

嵌合重组 caspase-3 诱导表达促进肿瘤细胞凋亡*

贾林涛¹⁾ 张立红¹⁾ 于翠娟¹⁾ 纪宗玲¹⁾ 曹云新²⁾ 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, 西安 710032;

²⁾第四军医大学基础部免疫学教研室, 西安 710032)

摘要 通过稳定转染人宫颈癌 HeLa 细胞, 建立了野生型 caspase-3 (wt-casp3), 大小亚基序列颠倒的重组 caspase-3 (r-casp3), 和 N 端融合绿脓杆菌外毒素 (PE) 转膜肽段的嵌合重组 caspase-3 (cr-casp3) 的诱导表达细胞系. 蜕皮素诱导后细胞中检测到目的基因的表达, MTT 检测和细胞计数结果表明, r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达后有效地导致 HeLa 细胞死亡, 通过测定细胞中 caspase-3 活性, 以及细胞周期检测、DNA 梯状电泳条带检测 (DNA ladder)、电镜观察等证实 r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达后细胞发生了凋亡, 且二者的促凋亡活性相当, 而 wt-casp3 诱导表达细胞并未出现上述效应. 结果表明, 与野生型 caspase-3 活化需要上游分子的切割不同, 重组 caspase-3 具有自发的促凋亡活性, 而 N 端 PE 肽段的融合不影响这种活性, 因此 PE 转膜结构域和重组 caspase-3 有望参与构建能转膜进入细胞内部, 并杀伤细胞的新型肿瘤治疗分子.

关键词 Caspase-3, 绿脓杆菌外毒素, 细胞凋亡, 肿瘤

学科分类号 Q255

Caspase 的活化是不同细胞凋亡途径中共同的下游事件^[1,2]. Caspase-3 是最主要的效应 caspase 之一, 它在细胞中以酶原形式存在, 一级结构中自 N 端起依次为原结构域 (prodomain)、大亚基和小亚基. 细胞发生凋亡时, caspase-3 被上游 caspase 切割, 原结构域被去除, 大、小亚基之间发生断裂, 并重新组装成具有活性的 caspase-3 分子. 活化 caspase-3 可以作用于细胞内多种结构和功能蛋白, 如多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP)、细胞周期素依赖的蛋白激酶 (CDK) 等, 引起细胞凋亡^[3-5]. Srinivasula 等^[6]通过将 caspase-3 的大、小亚基序列颠倒, 构建了具有自发活性的 caspase-3 分子. 这种活性 caspase-3 与转膜蛋白融合, 将有助于构建能高效地穿膜进入细胞液, 并杀伤细胞的新型分子, 为肿瘤的治疗提供一种新思路. 本文旨在对这种融合是否影响重组 caspase-3 的活性进行实验研究.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞系: 大肠杆菌 DH5 α 菌种、人宫颈癌 HeLa 细胞系为本教研室保存. 哺乳动物细胞诱导表达系统 Complete ControlTM Inducible Mammalian Expression System 质粒 pERV3、pEGSH 和 pEGSH-luciferase 购自 Stratagene 公司.

1.1.2 试剂: RPMI 1640 培养基、胎牛血清和脂

质体 LipofectAmineTM 2000 为 Gibco 公司产品, 限制性内切酶、TRIZOL RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒及 SuperScriptTM 反转录试剂盒亦购自 Gibco 公司. Caspase-3 活性测定试剂盒 (Caspase-3 activity assay Kit) 和凋亡细胞梯状 DNA 条带检测试剂盒 (apoptotic DNA ladder Kit) 为 Boehringer Mannheim 公司产品. 噻唑蓝 (MTT) 检测和免疫组化 ABC 即用型试剂为华美生物工程公司产品.

1.2 方法

1.2.1 Caspase-3 基因的克隆、改建和表达载体构建: 人 caspase-3 基因通过反转录 PCR 方法从淋巴瘤 Jurkat 细胞中克隆, 大、小亚基序列颠倒的重组 caspase-3 基因 (r-casp3) 通过重叠延伸拼接 (gene splicing by overlap extension, SOE) 和 PCR 方法获得, 进一步在该基因的 5' 端融合绿脓杆菌外毒素 (*Pseudomonas* exotoxin A, PE) 的 280~364 位氨基酸的编码序列, 得到嵌合重组 caspase-3 基因 (cr-casp3)^[7]. 上述 3 种基因分别克隆入诱导表达载体 pEGSH 的 *Bam*H I / *Xba* I 位点.

