Chinese hamster ovary cells[J]. Carcinogenesis, 1992, 13(11): 1989-1995.

[13] WATANABE S, ICHIMURA T, FUJITA N, *et al*. Methylated DNA-binding domain 1 and methylpurine-DNA glycosylase link transcriptional repression and DNA repair in chromatin[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(22): 12859-12864.

(编辑 汪勤俭)

作者书写数字须知

根据《关于出版物上数字用法的规定》，本刊实行三位分节法(即从小数点算起，向左向右每 3 位分 1 节，节间留出一定空隙)，废除千分撇分节法(如 2,431 改为 2 431)。但年份、页数、部队编号、仪表型号、标准号不用三位分节法。中文出现的数字，凡属计数数值，一律用阿拉伯数字表示。

本刊编辑部