

重组人凋亡诱导因子基因的构建、表达及其对 HeLa 细胞的促凋亡作用*

于翠娟 孟艳玲 桂俊豪 赵 晶 金 明 王 智 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 凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 定位于细胞的线粒体膜间隙. 当凋亡信号刺激时, AIF 分子从线粒体释放到胞浆, 然后转位到细胞核内, 引起染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂 (~ 50 kb). 用 RT-PCR 法分段克隆得到人全长 AIF 基因, 经改造截去其 N 端线粒体定位信号编码序列, 代之以不同长度的绿脓杆菌外毒素 (PE) 转膜结构域序列. 把这些重组基因克隆入 pIRES2-EGFP 真核表达载体, 脂质体法转染 HeLa 细胞, 通过荧光显微镜观察、共聚焦显微镜观察、电镜观察等方法检测了多种重组人 AIF 基因的表达及其对细胞生长的影响. 证明了重组人 AIF 基因的表达可引起 HeLa 细胞死亡, 为肿瘤的杀伤提供了新的策略.

关键词 AIF, 细胞凋亡, 融合蛋白, HeLa 细胞

学科分类号 Q255

凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 是 1996 年发现的一种凋亡诱导蛋白, 在多种组织中广泛分布, 其基因定位于 X 染色体上. AIF 前体蛋白在胞浆中合成后, 通过其 N 端的线粒体定位信号 (MLS) 有效地穿入线粒体膜间隙, 然后在 102 位甘氨酸处水解掉 MLS, 其余部分与黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 结合, 并重新折叠成为具有促凋亡潜能的成熟 AIF 分子^[1]. 当凋亡信号刺激时, 可检测到 AIF 分子从线粒体释放到胞浆, 然后转位到细胞核内, 直接介导早期凋亡核形态的变化^[2,3]. 体外实验结果表明, 显微注射 AIF 分子能引起分离的细胞核中部分 DNA 的丢失、染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂 (~ 50 kb)^[1]. 这种促凋亡作用不受广谱 caspases 抑制剂 z-VAD.fmk 的抑制, 也不受 bcl-2 过量表达的影响, 代表着独立于 caspase 信号通路之外的另一条凋亡途径^[4,5]. 绿脓杆菌外毒素 (pseudomonas exotoxin A, PE) 是一种毒性很强的细菌外毒素分子, 其 domain II 被认为与分子的转膜作用有关^[6]. 为研究 N 端融合有不同长度的 PE domain II 片段后是否会影响 AIF 分子的促凋亡活性, 本文构建了三种重组的 PE domain II/ 去除线粒体定位信号的截短型 AIF 基因, 观察了它们在 HeLa 细胞中的表达及其促凋亡活性, 为将其用于对肿瘤杀伤奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli DH5 α 菌种、人 Jurkat 细胞系、HeLa 细胞系、pUC19 质粒均为本室保存, pIRES2-EGFP 载体购自 Clontech 公司. TRIZOL 试剂、Taq DNA 聚合酶、M-MLV 逆转录酶、限制性核酸内切酶、胎牛血清、RPMI 1640、脂质体 LipofectAmineTM 2000 等购自 Gibco BRL 公司. T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 人 AIF 基因的分段克隆: 体外培养人 Jurkat 细胞, 离心收集 $7 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 对数生长期细胞, 用 TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA, 以 Ya2、Ya4 引物分段反转录 AIF cDNA 第一链, 然后分别以 Ya1、Ya2 (Ya1: 5'-tttgaattcatgttcgggtgtggaggcctggcg-3'、Ya2: 5'-ctccaagettctaaagtctccatct-3') 和 Ya3、Ya4 (Ya3: 5'-tggagactttagaagc-ttgagaaga-3'、Ya4: 5'-ttttctagagtcgactcagttctcatg-aatgttgaatag-3') 为引物进行 PCR, 分别扩增出

* 国家杰出青年科学基金资助项目 (39925036), 军队杰出中青年人才科研基金资助项目 (98J009) 和国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA217101).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3376798, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2002-04-21, 接受日期: 2002-06-11

AIF 的 EH 基因片段 (43~ 915 bp) 和 HX 基因片段 (916~ 1 884 bp). 分别经 *EcoR* I、*Hind* III 和 *Hind* III、*Xba* I 双酶切, 克隆入 pUC19 的相应位点, 转化 *E. coli* DH5 α 菌株. 挑阳性克隆酶切鉴定和测序, 分别命名为 pUC-AIF (EH) 和 pUC-AIF (HX), 测序由上海晶泰公司完成.

