文章编号:1000-5404(2006)24-2403-03

论著

人小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达基因的克隆研究

李昆霖,吴国明,戢福云,徐　智,黄桂君　(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　构建小细胞肺癌多药耐药细胞(H446/CDDP)差异表达消减 cDNA 文库。**方法**　①以 H446/CDDP cDNA 为实验方(Tester),小细胞肺癌细胞 H446 cDNA 为对照方(Driver),应用抑制消减杂交(SSH)技术结合 T/A 克隆技术构建小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达消减 cDNA 文库。②通过斑点杂交筛选、测序及同源性分析获取 H446/CDDP 细胞差异表达 cDNA 片段。**结果**　成功构建了小细胞肺癌多药耐药细胞 H446/CDDP 差异表达消减 cDNA 文库,获得 21 个 H446/CDDP 细胞差异表达 cDNA 片段,经测序及同源性分析表明它们分别代表 6 个已知基因(同源性为 96% ~ 100%)。**结论**　SSH 技术是筛选新的功能基因的有效方法;获取的 6 个差异表达基因可能参与了小细胞肺癌多药耐药细胞 H446/CDDP 的耐药形成,进一步的功能研究有利于了解它们在小细胞肺癌多药耐药机制中所发挥的作用。

关键词: 小细胞肺癌;多药耐药;抑制消减杂交技术
中图法分类号: R734.2;R394-33　　**文献标识码:** A

Clone of differentially expressed genes of human small-cell lung cancer multi-drug resistance cell line

LI Kun-lin, WU Guo-ming, JI Fu-yun, XU Zhi, HUANG Gui-jun (Institute of Respireatory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective　To build the subtracted cDNA library of differentially expressed genes of small cell lung cancer (SCLC) multidrug resistance (MDR) cells. Methods　The tester is SCLC MDR cell H446/CDDP cDNA; the driver is SCLC cell H446 cDNA; SHH and T/A cloning technology were done to build the subtracted cDNA library of differentially expressed genes of SCLC MDR cells. The dot blot hybridization, sequencing and homology analysis were used to obtain differentially expressed cDNA fragments. Results　The subtracted cDNA library of differentially expressed genes of SCLC MDR cells H446/CDDP was successfully built and 21 differentially expressed cDNA fgragments of cell H446/CDDP were obtained. Sequencing and homology analysis show that the 21 fragments respectively represent 6 known genes (96% - 100% homology). Conclusion　Suppression subtractive hybridization (SSH) is an effective method for screening new function genes. The six genes might participate in the formation of the MDR in H446/CDDP.

Key words: small cell lung cancer; multidrug resistance; suppression subtractive hybridization

多数情况下小细胞肺癌对初次化疗敏感,多次化疗后可能出现复发。这种现象与肿瘤多药耐药性(multidrug resistance, MDR)有密切关系。研究表明 MDR 的产生涉及多种机制单独或共同作用[1]。但这些机制均不能完全解释 MDR,表明还有其他未知的多药耐药机制存在,研究肿瘤多药耐药细胞的差异表达基因将有助于进一步了解肿瘤多药耐药的机制。本研究采用改良抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选人小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达 cDNA 片段,旨为研究小细胞肺癌多药耐药机制提供理论和实验依据。

1　材料与方法

1.1　细胞株与试剂

人小细胞肺癌细胞 H446 购自中国科学院上海细胞库,人小细胞肺癌多药耐药细胞 H446/CDDP 由我所戢福云博士诱导成功并获其惠赠[2]。所用试剂有:RPMI1640 培养基(Hyclone 公司);精制小牛血清(PAA 公司);PCR-select cDNA subtraction kit、Advantage cDNA Polymerase Mix (Clontech 公司); Reverse

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200119)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200119)
作者简介:李昆霖(1973 -),男,重庆市人,博士研究生,医师,主要从事肿瘤多药耐药机制方面的研究。电话:(023)68757245,E-mail: li676@sina.com
通讯作者:吴国明,电话:(023)68774603
收稿日期:2006-08-23;修回日期:2006-09-30

