

重构型人 caspase-8 基因的表达诱导 HeLa 细胞凋亡*

桂俊豪** 赵 晶 许彦鸣 于翠娟 贾林涛 王成济 杨安钢***

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710033)

摘要 以两种大、小亚基基因次序颠倒的重构型人 caspase-8 基因的 pIRES2-EGFP 真核表达载体转染 HeLa 细胞, 用间接免疫荧光染色、免疫细胞化学染色和电镜观察等方法, 研究重构型人 caspase-8 基因在 HeLa 细胞中的表达及其促凋亡活性。结果显示, 两种重构型人 caspase-8 基因在 HeLa 细胞中的表达可以有效地诱导 HeLa 细胞凋亡。

关键词 重构型, 人 caspase-8 基因, pIRES2-EGFP, 表达, HeLa 细胞, 凋亡

学科分类号 Q78

细胞凋亡 (apoptosis) 是细胞在受到生理或病理刺激后发生的自发性、无炎症的死亡过程。近年研究表明, 在众多的凋亡相关蛋白中, caspase 是细胞凋亡的关键执行者^[1]。Caspase 即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate-specific protease, caspase), 是一类进化上高度保守的半胱氨酸蛋白酶家族。根据 caspase 分子的同源性及其在细胞中的作用不同, 可将其分为 ICE (interleukin-1 β converting enzyme) 亚类、凋亡起始亚类 (initiator) 和凋亡效应亚类 (effector), 其中后二者与凋亡的关系最为密切。凋亡起始亚类以 caspase-8 为代表, 包括 caspase-2、-8、-9 和-10。凋亡效应亚类以 caspase-3 为代表, 包括 caspase-3、-6 和-7, 活化的效应 caspase 可以直接切割一系列的细胞底物成分而杀死细胞^[2]。

Caspase-8 全长有 479 个氨基酸, 其中 Met1 ~ Asp216 构成氨基端原结构域 (pro-domain), Ser217 ~ Asp374 间为大亚基, Asp384 ~ Asp479 间为小亚基, 大、小亚基构成催化结构域 (catalytic domain, CD), 酶活性中心由 QACQG 组成^[3]。在 Fas、TNFR-1、DR4、DR5 等死亡受体介导的细胞凋亡中, caspase-8 经‘诱导接近模式’活化, 活化的 caspase-8 激活下游效应 caspase, 如 caspase-3、-6、-7 等, 诱发细胞凋亡^[4~6]。

1998 年, Srinivasula 等^[7]构建并表达了大、小亚基基因次序颠倒的具有持续促凋亡活性的重构型人 caspase-3 和-6。虽然 caspase-8 和 caspase-3 等分子在结构和活化机制上具有相似性^[8,9], 但大、小亚基次序颠倒的重构型人 caspase-8 分子是否也具有持续的活性尚不得而知。在构建了两种重构型人

caspase-8 基因的真核表达载体的基础上^[10], 我们进一步研究了这两种重构型人 caspase-8 的促凋亡活性。

1 材料和方法

1.1 材料

HeLa 细胞系由本室保存, pIRES2-EGFP-Rev8 和 pIRES2-EGFP-Rev8L 由本室构建。胎牛血清、DMEM 及脂质体 LipofectAmine™2000 等购自 Gibco BRL 公司。山羊抗人 caspase-8 多抗和荧光染料 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 分别购自 Santa cruz 公司和武汉博士德公司, 4', 6-二乙酰基-2-苯基吲哚 (DAPI) 为 Molecular Probes 公司产品。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自 Jackson 公司, 免疫组化 ABC 即用型试剂盒为华美生物工程公司产品。荧光共聚焦显微镜及照相系统由德国 Leica Microsystems 公司出品。

1.2 方法

1.2.1 基因的改建及其真核表达载体的构建: 人 caspase-8 催化结构域基因的改建参见文献 [10], 所获重构型人 caspase-8 基因分别重命名为 Rev8 和 Rev8L, 并分别克隆入 pIRES2-EGFP 的相应位点, 构建成重构型人 caspase-8 基因的 pIRES2-EGFP 真核表达载体, 其结构示意图 1。

