BclGs 对肿瘤细胞促凋亡功能的初步研究*

柳向军, 李 谋, 刘小林
(西北农林科技大学 动物科技学院 杨凌 陕西 712100)

[摘 要] 为了探讨仅含有BH3 结构域的促凋亡蛋白BclGs 的促凋亡机理, 从人睾丸 cDNA 文库中克隆 *BclGs* 基因编码区, 将其与 pEGFP-C1 载体连接, 构建载体 pEGFP-BclGs, 转染 COS7 细胞和多种肿瘤细胞(如 Hela、HepG2 和MCF7 等), 研究BclGs 对肿瘤细胞的促凋亡功能。结果表明, pEGFP-BclGs 可以诱导不同的肿瘤细胞凋亡, 但凋亡率存在差别; BclGs 在不同细胞的线粒体中均呈点状分布。线粒体是诱导肿瘤细胞凋亡的有效细胞器, BclGs 在线粒体中呈点状分布。

[关键词] BclGs; BH3 结构域; 肿瘤细胞; 亚细胞定位
[中图分类号] Q 255 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)03-0029-04

Characteristics of apoptosis induced by BclGs in tumor cell

LIU Xiang-jun, LI Mou, LIU Xiao-lin
(*College of Animal Sciences and technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: In order to investigate the molecular mechanism of BH3-only proapoptotic BclGs inducing apoptosis, BclGs gene was cloned from human testis cDNA library and constructed into the expressing vector pEGFP-C1. The fusion protein pGFP-BclGs was successfully detected by fluorescent microscope analysis and Western blotting. The result demonstrated that BclGs could induce several tumor cells apoptosis, but showed difference in apoptosis rate. Therefore, the conclusion can be drawn that the plastochondria was an effective cell organ which can induce the tumor cell to apoptosis, and BclGs assumes the punctual distribution in plastochondria.

Key words: BclGs; BH3 domain; tumor cell; subcellular localization

BclGs(Bcl-Gonad short form)是近年来鉴定的Bcl-2 家族中, 惟一含有BH3 结构域的一类促凋亡蛋白, 其mRNA 在睾丸中特异高表达, 在COS7 和HEK293T 细胞中过表达, 定位于细胞质和线粒体, 在细胞质中呈弥散性点状分布[1]。Reed 等[2]研究发现, BclGs 能够依赖BH3 结构域有效发挥促凋亡功能, 此种功能可被抗凋亡蛋白Bcl-XL 所抑制, 其机理是Bcl-XL 能通过BH3 与BclGs 结构域发生相互作用[1]。但对BclGs 的促凋亡机理尚不清楚, 为了研究 *BclGs* 基因过表达后对肿瘤细胞是否具有促凋亡功能, 初步探讨BclGs 诱导细胞凋亡的机理, 本研究从人睾丸 cDNA 文库中扩增得到 *BclGs* 基因编码区, 将其与 pEGFP-C1 载体相连构建表达载体 pGFP-BclGs, 并转染于几种肿瘤细胞系(Hela, HepG2, MCF7 和HEK293T), 研究BclGs 诱导细胞凋亡的基本特征, 以期为BclGs 对肿瘤细胞中的促凋亡功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

人睾丸 cDNA 文库购自 Clontech 公司; 菌株 JM 109、COS7 细胞和 HEK293T、HepG2、MCF7、

* [收稿日期] 2006-02-21
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30200043)
[作者简介] 柳向军(1979-), 男, 甘肃庄浪人, 在读硕士, 主要从事分子遗传学研究。
[通讯作者] 刘小林(1961-), 男, 陕西城固人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

