

论著

文章编号:1000-5404(2013)15-1548-04

人 BNIP3 基因真核表达载体的构建及其对 HT-29 细胞化疗敏感性的影响

裴莉¹, 边志衡², 江恒², 陈克力², 陈建芳², 梁后杰² (400038 重庆, 第三军医大学西南医院: 血液科¹, 肿瘤科²)

[摘要] **目的** 构建人 BNIP3 真核表达载体, 观察 BNIP3 高表达对人结肠癌细胞 HT-29 化疗敏感性的影响。**方法** PCR 法扩增 BNIP3 基因, 酶切后插入质粒 pEGFP-C3, 构建重组真核表达载体 pEGFP-C3/BNIP3。脂质体转染人结肠癌细胞 HT-29, Western blot 检测 BNIP3 蛋白表达。MTT 法检测 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 的化疗敏感性和细胞增殖, Annexin V-APC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** 酶切电泳分析和 DNA 序列测定证实, 重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 构建成功; 转染重组质粒的 HT-29 细胞 BNIP3 蛋白明显高表达。与未转染组和转染空质粒 pEGFP-C3 组比较, 转染 pEGFP-C3/BNIP3 组 5-Fu 的 IC₅₀ 值显著降低 [(120.11 ± 5.45)、(113.40 ± 4.72) μg/mL vs (19.08 ± 2.62) μg/mL, *P* < 0.05], 细胞凋亡率显著增加 [(5.51 ± 0.32)%、(7.19 ± 0.47)% vs (41.72 ± 1.48)% , *P* < 0.05], 细胞克隆形成显著减少 [(52 ± 6)、(49 ± 5) vs (11 ± 3), *P* < 0.05], 细胞增殖速度减慢。**结论** 成功构建了人 BNIP3 真核表达载体, BNIP3 高表达可增加 HT-29 细胞对 5-Fu 的化疗敏感性。

[关键词] 结肠肿瘤; HT-29 细胞; BNIP3 基因; 化疗; 凋亡; 表达载体

[中图分类号] R394.33; R73-362; R735.35 **[文献标志码]** A

Construction of human BNIP3 eukaryotic expression vector and its effect on chemosensitivity of HT-29 cells

Pei Li¹, Bian Zhiheng², Jiang Heng², Chen Keli², Chen Jianfang², Liang Houjie² (¹Department of Hematology, ²Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To construct an eukaryotic expression vector encoding human Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa interacting protein (BNIP3) gene, and to investigate the effect of BNIP3 over-expression on the chemosensitivity of human colon cancer cell line HT-29. **Methods** The full-length cDNA of BNIP3 was amplified by PCR and cloned into pEGFP-C3 vector using genetic engineering technology. The recombinant expression vector pEGFP-C3/BNIP3 was confirmed by enzyme digestion and sequencing, and then was transferred into HT-29 cells by liposome. The expression of BNIP3 was detected by Western blotting. The chemosensitivity of transfected HT-29 cells to 5-Fu and cell proliferation were evaluated by MTT assay. Cell apoptosis was measured by flow cytometry. **Results** An eukaryotic expression vector of BNIP3 was constructed successfully, and the BNIP3 protein was highly expressed in HT-29 cells transfected with pEGFP-C3/BNIP3. The IC₅₀ of HT-29 cells transfected with pEGFP-C3/BNIP3 incubated with 5-Fu was significantly lower than those of HT-29 cells untransfected or transfected with pEGFP-C3 (120.11 ± 5.45, 113.40 ± 4.72 vs 19.08 ± 2.62 μg/mL, *P* < 0.05). The apoptotic rate of HT-29 cells transfected with pEGFP-C3/BNIP3 was significantly decreased compared with HT-29 cells untransfected or transfected with pEGFP-C3 [(5.51 ± 0.32)%, (7.19 ± 0.47)% vs (41.72 ± 1.48)% , *P* < 0.05]. Compared with the control cells, HT-29 cells transfected with pEGFP-C3/BNIP3 had significantly reduced cell colony formation (52 ± 6, 49 ± 5 vs 11 ± 3, *P* < 0.05) and decreased cell proliferation rate. **Conclusion** The recombinant expression vector pEGFP-C3/BNIP3 is successfully constructed. Over-expression of BNIP3 can enhance the chemosensitivity of HT-29 cells to 5-Fu.