* 国家高技术 (863) 计划资助项目 (2001AA217101), 国家杰出青年科学基金 (39925036) 和军队杰出青年科学基金 (98J009) 资助项目.

** 通讯联系人. Tel: 029-3376798, Fax: 029-3374513

E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2002-10-25, 接受日期: 2002-11-28

1.2.2 目的基因诱导表达细胞系的建立: 用 pERV3 质粒转染 HeLa 细胞, 该质粒表达一种源自蜕皮素受体 (ecdysone receptor, EcR) 的融合蛋白, 后者与蜕皮素或其类似物松甾酮结合后成为有活性的转录因子, 作用于 pEGSH 载体调控区的特定反应元件, 启动下游基因的表达. 筛选挑取 10 个阳性单克隆, 并扩大培养, 瞬时转染荧光素酶 (luciferase) 报告质粒 pEGSH-luciferase, 加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 松甾酮 (ponasterone) 诱导, 20 h 后分别测定未诱导和诱导后细胞的荧光素酶活性. 选取表达本底低、诱导表达倍数高的细胞克隆, 用 r-casp3、cr-casp3 和野生型 caspase-3 基因的 pEGSH 诱导表达载体转染, 潮霉素筛选 2 周, 并扩大培养, 得到相应基因的诱导表达细胞系. 在上述建系细胞中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 松甾酮诱导, 继续培养不同时间, 使目的基因得到表达.

1.2.3 免疫细胞化学: 目的基因诱导表达后 12 h, 培养于盖玻片上的细胞用冷丙酮 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 10 min, 用 3% H_2O_2 和含 25% 牛血清的 PBS 分别封闭 30 min, 加兔抗人 caspase-3 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 加生物素化羊抗兔 IgG 二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 同时将等量亲和素溶液 (A 液) 和生物素标记辣根过氧化物酶溶液 (B 液) 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 滴数滴经稀释的二氨基联苯胺 (DAB) 至片上, 显微镜下观察显色, 苏木素染核, 脱水透明, 树脂封片.

1.2.4 Caspase-3 活性测定: 按 Caspase-3 活性测定试剂盒操作说明进行. 目的基因诱导表达 24 h 后收集细胞, 用裂解缓冲液裂解细胞, 15 000 g 离心收集上清用于测定; 将待测样品以及不同浓度的 7-酰胺-4 荧光甲基香豆素 (AFC) 溶液分别加入经 caspase-3 抗体包被的微孔板的不同孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后去除样品, 加入 100 μl 新鲜配制的底物溶液 (Ac-DEVD-AFC), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后, 用荧光分光光度计在激发波长 400 nm, 发射波长 505 nm 下测定光吸收值. 根据预设的 AFC 溶液测定结果绘制光吸收值对底物浓度的标准曲线, 由此确定各样品测定中释放的 AFC 浓度, 并按照下式计算样品的 caspase-3 活性单位数: $U_{\text{casp3}} = FU \times \text{slope}^{-1} \times 10^6$, 其中 FU : 荧光强度; slope : 标准曲线斜率; caspase-3 活性单位 (U) 定义为 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 个小时内切割底物释放出 10^{-6} μmol AFC 所需的活性 caspase-3 的量^[8].

1.2.5 噻唑蓝 (MTT) 法测定细胞存活率: 培养在 96 孔板中的 HeLa 细胞, 分别于目的基因诱导

表达 24 h、48 h、72 h 和 96 h 后, 取 12 孔进行检测, 每孔加入 20 μl 1.5 g/L 的 MTT, 继续培养 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解结晶, 用酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 光吸收值 (A_{490}), 并计算平均值.