* 教育部留学回国人员科研启动基金 (HG99003) 和国家杰出青年科学基金 (39925036) 资助项目。

** 兰州军区乌鲁木齐总医院临床医学研究所, 乌鲁木齐 830000

*** 通讯联系人。

Tel: 029-3376598, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2003-03-02, 接受日期: 2003-04-28

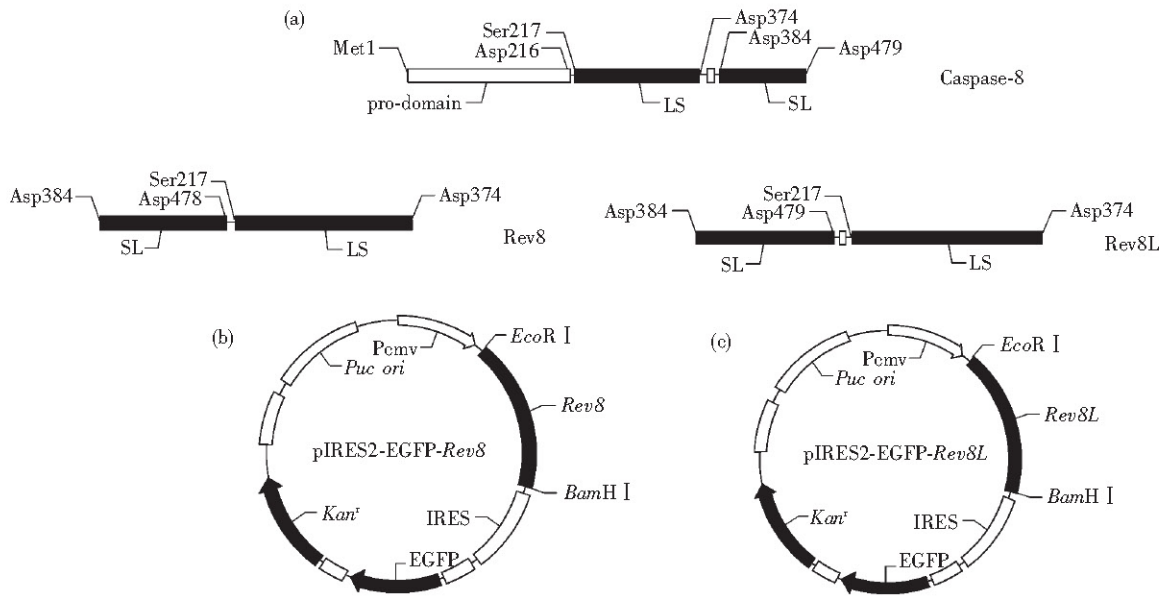


Fig. 1 Structural representation of *Rev8* and *Rev8L* and pIRES2-EGFP carrying reconstructed human caspase-8 genes (*Rev8* and *Rev8L*)

(a) structures of caspase-8, *Rev8* and *Rev8L* (LS: large subunit; SL: small subunit); (b) structure of pIRES2-EGFP-*Rev8* vector; (c) structure of pIRES2-EGFP-*Rev8L* vector.

1.2.2 细胞爬片制作及转染: 人宫颈癌 HeLa 细胞用 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清) 在 37℃、5% CO₂ 浓度条件下培养。转染前 24 h 将适量细胞重新接种于 12 孔培养板中的洁净盖玻片上, 过夜培养, 次日转染。转染按 LipofectAmine™2000 脂质体使用说明书进行。

1.2.3 间接免疫荧光染色检测基因的表达: 分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 载体瞬时转染培养在 12 孔板中盖玻片上的 HeLa 细胞, 转染以后 18 h, 弃培养液, 取出盖玻片并用 PBS 洗涤。加入 4% 多聚甲醛固定。加入 0.3% 的非离子型表面活性剂 Triton-X100 进行膜穿孔, 室温中作用 10 min, PBS 洗涤。加入一抗 (羊抗人 caspase-8 多抗, 用含 1% BSA 的 PBS 按 1:500 稀释), 细胞爬片置于一抗中 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤。将生物素化的二抗 (兔抗羊 IgG) 用 PBS 以 1:600 稀释, 细胞爬片在二抗中室温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍。将荧光染料 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 按 1:200 稀释后滴加至细胞爬片上, 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 遍。滴一滴 PBS 在载玻片中央, 小心取出盖玻片, 细胞面朝下轻轻置于载玻片液滴上, 置共聚焦荧光显微镜下观察并照相。

