

bax 加强表达对 Raji 细胞程序性死亡效应^①

张清秀 朱振宇 马涧泉

(中山医科大学生物化学教研室, 广州, 510089)

摘要 目的: 研究 *bax* 过量表达对 Burkitt 淋巴瘤细胞株细胞程序性死亡的效应及其机理。方法: 亚克隆构建可过量表达 *bax* α 的真核表达载体, 通过脂质体转染法导入 Raji 细胞株中。PCR 及免疫荧光定量鉴定 *bax* α 在 Raji 细胞株中的表达; 流式细胞仪检测凋亡率。结果: 成功构建 pSFFV-*bax* α -S 和 pSFFV-*bax* α -AS 两种质粒, 转染 Raji 细胞后, 测得转染 pSFFV-*bax* α -S 的 Raji 细胞的 *bax* α 表达量明显高于转染空载 pSFFV-*neo* 质粒的 Raji 细胞株。 χ^2 (胎牛血清)=0.01 诱导两种 Raji 细胞 48 h, Raji-*bax* α 的凋亡率为 48.6%, Raji-0 的凋亡率为 6.4%。结论: *bax* α 在 Raji 细胞中的加强表达可明显促进细胞的凋亡。

关键词 *bcl-2*; 基因表达; 脱噬作用; Burkitt's 淋巴瘤

中图分类号 R 73.263

EFFECTS OF *bax* GENE OVER-EXPRESSION ON PROGRAMMED CELL DEATH OF BURKITT LYMPHOMA RAJI CELL LINE

Zhang Qingxiu Zhu Zhenyu Ma Jianquan

(Department of Biochemistry, Sun Yat-sen University of Medical Science, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To investigate the effects and mechanism of *bax* over-expression on the programmed cell death of Burkitt lymphoma Raji cell line. **Method:** The mammalian expression vector pSFFV-*bax* α -*neo*, which overexpressed protein *bax* was constructed by subcloning. The plasmid was transfected into Raji cells by liposome-mediated transfection. The expression of *bax* α was determined by PCR and immunofluorescence staining and flow cytometric analysis. **Results:** pSFFV-*bax* α -S and pSFFV-*bax* α -AS were constructed successfully. *bax* α expression in Raji-*bax* α was apparently higher than that of Raji cells as control. The apoptosis rate of Raji-*bax* α cells was 48.6% while Raji cells was 6.4% after being induced by 1% FCS+RPMI 1640. **Conclusion:** Overexpression of *bax* in Raji cells clearly enhance apoptosis of the cells.

Subject headings *bcl-2* genes; gene expression; apoptosis; Burkitt's lymphoma

细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD), 又称凋亡 (apoptosis), 参与生物体的发育及正常组织动态平衡的维持, PCD 失调会导致自身免疫病、神经变性紊乱、癌症等疾病的发生^[1]。参与调控 PCD 的基因主要有两类, 一类是抑制 PCD 发生的, 如 *bcl-2*, *bcl-x1*, *MCL-1* 等; 另一类是促进 PCD 的, 如 *bax*, *bal-xs*, *bak*, *bik*, *bad* 等。 *bax* 基因是 Oltvai 等人 1993 年发现的^[2], 属于 *bcl-2* 的家

族的一员, Bax 蛋白可与 Bcl-2 形成异二聚体来拮抗 Bcl-2 的作用, 该作用与 Bax 抑制肿瘤的发生作用有关^[3]。EB 病毒 (EBV) 能感染 B 淋巴细胞使其“永生”, 该作用与其致癌性密切相关^[4]。有关 *bax* 的加强表达能否抑制或逆转 EBV 的上述作用的研究尚未见报道。本文通过将 *bax* 导入含有 EBV 基因的 Raji 细胞中, 观察 *bax* 的加强表达有无促进宿主细胞 PCD 的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

限制性内切酶, 脂质体转染试剂盒, 购自德国宝灵曼公司; 第一抗体, 兔抗人 Bax 抗体, 购自基因公司; 小牛血清(fetal calf serum, FCS)购自中山医科大学微生物教研室; RPMI-1640 购自 GIBCO; FITC-鼠抗兔 IgG 购自北京天象人公司, 其余为国产试剂。

