

(ISHM) was set up with rat hippocampus slides as positive controls. The change of GAP-43 mRNA levels in the vestibular nucleus area were investigated by ISHM in the labyrinthectomy rats at 5, 12, 20 and 30 days after the operation. The results demonstrated that labyrinthectomy increased GAP-43 mRNA levels. The application of ISHM laid a founda-

tion for the research of regenerative sprouting, synaptic remodeling and neuroplasticity in the vestibular compensation.

**Key words** *in situ* hybridization, growth-associated protein 43 (GAP-43) cDNA, digoxigenin (DIG), hippocampus slides, vestibular compensation

## 小鼠成纤维细胞凋亡与 bcl-2 结合蛋白\*

王文恭 童坦君<sup>1)</sup>

(北京医科大学生物化学与分子生物学系, 北京 100083)

**摘要** 为检测细胞凋亡过程中 bcl-2 基因的结合蛋白, 用 PCR 技术扩增小鼠 bcl-2 基因 (mbcl-2) 调控区, 经亚克隆后的序列分析证实其准确性. 用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 诱导小鼠成纤维细胞 (C3H 10 T1/2 Cl 8) 凋亡, 以此 PCR 产物作探针, 对上述细胞的核蛋白质粗提物进行迁移移位法 (EMSA) 与 DNA-蛋白质印迹分析. 结果表明, 细胞核内一分子质量为 53 ku 的结合蛋白与 mbcl-2 调控区的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后明显增强, 而一种 100 ku 的 DNA 结合蛋白与该区的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后明显减弱. 因而, p53 蛋白有可能是 bcl-2 的负转录因子, 100 ku 的 DNA 结合蛋白有可能是 bcl-2 的正转录因子.

**关键词** 细胞凋亡, bcl-2, 转录因子

**学科分类号** Q28

bcl-2 基因下调是细胞凋亡的关键环节之一. 种种迹象表明 p53 可能与 bcl-2 的下调密切相关<sup>[1,2]</sup>. 当 p53 上调时, bcl-2 表达下降, p53 缺乏时 bcl-2 呈高表达. Miyashita 等<sup>[1]</sup>认为, p53 可能作为 bcl-2 基因的负调控转录因子而下调后者的表达. 但尚无有力证据. 为探讨细胞凋亡过程中 bcl-2 与 p53 这两种凋亡关键性基因的相互关系, 我们曾用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 诱导小鼠正常与恶性转化的成纤维细胞的凋亡<sup>[2,3]</sup>, 观察这两种基因在凋亡过程中表达变化的时序, 报道了这两种细胞在 5-Fu 作用 24 h 时细胞存活率下降, 电泳显现 DNA 梯状断裂, 流式细胞计检测出现凋亡峰<sup>[2]</sup>. 该研究的 RNA 印迹分析显示, 在 5-Fu 作用 6 h 后这两种细胞 p53 mRNA 水平已明显增高, 而 bcl-2 mRNA 水平则在作用 12 h 方明显降低<sup>[2]</sup>. p53 上调先于 bcl-2 下调, 表明在时序上 p53 具备作为 bcl-2 基因负调控因子的条件. 为考核 p53 作为 bcl-2 基因负转录因子的可能性, 我们用 PCR 扩增出小鼠 bcl-2 基因调控区长度为 652 bp 的片段, 经亚克隆后分析该 PCR 产物的序列, 证实扩增的准确性后, 用<sup>32</sup>P 标记, 以其作为探针, 对 5-Fu 刺激 12 h 的小

鼠成纤维细胞的细胞核蛋白质粗提物进行迁移移位及 DNA-蛋白质印迹分析, 结果表明一分子质量为 53 ku 的序列特异结合蛋白与该片段存在直接作用.

### 1 材料和方法

#### 1.1 细胞株

小鼠的正常成纤维细胞 (C3H 10 T1/2 Cl 8, 简称 NC3H10) 及其恶性转化的成纤维细胞 (TC3H10) 由工业卫生研究所惠赠.

