

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.002

人基因 BAG-1 高表达载体的构建及其对肺腺癌细胞放射敏感度的影响

杨青山,刘媛媛,姜立朋

Effect of Expression Vector of Human BAG-1 Gene on Radio-sensitivity of Lung Adenocarcinoma Cells

Yang Qingshan, Liu Yuanyuan, Jiang Lipeng

Department of Oncology, The First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: Objective To explore the effect of BAG-1 on lung adenocarcinoma cells radio-sensitivity through constructing high expression vector of BAG-1. **Methods** Total RNA was extracted from A549 lung cancer cell lines. BAG-1 gene was amplified by RT-PCR. The expression vector pcDNA3.1-BAG-1 was constructed, and then transfected into lung cancer cells A549. A549 cell lines with high expression of BAG-1 was selected by Western blot. Effect of BAG-1 on lung cancer cell radio-sensitivity was investigated by cloning experiments. **Results** The high expression vector of pcDNA3.1-BAG-1 was constructed successfully. High expression of BAG-1 decreased lung adenocarcinoma cells radio-sensitivity. **Conclusion** High expression of BAG-1 was related to radiation resistance and may be a novel target for cancer therapy.

Key words: BAG-1; radio-sensitivity; Clone formation

摘要:目的 通过构建 BAG-1 高表达载体来研究 BAG-1 在肺腺癌细胞放射敏感度中的作用。方法提取人肺癌 A549 细胞中总 RNA,通过 RT-PCR 扩增 BAG-1 基因,构建 pcDNA3.1-BAG-1 表达载体,转染肺癌细胞 A549,通过 Western blot 筛选出 BAG-1 高表达 A549 细胞株。通过克隆形成实验,研究 BAG-1 对肺腺癌细胞放射敏感度的影响。**结果** 成功构建 pcDNA3.1-BAG-1 载体;筛选出 BAG-1 高表达 A549 细胞株;BAG-1 高表达降低肺腺癌细胞放射敏感度。**结论** BAG-1 高表达参与放射抵抗,有望成为肿瘤治疗的新靶点。

关键词: BAG-1;放射敏感度;克隆形成

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)02-0127-03

0 引言

BAG-1 是一种多功能抗凋亡蛋白,能与多种基因蛋白的产物相互作用来调节细胞的凋亡、增殖、转录及迁移。近年来研究发现:BAG-1 蛋白在肿瘤的发生、发展中起着重要作用,且异常表达与患者的不良预后、治疗反应和生存时间密切相关^[1-4]。然而,关于 BAG-1 蛋白与放疗抵抗在国内外报道甚少。本实验通过构建 BAG-1 高表达载体来研究 BAG-1 蛋白对肺癌细胞放射敏感度的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞 *E. coli* DH5 α 、肺腺癌细胞 A549 由辽宁医学院科研中心提供。真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Takara 公司。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂、Lipofectamine 2000 和 SuperScript cDNA 第一链合成系统购自 Invitrogen 公司。PCR 试剂盒、*Xho*I 和 *Kpn*I 内切酶、T4DNA 连接酶购自 Takara 公司。BAG-1 单克隆抗体、GAPDH 一抗及羊抗兔 IgG-HRP 二抗购自博士德生物有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提中量试剂盒、DAB 显色试剂盒购自天根生物公司。

1.1.3 引物设计 根据 GenBank 中人 BAG-1 的基因序列(NM_001172415),设计一对引物。上游引入保护碱基和 *Kpn*I 酶切位点,并含有目的基因 5'端部分序列;下游引入保护碱基和 *Xho*I 酶切位点,并含有目的基因 3'端部分序列。即上游引物:5'-CGGGGTACCCGACCCAGAGTGAGGAGGC-3',下游引物:5'-CCGCTCTAG CCCAAAGAAAG-CACCCAGA-3'。

1.2 方法

1.2.1 人肺癌细胞 A549 中总 RNA 的提取 培养人肺癌细胞 A549 至对数生长期,胰酶消化、洗涤、离心收集并计数,每小管约 2×10^6 个细胞,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。用分光光度法测定总 RNA 的纯度和量,通过电泳来鉴定 RNA 的完整性。

收稿日期:2011-04-11;修回日期:2011-09-23

基金项目:辽宁医学院院内青年基金资助项目(y2010z016)

