

乳腺癌耐药蛋白 BCRP 高表达细胞株的构建

应 帅, 郑婷婷, 陈培远, 许传莲

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: BCRP 属于 ABC 转运蛋白超家族 G 亚族的第二位成员,是导致临床乳腺癌治疗失败的最主要原因之一。通过构建 pLJM1-*bcrp* 重组质粒,利用病毒侵染的方法,将重组质粒转染至乳腺癌细胞株 MCF-7 中,通过嘌呤霉素筛选得到 BCRP 稳定高表达的细胞株 MCF-7/BCRP,并利用半定量 RT-PCR 和 Western-blot 进行分析,分别从 mRNA 水平和蛋白质水平研究 BCRP 的表达。

关键词: BCRP/ABCG2; 重组表达载体; 病毒侵染

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A

0 引 言

BCRP(breast cancer resistance protein)属于 ABC 转运蛋白超家族 G 亚族的第二位成员,能够利用 ATP 水解提供的能量将化学治疗药物排出细胞外,是造成癌细胞耐药性(multidrug resistance, MDR)的主要原因^[1]。

BCRP 基因位于染色体 4q22,全长 66 kb,由 16 个外显子和 15 个内含子组成,编码 655 个氨基酸,蛋白大小为 72 kDa。BCRP 仅由一个 ATP 结合结构域和一个由 6 个 α 螺旋结构的横跨膜结构域组成,与其他的全转运蛋白如 P-gp 或 MRP1(含两个或两个以上的 MSD 和 NBD 结构)相比,BCRP 可定义为半转运蛋白^[2]。BCRP 最早发现于阿霉素抗性的乳腺癌细胞株 MCF-7/AdrVP^[3]中。随后, Miyake k, Allikmets R 等相继从米托蒽醌抗性的直肠癌细胞株(名为 MXR)^[4]和人类胎盘组织(命名为 ABCP)^[5]中克隆得到类似基因。

BCRP 主要分布在具有分泌和排泄功能的组织中。BCRP 作为一种高效的外排泵在对药物等外源性物质在体内的吸收、分布、排泄过程发挥着重要作用。许多研究认为 BCRP 在药物的处理和组织保护中也起到了重要作用^[1-6]。此外,越来越多的研究

表明 BCRP 在干细胞中广泛表达,可作为多种肿瘤干细胞的标记物^[7-8]。

本文采用病毒侵染的方法拟构建 BCRP 高表达的稳定细胞株,并利用 Western-blot 和半定量 RT-PCR 方法分别从蛋白质水平以及基因水平进行验证。筛选 BCRP 高表达细胞株可为后续研究 BCRP 的外排功能以及筛选逆转耐药性药物提供了细胞模型。

1 实验材料与方法

1.1 材料与试剂

BCRP cDNA(GENBANKBC021281.2)购自广州复能基因有限公司;BCRP 单克隆抗体购自 Epitomics 公司;DNA 限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco* R I 购自 Takara 公司;反转录试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司。慢病毒质粒 pLJM1 及其两个包装质粒(PsPA2、PMD2. G)、大肠杆菌菌株 Stbl 3、MCF-7 细胞、293T 细胞为本实验室保存。

1.2 载体构建

以 BCRP 的 cDNA 为模板,*bcrp*-A(5'-ATCG-GATCCATGAGCGACGTGGCTATTGTG-3')、*bcrp*-B(5'-ATTGAATTCTCAGGCCGTGCCGCTGGC-3')为引物扩增 *bcrp* 片段。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 10 s,57℃ 退火 30 s,68℃ 延伸

1 min, 反应为 30 个循环; 继续 68℃ 延伸 7 min。经琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 扩增产物及限制性内切酶 *Nhe* I 和 *Eco*R I 酶切后, 与 pLJM1 质粒连接, 得到重组质粒 pLJM1-*bcrp*。

1.3 病毒包装

取对数生长期的 293T 细胞传代, 将 6×10^5 个/mL 293T 细胞接种至 10 cm 的培养皿中培养 24 h, 转染时细胞汇合度达 30%~40% 左右; 转染前将待转染细胞培养基换为无血清培养基培养 3 h; 将慢病毒质粒按照 pLJM1/*bcrp* (或 pLJM1) 10 μ g, PsPA2 5.5 μ g, PMD2. G 5 μ g 的比例混合, 至 400 μ L 无血清 MEM 培养基中, 轻轻吹打混合均匀; 另取一 EP 管, 将 20 μ L Transfers 加入至 400 μ L 无血清 MEM 培养基中, 轻轻吹打混合均匀, 室温孵育 5 min。混合两管培养基 (总体积 800 μ L) 轻轻吹打混合均匀, 室温孵育 20 min; 转染前用 6 mL 无血清培养基, 将上述混合的培养基逐滴加入培养皿中。37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 8 h 后换成 10% 血清的 DMEM 培养基培养; 48 h 后收集病毒, 取上清培养基至 15 mL 离心管中, 6 000 r/min, 4℃ 离心 3 min, 收集上清。加入新鲜培养基, 并保存于 -80℃。