1.2 质 粒

全长 *bax* α cDNA 连接在 pBluescript sk 质粒上, pSFFV-LTR-neo 均由美国芝加哥大学医学院 Brian Chang 博士惠赠。pSFFV-LTR-neo 中含有 *Sal* I 和 *Eco* R I 切得的 SFFV-LTR 片段 700 bp, 此 *Eco* R I 位点可用于插入目的基因的 cDNA; SV40 的早期剪切区和晚期 polyA 信号则是来自于 pSV 2 cat 的 912 bp 的 *Ban* I - *Bam* H I 片段; 来自于 pSV 2 neo 的 2 661 bp 的 *Pvu* II - *Bam* H I 片段含有新霉素抗性基因³。纯化后的质粒用脂质体转染法(具体步骤见试剂盒说明), 筛选采用含 G418 2 mg/L 的 1640 培养基培养 1 周后, 改用 1 mg/L G418 维持。存活的细胞供扩大培养及分析。

1.3 细菌和细胞

大肠杆菌 JM109 购自 Promega 公司; Raji 细胞株由中山医科大学肿瘤研究所提供。

1.4 真核表达载体 pSFFV-*bax* α 的鉴定

1.4.1 PCR 鉴定 根据 *bax* α cDNA 序列设计引物跨 1、2、3 外显子, 只有以 *bax* α 的 cDNA 为模板才可扩增出目的基因的片段, 引物序列为:

引物 I : 5'-ATGGACGGTCCGGGAGCAGC-3',

引物 II : 5'-CCCAGTTGAAGTTGCCGTCAG-3'。

1.4.2 流式细胞仪荧光密度分析⁶ 4 $^{\circ}$ C 经 250 g 离心 10 min 收集细胞, PBS 洗两次, 细胞于 -20 $^{\circ}$ C 用 φ (乙醇)=0.5 固定 30 min; 4 $^{\circ}$ C 下 250 g 离心 10 min, 然后用含胎牛血清(FCS)和叠氮钠的 PBS 于 4 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 细胞用 PBS 洗 3 次, 加入 FITC 偶联的羊抗兔 IgG 抗体(2 \times 10⁻⁴L, 1:100 稀释), 细胞悬浮液于 4 $^{\circ}$ C 保温 30 min, PBS 洗 4 次后细胞直接用流式细胞仪检测平均荧光密度(实验重复 3 次)。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

转染 *bax* α 的 Raji 细胞及未转染 *bax* α 的 Raji

细胞在 φ (FCS)=0.01 条件下培养 48 h, 碘化丙啶(0.05 g/L)染色分析 DNA 含量(荧光), DNA 片段化程度, 以及凋亡百分比, 即为凋亡率。

1.6 统计学处理

χ^2 检验。

2 结 果

2.1 pSFFV-*bax* α -neo 表达质粒的构建

将存在于 pBluescript sk 质粒中的 *bax* cDNA 全序列用 *Eco* R I 酶切下, 低熔点胶回收得到目的基因全序列; 同时 *Eco* R I 酶切 pSFFV-LTR-neo 质粒, 加入 T4 DNA 连接酶, 将 *bax* α cDNA 与 pSFFV-LTR-neo 质粒连接, 经含氨苄青霉素的 LB 培养基筛选, 挑取的单菌落中, 38 个有 7 个为阳性菌落, 抽提纯化后的质粒经酶切鉴定结果如图 1, 说明已顺利构建了真核表达质粒 pSFFV-*bax* α -neo。

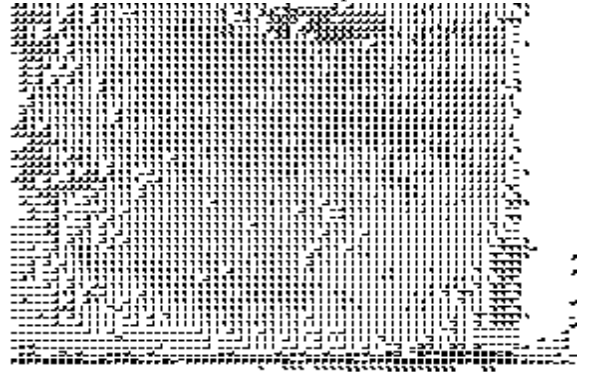


图 1 pSFFV-*bax* α -neo, pSFFV-neo 质粒酶切
Fig. 1 Cleavage of plasmids pSFFV-*bax* α -neo and pSFFV-neo by restriction endonuclease

lane 1. pSFFV-neo cleaved by *Bam* H I ; lane 2. pSFFV-*bax* α -neo in anti-sense cleaved by *Bam* H I ; lane 3. pSFFV-*bax* α -neo in sense cleaved by *Bam* H I ; lane 4. DNA Marker; lane 5. pSFFV-*bax* α -neo in sense; lane 6. pSFFV-*bax* α -neo in antisense; lane 7. pSFFV-neo