[Key words] colon neoplasm; HT-29 cell; BNIP3 gene; chemotherapy; apoptosis; expression vector

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BA5008). Corresponding author: Liang Houjie, E-mail: Lianghoujie@sina.com

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目 (CSTC2007BA5008)

[通信作者] 梁后杰, E-mail: Lianghoujie@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130620.1347.002.html> (2013-06-20)

结肠癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤。化疗是进展期结肠癌最基本的治疗手段,但是肿瘤细胞对化疗的耐药严重影响了化疗效果和患者预后。化疗药物大都可以通过诱导肿瘤细胞的凋亡而发挥抗肿瘤效应,凋亡逃逸是导致肿瘤细胞对化疗药物耐受的重要途径。Bcl-2/腺病毒 E1B19kDa 相互作用蛋白(Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa interacting protein, BNIP3)是 Bcl-2 家族中的促凋亡成员,在正常细胞和肿瘤细胞的生存和死亡调节中起重要作用。研究显示, BNIP3 在胰腺癌^[1]、结直肠癌^[2]和部分血液系统恶性肿瘤^[3]中表达降低或缺失,而且 BNIP3 的表达降低或缺失与肿瘤细胞对化疗抵抗^[4-6]和肿瘤的不良预后有关。提示 BNIP3 的表达降低或缺失可能是导致肿瘤细胞凋亡信号通路受阻,从而对化疗药物产生耐受的重要因素之一;恢复 BNIP3 的表达,可能增加化疗药物诱导的细胞凋亡,从而逆转肿瘤耐药。本研究设计构建 BNIP3 的人真核细胞表达载体,转染 BNIP3 低表达的结肠癌细胞,探讨提高 BNIP3 表达对结肠癌细胞化疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

BNIP3-linker 质粒 pDNR-LIB-BNIP3(武汉三鹰生物技术公司),pGCsiC3 质粒(上海吉凯公司),KOD-Plus 试剂盒(日本 TOYOBO 公司),限制性内切酶 *Hind* III 和 *Sac* II 及 *T*₄ DNA 连接酶(TaKaRa 公司),质粒 DNA 提取试剂盒(BioFlux 公司),DNA 胶回收试剂盒(美国 Omega 公司),Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司),胎牛血清(天津 TBD 公司),高糖型 DMEM 培养基(美国 Hyclon 公司),BCA 蛋白浓度试剂盒(上海碧云天公司),BNIP3 单克隆鼠抗和抗小鼠 IgG-HRP(美国 Sigma 公司),鼠单抗 β -actin(Novus 公司),Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(美国 Invitrogen 公司),二甲基四氮唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司),5-氟尿嘧啶(5-Fu,天津金耀氨基酸公司),Sigma 公司大肠杆菌 *E. coli*. DH5 α 由本院中心实验室冻存,人结肠癌细胞株 HT-29 为本院肿瘤科保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增人 BNIP3 基因 根据 GenBank 中 BNIP3 基因序列(NM004052),应用 Premir Primer 5.0 软件设计克隆引物,上游引物:5'-TTTAAGCCTATGTCGAGAACGGAGCGC-3',下游引物:5'-TTTCCGCGGAAAGGTGCTGGTGGAGGTTG-3',扩增片段长度为 603 bp。在上游引物和下游引物 5'端分别引入了 *Hind* III 和 *Sac* II 限制性内切酶位点。引物由上海生工有限公司合成。以 pDNR-LIB-BNIP3 为模板进行 PCR 扩增,按照 KOD-Plus 试剂盒说明书进行,反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,61 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,循环 30 次;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行初步鉴定,用 DNA 胶回收试剂盒进行 PCR 产物的回收。

1.2.2 真核表达载体 pEGFP-C3/BNIP3 的构建和鉴定 胶回收纯化的 PCR 产物用限制酶 *Hind* III 和 *Sac* II 进行双酶切,纯

化回收长度为 603 bp 的目的片段。pEGFP-C3 质粒也同时进行 *Hind* III 和 *Sac* II 双酶切,纯化回收大片段。用 *T*₄ DNA 连接酶连接目的片段和线性化的空质粒 pEGFP-C3,转化 DH5 α 感受态细菌,将转化的菌液涂在含有卡那霉素的 LB 平板上培养过夜,挑取阳性克隆扩增培养,提取重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3。取少量质粒用 *Hind* III 和 *Sac* II 双酶切初步鉴定阳性细菌克隆,将酶切鉴定正确的细菌克隆送交上海生工有限公司测序。