1.2.2 PE domain II/AIF Δ 1-120 融合蛋白基因真核表达载体的构建: 以 pUC-AIF (EH) 为模板, 以引物 Ya5 (Ya5: 5'-tttgaattcatggaggaagttcc-tcaagacaag-3')、Ya2 扩增 AIF 403~ 915 位核苷酸序列的片段 (编码 AIF121~ 291 位氨基酸), 测序正确后, 通过 *Hind* III 位点与 AIF 的 HX 基因片段相连, 得序列正确的截短型人 AIF 基因, 可编码 AIF 的 121~ 613 位氨基酸. 通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切, 插入真核表达载体 pIRES2-EGFP, 命名为 pIRES2-EGFP-AIF Δ 1-120. 进一步利用 *EcoR* I 酶切位点, 在 AIF Δ 1-120 基因 5' 端连接不同长度的绿脓杆菌外毒素 (PE) 的转膜结构域序列 (3NE: 编码 PE280~ 358 位氨基酸, 或者 4NE: 编码 PE280~ 364 位氨基酸), 得到重组型 AIF 融合蛋白基因, 通过 *Nhe* I 和 *Sal* I 双酶切, 克隆入真核表达载体 pIRES2-EGFP, 分别命名为 pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120, pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120.

1.2.3 细胞转染及荧光显微镜观察: 转染前 24 h, 胰酶消化 HeLa 细胞, 加 1~ 2 滴至 12 孔板中的盖玻片上, 制成细胞爬片. 待细胞达 80% 汇合时进行转染. 爬片细胞分为 4 组, 先用无血清 RPMI 1640 洗细胞 2 次, 加 0.8 ml 无血清 RPMI 1640, 分别转染 pIRES2-EGFP 空载体、pIRES2-EGFP-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120. 将 2 μ g 重组质粒和 4 μ l LipofectAmineTM 2000 分别加入 100 μ l 无血清 RPMI 1640 中, 轻轻震荡 5 min, 将二者混匀制成转染液, 室温静置 20 min 后, 逐滴加入爬片细胞中, 轻轻混合, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 h. 弃去转染液, 加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 继续培养, 于转染后 48 h 取出, 4% 多聚甲醛固定, 荧光显微镜下观察细胞形态.

1.2.4 间接免疫荧光检测法: 如 1.2.3 方法转染爬片细胞. 48 h 后, 细胞爬片用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 5~ 10 min, 再用 3% 双氧水封闭, 0.3% Triton X-100 穿膜, 加一抗, 即山羊抗人 AIF 抗体 (1:200 稀释于含 1% 牛血清白蛋白的 PBS 中), 4 $^{\circ}$ C 过夜. 洗涤后再加生物素标记的抗山

羊 IgG, 最后加入 SABS-Cy3, PBS 洗. 细胞爬片置于载玻片上, 激光共聚焦显微镜进行观察.

1.2.5 电镜标本制作: 将 HeLa 细胞接种于 6 孔板中, 脂质体法分别转染 pIRES2-EGFP 空载体、pIRES2-EGFP-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120. 于转染后 48 h 消化细胞, 离心收集细胞团块, 2.5% 戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h, 剥离细胞团块, 小心用 PBS 洗 2 次, 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 人 AIF 基因的分段克隆及鉴定

用 TRIZOL 试剂提取 Jurkat 细胞总 RNA, 用 Ya2、Ya4 引物分段反转录 AIF cDNA 第一链, 分别以 Ya1、Ya2 和 Ya3、Ya4 为引物作 PCR, 扩增出约 870 bp 的 AIF 的 EH 基因片段和 970 bp 的 HX 基因片段 (图 1). 将其克隆入 pUC19 的相应位点, 经双酶切鉴定后测序, 与 GenBank 中 AIF 基因序列比较, 证实我们所得序列与其完全相同.

