文章编号:1000-5404(2007)24-2315-04

论著

MDR相关新基因CA916798真核表达载体的构建及其对H446细胞增殖的影响

王海晶,杨和平,周向东 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要:目的 构建新基因CA916798真核表达载体,并观察其对H446增殖的影响。**方法** 以人A549细胞总RNA为模板,用RT-PCR技术扩增获得CA916798开放阅读框序列,连接入pBluescriptⅡSK克隆载体上,将重组质粒转化入大肠杆菌DH5α内并提取质粒,酶切与DNA测序鉴定准确,再用双酶切方法将CA916798开放阅读框序列定向连接到真核表达载体pQE-Trisystem中,构成pQE-Tri-CA916798,将pQE-Tri-CA916798转化入大肠杆菌DH5α内并提取质粒,双酶切鉴定、DNA测序鉴定准确,脂质体转染人小细胞肺癌细胞系H446细胞,选取稳定转染不同质粒的H446细胞,采用MTT绘制细胞增殖曲线,流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡率。**结果** 扩增出CA916798开放阅读框序列,大小约为350 bp,重组质粒的酶切鉴定结果与预期一致,测序结果完全正确。转染了pQE-Tri-CA916798的H446细胞顺铂作用后增殖速度加快,凋亡率下降。**结论** 成功构建了pQE-Tri-CA916798真核表达质粒,并初步证实了其与顺铂诱导的肺癌多药耐药相关。

关键词: 肺癌多药耐药相关基因;CA916798基因;H446细胞;表达载体
中图法分类号: R394-33;R730.23;R734.2 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector of CA916798 and its effect on proliferation of H446 cells

WANG Hai-jing, YANG He-ping, ZHOU Xiang-dong (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of CA916798 eukaryotic expression vector transfection on the growth of H446 cells *in vitro* and explore the role of CA916798 in the MDR of lung cancer. Methods Total RNA was isolated from A549 cells. The ORF of CA916798 was amplified by RT-PCR, then cloned into pBluescriptⅡSK vector. After identified by restriction endonucleases digestion and sequencing, it was cloned to the expression vector: pQE-Trisystem vector. The recombinant pQE-Tri-CA916798 was transformed into *E. coli* DH5α, identified by double digestion of restriction endonucleases and sequencing, then transfected into H446 cells by lipofectamine method. The growth curve was plotted and the sensitivity of cell lines to the drug was detected by MTT test. The effect of CA916798 on the cell cycle was observed by flow cytometry. Results Fragments about 350 bp were amplified. Enzymatic digestion showed that the length was in consistence with the expected. After CDDP treatment, the growth of pQE-Tri-CA916798 transfected cells was faster than that of vector transfected cells, and the cell apoptosis decreased. Conclusion The eukaryotic expression vector was successfully constructed. CA916798 may play an important role in MDR of lung cancer.

Key words: MDR; CA916798 gene; H446; expression vector

CA916798是我们采用抑制消减杂交(SSH)技术筛选肺腺癌MDR细胞系SPC-A-1/CDDP与其亲代细胞获得1条在耐药细胞中高表达的新基因,其在肺癌耐药细胞中的表达较在亲代细胞明显上调[1],对CA916798基因进行深入研究对阐明顺铂耐药形成的分子机制及对顺铂耐药的逆转具有重要意义。本研究旨在利用反转录PCR(RT-PCR)技术,获得人肺腺癌A549细胞中编码目的蛋白的带酶切位点的开放阅读框序列,构建其真核表达载体,获得重组质粒pQE-Tri-CA916798,转染人小细胞肺癌H446细胞,初步探讨其与顺铂诱导的肺癌多药耐药中的作用,为进一步研究

基金项目: 国家自然科学基金(30470773)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470773)
作者简介: 王海晶(1977-),女,河南省汝南县人,博士研究生,医师,主要从事肺癌方面的研究。电话:(023)68765179,E-mail:cslz@sohu.com
通讯作者: 杨和平,电话:(023)68754121
周向东,E-mail:xiangdongzhou@126.com
收稿日期: 2007-08-31;**修回日期:** 2007-09-17

该基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺腺癌 A549 细胞、人小细胞肺癌 H446 细胞由西南医院中心实验室保存。

1.1.2 载体及菌种 克隆载体 pBluescript Ⅱ SK 购自大连宝生物公司，DH5α 菌株由西南医院中心实验室保存。表达载体 pQE-Trisystem 购自美国 QIAGEN 公司。

