

Bcl-2 基因加强表达对 SK 细胞编程死亡的效应*

温龙平 陈亚兵 蔡毓 曾桂生 俞春东 曾定

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

细胞编程死亡(Programmed Cell Death, 简称 PCD)为一种自杀性细胞死亡,是多细胞高等生物体去除有害及多余细胞之途径,为生长发育及功能维持所必需^[1]。细胞进行编程死亡时产生一系列特征性变化,包括细胞质凝聚,核收缩及 DNA 断裂等,并往往需要新的 RNA 或蛋白质合成才能完成^[2]。

肿瘤坏死因子(TNF)对多种正常或肿瘤细胞有杀伤作用,且多数情况下是通过引发 PCD 而致效^[3],此为 TNF 用于临床化疗的依据。OA(Okadaic acid)系蛋白磷酸酶抑制剂,亦可诱发细胞死亡^[4]。Bcl-2 基因最初由某些 B 细胞淋巴瘤病人细胞内发生的染色体易位现象而发现,其表达产物为 26 kd 的膜附着蛋白,对许多因素引发的 PCD 有抑制或延缓作用,但对某些因素引发的 PCD 无效,如: Bcl-2 的过量表达对去除生长因子等诱发的细胞死亡有抑制作用,而对于依赖 IL-3, IL-6 等的细胞死亡则无效^[5,6]。然而,已报道的该类实验大都在不同的细胞系统中进行,其结果较难比较。

本文以人神经母细胞瘤 SK 细胞(SK 细胞)作为研究对象,首先用 TNF 和 OA 诱发 SK 细胞进入 PCD,继而使 Bcl-2 基因产物在 SK 细胞中增强表达,以探讨其对上述两种因子诱发的 SK 细胞 PCD 之效应。

材料和方 法

一、质粒和细胞系

人神经母细胞瘤 SK 细胞购自上海细胞所。哺乳类细胞表达载体 pXJ 41 neo 由新加坡国立大学郑新民博士惠赠。质粒 6-1-1-1 含有 2.4 kb 编码人 Bcl-2 全长蛋白及 3' 未转录序列的 cDNA,由本文作者温龙平

在新加坡国立大学从事研究工作时克隆,并经序列测定证实与发表的 Bcl-2 基因序列^[7]完全相同。

二、化学试剂、酶和抗体

限制性内切酶和 DNA 修饰酶购自美国 Promega 或 New England Biolabs 公司。小牛血清,RPM 1640 培养基及 G-418 购自美国 Gibco-BRL 公司。TNF、OA 及亚胺环己酮(CHX)购自美国 Sigma 公司。兔抗人 Bcl-2 蛋白抗体购自 DAKO 公司。ECL Western 检测试剂购自 Amersham 公司。其他试剂为中国华美生物工程公司产品或国产 AR 级试剂。

三、基因操作技术和方法

质粒 DNA 提取纯化及从琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段分别采用厦门 P&N 生物技术公司生产的“质粒 DNA 快速分离纯化试剂盒”及“DNA 片段快速回收试剂盒”。酶切、电泳、连接、转化等常规分子生物学操作按文献^[8]的方法进行。

四、SK 细胞培养及转染

采用 RPM 1640 培养基加 10%小牛血清培养 SK 细胞。取 6×10^5 约 80%汇合成片的 SK 细胞,用 10 μg 转染质粒按磷酸钙沉淀法^[9]转染,之后置于含 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G-418 的培养基中选择稳定转染子,由同一种质粒转染而得的所有转染细胞混合后作分析。

五、TNF 和 OA 处理

SK 细胞长至约 80%成片时换入含 2%小牛血清的新鲜 RPM 1640 培养基,于 37℃培养 2 小时后加 TNF (最终浓度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)或 OA(最终浓度 2 nM),或同时加亚胺环己酮(CHX)最终浓度(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$),之后置于 37℃培养箱中至预定天数。

六、细胞存活测定

采用台盼蓝拒染法(Trypan Blue Exclusion)^[9]。

七、DNA 断裂分析

按文献^[10]所述方法分离细胞 DNA 并作 1.5%琼脂糖电泳。

* 本课题由国家自然科学基金及福建省自然科学基金资助。

八、Western 印迹

10 μ g 转染细胞蛋白抽提液经 10% SDS-PAGE 电泳后用 Pharmacia 公司的 TransBlot 电泳转移至硝基纤维素薄膜上, 经 3% 牛血清白蛋白封闭后依次与第一抗体(兔抗人 Bcl-2 IgG, 1:40 稀释)及第二抗体(鼠抗兔 IgG-过氧化物酶偶联蛋白)反应, 而后采用 Amersham 公司的 ECL Western 印迹试剂检测。

