

医学与免疫生物技术

# 循环包装回收技术在筛选肝癌细胞相关耐药基因中的应用

戴文燕, 朱瑞宇, 金坚

江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122

戴文燕, 朱瑞宇, 金坚. 循环包装回收技术在筛选肝癌细胞相关耐药基因中的应用. 生物工程学报, 2016, 32(2): 204–211.

Dai WY, Zhu RY, Jin J. Screening of drug resistant gene by cyclical packaging rescue of hepatocellular carcinoma retroviral cDNA libraries. Chin J Biotech, 2016, 32(2): 204–211.

**摘要:** 肝癌先天性多表达多药耐药基因, 严重影响肝癌的化疗效果, 筛选肝癌细胞中的耐药基因, 研究其耐药机制有助于提高肝癌化疗效果, 提高肝癌的治愈率。首先构建肝癌细胞逆转录病毒的 cDNA 文库, 感染成纤维细胞, 使得逆转录病毒基因整合进细胞, 加药筛选, 存活细胞中的基因再次包装成病毒, 用于下一轮筛选。采用循环包装回收 (Cyclical packaging rescue, CPR) 技术进行肝癌细胞耐药基因的筛选即是通过病毒包装将基因从细胞中钓取出来, 相比于常规筛选方法, 仅通过一轮筛选可能会出现很多假阳性基因, 采用 CPR 技术则是通过多轮筛选, 很大程度减少了假阳性细胞的出现。通过该方法经过四轮筛选获得核糖体蛋白 S11 (RPS11)、核糖体蛋白 L6 (RPL6)、核糖体蛋白 L11 (RPL11)、核糖体蛋白 L24 (RPL24) 等几种基因, 经初步检测, 增加了细胞的耐药性。

**关键词:** 循环包装回收技术, 肝癌, cDNA 文库, 耐药基因

**Received:** March 17, 2015; **Accepted:** April 27, 2015

**Corresponding authors:** Jian Jin. Tel: +86-510-85918219; E-mail: jinjian31@hotmail.com

Ruiyu Zhu. E-mail: ry\_zhu@sina.com

网络出版时间: 2015-06-04

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150604.0914.001.html>

## Screening of drug resistant gene by cyclical packaging rescue of hepatocellular carcinoma retroviral cDNA libraries

Wenyan Dai, Ruiyu Zhu, and Jian Jin

School of Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** Multidrug resistant genes are highly expressed in hepatocellular carcinoma that seriously affects the effect of chemotherapy. Screening of resistant genes from HCC cells and studying its mechanism of drug resistance will be helpful to improve the efficacy of chemotherapy for hepatocellular carcinoma. Here we described an alternative method called cyclical packaging rescue (CPR). First we constructed a retrovirus cDNA library of hepatoma cells and used it to infect fibroblasts. Then we added drugs to screen survival cells. The survival cells, stably integrated helper-free retroviral libraries, were recovered rapidly after transfection with plasmids expressing retroviral gag-pol and env genes. Through this method, retroviral RNAs were directly repackaged into new infectious virions. Recovered retroviral supernatant was then used to reinfect fresh target cells. When performed in concert with selection using functional assays, cDNAs regulating functional responses could be identified by enrichment through multiple rounds of retroviral library recovery and retransmission. Using CPR, we obtained several cDNAs. After a preliminary detection, we found Ribosomal protein S11 (RPS11), Ribosomal protein L6 (RPL6), Ribosomal protein L11 (RPL11), Ribosomal protein L24 (RPL24) possibly had drug resistant function.

**Keywords:** cyclical packaging rescue, hepatocellular carcinoma, cDNA libraries, drug resistant genes

近年来,随着功能基因研究的不断深入,高效快捷的功能基因筛选方法受到广泛关注。循环包装回收(CPR)技术是在2002年美国科学院院报(PNAS)的一篇文献上首次应用,并筛选出多个功能基因<sup>[1]</sup>。此后,对采用CPR技术筛选的功能基因*iRhom2*进行研究,其成果刊登在2012年美国*Science*杂志上<sup>[2]</sup>。CPR技术的成功运用显示了其在功能基因筛选领域的优越性,但是在国内还未曾有使用该技术进行功能基因筛选的相关报道。