1.2.4 蛋白质印迹: 分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 转染培

养在 6 孔板中的 HeLa 细胞, 于转染后 20 h 弃培养液, 冰预冷的 PBS 洗 2 遍, 胰酶消化、离心收集细胞, 冰预冷的 PBS 洗 3 遍, 于细胞沉淀中加入适量蛋白质加样缓冲液, 沸水煮 10 min。12 000 r/min 离心 10 min。取 10 μl 上清进行蛋白质印迹分析。

1.2.5 荧光显微镜观察细胞及细胞核形态: 分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 载体瞬时转染 HeLa 细胞。于转染后 30 h 取出盖玻片, 吸去培养液, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗两遍。将细胞核染料 4',6-二乙酰基-2-苯基吡啶 (DAPI) 用 PBS 按 1:333 稀释, 滴加至细胞爬片上, 室温染核 5 min, 置不同波长荧光显微镜下观察细胞及细胞核的形态并照相。

1.2.6 免疫细胞化学染色: 分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 瞬时转染培养在 12 孔板中盖玻片上的 HeLa 细胞。转染后 30 h, 取出盖玻片, 加入 4% 多聚甲醛固定。甲醇: 双氧水 (甲醇 40 ml + 30% 新鲜双氧水 400 ml) 灭活。加入 0.1% 的非离子型表面活性剂 Triton-X100 进行膜穿孔。用含 1% ~ 3% 山羊血清的 PBS 封闭后, 直接加入一抗 (羊抗 caspase-8 多抗, 用含 1% BSA 的 PBS 按 1:100 稀释), 细胞爬片置于一抗中, 4℃ 孵育 12 ~ 24 h, PBS 洗涤。将生物素

化的二抗（即兔抗羊 IgG）用 PBS 以 1:200 稀释，细胞爬片在二抗中室温孵育 1~2 h，PBS 洗涤。将 A 液和 B 液按 1:100 稀释（A 为亲和素，B 为生物素-HRP），混匀，滴加至盖玻片上，室温孵育 1 h，PBS 洗涤。滴加显色液（由 40 ml PBS、5 μ l 30% 的 H_2O_2 和 1 ml 3,3'-二氨基联苯胺配制而成），暗处显色适当时间后加入 PBS 终止反应。脱水，透明，滴加适当中性树脂至载玻片上，盖玻片细胞面朝下轻轻放在载玻片上，烤箱烤干，镜检，照相。

1.2.7 电镜标本制作：分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-Rev8 和 pIRES2-EGFP-Rev8L 转染培养于 T25 瓶中的 HeLa 细胞，于 25 h 后消化、离心收集细胞，用 2.5% 戊二醛 4℃ 固定 2 h，剥离细胞团块，小心用 PBS 洗两遍，脱水、包埋，制备超薄切片，染色，水洗，透射电镜观察并照相。

2 结 果

2.1 基因的改建及真核表达载体的构建

人 caspase-8 催化结构域基因的改建及真核表达载体的构建参见文献 [10]。

2.2 重构型基因在 HeLa 细胞中的表达

真核表达载体 pIRES2-EGFP 具有双顺反子（double-cistron）结构，允许外源性基因和 EGFP 的同时表达，有利于观察外源性基因的表达对细胞形态的影响。我们分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-Rev8 和 pIRES2-EGFP-Rev8L 载体瞬时转染 HeLa 细胞，转染后 18 h 取出盖玻片，用山羊抗人 caspase-8 多抗、生物素化的兔抗山羊 IgG 及红色荧光染料 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 染色，置共聚焦显微镜下观察。其中，绿色荧光指示 EGFP 的表达，红色荧光指示 Rev8 和 Rev8L 基因的表达（Cy3 标记）。结果显示，未转染组 HeLa 细胞中可以检测到内源性 caspas-8 的表达，荧光强度较弱，分布于细胞浆（图 2a）。pIRES2-EGFP 空载体转染的 HeLa 细胞中有 EGFP 的表达，并显示内源性 caspas-8 本底（图 2b）。而与 EGFP 共表达的 Rev8 和 Rev8L 基因产物在细胞核和细胞浆中均有分布，荧光较强，成弥散状。在共聚焦显微镜下，红光和绿光叠加，呈橘黄色荧光（图 2c 和图 2d）。

