

依地福新诱导重组 Fas基因酵母的凋亡

张辉^a, 喻莉萍^b, 王彬^a, 李林珍^a, 李强国^a, 罗桐秀^a (湘南学院, a. 化学与生命科学系药理学教研室, b. 图书馆, 湖南 郴州 423000)

摘要:目的 将人 Fas基因转染至野生型粟酒裂殖酵母细胞中,并观察依地福新对重组酵母的促凋亡作用。方法 抽提 Jurkat 细胞的 RNA; RT-PCR 制备 Jurkat 细胞的 cDNA; PCR 扩增人 Fas 基因;将人 Fas 基因克隆到 pREP3X-HA 质粒中构建 pREP3X-HA-Fas 穿梭载体,电转化穿梭载体到野生型粟酒裂殖酵母细胞中;应用 Western blotting 鉴定蛋白表达产物;应用依地福新诱导重组酵母产生凋亡应答。结果 在 33 个酵母转化单菌落中,筛选到一个有表达活性的 pREP3X-HA-Fas 重组子,且依地福新能诱导此重组子的凋亡。结论 成功构建 pREP3X-HA-Fas 穿梭载体并转入到相应的野生型粟酒裂殖酵母细胞中,且转化子具有表达活性。依地福新可能通过 Fas 诱导酵母细胞凋亡。

关键词:依地福新;粟酒裂殖酵母;Fas;基因表达

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)05-0373-04

Apoptosis Induced by Edelfosine in *S. pombe* Which Cloned Fas Gene

ZHANG Hui^a, YU Li-ping^b, WANG Bin^a, LI Qiang-guo^a, LUO Tong-xiu^a (a. Department of Chemistry and Life Science, b. Library, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To obtain the human Fas gene and express in wild-type *S. pombe*, and observe the apoptosis induced by edelfosine in recombination yeast. **METHODS** Total RNA of Jurkat cells was extracted by TRIZOL reagent. First-strand cDNA of Jurkat cells was synthesized by RT-PCR. The Fas genes were amplified by PCR and cloned into plasmid and formed a relevant shuttle carrier. The pREP3X-HA-Fas shuttle carriers were transformed into wild-type *S. pombe* by Electroporation. The active recombination was identified by Western blotting and the apoptosis induced by edelfosine was observed. **RESULTS** An active recombination of pREP3X-HA-Fas was identified from 33 single clones of transformed *S. pombe*. Edelfosine induced apoptosis in transformed *S. pombe*. **CONCLUSION** The pREP3X-HA-Fas shuttle carriers have successfully been transformed into wild-type *S. pombe*; and the recombination of pREP3X-HA-Fas possess an expressed activity. Edelfosine could induce apoptosis by Fas in *S. pombe*.

KEY WORDS: edelfosine; *S. pombe*; Fas; gene express

Fas 是近年来研究得最为深入的有关细胞凋亡的膜表面分子,阐明它们在凋亡中的作用机制,对深入了解细胞凋亡的机制有重要的意义。酵母作为一种容易进行操作的生物模型,广泛应用于异基因表达和结构与功能的研究中^[1]。尽管酵母细胞可能缺乏某些与高等生物相似的凋亡调节因子的同功异构体,但在某些生理情况下(如突变体、乙酸处理等)或在异源表达哺乳动物促凋亡基因时,可观察到细胞的凋亡^[2]。大量的证据显示,多细胞生物和其他真核细胞生物细胞死亡过程具有共同的起源。从酵母细胞到哺乳动物细胞,基本的、关键的凋亡调节因子是保守的。

依地福新是目前所发现的第一个通过激活细胞内 Fas/CD95 死亡受体而起作用的抗癌药物。因此,在粟酒裂殖酵母中表达 Fas 并观察其对酵母存活的影响,将有助于进一步了解抗肿瘤酯类药物——依地福新对不同凋亡通路之间的相互作用关系,从而阐明该药诱导凋亡过程中的未知的许多下游事件。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DH5 α ; 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*) 菌株 *leu⁻ um⁻ h⁺*; 表达质粒 pREP3X-HA (HA, haemagglutinin, 血细胞凝集素); Jurkat 细胞均由西班牙萨拉曼卡大学的 Faustino Mollinedo 教授赠送。pREP3X-HA 质粒含 nmII 启动子、HA 和 his3 基因, nmII 启动子可以通过硫酸素调节表达, HA 基因编码血细胞凝集素抗原决定簇。

