

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0253-04

重构型 caspase-3 的表达及其对 SKBr3 细胞的凋亡诱导作用

张立红¹, 贾林涛¹, 陈广生², 曲萍², 于翠娟¹, 赵晶¹, 许彦鸣¹, 王成济¹, 杨安钢¹(1. 第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室; 2. 第四军医大学基础部病理学教研室, 西安 710032)

[摘要] 目的: 探讨重构型 caspase-3 基因的表达对肿瘤细胞的凋亡诱导作用。方法: 用重组 PCR 的方法获得大、小亚基顺序颠倒的重构型 caspase-3 基因并将其克隆入真核表达载体 pcDNA3, 转染乳腺癌细胞系 SKBr3 细胞, 通过 HE 染色、流式细胞仪分析及免疫组化等方法观察其表达后对细胞的促凋亡活性, 并将载体 DNA 直接注射荷瘤裸鼠研究其对肿瘤的抑制作用。结果: 重构型 caspase-3 基因可在 SKBr3 细胞内表达, 转染组较同期对照组出现明显的细胞死亡现象, pcDNA3- revcasp-3 重组质粒直接注入对荷瘤裸鼠肿瘤生长有明显抑制作用。结论: 重构型 caspase-3 基因表达可诱导 SKBr3 细胞凋亡。

[关键词] 重构型 caspase-3; 凋亡; SKBr3

[中图分类号] Q255 [文献标识码] A

Construction of Reversed Caspase-3 Protein and Its Effect on Apoptosis Induction in SKBr3 Cells

ZHANG Li-hong¹, JIA Lin-tao¹, CHEN Guang-sheng², QU Ping², YU Cui-juan¹, ZHAO Jing¹, XU Yan-ming¹, WANG Cheng-ji¹, YANG An-gang¹(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University; 2. Department of Pathology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptosis induction effect due to the expression of reversed caspase-3 gene in SKBr3 cells. **Methods:** Reversed caspase-3 gene was gain by recombinant PCR and cloned into expression vector pcDNA3 to transfected SKBr3 cells. The expression and the apoptosis induction effect of reversed caspase-3 gene on SKBr3 cells were observed by HE and immunohistochemical staining. The cell cycle of transfected SKBr3 cells were analyzed by FCM. The tumor suppression effect of reversed caspase-3 gene was observed through administrating recombinant plasmids to BALB/c nude mice bearing SKBr3 tumor. **Results:** Reversed caspase-3 gene can be expressed in SKBr3 stably. Reversed caspase-3 protein can induce obvious apoptosis in vitro and inhibit tumor growth in vivo. **Conclusion:** Reversed caspase-3 gene can effectively induce SKBr3 cells to apoptosis.

[Key words] caspase-3; apoptosis; SKBr3

* caspase(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶, cysteinyl aspartate-specific protease)是一类在细胞凋亡中起关键作用的蛋白酶家族^[1]。其中, caspase-3 是细胞凋亡最重要的执行分子, 它在细胞中通常以由 N 端原结构域、大亚基和小亚基组成的酶原的形式存在, 在凋亡信号刺激下, 酶原被上游 caspase 分子切割, 原结构域被去除, 大、小亚基游离并组装成有活性的 caspase-3 分子, 特异性识别并切割一系列下游底物分子如 PARP 等, 使细胞凋亡^[2]。caspase-3 的切割活化是不同细胞凋亡途径中共同的下游事件。一旦 caspase-3 活化, 凋

亡将不可逆转。Srinivasula 等^[3]则构建了一种重构型 caspase-3 分子, 这种分子可自发折叠成具有活性的三维结构形式而无需上游 caspase 分子切割活化。本文构建了具有自发活性的重构型 caspase-3(revcasp-3)真

* [基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2001AA217101)、国家杰出青年科学基金(399Z5036)及军队杰出中青年人才研究基金(98J009)资助

[作者简介] 张立红(1972-), 女, 山西太原人, 讲师, 博士生, 主要从事肿瘤基因治疗方向研究。

[通讯作者] 杨安钢

核表达载体并研究了其在体内、外对人乳腺癌细胞系 SKBr3 细胞的促凋亡作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞系 SKBr3 为本室保存;大肠杆菌 DH5a, pUC19 质粒, pcDNA3 载体均为本室保存;限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、新生牛血清、DMEM 培养基、胰酶及脂质体 lipofectAMINE™2000 为 Gibco 公司产品;兔抗人活性型 caspase-3 多抗为 PharMinGen 公司产品;实验用 BALB/c 裸鼠由第四军医大学实验动物中心繁殖饲养。

1.2 方法

1.2.1 重构型人 caspase-3 基因的克隆及真核表达载体的构建

caspase-3 基因克隆见文献[4],设计引物 P1/P2, P3/P4 分别扩增 caspase-3 大、小亚基基因, P1: ttggatc-catgagtggtgtgatgatga; P2: gttctccatgtgataaaatag ag; P3: tttttacatcggagaacactgaa; P4: ttctagattagtctgtctcaatgccac 重组 PCR 连接获得大、小亚基顺序颠倒的 caspase-3 基因(revcasp-3),将其克隆入 pUC19 质粒并测序,结果正确之后将其亚克隆入 pcDNA3 载体,命名为 pcDNA3-revcasp-3。