#### 1.2 试剂

5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 为 Sigma 公司产品, PCR 引物由 Cybersyn 公司合成, pGEM-T 载体系统, Taq 酶, 双脱氧终止法测序试剂盒为 Promega 公司产品, 其余试剂均为国产或进口分析纯试剂.

#### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养与凋亡的诱导:** 把 NC3H10 与 TC3H10 细胞接种于培养瓶后, 常规培养, 待细胞将铺满瓶底时, 按文献 [2, 3] 换以含 0.1% 小牛血清及 10 mmol/L 5-Fu 的 DMEM 继续培养以诱导

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670806). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

收稿日期: 1998-09-07, 修回日期: 1998-12-15

凋亡, 24 h 后可出现典型的凋亡现象.

1.3.2 PCR 引物设计与 PCR 扩增技术: mbcl-2 调

控区序列参照文献 [4], 扩增片段位于翻译起始位点 5' 上游 -1137 至 -1788 间, 长 652 bp (图 1).

引物 1 (-1788 至 -1170 bp 间): 5' TATAGGCACGTCCAGCCAG 3';  
引物 2 (-1154 至 -1137 bp 间): 5' CGGAGAAAGGAGGTGGTG 3';

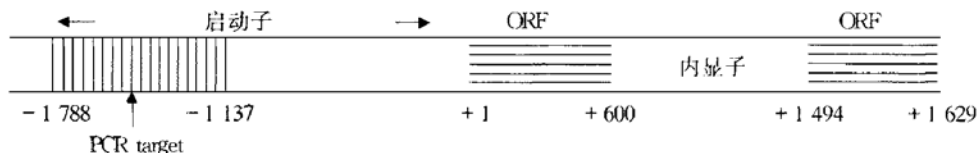


图 1 mbcl-2 调控区与 PCR 引物设计

以 NC3H10 细胞 DNA 为模板, PCR 扩增技术参照文献 [5].

1.3.3 PCR 产物的亚克隆与鉴定: 按 Promega 公司 pGEM-T 载体系统操作指南将 PCR 扩增产物亚克隆入 pGEM-T 载体系统. 重组质粒提取参照文献 [5], 序列分析参照 Promega 公司双脱氧终止法序列分析试剂盒说明书进行.

1.3.4 迁移移位法 (electrophoresis migration shift assay, EMSA) 及 DNA-蛋白质印迹技术: 核蛋白粗提物制备参照彭勇等<sup>[6]</sup>方法, 核蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及转移参照文献 [5] 进行, 迁移移位法与 DNA-蛋白质印迹技术参照文献 [6, 7] 进行.

2 结 果

2.1 PCR 产物电泳鉴定

电泳结果表明, PCR 产物与理论长度 (652 bp) 相符 (图未示出).

2.2 重组质粒酶切鉴定及序列分析

PCR 扩增产物亚克隆入 pGEM-T 载体系统后, 重组质粒经 Pvu II 酶切后产生 2567 bp 与 1086 bp 片段, 非重组质粒经 Pvu II 酶切后产生 2567 bp 与 434 bp 片段, 符合预期结果. 重组后经双脱氧终止法测序分析表明, PCR 产物序列除两处点突变外 (m1, m2) 与文献 [4] 报道序列一致 (图 2).