HeLa肿瘤细胞等由北京军事医学科学院功能基因组与蛋白质组学实验室保存; 胎牛血清、DMEM、双抗及胰酶均为Hyclone公司产品; 限制性内切酶和T4DNA连接酶均为NEB公司产品; 质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒均为Promega公司产; dNTP、pyrobest酶和DL-2000 DNA marker购自TaKaRa公司; Lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品; GFP单克隆抗体、Annexin V-PE凋亡检测试剂盒为MBL公司产品; 二抗(羊抗鼠)为Santa cruz公司产品; PVDF膜为Amersham公司产品; Western blot显色试剂盒为Pierce公司产品; 蛋白酶抑制剂为Roche公司产品; 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)为BD Pharmingen™公司产品。

1.2 引物设计

根据NCBI提供的人*BclGs*基因序列(GenBank登录号为AF281255)设计一对引物:

上游GFP-BclGs: 5′CCG CTC GAG CT ATG TGT AGC ACC AGT GGG TGT GAC CT-3′;

下游GFP-BclGs: 5′CCC AAG CTT TCA AAT GCA GGC CAT CAA ACC ATC CTG-3′。

上、下游引物两端分别设有酶切位点*Xho* Ⅰ(CTCGAG)和*Hin*dⅢ(AAGCTT)。引物由北京奥科生物技术有限公司合成, 工作浓度为10 μmol/L。

1.3 *BclGs*基因PCR扩增

以人睾丸cDNA文库为模板, 以pyrobest聚合酶扩增*BclGs*的cDNA。PCR反应体系为: ddH_2O 35.5 μL, dNTP 4 μL, 上、下游引物各1 μL, 模板1 μL, pyrobest酶0.5 μL。混匀后3 000 g离心10 s, 放入GeneAmp PCR system 9700中扩增。PCR扩增条件为: 94 ℃预变性4 min; 94 ℃变性45 s, 60 ℃退火1 min, 72 ℃延伸90 s, 循环30次; 最后72 ℃延伸7 min。产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 pGFP-BclGs载体的构建与鉴定

用Promega凝胶回收试剂盒回收上述PCR反应产物, 经*Xho* Ⅰ/*Hin*dⅢ双酶切后与经同样酶切处理的pEGFP-C1载体按体积比5∶1混合, 16 ℃连接16~20 h。连接产物转化大肠杆菌JM 109, 用$Kana^+$抗性平板筛选阳性克隆。挑取单克隆37 ℃摇菌过夜, 用Promega质粒提取试剂盒提取质粒DNA, 进行*Xho* Ⅰ/*Hin*dⅢ双酶切鉴定并测序(测序在北京诺赛基因组研究中心有限公司完成)。

1.5 pGFP-BclGs瞬时转染

HepG2、MCF7、HeLa、HEK293T和COS7等细胞培养于含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL的双抗(青霉素和链霉素)的DMEM中, 培养条件为37 ℃、体积分数5%的CO_2。待细胞长至70%融合时, 用Invitrogen公司Lipofectamine 2000试剂进行转染, 操作步骤严格按照说明书进行。

1.6 转染肿瘤细胞的荧光观察及Western blot鉴定

转染24 h后的肿瘤细胞用PBS洗一遍, 无水甲醇固定10 min, 弃甲醇加入DAPI于37 ℃反应10 min, PBS洗一遍, 进行荧光观测。同时离心收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L NaF, 体积分数0.5%的NP-40, pH 7.4)冰浴10 min。裂解后加入等体积的2×Loading Buffer于100 ℃煮沸10 min, 6 000 *g*离心5 min吸取上清进行Western blot检测, 分离胶质量浓度为120 g/L, 转膜后用50 g/L脱脂牛奶(TBST稀释)室温封闭2 h, 然后加稀释的小鼠抗GFP抗体(体积比1∶2 000倍稀释)室温孵育2 h, 洗膜后加稀释的HRP偶联的羊抗小鼠二抗(体积比1∶2 000倍稀释)室温孵育45 min, TBST洗膜后显色、曝光。