1.2.3 基因转染 人结肠癌 HT-29 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中常规 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。胰酶消化对数生长期 HT-29 细胞,接种于 6 孔板中,第 2 天按 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书转染 pEGFP-C3 空质粒或 pEGFP-C3/BNIP3 重组质粒。实验分 3 组:未转染组、转染空质粒 pEGFP-C3 组和转染重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 组。

1.2.4 Western blot 检测 BNIP3 蛋白的表达 转染 48 h 后用 RIPA 裂解液提取 HT-29 细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量 50 μ g,SDS-PAGE 电泳分离,电转移至 PVDF 膜。抗 BNIP3 一抗(1:800)4 °C 孵育过夜,HRP 标记的二抗(1:2500)室温孵育 1 h。以 β -actin 为内参。化学发光法显影,应用 Quantity One 图像分析软件进行条带灰度分析,得出 BNIP3 蛋白表达的相对水平,结果以 BNIP3 蛋白积分光密度/ β -actin 蛋白积分光密度表示。

1.2.5 MTT 法检测 5-Fu 敏感性 HT-29 细胞转染空质粒 pEGFP-C3 或重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 48 h 后,胰酶消化细胞,以每孔 5×10^3 /孔接种于 96 孔板,48 h 后吸弃培养液,每组细胞加入不同浓度(0、10、20、40、80、160、320 μ g/mL)的 5-Fu,每个浓度设 3 个复孔。并设不含细胞及药物的调零空白对照孔。继续培养 48 h 后每孔加 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,培养箱内孵育 4 h。小心吸去培养基,每孔加 150 μ L DMSO,振荡使紫色结晶完全溶解,酶标仪检测波长 490 nm 光密度值 [$D(490)$]。计算药物的细胞增殖抑制率,采用 LOGIT 法计算化疗药物 IC₅₀ 值。

抑制率 = $[1 - \text{实验孔平均 } D(490) \text{ 值} / \text{对照孔平均 } D(490) \text{ 值}] \times 100\%$

1.2.6 AnnexinV-APC/PI 检测细胞凋亡 胰酶消化收集空质粒 pEGFP-C3 或重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 转染 48 h 后 HT-29 细胞,预冷 PBS 洗涤 2 次,1 \times Binding Buffer 300 μ L 重悬细胞,加入 AnnexinV-APC 和 PI 溶液各 5 μ L,混匀后室温下避光孵育 10 min,补加 200 μ L Binding buffer,流式细胞仪检测。以 Annexin V⁺/PI⁻ 细胞所占比例计算凋亡率。

1.2.7 MTT 法检测细胞增殖 HT-29 细胞转染空质粒 pEGFP-C3 或重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 48 h 后,胰酶消化细胞,以每孔 5×10^3 /孔接种于 96 孔板,静置培养 5 d,每天各组取 3 孔细胞行 MTT 检测。同时设不含细胞的调零空白对照孔。每孔加 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,培养箱内孵育 4 h。小心吸去培养基,每孔加 150 μ L DMSO,振荡使紫色结晶完全溶解,酶标仪检测波长 490 nm 处光密度值 [$D(490)$]。以培养时间为横轴,以 $D(490)$ 值为纵轴,绘制细胞生长曲线。

1.2.8 克隆形成试验检测细胞增殖 HT-29 细胞转染空质粒 pEGFP-C3 或重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 48 h 后,胰酶消化细胞,单个细胞重悬于 60 mm 培养皿中,并加入 G418 筛选,静置培养 2 周。去除培养基,甲醇固定后用姬姆萨染料。镜下记

录含有50个细胞以上、直径>0.5 mm的细胞克隆数量。

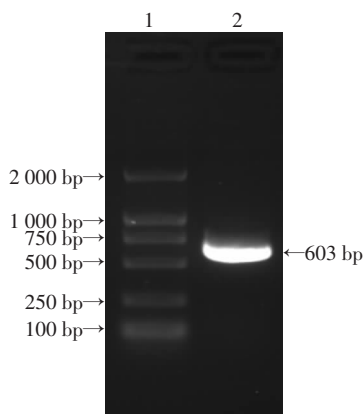
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 BNIP3的PCR扩增

