DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.020
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
54 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)01-0054-03

视黄酸依赖 Fas/RARα 融合蛋白表达及其定位研究

杨志祥,糜漫天,郎海滨,韦 娜,杨 剑 (第三军医大学预防医学系营养卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 检测视黄酸依赖 Fas/RARα 表达载体转染 MCF-7 细胞后融合蛋白表达及定位。方法 Fas/RARα 表达载体经脂质体转染MCF-7细胞,经报告基因的荧光显微镜观测、RT-PCR 和 SDS-PAGE 等方法检测视黄酸依赖融合蛋白的表达及其胞内定位。结果 以(0.1~1)×10^{-6} mol/L 视黄酸处理融合基因转染MCF-7 细胞后,融合蛋白表达呈视黄酸时间剂量依赖性增强,且该蛋白主要定位于转染细胞胞膜。结论 视黄酸依赖的融合蛋白表达主要定位在细胞膜上。

关键词:融合蛋白;视黄酸;MCF-7
中图法分类号:R392.11;R394.3;R737.9 文献标识码:A

Expression and location of fusion protein of Fas/RARα induced by ATRA

YANG Zhi-xiang, MI Man-tian, LANG Hai-bin, WEI Na, YANG Jian (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the expression and location of Fas/RARα fusion protein in MCF-7 cells transfected with the vector induced by all-trans retinoic acid (ATRA). Methods After transfection of fusion gene vector pRARE-Fas/RAR alpha and treatment of RA in tumor cells, the protein expression was detected with RT-PCR and fluorescence microscopy, and the cellular location of fusion protein was determined with SDS-PAGE. Results Expression of fusion protein increased in an RA-dependent manner after treatment with RA. The Fas/RAR alpha fusion protein was mainly located in cell membrane of the transfected cells. Conclusion Exogenous fusion protein induced by RA is located in cell membrane of the transfected MCF-7 cells.

Key words: fusion protein; retinoic acid; MCF-7

Fas 抗原是死亡受体超家族(包括 TRAIL、Fas、DR3、DR4、DR5 等)成员之一,在细胞凋亡信号的启动和传递过程中起重要作用。Fas 抗原可与 Fas 相关死亡结构域蛋白(fas-associated death domain protein, FADD)作用,引发 caspase 酶原的活化而促进凋亡效应[1]。针对 Fas 死亡区构建的融合基因表达载体中含有视黄酸(retinoic acid, RA)的顺式反应元件(retinoic acid response element, RARE)片段,外源性 RA 即可经 RARE 调控融合基因表达,从而达到肿瘤细胞凋亡效应可控的目的。RA 及其衍生物对多种肿瘤细胞有增殖抑制和诱导分化作用[2]。本研究以此载体转染乳腺癌 MCF-7 细胞后,经 RA 启动融合基因的表达,观测其 RA 依赖性表达变化及其在靶细胞内亚细胞定位情况。

1 材料与方法

1.1 pRARE-Fas/RARα 表达载体构建

常规 PCR 方法扩增 Fas 跨膜区和死亡区片段、RAR 配体结合区(ligand binding domain, LBD)片段及 eGFP 全长片段,并经酶切获得 RARE-tk 片段,依次将 RARE-tk、eGFP、Fas 和 RARα(LBD) cDNA 片段插入到 pCI-neo 工具载体质粒的多克隆位点(muHiple clonal site, MCS)中,即构建成带有 RARE-tk 的融合基因 Fas/RARα 表达载体(pRARE-Fas/RARα),并以相应酶切和 DNA 序列测定鉴定重组质粒。

1.2 脂质体方法转染肿瘤细胞

按 DOTAP 脂质体转染试剂盒说明书进行,以 400 μg/ml 浓度加入 G418 进行筛选,7 d 左右对照组细胞完全死亡,10 d 后,减低 G418 的浓度维持筛选 2 周。细胞扩增后冻存保种,转染有 pRARE-Fas/RARα 的 MCF-7 细胞命名为 MCF-7^{FP}。

1.3 细胞培养及分组

用含 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培养液培养 MCF-7 和 MCF-7^{FP}细胞,37 ℃,5% CO_2 常规培养传代。全反式视黄酸(ATRA)处理细胞终浓度选用 1×10^{-7}、5×10^{-7}、1×10^{-6} mol/L,标

