

Bax α 高表达 PC12 细胞系的建立及 (-) 黄皮酰胺抗细胞凋亡作用机制的研究

王润生, 张均田*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 用 Bax α 高表达的 PC12 细胞研究了 (-) 黄皮酰胺的抗细胞凋亡作用。方法 先将 Bax α cDNA 从原核载体 pBluescript SK 克隆到真核载体 pcDNA3。用脂质体转染的方法将 pcDNA3-Bax α 导入 PC12 细胞。以 6-羟基多巴胺(6-OHDA) 诱导 Bax α 高表达 PC12 细胞的凋亡。结果 (-) 黄皮酰胺(0.1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可使细胞凋亡率显著降低。结论 (-) 黄皮酰胺可以抑制细胞凋亡, 对神经退行性病变有一定应用前景。

关键词: 细胞凋亡; 基因转化; 重组 DNA; 遗传载体; bax 基因; 黄皮酰胺

中图分类号: R965.2; Q813.1⁺1; R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2000)06 - 0404 - 04

Bax 的过度表达可启动细胞程序性死亡^[1]。与 Bcl-2 相同, Bax 主要存在于核膜、线粒体外膜及内质网膜。Bax 基因 mRNA 的剪切方式有 $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \omega$ 5 种。在中枢系统中以 Bax α 和 Bax β 为主。凋亡诱导基因 p53 可以促进 Bax 的表达^[2]。大脑中动脉缺血(MCAO) 以后, Bax 的转录水平升高到对照的 180%^[3]。Bax 可以在红细胞膜和脂质体膜形成通道^[4]。因此 Bax 的抑制物有一定的应用价值。研究表明, (-) 黄皮酰胺可促进突触体乙酰胆碱释放, 拮抗由 Fe^{2+} -半胱氨酸和 VC-NADPH 造成的膜流动性下降。另外 (-) 黄皮酰胺还可增加突触基础群峰电位及 LTP 的幅度, 促进 LTP 的产生^[5]。本实验首先建立了 Bax α 高表达的 PC12 细胞系, 用 6-羟基多巴胺造成细胞凋亡损伤模型, 观察了 (-) 黄皮酰胺的作用。

材料与 方法

试剂和药品 限制性内切酶购自 Promega Co, New England Biolabs Co 和 Boehringer Mannheim Co; T4 DNA 连接酶购自 Boehringer Mannheim Co; DNA 纯化试剂盒购自 Gibco BRL Co; DNA 分子量标准 pBR322/HinfI 由 Biotech 生物工程公司提供;

脂质体转染试剂购自 Gibco BRL Co; 其他为 Sigma, Fluka 及国产分析纯试剂。

质粒和菌株 质粒 pBluescriptSK-Bax α , 由 Dr S.J. Korsmeyer (Howard Hughes Medical Institute, USA) 提供。它含有 Bax α cDNA 全长序列, 编码小鼠的 Bax α , 克隆于 EcoRI 位点。真核载体 pcDNA3 购自 Invitrogen Co。大肠杆菌株 DH5 α [supE44 Δ lac Ul69 (ϕ 80LacZ Δ m15) hsdRl7recA1endA1gyrA96thr1relA1] 由中国医学科学院基础医学研究所提供。

克隆及转化过程 用标准的分子生物学方法处理和析核酸^[6]。碱裂解法提取质粒 DNA, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察酶切反应。连接反应物转入 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, 在含有 ampicillin 的 LB 平板上进行选择性培养, 提取质粒 DNA。

按试剂说明进行质粒 DNA 的限制性内切酶反应鉴定重组体。稳定转染方法参照试剂盒说明。Western blot 分析所用第一抗体为兔抗鼠多抗 (Santa Cruz), 识别位点为 Bax 蛋白 p21 氨基末端 aa 11-30。

流式细胞仪检测凋亡^[7] 细胞培养于 DMEM 中, 将 PC12 细胞暴露于 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导凋亡。(-) 黄皮酰胺 (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 6-OHDA 同时加入。72 h 后, 收集细胞, 用磷酸缓冲液 (PBS) 洗两次, 加胰酶-EDTA 消化, 轻轻吹打收集细胞于一个离心管内, 500 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 3 min。沉淀用 70% 乙醇悬浮固定 24 h。离心洗涤细胞后用 RNA 酶 A 消化细胞,

收稿日期: 1999-09-20

基金项目: 国家重点基础研究(973) 课题

* 联系人 Tel: (010) 63165179, Fax: (010) 63017757,

E-mail: Zjtian@public.bta.net.cn

37 °C 作用 30 min。细胞经碘化丙啶 (PI, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 染色, 用 FACS-420 型流式细胞分选仪计数 10 000 个细胞, 测定各期 DNA 含量, 去除细胞碎片的影响, 并计算细胞凋亡比例。