CPR技术筛选的一个大致过程如下:首先用逆转录病毒的cDNA文库感染宿主细胞,使得逆转录病毒的cDNA文库中的基因整合到宿主细胞进行表达,再加药处理细胞,使得细胞90%死亡,存活的细胞用逆转录病毒的包装质粒

pGP vector 和 pE-eco vector 将细胞中的基因重新包装成病毒,再用于下一轮感染宿主细胞。

CPR 筛选的具体流程如图 1 所示。

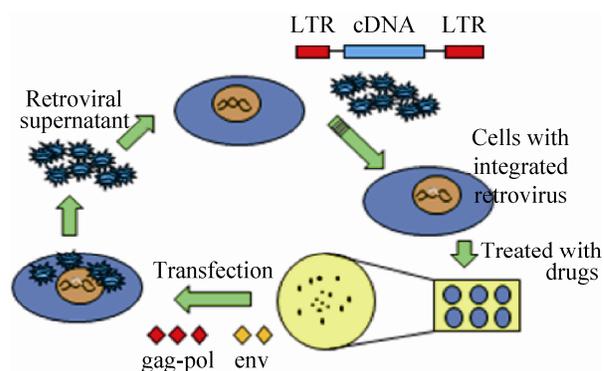


图 1 CPR 筛选流程图

Fig. 1 The flow chart of CPR.

采用 CPR 技术筛选逆转录病毒的 cDNA 文库中的功能基因在很大程度上减少了假阳性细胞的出现,更加高效地从逆转录病毒的 cDNA 文库分离获得功能基因<sup>[3-8]</sup>。

在我国,肝癌被称为“癌症之王”,在恶性肿瘤死亡率中位居第二,仅次于肺癌<sup>[9-11]</sup>。肝癌先天性多表达多药耐药基因,严重影响化疗效果<sup>[12-14]</sup>。因此肝癌治疗过程中的耐药性受到了广泛的关注,促使科研工作者加强对肝癌耐药方面的研究。目前普遍认为肿瘤耐药机制的发生与多种耐药相关的酶和蛋白有关,采用 CPR 技术筛选肝癌细胞耐药基因,研究耐药机制,有助于缓解肝癌耐药,促进肝癌治疗技术的发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂、菌株、细胞株

RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司。SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit 购自 Clontech (美国)。逆转录病毒包装试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。Expand High Fidelity PCR System 购自 Roche 公司。DMEM、1640 细胞培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司。胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。Cell Titer-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay 购自 Promega 公司。293T 细胞、NIH-3T3 细胞、Bel-7402 细胞均为本实验室保存。

### 1.2 肝癌细胞 cDNA 文库的构建

总 RNA 的提取:取对数生长期的肝癌细胞 Bel-7402,加入适量的 Trizol,按照说明书的步骤提取总 RNA,电泳检测 RNA 的完整性,并测定 OD 值检测 RNA 的纯度。

cDNA 文库的构建:根据 Smart cDNA library 构建试剂盒(Clontech)说明书进行肝癌细胞文库的构建。首先以提取的总 RNA 为模板,有 *Sfi* I 酶切位点的 SMART IV Oligonucleotide 和 CDSIII/3' PCR primer 为引物,在反转录酶作用下转录合成 cDNA 第一链。根据 PCR 仪以及模板用量,确定最佳循环数后,合成 cDNA 第二链。双链 cDNA 经蛋白酶 K 消化以及 *Sfi* I 酶切及片段纯化后,进行 DNA 的分级,连接到 pLIB 载体上,转化,提取质粒,获得 cDNA 文库。

cDNA 文库丰度的检测:以 cDNA 文库为模板,载体两端序列为引物进行 PCR 扩增,检测文库的丰度。

### 1.3 逆转录病毒的包装

逆转录病毒表达系统通常是由逆转录病毒载体、两个包膜蛋白载体和包装细胞系组成。本研究选用 293T 细胞作为包装细胞,用连逆转录病毒载体 cDNA 文库、pGP vector 和 pE-eco vector 质粒共转染,分别收集转染 24、48 和 72 h 的病毒,并测定逆转录病毒的滴度。