基金项目:国家自然科学基金资助项目(37790321)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (37790321)
作者简介:杨志祥(1973—),男,河北省沙河市人,博士,讲师,主要从事视黄酸与血液肿瘤方面的研究,发表论文 8 篇。现在大坪医院野战外科研究所肿瘤科,电话:(023)68757449
通信作者:糜漫天,电话:(023)68752292
收稿日期:2002-09-04;修回日期:2003-01-26

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

识为 RA1、RA2、RA3 组, 分别处理细胞 1、2、3 d, 实验同时设未处理对照。

1.4　荧光显微镜检测 eGFP 即融合蛋白表达量变化

直接在光镜视野下以蓝色激发光激发观察绿色荧光阳性细胞比率以及荧光强度变化, 即可间接反映融合蛋白表达变化。

1.5　RT-PCR 检测融合基因 mRNA 表达变化

PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成:

eGFP FP1: 5′-GCGCCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG-3′

eGFP RP2: 5′-GCGCGAATTCGGGGGGACTTGTACAGCTCGTG-3′

β-actin FP1: 5′-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3′

β-actin RP2: 5′-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3′

常规行 RNA 提取、逆转录及 PCR 扩增, 扩增条件为: 取 0.5 ml PCR 管, 依次加入下列成分, 混匀后加 30 μl 石蜡油覆盖, 短时间离心, 置于 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 ℃ 1 min; 58 ℃ 1 min; 72 ℃ 1 min; 35 个循环。2% AGE 鉴定 RT-PCR 产物。

1.6　细胞胞膜和胞浆蛋白提取

参照文献[3] 制备细胞胞液和胞膜蛋白组分, 实验组各取 1 × 10^7 个细胞, 用冰冷的 PBS 洗 2 次, 加入 200 μl 蛋白提取缓冲液Ⅰ (25 mmol/ L Tris-HCl pH 7.5、2 mmol/ L EDTA、0.5 mmol/ L EGTA、1 mmol/ L DTT、0.2 g/ L Triton X-100、5 mg/ L 抑蛋白酶肽、5 mg/ L 亮抑蛋白酶肽、1 mmol/ L PMSF), 混匀, 冰上放置 30 min, 100 000× g 离心 30 min, 所得上清即为胞浆蛋白组分; 离心所得沉淀以蛋白提取缓冲液Ⅱ(25 mmol/ L Tris-HCl pH 7.5、2 mmol/ L EDTA、0.5 mmol/ L EGTA、1 mmol/ L DTT、10 g/ L Triton X-100、5 mg/ L 抑蛋白酶肽、5 mg/ L 亮抑蛋白酶肽、1 mmol/ L PMSF)进一步提取, 冰上 30 min, 100 000× g 离心 30 min, 所得上清即为胞膜蛋白组分。各蛋白组分以 20 μl/ 管分装, -20 ℃保存备用。

1.7　SDS-PAGE 分析融合蛋白的胞内定位

1.7.1　上样与电泳　　分别取各组不同组分蛋白 20 μl, 加 20 μl 2× SDS 凝胶加样缓冲液, 混匀后置 100 ℃沸水中煮沸 5~10 min, 短暂离心, 行 10% 聚丙烯酰胺电泳。

1.7.2　考马斯亮蓝 G250 凝胶染色　　染液配制: 1 ml 1 mol/ L HCl、15 ml 1 g/ L 考马斯亮蓝 G250, 加水至 1 000 ml 即可。染色步骤: 电泳完毕后, SDS-PAGE 凝胶置 5 mmol/ L HCl 中室温振荡 2 h, 凝胶置染液中, 室温振荡染色 2~16 h, 弃染色液, 以 1 mmol/ L HCl 漂洗脱色 2~4 h, 期间可换液 3~5 次, 于 1 mmol/ L HCl 中 4 ℃保存放置。

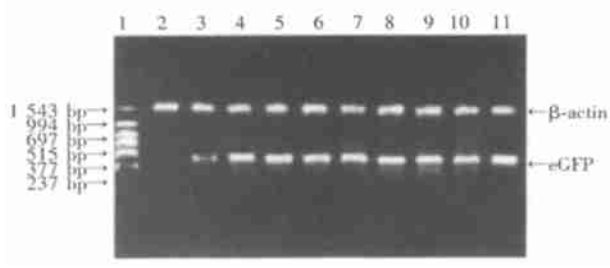
2　结果

2.1　融合基因 Fas/ RARα mRNA 的 RA 依赖性表达

采用 RT-PCR 方法检测 MCF-7FP 细胞各时相点融合基因表达变化, 显示随 RA 剂量增大和处理时间的延长, eGFP 表达(即融合基因)呈增加趋势, 且 1× 10^{-7} mol/ L RA 剂量组即可出现融合基因强阳性表达(图 1), 提示较小剂量 RA 在该模型中即可发挥诱导靶基因表达作用。