1.2.6 流式细胞仪测定细胞周期: 目的基因诱导表达后 24 h, 收集 1×10^5 个 HeLa 细胞, PBS 洗两遍, 重悬于 1 ml PBS 中, 加 2 ml 无水乙醇固定 30 min, 染色并用流式细胞仪测定 DNA 含量.

1.2.7 DNA 梯状电泳条带检测: 按凋亡细胞梯状 DNA 条带检测试剂盒操作说明进行. 收集目的基因诱导表达后 48 h 的 HeLa 细胞, 重悬于 200 μl PBS 中, 加 200 μl 裂解缓冲液, 立即混匀, 15~25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 min, 加入 100 μl 异丙醇, 震荡, 将样品移入套在 1.5 ml 管中的提取柱中, 8 000 g 离心 1 min, 弃去流出液, 用 500 μl 洗涤缓冲液洗两次, 离心后用 100 μl 70 $^{\circ}\text{C}$ 预热的洗脱缓冲液洗脱, 获得细胞基因组 DNA 提取物, 取 15 μl 在 1% 琼脂糖凝胶上, 60 V 电压, 电泳 1.5 h.

2 结 果

2.1 目的基因诱导表达细胞系的建立

我们在以前的研究中, 通过反转录 PCR 和重叠延伸拼接 (SOE) 法克隆并改建获得了野生型 caspase-3 (wt-casp3) 基因, 大、小亚基编码序列颠倒的重组 caspase-3 (r-casp3) 基因, 以及随后在 N 端融合绿脓杆菌外毒素转膜结构域的部分肽段, 形成的嵌合重组 caspase-3 (cr-casp3) 的基因^[7]. 本研究中, 进一步将大小分别为 834 bp、846 bp 和 1.1 kb 的上述 3 个基因克隆入诱导表达载体 pEGSH (图 1). 用 pERV3 转染 HeLa 细胞, 随机选取 10 个克隆, pEGSH-luciferase 转染, 并于

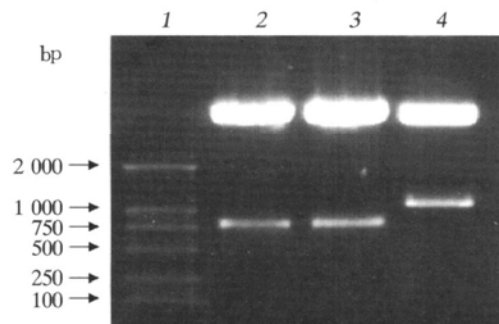


Fig 1 Wild-type and recombinant caspase-3 genes cloned into the pEGSH vector as confirmed by BamHI / Xba I cleavage
1: DNA markers; 2: wt-casp3; 3: r-casp3; 4: cr-casp3.

5 μmol/L 松甾酮诱导前后测定荧光素酶的活性, 选择本底低且诱导表达倍数高的 7 号克隆, 分别用 r-casp3、cr-casp3 和 wt-casp3 的 pEGSH 表达载体转染, 筛选 2 周并扩大培养, 得到上述基因的诱导表达细胞系。

3 种细胞系在加入 5 μmol/L 松甾酮诱导 12 h

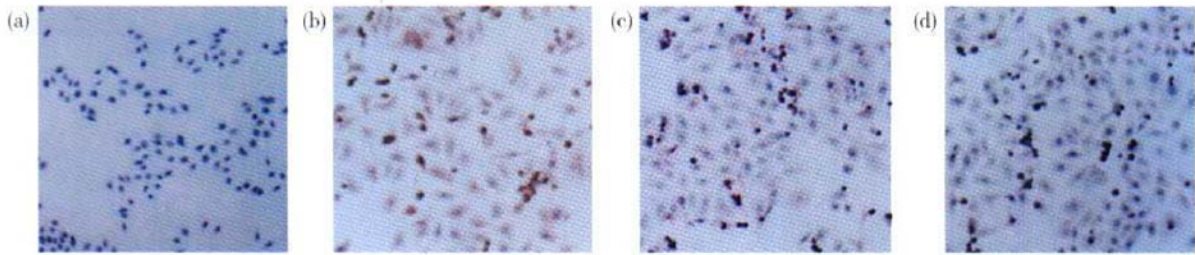


Fig. 2 Immunocytochemical detection of wild type and recombinant caspase 3 in HeLa cells 12 h post induction with ponasterone (× 200)

(a) HeLa; (b) HeLa wt-casp3; (c) HeLa r-casp3; (d) HeLa cr-casp3.