结 果

一、TNF 及 OA 诱导 SK 细胞的 PCD

死亡细胞缩小变圆, 核凝聚, DNA 断裂成大约 123 bp 大小的片段, 并且上述过程可由蛋白合成抑制剂亚胺环己酮抑制, 结果见《厦门大学学报》(待发表)。

二、表达质粒构建及转染

我们选用 pXJ 41 neo 作为 SK 细胞中的表达载体, 它含有强有力的 HCMV 病毒启动子控制在 polylinker 处插入序列的表达, 并含有 neo 基因作为动物细胞中的选择性标记, 用 EcoR I 酶水解质粒 6-1-1-1, 进行琼脂糖凝胶电泳, 从胶上纯化 1.6 kb 编码 Bcl-2 蛋白的 cDNA 片段(包括 12 个核苷酸长度的 5' 未翻译序列及大约 860 bp 3' 非翻译序列), 克隆入 pXJ 41 neo 的 EcoRI 部位, 获得正向(pBcl-2-S)及反向(pBcl-2-AS)两种表达质粒, 示于图 1, 采用磷酸钙沉淀法将这两个质粒分别引入

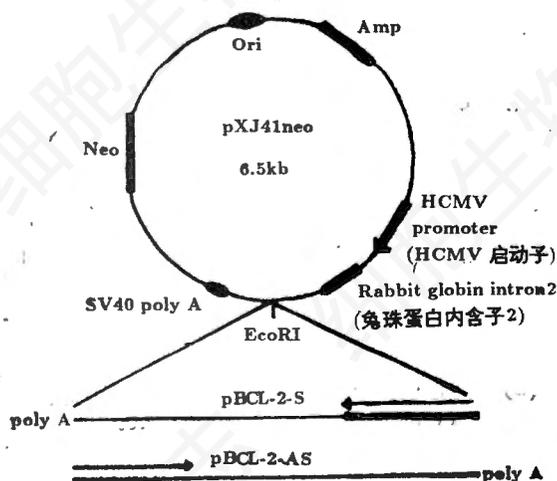


图 1 表达载体

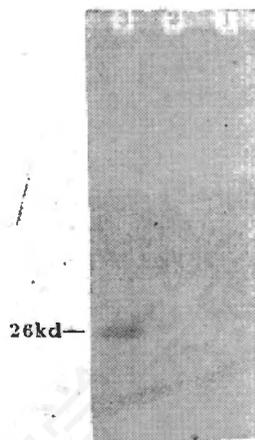


图 2 Western 印迹分析

1. 对照
2. pBcl-2-AS 转染细胞
3. pBcl-2-S 转染细胞

SK 细胞中并获得稳定转染子。

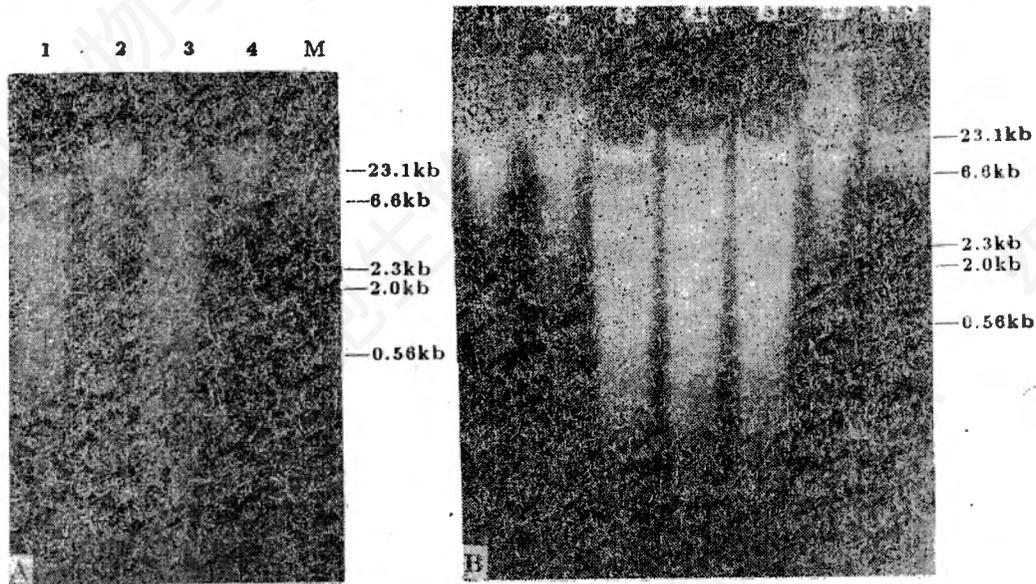
三、Bcl-2 表达产物检测

图 2 显示由 Western 印迹检测到的 Bcl-2 在转染细胞中的表达。Bcl-2 蛋白特异性抗体在正向转染子中检测到 26 kd 的蛋白质, 与已报道的 Bcl-2 表达产物大小相同。反向转染子中未检测到该蛋白。