作者单位:121001 辽宁锦州,辽宁医学院附属第一医院肿瘤科

作者简介:杨青山(1975-),男,博士,主治医师,主要从事肿瘤放疗工作

1.2.2 RT-PCR 扩增 BAG-1 基因 用 Oligo(dT) 为引物,合成 cDNA 第一链,用 PCR 试剂盒扩增 BAG-1 基因,PCR 体系为 50 μ l, Taq Plus 酶 1 μ l, 10 \times Pfu Buffer 5 μ l, dNTP Mixture 4 μ l, 上下游引物各 1 μ l, cDNA 10 μ l, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。对扩增产物,用 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用胶回收试剂盒进行回收,电泳鉴定,同时对 DNA 进行定量。

1.2.3 真核表达载体及 PCR 产物双酶切 真核表达载体 pcDNA3.1 及 PCR 产物分别行双酶切。酶切反应体系总体积 50 μ l,包括纯化的 pcDNA3.1 质粒 2 μ l 或 PCR 产物 2 μ l, 10 \times Buffer 5 μ l, 100 \times BSA 0.5 μ l, *Kpn*I (10 u/ μ l) 及 *Xho*I (10 u/ μ l) 各 1 μ l, H₂O 40.5 μ l。将上述混合的反应物置于 37 $^{\circ}$ C, 过夜。双酶切产物用胶回收试剂盒回收,电泳检测酶切效果。

1.2.4 表达载体的构建 连接体系为 10 μ l, 真核表达载体及 PCR 产物经双酶切后 DNA 各 1 μ l, T4DNA 连接酶 5 μ l, ddH₂O 3 μ l。16 $^{\circ}$ C 连接 30 min。获得连接产物 pcDNA3.1-BAG-1。取 10 μ l 连接反应液转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂有 IPTG 及 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,进行蓝白斑筛选,挑取白色菌落,提取质粒。

1.2.5 阳性克隆的双酶切鉴定及 DNA 测序 将重组质粒经 *Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切,双酶切后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将酶切鉴定正确的重组质粒送至北京天根公司进行测序,将测序结果进行 BLAST 同源序列比对。

1.2.6 检测目的基因表达 选择测序鉴定正确的克隆,扩增并提取质粒 DNA,紫外光吸收法测定浓度,保证所提质粒 DNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间。取对数生长期的肺腺癌细胞 A549 (2 \times 10⁶ 细胞/ml), Lipofectamine 2000 转染 pcDNA3.1-BAG1, 同时设阴性对照。培养转染细胞,用 G418 (600 mg/L) 筛选单克隆细胞进行传代,Western blot 验证筛选出的阳性细胞蛋白质的表达水平。将筛选出的阳性细胞 BAG-1-1 和 BAG-1-2 作为实验组,阴性对照质粒 pcDNA3.1 转染的细胞作为阴性对照组及亲本肺腺癌细胞 A549 作为空白对照组,进行后续实验。

1.2.7 放射敏感度实验 取对数生长期的各组细胞,消化细胞成单个,接种细胞于 100 mm 培养皿中,为了计数方便,不同照射剂量 0、1、2、4、6 和 8 Gy,每皿细胞数分别为 200、200、400、800、1 600、3 200 个细胞,每组设三个平行皿。24 h 细胞贴壁后,直线加速器进行 X 线照射 (Siemens Primus M, 德国),照射野大小为 20 cm \times 20 cm,源皮距为 100 cm,照射剂量为 1、2、4、6 和 8 Gy (剂量率 200 cGy/min),同时设未照射组为对照组。将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 14 天,有克隆形成。倒去上清培养液,用 PBS 洗涤 2 次,加入 75% 甲醇固定

液,铺满培养皿底面,固定 5 min。弃去固定液,待稍干燥后加入 0.5% 结晶紫 (甲醇配制) 染色 5 min,在镜下检查染色程度,当克隆着色足够时用水洗去残余染液,以每团细胞数大于 50 个时作为一个克隆计数,计算克隆形成率 (克隆形成率 = 生成克隆数 / 接种细胞数 \times 100%) 和存活分数 (SF = 受照射细胞的克隆形成率 / 对照组细胞克隆形成率 \times 100%)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad prism4 统计软件进行方差分析,组间比较采用单因素方差分析或配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌 A549 细胞 RNA 的提取

总 RNA 抽提产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外成像系统拍照,可见清晰的三条带,分别为 28 S、18 S 和 5 S,且前二者亮度之比接近 2:1,表明 RNA 分子较完整,见图 1。

2.2 RT-PCR 产物结果

RT-PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR 扩增产物与人 BAG-1 基因理论长度 692 bp 相一致,见图 2。

