

肝癌细胞自噬性凋亡过程中 caspase-3 基因的克隆与鉴定

彭心昭¹, 陈英², 朴英杰²

Cloning and Identification of Caspase-3 Gene from HepG2 Cells that Underwent Autophagic Apoptosis

PENG Xin-zhao¹, CHEN Ying², PIAO Ying-jie²

1. Department of Oncology, No. 421 Hospital of PLA, Guangzhou 510318, China; 2. Central Laboratory, Southern Medical University

Abstract :Objective To acquire the fragment of caspase-3 gene from HepG2 cells, a human hepatocarcinoma cell line, that underwent autophagic apoptosis induced by vincristine (VCR). **Methods** Total RNA was extracted from the HepG2 cell line, then the fragment of caspase-3 gene from the cells was amplified by RT-PCR and it was cloned, sequenced by gene recombination techniques for confirmation. **Results** The prospective sequence of selected cloned caspase-3 gene was 625 bp. It is consistent with that of reported human caspase-3 gene sequence. **Conclusions** It was proved that the fragment of caspase-3 gene is involved in autophagic apoptosis induced by VCR on HepG2 cells.

Key words: HepG2 hepatoma cell; Autophagocytosis; Apoptosis; Vincristine; caspase-3 gene

摘要:目的 从长春新碱诱导发生自噬性凋亡的肝癌细胞系 HepG2 中克隆 caspase-3 基因。方法 提取细胞总 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增目的片段, 构建重组克隆载体, 测序鉴定及分析。结果 经 RT-PCR 获得了预期的扩增产物即 caspase-3 基因 625bp 的核苷酸片段, 其测序结果与文献报道一致。结论 初步证明该 caspase-3 基因片段参与了长春新碱诱导的 HepG2 细胞自噬性凋亡过程。

关键词: HepG2 肝癌细胞系; 自吞噬作用; 细胞凋亡; 长春新碱; caspase-3 基因

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2006)05-0349-03

0 引言

细胞自噬 (autophagy) 与细胞凋亡 (apoptosis) 的调控机制有关, 除了凋亡以外, 自噬也可能是一种肿瘤抑制机制^[1]。有着明显自噬特征的细胞凋亡称为“自噬性凋亡” (autophagic apoptosis)^[2-4]。现认为 caspase 蛋白酶家族中的 caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡的关键蛋白酶^[5]。本研究采用抗肿瘤药长春新碱 (vincristine, VCR) 诱导人肝癌细胞系 HepG2 自噬性凋亡, 在此凋亡模型^[4]基础上, 试图从发生自噬性凋亡的细胞中克隆并鉴定 caspase-3 基因, 以研究长春新碱诱导的自噬性凋亡是否也与 caspase-3 有关。

1 材料和方法

1.1 细胞及培养

人肝癌细胞系 HepG2 细胞 (购自上海中科院

细胞所) 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 (Gibco BRL) 常规培养。

1.2 细胞分组与加药处理

细胞分 3 组: 未加药对照组 (药物为零剂量)、VCR (sigma) 作用 4h 组、VCR 作用 16h 组。VCR 组的药物处理基本同文献^[5]之自噬性凋亡细胞模型制作, 即于培养细胞中加入 $1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 VCR 进行诱导。各组分别于药物作用 4h、16h 后收获细胞继续以下实验。

1.3 RNA 分离

以 TRIzol Reagent RNA 分离液 (GIBCO BRL) 提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定浓度后, 将 RNA 样品作电泳质量分析后备用。

1.4 caspase-3 基因 PCR 引物的设计及合成

从“GeneBank”中查得的 caspase-3 基因 cDNA 序列^[6], 应用引物设计软件“Oligo DNA/ RNA Primer Analysis Software”设计一对 caspase-3 基因 PCR 引物为: 上游: 5' ATCATA CATGGAA GCGAATC 3'; 下游: 5' TGTCGGCATACTGTTTCA 3', 理论上计算出其间长度为 625bp。引物由上海生工公司合成。

1.5 cDNA 合成及引物扩增 cDNA

收稿日期: 2005-05-10; 修回日期: 2005-07-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870382)

作者单位: 1. 510318 广州, 解放军 421 中心医院中西医结合肿瘤科; 2. 南方医科大学中心实验室

作者简介: 彭心昭 (1958 -), 男, 博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床、肿瘤细胞自噬及凋亡研究

用 Gibco BRL THERMOSCRIPT RT-PCR System 逆转录提取的 RNA 成 cDNA; 以之为模板行 PCR, PCR 循环参数为 94 , 4 min 94 , 1 min; 52 , 1min; 72 , 3min; 共 40 个循环后 72 , 5min。运用 GAPDH 作为内对照以半定量估计 caspase-3 mRNA 在总 RNA 中的水平。