1.4 病毒侵染及稳定株的筛选

取对数生长期的 MCF-7 细胞, 用 0.25% 的胰酶消化后接种于 10 mL 培养皿中, 确保侵染时细胞汇合度为 40%, 培养 48 h 后滴加 4 mL 病毒液侵染 MCF-7 细胞; 侵染 24 h 后换成 10% FBS 的 MEM 培养基培养; 侵染后的 MCF-7 细胞用 1 μ g/mL 的嘌呤霉素 (puromycin) 进行筛选。以未侵染 MCF-7 细胞作为对照, 嘌呤霉素的用量以对照组细胞在 3~5 d 内全部死亡为佳。筛选的细胞每隔 2 d 换含有嘌呤霉素的 MEM 培养基培养, 细胞密度达 80% 即可传代培养用于后续实验的研究, 冻存筛选好的稳定株, 用于后续实验。

1.5 Western-blot

在筛选得到 MCF-7/BCRP 细胞株后, 收取 MCF-7/BCRP 以及对照组 MCF-7 细胞, 经 Trizol 试剂裂解、Bradford 法蛋白定量后, 进行 Western-blot 检测目的蛋白 BCRP 的表达情况。

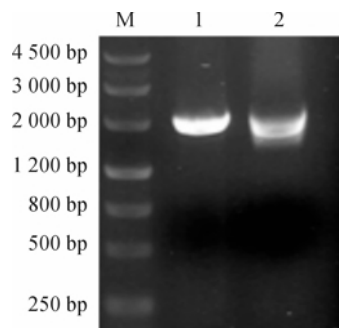
1.5 半定量 RT-PCR

提取 MCF-7/BCRP、MFC-7 细胞的总 RNA 后, 以 *bcrp*-A (5'-GAAACCTGGTCTCAACGC-3'), *bcrp*-F (5'-AGAGTGCCCATCACAACA-3') 为引物进行逆转录 RT-PCR 法, 从分子水平上检测高表达细胞株及其对照组中目的基因的表达差异。

2 结果与分析

2.1 pLJM1/*bcrp* 重组载体的构建

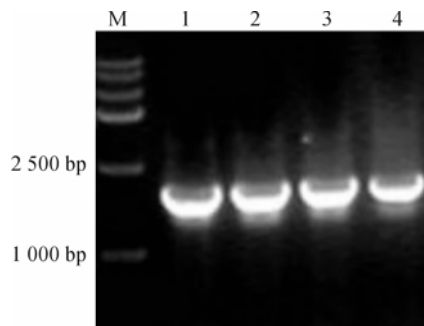
a) PCR 扩增得到 *bcrp* 片段 (图 1), 电泳结果显示, 条带大小在 2 000 bp 左右, 与预期大小相符。



M: DL4500 Marker; 1, 2: *bcrp* PCR 扩增产物

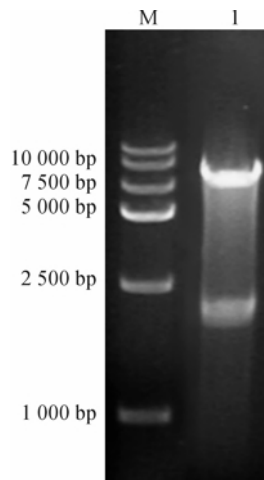
图 1 目的片段 *bcrp* 的 PCR 扩增电泳鉴定

b) 双酶切 PCR 片段和 pLJM1 质粒, 经 T₄ DNA 连接酶连接过夜, 转化, 涂布于固体 LB 培养基平板上筛选单克隆, 挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定 (图 2) 及提取质粒进行双酶切鉴定 (图 3)。图 2 结果显示, 条带大小在 Marker 的 2 500 bp 与 1 000 bp 条



M: DL15000 Marker; 1-4: *bcrp* 的菌落 PCR 扩增产物

图 2 pLJM1-*bcrp* 的菌落 PCR 鉴定



M: DL15000 Marker; 1: 重组质粒 pLJM1-*bcrp* 双酶切电泳图

图 3 pLJM1-*bcrp* 的双酶切鉴定

带之间,与预期大小 2 000 bp 相符;图 3 结果显示,条带大小分别在 Marker 的 2 500 bp 和 1 000 bp 之间,以及 10 000 bp 和 7 500 bp 条带之间,与预期大小相符。综合上述结果,证明重组表达载体构建成功,可用于后续细胞转染实验。