线粒体膜电位测定^[8] 细胞培养方法同上, 6-OHDA 和 (-) 黄皮酰胺 (0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 12 h, 将荧光染料 Rh123 (1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 加入到细胞培养液中, 37 °C, 30 min。PBS 洗 2 次, 去除细胞浆的染料, 用流式细胞仪检测 530 nm 处的荧光值。

结 果

1 重组 pcDNA3-Bax α 的构建并转入 PC12 细胞

首先去除 Bax α 的 polyA 信号序列构建中间载体 (pBluescript⁺-Bax α -pA⁻)。将 pBluescript⁺-Bax α 用 ClaI, NarI 双酶切, T4 DNA 连接酶连接。Bax α 的 polyA 信号序列, polyA 以及 polyA 3' 端约 -190 bp 长的核苷酸序列被切去。由于 3' 端 EcoRI 切点位于 NarI 和 ClaI 之间, 所以也同时被删除。因此去除 3' 端 polyA 信号的 Bax α 含有全长编码序列, 长度为 765 bp。NarI/ClaI 位点也被删除。

构建重组 pcDNA3-Bax α 。真核载体 pcDNA3 用 EcoRI, XhoI 酶切, 分离 -5.4 kb 长 pcDNA3 片段, 其中含有人巨细胞病毒即刻早期启动子 (CMV), 牛生长因子 (BGH) polyA 信号序列, SV40 origin, Ampicillin 抗性基因和 Genetecin (Neo) 抗性基因。将 pBluescript⁺-Bax α (pA⁻) 用 EcoRI, XhoI 酶切, 分离 -765 bp Bax α cDNA 片段。将 -765 bp Bax α cDNA 片段与 -5.4 kb 的 pcDNA3 片段相连接, 转入 DH5 α , 筛选。ApaI 酶切后, 电泳显示重组 pcDNA3-Bax α 中, Bax α 以正义方向插入到载体 (图 1)。

PC12-Bax α 的转化与选择。转染后两周单细胞克隆开始出现, 转染后一个月共有 49 个单细胞克隆长出。用 Western blot 检测了 pcDNA3-Bax α 转染的 PC12 细胞 Bax α 蛋白的含量。与原 PC12 细胞系和转空载细胞对照相比, pcDNA3-Bax α 转染的 PC12 细胞 (clone 7) 有高水平的 Bax α 表达。

2 (-) 黄皮酰胺对 Bax α 高表达 PC12 细胞的作用

细胞凋亡时, 流式细胞检测可呈现亚二倍体核型峰的特征。根据细胞光散射的特点, 应用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色, 可以将坏死细胞与凋亡细胞加以区别。在 DNA 直方图上, 凋亡细胞 G1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型。而坏死时, 细

胞周期中的细胞均出现不同程度的减少。Bax α 高表达的 PC12 细胞的凋亡比例显著高于亲代细胞 (49.96% vs 32.90%, $P < 0.01$)。(-) 黄皮酰胺 (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够显著降低细胞凋亡的比例 (表 1, 图 2)。

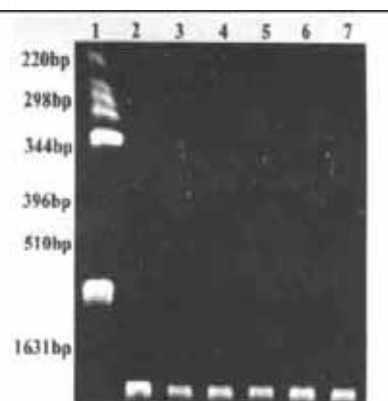


Fig 1 Restriction enzyme analysis of recombinant pcDNA3-Bax α

Lane 1: pBR322/HinfI molecular standard. Lane 2: pcDNA3 vector cut by ApaI. Lane 3 ~ 7: pcDNA3-Bax α minipreps cut by ApaI

3 (-) 黄皮酰胺对线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位降低是细胞凋亡的早期标志, 经 6-羟多巴胺作用后线粒体膜电位降低。表 2 提示, 黄皮酰胺可以显著提高凋亡细胞的线粒体膜电位水平 (表 2)。

Tab 1 Effects of (-) clausenamide on apoptosis of cultured PC12-Bax α cell line induced by 6-hydroxydopamine

Group	Drug concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Apoptotic percentage/ %
Control		49.96 \pm 2.8
(-) Clausenamide	0.1	36.23 \pm 1.8*
(-) Clausenamide	1.0	28.10 \pm 2.7*
(-) Clausenamide	10	9.5 \pm 1.5*