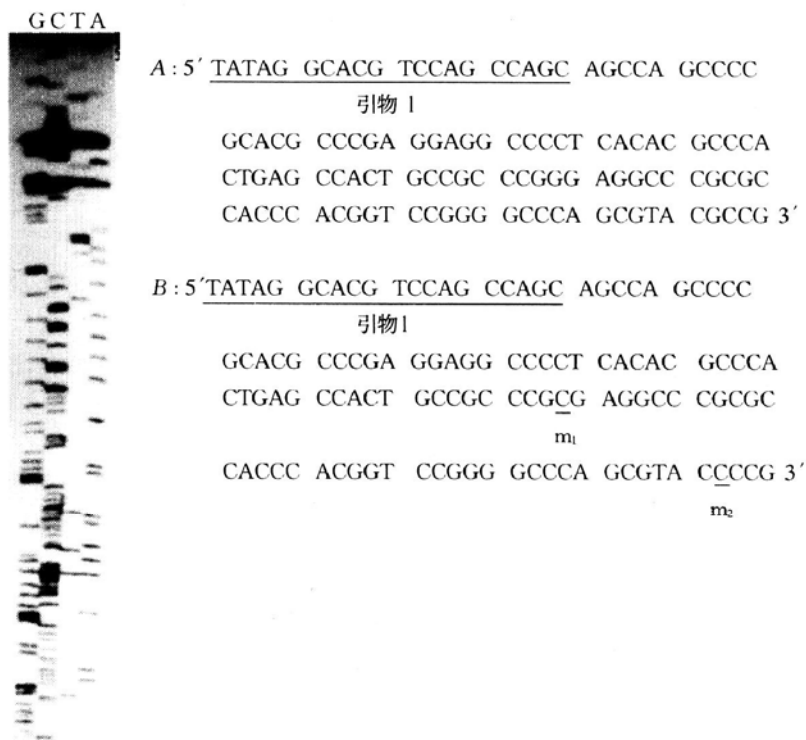


图 2 mbcl-2 调控区的核苷酸序列

A: mbcl-2 调控区的序列; B: PCR 产物的序列.

### 2.3 迁移位移法分析

EMSA 分析显示, NC3H10 与 TC3H10 细胞在 5-Fu 刺激前后其核蛋白粗提物均对 mbcl-2 调控区片段有阻滞作用 (图 3), 预先经非标记探针封闭后阻滞带消失, 说明该带为特异阻滞带。

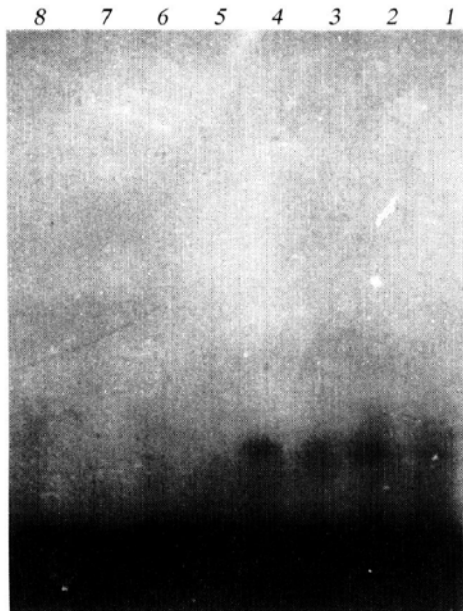


图 3 5-Fu 刺激的小鼠成纤维细胞的核内蛋白质的 EMSA 图

1: 未经 5-Fu 处理的 NCH10 细胞; 2: 5-Fu 处理 12 h 的 NCH10 细胞; 3: 未经 5-Fu 处理的 TCH10 细胞; 4: 5-Fu 处理 12 h 的 TCH10 细胞; 5, 6, 7, 8: 依次与 1, 2, 3, 4 相同, 但核内蛋白质作 EMSA 前, 用未标记的探针预先处理, 以  $^{32}\text{P}$  标记的 PCR 产物为探针。

### 2.4 DNA-蛋白质印迹分析

结果显示, 一分子质量为 53 ku 的 DNA 结合蛋白在两种细胞中皆可与 mbcl-2 调控区结合 (图 3), 此结合信号在 5-Fu 刺激后 12 h 明显加强; 另外, 还出现了一个分子质量为 100 ku 的蛋白质也可与 mbcl-2 调控区结合, 不过其结合信号在 5-Fu 刺激后 12 h 反而减弱。