1.2 酶和试剂

限制性内切酶为 MBI 产品; Taq 酶, dNTPs, DNA marker, 5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷 (5-brom- α -4-chloro-3'-indolyl- β -D-galactoside, X-gal), 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside, IPTG), 胶回收试剂盒 (SK1131) 和 PCR 引物均为上海生工生物工程有限公司产品; 连接酶和 DeadEndTM Fluorometric TUNEL System 试剂盒购自于 Promega 公司; 抗 HA 抗原决定簇抗体、抗 Fas 抗体、羊抗鼠 HRP 抗体、羊抗兔 HRP 抗体均为 Pierce 公司产品; 其他试剂均为市售分析纯。

1.3 Fas 基因的合成与克隆

1.3.1 Jurkat 细胞 Fas 基因的合成 应用酚氯仿抽提

作者简介: 张辉, 男, 博士, 副教授 Tel: (0735) 2980615 E-mail: zhgho@163.com

法^[3],制备 Jukat细胞 RNA,然后应用 RT-PCR 合成其 cDNA^[4],以该 cDNA 为模板经 PCR 合成 Fas 基因。合成引物:前向引物为 5'-TAGTCGACATGCTGGGCATCTGGACCTCCT-3',反向引物为 5'-TAGCGGCCGCTAGACCAAGCTTTG-GATTTCATT TC-3'。PCR 反应体系 (25 μ L):引物 1 μ mol $\cdot$ L⁻¹,dNTPs 50 μ mol $\cdot$ L⁻¹,MgCl₂ 1 μ mol $\cdot$ L⁻¹,Taq 酶 1 U,PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 30 s 60 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 90 s 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 15 min。

1.3.2 Fas 基因的克隆和鉴定 4% 琼脂糖电泳 PCR 产物,回收目的条带,按照 SK1131 胶回收试剂盒说明书回收目的片段,与 T 载体连接过夜,转化 DH5 α 感受态细胞,涂布在带有 X-gal 和 IPTG 的氨苄平板上,挑选白斑克隆,提取质粒后,分别用 SalI 和 NotI 单酶切验证为阳性克隆后,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 pREP3X 重组质粒载体的构建和鉴定

pREP3X-HA 质粒为含有血细胞凝集素抗原决定簇的蛋白表达质粒,HA 抗原决定簇的核苷酸序列为 (5'-CTC-GAGATGTATCCTTATGACGTGCTGACTATGCCAGCCTGGGAGGACCGTCGACAACTAGTAGCGGCCGAGGATCC),在此序列中含有 SalI SpeI 和 NotI 限制性酶切位点。HA 基因克隆到 pREP3X 质粒的 XhoI/BamHI 限制性酶切位点。Fas 基因克隆到 HA 基因的 SalI/NotI 限制性酶切位点。pREP3X-HA 质粒与 Fas 基因克隆和转染参考本实验室以前的方法^[5]。重组质粒命名为 pREP3X-HA-Fas。

1.5 裂殖酵母的转化和鉴定

1.5.1 酵母的转化 参考 Suga 等^[6]的方法进行电转化。转化条件为:1.5 kV,132 Ω ,40 μ F。电转化完成后立即将转化了的细胞接种到含有 SC 选择培养基的培养皿中。将接种后的细胞置于 32 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3~4 d 后,平板上长出转化子。

1.5.2 转化子的鉴定 转化平板上挑取单菌落,接种于 EMM 基本培养基培养至 A₅₉₅ 1.0 左右,取菌液 1.5 mL,离心 (3 000 $\times$ g) 收集细胞,重悬于 STET 100 μ L,短暂振荡后热水浴加热 3 min 冰上降温数秒,离心,上清转移,加入醋酸铵 (7.5 mol $\cdot$ L⁻¹) 50 μ L, -20 $^{\circ}$ C 存放 1 h 后离心;上清转移,加入 2 倍体积乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤,加水溶解。10 μ L 提取的 DNA 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,过夜培养后,挑取单菌落,液体培养,提取质粒,电泳,与 pREP3X-HA-Fas 比较大小。

