

• 论 著 •

抑制性差减杂交技术分离白血病多药耐药基因

王楠¹, 潘喆^{2△}, 袁宏¹

(大连医科大学附属第一医院:1. 检验科;2. 病理科, 辽宁大连 116023)

摘要:目的 分离及鉴定与白血病多药耐药性相关的差异表达基因。方法 采用抑制性差减杂交(SSH)技术分离非耐药细胞株 K562 与耐药细胞株 K562/DOX 差异表达基因。提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 经限制性内切酶 Rsa I 酶切后, 分别与不同的接头(adopter1 和 adopter2R)连接;连接产物插入 pMD19-T 载体后转入大肠埃希菌中, 构建 cDNA 差减文库;挑取阳性克隆提取质粒进行测序及同源序列分析, 确定差异表达基因。结果 筛选获得 220 个差异表达基因, 包括血红蛋白、核糖体和线粒体等相关基因, 以及热休克因子结合蛋白(HSPB1)基因等其他基因。结论 采用 SSH 技术及分子克隆技术可构建耐药及非耐药肿瘤细胞株差异表达基因的差减 cDNA 文库, 能够为进一步筛选、克隆肿瘤细胞多药耐药性相关差异表达基因奠定基础。

关键词:白血病; 多药耐药; 抑制性差减杂交; 差异表达基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)06-0743-04

Multidrug resistance associated genes of leukemia separated by suppression subtractive hybridization

Wang Nan¹, Pan Zhe^{2△}, Yuan Hong¹

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116023, China)

Abstract: Objective To isolate and identify differential expression genes associated with multidrug resistance of leukemia. **Methods** Differential expression genes between leukemia cell line K562 and resistant cell lines K562/DOX were isolated by using suppression subtractive hybridization(SSH) technique. Total RNA were extracted, cDNA were synthesized and digested by restriction enzyme Rsa I, then connected with adopter1 and adopter2R, and linked with pMD19-T vector. Constructed vectors were transferred into E. coli. Subtracted cDNA library was constructed, and the positive clones were screened according to base sequences and homologous sequences. The differential expression genes were indentified by comparison analysis of Gene Bank database. **Results** A total of 220 differential expression genes were sequenced, including hemoglobin, ribosomes and mitochondria related genes, and heat shock factor binding protein 1 (HSPB1) gene and other genes. **Conclusion** SSH method and molecular cloning technique could be used to construct subtracted cDNA library of differential expression genes between drug resistant and not-resistant leukemia cells, which might be useful for further screening and cloning of differential expression genes of multidrug resistant tumor cells.

Key words: leukemia; multidrug resistance; suppressive subtractive hybridization; differential expression genes

白血病细胞多药耐药是导致化疗效果减低或治疗无效的主要原因,而耐药基因过度表达是肿瘤细胞形成耐药性的基础。研究白血病耐药细胞基因表达的差异,可获知细胞出现表型差异的原因,提供复杂生命过程的基本信息^[1]。本研究采用抑制性差减杂交(SSH)技术构建非耐药白血病细胞株 K562 与耐药细胞株 K562/DOX 差异表达基因的 cDNA 文库^[2],为筛选白血病耐药基因,揭示白血病多药耐药的形成机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株 白血病细胞株 K562 由大连医科大学血液检验研究所惠赠,耐药细胞株 K562/DOX 购自天津血液病研究所。所有细胞均按常规方法培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,5% CO₂、37℃ 培养箱中传代培养,1~2 d 换液 1 次使细胞维持对数生长。K562/DOX 细胞株定期采用阿霉素冲击以维持其耐药性(阿霉素应用剂量为 10 μg/mL,1 小时/次,1 次/周)。停药 2 周后进行后续实验。

1.2 试剂 SMARTer cDNA 合成试剂盒(SMARTer cDNA Synthesis Kit,批号:634925)、SSH 试剂盒(PCR-Select cDNA