2.2 MCF-7/BCRP 细胞株的构建结果

经病毒包装的重组表达载体侵染 MCF-7 细胞后,用一定浓度的嘌呤霉素进行持续筛选,得到少量存活的细胞,初步断定为 MCF-7/BCRP 细胞。如图 4 所示,筛选后得到的 MCF-7/BCRP 细胞与 MCF-7 相比,细胞形态变得更加扁平,饱满度有所下降。

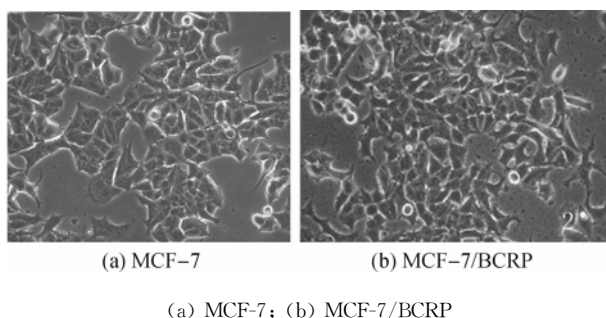
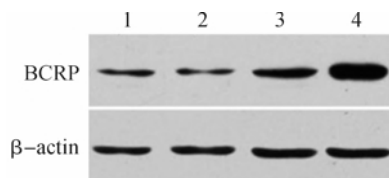


图 4 嘌呤霉素筛选侵染 pLJM1-*bcrp* 的 MCF-7 细胞

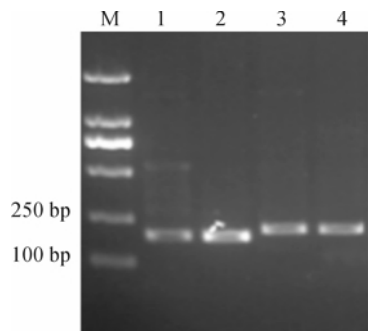
图 5 的 Western-blot 结果显示,MCF-7/BCRP 细胞株中 BCRP 表达量明显高于野生型及空载体转染的 MCF-7 细胞,该实验结果从蛋白质水平说明 BCRP 高表达细胞株构建成功。



1: MCF-7; 2: MCF-7/pLJM1;
3: MCF-7/BCRP1; 4: MCF-7/BCRP2

图 5 Western-blot 结果

提取 MCF-7/BCRP 及 MCF-7 细胞的总 RNA 后进行半定量 RT-PCR 分析,结果显示(图 6),BCRP



M: DL2000 Marker; 1: 对照组 *bcrp*; 2: 实验组 *bcrp*;
3: 对照组 β -actin; 4: 实验组 β -actin

图 6 RT-PCR 电泳结果

高表达细胞株中 *bcrp* 的表达量(泳道 2)明显高于对照组 MCF-7 细胞中的表达量(泳道 1),片段大小为 187 bp,泳道 3、4 为 β -actin,该实验结果从分子水平上证实 BCRP 高表达细胞株构建成功。

3 讨 论

BCRP 作为 ABC 超家族 G 家族的新成员,由于其特殊的结构^[2] 以及重要生化特性^[9] 和生理功能^[10],尤其在肿瘤的发生^[11]、诊断^[12]、治疗^[13] 中潜在的应用前景而越来越受到人们的关注,成为 ABC 转运蛋白结构与功能及其与多药耐药性相关研究的重要热点之一。近 10 多年来对 BCRP 转运蛋白的生理功能、转运机制、临床耐药机制及其耐药逆转的研究虽然取得了一定进展,然而还有待于进一步深入。

目前,对 BCRP 体内外功能研究方面已经取得了较大的进展,确认了越来越多的底物和抑制剂,以及 BCRP 对这些外源性或内源性底物在吸收、排泄、分布等方面发挥的重要作用。BCRP 不仅广泛分布于人的多种正常组织中,是血脑屏障、胎盘屏障、血睾屏障等重要生理屏障的组成部分,同时也高表达于某些血液肿瘤和实体瘤中。而 BCRP 在干细胞的侧群细胞中的保守表达为干细胞提供了一种保护功能,并可作为区分某些干细胞的标记物。因此,通过对正常细胞与肿瘤细胞中 BCRP 表达及功能的差异点,以寻求合适的作用于肿瘤细胞及肿瘤干细胞的药物靶点,可作为肿瘤治疗新的研究方向。此外,BCRP 具有促进干细胞的增殖及阻止其分化等特殊作用,这也揭示了 BCRP 在干细胞治疗方面具有潜在的应用前景^[14]。