## 3 讨 论

bcl-2 基因的下调是细胞凋亡的重要环节, 其下调机理似与 p53 有关, p53 上调常与 bcl-2 下调并存<sup>[1,2]</sup>, p53 可能与 bcl-2 调控区负调控元件结合以下调 bcl-2。我们用 5-Fu 诱导 NC3H10 及 TC3H10 细胞凋亡, 证实了凋亡过程中, p53 表达的增高出现在 bcl-2 下调前, 表明在时序上 p53 具有作为 bcl-2 负调控因子的条件<sup>[2]</sup>。本研究中,

PCR 产物的电泳鉴定及序列分析 (图 1, 图 2) 表明, 该 PCR 产物与 mbcl-2 调控区片段的序列具有良好的一致性。EMSA 分析显示 (图 3), 小鼠两种成纤维细胞的细胞核存在可与 mbcl-2 调控区特异结合的蛋白质。由于我们所用的探针为 652 bp, 分子质量高达 400 ku, 而 DNA 结合蛋白分子比它要小得多, 难以用 EMSA 鉴别此类蛋白质的质与量, 所以 5Fu 处理前后两种细胞 EMSA 无明显差别。为此, 我们改用了更能反映 DNA 结合蛋白质与量的 DNA-蛋白质印迹分析法。该分析结果显示 (图 4), 在 53 ku 与 100 ku 位置处均出现了与 mbcl-2 调控区的结合信号。其中 mbcl-2 调控区与 53 ku 蛋白质的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后 (此时 bcl-2 下调) 明显增强, 而 mbcl-2 调控区与 100 ku 蛋白质的结合信号在 5-Fu 刺激 12 h 后明显减弱。这些结果在正常细胞 (NC3H10) 与其对应的恶性转化细胞 (TC3H10) 中无明显差异。这提示, 在这两种细胞中 p53 可能作为 bcl-2 基因的负调控因子而与其调控区结合以下调其表达。而另一个不明性质的 mbcl-2 调控区结合蛋白 (P100) 有可能是 bcl-2 的正调控因子。

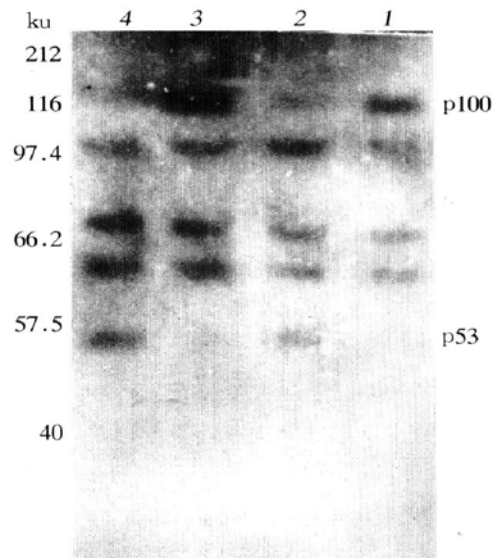


图 4 mbcl-2 调控区结合蛋白的 DNA-蛋白质印迹分析

1: 未经 5-Fu 处理的 NCH10 细胞; 2: 5-Fu 处理 12 h 的 NCH10 细胞; 3: 未经 5-Fu 处理的 TCH10 细胞; 4: 5-Fu 处理 12 h 的 TCH10 细胞。以  $^{32}\text{P}$  标记的 PCR 产物为探针。

## 参 考 文 献

- Miyashita T, Krajewski S, Krajewski M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*, 1994, 9 (6): 1799-1805
- 王文恭, 童坦君 (Wang W G, Tong T J). 小鼠成纤维细胞调