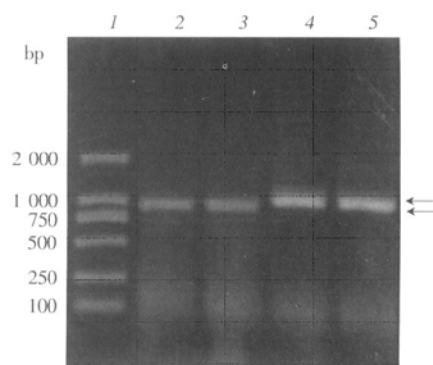


Fig. 1 PCR products of human AIF gene

1: PCR marker; 2, 3: AIF EH gene (N-terminal region of human AIF gene, ~ 870 bp); 4, 5: AIF HX gene (C-terminal region of human AIF gene, ~ 970 bp).

2.2 PE domain II/AIF Δ 1-120 融合蛋白基因真核表达载体的构建

以 pUC-AIF (EH) 为模板, 以引物 Ya5、Ya2 扩增得到去除 N 端线粒体定位信号的截短型 AIF EH Δ 1-120 基因, 大小为 516 bp (图 2), 测序正确后, 通过 *Hind* III 位点与 AIF 的 HX 基因片段相连, 克隆入 pIRES2-EGFP 载体, 得序列正确的截短型人 AIF 基因 AIF Δ 1-120, 大小为 1 485 bp (图 3). 再通过 *EcoR* I 位点, 在其 N 端连接绿脓

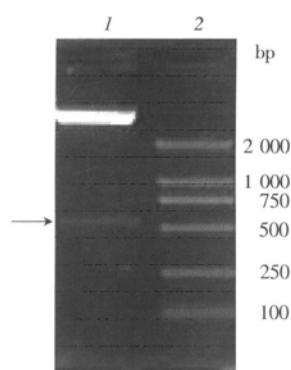


Fig. 2 Enzyme digestion analysis of the pUC19-AIF

EH Δ 1-120 gene

1: enzyme digest by *Eco*R I / *Hind* III; 2: PCR Marker.

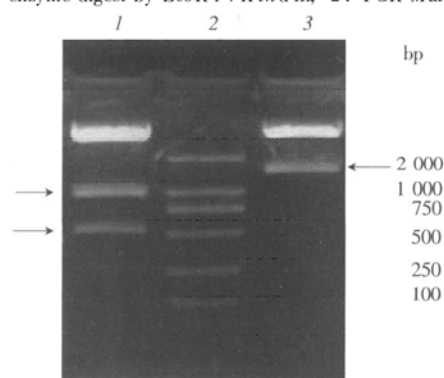


Fig. 3 Enzyme digestion analysis of the truncated pIRES

EGFP-AIF Δ 1-120 gene

1: triple enzyme digest by *Eco*R I / *Hind* III / *Sal* I; 2: PCR marker; 3: double enzyme digest by *Eco*R I / *Sal* I.

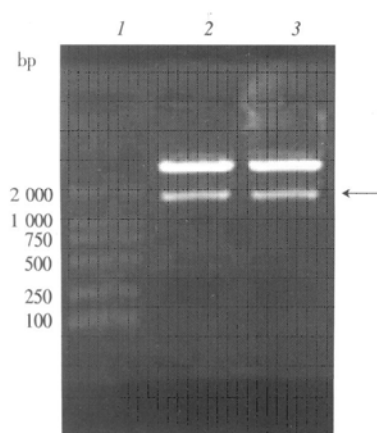


Fig. 4 Enzyme digestion analysis of the fused AIF gene in

pIRES EGFP vector

1: PCR markers; 2: pIRES-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120 (*Eco*R I / *Sal* I); 3: pIRES-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120 (*Eco*R I / *Sal* I).

