

研究简报

活性型粒酶 B 基因的异位表达导致多核巨细胞产生*

赵 晶¹⁾ 陈 蕾²⁾ 许彦鸣¹⁾ 张淼丽³⁾ 温伟红¹⁾ 王成济¹⁾ 杨安钢¹⁾**

(¹⁾第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032; ²⁾清华大学生物科学与技术系, 北京 100084;

³⁾第四军医大学人体解剖学教研室, 西安 710032)

摘要 粒酶 B (granzyme B, GrB) 是一种重要的丝氨酸蛋白酶参与细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤细胞 (NK) 介导的细胞杀伤过程。为研究粒酶 B 在肿瘤细胞中异位表达后能否诱导细胞死亡, 将构建的活性型粒酶 B (GrBa) 基因及其酶活性中心突变型 (mGrBa) 基因的真核表达载体, 以脂质体法瞬时转染 HeLa 细胞, 通过绿色荧光蛋白 (GFP) 共表达、间接免疫荧光、细胞计数、MTT 等方法, 观察到 GrBa 蛋白的异位表达引起多核巨细胞形态异常, 并且表达细胞的生长受到抑制。Percoll 分离多核巨细胞后, 观察到其生长状态较差, 是导致生长抑制的直接原因。细胞骨架破坏和具有多极纺锤体的异常有丝分裂, 推测是多核巨细胞不断产生的根源。上述结果为 GrBa 应用于肿瘤基因治疗提供了一定依据。

关键词 粒酶 B, 异位表达, 多核巨细胞

学科分类号 Q255

粒酶 B (granzyme B, GrB) 是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤细胞 (NK) 颗粒 (granule) 中的主要杀伤性分子, 属于丝氨酸蛋白酶家族^[1]。当粒酶 B 被切除 N 端信号肽和酸性二肽后, 成为有活性的成熟粒酶 B (active granzyme B, GrBa), 活性中心包含 His⁴⁴、Asp⁸⁸ 和 Ser¹⁸³ 三个关键的氨基酸残基^[2, 3]。活性型粒酶 B 由受体介导进入靶细胞, 通过 caspase 依赖途径、不依赖 caspase 的胞浆途径及直接入核途径, 有效启动靶细胞凋亡^[4-7]。以往研究粒酶 B 功能的方法局限于纯化天然或重组的粒酶 B 蛋白, 体外与靶细胞孵育。我们首次报道了将活性型粒酶 B 基因转染人宫颈癌 HeLa 细胞, 初步观察到胞浆中表达的粒酶 B 蛋白使转染细胞形态发生异常^[8]。为进一步阐明异位表达的粒酶 B 介导的细胞死亡方式, 我们构建了突变型粒酶 B (Cys¹⁸³) 作为阴性对照, 定性、定量地追踪表达活性型粒酶 B 的细胞随时间的变化趋势。

1 材料和方法

1.1 材料

pUC19 质粒、pcDNA3 质粒、*E. coli* DH5 α 宿主菌和人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞均为本室保存。绿色荧光蛋白 (GFP) 共表达载体 pIRES2-EGFP 为 Clontech 公司产品。pUC19-GrB 克隆质粒 (含

744 bp 的人全长粒酶 B 基因) 由本室构建^[8]。Percoll 为 Pharmacia 公司产品。PCR 引物合成和 DNA 序列测定由上海生工生物公司完成。限制性内切酶、Taq 酶、RPMI 1640、DMEM、新生牛血清及脂质体 lipofectAMINE 2000 均购自 Invitrogen 公司。T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。质粒提取试剂盒购自上海华舜公司。山羊抗人粒酶 B 多克隆抗体为 Santa Cruz 产品。DAPI 和小鼠抗牛 α -tubulin 单克隆抗体购自 Molecular Probes 公司。生物素化兔抗山羊二抗、FITC 标记山羊抗小鼠二抗及 SABC-Cy3 为博士德公司产品。

1.2 方法

1.2.1 突变型粒酶 B (mutant granzyme B, mGrB) 基因的构建: 将粒酶 B 活性中心 Ser¹⁸³ 定点突变为 Cys¹⁸³。设计引物如下: mGRBR, 5' CACACAAG-AGGGCCCCACAGTCCCCCT 3'; mGRBF, 5' CTT-CCTTTAAGGGGACTGTGGGGCCCC 3'。以 pUC19-GrB 为模板, 用 GRBF^[8] 和 mGRBR 引物、mGRBF 和 GRBR^[8] 引物进行重组 PCR, 产物经 *Bam*H I 和

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2001AA217101), 国家杰出青年科学基金资助项目 (39925036) 和全军医药卫生科研基金重点项目 (01Z090)。

** 通讯联系人。

Tel: 029-83374528, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2003-11-10, 接受日期: 2003-12-09

EcoR I 双酶切后, 克隆入 pUC19. 测序证实后命名重组质粒为 pUC19-mGrB.