Subtraction 试剂盒,批号:637401)、DNA 片段纯化试剂盒(DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0,批号:DV807)、DNA 连接试剂盒(DNA Ligation Kit,批号:D6020A)、pMD19-T 载体(pMD19-T Vector,批号:D102A)购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 cDNA 合成及确认最佳 PCR 产物 以 2 μL 细胞总 RNA 作为模板,逆转录合成 cDNA,PCR 反应条件:72℃ 3 min,42℃ 2 min。为获得较高浓度产物和确认最佳 PCR 产物,进行一系列 PCR 扩增,以电泳结果确认最佳产物。PCR 反应条件:95℃ 1 min,95℃ 15 s,65℃ 30 s,68℃ 3 min,循环次数分别为 15、18、21、24、27 次。采用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳,根据电泳结果确认最佳循环次数。对 PCR 产物进行纯化处理,电泳确认纯化效果。

1.3.2 cDNA 酶切及确认 采用限制性内切酶 Rsa I 对 K562 细胞及 K562/DOX 细胞 cDNA 进行酶切,反应体系为最佳产物 cDNA 300 μL,10×Rsa I 酶切缓冲液 36 μL,Rsa I 1.5 μL,反应条件为 37℃ 3 h。采用 1% 琼脂糖凝胶对 10 μL 未酶切

的 cDNA 和 10 μ L Rsa I 酶切后的 cDNA 进行电泳,同时加入 8 μ L 乙二胺四乙酸/糖原混合物终止反应,2% 琼脂糖凝胶电泳确认产物。

1.3.3 连接反应 以人骨骼肌细胞 DNA 作为对照组 (Control 组),将 2 μ L DNA 加入 38 μ L dH₂O 中,DNA 终浓度为 150 ng/mL。以 K562/DOX 细胞 DNA 作为检测组 (Tester 组),取 Rsa I 酶切后的 cDNA 产物进行 5 倍稀释。根据接头 (adaptor) 的差异分为 4 个亚组,分别为 K562/DOX Tester1-1 组、K562/DOX Tester1-2 组、Control Tester1-1 组和 Control Tester1-2 组。为检测连接是否正常,加入 1 μ L 20 乙二胺四乙酸/糖原混合物终止反应,72 $^{\circ}$ C 预热 5 min,反应体系为 cDNA 2 μ L,T4 DNA 连接酶 1 μ L,adaptor1/adaptor2R 2 μ L;反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,68 $^{\circ}$ C 2.5 min,共 25 个循环,电泳确认反应结果。

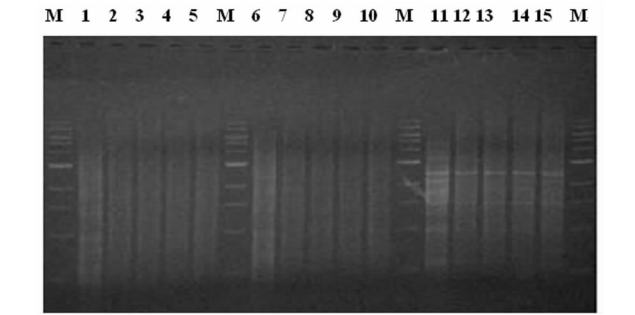
1.3.4 差减杂交反应 将 Rsa I 酶切处理的 cDNA 分别与连接产物进行第 1 轮杂交;反应条件:98 $^{\circ}$ C 90 s,68 $^{\circ}$ C 8 h。将第 1 轮杂交产物混合进行第 2 轮杂交;反应条件:98 $^{\circ}$ C 90 s,68 $^{\circ}$ C 过夜。