1.7 肿瘤细胞凋亡的检测

用6孔板培养细胞, 待其长至70%融合时进行转染, 收集转染pEGFP-C1空载体后36 h细胞(对照组)及转染pGFP-BclGs后36 h的细胞(凋亡实验组), PBS洗涤2次, 加入500 μL的结合缓冲液, 避光下分别用5 μL的Annexin V-PE和5 μL的7-AAD标记后, 1 h内用流式细胞仪检测凋亡细胞。

2 结果与分析

2.1 *BclGs*基因扩增结果

结果显示, 扩增片段长度约为750 bp (图1), 与预期结果相符, 且无非特异扩增现象。

2.2 重组载体pEGFP-BclGs的鉴定结果

结果表明, 阴性对照(空载体酶切)无片断释放, 重组载体pEGFP-BclGs酶切后释放出长度约为759 bp的片断(图2), 与预期结果相符。测序及序列分析结果表明, 目的基因*BclGs*与GenBank中已发表的基因序列完全一致, 且阅读框正确。以上结果表明载体pEGFP-BclGs构建成功。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

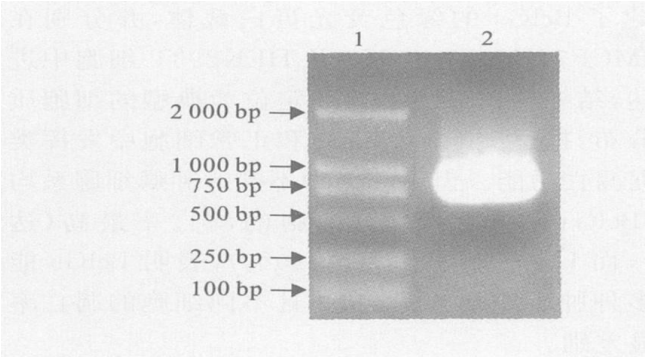

图 1　*BclGs* 基因 PCR 扩增产物电泳图

1. DNA 标样; 2. *BclGs* 的 PCR 扩增产物

Fig. 1　Amplification of *BclGs* gene by PCR

1. DL 2000 Marker; 2. PCR product of *BclGs*

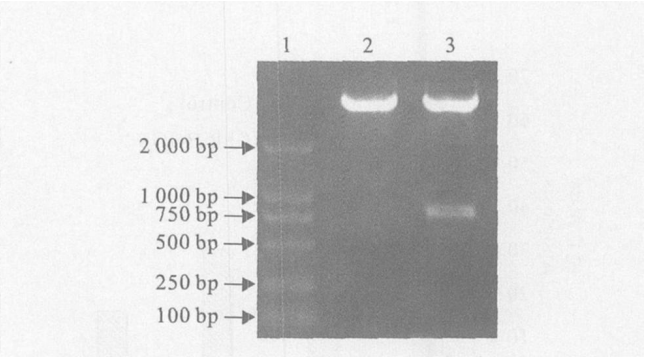

图 2　pEGFP-BclGs 的 *X ho* Ⅰ/*H ind*Ⅲ双酶切鉴定图

1. DNA 标样; 2. pEGFP-C1 双酶切产物; 3. pEGFP-BclGs 的双酶切产物

Fig. 2　pEGFP-BclGs digested with *X ho* Ⅰ and *H ind*Ⅲ

1. DL 2000 Marker; 2. pEGFP-C1; 3. pEGFP-BclGs

2.3　转染肿瘤细胞的荧光观测结果

结果显示, 表达的 BclGs 绿色荧光融合蛋白在 HepG2 (图 3 A), MCF7 (图 3 B)、HEK293T (图 3 C) 及 Hela 细胞中, 均表现为胞浆的点状分布, 其定位并无明显差别。