1.2.2 活性型粒酶 B (GrBa) 及其突变型 (mGrBa) 基因真核表达载体的构建: 设计引物 GF 和 GR, 将粒酶 B 和突变型粒酶 B 去除 N 端信号肽和酸性二肽. GF: 5' TTTGAATTCATGATCATCG-GGGGACATGAGGC 3'; GR: 5' TTTTCTAGAGGAT-CCTTAGTAGCGTTTCATGGTTTT 3'. 分别以 pUC19-GrB 和 pUC19-mGrB 为模板, 用 GF 和 GR 引物扩增得到 GrBa 及 mGrBa 基因, 分别克隆入 pcDNA3 和 pIRES2-EGFP 表达载体中, 测序证实.

1.2.3 细胞培养与转染: HeLa 细胞用 DMEM (含 10% 小牛血清) 在 37℃、5% CO₂ 浓度条件下培养. 转染前 24 h 将处于对数生长期的细胞重新接种于六孔板中, 待贴壁细胞长满底面积 80% 时进行转染. 转染按照 LipofectAMINE 2000 试剂说明书操作.

1.2.4 GFP 共表达的荧光显微镜观察: 转染后 18 h 用胰酶消化细胞, 加 1~2 滴至培养板中的盖玻片上, 37℃、5% CO₂ 条件下培养 1 h, 使细胞贴壁, 补加适量培养液继续培养. 不同时间点取出细胞爬片, 用 PBS (pH 7.4) 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再以 PBS 洗 2 次, 加 1 滴 PBS 封片, 于荧光显微镜下观察并照相. 激发波长为 488 nm, 发射波长为 508 nm.

1.2.5 细胞计数: 细胞消化后重悬于适量培养液中, 用血球计数板进行细胞计数, 描绘生长曲线以及计算生长抑制率. 生长抑制率 (%) = (对照组细胞数 - 实验组细胞数) / 对照组细胞数 × 100%

1.2.6 Percoll 分离不同体积的转染细胞: 转染后 72 h 收集细胞, 重悬于 2 ml 无血清培养液中. 缓慢加入 2 ml 40% percoll 至离心管底, 1 500 r/min 离心 15 min, 分别吸取界面细胞和管底部细胞, 无血清培养液洗 2 次, 加入含 10% 小牛血清的培养液继续培养.

1.2.7 间接免疫荧光: 取出转染细胞的爬片, 用 PBS (pH 7.4) 洗 2 次后, 加 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再以 PBS 洗 2 次. 经 0.01% Triton X-100 处理、0.3% 双氧水灭活内源性过氧化物酶及血清封闭等处理后, 依次加入 1:200 稀释的山羊抗人粒酶 B 多克隆抗体或 1:200 稀释的小鼠抗牛 α -tubulin 单克隆抗体, 1:100 稀释的生物素化兔抗山羊二抗或 1:50 稀释的 FITC 标记山羊抗小鼠二抗, 1:100

稀释的 SABC-Cy3, 最后经 DAPI (300 nmol/L) 室温染色 5 min, 荧光显微镜观察并照相.

1.2.8 MTT 法测定细胞存活率: 细胞转染后 24 h 接种入 96 孔板中, 分别于不同时间点每孔加入 20 μ l 新配制的 MTT (0.5 g/L), 37℃ 继续孵育 4 h 后弃 MTT 液, 加 150 μ l DMSO 混匀, 酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 光吸收值, 并计算平均值.

2 结 果

2.1 突变型粒酶 B (mGrB) 基因的构建

以 pUC19-GrB 为模板, 用 GRBF 和 mGRBR 引物、mGRBF 和 GRBR 引物分别扩增出约 630 bp 的 5' 端片段和约 160 bp 的 3' 端片段, 二者的重组 PCR 产物长约 760 bp (图 1). 将其克隆入 pUC19 后酶切鉴定 (图 2), 并测序证实活性中心 Ser183 成功突变为 Cys183 (图 3).