1.6 PCR 反应产物电泳分析

以 X174-Hinc digest DNA Marker 为分子量参照, 电泳 2h 后溴乙锭染色, 紫外透射仪上观察照相。

1.7 序列分析

回收 RT-PCR 产物, 与 p GEM-T vector 质粒重组, 抽提质粒, 以重组质粒 DNA 为模板, 3700-Big-dye-Terminator 测序系统用 M13 正反向引物从两端行目的片段序列测定。经计算机 DNASIS 软件和 BLAST 软件根据 GeneBank 资料对目的 DNA 测序结果进行分析及基因同源性比较。

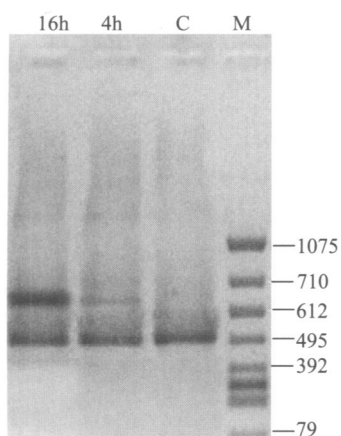
2 结果

2.1 总 RNA 电泳

从细胞中提取的总 RNA 经电泳鉴定可见清晰的 18s、28s 两条带。

2.2 PCR 扩增产物电泳

取 PCR 扩增产物电泳, 结果可见两条清晰的扩增条带, 一条为 496bp 的 GAPDH 内对照扩增产物带; 另一条为目的基因扩增片段, 大小为 625bp, 其片段大小与我们设计的理论预计值相符, 未见非特异扩增带, 见图 1。



M: 分子量标准; C: 未加药对照组; 4h: VCR 4h 组; 16h: VCR 16h 组。GAPDH 分子量大小为 496bp

图 1 caspase-3 mRNA RT-PCR 扩增产物的电泳鉴定

2.3 PCR 扩增片段核苷酸序列测定结果

对扩增片段测序结果测出 625bp 核苷酸片段, 与设计的引物间核苷酸片段长度一致。

2.4 核苷酸序列同源性检索及比对

引物间核苷酸序列与 Genebank 报道的 caspase-3 序列 (检索号为 NM_004346) 同源性为 100%。用 Blast 软件行序列分析结果显示引物间核苷酸序列与报道的 CPP32 / Yama (caspase-3) cDNA 序列完全一致, 见图 2。

```

Query = (625 letters). Alignments: > gi|4757911|ref|NM_004346.1|
Homo sapiens caspase 3 ,apoptosis-related cysteine protease (CASP3) ,
mRNA.Length = 2635 .Score = 1189 bits (600) ,Expect = 0.0
Identities = 625/625 (100 %)

Query: 1  atacatggaagcgaatcaatggactctggaatatccctggacaacagttataaaatggat 60
|||||
Sbjct: 285  atacatggaagcgaatcaatggactctggaatatccctggacaacagttataaaatggat 344
Query: 61  tatcctgagatgggtttatgtataataataataagaattttcataaaagcactgga 120
|||||
Sbjct: 345  tatcctgagatgggtttatgtataataataataagaattttcataaaagcactgga 404
Query: 121  atgacatctcggtctggtacagatctcagtcagcaaacctcagggaaacatcagaaac 180
|||||
Sbjct: 405  atgacatctcggtctggtacagatctcagtcagcaaacctcagggaaacatcagaaac 464
Query: 181  ttgaaatagaagtacaggaataaaatgatcttacacgtgaagaaatgtggaatgatg 240
|||||
Sbjct: 465  ttgaaatagaagtacaggaataaaatgatcttacacgtgaagaaatgtggaatgatg 524
Query: 241  cgtgatgttctaaagaagatcacagcaaaaggagcagtttgtttgtgtctctgagc 300
|||||
Sbjct: 525  cgtgatgttctaaagaagatcacagcaaaaggagcagtttgtttgtgtctctgagc 584
Query: 301  catggtgaagaaggaataatttttggacaacatggacctgtgacctgaaaaaataaca 360
|||||
Sbjct: 585  catggtgaagaaggaataatttttggacaacatggacctgtgacctgaaaaaataaca 644
Query: 361  aacttttccagaggggactcgtttagaagttcaactgaaaacccaacttttcaattat 420
|||||
Sbjct: 645  aacttttccagaggggactcgtttagaagttcaactgaaaacccaacttttcaattat 704
Query: 421  caggcctgccgtggtacagaactggacttggcattgagacagacagtggtgtgatgat 480
|||||
Sbjct: 705  caggcctgccgtggtacagaactggacttggcattgagacagacagtggtgtgatgat 764
Query: 481  gacatggcgtgtcataaaataccagtgatgccacttcttctgtatgcatactccacaga 540
|||||
Sbjct: 765  gacatggcgtgtcataaaataccagtgatgccacttcttctgtatgcatactccacaga 824
Query: 541  cctggttattatcttggcgaatcaaaagatggctcctggttcacccagtcgcttgt 600
|||||
Sbjct: 825  cctggttattatcttggcgaatcaaaagatggctcctggttcacccagtcgcttgt 884
Query: 601  gccatgctgaaacagtatgccgaca625
|||||
Sbjct: 885  gccatgctgaaacagtatgccgaca909