2.2 嵌合重组 caspase-3 诱导表达导致细胞死亡

分别于目的基因诱导表达后 24~ 96 h 进行 MTT 检测, 在一定细胞数范围内, 培养物 A₄₉₀ 与存活细胞数成正比. 结果显示, 野生型 caspase-3 基因诱导表达细胞与对照组 HeLa 细胞 A₄₉₀ 值相近, 而 r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达细胞出现相同程度的 A₄₉₀ 值大幅降低, 表明存活细胞数显著减少 (图 3). 将目的基因诱导表达细胞培养在 6 孔板中, 野生型和重组 caspase-3 诱导表达后 48 h 用血球计数板进行细胞计数, 并计算死亡率 (表 1). 结果显示, r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达组细胞死亡率分别达到 73.2% 和 70.8%, 而 wt-caspase-3 诱导表达组细胞死亡率仅为 10.1%.

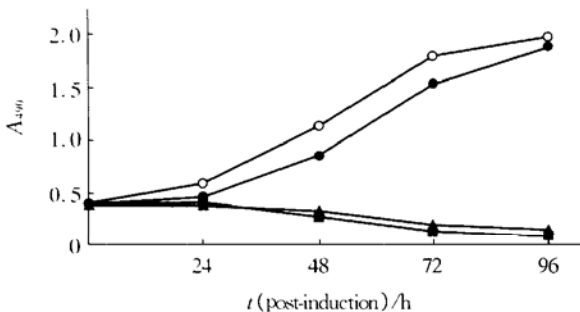


Fig. 3 MTT assay curves of HeLa cells post induction of wild type and recombinant caspase 3 genes

○ — ○: HeLa; ● — ●: HeLa wt-casp3; ▲ — ▲: HeLa r-casp3; ■ — ■: HeLa cr-casp3.

后, 用抗 caspase-3 多抗做免疫细胞化学检测, 发现各转染组细胞质呈棕色阳性结果, 胞核经苏木素染色后呈蓝色, 表明野生型及重组 caspase-3 蛋白均得到表达, 且主要分布于胞浆中, 而诱导前以及未转染的细胞中, 由于组成性表达的 caspase-3 浓度太低, 因而检测结果呈阴性 (图 2).

Table 1 Death ratios of HeLa cells 48 h post induction of wild type and recombinant caspase 3 genes with ponasterone

	HeLa r-casp3	HeLa cr-casp3	HeLa wt-casp3	HeLa (control)
Cell number/well	0.45 × 10 ⁶	0.49 × 10 ⁶	1.51 × 10 ⁶	1.68 × 10 ⁶
Death ratio/%	73.2	70.8	10.1	/

Death ratio= (number of HeLa- number of HeLa interest gene) / number of HeLa × 100%.

2.3 嵌合重组 caspase-3 诱导表达促进细胞凋亡

测定目的基因诱导表达 24 h 后细胞中的 caspase-3 活性, 结果 r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达后, 细胞中 caspase-3 活性升高数十倍, 而野生型 caspase-3 诱导表达组细胞中 caspase-3 活性没有明显增加 (表 2). 同期进行的细胞周期检测表明, r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达组细胞均出现凋亡峰,

Table 2 Caspase 3 activities in HeLa cells pre and post induction of indicated genes with ponasterone

Gene induced	r-casp3	cr-casp3	wt-casp3	control
Pre induction	13.5U	15.1U	5.9U	3.7U
24 h post induction	982.8U	1126.5U	16.3U	4.9U
Folds of induction	72.8	74.6	2.8	1.3