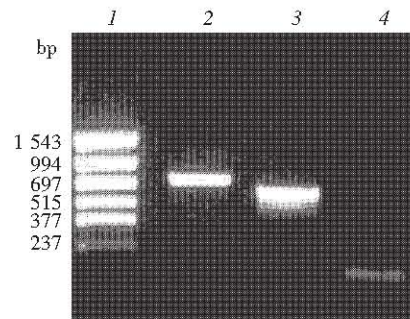


Fig. 1 Recombinant PCR product of mGrB gene

1: PCR marker; 2: mGrB gene; 3: 5'-terminal fragment of mGrB; 4: 3'-terminal fragment of mGrB.

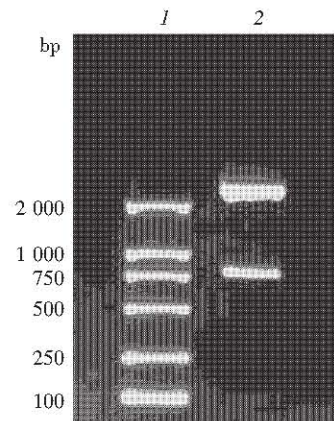


Fig. 2 Restriction enzyme analysis of recombinant pUC19-mGrB

1: DL-2000 marker; 2: pUC19-mGrB digested by *Bam*HI/*Eco*RI.

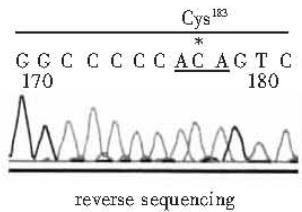


Fig. 3 Mutation of Ser183 into Cys183 confirmed by DNA sequencing

2.2 活性型粒酶 B 及其突变型基因的获取

分别以 pUC19-GrB 和 pUC19-mGrB 为模板，用 GF 和 GR 引物扩增得到长约 700 bp 的 GrBa 及 mGrBa 基因，克隆入 pcDNA3 和 pIRES2-EGFP 表达载体后酶切鉴定（图 4~6）。测序结果表明所得序列完全正确。

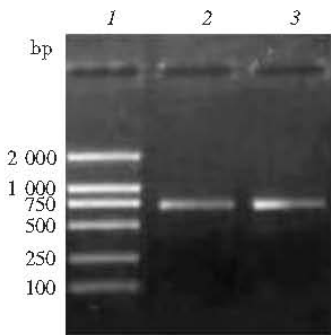


Fig. 4 PCR products of GrBa and mGrBa genes
1: DL-2000 marker; 2: GrBa gene; 3: mGrBa gene.

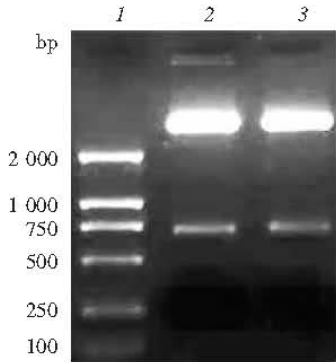


Fig. 5 GrBa and mGrBa genes cloned into pcDNA3 vector as confirmed by *EcoR* I / *Xba* I digestion
1: DL-2000 marker; 2: pcDNA3-GrBa; 3: pcDNA3-mGrBa.

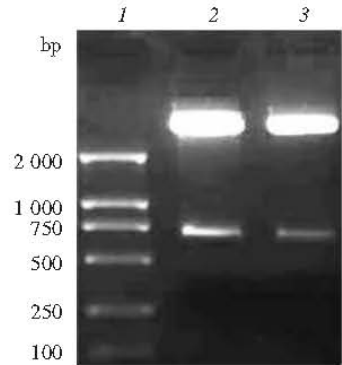


Fig. 6 GrBa and mGrBa genes cloned into pIRES2-EGFP vector as confirmed by *EcoR* I / *BamH* I digestion
1: DL-2000 marker; 2: pIRES2-EGFP-GrBa; 3: pIRES2-EGFP-mGrBa.