- 亡过程中 P53 与 bcl-2 表达的时序性. 中国生物化学与分子生物学学报 (Chin J Biochem & Mol Biol), 1998, **14** (3): 318~321
- 3 王文恭, 童坦君 (Wang W G, Tong T J). 细胞凋亡过程中 bcl-2 基因的甲基化. 中国生物化学与分子生物学学报 (Chin J Biochem & Mol Biol), 1998, **14** (3): 309~313
- 4 Negrini M, Silini E, Kozak C, *et al.* Molecular analysis of mbcl-2: structure and expression of murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell*, 1987, **49** (4): 455~463
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 1. 40~1. 52
- 6 彭勇, 童坦君, 张昌颖 (Peng Y, Tong T J, Zhang C Y). EGF 对 EGFR 基因和 c-fos, c-myc 原癌基因结合蛋白质的影响. 生物化学杂志 (Chin Biochem J), 1993, **9** (4): 400~405
- 7 Mao Z B, Zhang Z Y, Tong T J. Induction of c-fos/c-myc expression by epidermal growth factor decreases with alteration of their gene binding proteins in senescent fibroblasts. *Chinese Med J*, 1997, **110** (10): 755~759

**The DNA Binding Proteins of bcl-2 Regulatory Region in Apoptosis of Mouse Fibroblast.** WANG Wen Gong, TONG Tan Jun ( *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China* ).

**Abstract** To explore the DNA binding proteins of mouse mbcl-2 regulatory region in the apoptotic process of mouse fibroblast cell line (C3H 10 T1/2 Cl 8) and its transformed counter part, the mouse bcl-2 (mbcl-2) regulatory region was amplified by PCR. The PCR products were subcloned into pGEM-T vector system and then checked by sequencing. Using the product as probe, DNA binding proteins of mbcl-2's regulatory region in nuclear protein extracts of both cell lines were studied. Southwestern blotting results showed that a 53 ku protein binds with the probe. Its binding signal strengthened after exposing both cells to 5-Fu for 12 h, as another DNA binding protein (100 ku) also binds with the probe though its binding signal weakened after 5-Fu treatment. The results suggested that p53 protein may be the negative regulatory factor of mbcl-2 gene. An unidentified 100 ku protein may be the positive regulatory factor of mbcl-2 gene.

**Key words** apoptosis, bcl-2, transcription factor

## 双位点核酶对乙型肝炎病毒 C 基因 体外转录物的剪切作用\*

连建奇 周永兴

(第四军医大学唐都感染病院, 西安 710038)

金由辛

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

**摘要** 为探讨双位点核酶对乙型肝炎病毒 C 基因体外转录物的剪切作用, 观察双位点核酶对单一核酶体外剪切的增强作用, 同时比较串联核酶和混合核酶的体外切割作用, 构建了核酶 Rz1, Rz3, Rz1 和 Rz3 的串联核酶 (Rz13) 体外转录载体, 经体外转录后切割靶 RNA. 结果表明: 双位点核酶, 无论是串联或混合核酶均可增强单一核酶的体外切割作用, 串联和混合核酶中的单一核酶可独立发挥作用; 当串联和混合数目为 2 个时, 两者的切割效率差别不大 ( $P > 0.05$ ).

**关键词** 乙型肝炎病毒 C 基因, 串联核酶, 混合核酶

**学科分类号** R575.1

核酶 (ribozyme) 是一类具有催化活性的 RNA 分子, 目前已广泛用于抗病毒基因的治疗. 多位点核酶是新一代核酶分子, 可分别针对靶 RNA 分子不同位点切割并破坏靶 RNA, 从而进一步提高核酶阻断靶基因的效率<sup>[1]</sup>. 多位点核酶包括多个核

酶串联和混合的核酶分子, 其简单形式是双位点核酶. 本文观察双位点核酶对单一核酶的增强作用, 同时比较混合和串联核酶的切割效率.

\* 国家自然科学基金资助项目 (39570652).

收稿日期: 1999-02-25, 修回日期: 1999-05-06