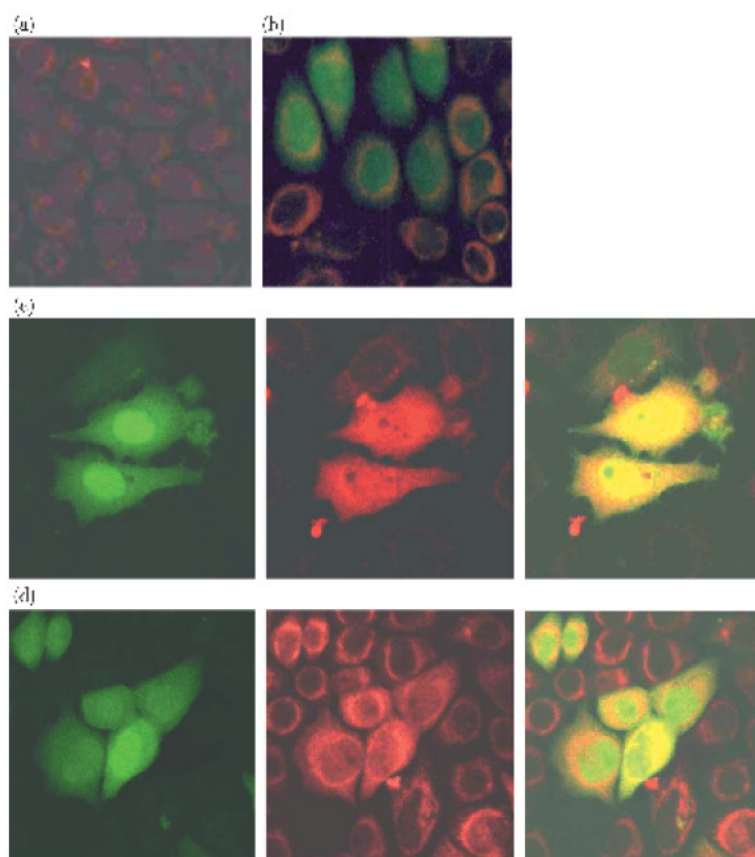


Fig. 2 Analyzing the expression and localization of Rev8 and Rev8L genes in HeLa cells with confocal microscope
(a) untreated HeLa cells; (b), (c), (d) HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP vector, pIRES2-EGFP-Rev8 and pIRES2-EGFP-Rev8L respectively. Green fluorescence represents EGFP, red fluorescence represents Cy3. $\times 400$.

2.3 蛋白质印迹

分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 转染 HeLa 细胞, 于转染后 20 h 收集、裂解细胞, 做蛋白质印迹检测. 结果显示, pIRES2-EGFP 空载体转染组 HeLa 细胞中只能检测到内源性 caspase-8 的表达 (全长), 分子质

量大小为 55 ku. 而 pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 转染的 HeLa 细胞中既能检测到全长的内源性 caspase-8, 还分别同时表达 *Rev8* 和 *Rev8L* 基因 (图 3), 其分子质量大小为 29 ku, 与理论分子质量相符.

2.4 重构型人 caspase-8 诱导 HeLa 细胞凋亡

用 pIRES 2 - EGFP、pIRES 2 - EGFP - *Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 载体瞬时转染爬片上培养的 HeLa 细胞, 并用 4', 6-二乙酰基-2-苯基吲哚 (DAPI) 染色. 利用荧光显微镜, 我们观察到转染后 25 h, 与 EGFP 共表达的 *Rev8* 和 *Rev8L* 基因产物即可导致细胞出现变圆、皱缩等凋亡特征. 而且, 随着观察时间的延长, *Rev8* 和 *Rev8L* 实验组细胞爬片上 EGFP 阳性细胞显著减少, 甚至很难找到, 该现象提示 *Rev8* 和 *Rev8L* 实验组 EGFP 阳性细胞已经死亡. 而空载体转染组细胞仍见大量形态完好的 EGFP 阳性细胞贴壁生长. DAPI 染色显示, *Rev8* 和 *Rev8L* 实验组 EGFP 阳性细胞细胞核出现显著的染色质固缩现象 (图 4).