Transcriptase M-MLV(RNase H⁻)、LA *Taq*、pMD18-T 质粒载体(TaKaRa 公司);PCR 产物纯化试剂盒(天为时代公司);随机引物标记试剂盒、高效液相杂交试剂盒(北京博大泰克公司)。PCR 仪为 MJ Research PTC-200。

1.2 细胞总 RNA 提取

取对数生长期细胞,按一步法提取细胞总 RNA,用紫外分光光度仪和 1% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳对细胞总 RNA 进行定量定性分析。

1.3 抑制消减杂交

采用改良抑制消减杂交方法进行筛选。根据 Smart 方法,采用细胞总 RNA 合成 cDNA 文库,具体方法参见 Smart PCR cDNA 合成试剂盒和 PCR-select cDNA subtraction kit 说明书。

1.4 cDNA 消减文库的构建、初步筛选和克隆

1.4.1 cDNA 消减文库的构建 按说明书对 PCR 产物与 pMD18-T 质粒载体进行连接,用氯化钙法制备感受态,将连接反应产物导入感受态 DH5α 中。按常规将菌液接种于含氨苄青霉素/X-gal/IPTG 琼脂平板上,37 ℃培养 18 h。随机挑取直径 >1 mm 的白色菌落,接种于 850 μl 含 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培基中,37 ℃、200 r/min 振荡培养过夜。加入 150 μl 无菌甘油,摇匀后置 -70 ℃冻存备用。

1.4.2 菌液 PCR 扩增和斑点杂交筛选 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.4.3 阳性克隆 DNA 测序与插入片段的序列同源性分析

根据斑点杂交阳性结果选取相关标本的 PCR 反应液进行电泳,取单克隆样本送上海生工公司测序。登录 NCBI 网站(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/),用 BLAST 软件对所有序列进行同源性比较。

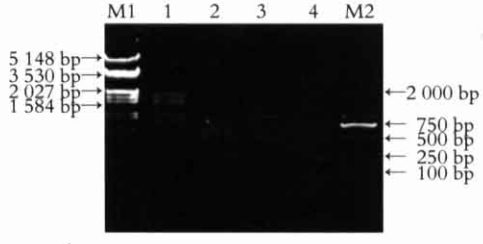
2 结果

2.1 细胞总 RNA 的定性定量分析

H446 和 H446/CDDP 的总 RNA 浓度分别为 0.97 μg/μl 和 0.83 μg/μl,$D(260)/D(280)$ 值分别为 1.92 和 1.82,28S 与 18S 的亮度比大于 2:1。

2.2 抑制消减杂交

2.2.1 双链 cDNA 的合成及 cDNA *Rsa* Ⅰ酶切结果 按 Smart 方法成功合成双链 cDNA,长度在 0.2 ~ 5 kb,其中在 900 bp 处有一较亮条带。酶切后 cDNA 产物长度在 0.1 ~ 2 kb,表明 2 组 cDNA 酶切成功(图 1)。

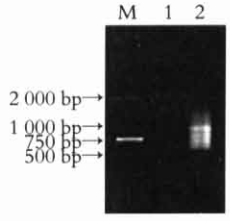


1:Driver 第 2 链扩增产物;2: Driver 第 2 链扩增产物 *Rsa* Ⅰ酶切后;3: Tester 第 2 链扩增产物;4: Tester 第 2 链扩增产物 *Rsa* Ⅰ酶切后;M1: DNA 标准(*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ);M2:标准(DL 2000)

图 1 cDNA *Rsa* Ⅰ酶切效果鉴定电泳图

2.2.2 接头连接效率分析 接头引物 PCR 引物 1 和 G3PDH 基因 3′引物配对扩增所得产物亮度约为用 G3PDH 基因 3′和 5′引物配对扩增所得产物条带亮度的 25% 以上,表明接头连接效率高。

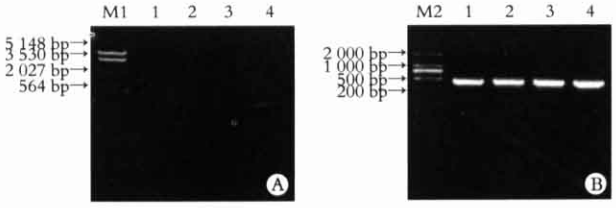
2.2.3 第 1 次和第 2 次抑制 PCR 扩增 电泳显示 2 次 PCR 扩增产物条带清晰可见(图 3)。