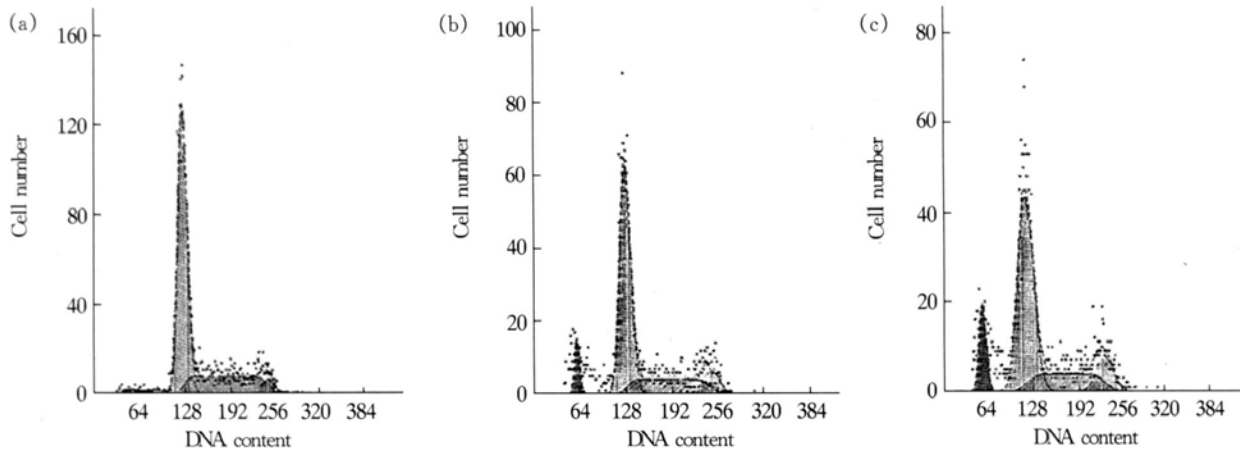


Fig 4 Flow cytometry analysis of DNA contents in HeLa cells 24 h post-induction of the wild-type and recombinant caspase 3 genes with ponasterone

(a) HeLa wt-casp3; (b) HeLa r-casp3; (c) HeLa cr-casp3.

而且两种重组 caspase-3 的上述效应基本相当 (图 4)。提取细胞基因组 DNA 并进行电泳, 发现 r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达组细胞基因组 DNA 出现清晰的梯状电泳条带 (DNA ladder) (图 5)。目的基因诱导表达 48 h 后, r-casp3 和 cr-casp3 诱导表达组细胞在电镜下呈现出细胞皱缩、核致密化、染色质边集固缩, 以及与周围细胞联系减少等凋亡细胞典型的形态特征 (图 6)。而野生型 caspase-3 诱导表达细胞基本没有出现这些凋亡细胞特有的生化和形态学变化。

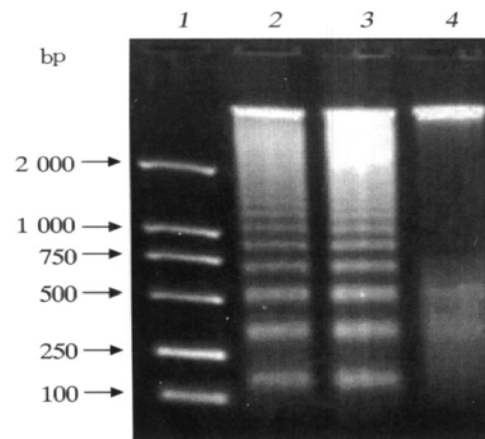


Fig 5 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA prepared from HeLa cells 24 h post-induction of wild-type and recombinant caspase 3 genes with ponasterone

1: DNA markers; 2: HeLa r-casp3; 3: HeLa cr-casp3; 4: HeLa wt-casp3.