以pDNR-LIB-BNIP3为模板扩增得到BNIP3基因完整的编码区,1%琼脂糖凝胶电泳显示扩增的特异性片段在约600 bp处,与预期的目的片段大小相符(BNIP3编码区全长为585 bp,加上引物两端设计的酶切位点和保护碱基共计603 bp),见图1。



1:标准;2:BNIP3扩增产物
图1 PCR扩增BNIP3基因产物琼脂糖凝胶电泳分析

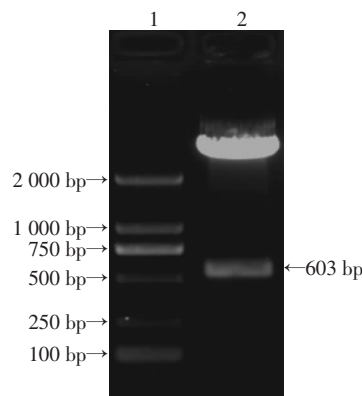
2.2 重组质粒pEGFP-C3/BNIP3的鉴定

将BNIP3的PCR扩增产物与pEGFP-C3质粒连接后进行克隆筛选,得到重组质粒,再用限制酶Hind III和Sac II双酶切重组质粒,电泳结果显示得到与目的基因片段大小(603 bp)一致的产物,证明目的基因已正确插入质粒pEGFP-C3,得到了重组真核表达质粒pEGFP-C3/BNIP3(图2)。酶切鉴定正确的细菌克隆送交上海生工有限公司测序,测序结果亦证实该重组质粒含有完全正确的BNIP3编码区序列。

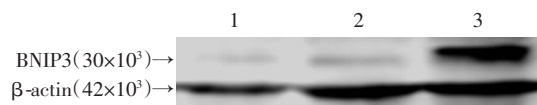
2.3 Western blot检测BNIP3的表达

空质粒pEGFP-C3和重组质粒pEGFP-C3/BNIP3转染HT-29细胞48 h后,收集细胞总蛋白,Western blot检测结果显示,未转染组、转染pEGFP-C3组和转染pEGFP-C3/BNIP3组细胞BNIP3蛋白相对表达量分别为(0.093 ± 0.008)、(0.101 ± 0.012)和(1.084 ± 0.137)。转染pEGFP-C3/BNIP3组细胞BNIP3

蛋白相对表达量较未转染组、转染pEGFP-C3组均显著增高(P<0.01),而转染pEGFP-C3组和未转染组之间BNIP3蛋白相对表达量无明显差异(P>0.05,图3)。



1:标准;2:重组质粒pEGFP-C3/BNIP3双酶切产物
图2 重组质粒pEGFP-C3/BNIP3的双酶切鉴定



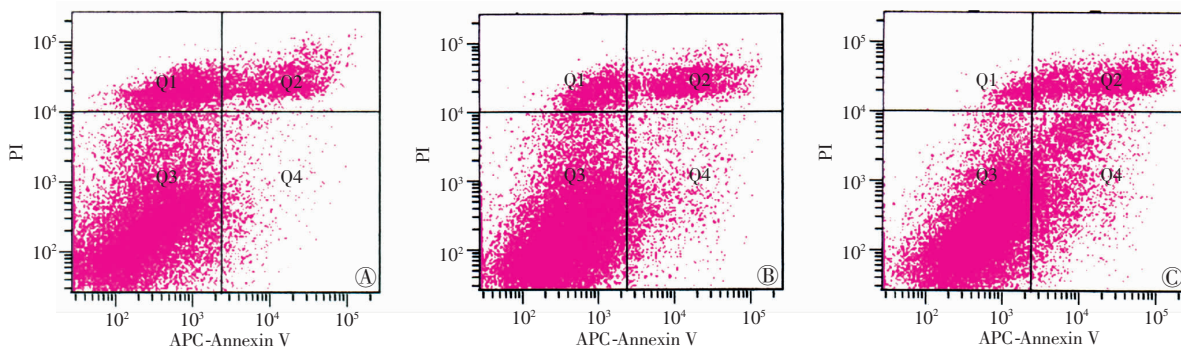
1:未转染细胞;2:转染pEGFP-C3;3:转染pEGFP-C3/BNIP3
图3 Western blot检测HT-29细胞BNIP3蛋白表达