1.1.3 主要试剂 限制酶、T_4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司，RNA 提取试剂盒购自美国 QIAGEN 公司，AMV 反转录酶、*Taq* 酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购于大连宝生物工程有限公司。其他试剂均为分析纯试剂。

1.1.4 引物设计和合成 编码目的蛋白带酶切位点开放阅读框序列引物设计如下：上游引物：5′-GTGATATCCATGACAGTGCTGGAGGCCG-3′；下游引物：5′-TGACTCGAGAACCAGGAGCAGCTCCC-3′。上游引物 5′端有 *Eco*R Ⅴ酶切位点（下划线处），下游引物 5′端有 *Xho* Ⅰ酶切位点（下划线处），基因引物由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 复苏并培养 A549 细胞，按 QIAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒说明提取总 RNA，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳判断总 RNA 的完整性。

1.2.2 目的基因的获得 将提取的总 RNA 用引物，在 AMV 反转录酶的作用下于 42 ℃反转录 1 ~ 2 h，制备 cDNA。以 cDNA 为模板，扩增出目的片段。扩增条件为：95 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min；55 ℃ 1 min；72 ℃ 2 min。30 个循环后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.3 克隆载体的构建 鉴定大小合适的片段经胶回收试剂盒回收目的基因，PCR 获得的目的基因用胶回收试剂盒回收后，*Eco*R Ⅴ酶切克隆载体 pBluescript Ⅱ SK，使其形成线性化的载体，使用 T_4 DNA 连接酶对上述产物和 pBluescript Ⅱ SK 进行连接，并转化 DH5α 感受态细菌，以酶切和 PCR 方法鉴定阳性克隆，命名为 SK + CA916798。

1.2.4 表达重组载体的构建 将结果合适的重组质粒分别进行 PCR 扩增，回收后得到 CA916798 ORF 片段经 *Eco*R Ⅴ和 *Xho* Ⅰ双酶切，并用同样的酶双酶切表达载体，使其形成线性化的载体，使用 T_4 DNA 连接酶对上述酶切产物和 pQE-Trisystem 进行连接。将连接产物转化 DH5α 细菌，在氨苄（100 mg/ml）抗性的 LB 平板上筛选，挑选克隆后，摇菌过夜培养，提取重组质粒。采用 PCR、酶切等方法鉴定，得到阳性重组质粒，命名为 pQE-Tri-CA916798。

1.2.5 建立稳定转染 pQE-Tri-CA916798 人小细胞肺癌 H446 细胞株 采用脂质体介导转染方法，实验分 3 组，以不含目的片段的空载体 PQE-Trisystem 为阴性对照，不加质粒 DNA 的空白组为空白对照，含目的片段的 PQE-Tri-CA916798 组为目的基因转染组。取 1×10^6 个 H446 细胞悬于 0.5 ml RPMI 1640 中，加入 6 孔板，以 1∶3 的比例配脂质体与质粒混合物，室温放置 10 min 后加入 6 孔板，37 ℃ 5% CO_2 孵箱孵育 3 h。在 6 孔板中加入 5 ml 完全培养基，37 ℃ 5% CO_2 孵箱孵育 48 h 后，加入 G418 100 μg/ml，初筛抗性转基因细胞 20 d 后，阴性对照组的细胞全部死亡，继续用稀释法筛选转基因单克隆细胞，用半量浓度维持选择压力，将稳定表达 CA916798 的 H446 细胞系命名为 H446-PQE-Tri-CA916798 细胞。

1.2.6 MTT 比色法测定转染细胞对顺铂的药物敏感性，绘制生长曲线细胞 以 H446-PQE 细胞为对照组，2 组细胞按 1×10^4/孔接种于 96 孔培养板上，每 6 孔为 1 组共接种 8 板，每日取出 1 板，采用 MTT 比色法测定波长 490 nm 下的吸光度值[D(490)]，绘制细胞增殖曲线。

1.2.7 流式细胞术比较细胞周期的变化 以 PQE-H446 细胞为对照组，2 组细胞各 3 瓶于 50 ml 培养瓶中培养，生长至对数期时，收集细胞，尽量吹打成单细胞悬液，用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）洗涤后，70% 冷乙醇 4 ℃下固定 24 h 以上，应用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡率。