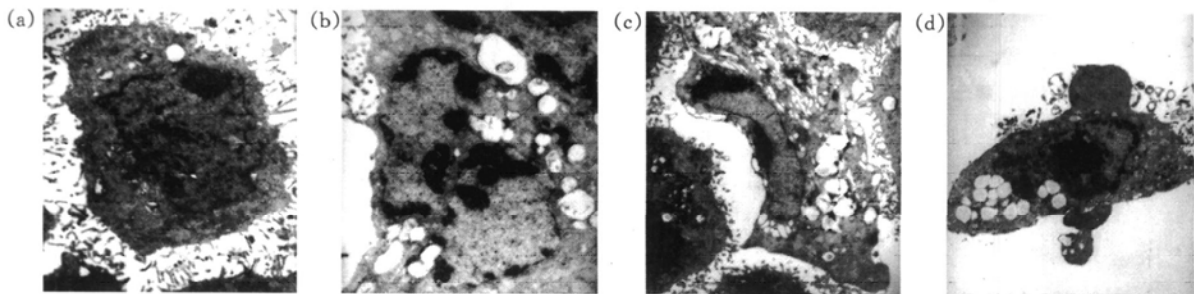


Fig 6 Electronic microscopy of HeLa 48 h post-induction of wild-type and recombinant caspase 3 genes with ponasterone

(a) HeLa wt-casp3 (x3500); (b) HeLa r-casp3 (x5000); (c) HeLa cr-casp3 (x2500); (d) HeLa cr-casp3 (x2500).

3 讨 论

细胞凋亡是生命有机体的一种固有的细胞死亡

模式, 它对于机体正常的发育过程和机体稳态的维持至关重要^[9, 10]。不同的细胞凋亡途径最终都要导致 caspase 活化, 活化后的 caspase 切割细胞内广

泛的结构和功能蛋白,引起细胞凋亡. Caspase-3 在这些 caspases 中居于核心地位^[1,4]. Srinivasula 等^[6]从 caspase-3 结构和活化过程中得到启示,构建了一种大小亚基序列颠倒的重组 caspase-3 分子,发现这种分子可以自发折叠成活性 caspase-3,而不再依赖于上游 caspase 的切割,但这一结果尚有待进一步的实验证实.

以上述研究为基础,我们构建了 N 端带有绿脓杆菌外毒素 (PE) 转膜序列的嵌合重组 caspase-3 基因,并建立了几种 caspase-3 构建物诱导表达的 HeLa 细胞系. 该细胞系从 pERV3 载体上组成性表达一种转录因子 VgEcR, 它与共激活物蜕皮素或其类似物结合形成具有活性的转录因子, 识别并结合 pEGSH 载体上特征性的调控序列 E/GRE, 启动下游目的基因的表达. 本研究中, 野生型和重组 caspase-3 的诱导表达均已通过免疫细胞化学检测证实.

通过 MTT 检测和对存活细胞进行计数发现, N 端带有 PE 部分肽段的嵌合重组 caspase-3, 和未融合 PE 肽段的重组 caspase-3 均能够促进 HeLa 细胞死亡, 并且二者的上述活性相近. 进一步研究发现, 两种重组 caspase-3 诱导表达细胞中 caspase-3 活性发生同等程度的大幅上调, 细胞在流式细胞仪检测中出现亚二倍体峰, 同时基因组 DNA 被降解为连续大小的片段, 细胞在电镜下呈现出凋亡细胞特征性的形态学变化. 这表明, 与野生型 caspase-3 需要上游分子活化的特点不同, 两种重组 caspase-3 均具有自发的 caspase-3 活性, 而且这种活性未受到 N 端融合肽段的影响. 另外, 我们应用人乳腺癌 SKBr-3 等细胞进行的研究也获得了类似结果.

通过诱导细胞凋亡的途径杀伤肿瘤细胞, 是当前肿瘤治疗的一个重要研究方向, 应用 caspase 等主要凋亡效应分子构建新型蛋白质药物, 可以高效地诱导肿瘤细胞凋亡. 但是, 由于 caspase 需要在靶细胞的细胞液中发挥作用, 因此实际应用中必须将 caspase 与具有转膜作用的多肽融合, 在后者的引导下内化和转位进入细胞液^[11]. 研究表明, 来源于绿脓杆菌外毒素的部分序列, 即 PE 的第 253 ~ 364 位氨基酸具有较强的转膜功能. 它们在引导

与之融合的蛋白质进入细胞后, 在相应于原来 PE 分子第 279 位精氨酸和 280 位甘氨酸之间断开, 释放出始自 Gly 280 的 N 端包含 PE 部分序列的下游肽段^[12,13]. 在本研究中, 我们证实, N 端融合 PE 转膜结构域部分序列的重组 caspase-3 仍然具有很强的促凋亡活性. 因此, 用 PE 转膜结构域和重组 caspase-3 构建能够内化和转位进入细胞内部的促凋亡蛋白, 并结合能够识别肿瘤细胞的抗体或配体, 将为肿瘤的靶向治疗提供一种行之有效的新途径.