2.3 GrBa 瞬时转染细胞随时间的变化趋势

追踪 pIRES2-EGFP-GrBa 瞬时转染细胞的形态变化，观察到表达 GrBa 的 HeLa 细胞经历了由较正常形态到多核巨细胞增多，再到濒死的固缩细胞比例增大的变化过程。而表达 mGrBa 的细胞始终具有正常的细胞形态（图 7）。细胞计数结果表明，

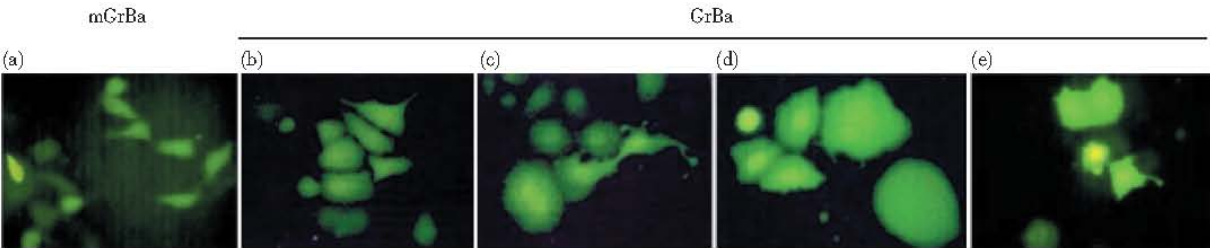


Fig. 7 Morphological change of HeLa cells transiently transfected with pIRES2-EGFP-GrBa shown by fluorescence microscopy
(a) mGrBa; (b~e) GrBa. (b) 2 days, (c) 4 days, (d) 6 days, (e) 8 days. ($\times 400$)

pIRES2-EGFP-GrBa 转染细胞的生长速度较空载体转染组和突变型转染组缓慢 (图 8).

2.4 不同体积 GrBa 瞬时转染细胞的形态与数量

pIRES2-EGFP-GrBa 瞬时转染 HeLa 细胞 72 h 后, 用 40% percoll 将转染细胞分离成不同体积的两组, 光镜下观察大体积组中多核巨细胞的比例提高到约 50%. 继续培养 4 天或 7 天后观察, 大体积组中表达 GrBa 细胞的比例较小体积组少, 小体积组中也逐渐出现体积较大的 GrBa 阳性细胞 (图 9). 定量分析显示, GrBa 转染的大体积组细胞生长慢于对照组 (图 10, 11).

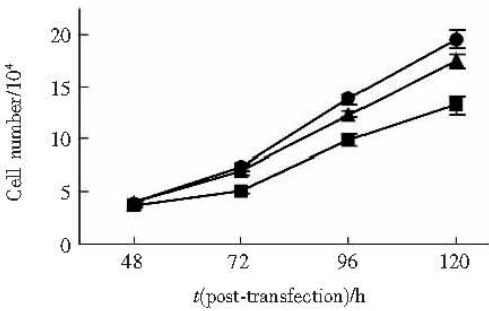


Fig. 8 Growth curves of HeLa cells transfected with pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-GrBa and pIRES2-EGFP-mGrBa

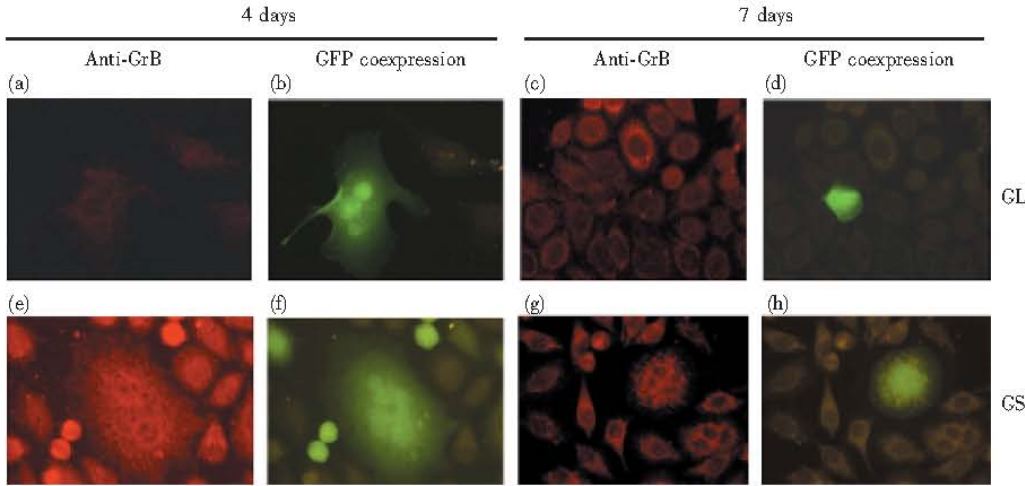


Fig. 9 Morphology of pIRES2-EGFP-GrBa transfectants of different volume at indicated times after separation by 40 % percoll