四、转染细胞对 TNF 及 OA 的敏感性

正向及反向 Bcl-2 转染细胞在形态及生长特点等方面与未转染细胞无明显差别(未发表结果), 这与其它实验室在别种细胞中所得的结果相符^[11], 进一步证实 Bcl-2 并非一种通常意义上的癌基因。图 3 A 显示从 TNF 处理 3 天以及 OA 处理 6 天后的 SK 细胞中提取细胞内 DNA, 作 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果。图 3B 显示 pBcl-2-AS 和 pBcl-2-S 转染后细胞的 DNA 断裂分析。

图 4(A)和(B)分别显示 TNF 和 OA 处理 SK 细胞不同天数后的细胞存活计数结果(以处理前的活细胞数作为 100%)。可见 TNF 处理的细胞两天后开始死亡, 四天后死亡细胞已达 82%。OA 的作用则较缓慢, 处理三天后部分细胞开始死亡, 七天后死亡细胞比例为 80%, 对照组细胞存活在实验期内无明显变化, 图 4

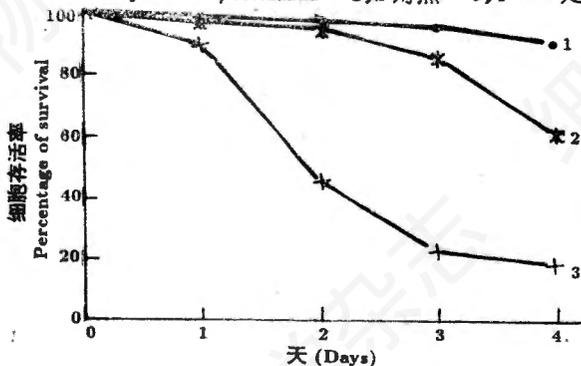


A. 未转染Sk细胞

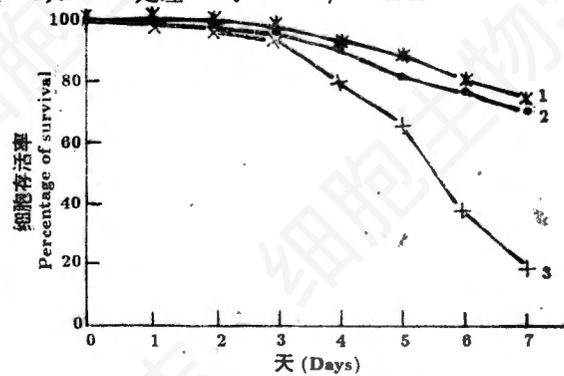
B. 转染细胞

图3 DNA断裂分析

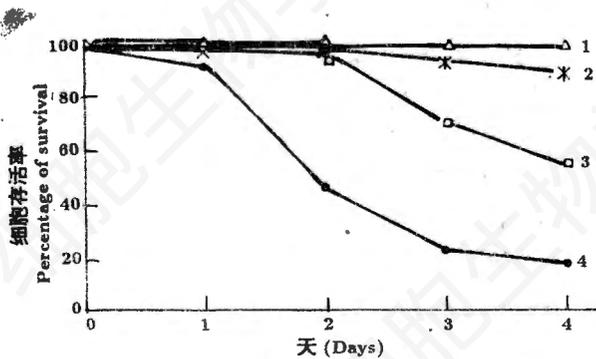
1. TNF处理 2,4. 对照 1,3,5 pBcl-2-AS转染细胞 2,4,6 pBcl-S转染细胞 3. OA处理
M. λ DNA/HindIII 1,2 对照 3,4 OA处理 5,6 TNF处理 M. λ DNA/HindIII