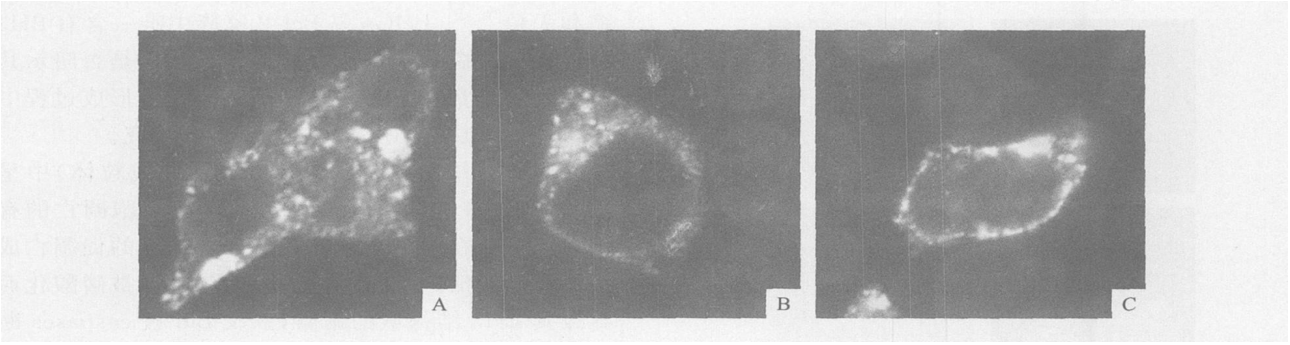

图 3　pGEP-BclGs 在不同肿瘤细胞系的亚细胞定位

A. HepG2; B. MCF7; C. HEK293T

Fig. 3　Subcellular localization of pEGFP-BclGs fusion protein in cell

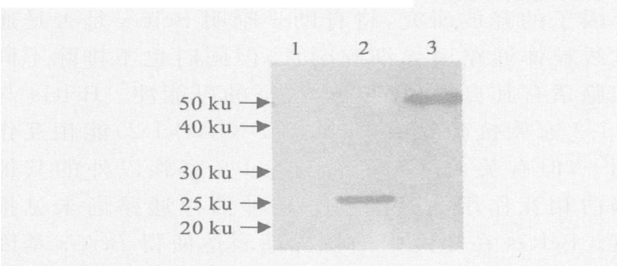

图 4　pGFP-BclGs 在 HEK293T 细胞中的 Western blotting 检测表达

1. 未转染的 HEK293T; 2. 转染 pEGFP-C1 的 HEK293T; 3. 转染 pGEP-BclGs 的 HEK293T

Fig. 4　Expression of PEGFP-C1 and pGFP-BclGs protein by Western blotting in HEK293T cell

1. Cell lysate; 2. Cells were transfected with pEGFP-C1; 3. Cells were transfected with pGFP-BclGs

2.4　pGFP-BclGs 表达的 Western blot 检测结果

分别取转染空载体 pEGFP-C1 和 pGFP-BclGs 的 HEK293T 细胞裂解液, 用小鼠抗 GFP 抗体进行 Western blot 检测。结果(图 4) 显示, 转染空载体的细胞裂解液有 1 条相对分子质量约为 26 ku 的条带, 而转染有 pEGFP-BclGs 的细胞裂解液有一条相对分子质量约为 54 ku 的条带, 与预期结果相符合。

2.5　BclGs 对不同细胞系凋亡率的影响

用 Annexin V-PE 试剂盒检测发现, 转染 pGFP-BclGs 细胞的凋亡率明显高于转染空载体 pEGFP-C1 的细胞; 4 种细胞系中, Hela 细胞的凋亡率最高, 达 60%, MCF 细胞、COS7 细胞和 HepG2 细胞的凋亡率分别为 38%, 30% 和 16% (图 5)。

从形态学观察, 转染空载体 pEGFP-C1 的细胞形态良好, 而转染 pGFP-BclGs 后细胞的状态明显变差, 具体表现为细胞数目减少, 形态变圆, 表明 BclGs 对肿瘤细胞的确具有促凋亡功能(图 6)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