### 1.4 耐药基因的筛选

CPR 技术是一种循环病毒包装技术。CPR 筛选过程中,首先选择一株比较敏感的成纤维细胞 NIH-3T3 作为宿主细胞,这样就减少了由于宿主细胞耐药产生的假阳性现象。首先 NIH-3T3 细胞铺六孔板,12 h 后细胞汇合度大概在 80%左右,采用稀释适当倍数的逆转录病毒进行感染,48 h 后,撤去病毒上清,将细胞消化到两个直径 10 cm 的细胞培养皿中继续培养 24 h,然后加阿霉素处理细胞 48 h,使得细胞死亡率达到 90%。再次更换新鲜的培养基培养使细胞状态得到恢复,然后转染 pGP vector

和 pE-eco vector 将细胞里面的基因包装成病毒，用于下一轮筛选。转染过的细胞提取细胞基因组，以基因组作为模板，使用载体两端的引物进行 PCR，检测细胞中目的基因的情况。

### 1.5 耐药基因功能的初步验证

PCR 产物中出现特异性条带的部分割胶回收，然后酶切再次连接到逆转录病毒的载体 pLIB 上，转化挑取单菌落，进行测序。然后提取质粒转染宿主细胞，转染 24 h 后，加入不同浓度的阿霉素，48 h 后，采用 Promega 公司试剂盒 CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay 测定宿主细胞耐药指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 肝癌细胞 cDNA 文库的构建

#### 2.1.1 总 RNA 提取和双链 DNA 的合成

在 cDNA 文库构建过程中，RNA 的提取是第一步，这一步骤直接关系到构建的 cDNA 文库的质量，RNA 如果降解将会降低文库的丰度。图 2A 是提取的 RNA 的凝胶电泳图，泳道 M 为 1 kb 的 Marker，泳道 1 为细胞 Bel-7402 的 RNA，显示 28S 和 18S 的条带较亮，28S 条带的亮度约为 18S 亮度的 2 倍，且 5S 的条带几乎看不到，说明 RNA 在提取过程中几乎没有降解。检测 RNA 的  $OD_{280}$  和  $OD_{260}$ ，比值为 1.83。从 RNA 的电泳图以及 RNA 的  $OD_{280}$  和  $OD_{260}$  分析所得，RNA 提取质量符合文库构建的要求。在合成 cDNA 双链的过程中实际上就直接关系到最终连接到载体上的 DNA 片段的大小，所以在这一实验过程中必须保持双链 DNA 的弥散程度，此外不应该有特异性条带出现，特异性条带的出现会导致构建的 cDNA 文库中相同基因的量

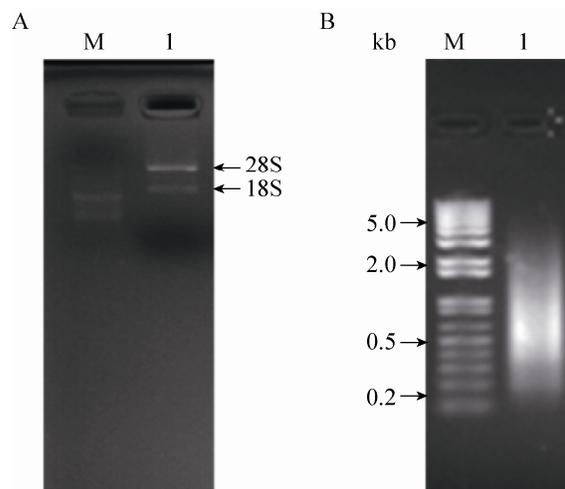


图 2 细胞 Bel-7402 的 RNA 和 dsDNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis analysis of total RNA and dsDNA of Bel-7402.