2.2　视黄酸对融合基因中绿色荧光蛋白表达的影响

直接在光镜视野下以蓝色激发光激发报告基因绿色荧光, 结果显示融合载体转染的 MCF-7 细胞中, 绿色荧光阳性细胞比率随 RA 处理时间延长而增多, 荧光强度同时呈现 RA 剂量时间依赖性增强, 且 1× 10^{-7} mol/ L RA 剂量组即可诱导较强的荧光表达(图 2)。



1: PCR marker; 2: $MCF7^{FP}$; 3: 1× 10^7 mol/ L RA 1 d; 4: 1× 10^{-7} mol/ L RA 2 d; 5: 1× 10^{-7}mol/ L RA 3 d; 6: 5× 10^{-7} mol/ L RA 1 d; 7: 5× 10^{-7} mol/ L RA 2 d; 8: 5× 10^{-7}mol/ L RA 3 d; 9: 1× 10^6mol/ L RA 1 d; 10: 1× 10^6 mol/ L RA 2 d; 11: 1× 10^6 mol/ L RA 3 d

图 1　**RA 对 pRARE-Fas/ RARα 转染 MCF-7 细胞融合基因中 eGFP mRNA 表达影响**

Fig 1　Effect of RA on the expression of eGFP mRNA of fusion gene in MCF-7 cells transfected with pRARE-Fas/ RARα



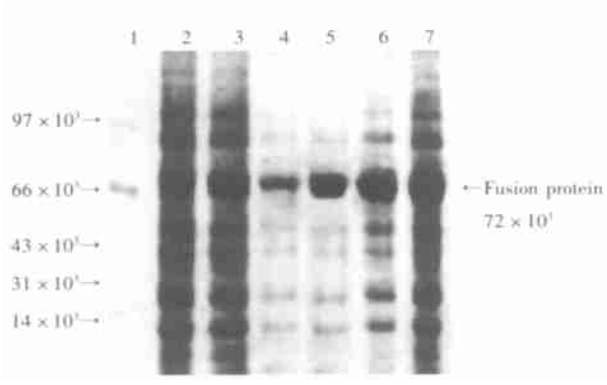
图 2　**1× 10^{-7} mol/ L ATRA 处理 MCF-7FP 细胞 3 d 荧光显微镜检测融合基因表达**

Fig 2　Expression of fusion gene in MCF-7FP treated with 1× 10^{-7} mol/ L ATRA at 3 d by fluorescence microscopy

2.3　转染细胞融合蛋白的胞内定位检测

图 3 显示, 提取细胞各组分(胞浆和胞膜)蛋白进行 SDS-PAGE 分析表明, MCF-7 转染细胞胞膜组分中融合蛋白(经氨基酸构成推测约 72× 10^3 大小)含量明显高于胞浆组分, 且随 RA 处理时间延长而表达增高, 未转染细胞中未见融合蛋白表达, 提示融合蛋白表达后主要定位于转染细胞的胞膜上。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



1: Protein marker; 2: MCF7 total protein; 3: MCF7/FP total protein; 4: Plasma protein; 5: Membrane protein/ RA1 1 d; 6: Membrane protein/ RA1 2 d; 7: Membrane protein/ RA1 3 d

图 3 pRARE-Fas/ RARα 转染 MCF-7 细胞融合基因表达产物定位分析

Fig 3 Location analysis of fusion protein in MCF-7 by SDS-PAGE

3 讨论

本研究采用脂质体转染方式介导融合载体入 MCF-7 细胞，转染后数天即可由荧光显微镜直接观测到报告基因的表达，经 G418 筛选维持培养，一般两周后大多细胞裂解成细胞碎片，仅见较少阳性细胞克隆，提示转染成功。本实验使用的融合基因母本载体 pCI-neo 为高拷贝的真核表达质粒[4]，其内含多克隆位点，是一段特殊设计的具有多种不同限制性核酸内切酶单识别位点的 DNA 短序列[5]，可以使两种不同粘性末端的外源性 DNA 无须借助其它操作而直接克隆到 pCI-neo 质粒载体上，构建融合蛋白的各片段 DNA 均经精心设计合成，以不同粘性末端方式插入 MCS，保证了其顺利表达和各自功能发挥。载体构建时插入了报告基因增强型绿色荧光蛋白(eGFP)，因其良好的定位示踪功能，国内外以其和相关靶基因相互融合构建载体的研究已大量开展。有研究报道使用 eGFP 与 bcl-2 家族相关基因融合，即可直观地显示细胞凋亡过程中融合蛋白在线粒体内外膜上的定位和穿梭，为探讨凋亡的具体分子机制提供了便利[6,7]。