1.3.5 PCR 扩增反应 第 1 次 PCR 扩增反应体系为杂交产物/未杂交产物/Control 杂交产物/阴性对照品各 1 μ L,10 $\times$ 含 Mg²⁺ 的 AdvantageTM PCR 缓冲液 2.5 μ L,50 $\times$ dNTP 混合物 (每种 dNTP 浓度为 10 mmol/L)0.5 μ L,50 $\times$ AdvantageTM 聚合酶混合液 (2.5 U/ μ L)0.5 μ L,PCR 引物 1 (10 μ mol/L)1 μ L;反应条件:75 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,66 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 27 个循环,电泳确认 PCR 产物。为富集 PCR 产物,取 1 μ L 稀释后的第 1 次 PCR 反应产物进行第 2 次 PCR 反应。

1.3.6 阳性克隆筛选与确认 采用 DNA 片段纯化试剂盒精制第 2 次 PCR 反应产物,命名为 CTD809 PCR,使用 DNA 连接试剂盒对 CTD809 PCR 与 pMD19-T 载体进行连接;连接产物经热转化大肠埃希菌后涂布平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;挑选单克隆菌落筛选阳性克隆;提取阳性克隆菌落质粒,由宝生物工程 (大连)有限公司进行测序;采用 Gene Bank 数据库对测序结果进行比对分析,确认差减杂交文库是否构建成功。

2 结 果

2.1 cDNA 合成及确认最佳 PCR 产物 对循环次数分别为 15、18、21、24、27 次的反应产物各 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (见图 1),确认最佳循环次数为 15 次。

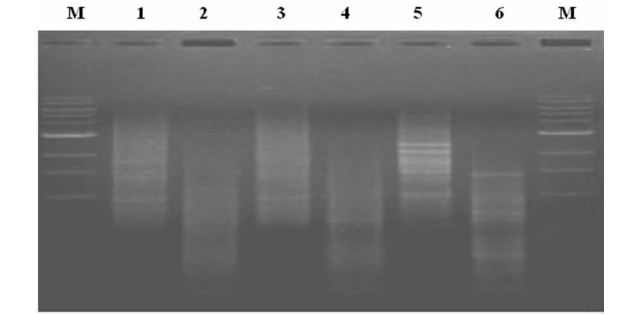


M: 1 Kb DNA Ladder 分子标记物;1~5:K562 细胞 cDNA 合成产物;6~10:K562/DOX 细胞 cDNA 合成产物;11~15:小鼠 cDNA 合成产物。

图 1 PCR 反应产物电泳结果

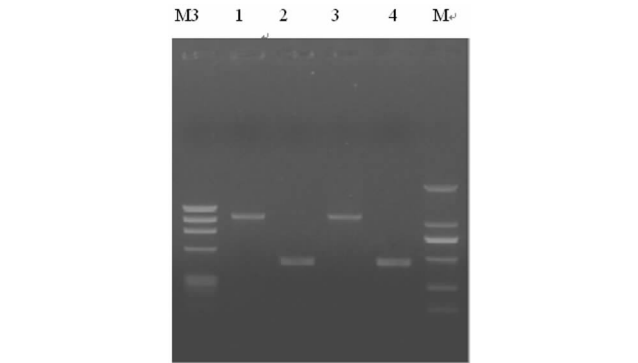
2.2 cDNA 酶切及确认 采用限制性内切酶 Rsa I 对 cDNA

产物进行酶切,产生末端平头的片段。将未酶切和酶切的产物各 10 μ L 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 (见图 2)。



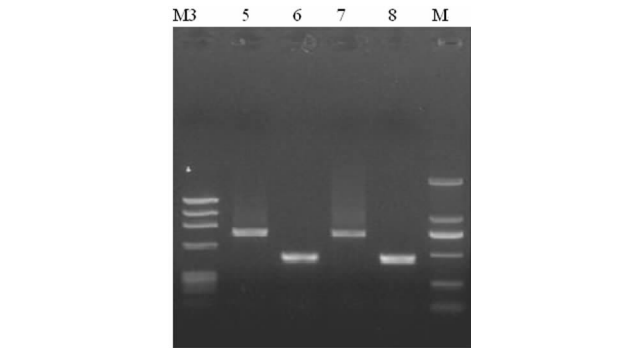
M: 1 Kb DNA Ladder 分子标记物;1:K562 细胞 cDNA 未酶切产物;2:K562 细胞 cDNA Rsa I 酶切产物;3:K562/DOX 细胞 cDNA 未酶切产物;4:K562/DOX 细胞 cDNA Rsa I 酶切产物;5:小鼠 cDNA 未酶切产物;6:小鼠 cDNA Rsa I 酶切产物。