1.6 蛋白表达产物的鉴定

将未转化的酵母、pREP3X-HA 质粒转化的酵母和 pREP3X-HA-Fas 重组质粒转化的酵母在 EMM 培养基中于 32 $^{\circ}$ C 培养。参考 HOU 等^[7]的方法,分别提取各组转化酵母细胞蛋白后,取 30 μ g 蛋白进行 SDS 凝胶电泳将蛋白进行分离后,将其转移至硝化纤维上,用抗 HA 抗原决定簇抗体或抗 Fas 抗体作为一抗,应用羊抗鼠 HRP 或羊抗兔 HRP 作为二抗,按试剂盒说明进行操作,染色蛋白条带,并进行拍照。

1.7 表达产物活性的鉴定

将酵母细胞分为三组 (野生型酵母对照组,重组酵母对照组和重组酵母处理组),处理组细胞生长于含有 2% 的半乳糖的 MM 液体培养基中,并加入 20 μ mol $\cdot$ L⁻¹ 的依地福新处理 6 h 以诱导粟酒裂殖酵母产生凋亡应答^[5]。而对照组则未用依地福新处理。处理结束后,对细胞分别进行 TUNEL 试验和 PI 染色法流式细胞术检测。

1.7.1 TUNEL 试验 依照 DeadEndTM Fluorometric TUNEL System 试剂盒的说明进行,主要步骤如下:将 2 $\times$ 10⁶ 个细胞重悬于 100 μ L 的 PBS 液中,混匀后,涂布于多聚赖氨酸玻片上,37 $^{\circ}$ C 干燥 10 min,4% 甲醛固定 25 min,0.2% TritonX-100 处理 5 min。加 100 μ L Equilibration Buffer 于室温下孵育 5 min,加入 50 μ L rdt incubation buffer (45 μ L Equilibration Buffer 5 μ L Nucleotide Mix 1 μ L rdt Enzyme),37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后加入 2 $\times$ SSC 溶液,孵育 15 min, PBS 洗涤 3 次,将细胞置于含有 1 μ g $\cdot$ mL⁻¹ propidium iodide 的 PBS 溶液中孵育 15 min 盖上盖玻片。立即在荧光显微镜下计数两组细胞的正常细胞数、形成细胞膜泡的细胞数、细胞核碎裂和细胞核溶解的细胞数量。

1.7.2 PI 染色法流式细胞术检测 取 2 $\times$ 10⁶ 个细胞,加入 80% 冷乙醇,4 $^{\circ}$ C 固定 30 min, PBS 洗 1 次,将细胞重悬于含 0.2 mg $\cdot$ mL⁻¹ RNase A 的 0.5 mL 枸橼酸钠 (浓度为 50 mmol $\cdot$ L⁻¹) 溶液中,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,11 000 $\times$ g 离心 5 min,弃去上清后重悬于 0.5 mL 含有 5 mg $\cdot$ mL⁻¹ 胃蛋白酶的盐酸 (浓度 50 mmol $\cdot$ L⁻¹) 中,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。11 000 $\times$ g 离心 5 min 弃去上清。细胞重悬于含有 4 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 碘化丙啶的 1 mL 柠檬酸钠 (浓度为 50 mmol $\cdot$ L⁻¹) 溶液中。应用超声波振荡器振荡 5 s 后立即进行流式细胞术的检测。