2.4 MTT检测5-Fu敏感性

HT-29细胞转染空质粒pEGFP-C3或重组质粒pEGFP-C3/BNIP3 48 h后,收集细胞并接种培养48 h后,加入不同浓度5-Fu作用细胞48 h,MTT法检测细胞生存率并计算药物IC₅₀值。未转染组、转染pEGFP-C3组和转染pEGFP-C3/BNIP3组细胞的5-Fu的IC₅₀值分别为(120.11 ± 5.45)、(113.40 ± 4.72)、(19.08 ± 2.62) μg/mL。统计学分析显示,与另两组比较,转染重组质粒pEGFP-C3/BNIP3组HT-29细胞5-Fu的IC₅₀值显著降低(P<0.05)。

2.5 细胞凋亡检测

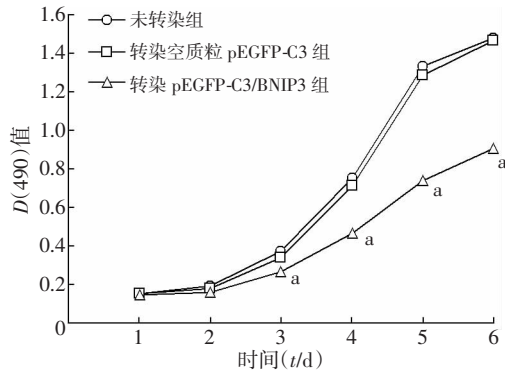
空质粒pEGFP-C3和重组质粒pEGFP-C3/BNIP3转染HT-29细胞48 h后,收集细胞,用AnnexinV-APC和PI双染,流式细胞仪检测细胞凋亡结果显示,未转染组、转染pEGFP-C3组和转染pEGFP-C3/BNIP3组的细胞凋亡率分别为(5.51 ± 0.32)%、(7.19 ± 0.47)%和(41.72 ± 1.48)%。转染pEGFP-C3/BNIP3组细胞凋亡率较另两组均显著增加(P<0.05)。见图4。



A:未转染组;B:转染空质粒pEGFP-C3组;C:转染pEGFP-C3/BNIP3组
图4 未转染组和转染不同质粒组的HT-29细胞凋亡检测结果

2.6 MTT 检测细胞增殖

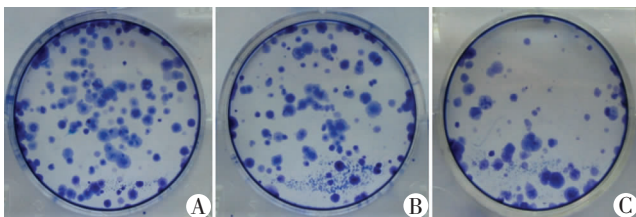
空质粒 pEGFP-C3 和重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 转染 HT-29 细胞 48 h 后,收集接种细胞继续培养 5 d,MTT 检测结果显示,转染 pEGFP-C3/BNIP3 组较未转染组和转染空质粒 pEGFP-C3 组细胞 $D(490)$ 值均显著减少 ($P < 0.05$),提示细胞增殖减少,生长曲线显示细胞生长减慢(图 5)。



a: $P < 0.05$,与未转染组和转染空质粒 pEGFP-C3 组比较
图 5 未转染组和转染不同质粒组的 HT-29 细胞生长曲线

2.7 细胞克隆形成

空质粒 pEGFP-C3 和重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 转染 HT-29 细胞 48 h 后,收集细胞,细胞克隆形成实验显示,未转染细胞、转染空质粒 pEGFP-C3 和重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 的细胞,克隆形成数分别为 (52 ± 6) 、 (49 ± 5) 、 (11 ± 3) 。转染重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 的 HT-29 细胞克隆形成数较另 2 组均显著减少 ($P < 0.05$)。见图 6。



A: 未转染组;B: 转染空质粒 pEGFP-C3 组;C: 转染 pEGFP-C3/BNIP3 组
图 6 未转染组和转染不同质粒组的 HT-29 细胞克隆形成观察