1.2.2 基因转染、细胞形态观察

转染前 24 h 将细胞分别铺于 6 孔板,待细胞生长至约 60% 时,按照 lipofectAMINE™2000 使用说明转染 pcDNA3-revcasp-3 及 pcDNA3 空载体。倒置显微镜观察并在转染后 1~6 d 分别制备细胞爬片,HE 染色按照常规方法进行。

1.2.3 流式细胞仪分析

分别于转染后 1~6 d 消化细胞,PBS 洗涤 2 次,加 2 倍体积无水乙醇固定细胞,PI 染色后进行细胞周期分析。

1.2.4 基因表达产物的检测

取转染后 2 d SKBr3 细胞爬片,用抗人 caspase-3 多抗进行免疫细胞化学检测。

1.2.5 裸鼠体内抑瘤性实验

选取 18 g 左右裸鼠共 8 只,在肢体左右两侧皮下分别接种 1×10^6 SKBr3 细胞,3 周后形成直径约 5 mm 左右瘤块。在肢体左右两侧瘤体分别注射 pcDNA3-revcasp-3(治疗组)及空载体 pcDNA3(对照组)各 100 μ g,3 d 和 6 d 后再追加注射 2 次。定期测量肿瘤体积(肿瘤体积 = $1/2 \times$ 肿瘤最大径 \times 肿瘤最小径²),3 周后将裸鼠颈椎脱臼致死,称量对照组和治疗组肿瘤重

量。

2 结果

2.1 pcDNA3-revcasp-3 真核表达载体的构建

以 pUC19-caspase-3 基因为模板,用引物 P1/P2, P3/P4 分别扩增 caspase-3 大、小亚基基因,重组 PCR 获得大、小亚基顺序颠倒的 caspase-3 基因,测序证实后将其亚克隆入真核表达载体 pcDNA3。EcoR I/XbaI 双酶切鉴定结果如图 1。

图 1 EcoR I/Xba I 双酶切鉴定克隆人 revcasp-3 基因
Fig. 1 Identification of reversed caspase-3 gene cloned into pcDNA3 by EcoR I/Xba I cleavage

Lane 1: DL 2000 marker; Lane 2: reversed caspase-3

2.2 revcasp-3 基因转染抑制 SKBr3 细胞生长

以 pcDNA3 空载体作为对照,用 pcDNA3-revcasp-3 转染后发现,实验组细胞在转染后第 2 天开始部分细胞形态及折光性变差,有少量细胞死亡。HE 染色结果显示转染后第 2 天开始有核深染,细胞表面突起等较典型的凋亡细胞出现,随着时间的推移凋亡细胞逐渐增多,至第 4 天已形成了大量的凋亡小体。至第 5,6 天更是有大量的凋亡和坏死细胞出现(图 2)。在转染后第 2 天即通过流式细胞仪检测出较明显的凋亡峰(图 3)。

2.3 免疫组化结果显示 revcasp-3 基因在细胞中表达

转染后 48 h 用兔抗人活性型 caspase-3 多抗进行免疫细胞化学检测,结果显示转染 pcDNA3-revcasp-3 组胞质染棕色,表明转染的 revcasp-3 基因得到表达。对照组胞浆未着色,只有胞核被苏木素衬染呈蓝色(图 4)。

2.4 revcasp-3 基因表达可抑制裸鼠体内肿瘤生长

给荷瘤裸鼠注射 pcDNA3-revcasp-3 重组质粒之后

观察发现和 pcDNA3 空载体组比较,转染 revcasp-3 基因对肿瘤生长有明显抑制作用(表 1)。统计结果显示

两者有显著差异($P < 0.01$)。肿瘤抑制率可达 70.13%。

图 2 转染实验组及同期对照组细胞的 HE 染色结果

Fig. 2 Staining of SKBr3 with HE after transfected

A-F: Control groups at 1d,2 d,3 d,4 d,5 d,6 d after transfected with vectors pcDNA3 separately;
G-L: Experimental group at 1d,2 d,3 d,4 d,5 d,6 d after transfected with pcDNA3- revcasp-3 separately