增加，使得库容量降低。图 2B 中泳道 M 为 1 kb plus Marker，泳道 1 为细胞 Bel-7402 的 dsDNA，由图可知 dsDNA 的条带主要集中在 0.4–2 kb 之间，且没有特异性的条带。

#### 2.1.2 cDNA 文库丰度的检测

cDNA 连接到载体上转化之后进行克隆数计数，本实验中 Bel-7402 细胞转化后共涂 40 个直径 15 cm 的培养皿，为了计算涂布之后的克隆数，选择涂布前的菌液取 2  $\mu$ L 稀释至 100  $\mu$ L，然后涂板计算克隆数，最终乘以稀释倍数，计算总克隆数。此外还计算了空载率大概在 2.7% 左右。除去空载，计算所得 Bel-7402 克隆数大概为  $1.3 \times 10^6$  个。

采用 pLIB 载体 *Sfi* I 酶切位点附近的序列作为引物，检测文库的丰度，电泳结果如图 3 所示，泳道 M 为 1 kb plus 的 Marker，泳道 1 为 Bel-7402 的 cDNA 文库 PCR 的结果，cDNA 片段大小基本在 0.4–2 kb 之间，与 SMART 法构建的 cDNA 文库所要求的片段大小一致。

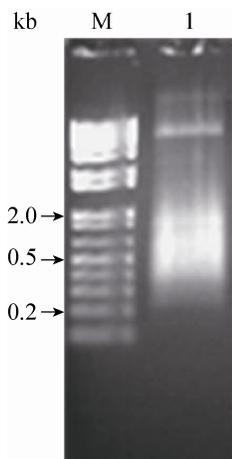


图3 Bel-7402 细胞 cDNA 文库 PCR 电泳图  
Fig. 3 Electrophoresis analysis of PCR of cDNA libraries of Bel-7402.

## 2.2 逆转录病毒滴度测定

病毒包装完成之后必须要对病毒的滴度进行测定，从而确定下一步感染细胞时稀释的倍数。在本实验中采用了荧光定量 PCR 的方法进行病毒滴度的测定。图 4 为荧光定量 PCR 测定模板 RNA 的标准曲线。

依据标准曲线，根据所测样品的  $C_t$  算所测病毒的滴度分别为：

- 24 h 收集的病毒： $2.22 \times 10^6$  ivp/mL；
- 48 h 收集的病毒： $4.19 \times 10^7$  ivp/mL；
- 72 h 收集的病毒： $3.00 \times 10^7$  ivp/mL。

## 2.3 耐药基因筛选

采用 CPR 技术进行耐药基因筛选后，每一轮筛选后的细胞包装过病毒之后提取细胞基因组，进行基因组 PCR，电泳结果如图 5-8 所示（其中 M 为 DL2 000 的 Marker，标号 1、2、3、4……均代表六孔板中同一批次不同孔的细胞所提的基因组）。从结果可以看出，第一轮（图 5）和第二轮（图 6）筛选的条带比较弥散，没有特异

性的条带，而第三轮（图 7）和第四轮（图 8）筛选之后可以发现条带仍比较弥散，但是已经有一些特异性的条带出现，这些特异性的条带中可能就存在具有耐药功能的基因。

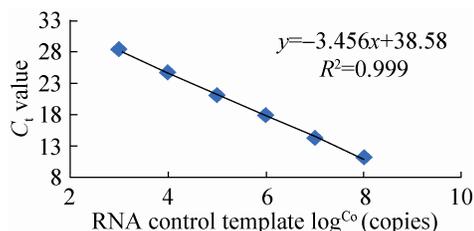


图4 RNA 模板标准曲线  
Fig. 4 A standard curve by using RNA control template.

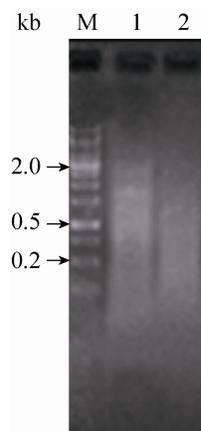


图5 CPR 第一轮筛选细胞基因组 PCR  
Fig. 5 The first selection round of CPR.

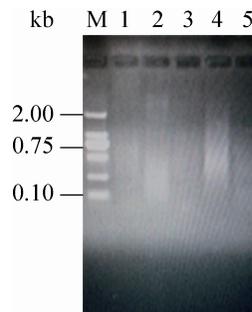


图6 CPR 第二轮筛选细胞基因组 PCR  
Fig. 6 The second selection round of CPR.