2.2 *bax* α 真核表达载体的鉴定

2.2.1 PCR 法 *bax* 的 mRNA 中含有 6 个外显子, *bax* α 与 *bax* β 在外显子 1 的序列上有差别, 而 *bax* γ 则缺乏外显子 2。本文所设计的引物则跨外显子 1、2、3, 可专一性地将 *bax* α 的 323 bp 片段扩增出来。真核表达载体 pSFFV-*bax* α -neo 经扩增、抽提、纯化后, 脂质体转染进入 Raji 细胞, G418 筛选 1 周后获得稳定转染细胞, 收集细胞并抽提其 DNA, PCR 扩增后, 经 w (琼脂糖)=0.01 电泳结果如图 2。

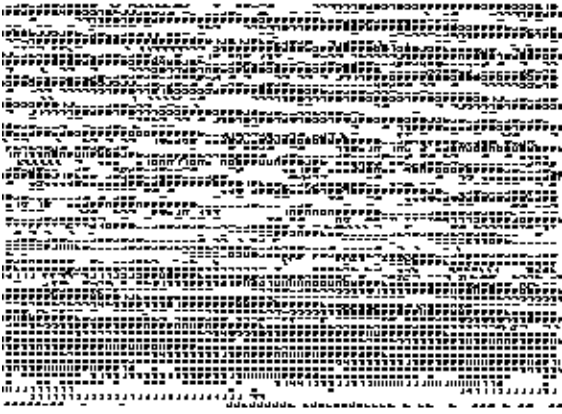


图 2 不同模板 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR assay of different DNAs as templates

lane 1. PCR Marker; lane 2. positive control; pSFFV-*bax* α -neo as template; lane 3. negative control; DNA of Raji cells as template; lane 4. DNA of stable transfected Raji cells as template

2.2.2 真核表达载体 pSFFV-*bax* α -neo 表达产物鉴定 *bax* α cDNA 亚克隆进入 pSFFV-LTR-neo

获得的真核表达载体, 并在 JM109 中扩大培养、纯化, 转染进入 Raji 细胞, 经 G418 筛选获得稳定转染细胞。以转染空载 pSFFV-LTR-neo 的 Raji 细胞为对照, 进行间接荧光平均强度测定 (细胞数目为 5 000 ~ 7 000) 稳定转染细胞为 4. 25, 对照细胞为 1. 32。结果如图 3, 说明 *bax* α 在 Raji 细胞中得到加强表达。

2.3 *bax* α 的表达对细胞凋亡的效应检测

已知细胞进行凋亡时表现出的特征性 DNA 片段化, DNA 降解成寡核苷酸片段, 这一特征通过流式细胞仪分析、检测得到细胞凋亡率。将 *bax* α -cDNA 插入 SFFV-LTR 启动子的 3' 端, 导入 Raji 细胞株中并得到加强表达后, 经 RPMI-1640 + ϕ (FCS) = 0. 01 培养 48 h 处理, 细胞凋亡率是未转染 Raji 细胞 (对照组) 的 6 倍, 经统计学处理后仍可看出两者的明显差异, 分别为 40. 8% 和 6. 4%, $P < 0. 005$, 见表 1。同时还分析了细胞分裂周期中 G1/G0、S 期等的百分率变化 ($P > 0. 05$), 发现 *bax* α 的加强表达对增殖中的细胞周期分布没有产生有意义影响。

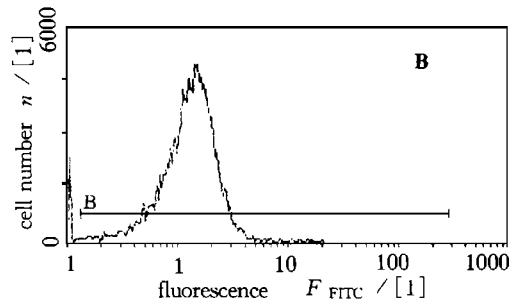
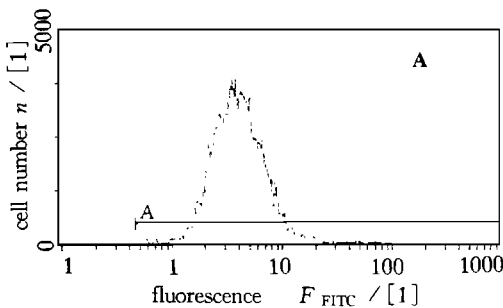


图 3 Raji-*bax* α 细胞与 Raji 细胞的相对荧光密度

Fig. 3 Relative fluorescent intensity of Raji-*bax* α cell and Raji o cell

1×10^6 cells were fixed with ethanol stained with Bax α -specific rabbit anti-human IgG, followed by FITC-conjugated mouse anti-rabbit IgG, incubated for 30 min, washed four times with PBS. Cells was then analysed by flow cytometry. Mean flourencent intensity of two kinds of cell lines is: (A) Raji-*bax* α ; 4. 25; (B) Raji; 1. 32