GL and GS: giant and shrunk GrBa-transfected HeLa cells. (×400) (a), (e) Anti-GrB; (b), (f) GFP coexpression; (c), (g) Anti-GrB; (d), (h) GFP coexpression.

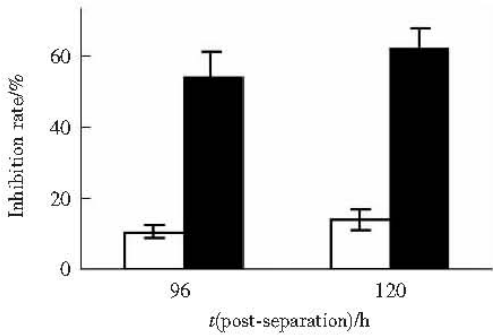


Fig. 10 Growth inhibition of giant transfected HeLa cells isolated by percoll

□: Giant pIRES2-EGFP-mGrBa transfectants; ■: Giant pIRES2-EGFP-GrBa transfectants.

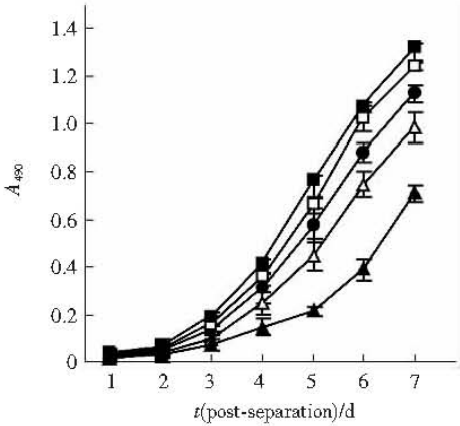


Fig. 11 MTT assay curves of HeLa transfectants of different volume separated by percoll

●—●: Vector; △—△ and □—□: Giant and shrunk pIRES2-EGFP-mGrBa transfectants; ▲—▲ and ■—■: Giant and shrunk pIRES2-EGFP-GrBa transfectants.

2.5 多核巨细胞的细胞骨架和有丝分裂异常

pcDNA3-GrBa 转染 HeLa 细胞 72 h 后进行细胞骨架染色. 结果表明, 表达 GrBa 的多核巨细胞的细胞骨架出现异常, 并且 GrBa 转染细胞的有丝分

裂出现多极纺锤体等异常现象; 而表达 mGrB 对照蛋白的细胞具有正常的骨架形态, 同时观察到正常有丝分裂相的细胞 (图 12).