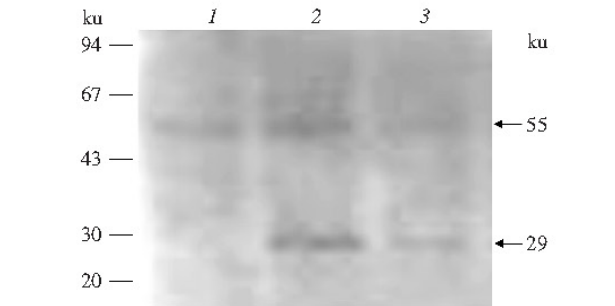


Fig 3 Detecting the expression of *Rev8* and *Rev8L* genes in HeLa cells by Western blot
1, 2, 3: HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* respectively.

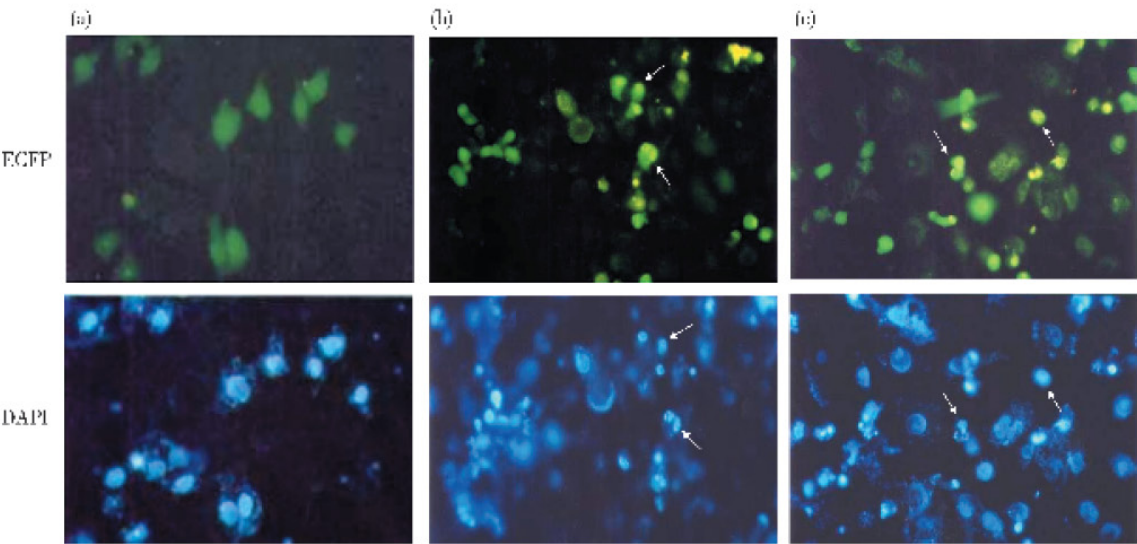


Fig 4 Morphological alteration of HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* respectively
(a), (b), (c): HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* respectively, the arrow show apoptotic HeLa cell. (×200).

2.5 免疫组织化学染色

分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 瞬时转染培养在 12 孔板中盖玻片上的 HeLa 细胞, 于转染后 30 h 取出盖玻片,

进行免疫细胞化学染色. 如图 5 所示, 与空载体转染组相比, *Rev8* 和 *Rev8L* 基因转染组阳性细胞呈现明显的皱缩, 细胞体积缩小等凋亡特征.



Fig. 5 Detecting the expression and pro-apoptotic effects of *Rev8* and *Rev8L* genes in HeLa cells by immunohistochemical staining

(a), (b), (c): IRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* transfected HeLa cells respectively. the arrow show apoptotic HeLa cells. $\times 400$.

2.6 电镜观察 HeLa 细胞核改变

借助电镜技术,我们观察了对照组和转染组 HeLa 细胞核的改变. 如图 6 所示, 转染后 25 h, pIRES2-EGFP-*Rev8* 和 pIRES2-EGFP-*Rev8L* 转染组 HeLa 细胞细胞核即出现染色质凝聚、聚边呈新月状等凋亡细胞的特征,且细胞核的核膜仍然完整,而空载体转染组细胞核形态完好.