杆菌外毒素 PE 的部分转膜结构域 (编码 PE280~358 或 PE280~364 位氨基酸) 序列, 克隆入 pIRES2-EGFP 的 *Nhe* I, *Sal* I 酶切位点, 分别命名为 pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120 和 pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120, 酶切鉴定图谱如图 4 所示, 切出的片段大小与预期值一致。

2.3 重组型 AIF 基因在 HeLa 细胞中的表达和定位

分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120 和 pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120 转染 HeLa 细胞, 于转染后 48 h 进行间接免疫荧光检测, 绿色指示 GFP (绿色荧光蛋白) 的表达, 红色指示 Cy3 标记的 AIF 的表达。用共聚焦显微镜观察结果显示, 未转染组 HeLa 细胞中仅观察到内源性 AIF 蛋白表达于线粒体内 (图 5), 转染 pIRES2-EGFP 空载体组 HeLa 细胞中, 可检测到绿色荧光蛋白 GFP 的表达, 而 AIF 的表达同样呈点状分布 (图 5b); 转染目的基因的三个实验组中, 可观察到 GFP 和 AIF 蛋白都得到有效地表达 (图 5c, d, e), 去除线粒体定位信号的截短型 AIF 蛋白表达于胞浆中, 甚至已迁移到细胞核内, 引起 HeLa 细胞出现明显的不规则的形态变化 (图 5e)。

2.4 重组型 AIF 基因对 HeLa 细胞的促凋亡活性

pIRES2-EGFP 载体的应用可使目的基因与 GFP 基因实现共表达, 从而有利于表达细胞形态学的观察。分别用 pIRES2-EGFP、pIRES2-EGFP-AIF Δ 1-120、pIRES2-EGFP-3NE-AIF Δ 1-120 和 pIRES2-EGFP-4NE-AIF Δ 1-120 转染 HeLa 细胞。于转染后 48 h 进行荧光显微镜观察, 可观察到转染空载体组细胞呈梭形, 细胞膜清晰完整, 形态正常。实验组细胞生长变缓, 部分细胞体积增大变圆, 出现多核现象, 另有部分细胞呈固缩状, 并可观察到细胞膜出泡, 细胞核不均一等形态学变化, 而且许多细胞已不具有清晰的轮廓, 提示细胞已经死亡。转染截短型 AIF Δ 1-120 基因及其融合蛋白基因的促凋亡效应基本相似 (图 6)。该实验重复三次以上, 均得到类似的结果。共聚焦显微镜观察亦可检测到 AIF 表达阳性的 HeLa 细胞出现细胞膜出泡, 细胞固缩等典型的凋亡细胞形态 (图 5e)。可见重组型 AIF 基因的表达对 HeLa 细胞具有明显的促凋亡活性。

2.5 重组型 AIF 基因的表达引起 HeLa 细胞的超微结构变化

电子显微镜观察表明, 转染 HeLa 细胞 48 h 后, 与未转染组、及转染 pIRES2-EGFP 空载体组 HeLa 细胞比较, 实验组中, 截短型 AIF $\Delta 1-120$ 及其融合蛋白基因的表达可使 HeLa 细胞呈现典型的

凋亡细胞特征 (图 7): 如细胞膜表面微绒毛消失, 核膜及细胞膜完整, 细胞膜表面出泡, 染色体凝集且聚集于核膜周边, 以及有完整的线粒体及内质网扩张等超微结构变化. 而未转染细胞或转染空载体细胞形态正常.