虽然人们早已意识到 BCRP 在肿瘤细胞多药耐药性中发挥重要作用,但是通过使用 BCRP 的抑制剂避免癌症患者对临床药物耐药性的治疗方法还未实现。这就需要进一步开发高抑制效能、高特异性、低毒的 BCRP 抑制剂以及合理设计临床试验。此外,更加深入全面地了解 BCRP 的作用机制更为重要。例如 BCRP 如何识别底物以及其拥有广谱特异性底物的决定因素? 如何转运底物以及在底物转运过程中如何与 ATP 的水解相偶联? 对这些问题的答案仍未清楚,迫切需要进行进一步地研究解决这些问题^[15]。

相信随着新的实验技术的应用、药物基因组学的发展、新突变位点的发现,必将有助于进一步阐明 BCRP 转运蛋白的生理功能及其转运机制。

本研究利用病毒转染优势构建的 BCRP 高表达细胞株 MCF-7/BCRP 可为后续研究 BCRP 的外

排功能以及肿瘤细胞的耐药性提供细胞模型。

参考文献:

- [1] Mao Q, Unadkat J D. Role of the breast cancer resistance protein(abcg2) in drug transport[J]. The AAPS Journal, 2005, 7(1): 118-133.
- [2] McDevitt C A, Collins R F, Conway M, et al. Purification and 3d structural analysis of oligomeric human multidrug transporter abcg2[J]. Structure, 2006, 14(11): 1623-1632.
- [3] Doyle L A, Yang W, Abruzzo L V, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(26): 15665-15670.
- [4] Miyake K, Mickley L, Litman T, et al. Molecular cloning of cdnas which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells; demonstration of homology to abc transport genes[J]. Cancer Research, 1999, 59(1): 8-13.
- [5] Allikmets R, Schriml L M, Hutchinson A, et al. A human placenta-specific atp-binding cassette gene(abcp) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance[J]. Cancer Research, 1998, 58(23): 5337-5339.
- [6] Karthika N, Yi X, Maria R B, et al. Role of breast cancer resistance protein(BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance[J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 83(8): 1084-1103.
- [7] Zhou S, Schuetz J D, Bunting K D, et al. The abc transporter bcrp1/abcg2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype[J]. Nature Medicine, 2001, 7(9): 1028-1034.
- [8] Ahmed F, Arseni N, Glimm H, et al. Constitutive expression of the atp-binding cassette transporter abcg2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors[J]. Stem Cells, 2008, 26(3): 810-818.
- [9] Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, et al. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of s-s dependent homodimerization[J]. International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer, 2002, 97(5): 626-630.
- [10] Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg M F, et al. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)[J]. Current Drug Metabolism, 2010, 11(7): 603-617.
- [11] Gao K X, Xu H, Huang L, et al. The expression of ABCG2 protein and its significance in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Modern Oncology, 2009, 17(6): 1068-1070.
- [12] Rabindran S K, He H, Singh M, et al. Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin c[J]. Cancer Research, 1998, 58(24): 5850-5858.
- [13] Yang C H, Chen Y C, Kuo M L. Novobiocin sensitizes bcrp/mxr/abcp overexpressing topotecan-resistant human breast carcinoma cells to topotecan and mitoxantrone[J]. Anticancer Research, 2003, 23(3B): 2519-2523.
- [14] Ding X W, Wu J H, Jiang C P. Abcg2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy[J]. Life Sciences, 2010, 86(17/18): 631-637.
- [15] Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg M F, et al. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (bcrp/abcg2)[J]. Current Drug Metabolism, 2010, 11(7): 603-617.

Establishment of Highly Expressed Cell Strain of Breast Cancer Resistance Protein BCRP

YING Shuai, ZHENG Ting-ting, CHEN Pei-yuan, XU Chuan-lian

(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: BCRP is the second member of ABC transport protein superfamily G subtribe and one of the main reasons causing the failure of breast cancer therapy. This paper transfects recombinant plasmid into breast cancer cell strain MCF-7 with the method of virus infection through the establishment of pLJM1-bcrp recombinant plasmid, obtains BCRP stable and highly expressed cell strain MCF-7/BCRP through puromycin screening, conducts analysis using semiquantitative RT-PCR and Western-blot and studies the expression of BCRP respectively from mRNA level and protein level.

Key words: BCRP/ABCG2; recombinant expression vector; virus infection

(责任编辑: 许惠儿)