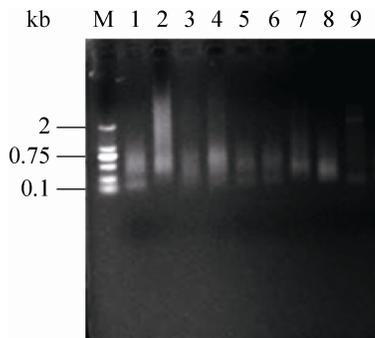


图 7 CPR 第三轮筛选细胞基因组 PCR

Fig. 7 The third selection round of CPR.

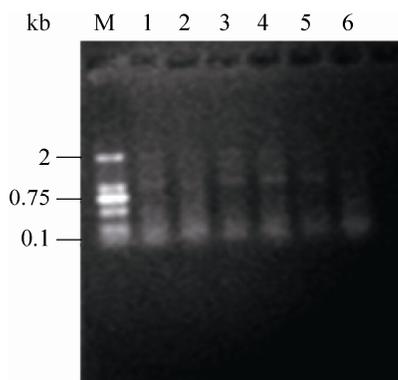


图 8 CPR 第四轮筛选细胞基因组 PCR

Fig. 8 The fourth selection round of CPR.

#### 2.4 耐药基因耐药性的初步检验

将第四轮筛选中特异性条带的部分割胶回收, 连接到 pLIB 载体上, 转化挑单克隆送去测序。经测序出现频率比较高的有核糖体蛋白 S11 (RPS11)、核糖体蛋白 L6 (RPL6)、核糖体蛋白 L11 (RPL11)、核糖体蛋白 L24 (RPL24)、细胞色素氧化酶亚基 II (COX2) 等几种基因。提取这几种基因的质粒, 转染进 NIH-3T3 细胞测定 NIH-3T3 细胞的耐药指数 (图 9), 从实验结果分析所得, 有 RPS11、RPL6、RPL11、RPL24 几种基因的耐药指数有所上升, 但其具体耐药功能还有待进一步验证。

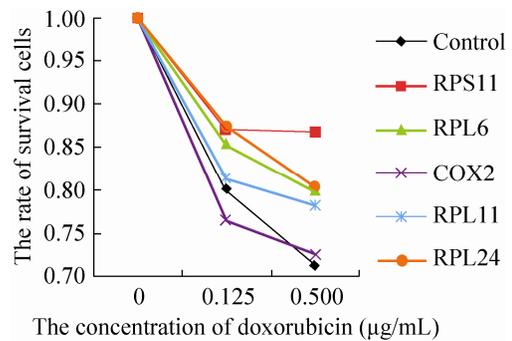


图 9 选出的基因的耐药性的测定

Fig. 9 The determination of drug resistant index of the screening genes.

### 3 讨论

本研究构建了肝癌细胞逆转录病毒的全长 cDNA 文库, 采用 CPR 技术进行肝癌细胞中耐药基因的筛选。该技术最大的优势在于多轮循环筛选, 很大程度减少了假阳性细胞的出现, 增加筛选出的耐药基因的可信度。CPR 技术实现了以哺乳动物细胞为宿主的功能基因筛选, 此外这种方法通过循环病毒包装回收技术也可以实现功能基因在哺乳动物细胞间的传递, 使基因功能的鉴定更加快速方便。

本研究筛选获得 RPS11、RPL6、COX2、RPL11、RPL24 等几种基因, 经初步检测 RPS11、RPL6、RPL11、RPL24 增加了细胞的耐药性。通过查阅文献发现这几种基因在细胞的调控过程中都发挥着重要的作用<sup>[15-18]</sup>。例如 RPL6 基因属于核糖体 L6 蛋白, 有相关文献显示, 在 p53 调控通路中发挥着重要作用, 且在耐药细胞中蛋白表达量增加<sup>[19-22]</sup>。RPS11 与蛋白泛素化过程密切相关, 而这一过程又关系到细胞的癌变<sup>[23]</sup>。关于 RPL11 在恶性肿瘤中的研究尚不是很多, 但是 RPL11 与 mTOR 通路和 p53 因子间相关, RPL11 能够保持 p53 稳定, 但雷帕霉素抑制剂

能够下调 RPL11 的表达,从而破坏 RPL11 与 p53 之间的稳定<sup>[16]</sup>。此外已有研究表明 RPL24 的过表达会引起肝癌细胞的耐药<sup>[24-25]</sup>。但是这些因子具体如何在肝癌细胞的耐药通路中发挥作用还有待后续进一步研究。