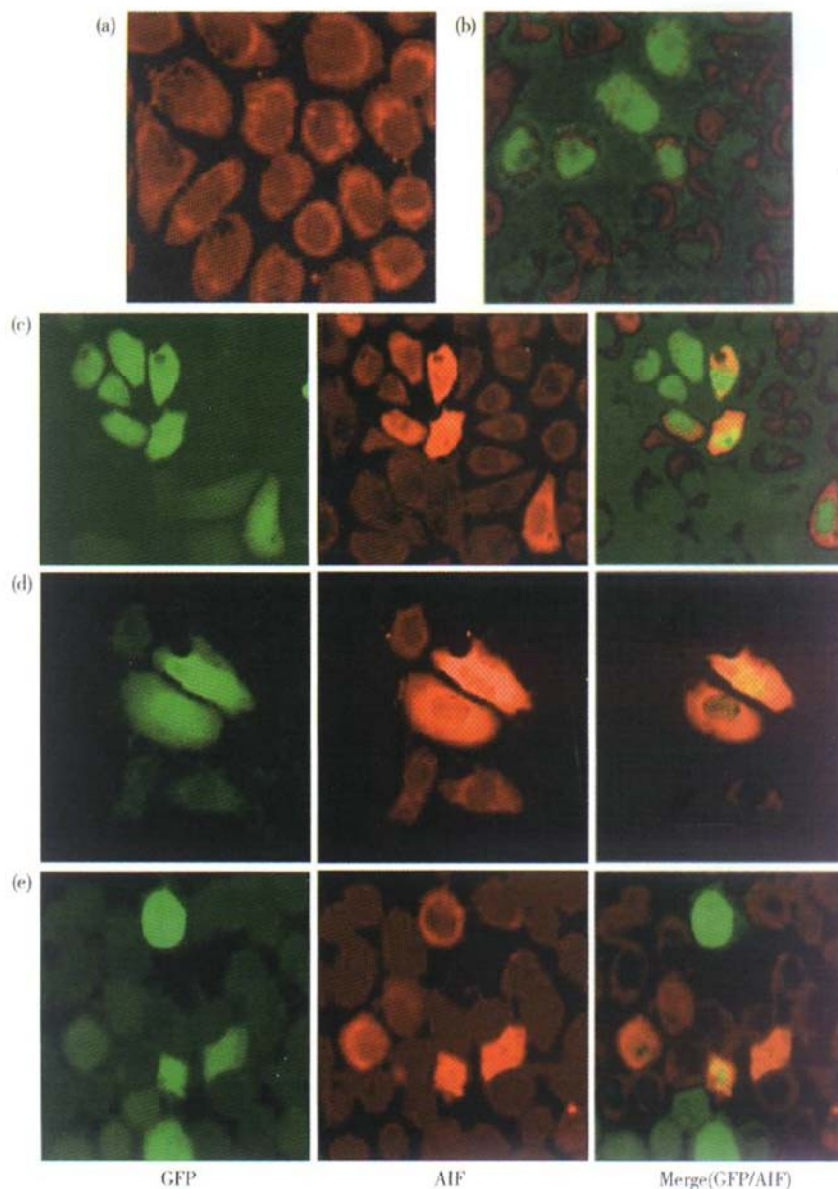


Fig. 5 Expression and localization of the recombinant AIFs in HeLa cells with confocal microscopy analysis

(a) HeLa cell untreated; (b) HeLa cell transfected with pIRES-EGFP vector as control; (c), (d), (e) HeLa cells transfected with pIRES-EGFP-AIF $\Delta 1-120$ (c), pIRES-EGFP-3NE-AIF $\Delta 1-120$ (d) and pIRES-EGFP-4NE-AIF $\Delta 1-120$ gene (e), respectively. Green fluorescence represents GFP, red fluorescence represents AIF stained Cy3.

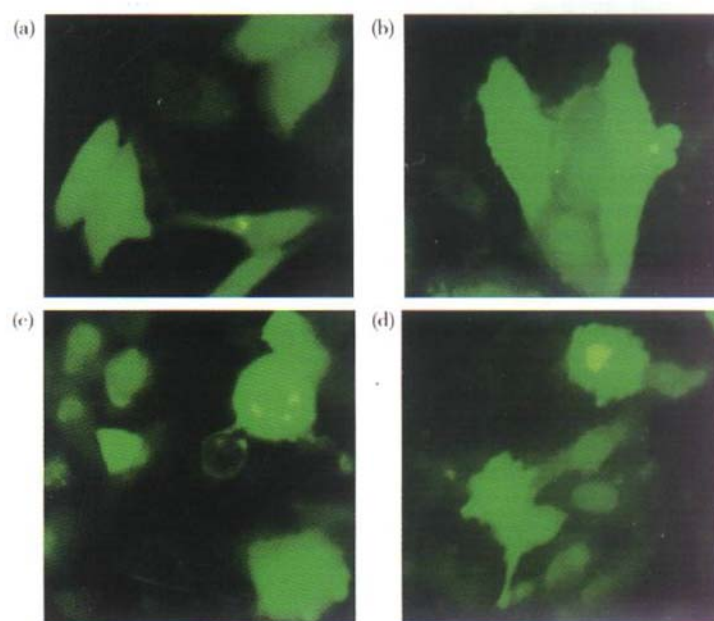


Fig. 6 Morphological alterations of HeLa cells transfected with three recombinant AIF genes shown by fluorescence microscopy ($\times 660$)

(a) HeLa cells transfected with pIRES-EGFP vector. (b), (c), (d) HeLa cells transfected with pIRES-EGFP-AIF $\Delta 1-120$ (b), pIRES-EGFP-3NE-AIF $\Delta 1-120$ (c) and pIRES-EGFP-4NE-AIF $\Delta 1-120$ gene (d), respectively.