参 考 文 献

- 1 Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, **281** (5381): 1312~ 1316
- 2 Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W, *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, **87** (2): 171
- 3 Wolf B B, Green D R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem*, 1999, **274** (29): 20049 ~ 20052
- 4 Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, **407** (6805): 770~ 776
- 5 Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30761 ~ 30764
- 6 Srinivasula S M, Ahmad M, MacFarlane M, *et al.* Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits. *J Biol Chem*, 1998, **273** (17): 10107~ 10111
- 7 贾林涛, 于翠娟, 许彦鸣, 等. GFP 共表达检测重组型 caspase-3 对 HeLa 细胞凋亡的诱导作用. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, **17** (3): 218~ 221
Jia L T, Yu C J, Xu Y M, *et al.* *J Cellular Molecular Immunology*, 2001, **17** (3): 218~ 221
- 8 Gurtu V, Kain S R, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem*, 1997, **251** (1): 98~ 102
- 9 Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*, 2000, **407** (6805): 796~ 801
- 10 Hengartner M O. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*, 2001, **104** (3): 325~ 328
- 11 Kouraklis G. Progress in cancer gene therapy. *Acta Oncol*, 1999, **38** (6): 675~ 683
- 12 Prior T I, FitzGerald D J, Pastan I. Translocation mediated by Domain II of *Pseudomonas* exotoxin A: transport of barnase into the cytosol. *Biochemistry*, 1992, **31** (14): 3555~ 3559
- 13 Taupiac M P, Bebién M, Alami M, *et al.* A deletion within the translocation domain of *Pseudomonas* exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly. *Mol Microbiol*, 1999, **31** (5): 1385~ 1393

Inducible Expression of Chimeric Recombinant Caspase 3 Promotes Apoptosis in Tumor Cells*

JIA Lin-Tao¹⁾, ZHANG Li-Hong¹⁾, YU Cui-Juan¹⁾, JI Zong-Ling¹⁾,
CAO Yun-Xin²⁾, WANG Cheng-Ji¹⁾, YANG An-Gang^{1)**}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Preclinical Medicine,
Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China;

²⁾Department of Immunology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Human cervix HeLa cells were stably transfected to establish cell lines that inducibly expressed 3 types of caspase-3 constructs, respectively. These constructs involved wild-type caspase-3 (wt-casp3), recombinant caspase-3 (r-casp3) in which the order of the small and large subunits was reversed in contrast to the original protein, and chimeric recombinant (cr-casp3) in which a *Pseudomonas* exotoxin A (PE) -derived peptide was fused to N-terminus of r-casp3. The expression of the interest genes was detected upon induction with ponasterone. The genes of r-casp3 and cr-casp3 were demonstrated to effectively cause cell death by MTT assay and cell counting. Cells that expressed r-casp3 or cr-casp3, but not wt-casp3, underwent apoptosis in a comparable level as determined by cell cycle analysis, genomic DNA ladders, and electronic microscopy. These results prove that unlike wild-type caspase-3 which is inactive unless proteolytically processed by upstream caspase, both recombinant caspase-3s are naturally active, and the N-terminal fusion of PE translocation domain does not interfere with the natural caspase-3 activity, suggesting their applications on the construction of novel tumor therapeutics that efficiently translocate to the cytosol of tumor cells and cause cell death.

Key words caspase-3, *Pseudomonas* exotoxin A, apoptosis, tumor

* This work was supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA217101), National Outstanding Youth Scientific Fund (39925036) and Outstanding Youth Scientific Fund of PLA (98J009).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3376798, Fax: 86-29-3374513, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

Received: October 25, 2002 Accepted: November 28, 2002