$n = 3, \bar{x} \pm s, * P < 0.01$ vs control

Tab 2 Effect of (-) clausenamide on decrease of mitochondria membrane potential in PC12 cells subjected to 6-hydroxydopamine

Group	Drug concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Rh123 fluorescence
Control		24.6 \pm 0.45
(-) Clausenamide	0.1	36.7 \pm 3.3*
(-) Clausenamide	1.0	56.0 \pm 5.0**

$n = 3, \bar{x} \pm s, * P < 0.05, ** P < 0.01$ vs control

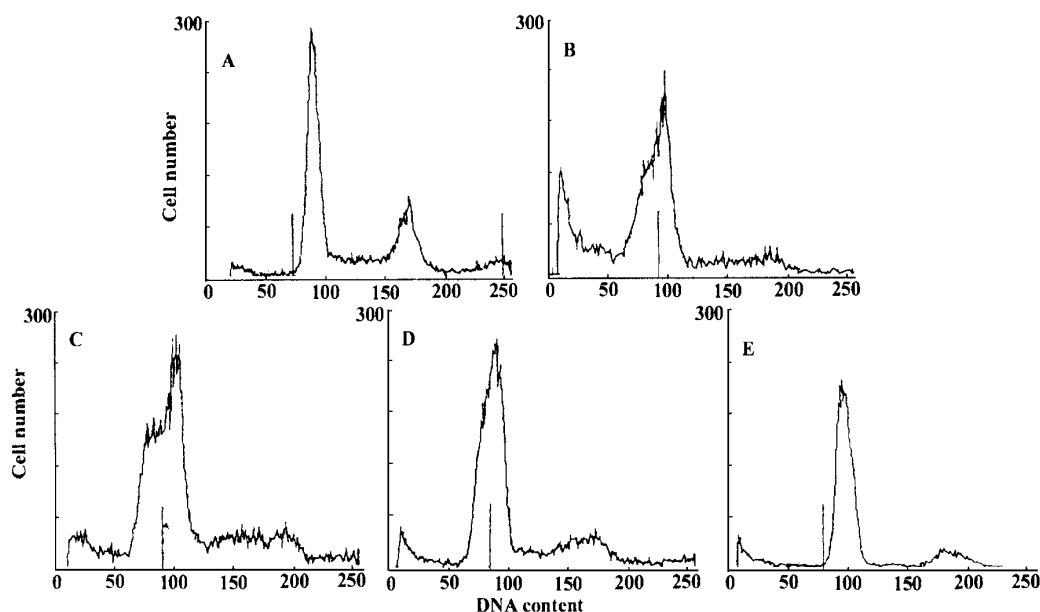


Fig 2 DNA content frequency histograms of cultured PC12 cells. The cells were stained immediately following fixation at 4 °C with propidium iodide (PI) and measured by flow cytometry (A) control PC12-Bax α ; (B) PC12-Bax α subjected to 6-hydroxydopa mine (6-OHDA) treatment; (C, D, E) added (-) clausena mide (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at the time of 6-OHDA treatment

讨 论

许多因子参与凋亡的发生和发展过程,其中 Bax 导致的线粒体膜对某些分子的通透性改变是凋亡的始动因素,因此 Bax 抑制物对治疗与凋亡相关的神经退行性病变有一定的治疗价值。本研究运用 Bax α 高表达 PC12 细胞研究了 (-) 黄皮酰胺的抗凋亡作用。为提高转染基因的表达水平,首先用限制性内切酶去除 Bax α cDNA 3' 末端加 polyA 信号序列,构建了中间载体 pBluescriptSK-Bax α (pA⁻)。然后用两种不同的限制性内切酶从中间载体将 Bax α cDNA 切出,以单一方向与真核表达载体 pcDNA3 相连接,获得 pcDNA3-Bax α 重组质粒。与平端连接相比,这样可使非重组体的背景降低,以便于选择。重组的 Bax α 含有 -50 bp 的 5' 非翻译末端(5'-UTR), 575 bp 的开放读码框架(ORF)-编码 192 个氨基酸组成的蛋白质,以及 137 bp 的 3' 非翻译末端(3'-UTR)。蛋氨酸翻译起始区序列含有 Kozak 共有序列^[9]。因此该重组质粒可以用来将 Bax α 基因转入到哺乳动物细胞,并利用其强启动子高水平表达 Bax α 基因,为研究其功能提供了一个重要的途径。Bax 在其 COOH 末端含有单一的跨膜结构域,在没有死亡信号的情况下 Bax 存在于细胞浆或结合于胞内膜系结构周围。只有在细胞受到刺激后,