1.8 统计学分析

计数资料组间差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Fas 基因的扩增

PCR 产物电泳后,大小为 1 007 bp 左右,连接到 T 载体上,经上海生工生物工程有限公司测序,序列正确。见图 1。

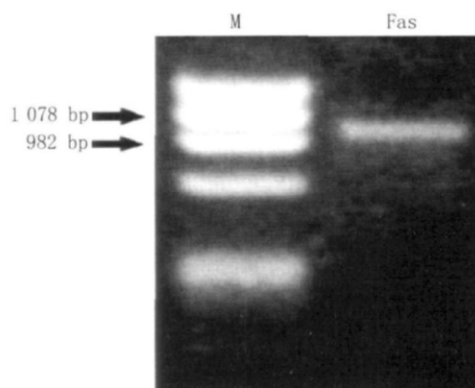


图 1 Fas PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

M - 标记; Fas - Fas 基因

Fig 1 Profile of Fas PCR in agarose gel electrophoresis

M - Marker Fas - Fas gene

2.2 穿梭载体的构建

连接产物的转化菌,提取质粒经 *Sa*II和 *Not*I酶的单酶切和双酶切,同时以 pREP3X-HA为对照,酶切产物进行琼脂糖电泳,电泳结果见图 1,电泳结果显示,双酶切片断长度约为 1 007 bp左右,大小与 *Fas*基因相当,说明 *Fas*基因已被克隆至该位点,见图 2。酶切验证阳性的重组质粒,经上海博亚测序,序列正确。

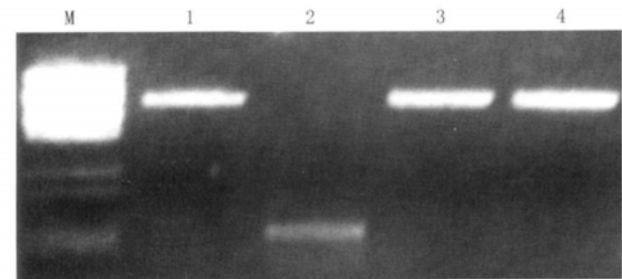


图 2 pREP3X-HA-Fas穿梭载体和 pREP3X-HA质粒的限制性酶切图谱

M-标记; 1-pREP3X-HA-Fas质粒; 2-pREP3X-HA-Fas经 *Sa*II和 *Not*I双酶切质粒; 3-pREP3X-HA-Fas经 *Sa*II单酶切质粒; 4-pREP3X-HA-Fas经 *Not*I单酶切质粒

Fig 2 Profile of pREP3X-HA-Fas plasm id and pREP3X-HA plasm id digested by restriction enzyme
M-Marker; 1-pREP3X-HA-Fas plasm id; 2-pREP3X-HA-Fas plasm id digested by *Sa*II and *Not*I; 3-pREP3X-HA-Fas plasm id digested by *Sa*II; 4-pREP3X-HA-Fas plasm id by *Not*I

2.3 酵母转化子的鉴定

从酵母转化子提取的质粒,转化大肠杆菌扩增后,与 pREP3X-HA-Fas同时进行电泳试验,比较质粒大小。电泳结果见图 3,表明酵母质粒与重组质粒大小一致。

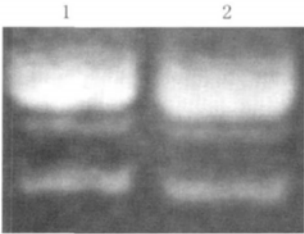


图 3 酵母穿梭质粒和 DH5α细菌质粒电泳图谱
1-酵母穿梭质粒; 2-DH5α细菌质粒

Fig 3 Electrophoresis profile of yeast shuttle plasm id and DH5α plasm id

1-yeast pREP3X-HA-Fas plasm id; 2-DH5α pREP3X-HA- Fas plasm id

2.4 蛋白表达产物的鉴定

在表达产物鉴定试验中可以看出,在未转化的酵母细胞中,未检测到 HA和 *Fas*的表达;在转化了 pREP3X-HA质粒的酵母细胞中,检测到了 HA的表达,但未检测到 *Fas*的表达;在转化了 pREP3X-HA-Fas重组质粒的酵母细胞中,既检测到 HA的表达,也检测到了 *Fas*的表达。试验说明外源基因得到了表达,见图 4,图 5。最终,本研究在 33 个酵母转化单菌落中,筛选到一个有表达活性的重组子。