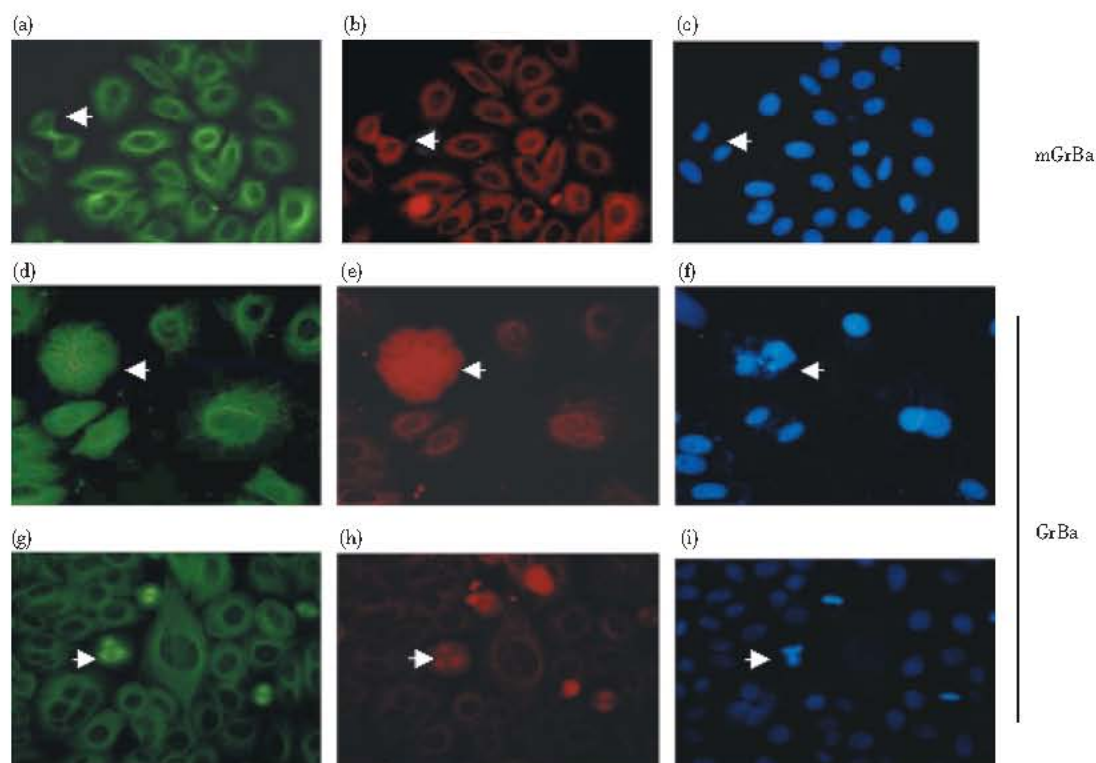


Fig. 12 Cytoskeletal analysis of HeLa cells transfected with pcDNA3-GrBa and pcDNA3-mGrBa

(a), (d), (g) Anti- α -tubulin; (b), (e), (h) Anti-GrB; (c), (f), (i) DAPI. ($\times 400$)

3 讨 论

粒酶 B (GrB) 主要由 CTL 和 NK 细胞特异性表达, 是参与淋巴细胞杀伤靶细胞重要的丝氨酸蛋白酶. 许多研究表明, 纯化的粒酶 B 蛋白可以内化入靶细胞, 启动多层次、多水平的细胞凋亡途径^[4-7]. 显微注射入 MCF-7 细胞浆中的活性型粒酶 B (GrBa) 蛋白能够诱导细胞凋亡发生^[9], 提示将 GrBa 基因异位表达于肿瘤细胞浆可能使细胞走向死亡. 在以往的研究中, 我们初步观察到 GrBa 基因转染的细胞出现异常形态^[8], 但 GrBa 异位表达对细胞的作用机制有待于进一步研究.

本文构建了酶活性中心突变的 mGrBa 基因作为对照, 观察了 GrBa 基因瞬时转染细胞的形态学及细胞生长曲线的变化. 转染后随时间延长, GrBa 与 GFP 共表达的细胞体积增大, 常伴随多个细胞核出现, 并且细胞生长速度减慢, 而 mGrBa

基因转染细胞的形态及生长相对正常. 表达 GrBa 蛋白的多核巨细胞是一个令人感兴趣的现象, 它们虽然目前处于存活状态, 但生长状况较差, 很可能是细胞死亡前的一种形态表现. 进一步用 percoll 分离出转染后形态较大的细胞, 光镜下观察多核巨细胞比例提高到约 50%. 随着培养时间的延长, 大细胞组中 GrBa 阳性细胞的比例较小细胞组少, 提示多核巨细胞不能进行正常的细胞分裂和增殖, 而小细胞组中也逐渐出现体积较大的 GrBa 阳性细胞, 表明 GrBa 蛋白作用于其表达细胞终将使之出现多核巨细胞形态. 细胞计数和 MTT 检测结果显示, 多核巨细胞的生长速率明显慢于对照组, 小细胞组的生长则较为正常, 说明 GrBa 蛋白的过表达引起细胞形态变大, 从而抑制细胞生长. 进一步的实验表明, 多核巨细胞的细胞骨架出现异常, 推测是由于 GrBa 切割而破坏了重要的细胞骨架蛋白引起的^[7], 同时观察到具有多极纺锤体的异常有丝