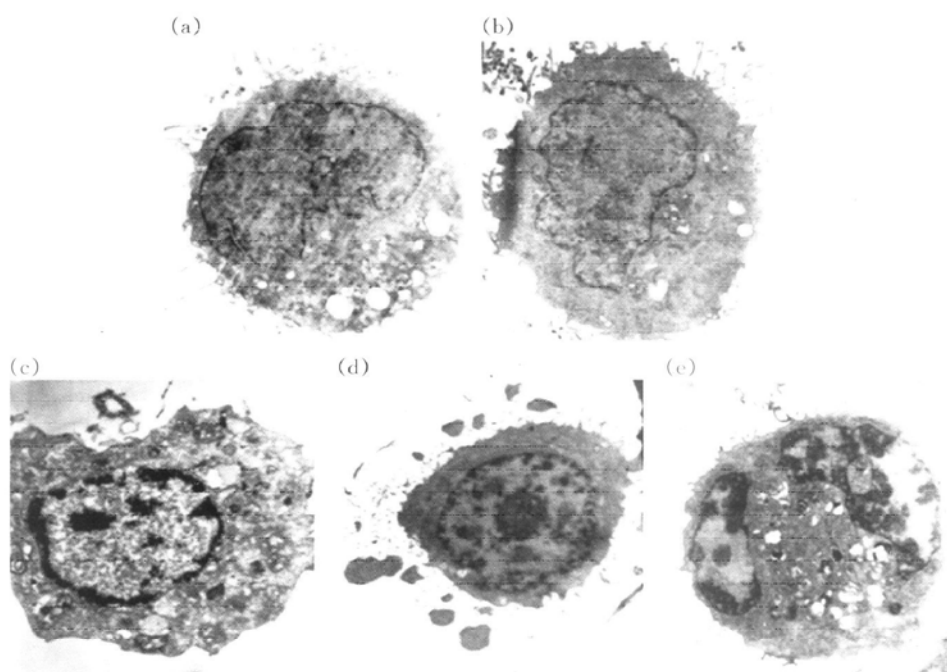


Fig. 7 Electronic microscope photos of HeLa cells transfected with three recombinant AIF genes

(a) HeLa cell untreated ($\times 4000$); (b) HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP vector ($\times 6000$); (c), (d), (e) HeLa cells transfected with experimental genes ((c) $\times 6000$, (d) $\times 3000$, (e) $\times 6000$).

3 讨 论

细胞凋亡是所有多细胞生物所具有的一种基本

特性, 有重要的生理意义. 目前认为 caspases 是介导细胞凋亡的主要分子, 但在大部分应激诱导的哺乳动物凋亡模型中, caspases 的抑制并不能完全阻

止细胞凋亡的发生^[7~9]。近来发现了独立于 caspases 信号通路之外的又一条凋亡途径, 即由线粒体凋亡诱导因子 (AIF) 直接介导的细胞凋亡^[4, 5, 10, 11]。AIF 通过独自介导鼠胚胎成腔过程的细胞程序性死亡而影响鼠胚胎的形成和发育^[4]。体外实验结果表明, 显微注射 AIF 分子能引起分离的细胞核中部分 DNA 丢失、染色体核周边凝集和 DNA 呈大片段断裂 (~ 50kb)。该作用不受广谱 caspases 抑制剂 z-VAD.fmk 的抑制。

我们用 RT-PCR 法分段克隆获得了全长 AIF 基因。后经重组 PCR 方法得到截短型 AIF 基因 (AIF Δ 1-120)。在其 N 端融合不同长度的 PE 转膜结构域基因 (3NE-AIF Δ 1-120 和 4NE-AIF Δ 1-120), 插入真核表达载体。脂质体法转染 HeLa 细胞后, 经荧光显微镜观察、电镜观察、共聚焦显微镜观察等方法, 研究了转染细胞中这些重组型 AIF 的表达, 及其对转染细胞的形态和生长状况的影响。