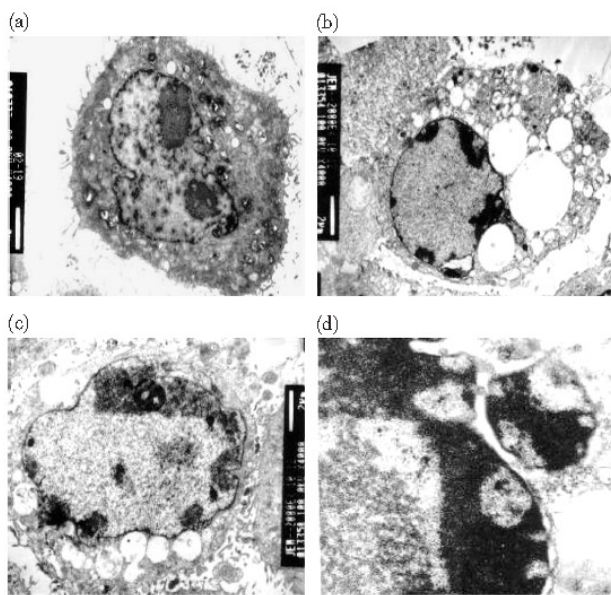


Fig. 6 Electronic microscope photos of HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* respectively

(a), (b), (c) HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-*Rev8* and pIRES2-EGFP-*Rev8L* respectively ($\times 4\ 500$); (d) the nuclear membrane of apoptotic HeLa cell. (25 h, $\times 7\ 500$)

3 讨 论

细胞凋亡是一种进化上高度保守的细胞死亡模式, 凋亡细胞最显著的特征性变化是细胞皱缩、染色质凝缩、DNA 降解、PS (phosphatidyl-serine)

外翻, 直至形成凋亡小体而被周围细胞吞噬^[11]. 一般认为, 不同的细胞凋亡途径最终都要导致 caspase 蛋白酶活化. 目前在哺乳动物细胞中共发现了 14 种 caspase, 它们在结构上具有很高的相似性, 活性中心含有保守的 QACXG (X = R, Q 或 C) 氨基酸序列. 活化的 caspase 分子可以特异性地识别底物中不同的四肽序列, 并从 Asp 的羧基端切断蛋白质底物而诱发细胞凋亡, 因而, 有的学者将 caspase 称为细胞中的“炸药” (explosive)^[1,11].

Caspase-8 亦称 MACH 或 FLICE, 在死亡受体 Fas、TNFR-1、DR4、DR5 等介导的细胞凋亡中, caspase-8 处于凋亡信号通路的上游. 目前认为, caspase-8 的活化遵循“诱导接近模式”^[4], 即: 死亡配体 FasL、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和 TRAIL 等与死亡受体的结合可引起后者形成三价聚集体, 再经接头蛋白 FADD (Fas-associated death domain)、TRADD (TNFR-associated death domain) 等介导 caspase-8 相互靠近并相互催化, 切除氨基端原结构域, 并装配成由两个大亚基和两个小亚基构成的活化型四聚体分子.

1998 年, Srinivasula 等^[7]分别将 caspase-3 和-6 的大、小亚基基因次序颠倒, 构建了重构型人 caspase-3 和-6 基因, 其表达产物中小亚基的 C 端和大亚基的 N 端经一连接肽 (linker) 共价连接, 而小亚基的 N 端和大亚基的 C 端仍然处于游离的状态. 实验表明, 大、小亚基次序的颠倒赋予了重构型人 caspase-3 和-6 自发的、持续的促凋亡活性.

鉴于 caspase-8 和 caspase-3 等在结构和活化机制上的相似性^[8,9], 根据“蛋白质一级结构决定高级结构”的基本原理, 我们推测, 大、小亚基次序颠倒的重构型人 caspase-8 也可能具有持续的活性. 为此, 在构建了两种重构型人 caspase-8 基因真核表达载体的基础上, 通过瞬时转染方法, 我们