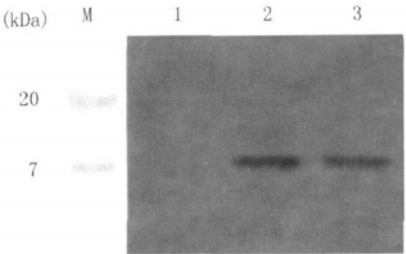


图 4 粟酒裂殖酵母细胞蛋白表达产物 HA表达图谱
M-标记; 1-*S. pombe*野生型; 2-*S. pombe*经 HA基因转化型; 3-*S. pombe*经 HA基因和 *Fas*基因转化型

Fig 4 Expressed profile of HA p rotein in *S. pombe*
M-Marker; 1-*S. pombe* wild-type; 2-*S. pombe* transferred with HA gene; 3-*S. pombe* transferred with HA gene and *Fas* gene

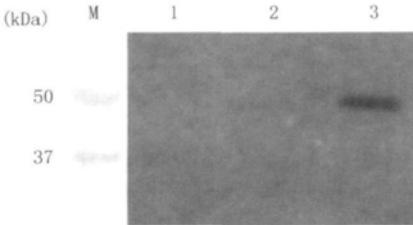


图 5 粟酒裂殖酵母细胞蛋白表达产物 Fas表达图谱
M-标记; 1-*S. pombe*野生型; 2-*S. pombe*经 HA基因转化型; 3-*S. pombe*经 HA基因和 *Fas*基因转化型

Fig 5 Expressed profile of Fas p rotein in *S. pombe*
M - Marker; 1 - *S. pombe* wild-type; 2 - *S. pombe* transferred with HA gene; 3 - *S. pombe* transferred with HA gene and *Fas* gene

2.5 表达产物活性的鉴定 凋亡细胞显微计数与流式细胞术计数

凋亡细胞显微计数结果见表 1。重组酵母对照组正常细胞占计数细胞总数的 90.65%,发生了细胞膜泡形成、细胞核碎裂和细胞核溶解的细胞各占计数细胞总数的 2.80%, 3.74%和 2.80%;重组酵母处理组细胞正常细胞占计数细胞总数的 37.14%,而发生了细胞膜泡形成、细胞核碎裂和细胞核溶解的细胞各占计数细胞总数的 26.67%, 22.86%和 13.33%。两组经 χ^2 检验,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。PI法流式细胞术凋亡检出率,重组酵母对照组分别为 1.24%,重组酵母处理组为 50.17%。两者之间差异也有统计学意义 ($P < 0.01$)。野生型酵母对照组 TUNEL法显微计数凋亡率为 9.82%,PI法检出率为 1.32%,与重组酵母对照组比较,差异无统计学意义。

表 1 PTE-ET-18-OCH₃处理细胞 6 h后细胞凋亡计数

Tab 1 Numbers of apoptosis cells treated with PTE-ET-18-OCH₃ for 6 h

组别	<i>n</i>	正常细胞数	细胞膜泡形成	细胞核碎裂	细胞核溶解
野生型酵母对照组	112	101	4	3	4
重组酵母对照组	107	97	3	4	3
重组酵母处理组	105	39	28	24	14

注:与对照组比较, $\chi^2 = 53.6, P < 0.01$

Note: Compared with control group, $\chi^2 = 53.6, P < 0.01$

3 讨论

凋亡是一种程序性细胞死亡,对生物体维持内环境的稳定和细胞生物的生存起重要的作用^[8]。机体在清除自反应免疫细胞、病毒感染细胞和不可修复的、有恶性转化危险的遗传损伤细胞时都会发生凋亡。凋亡是一个由许多调节物质和效应物质组成的复杂网络,它可被各种毒素或外来信号(如乙醇、活性氧、ROS、各种受体的配体等)各种细胞内活动(如有丝分裂缺陷、修复失败)所激活。几乎所有的凋亡过程在其最后阶段都具有独立的调节通路,凋亡具有典型的生物化学和形态学标志,这些标志包括 caspase 激活、膜气溶化、核 DNA 碎片形成和细胞皱缩^[8]。