图 2 Rsa I 酶切产物电泳结果



M3: Φ X174 Hae III 酶切产物;1: Tester1-1 PCR 产物 (小鼠);2: G3PDH 3'Primer PCR 产物 (小鼠);3: Tester1-2 PCR 产物 (小鼠);4: G3PDH 5'Primer PCR 产物 (小鼠);M: DL2000 DNA 分子标记物。

图 3 连接反应 PCR 产物电泳结果



M3: Φ X174 Hae III 酶切产物;5: Tester1-1 PCR 产物 (K562/DOX 细胞);6: G3PDH 3'Primer PCR 产物 (K562/DOX 细胞);7: Tester1-2 PCR 产物 (K562/DOX 细胞);8: G3PDH 5'Primer PCR 产物 (K562/DOX 细胞);M: DL2000 DNA 分子标记物。

图 4 检测反应 PCR 产物电泳结果

2.3 连接反应 Control 组和检测组标本分别连接不同的 cDNA adaptor (即 adaptor1 和 adaptor2R)。adaptor 的末端无磷酸基团,仅有 adaptor 的 1 条链与 cDNA 5'末端相连,adaptor1 和 adaptor2R 具有不同的序列,因此当残留末端被补平后,可同时与 2 个不同的 PCR 引物进行退火连接反应。为检测连接效率,将产物各 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (见图 3、

4)。电泳结果表明连接效率大于 25%，符合后续实验要求。

2.4 PCR 扩增 在第 1 次 PCR 扩增中，两端连接有不同 adaptor 的差异表达序列能够进行指数扩增，仅有一端连接 adaptor 或两端连接同一 adaptor 形成发卡结构时，只能进行线性扩增，没有引物结合位点则不能进行扩增。第 1 次 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果(见图 5)显示，Control 组与 Tester 组杂交 PCR 产物大小分别为 720、900 bp。第 1 次 PCR 扩增产物丰度低，为了富集产物进行第 2 次 PCR 扩增产物，扩增产物电泳结果(见图 6)显示产物丰度明显增加，阳性对照扩增产物条带明显，阴性对照无扩增产物。