进一步研究了这两种与绿色荧光蛋白 (EGFP) 共表达的重构型人 caspase-8 的促凋亡活性。

在本研究中, 我们用重构型人 caspase-8 基因转染 HeLa 细胞, 用间接免疫荧光染色、蛋白质印迹方法证实了重构型人 caspase-8 基因在 HeLa 细胞中的表达, 表达产物分布于整个细胞浆和细胞核中。借助荧光显微镜、DAPI 染色、免疫细胞化学染色, 我们看到, 与 pIRES2-EGFP 空载体转染组相比较, *Rev8* 和 *Rev8L* 基因实验组被转染 HeLa 细胞出现细胞变圆、皱缩、染色质固缩等典型的细胞凋亡特征。电镜观察显示, 染色质出现明显的凝聚, 而核膜保持完整。另外, 在研究中我们观察到, 随着观察时间的延长, 被转染的细胞活力下降, 此时 *Rev8* 和 *Rev8L* 基因转染组细胞爬片上 EGFP 阳性细胞显著减少, 甚至很难找到, 而同批同时转染空载体的 HeLa 细胞仍有大量的 EGFP 阳性细胞贴壁生长, 且形态完好。

根据以上研究, 我们认为, *Rev8* 和 *Rev8L* 基因的表达产物在 HeLa 细胞中具有持续的促凋亡活性。在这里, 大、小亚基基因次序颠倒的可能意义在于: 其表达产物完全可以模拟自然条件下活化形成的 caspase-8, 具备完整的酶活性中心。

从时相上看, *Rev8* 和 *Rev8L* 诱导 HeLa 细胞凋亡具有快速的特点。因为在死亡受体等介导的细胞凋亡中, caspase-8 分子处于凋亡信号通路的上游, 这可能意味着细胞内表达的活性型 *Rev8* 和 *Rev8L* 分子足以高效地引起其下游 caspase-3、caspase-6、caspase-7 和 Bid 的级联活化, 从而快速地诱导细胞

凋亡。

该研究结果也提示, 鉴于 caspase 家族成员在结构和活化机制上的相似性及其进化上的保守性, 通过“颠倒其大、小亚基次序而获得具有持续活性的重组型 caspase”的思路可能具有一定的普遍性意义。

参 考 文 献

- 1 Thornberry N, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, **281** (5381): 1312 ~ 1316
- 2 Salvesen G S, Dixit V M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 1997, **91** (4): 443 ~ 446
- 3 Muzio M, Chinnaiyan A M, Kischkel F C, *et al.* FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 1996, **85** (6): 817 ~ 827
- 4 Salvesen G S, Dixit V M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (20): 10964 ~ 10967
- 5 Chinnaiyan A M, O'Rourke K, Yu G L, *et al.* Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, 1996, **274** (5289): 990 ~ 992
- 6 Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, **9** (2): 247 ~ 251
- 7 Srinivasula S M, Ahmad M, Macfarlane M, *et al.* Generation of constitutively active recombinant caspase-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J Biol Chem*, 1998, **273** (17): 10107 ~ 10111
- 8 William W, Kenneth A K, Ana M M, *et al.* The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure Fold Des*, 1999, **7** (9): 1135 ~ 1143
- 9 Blanchard H, Kodandapani L, Mittl P R, *et al.* The three-dimensional structure of caspase-8: an initiator enzyme in apoptosis. *Structure*, 1999, **7** (9): 1125 ~ 1143
- 10 Gui J H, Jia L T, Xu Y M, *et al.* Expression of recombinant human caspase-8 genes and their effects on growth of HeLa cells. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2002, **18** (2): 117 ~ 120
- 11 Cryns V, Yuan Y. Proteases to die for. *Genes Dev*, 1998, **12** (11): 1551 ~ 1570

The Expression and Pro-apoptotic Effects of Reconstructed Human Caspase-8 Genes on HeLa Cells*

GUI Jun-Hao**, ZHAO Jing, XU Yan-Ming,

YU Cui-Juan, JIA Lin-Tao, WANG Cheng-Ji, YANG An-Gang***

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract The pIRES2-EGFP eukaryotic expression vectors carrying two kinds of reconstructed human caspase-8 genes with rearrangement subunits were transfected into HeLa cells. The expression and pro-apoptotic effects of reconstructed human caspase-8 gene on HeLa cells were analyzed by indirect fluorescent staining, immunohistochemical staining and electronic microscope etc. The results show that expression of the two human caspase-8 can induce HeLa cells apoptosis effectively.

Key words reconstructed, human caspase-8 genes, pIRES2-EGFP, expression, HeLa cell, apoptosis

* This work was supported by grants from The Ministry of Education of China (HG99003) and The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (39925036).

** Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA. Urumqi 830000

*** Corresponding author. Tel: 86-29-3376598, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

Received: March 2, 2003 Accepted: April 28, 2003