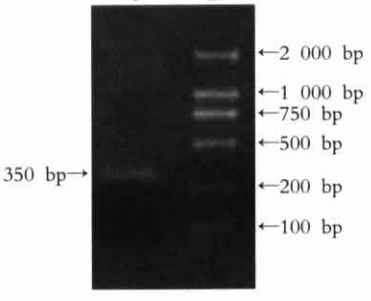
1.3 统计学处理

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 目的片段的 RT-PCR 扩增

扩增产物经琼脂糖凝胶电泳，可见约 350 bp 条带（图 1），与预期产物一致。



1：CA916798 开放阅读框 cDNA；2：DNA 标准（DL 2000）

图 1 RT-PCR 扩增 CA916798 开放阅读框产物电泳图

2.2 CA916798 开放阅读框序列克隆载体鉴定

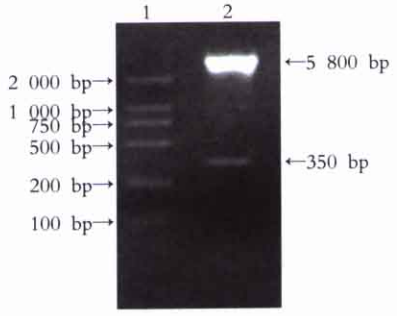
将 PCR 扩增的基因片段经胶回收纯化，并克隆至 pBluescript Ⅱ SK 载体，DH5α 感受态细胞转化，经筛选获得 1 株阳性重组质粒。将重组质粒酶切进行电泳检测，发现环状质粒已被切开，SK + CA916798 重组质粒大片段约为 2 900 bp，小片段约为 350 bp，与预期一致。重组质粒经自动基因测序仪测序（宝生物公司）结果与 CA916798 基因序列基本相符，所含目的基因开放阅读框序列准确无误，重组质粒构建成功。

2.3 表达重组载体的鉴定

将获得的重组载体质粒以 *Eco*R Ⅴ和 *Xho* Ⅰ双酶切，电泳可得目的基因（约 350 bp）及载体（约 5 800 bp）的条带（图 2，第 2 泳道）。证明重组真核表达载体已成功构建。

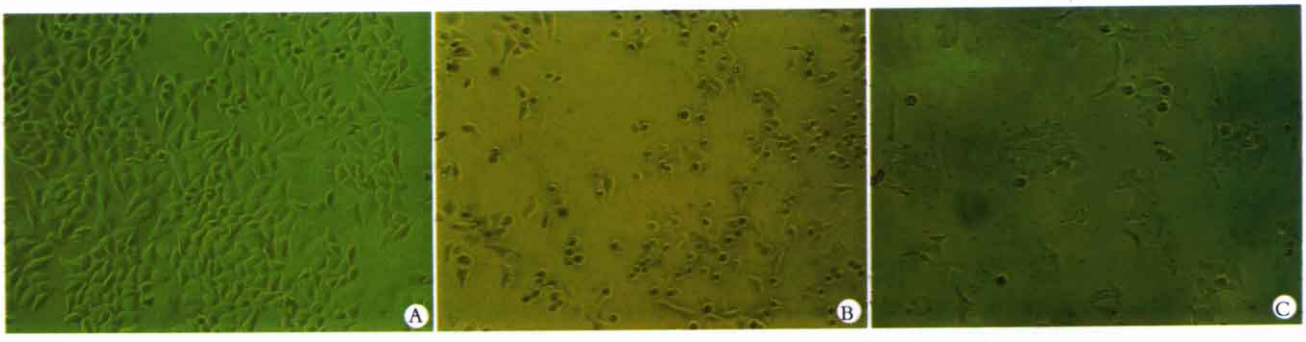
2.4　细胞培养、转染及阳性克隆筛选

采用脂质体法进行基因转染，以 G418 筛选转染细胞（G418 浓度：100 μg/ml），观察到空白对照组细胞单层贴壁生长，细胞间相互连接，在加入 G418 后第 7 天绝大多数死亡，仅有少数细胞贴壁，细胞变圆变小，培养液中可见大量细胞碎屑，至第 12 天全部死亡，未见贴壁。而实验组和阴性对照组在第 12 天均有抗性集落形成，在此基础上采用极低密度稀释接种法，并维持 G418 浓度筛选单克隆细胞，继续培养 18～21 d，即可获得已呈明显区域性生长的抗性克隆。采用小滤纸片胰酶定点消化法挑出阳性克隆，逐步放大培养，降低 G418 浓度并维持在一定张力下扩增传代，见图 3。