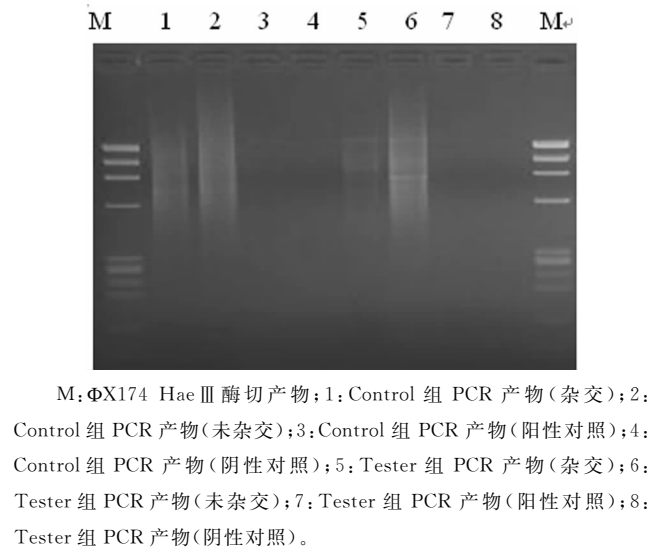


图 5 第 1 次 PCR 产物电泳结果

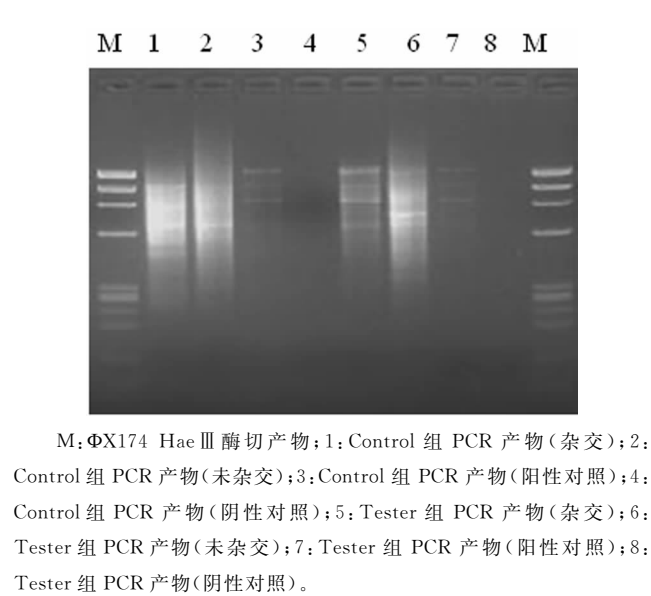


图 6 第 2 次 PCR 产物电泳结果

2.5 阳性克隆筛选及确认 挑选 24 个单克隆菌落进行阳性克隆筛选，质粒测序结果显示，在 15 个具有插入片段的阳性克隆中共有 220 个差异基因。经 Gene Bank 数据库比对分析，选出覆盖率 90% 和相似度 98% 以上的差异基因 122 个，舍去 98 个覆盖率和相似度较小的差异基因。在选出的 122 个差异基因中，包括 34 个线粒体相关基因、10 个甘油三磷酸脱氢酶基因、4 个核糖体基因、3 个支原体基因、7 个血红蛋白(HBE1)基因、1 个凝血因子Ⅷ基因、1 个热休克因子结合蛋白 1(HSBP1)

基因和 62 个未知基因。

3 讨论

肿瘤细胞耐药基因的存在不但影响化疗效果，也影响患者预后。耐药基因的表达是肿瘤细胞产生多药耐药性的分子基础。因此，鉴定耐药细胞和非耐药细胞间的差异基因是阐明耐药性发生机制的重要手段。本研究选用遗传背景相同的非耐药 K562 细胞与 K562/DOX 耐药细胞，经 SSH 筛选得到相关差异基因，部分差异基因具有生物学功能，在肿瘤细胞产生耐药性方面具有更大的作用。

较高浓度水平的 cDNA 是顺利完成 SSH 实验的必备条件，而本研究中的限制性酶切产物电泳结果显示，逆转录合成的 K562/DOX 和 K562 细胞 cDNA 水平无法满足 SSH 实验的要求。因此，本研究采用 PCR 扩增富集的方法使 cDNA 水平达到 300 ng/ μ L。此外，本研究将 cDNA 合成条件分别设定为 15、18、21、24、27 次循环，合成产物电泳结果显示 15 次循环得到的 cDNA 产物浓度水平最高，为最佳循环次数。而在选择阳性对照时，最初选择了可应用于 SSH 实验的小鼠总 RNA，但 PCRC 产物电泳图显示实验结果不理想，推测原因可能是受到种系同源性因素的影响。因此，本研究选用人骨骼肌细胞 cDNA 作为阳性对照。

在应用 SSH 技术后，本研究选择 24 个单克隆菌落进行质粒测序，在 15 个有插入片段的阳性克隆中共获得 220 个差异基因。经 Gene Bank 比对分析，选出覆盖率为 90% 和相似度为 98% 以上差异基因 122 个，其中线粒体相关基因共 34 个，包括 22 个线粒体基因、11 个人类离子细胞内通道蛋白(CLIC2)基因、1 个电位依赖性离子通道 3(VDAC3)基因。线粒体基因在多药耐药肿瘤细胞和非耐药肿瘤细胞间呈明显的差异表达，提示线粒体基因的表达可能与肿瘤细胞产生多药耐药性密切相关。