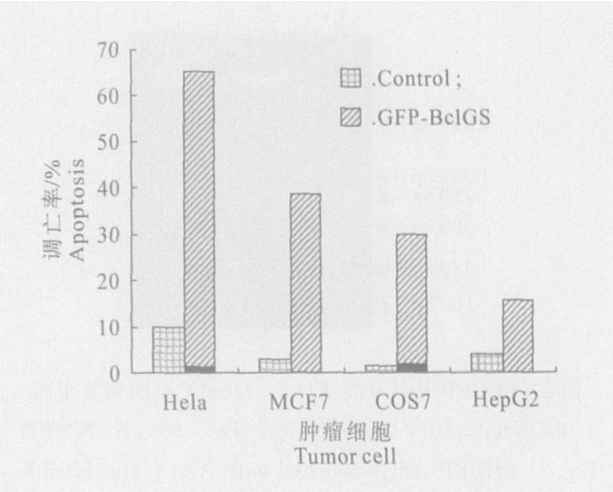

图 5 pGFP-BclGs 对 Hela、MCF7、HepG2 及 COS7 肿瘤细胞系凋亡率的影响

Fig. 5 Apoptosis in Hela, MCF7, HepG2 and COS7 cells induced by pGFP-BclGs

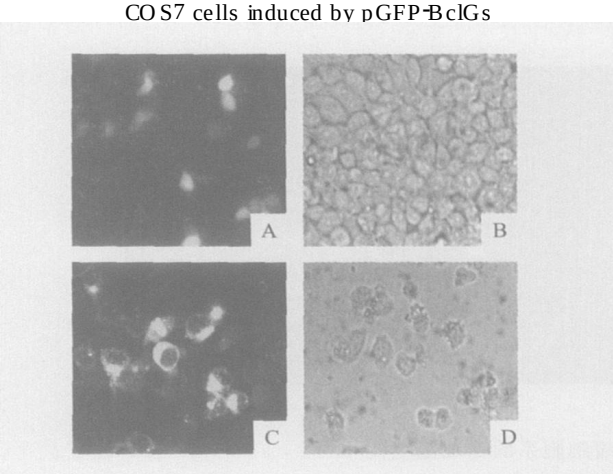

图 6 pEGFP-BclGs 对 HepG2 细胞形态及凋亡的影响(×40)

A. 转染 pEGFP-C1 的 HepG2 细胞荧光照片; B. 转染 pEGFP-C1 的 HepG2 细胞; C. 转染 pEGFP-BclGs 的 HepG2 细胞荧光照片; D. 转染 pEGFP-BclGs 的 HepG2 细胞

Fig. 6 Morphology of HepG2 cells transfected pEGFP-C1 and pEGFP-BclGs respectively

A. Cells transfected pEGFP-C1; B. Cells transfected pEGFP-C1; C. Cells transfected pEGFP-BclGs; D. Cells transfected pEGFP-BclGs

3 讨 论

Reed 等[2]研究表明, BclGs 的 mRNA 仅在睾丸中表达, 使 Bcl-G (Gonad) 得以冠名。BclGs 在细胞质的点状分布并不依赖于 BH3 结构域[1]。有研究表明 BH3 结构域确实是细胞凋亡的关键性结构域, 通常此结构域氨基酸的修饰(如磷酸化)可以影响其促凋亡作用的发挥[3-6]。对 Bcl-2 家族另一成员 Bak 的 BH3 结构域的三维结构研究表明, 其通常是促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白形成二聚体所必需的[7]。本研究构建了 BclGs 的绿色荧光蛋白载体, 并分别在 Hela、MCF7、HepG2、COS7 及 HEK293T 细胞中进行表达, 结果发现其表达后的定位为典型的细胞质点状分布, 提示其在肿瘤细胞和正常细胞中发挥类似的促凋亡功能。但是在 4 种不同的肿瘤细胞系均受到 BclGs 诱导时, Hela 细胞的凋亡率最高(达 60%), 而 HepG2 较低(不到 20%), 表明 BclGs 能诱导多种肿瘤细胞的凋亡, 并且不同细胞的凋亡率有明显差别。