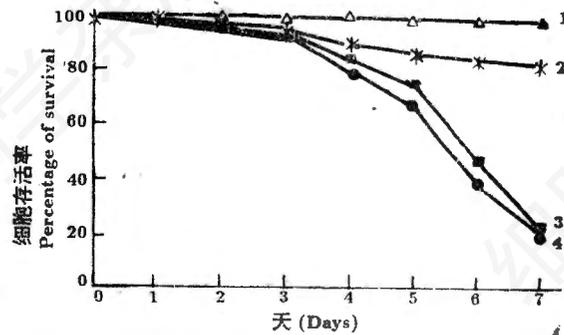
(A) 1. control 2. TNF+CHX 3. TNF



(B) 1. control 2. OA+CHX 3. OA



(C) 1 & 3. pBcl-2-S 2 & 4 pBcl-2-AS
1 & 2 control 3 & 4 TNF



(D) 1 & 3. pBcl-2-S 2 & 4. pBcl-2-AS
1 & 2 control 3 & 4. OA

图4(1) 细胞存亡数分析(未转染)

1. 对照 2. 处理+CHX 3. 处理

图4(2) 细胞存亡数分析(转染)

1,3 pBcl-2-S转染细胞 2,4 pBcl-2-AS转染细胞 1,2 对照 3,4 处理
A. TNF处理 B. OA处理 C. TNF处理 D. OA处理

(C)和(D)显示 pBcl-2-AS 及 pBcl-2-S 转染细胞后的细胞存活计数结果。

附: 图 4(C), (D) pBcl-2-AS 及 pBcl-2-S 转染细胞后细胞存亡结果(原始数据)

天数	1		2		3		4	
	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S
TNF	92	100	45	97	22	70	17	58
对照	99	99	98	99	93	99	90	99

天数	1		2		3		4		5		6		7	
	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S	AS	S
OA	99	100	97	99	94	95	80	85	67	75	38	47	20	23
对照	100	100	98	99	95	99	90	99	86	99	84	98	82	98

结果可见, 反向转染子对 TNF 及 OA 的敏感性与未转染细胞基本相同, 而正向转染子中加强表达的 Bcl-2 蛋白显著抑制了由 TNF 诱发的细胞死亡, 但对 OA 诱发的细胞死亡无明显效应。

讨 论

Bcl-2 基因的过量表达已在淋巴细胞^[12]、胸腺细胞^[13]、神经细胞^[14]乃至昆虫细胞^[15]等体系中证明能抑制多种因素造成的细胞编程死亡, 显示 Bcl-2 基因作用的广泛性, 而亦有证据指出 Bcl-2 对某些情形下的细胞死亡无抑制作用。这些研究中一个突出的问题是各个细胞体系的特异性。这里我们采用同一细胞系(SK 细胞)用两种不同处理(TNF 和 OA), 证明 Bcl-2 基因选择性抑制其中一种处理(TNF)引发的 PCD, 提示细胞编程死亡有不同途径, 其中只有某些能被 Bcl-2 基因产物阻断。我们就同一细胞系, 以不同的诱导剂进行处理, 目的在于对细胞编程死亡的途径和机制作系统的比较研究。

Vanhaesebroeck 等将人的 Bcl-2 基因引入 L-929, NIH 3 T3, REF, MCF 7 及 32 D 等细胞中过量表达, 发现由 TNF 在这些细胞中诱发的细胞死亡不受影响^[16]。这些结果与本文报道的截然相反, 可能系采用的细胞系不同之故, 具体原因还有待于进一步的研究。

摘 要

TNF 和 OA 诱发人神经母细胞瘤 SK 细胞

编程死亡(PCD)。将编码 Bcl-2 完整蛋白质的 cDNA 植入 pXJ 41 neo 载体中, 由 HCMV 病毒启动子控制其表达。形成的正向(pBcl-2-S)及反向(pBcl-2-AS)表达质粒经转染导入 SK 细胞中获得稳定转染子。Western 印迹表明正向转染子表达较大量的 26 kd Bcl-2 蛋白, 而反向转染子则不表达。增强表达的 Bcl-2 基因产物能抑制由 TNF 引发的 PCD, 但不影响由 OA 引发的 PCD, 从而证明 Bcl-2 基因产物抗细胞死亡效应的特异性。