在耐药基因功能的初步鉴定中发现筛选获得的细胞色素 c 氧化酶亚基 II (COX2) 不能发挥耐药功能。COX2 是细胞色素氧化酶的一个亚基,必须要通过与其他亚基和辅助因子组装才能发挥酶活性。这一因子单独转染细胞可能无法发挥其功能,但是与其他因子相互作用是否能发挥耐药功能也有待进一步研究。

对筛选出的耐药基因进行功能研究,有助于进一步研究肝癌的耐药机制,为肝癌患者提供个性化的治疗方案,且促进抗肝癌药物新靶点的发现。

## REFERENCES

- [1] Bhattacharya D, Logue EC, Bakkour S, et al. Identification of gene function by cyclical packaging rescue of retroviral cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(13): 8838–8843.
- [2] McIlwain DR, Lang PA, Maretzky T, et al. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science*, 2012, 335(6065): 229–232.
- [3] Whitehead I, Kirk H, Kay R. Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(2): 704–710.
- [4] Kitamura T, Onishi M, Kinoshita S, et al. Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9146–9150.
- [5] Duan Y, Naruse T, Nakamura M, et al. Expression and functional analysis of a hemopoietic progenitor antigen, NJ-1 (114/A10), in the megakaryocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(2): 401–406.
- [6] He YW, Deftos ML, Ojala EW, et al. RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity*, 1998, 9(6): 797–806.
- [7] Hitoshi Y, Lorens J, Kitada SI, et al. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, 1998, 8(4): 461–471.
- [8] Whitehead I, Kirk H, Kay R. Retroviral transduction and oncogenic selection of a cDNA encoding Dbs, a homolog of the Dbl guanine nucleotide exchange factor. *Oncogene*, 1995, 10(4): 713–721.
- [9] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(2): 74–108.
- [10] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [11] Torre L A, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87–108.
- [12] Chang XB. Molecular mechanism of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein 1. *Methods Mol Biol*, 2010, 596: 223–249.
- [13] Sodani K, Patel A, Kathawala RJ, et al. Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin J Cancer*, 2012, 31(2): 58–72.
- [14] Chen KG, Sikic BI. Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(7): 1863–1869.
- [15] Zhou F, Roy B, von Arnim AG. Translation reinitiation and development are compromised in similar ways by mutations in translation initiation factor eIF3h and the ribosomal protein RPL24. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 193.
- [16] Goudarzi KM, Nistér M, Lindström MS. mTOR inhibitors blunt the p53 response to nucleolar stress by regulating RPL11 and MDM2 levels. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(11): 1499–1514.
- [17] Morgado-Palacin L, Llanos S, Urbano-Cuadrado

- M, et al. Non-genotoxic activation of p53 through the RPL11-dependent ribosomal stress pathway. *Carcinogenesis* 2014, 35(12): 2822–2830.
- [18] Yajima S, Ishii M, Matsushita H, et al. Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1029–1037.
- [19] Wang X, Lan M, Shi YQ, et al. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cells. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 54–59.
- [20] Du J, Shi Y, Pan Y, et al. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein L6 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(2): 250–255.
- [21] Wu Q, Gou Y, Wang Q, et al. Downregulation of RPL6 by siRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human gastric cancer cell lines. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e26401.
- [22] Kubo N, Fujimoto M, Arimura S, et al. Transfer of rice mitochondrial ribosomal protein L6 gene to the nucleus: acquisition of the 5'-untranslated region via a transposable element. *BMC Evol Biol*, 2008, 8: 314.
- [23] Bengsc F, Tu Z, Tang HY, et al. Comprehensive analysis of the ubiquitinome during oncogene-induced senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle*, 2015, 14(10): 1540–1547.
- [24] Guo YL, Kong QS, Liu HS, et al. Drug resistance effects of ribosomal protein L24 overexpression in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9853–9857.
- [25] Barkic M, Crnomarkovic S, Grabusic K, et al. The p53 tumor suppressor causes congenital malformations in Rpl24-deficient mice and promotes their survival. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10): 2489–2504.

(本文责编 郝丽芳)