2.3 pcDNA3.1-BAG-1 酶切结果

将阳性菌落摇菌提取质粒,分别进行 *Kpn*I 和 *Xho*I 双酶切,电泳分析,在 692 bp 左右有目的条带,证明目的产物已经插入真核表达载体中,见图 3。

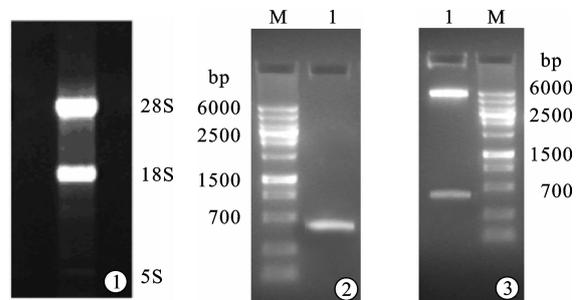


图 1 提取总 RNA 电泳分析

Figure 1 Electrophoresis analysis of total RNA extracted M:DNA Marker; 1:RT-PCR products

图 2 人 BAG-1 RT-PCR 扩增产物的电泳分析
Figure 2 Electrophoresis analysis of RT-PCR products of human BAG-1

1:digestion products of pcDNA3.1-BAG-1 plasmid using *Kpn*I/*Xho*I enzyme; M:DNA Maker

图 3 pcDNA3.1-BAG-1 质粒的酶切鉴定

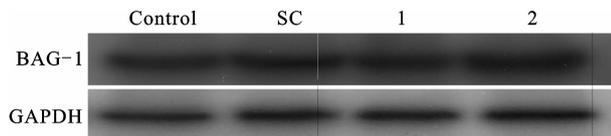
Figure 3 Identification of pcDNA3.1-BAG-1 plasmid with enzyme digestion

2.4 人 pcDNA3.1-BAG-1 序列分析

测序结果显示,插入片段为 692 bp,与 GenBank 中公布的 BAG-1 基因序列一致 (图略)。BLAST 同源序列比对结果显示两者同源率为 100%,表明人 BAG-1 基因成功克隆到 pcDNA3.1 表达载体中。

2.5 稳定转染 A549 肺癌细胞系的建立

pcDNA3.1-BAG-1 质粒通过 Lipofectamine 2000 转染 A549 细胞后 48 h,用 G418(600 mg/L)筛选出的细胞扩大培养后,收集细胞。通过 Western blot 对 BAG-1 蛋白水平进行鉴定。结果显示:对比亲本 A549、A549/ pcDNA3.1 阴性对照细胞,BAG-1-1、BAG-1-2 细胞中 BAG-1 蛋白表达明显升高,约为 40%、60% ($F = 250.4, P < 0.05$),见图 4。我们选 BAG-1-2 细胞系做后续实验。



Control: untransfected groups; SC: pcDNA3.1 vectors transfected A549 cell; lines 1,2: pcDNA3.1-BAG-1 transfected A549 positive clone cell lines

图 4 不同组别转染 A549 细胞的 BAG-1 蛋白表达
Figure 4 Expressions of BAG-1 proteins in different groups after transfection

2.6 BAG-1 高表达降低 A549 肺腺癌细胞对射线的敏感度

为了判定 BAG-1 蛋白表达与射线敏感度的关系,我们将 A549 细胞、A549/pcDNA3.1 细胞和 A549/pcDNA3.1/BAG-1-2 细胞暴露于 X 射线,于照射后 24 h,将细胞消化,以合适的密度接种培养,14 d 后观察细胞的集落形成情况,计算克隆的接种效率和存活分数,比较细胞放射敏感度差异,见图 5,A549 细胞和 A549/pcDNA3.1 细胞之间的放射敏感度差异无统计学意义 ($t = 1.03, P > 0.05$)。然而,A549/pcDNA3.1/BAG-1-2 细胞的放射敏感度则明显降低,与前二者比较差异有统计学意义 ($t = 4.67, P < 0.05$)。结果显示:BAG-1 高表达可以显著降低 A549 细胞对射线的敏感度。