绿色荧光蛋白 (GFP) 的共表达可清晰地显示转染细胞的形态, 从而较好地反映与之共表达的外源基因对细胞的作用。结果显示, 三种重组型 AIF 均获得有效表达, 表达 AIF 的 HeLa 细胞出现细胞膜出泡、悬浮细胞增多的现象。间接免疫荧光试验观察一方面证实了绝大多数转染细胞中, 目的蛋白和 GFP 可实现共表达, 另一方面直接显示出 AIF 的分布情况。实验结果表明, 去除线粒体定位信号后, 重组 AIF 分子在胞浆中呈弥散分布, 而且相当一部分转染的细胞中 AIF 已经进入细胞核内。电镜观察表明, 转染细胞呈现出典型凋亡细胞的结构特征, 染色质凝集模式则停留在凋亡的初期 (stage I), 这正是 AIF 分子的作用模式。

本研究首次证实了 N 端融合有不同长度 PE 转膜结构域的截短型 AIF 分子具有促细胞凋亡活性, 为重组 AIF 分子实际应用于肿瘤杀伤提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Susin S A, Lorenao H K, Zamzami N, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 1999, **397** (6718): 441~446
- 2 Daugas E, Susin S A, Zamzami N, *et al.* Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J*, 2000, **14** (5): 729~739
- 3 Leoffler M, Daugas E, Susin S A, *et al.* Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J*, 2001, **15** (3): 758~767
- 4 Joza N, Susin S A, Daugas E, *et al.* Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 2001, **410** (6828): 549~554
- 5 Susin S A, Daugas E, Ravagnan L, *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med*, 2000, **192** (4): 571~579
- 6 Gray G L, Smith D H, Baldrige J S, *et al.* Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81** (9): 2645~2649
- 7 McCarthy N J, Whyte M K B, Gilbert C S, *et al.* Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol*, 1997, **136** (1): 215~227
- 8 Deas O, Dumont P, MacFarlane M, *et al.* caspase independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J Immunol*, 1998, **161** (7): 3375~3383
- 9 Dong Z, Salkumar P, Griess G A, *et al.* Intracellular Ca²⁺ thresholds that determine survival or death of energy deprived cells. *Am J Pathol*, 1998, **152** (1): 231~240
- 10 Lorenzo H K, Susin S A, Penninger J, *et al.* Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ*, 1999, **6** (6): 516~524
- 11 Cande C, Cohen I, Daugas E, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*, 2002, **84** (2-3): 215~222

Gene Construction, Expression and The Apoptosis Inducing Effects on HeLa Cells of The Recombinant Apoptosis Inducing Factor^{*}

YU Cui-Juan, MENG Yan-Ling, GUI Jun-Hao, ZHAO Jing,
JIN Ming, WANG Zhi, WANG Cheng-Ji, YANG An-Gang^{**}

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Apoptosis inducing factor (AIF) is a mitochondrial intermembrane space protein ubiquitously expressed in various kinds of cells. When death stimuli present, AIF is released from mitochondria to the cytoplasm and then translocated to the nucleus, inducing peripheral chromatin condensation and large-scale fragmentation of DNA (~ 50 kb). The full-length AIF gene was amplified by RT-PCR firstly, then its N-terminal mitochondrial localization sequence (MLS) was deleted, being replaced with PE transmembrane domain, and then the recombinant gene was inserted into the pIRES2-EGFP eukaryotic expression vector. After transfection into HeLa cells with lipofectamine, the expression of these recombinant AIF gene and their effects on HeLa cell growth were detected by fluorescent microscopy, confocal microscopy, and electron microscopy analyses. The result proved that the expression of the recombinant human AIF gene could induce HeLa cell death, which provided new strategy for killing cancer cells.

Key words apoptosis-inducing factor (AIF), apoptosis, fusion protein, HeLa cell

^{*} This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China for Outstanding Youth Scholars (39925036), The Military Research Funds of China for Outstanding Youth Scholars (98J009), and State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA217101).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-29-3376798, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

Received: April 21, 2002 Accepted: June 11, 2002