3 讨论

前期研究发现,启动子甲基化是导致结肠癌 SW480 细胞 BNIP3 基因表达沉默的重要原因,甲基转移酶抑制剂 5-aza-dC 可以通过去甲基化作用恢复 BNIP3 基因的表达,增加细胞对 5-Fu 和 L-OHP 的敏感性^[7]。但是因为 5-aza-dC 的去甲基化作用也可以影响其他抑癌基因的表达,药物敏感性结果可能是多种分子共同作用的结果。这就需要进一步研究来证实 BNIP3 分子对结肠癌细胞的独立影响。预实验发现结肠癌细胞株 HT-29 细胞基本不表达 BNIP3 蛋白,所以我们利用分子克隆技术,构建了人 BNIP3 的重组真核表达载体 pEGFP-C3/BNIP3,通过脂质体介导转染入 HT-29 细胞,Western blot 检测显示重组质粒 pEGFP-C3/BNIP3 转染的 HT-29 细胞得到了高水平 BNIP3 表达。用 MTT 法检测 BNIP3 表达水平对 HT-29 细胞化疗药物敏感性的影响,结果显示,相同浓度 5-Fu 对高

表达 BNIP3 的 HT-29 细胞的增殖抑制率显著增高,5-Fu 的 IC_{50} 值显著降低,表明独立的 BNIP3 分子高表达可以增加结肠癌细胞 HT-29 对 5-Fu 的敏感性。

诱导肿瘤细胞内源性凋亡是化疗药物发挥抗肿瘤作用的重要机制。Bcl-2 家族蛋白在化疗药物等细胞毒性信号启动内源性凋亡途径中起着关键作用。BNIP3 是 Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白,它通过与抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-x1 等形成异源二聚体,释放与 Bcl-2、Bcl-x1 结合的促凋亡蛋白 BAX、BAK,或 BNIP3 同源二聚体直接作用于线粒体外膜,促进线粒体功能障碍、线粒体膜通透性转换孔(MPTP)开放,从而引起细胞凋亡^[8]。对 BNIP3 不同表达水平的 HT-29 细胞生物学行为进一步检测显示,BNIP3 高表达的 HT-29 细胞凋亡率显著增加、细胞增殖能力显著降低。这些结果提示,结肠癌细胞 BNIP3 的表达降低或缺失可能导致肿瘤细胞凋亡信号通路受阻,逃逸化疗药物诱导的细胞死亡,打破了细胞增殖和死亡调节信号的平衡,从而最终导致了细胞对化疗药物的耐药;而通过导入 BNIP3 基因恢复 BNIP3 表达,诱导细胞凋亡增加、抑制细胞增殖,可以增加结肠癌细胞对化疗药物的敏感性。

本研究成功构建了人 BNIP3 的表达载体,并在人结肠癌细胞 HT-29 中高表达,证明 BNIP3 高表达可以增加结肠癌细胞 HT-29 对 5-Fu 的敏感性,化疗药物的增敏与 BNIP3 促进 HT-29 细胞的凋亡、抑制细胞增殖有关。但是,BNIP3 高表达诱导细胞凋亡、提高化疗药物敏感性的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Okami J, Simeone D M, Logsdon C D. Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(15): 5338-5346.
- [2] Murai M, Toyota M, Suzuki H, et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1021-1027.
- [3] Murai M, Toyota M, Satoh A, et al. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(6): 1165-1172.
- [4] Tang H, Liu Y J, Liu M, et al. Establishment and gene analysis of an oxaliplatin-resistant colon cancer cell line THC8307/L-OHP[J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(6): 633-639.
- [5] Valdez BC, Murray D, Ramdas L, et al. Altered gene expression in busulfan-resistant human myeloid leukemia[J]. *Leuk Res*, 2008, 32(11): 1684-1697.
- [6] Hiraki M, Kitajima Y, Nakafusa Y, et al. CpG island methylation of BNIP3 predicts resistance against S-1/CPT-11 combined therapy in colorectal cancer patients[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(1): 191-197.
- [7] 裴莉,解方为,陈克力,等. BNIP3 表达对结肠癌细胞化疗敏感性的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34(9): 1050-1053.
- [8] Zhang J, Ney P A. Mechanisms and biology of B-cell leukemia/lymphoma 2/adenovirus E1B interacting protein 3 and Nip-like protein X[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(10): 1959-1969.

(收稿:2013-04-16;修回:2013-05-31)

(编辑 汪勤俭)