众所周知, Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中, 其抗凋亡成员和促凋亡成员协同作用, 通过线粒体途径共同决定细胞是否进入凋亡程序[8-9]。近年来, 从生理水平研究 Bcl-2 家族成员的报道逐渐增多。对于 Bcl-2 家族某些促凋亡基因敲除小鼠的研究表明, 敲除了某些基因将导致雄性小鼠的不育, 表现在抑制了大量精原细胞和精母细胞的生长以及睾丸萎缩和无精[10-13]。BclGs 是 Bcl-2 家族中唯一含有 BH3 结构域的蛋白, 在睾丸中特异高表达, 这是否暗示其在睾丸的正常发育和生精细胞及胚胎的形成过程中发挥着重要功能, 还需要进一步深入研究。

本研究结果显示, BclGs 在胞浆(线粒体)中呈点状分布, 表明线粒体或许是其诱导细胞凋亡的有效细胞器。在细胞凋亡期间, Bcl-2 家族的促凋亡成员往往被激活(如 Bax 构像的改变、Bad 被磷酸化而导致其 BH3 结构域的暴露, 以及 Bid 被 caspases 断裂), 从而导致了线粒体中凋亡诱导因子(如细胞色素 c、Smac 等)的释放, 最终介导了细胞的凋亡[6]。因此, 与之相关的线粒体膜通透性的变化及凋亡诱导因子的释放研究, 将有助于阐明 BclGs 是否是通过线粒体通路诱导细胞凋亡, 但同时也不排除不同细胞系有其自身独特凋亡特征的可能性。BclGs 与 Bcl-2 家族抗凋亡成员(如 Bcl-XL, Bcl-2)能相互作用[1], 但有关 BclGs 是否与 Bcl-2 家族以外的其他蛋白相互作用而共同调节某种信号通路尚未见报道。BclGs 在睾丸中的特异高表达使得 *BclGs* 基因在动物生理水平的研究显得尤为重要, 基因敲除和转基因动物生理水平的研究, 将为阐明 BclGs 的生理功能提供重要线索。

[参考文献]

[1] Guo B, Godzik A, Reed J C. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family [J]. J Biol Chem, 2001, 276(4): 2780-2786.

(下转第 37 页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

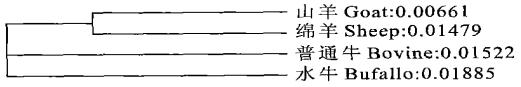

图 8　4 种家畜的遗传进化树

Fig. 8　Cladogram tree of goat, sheep, bovine, buffalo

3　讨　论

*IGFBP*3 基因有许多生物学功能, 已成为学者研究的热点之一。本实验结果表明, *IGFBP*3 基因存在明显的物种间遗传多样性, 即绵羊、山羊、水牛和牦牛该基因座位未表现多态, 而南阳牛该基因座位存在多态性。在南阳牛中表现多态, 与党瑞华[7]在鲁西牛和晋南牛上及孙维斌[2]在秦川牛上利用 PCR-RFLP 的研究结果相似。表明在 *IGFBP*3 基因位点上, 普通牛存在普遍的多态性, 而绵羊、山羊、水牛和牦牛不存在多态性。

本实验结果显示, 山羊与绵羊的亲缘关系最近, 其次是与普通牛和水牛, 该结果与从形态、细胞和生化等方面的分类结果一致。因此, *IGFBP*3 基因核苷酸序列适合于物种间分子进化树的构建。但是, 本实验结果与蓝贤勇等[8]和樊保良等[9]的研究结果有一定的差异, 所以对以上家畜亲缘关系分析还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Reichenmiller K M, Mattern C, Ranke M B, et al. IGFs, IGF-BPs, IGF-binding sites and biochemical markers of bone metabolism during differentiation in human pulp fibroblasts [J]. Horm Res, 2004, 62(1): 33-39.