```

图 2 引物间核苷酸序列与 caspase-3 序列的同源性检索比对

3 讨论

经过一系列研究, 作者认为“自噬性凋亡”是细胞凋亡的一种特殊类型, 自噬性凋亡有着明显的自噬特征^[2-4]。其他一些学者也对细胞凋亡作了类似的分类, 并认为自噬才是这类细胞凋亡的真正原因^[7]。

现普遍认为半胱天冬酶类 (caspases) 是凋亡信号传导的共同通路, 该蛋白酶家族成员之一的 caspase-3 在其中起着核心作用^[5]。为了阐明长春新碱诱导的自噬性凋亡是否也依赖于 caspases, 作者进行了上述实验, 在已建立的长春新碱诱导 Hep G2 细胞自噬性凋亡之细胞模型基础上, 试图从发生自噬性凋亡的细胞中克隆 caspase-3 基因。

长春新碱属于长春碱类抗肿瘤药, 据报道这类

药物可诱导细胞自噬的发生,也能诱导肿瘤细胞凋亡^[8,9]。Hep G2 细胞在 VCR 诱导之后先后出现两个阶段的变化:自噬阶段和凋亡阶段。自噬阶段发生于 VCR 作用的初期,并贯穿整个细胞变化过程;而凋亡阶段主要出现于 VCR 处理 8h 之后,在药物作用 16h 时凋亡细胞数量达到很高的程度^[4]。作者分别以 3 组不同的 Hep G2 细胞总 RNA 为模板,经 RT 后在 caspase-3 的特异引物引导下进行 PCR 扩增,625bp 的扩增产物其大小与设计的 caspase-3 基因片段相符,结果并显示 VCR 作用 4h 组、16h 组的细胞中均有 caspase-3 mRNA 的表达。并可看出,从 VCR 作用 4~16h 即从自噬到自噬性凋亡过程中,caspase-3 的 mRNA 表达呈增强趋势。本实验采用 GAPDH 作为内对照,三组样本均获得同样的 GAPDH 扩增产物带,说明用于 RT-PCR 的三组起始 RNA 的量基本相同,所获结果具有可比性。

将 PCR 扩增产物经测序及同源性比较分析后的结果表明,分离得到的基因片断与 Genebank 报道的 caspase-3 基因序列完全一致,提示作者从 VCR 诱导的自噬性凋亡 Hep G2 细胞中克隆的基因片断为 caspase-3 基因片断。虽然实验获得的只是 caspase-3 的一段序列,但该实验证明 caspase-3 参与了 VCR 诱导的 Hep G2 细胞自噬性凋亡。caspase-3 基因可能是该自噬性凋亡的枢纽元件。自噬和凋亡可能使用着某些共同的调节机制^[10],自噬的抑制可以影响长春新碱诱导的肝癌细胞自噬性凋亡^[4]。自噬也可能是一种肿瘤抑制机制,自噬及自噬性凋亡的调控可能均与肿瘤的调控机制有关。

参考文献:

- [1] Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23 (16): 2891-2906.
- [2] 朴英杰,胡雯,黄行许,等. 射线照射による淋巴球のAutophagic apoptosis について[J]. *电子显微镜*, 1997, 32 (2): 140-145.
- [3] 彭心昭,陈英,朴英杰,等. 自噬的抑制影响长春新碱诱导的肝癌细胞自噬性凋亡[J]. *肿瘤*, 2004, 24 (1): 32-35.
- [4] 彭心昭,陈英,朴英杰,等. 长春新碱诱导的自噬性凋亡对线粒体膜电位的影响[J]. *中国医学物理学杂志*, 2001, 18 (1): 37-39.
- [5] Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15 (6): 725-731.
- [6] Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, et al. Yama/ CPP32 beta a mammalian homolog of CED-3, is a crmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase [J]. *Cell*, 1995, 81 (5): 801-809.
- [7] Yue Z, Horton A, Bravin M, et al. A novel protein complex linking the 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice [J]. *Neuron*, 2002, 35 (5): 921-933.
- [8] Groninger E, de Graaf SS, Meeuwseer-de Boer GJ, et al. Vincristine-induced apoptosis in vivo in peripheral blood mononuclear cells of children with acute lymphoblastic leukaemia (ALL) [J]. *Br J Haematol*, 2000, 111 (3): 875-878.
- [9] 郭德玉,卞修武,辛容,等. 5-氟尿嘧啶、长春新碱与去甲二氢愈创木酸配伍对人恶性胶质瘤细胞株的作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2002, 29 (1): 50-52.
- [10] Camougrand N, Grelaud-Coq A, Marza E, et al. The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47 (2): 495-506.

[编辑:周永红]