电位依赖性离子通道(VDAC)也称线粒体穿孔蛋白，在线粒体外膜中表达水平较高，VDAC3 是 VDAC 的 3 种异构体之一。线粒体可感受细胞能量代谢水平的变化，进而影响核基因的表达^[3]。有研究证实，离子通道尤其是 VDAC 参与了肿瘤细胞的演化，在调节细胞周期方面具有重要作用^[4]。因此，VDAC 是近年来外源化学物所致细胞凋亡机制研究领域的热点之一。VDAC 基因表达水平增高或降低均影响线粒体功能，与细胞生存及凋亡密切相关^[5]。肿瘤细胞膜上也分布着不同类型的离子通道，并与肿瘤的发生、发展密切相关，其中 VDAC 基因的表达与肿瘤的形成有关，但与白血病细胞多药耐药性的相关性研究未见报道。本研究证实 VDAC3 基因可能在白血病细胞产生多药耐药性方面具有一定的作用，但具体作用机制有待进一步研究证实。

核糖体蛋白 S4-X 基因亦为耐药与非耐药白血病细胞差异基因之一。核糖体参与基因的复制、转录，具有调控机体发育等功能，与正常细胞的恶性转化及肿瘤细胞产生耐药性密切相关。本研究也筛选出具有差异表达的 3 个支原体基因，分别是支原体基因 JER、M64、PG18。支原体基因的高表达可能引起肿瘤细胞生物学行为的改变，提示支原体基因的异常表达与肿瘤的发生有潜在的相关性。

此外，10 个甘油三磷酸脱氢酶基因、1 个凝血因子Ⅷ基因、7 个 HBE1 基因、1 个 HSBP1 基因和 62 个未(下转第 748 页)

350.

[2] Elena S, Angela M, Antonio S, et al. Chronic migraine does not increase posterior circulation territory (PCT) infarct-like lesions[J]. J Neurol Sci, 2014, 336(12): 180-183.

[3] 李蔚, 陈果, 曹晓红. 监测血清降钙素原水平以优化慢性阻塞性肺疾病的抗感染治疗策略[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(1): 64-67.

[4] Haasper C, Kalmbach MGD, Meller R, et al. Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis[J]. Technol Health Care, 2010, 18(20): 89-100.

[5] 侯昕珩, 江莲, 谢伟国, 等. 血清降钙素原 PCT 检测在发热待查病因初筛的临床应用[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(12): 1847-1848.

[6] 刘建成, 和明丽, 丁奇龙. 血清降钙素原检测对慢性阻塞性肺疾病急性加重期治疗的指导意义[J]. 中国医药指南, 2011, 15(23): 21-23.

[7] Mariella D, Ruggero B, Cecilia G, et al. Analytical evaluation of Diazyme procalcitonin (PCT) latex-enhanced immunoturbidimetric assay on Beckman Coulter AU5800[J]. CCLM/FESCC, 2015, 53(4): 593-597.

[8] 李蔚, 陈果, 曹晓红. 监测血清降钙素原水平以优化慢性阻塞性肺疾病的抗感染治疗策略[J]. 中华实验和临床感染病杂志, 2013, 7(1): 78-79.

[9] Marketa C, Markova H, Brodska K, et al. Substantially elevated C-reactive protein (CRP), together with low levels of procalcitonin (PCT), contributes to diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients[J]. Support Care Cancer, 2013, 21(10): 2733-2742.

[10] 梅蕊, 王东升, 葛平. 血清降钙素原指导神经内科 ICU 重症患者抗感染的临床价值研究[J]. 南昌大学学报: 医学版, 2012, 52(9): 47-49.