[2] 孙维斌, 陈　宏, 雷雪芹, 等. *IGFBP*3 基因多态性与秦川牛部分屠宰性状的相关性[J]. 遗传, 2003, 25(5): 511-516.

[3] 张润锋, 陈　宏, 蓝贤勇, 等. 西安荷斯坦奶牛群 5 个基因座位遗传多态性 PCR-RFLP 分析[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(6): 545-549.

[4] 潘传英, 陈　宏, 蓝贤勇, 等. 西农萨能奶山羊 *IGFBP*3 基因多态性研究[J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2004, 9(1): 313-316.

[5] Lan X Y, Chen H, Pan C Y, et al. Cloning and sequencing of *IGFBP*3 gene in Xinong Saanen dairy goat [J]. Animal Biotechnology Bulletin, 2002, 9(1): 45-48.

[6] Chen H, Leibenguth F. Studies on multilocus fingerprints RAPD markeers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus* Gibelio) [J]. Biochem Genet, 1995, 33: 297-306.

[7] 党瑞华, 魏伍川, 陈　宏, 等. *IGFBP*3 基因多态性与鲁西牛和晋南牛部分屠宰性状的相关性[J]. 中国农学通报, 2005, 3(4): 19-22.

[8] 蓝贤勇, 陈　宏, 潘传英, 等. 山羊 FSHR 基因第 10 外显子的 PCR-SSCP 检测及其序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(4): 484-488.

[9] 樊宝良, 李　宁, 吴常信, 等. 依据乳蛋白基因序列构建反刍动物种系发生树的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(6): 485-497.

(上接第 32 页)

[2] Reed J C, Haldar S, Croce C M, et al. Complementation by BCL-2 and C-HA-RAS on co genes in malignant transformation of rat embryo fibroblasts[J]. Mol Cell Boil, 1990, 10(8): 4370-4374.

[3] Adachi M, Zhang Y B, Imai K, et al. Mutation of BAD within the BH3 domain impairs its phosphorylation-mediated regulation[J]. FEBS Letters, 2003, 551: 147-152.

[4] Verma S, Zhao L J, Chinnadurai G, et al. Phosphorylation of the pro-apoptotic protein BIK: mapping of phosphorylation sites and effect on apoptosis[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 4671-4676.

[5] Li H, Zhu H, Xu C, et al. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway to apoptosis[J]. Cell, 1998, 94: 491-501.

[6] 柳向军, 张令强, 刘小林, 等. 细胞凋亡中的 Bcl-2 家族蛋白及其 BH3 结构域的功能研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(3): 221-225.

[7] Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions[J]. Mol Immunol, 2003, 39: 615-647.

[8] Kroemer G, Reed J C. Mitochondrial control of cell death[J]. Nat Med, 2000, 6: 513-519.

[9] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13: 1899-1911.

[10] Coultas L, Bouillet P, Loveland K L, et al. Concomitant loss of proapoptotic BH3-only Bcl-2 antagonists Bik and Bim arrests spermatogenesis [J]. EMBO J, 2005, 24(22): 3963-3973.

[11] Suominen J S, Yan W, Toppari J, et al. The expression and regulation of Bcl-2-related ovarian killer (Bok) mRNA in the developing and adult rat testis[J]. Eur J Endocrinol, 2001, 145(6): 771-778.

[12] Yan W, Huang J X, Lax A S, et al. Overexpression of Bcl-W in the testis disrupts spermatogenesis: revelation of a role of BCL-W in male germ cell cycle control[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(9): 1868-1879.

[13] Yan W, Samson M, Jegou B, et al. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis[J]. Mol Endocrinol, 2000, 14(5): 682-699.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net