表 1 流式细胞仪检测的细胞凋亡率¹⁾

Table 1 Apoptosis rate r_{ap} / (%) of different cell lines analysed by flow cytometry¹⁾

cell lines	cell number	G1/G0	S / (%)	r_{ap} / (%)
Raji	10 659	17. 9	20. 6	6. 4
Raji- <i>bax</i> α	11 566	18. 1	19. 3	40. 8
<i>P</i>		$> 0. 05$	$> 0. 05$	$< 0. 005$

1) repeated for three times

3 讨论

PCD 的失控将导致自身免疫病、神经变性紊乱、癌症等疾病的发生^[1]。尽管免疫组化测定小鼠活体组织中, Bax 和 Bcl-2 的分布区域仅部分重叠^[7], 但已证实 Bax 能拮抗 Bcl-2 而具有抑制肿瘤发生的作用^[3]。*bax* 缺陷小鼠仍能生存, 但它的 B

淋巴细胞表现异常增殖, 雄性生殖细胞发生死亡^[8], 说明 Bax 在不同系统、组织细胞中, 其作用机理、功能不同。EBV 具有致癌性, 它在体外感染 B 淋巴细胞可使之转化为母细胞而分裂增殖, 形成能长期传代的“类淋巴母细胞株”^[4], 证实 EBV 的潜伏膜蛋白(LMP1)及 BHRF1 蛋白能保护被其感染的 B 细胞免于发生 PCD^[9, 10]; Yin 等^[3]用转基因鼠研究发现在活体内 Bax 可抑制鼠脑肿瘤的发生并激发 PCD 的发生。我们观察到 *bax* α 在含有 EBV 的 Raji 细胞中的加强表达后, 的确能明显提高 Raji 细胞在缺血条件下的凋亡率, Bax 参与了其凋亡过程。Bax 不仅在 B 淋巴系统中促进凋亡, 并且在 EBV 存在的条件下也能明显促进凋亡, 而 Bax 的作用机理如何、能否逆转 EBV 所导致的 B 淋巴细胞永生, 尚有待进一步研究。*bax* 的过量表达能够促进含 EBV 的 Raji 细胞凋亡, 高表达 *bax* α 的真核表达载体的构建, 这一研究结果为进一步开展肿瘤的基因治疗奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, 267: 1456
- 2 Oltvai Z N, Millman C T, Korsmeyer S T. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 1993, 74: 609
- 3 Yin C Y, Kundson C M, Korsmeyer S J, *et al*. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*. *Nature*, 1997, 385: 637
- 4 闻玉梅. 医学分子病毒学. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 1~150
- 5 Fuhlbrigge R C, Fine S M, Unanue E R, *et al*. Expression of membrane interleukin 1 by fibroblasts transfected with murine pro-interleukin α cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 5649
- 6 Lu J J Y, Chen J Y, Hsu T Y, *et al*. Induction of apoptosis in epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1883
- 7 Krajewski S, Krajewska M, Shabik A, *et al*. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol*, 1994, 145: 1323
- 8 Knudson C M, Tung K S K, Tourtellotte W G, *et al*. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 1995, 270: 96
- 9 Henderson S, Rowe M, Gregory C, *et al*. Induction of *bcl-2* expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cell from programmed cell death. *Cell*, 1991, 65: 1107
- 10 Henderson S, Huen D, Rowe M, *et al*. Epstein-Barr virus-code BHRF1 protein, a viral homologue of *bcl-2*, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 8479

(1997-08-10 收稿 1997-12-29 修回)

·新成果·

生活反应微环境改变在生前死后伤鉴别与溺死诊断中的研究

课题负责人 陈玉川

(中山医科大学法医病理学教研室; 广州, 510089)

本研究从法医学实际需要出发, 采用化学分析、生物化学及免疫组化等方法, 对损伤组织离子、损伤组织酶、损伤出血部位的糖蛋白、损伤组织的炎症介质、溺死尸体微量元素等方面进行深入的研究, 揭示了损伤、溺死过程中局部组织、微环境生活反应的形成规律、影响因素和产生机理, 建立了一种科学、可靠的诊断方法, 并在法医实际案例中得到验证, 为解决全国各地送检的一些重大、疑难案件提供了正确的判断和科学依据。本研究于 1996 年获国家教委科技进步二等奖。

(陈丽芳)