这在维持机体正常生命过程具有重要意义。同时,细胞凋亡与肿瘤的发生密切相关,由于癌基因激活而导致的细胞周期失控、细胞凋亡不足是许多肿瘤发生的重要机制。

图 3 细胞周期分析结果

Fig. 3 Result of measurement of cell cycle

A: Control group; B: pcDNA3- revcasp-3 transfected group at 2 d

3 讨论

caspase-3 是细胞凋亡过程中重要的效应蛋白酶,在细胞凋亡通路中居于中心地位。通常它只在经过上游起始 caspase 切割后才被活化,引发细胞凋亡过程。

图 4 revcasp-3 蛋白在细胞中的表达

Fig. 4 Expression of revcasp-3 protein in SKBr3

A: Control group; B: pcDNA3- revcasp-3 transfected group at 2 d

表1 治疗前后裸鼠肿瘤体积变化情况

Tab. 1 The changes of tumor volume

Groups	n	Tumor volume	Tumor volume	Tumor weight
		before therapy (mm ³)	after therapy (mm ³)	after therapy (g)
Control	8	62.26 ± 9.67	795.54 ± 32.72	0.29
Therapy	8	63.15 ± 8.93	281.59 ± 13.03	0.05

近年来随着人们对凋亡机理研究的不断深入,越来越多的研究者试图通过诱导肿瘤细胞凋亡来治疗癌症,其中作为内源性的凋亡效应蛋白酶,caspase-3亦因其在细胞凋亡过程中的重要作用而倍受关注。例如,Yamabe等^[5]将caspase-3基因转入肝癌细胞系AH130后显著增加了细胞对化疗的敏感性。Shinoura等^[6]将caspase-3和FasL基因共同转化神经胶质瘤细胞并高效诱导了细胞凋亡。Maccorkle等^[7]构建了caspase-3和FKBP的嵌合分子,转化细胞后用二聚体药物FK1012诱导,caspase-3发生聚集并活化。Shariat等^[8]则将这种被称为“死亡开关”的新的“自杀基因”策略用于前列腺癌的基因治疗。Vocero-Akbani等^[9]在HIV治疗中构建并在大肠杆菌中表达了嵌合分子TAT-caspase-3,该分子用HIV蛋白酶切割识别位点代替了原有的上游caspase切割位点并可借助TAT的穿膜作用进入淋巴细胞,但正常情况下并不具有caspase-3活性。只有当HIV感染时,病毒编码的蛋白酶才会将其加工成活性分子,使细胞走向凋亡。Colussi等^[10]则将caspase-2的N端prodomain与caspase-3融合,获得了可自发聚集活化的融合分子。Srinivasula等^[3]则构建了一种重构型caspase-3分子,这种分子可自发折叠成具有活性的三维结构形式,无须上游caspase分子切割活化。

本研究据此构建了表达具有自发活性的重构型caspase-3(revcasp-3)真核表达载体,转染乳腺癌细胞系SKBr3,瞬时表达目的基因,进一步通过细胞形态观察、免疫组化、流式细胞仪分析细胞周期等方法对转染细胞进行了研究。结果发现,转染revcasp-3基因的细胞在转染后第2天开始有较典型的凋亡细胞出现,此时,通过流式细胞仪检测出较明显的凋亡峰。随着时间的推移凋亡细胞逐渐增多,至第4天已形成了大量的凋亡小体;至第

5,6天更是有大量的凋亡和坏死细胞出现。通过免疫组化的方法在蛋白水平上观察到重组基因的表达。动物实验结果进一步证明revcasp-3基因的表达可诱导乳腺肿瘤细胞凋亡,明显延缓肿瘤细胞生长,对乳腺肿瘤有很好的抑制作用,抑制率可达70.13%。

以上研究表明,表达的重构型caspase-3可以诱导乳腺癌细胞SKBr3的凋亡,并明显抑制裸鼠肿瘤的生长,有望为肿瘤生物治疗提供一种新的思路。

[参考文献]

- [1] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 383-424.
- [2] Hengartner MO. Apoptosis: Corraling the corpses [J]. *Cell*, 2001, 104: 325-328.
- [3] Srinivasula SM, Ahmad M, Macfarlane M, *et al.* Generation of constitutively active recombinant caspase-3 and -6 by rearrangement of their subunits [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 10107-10111.
- [4] 贾林涛,于翠娟,朱峰,等. caspase-3融合蛋白基因的构建及其对HeLa细胞的凋亡诱导作用[J]. *第四军医大学学报*, 2001(22), 12: 1057-1060.
- [5] Yamabe K, Shimzu S, Ito T, *et al.* Cancer gene therapy using a pro-apoptosis gene, caspase-3 [J]. *Gene Ther*, 1999, 6: 1952-1959.
- [6] Shinoura N, Muramatsu Y, Yoshida Y, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of caspase-3 with Fas ligand induces drastic apoptosis in U373Mg glioma cells [J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256: 423-433.
- [7] Maccorkle RA, Freeman KW, Spencer DM. Synthetic activation of caspase: Artificial death switches [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3655-3660.
- [8] Shariat SF, Desai S, Song W, *et al.* Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: A novel "death switch" gene therapeutic approach to prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 2562-2571.
- [9] Vocero-Akbani AM, Heyden NV, Lissy NA, *et al.* Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 29-33.
- [10] Colussi PA, Harvey NL, Shearwin-Whyatt LM, *et al.* Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 26566-26570.

[收稿日期] 2002-06-08

[修回日期] 2002-08-30