1：DNA 标准（DL 2000）；2：阳性克隆

图 2　重组真核表达质粒 p2QE-Tri-CA916798 酶切鉴定



A：正常 H446；B：G418 作用后；C：PQE-Tri-CA916798 抗性集落形成

图 3　重组质粒 pQE-Tri-CA916798 转染 H446 细胞　（倒置显微镜 ×100）

2.5　转染细胞 MTT 增殖曲线测定

各组细胞每天的 $D(490)$ 通过重复测量设计资料的方差分析，实验组和对照组比较，采用 MTT 法绘制细胞增殖曲线（图 4），结果提示，pQE-Tri-CA916798 转染组 H446 细胞分别用 0.5 μg/ml 与 1.0 μg/ml 顺铂作用后增殖速度较空载体组细胞显著升高（$P<0.01$）。

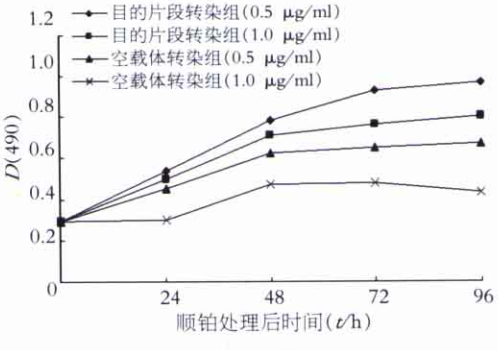
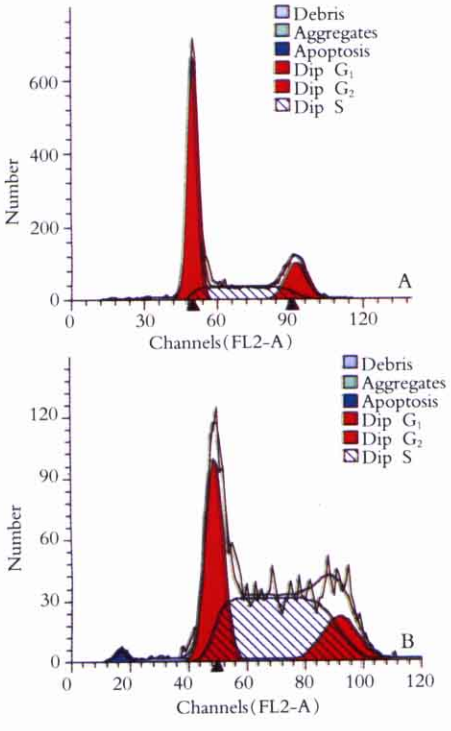


图 4　不同浓度顺铂作用后 H446-pQE-Tri-CA916798、H446-pQE-Tri 细胞生长曲线

2.6　细胞凋亡分析

流式细胞仪检测结果见图 5。1.0 μg/ml 顺铂作用后，空载体组细胞被抑制在 S 期，转染了 pQE-Tri-CA916798 的 H446 细胞凋亡率（0.12 ± 0.46）% 显著低于转染空载体细胞（1.12 ± 0.57）%（$P<0.01$）。



A：目的片段转染组（1.0 μg/ml 顺铂作用后）；B：空载体转染组（1.0 μg/ml 顺铂作用后）

图 5　各组稳定转染的 H446 细胞顺铂作用后对细胞周期和细胞凋亡的影响

3 讨论

尽管目前对肺癌的化学治疗取得了一定进展，但其4年平均生存率仅为13%[2]。肺癌细胞的内在和/或获得性多药耐药性（MDR）是化疗失败及低生存率的重要原因之一。

国内外研究表明，肺癌细胞对化疗药物耐受的机制是一个多基因参与的复杂事件，虽然已经发现由跨膜转运蛋白如P-170（P-gp）糖蛋白、多药耐药相关蛋白（MRP）、乳腺癌耐药蛋白（BCRP）和肺耐药相关蛋白（LRP）介导的典型耐药途径；由其他非跨膜机制如凋亡、酶活性、细胞内pH等变化介导的非典型耐药途径[3-6]，但肺癌多药耐药的机制仍未完全阐明。只有不断寻找新的耐药相关基因并进行深入研究，才有希望阐明肺癌MDR的机制进而逆转耐药。