Bax 利用其跨膜结构域插入到线粒体外膜^[10]。Bax 在线粒体膜上形成的通道可以导致离子及小分子物质的被动内流,造成其膜电位发生变化,细胞色素 C 释放,从而促进细胞凋亡过程的发生^[11,12]。用 Lipofectamine 法将 pcDNA3-Bax α 转入 PC12 细胞, G418 选择抗性细胞克隆。Western 印迹法显示 Bax α 蛋白有高水平的表达。用单胺能神经毒 6-羟基多巴胺(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导 Bax α 高表达 PC12 细胞凋亡。与亲代 PC12 细胞相比, Bax α 高表达 PC12 细胞凋亡比例显著升高,与 Oltvai 等^[1]的结果相一致,表明 Bax 促进细胞凋亡发生。研究表明, PC12 细胞经 6-羟基多巴胺作用 6 h 后, Bax 蛋白水平开始升高; 24 h 时细胞开始出现凋亡形态及相应的生化改变^[13]。显然 Bax 在 6-OHDA 引起的凋亡过程中起重要作用, (-) 黄皮酰胺可以显著降低凋亡细胞的比例,提高降低的线粒体膜电位水平,提高的线粒体膜电位水平为其抗凋亡的机制之一。但 (-) 黄皮酰胺抗凋亡作用机制是复杂的, (-) 黄皮酰胺可能作用于 Bax 介导的凋亡过程。不能够排除 (-) 黄皮酰胺对 Bax 通道有直接的阻滞作用。因此 (-) 黄皮酰胺的生化药理机制值得进一步探讨,对 Bax 通道体外作用模型的研究可以进一步确定其作用的确切机制。

参 考 文 献 :

- [1] Oltvai Z, Millman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vitro* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, **74**: 609.
- [2] Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor P53 is a direct transcription factor of the human bax gene [J]. *Cell*, 1995, **80**: 293.
- [3] Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, *et al.* Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax and c-Fos colocalize with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Mol Brain Res*, 1996, **40**: 254.
- [4] Antonsson B, Conti F, Ciavatta AM, *et al.* Inhibition of BAX channel forming activity by Bcl-2 [J]. *Science*, 1997, **277**: 370.
- [5] Liu SL, Zhang JT. Effects of naloxone on κ -clausenamide-induced long-term potentiation in dentate gyrus of anesthetized rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, **20**: 112.
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Darzynkiewicz Z, Bino SBG, Gorczyca W. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [J]. *Cytometry*, 1992, **13**: 795.
- [8] Darzynkiewicz Z, Staiano-Coico L, Melamed MR. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, **78**: 1383.
- [9] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequence from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**: 8125.
- [10] Goping IS, Gross A, Lavoie JN, *et al.* Regulated targeting of BAX to mitochondria [J]. *J Cell Biol*, 1998, **143**: 207.
- [11] Narita M, Shimizu S, Ito T, *et al.* Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome C release in isolated mitochondria [J]. *Biochemistry*, 1998, **95**: 14681.
- [12] Machetti P, Castedo M, Susin SA, *et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis [J]. *J Exp Med*, 1996, **184**: 1155.
- [13] Blum D, Wu Y, Nissou MF, *et al.* p53 and bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Brain Res*, 1997, **751**: 139.

CONSTRUCTION OF BAX α HIGH EXPRESSING PC-12 CELL LINE AND THE MECHANISMS OF (-) CLAUSENAMIDE IN INHIBITING APOPTOSIS

WANG Ruir Sheng, ZHANG Jur-Tian

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: AIM PC12 cells with high expression of Bax α were used to study the antiapoptotic effects of (-)clausenamide. **METHODS** The Bax α cDNA was first subcloned from pBluescript SK to eukaryotic vector pcDNA3. The pcDNA3-Bax α was transformed into PC12 cells. PC12 cells with high expression of Bax α were subjected to neurotoxin 6-hydroxydopamine 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to induce apoptosis. **RESULTS** The Bax α expressing PC-12 cells has a higher apoptosis percentage compared with the vector transfected controls (49.96% vs 32.9%). (-) Clausenamide (0.1 ~ 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was shown to significantly decrease the apoptotic cells measured by flowcytometry method. (-) Clausenamide (0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) also improved the compromised mitochondrial membrane potential. **CONCLUSION** These findings suggest that (-) clausenamide may save the cells from apoptosis and provide a clue to the therapy of neurodegenerative diseases.

KEY WORDS: apoptosis; gene transformation; recombinant DNA; genetic vectors; bax gene; clausenamide