[11] Pawe W, Kopyra A, Seremak-Mrozikiewicz K, et al. Usefulness of PCT, IL-6, CRP measurement in the prediction of intraamniotic infection and newborn status in pregnant women with premature rupture of membranes[J]. Ginekologia Polska, 2010, 81(5): 336-341.

[12] 崔庆, 尹晓红, 张仁峰, 等. 血清降钙素原与 C 反应蛋白在感染性开放性骨折诊断中的应用价值[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17(13): 1034-1035.

[13] Neelima V, Shaloo K, Deepa R, et al. PCT as a prognostic marker in cardiac patients with neutropenic sepsis: two case reports[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 29(1): 107-111.

[14] 武夏. 血清降钙素原测定对合理应用抗生素治疗 AECOPD 的作用[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(17): 654-655.

[15] Masaki T, Masato W, Akira N, et al. Serial quantification of procalcitonin (PCT) predicts clinical outcome and prognosis in patients with community-acquired pneumonia (CAP) [J]. J Infect Chemother, 2014, 20(2): 97-103.

[16] Kerim B, Nima E, Daniel H, et al. The value of perfusion computed tomography (PCT) imaging after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review of the current data[J]. Acta Neurochir Suppl, 2015, 120(12): 35-38.

(收稿日期: 2015-11-26)

(上接第 745 页)

知基因也是差异表达基因, 可能在白血病细胞产生耐药性方面具有一定的作用。HSBP1 可结合热休克蛋白 70 (HSP70) 基因启动子, 减弱或阻止 HSP70 基因的转录。HSBP1 是线粒体的“分子伴侣”之一, 但与白血病细胞多药耐药性的相关性研究未见报道。本研究结果显示, HSBP1 基因与 VDAC3 基因都可能参与了白血病多药耐药的形成, 具体作用机制有待进一步研究证实。笔者推测, HSBP1 基因的差异表达可能是调控 VDAC 基因参与肿瘤细胞产生耐药性的关键因素。VDAC3 基因启动子区可能含有热休克元件 (HSE), HSBP1 通过与 HSE 的结合调控 VDAC 基因的表达^[6-7]。

综上所述, 本研究采用 SSH 技术成功构建了 K562/DOX 细胞与 K562 细胞的差异表达基因, 且多数差异表达基因为线粒体相关基因, 提示线粒体基因的表达在白血病细胞产生耐药性方面具有关键作用。本研究也筛选出一些罕见报道的基因, 如 HSBP1 基因。这些具有调控作用的基因在白血病细胞产生耐药性中的作用更值得注意, 其与线粒体相关基因的关系值得深入研究和分析。

参考文献

[1] Luzi C, Brisdelli F, Cinque B, et al. Differential sensitivity to resveratrol induced apoptosis of human chronic myeloid (K562) and acute lymphoblastic (HSB2) leukemia cells[J]. Biochem Pharma-

col, 2004, 68(16): 2021-2030.

[2] Zheng GH, Fu JR, Xu YH, et al. Screening and cloning of multi-drug resistant genes in HL-60/MDR cells[J]. Leuk Res, 2009, 33(8): 1120-1123.

[3] Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death[J]. Mol Aspects Med, 2010, 31(3): 227-285.

[4] Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, et al. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signaling, cell life and cell death[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(18): 2249-2270.

[5] Yuan S, Fu Y, Wang X, et al. Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis[J]. FASEB J, 2008, 22(8): 2809-2820.

[6] Dong XY, Pang XW, Yu ST, et al. Identification of genes differentially expressed in human hepatocellular carcinoma by a modified suppression subtractive hybridization method[J]. Int J Cancer, 2004, 112(2): 239-248.

[7] Huang Y, Cai X, Zou Z, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of three heat shock responsive genes from *Halotis diversicolor* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 36(2): 590-599.

(收稿日期: 2015-11-13)