M:标准(DL 2000);1:H446/CDDP 第 1 次抑制 PCR 产物;2:H446/CDDP第 2 次抑制 PCR 产物

图 2 H446/CDDP 抑制 PCR 扩增产物电泳图

2.2.4 抑制消减杂交效率验证 以未进行消减杂交的第 2 次 PCR 产物为模板扩增 18 个循环即可观察到产物条带,而以消减杂交第 2 次 PCR 产物为模板扩增 28 个循环方可观察到产物条带,说明抑制消减杂交效果好(图 3A、B)。



A:消减;B:未消减

1-4:分别为消减模板扩增 G3PDH 基因 18、23、28、33 个循环所得产物;M1:DNA 标准(*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅰ);M2:标准(DL 2000)

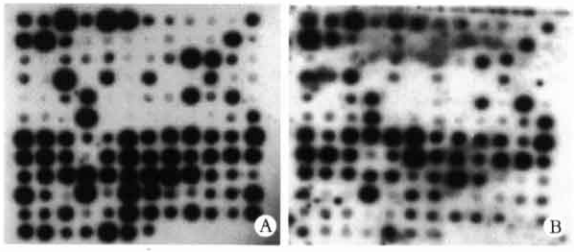
图 3 抑制消减杂交效率验证

2.3 差异表达基因 cDNA 片段文库的构建筛选结果

平板上约有 170 个菌落生长,多为白色,个别呈淡蓝色。阴性对照无菌落生长。随机挑选 139 个白色菌落进行培养,经菌落 PCR 斑点杂交显示有 28 个只存在于正向消减杂交 Tester 中或在正向消减杂交 Tester 中表达强于 Driver 的克隆(图 4)。这些阳性克隆对应的 PCR 反应产物电泳结果显示其中 21 个阳性克隆有单克隆片段插入,大小为 100 ~ 700 bp;其余 7 个克隆的 PCR 产物电泳条带为多克隆片段,予以剔除。

2.4 插入片段的序列同源性分析结果

测序结果经合并相同序列,得到 6 个基因序列。经序列同源性比较表明它们代表 6 个不同的已知基因,分别编码:①磷酸二酯酶 2A(cGMP-stimulated phosphodiesterase 2A, PDE2A);②铁蛋白轻链(ferritin light polypeptide, FTL);③叶酸受体 1(folate receptor 1);④富含半胱氨酸蛋白质 1(cysteine-rich protein, CRP);⑤磷蛋白磷酸酶 2A 型抑制蛋白(I-2^{PP2A});⑥核糖体蛋白 L27(Ribosomal protein L27, RPL27)。



A：以 H446/CDDP 消减文库为模板标记探针杂交结果；
B：以H446 消减文库为模板标记探针杂交结果

图 4　DNA 斑点杂交差异显示筛选阳性克隆

3　讨论

研究肿瘤基因的差异表达，有助于了解肿瘤发生、发展的分子机制。SSH 以其操作简单、筛选效率高、假阳性率低、通用性强等优点被广泛应用于肿瘤相关基因克隆。

目前还少见应用 SSH 技术分离小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达基因的研究报道。基于此，本研究应用改良 SSH 技术构建了 H446/CDDP 细胞的差异表达 cDNA 文库。改良主要体现在以细胞总 RNA 为模板，采用 Smart 方法合成双链 cDNA。其优点为：①省去了 mRNA 纯化过程，适合总 RNA 较少或来源有限的标本。②能获得高质量的 cDNA，尽量保留相关基因信息。成功构建小细胞肺癌多药耐药细胞差异表达消减 cDNA 文库后有以下体会：①高质量细胞总 RNA 是构建高质量差异消减文库的基础。②连接效率大于 25% 方可进行下一步杂交，而 *Rsa* Ⅰ 酶切质量和 T_4 DNA 连接酶活性均可影响连接效率。③杂交时加入过量的新鲜的 Driver cDNA。④T/A 克隆时采用新鲜 PCR 产物进行连接。⑤尽量挑取饱满的白色单克隆菌落。