依地福新能选择性的诱导肿瘤细胞的凋亡,Edelfosine 诱导的凋亡涉及 Fas/CD95 死亡受体、JNK、线粒体、活性氧、c-Jun 和 caspase-3^[9]。Fas/CD95 死亡受体(也称 APO-1)是肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族的主要成员,它通过质膜上的“死亡域”(DD)传导凋亡信号,用特异配体 FasL/CD95L 刺激 Fas/CD95 导致受体聚集,随后形成三聚体,通过其自身的 DD 与丛集的受体 DD 相互作用招募 FADD^[10]。酵母作为一种简单的生物模型体系,可能有助于阐明这种凋亡调节机制。

在本研究中 PI 法凋亡检出率重组酵母处理组为 50.17%,低于 TUNEL 法。其检出率低的主要原因可能是由于 TUNEL 法比较主观,且计数的细胞数只有 100 个左右,容易产生偏差。次要原因可能是由于 TUNEL 法无法很好地鉴定凋亡和坏死,因此可能导致假阳性的产生。比较两种方法的凋亡检出率,两者差别不大,说明 $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的依地福新处理 6 h 后,细胞以凋亡为主,坏死不严重。

目前,最常用的酵母表达系统是毕赤酵母的分泌表达系统,但是这个系统的缺陷在于信号肽不能完全切除,可能会影响目的蛋白,特别是相对分子质量较小的多肽的活性,故本实验选用了裂殖酵母的胞内表达系统。本研究在 33 个酵母转化单菌落中,只筛选到一个有表达活性的重组子。因

此,在裂殖酵母表达系统中,如何快速筛选目的重组子,是以后需要研究和解决的课题。Fas 基因在裂殖酵母中表达成功,不仅为今后进一步研究凋亡提供了一定的基础,而且可以用药物干预酵母,从而阐明药物诱导凋亡的途径。

REFERENCES

- [1] YUE Q, ZHOU H. Schizosaccharomyces Pombe-A Favourable Model Organism for Studying Eukaryote[J]. J Shaoguan Univ (Soc Sci) (韶关学院学报社会科学版), 2003, 26: 100-103.
- [2] MADEO F, FR HLICH E, FR HLICH K U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis[J]. J Cell Biol, 1997, 139: 729-734.
- [3] KONG W J, WANG Y, WANG Q, *et al.* Comparison of three methods for isolation of nucleic acids from membranate inner ear tissue of rats[J]. Chin Med J (Engl) (中华医学杂志英文版), 2006, 119: 986-990.
- [4] SELAM B, KAYISLI U A, AKBAS G E, *et al.* Regulation of FAS ligand expression by chemokine ligand 2 in human endometrial cells[J]. Biol Reprod, 2006, 75 (2): 203-209.
- [5] ZHANG H, YU L P, FANG F, *et al.* Study of the inhibition mechanism of edelfosine on cytokinesis in Schizosaccharomyces pombe[J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2007, 23 (3): 374-379.
- [6] SUGA M, HATAKEYAMA T. High efficiency transformation of Schizosaccharomyces pombe pretreated with thiol compounds by electroporation[J]. Yeast, 2001, 18: 1015-1021.
- [7] HOU J S, HUANG H Z, WANG J G, *et al.* Effect of fas gene transfection on tumorigenicity and proliferation of transplanted tumor of oral squamous cell carcinoma cell line tca8113[J]. West China J Stomatol (华西口腔医学杂志), 2004, 22 (3): 189-191.
- [8] HENGARTNER M O. The biochemistry of apoptosis[J]. Nature, 2000, 407: 770-776.
- [9] ANLIKER B, CHUN J. Cell surface receptors in lysophospholipid signaling[J]. Sem in Cell Dev Biol, 2004, 15: 457-465.
- [10] HUEBER A O, BERNARD A M, HERINCS Z, *et al.* An essential role for membrane rafts in the initiation of Fas/CD95-triggered cell death in mouse thymocytes[J]. EMBO Rep, 2002, 3: 190-196.

收稿日期: 2007-07-18