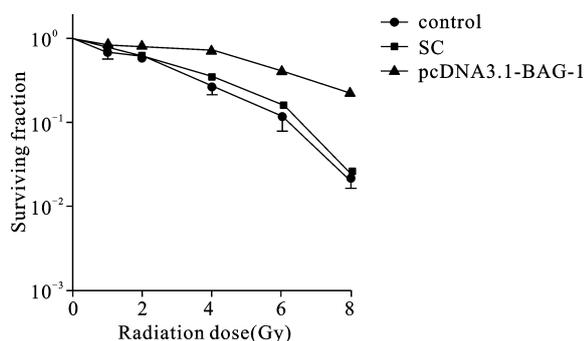


图 5 BAG-1 高表达降低 A549 细胞系的放射敏感度
Figure 5 Radio-sensitivity of A549 cells reduced by high expression of BAG-1

3 讨论

BAG-1 是 1995 年由 Takayuma 等^[5]在人淋巴细胞株 Jurkat 中筛选出的一个能够与 bcl-2 结合,具有抗凋亡等多种功能的基因。人 BAG-1 基因位于人类染色体 9p12,它编码的 BAG-1 蛋白有四个

异构体,即 P50 (BAG-1L)、P46 (BAG-1M)、P33 (BAG-1S)和 P29,能与多种基因蛋白的产物相互作用来调节细胞的凋亡、增殖、转录及迁移。BAG-1 在细胞表面与生长因子受体如 HCG/PDGF 受体结合能增强细胞对生长因子诱导的凋亡。在细胞质内与 HSP70/RAF-1/Bcl-2 相结合调节其蛋白功能,促进细胞的增殖;在细胞核内与多个激素受体家族成员如 ER、PR 相结合,调节激素诱导的凋亡。近年来研究发现,BAG-1 在许多肿瘤细胞及肿瘤组织中高表达,且参与肿瘤细胞对药物的抵抗^[6-7]。然而,关于 BAG-1 是否与放射抵抗的有关报道甚少。

为了更好地研究 BAG-1 基因的功能,本实验利用基因克隆技术成功构建了 pcDNA3.1-BAG-1 表达载体,在构建载体过程中双酶切的时间及连接载体温度的控制是关键,而基因测序是检测载体构建成功的金标准;通过 Lipofectamine 2000 转染肺腺癌细胞 A549,筛选出 BAG-1 高表达 A549 细胞株,对不同的阳性细胞株进行 Western blot 测定,挑选出 BAG-1 表达较高的 BAG-1-2 做后续实验。

为了探讨 BAG-1 是否参与肺癌放疗抵抗,本实验通过放射敏感度实验发现,BAG-1 高表达使 A549 细胞对射线敏感度降低,产生放射抵抗,而阴性对照组与亲本细胞组对射线敏感度无明显变化,说明 BAG-1 可能是一个放射抵抗基因,这也与先前报道的 BAG-1 高表达与患者不良预后相关的结果相符^[8]。然而,关于 BAG-1 蛋白参与放射抵抗的机制还有待于进一步研究。BAG-1 有望成为肿瘤治疗的新靶点。

参考文献:

- [1] Sun N, Meng Q, Tian A. Expressions of the anti-apoptotic genes Bag-1 and Bcl-2 in colon cancer and their relationship[J]. Am J Surg, 2010, 200(3): 341-345.
- [2] Wood J, Lee SS, Hague A. Bag-1 proteins in oral squamous cell carcinoma[J]. Oral Oncol, 2009, 45(2): 94-102.
- [3] Barnes JD, Arhel NJ, Lee SS, et al. Nuclear BAG-1 expression inhibits apoptosis in colorectal adenoma-derived epithelial cells[J]. Apoptosis, 2005, 10(2): 301-311.
- [4] Tang SC, Beck J, Murphy S, et al. BAG-1 expression correlates with Bcl-2, p53, differentiation, estrogen and progesterone receptors in invasive breast carcinoma[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 84(3): 203-213.
- [5] Takayama S, Sato T, Krajewski S, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel bcl-2-binding protein with anti-cell death activity[J]. Cell, 1995, 80(2): 279-284.
- [6] Liu H, Liang Y, Li Y, et al. Gene silencing of BAG-1 modulates apoptotic genes and sensitizes lung cancer cell lines to cisplatin-induced apoptosis[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(10): 832-840.
- [7] Ma J, Zhu W, Zhou Q. Expression and significance of bag-1, bcl-2 in Non-small cell lung cancer and the correlation with multi-drug resistance[J]. Chin J Lung Cancer, 2009, 12(10): 1089-1094.
- [8] Liu H, Bai Y, Liu B, et al. The expression of BAG-1 and its clinical significance in human lung cancer[J]. Chin J Lung Cancer, 2008, 11(4): 489-494.

[编辑:刘红武;校对:黄园玲]