在获取的中，核糖体蛋白和铁蛋白轻链基因与肿瘤 MDR 关系密切。研究表明核糖体蛋白在肿瘤 MDR 形成中所发挥的作用，主要与核糖体蛋白基因（ribosomal protein gene，RPG）异常（包括突变和表达异常）、细胞凋亡[3]和 DNA 修复有关。铁蛋白轻链基因的表达高低与多种肿瘤的耐药性产生有关[4]。

其余 4 个基因与肿瘤也有一定关系。叶酸受体在正常组织中的表达高度保守，一般只在肺、肾、脉络膜、胎盘中有低到中等水平表达，且以 β 亚型为主，但在多种肿瘤细胞中过度表达。FRα 只表达于特定上皮细胞，在大部分来源于上皮组织的恶性肿瘤特别是妇科肿瘤中有高度表达，这一特点有利于分子靶向治疗[5]。富含半胱氨酸蛋白质 1 与许多不同细胞进程有关，包括在细胞质中参与细胞骨架的重建，在胞核中使平滑肌更容易分化等[6]。PDE2A 在人的大脑组织中高表达，在心脏、肝脏、骨骼肌、肾脏以及胰腺组织中中度表达，在胎盘与肺组织中的表达水平最低。实验显示在胃肠道间质瘤细胞 GIST882 中加入抗肿瘤药物 Gleevec 后细胞生长受到抑制，PDE2A 基因 mRNA 也持久表达下调[7]。I-2^{PP2A}是磷蛋白磷酸酶 2A 型（protein phosphatase 2A，PP2A ）的抑制蛋白，PP2A 广泛参与胞内受信号传导系统，是一种促凋亡因子，也是肿瘤发生的一个重要决定因素。研究表明 I-2^{PP2A}在白血病患者中的表达量相对较高[8]。理论上 I-2^{PP2A}具有抑制 PP2A 诱导的细胞凋亡作用，实际研究也证实了这一点[9]。

对获取的差异基因片段在小细胞肺癌多药耐药细胞及多种肿瘤细胞中的表达情况进行研究，将有助于进一步了解它们是否具有肿瘤多药耐药相关功能。

参考文献：

[1] DAMIANI D, MICHELUTTI A, MICHIELI M, *et al*. P-glycoprotein, lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein in de novo adult acute lymphoblastic leukaemia[J]. Br J Haematol, 2002, 116(3): 519 - 527.

[2] 钱　频，戢福云，钱桂生，等. 顺铂诱导人小细胞肺癌多药耐药细胞系 NCI-H446/CDDP 的建立及其生物学特征分析[J]. 解放军医学杂志，2004，29(12)：1052 - 1054.

[3] DU J, SHI Y, PAN Y, *et al*. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein 16 in gastric cancer cells[J]. Cancer Biol Ther, 2005, 4(2): 242 - 247.

[4] MOHR S, BOTTIN M C, LANNES B, *et al*. Microdissection, mRNA amplification and microarray: a study of pleural mesothelial and malignant mesothelioma cells[J]. Biochimie, 2004, 86(1): 13 - 19.

[5] REDDY J A, ALLAGADDA V M, LEAMON C P. Targeting therapeutic and imaging agents to folate receptor positive tumors[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2005, 6(2): 131 - 150.

[6] CHANG D F, BELAGULI N S, IYER D, *et al*. Cysteine-rich LIM-only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors[J]. Dev Cell, 2003, 4(1): 107 - 118.

[7] FROLOV A, CHAHWAN S, OCHS M, *et al*. Response markers and the molecular mechanisms of action of Gleevec in gastrointestinal stromal tumors[J]. Mol Cancer Ther, 2003, 2(8): 699 - 709.

[8] JANSSENS V, GORIS J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling[J]. Biochem J, 2001, 353(Pt 3): 417 - 439.

[9] HARMALA-BRASKEN A S, MIKHAILOV A, SODERSTROM T S, *et al*. Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness[J]. Oncogene, 2003, 22 (48): 7677 - 7686.

（编辑　王　红）