分裂阶段, 提示异位表达的 GrB 可能通过抑制细胞质分裂, 从而使表达细胞出现多核巨细胞现象。

使肿瘤细胞表达凋亡效应蛋白从而诱导细胞死亡, 是肿瘤治疗的重要研究方向。不同的效应分子启动不同的凋亡途径, 可以协同作用、相互补充。研究表明, 胞浆中异位表达的 GrBa 蛋白能够抑制细胞生长, 形态异常的多核巨细胞是 GrBa 介导的死亡途径中特殊的现象。上述结果与一些凋亡相关基因转染后使细胞形态变大及多核化、而非出现凋亡典型特征报道一致^[10~12], 提示这与纯化的凋亡蛋白直接作用于靶细胞的机制不同。本研究为将 GrBa 应用于肿瘤基因治疗提供了一定的依据。

参 考 文 献

- 1 Trapani J A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*, 2001, **2** (12): 1~7
- 2 Edwards K M, Davis J E, Browne K A, *et al.* Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol Cell Biol*, 1999, **77** (1): 76~89
- 3 Kam C M, Hudig D, Powers J C. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1477** (1~2): 307~323
- 4 Andrade F, Roy S, Nicholson D, *et al.* Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 1998, **8** (4):

451~460

- 5 Pinkoski M J, Heibin J A, Barry M, *et al.* Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ*, 2000, **7** (1): 17~24
- 6 Alimonti J B, Shi L, Baijal P K, *et al.* Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 2001, **276** (10): 6974~6982
- 7 Browne K A, Johnstone R W, Jans D A, *et al.* Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem*, 2000, **275** (50): 39262~39266
- 8 赵 晶, 许彦鸣, 贾林涛, 等. 人 granzyme B 基因在 HeLa 细胞中的表达. *第四军医大学学报*, 2002, **23** (5): 394~397
- 9 Zhao J, Xu Y M, Jia L T, *et al.* *J Fourth Mil Med Univ*, 2002, **23** (5): 394~397
- 10 Pinkoski M J, Hobman M, Heibin J A, *et al.* Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood*, 1998, **92** (3): 1044~1054
- 11 Iwasaka T, Zheng P S, Ouchida M, *et al.* Cytologic changes in two cervical carcinoma cell lines after transfection of the wild-type p53 gene. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1996, **75** (9): 797~803
- 12 Elliott M J, Murphy K M, Stribinskiene L, *et al.* Bel-2 inhibits early apoptotic events and reveals post-mitotic multinucleation without affecting cell cycle arrest in human epithelial tumor cells exposed to etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1999, **44** (1): 1~11
- 12 Fokkema E, de Vries E G, Groen H J, *et al.* Expression of apoptosis-related proteins and morphological changes in a rat tumor model of human small cell lung cancer prior to and after treatment with radiotherapy, carboplatin, or combined treatment. *Virchows Arch*, 2003, **442** (4): 349~355

Ectopic Expression of Active Granzyme B Gene Leads to Multinuclear Giant Cells*

ZHAO Jing¹⁾, CHEN Lei²⁾, XU Yan-Ming¹⁾, ZHANG Miao-Li³⁾,
WEN Wei-Hong¹⁾, WANG Cheng-Ji¹⁾, YANG An-Gang¹⁾**

⁽¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China;

⁽²⁾Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

⁽³⁾Department of Human Anatomy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Granzyme B (GrB) is an important serine protease involved in granule-mediated killing in cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) cells. In order to study whether ectopic expression of GrB in tumor cells can induce cell death, expression vectors encoding active GrB (GrBa) and mutant GrBa (mGrBa) gene in which serine in catalytic triad was replaced with cysteine were constructed, and transiently transfected into HeLa cells with lipofectamine. It was shown by GFP coexpression, indirect immunofluorescence, cell counting and MTT analyses that ectopic expression of GrBa genes caused increased tumor cell size and multinucleation, and the growth of cells that expressed GrBa proteins was inhibited. Retarded growth was further observed in these morphologically abnormal cells isolated by 40% percoll, which directly contributed to growth inhibitory effect on GrBa-transfectants. There was cytoskeletal breakdown and abnormal mitosis characteristic of multiple spindle poles, largely resulting in accumulation of giant multinuclear cells. These results suggest that GrBa may serve as a good candidate in tumor gene therapy.

Key words granzyme B, ectopic expression, multinuclear giant cells

* This work was supported by grants from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA217101), National Outstanding Youth Scientific Fund (39925036) and Medical Research Foundation of PLA (01Z090).

** Corresponding author. Tel: 86-29-83374528, E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

Received: November 10, 2003 Accepted: December 9, 2003