CA916798基因是我们采用抑制消减杂交（SSH）技术筛选肺腺癌MDR细胞系SPC-A-1/CDDP与其亲代细胞获得1条在耐药细胞中高表达的新基因。本研究发现，CA916798基因在肺癌耐药细胞中的表达较其亲代细胞明显上调，经序列同源性分析表明，它与已知的耐药相关基因无明显同源性。半定量RT-PCR检测CA916798基因在5种肺癌细胞株SH77、H446、A549、SPC-A-1和H460中该基因mRNA表达的相对量分别为0.395 5、0.410 3、1.206 6、1.394 3和0.574 8。由此可见，肺腺癌细胞系该基因的表达最强，其次为大细胞肺癌细胞系，SCLC细胞系最弱[7,8]。因此，构建该基因的真核表达载体并将其转染表达量最低的小细胞肺癌细胞株，为进一步对CA916798基因进行研究进而阐明顺铂耐药形成的分子机制奠定了基础。

本实验所选用的表达载体为pQE-Trisystem载体，它源于杆状病毒，它的多克隆位点上包括了20种常用的酶，有利于目的片段的插入。载体本身具有氨苄抗性，可用于对阳性克隆的筛选，并具有99%的真核表达载体所具有的Kozak序列。Kozak序列中含有ATG启动子，有利于翻译的高效启始，同时也具有表达载体所必须的转录终止区。综上所述，pQE-Trisystem载体是一种真核表达系统所需的优秀载体。

近年来发现，顺铂的抗肿瘤毒性与诱导细胞凋亡密切相关[9]，为了进一步明确CA916798基因对肺癌多药耐药的作用机制，本研究在成功构建CA916798基因真核表达载体的基础上，用脂质体法将该载体转染H446细胞，观察CA916798基因对小细胞肺癌对顺铂耐药特性的影响。结果显示，转染CA916798的H446细胞顺铂作用后较对照组生长增殖速度加快，凋亡率下降。该结果提示，CA916798基因可增加H446细胞对顺铂的耐药性，进一步验证了CA916798基因在顺铂所致的肺癌多药耐药中的作用。因此，逆转顺铂诱导肿瘤细胞发生凋亡可能是CA916798基因诱导耐药的机制之一。

通过以上表述，本实验成功构建包含了CA916798基因真核表达载体，使下一步对CA916798基因的功能进行深入研究奠定基础，将为进一步阐明顺铂致肺癌MDR的机制提供帮助。

参考文献：

[1] 周向东，刘凌志，钱桂生，等. 一条新的人肺腺癌耐药相关基因全长cDNA片段的克隆及序列分析[J]. 癌症，2002，21(4)：341-345.

[2] Blanchon F，Grivaux M，Asselain B，*et al*. 4-year mortality in patients with non-small-cell lung cancer：development and validation of a prognostic index[J]. Lancet Oncol，2006，7(10)：829-836.

[3] Kartalou M，Essigmann J M. Mechanisms of resistance to cisplatin[J]. Mutat Res，2001，478(1-2)：23-43.

[4] Yoon S S，Ahn K S，Kim S H，*et al*. *In vitro* establishment of cis-diammine-dichloroplatinum(Ⅱ) resistant lung cancer cell line and modulation of apoptotic gene expression as a mechanism of resistant phenotype[J]. Lung Cancer，2001，33(2-3)：221-228.

[5] 王 梅，葛明建. 荧光定量RT-PCR法监测肺癌患者化疗前后外周血淋巴细胞mdr1 mRNA的变化[J]. 第三军医大学学报，2006，28(19)：1979-1982.

[6] 姬明丽，宋晓荣，千智斌，等. 非小细胞肺癌组织Bcl-2蛋白的表达和多药耐药检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2006，41(5)：919-921.

[7] 刘凌志，钱桂生，周向东. 肺癌耐药相关基因在肺癌组织和肺癌细胞株中的表达[J]. 癌症，2003，22(2)：171-174.

[8] 周向东，钱桂生，刘凌志. 采用基因芯片技术筛选人小细胞肺癌SH77/CDDP多药耐药相关基因表达谱的研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：279-253.

[9] Kosmider B，Osiecka R，Ciesielska E，*et al*. Induction of apoptosis and necrosis in lymphocytes by the cis-Pt(Ⅱ) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP[J]. Mutat Res，2004，558(1-2)：169-179.

（编辑 栾 嘉）