关键词: Bcl-2 基因 加强表达 细胞编程死亡

参 考 文 献

- [1] Eills, R. E., Yuan, J., Horvitz, H. R., 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.*, 7: 663-698.
- [2] Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972, *Br. J. Cancer*, 26: 237-257.
- [3] Laster, S. M., Good, J. G., Gooding, L. R., 1988, *J. Immunol.*, 141: 2629-2643.
- [4] Kiguchi K., Glesne D., Chubb CH., et al., 1994, *Cell Growth and Differentiation*, 5(9): 995-1004.
- [5] Vaux, D. L., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 786-789.
- [6] Nanez et al., 1990, *J. Immunol.*, 144: 3602.
- [7] Cleary, M. L., Smith, S. D., Sklar, J., 1986, *Cell*, 47: 19-28.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring

- Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y..
- [9] Wagner, A. J., Small, M. B., Hay, N., 1993, *Mol. Cell. Biol.*, 13: 2432-2440.
- [10] Selmaj, K., Raine, C. S., Farooq, M., et al., 1991, *J. Immunol.*, 147: 1522-1529.
- [11] Vaux, D. L., Cory, S., Adams, J. M., 1988, *Nature*, 335: 440-442.
- [12] Borzillo, G. V., Endo, K., Tsujimoto, Y., 1992, *Oncogene*, 7: 869-876.
- [13] Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., et al., 1991, *Cell*, 67: 879-888.
- [14] Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y., et al., 1992, *Science*, 258: 302-304.
- [15] Alnemri, E. S., Robertson, N. M., Fernandes, T. F., et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89: 7295-7299.
- [16] Vanhaesebroedk, B., Reed, J. c., Valck, D. D., et al., 1993, *Oncogene*, 8: 1075-1081.

EFFECTS OF ENFORCED BCL-2 OVER-EXPRESSION ON THE PROGRAMMED CELL DEATH IN THE HUMAN NEUROBLASTOMA SK CELL LINE

Wen Longping Chen Yabing Cai Yu Zeng Guisheng Yu Chundong Zeng Ding
(State Lab. for Tumor Cell Engineering in Xiamen Univ. Xiamen 361005)

TNF and OA induce cell death in the human neuroblastoma SK cell line with the characteristic features of apoptosis.

A 1.6 kb cDNA encoding the full-length human Bcl-2 protein was inserted into mammalian expression vector pXJ 41 neo and placed under the control of HMCV promoter in either the sense (pBcl-2-s) or anti-sense (pBcl-2-AS) orientation. The above two plasmids were transfected into SK cells and stable transfectants were obtained. pBcl-2-S-transfected SK cells expressed high level of 26 Kd Bcl-2 protein, as evidenced by Western blotting, while pBcl-2-AS-transfected cells showed no detectable Bcl-2 expression. Over-expressed Bcl-2 protein effectively inhibited TNF-induced, but not OA-induced SK cell death, therefore demonstrating the specificity of Bcl-2 action.

Key words: Bcl-2 gene Over-expression Programmed Cell Death

四川省细胞生物学会第三届会员代表大会暨学术会议召开

[简讯] 四川省细胞生物学会第三届会员代表大会暨学术会议, 于1996年4月18-20日在重庆医科大学隆重召开。

出席会议的代表约80余人, 其中, 中青年占了大多数。重庆医科大学党委副书记张依仁教授及主管科研的校长邱宗荫教授、中国细胞生物学学会乔以炯高级实验师在会上讲话。挂靠单位华西医科大学写来了热情洋溢的贺信。

四川省细胞生物学会理事长、华西医科大学杨抚华教授代表二届理事会作了报告, 全面总结了三年来学会的工作。

大会邀请了六位专家及青年学者作了专题报告, 他们从不同的领域介绍了当前细胞生物学国内外的现状及最新进展。还有28位代表分别在大会及分组会上介绍了自己的工作, 这些工作既有对理论问题的探索, 也有对实际应用的研究, 展现了四川省细胞生物学研究欣欣向荣、蓬勃发展的新局面以及科学研究的丰硕成果。

会议经过严格评选, 评出青年优秀论文14篇。其中一等奖三篇; 二等奖五篇; 三等奖六篇。

本次会议还以无记名投票选出了四川省细胞生物学会第三届理事会。在三届一次理事会上, 选举产生了由13人组成的常务理事, 杨抚华教授再次被选为理事长, 陈文元、任正隆及王喜忠教授当选为副理事长, 秘书长由王喜忠教授兼任。

会议于4月20日下午胜利闭幕。