本实验结果显示，经荧光显微镜直接检测融合蛋白中报告基因绿色荧光蛋白的表达量变化，因 eGFP 与融合基因的表达相一致，可以间接反映融合蛋白的表达情况，结果显示随不同剂量 RA 处理融合基因载体转染的 MCF-7 细胞时间延长，荧光强度明显增大，且处理第 1 天即可出现明显的绿色荧光，提示 RA 依赖性靶基因表达与其剂量呈正相关；而使用低于常规治疗剂量(1×10^{-7} mol/L)的 RA 亦可明显引发荧光量的增强。RT-PCR 结果显示，融合基因中报告基因 eGFP mRNA 表达变化与荧光量一致，证实 RA 通过此融合基因载体模型可明显诱导融合基因表达，且小剂量 RA 处理即可获得高效表达。

Fas 抗原与其配体(FasL)是一对细胞膜表面分子，结合后可以传递细胞凋亡信号。Fas 系统在维持细胞群体数量的稳定、消除转化细胞以及免疫耐受的形成等生理活动中发挥重要作用[8]，Fas 抗原介导细胞凋亡效应的产生主要依靠胞内 caspases 和 bcl-2 家族成员的参与，各凋亡因子通过级联放大和网络协同作用，最终导致细胞凋亡[9,10]。由上述 Fas 启动细胞凋亡途径来看，Fas 作为膜受体，细胞凋亡启动信号由胞膜引发，有研究显示：去除胞膜和胞外区的 Fas 蛋白难以启动细胞凋亡[11]，原因可能为无 Fas 配体与之结合或其它凋亡相关蛋白(如 FADD)聚集于胞膜附近有关。细胞凋亡信号传导过程中多数因子也定位于胞浆，Fas 胞膜定位为信号的顺利传导提供了保证。本研究所构建的 Fas/ RARα 融合基因包含 Fas 抗原胞膜区和胞浆死亡区，实验结果亦显示：报告基因 eGFP 荧光指示融合蛋白在细胞整体均见，进一步提取转染细胞胞膜和胞浆蛋白组分进行 SDS-PAGE，证实 RA 诱导表达的融合蛋白主要定位于转染细胞的胞膜上。

参考文献：

[1] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305－1308.

[2] 张乾勇，糜漫天，郎海滨，等. 祝黄酸对细胞周期素依赖性激酶基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报，1998, 20(5): 389－391.

[3] 陈军松，柴敏强，宋建国. 佛波酯对 A-549 细胞株中蛋白激酶 C 的调节[J]. 生物化学与生物物理学报，2000, 32(6): 645－648.

[4] Kobayashi T, Ruan S, Clodi K, *et al*. Overexpression of Bax gene sensitizes K562 erythroleukemia cells to apoptosis induced by selective chemotherapeutic agents[J]. Oncogene, 1998, 16(12): 1587－1591.

[5] Koch B, Jensen L E, Nybroe O. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the gfp marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site[J]. J Microbiol Methods, 2001, 45(3): 187－195.

[6] Wolter K G, Hsu Y T, Smith C L, *et al*. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1997, 139(5): 1281－1292.

[7] Mahajan N P, Linder K, Berry G, *et al*. Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(6): 547－552.

[8] Chatterjee M, Wu S. Involvement of Fas receptor and not tumor necrosis factor-alpha receptor in ultraviolet-induced activation of acid sphingomyelinase[J]. Mol Carcinog, 2001, 30(1): 47－55.

[9] Zhu X F, Liu Z C, Xie B F, *et al*. Involvement of caspase-3 activation in squamocin-induced apoptosis in leukemia cell line HL-60[J]. Life Sci, 2002, 70(11): 1259－1269.

[10] Wolf B B, Green D R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases[J]. J Biol Chem, 1999, 274(29): 20049－20052.

[11] Ashley W W Jr, Russell B. Tenotomy decreases reporter protein synthesis via the 3′-untranslated region of the beta-myosin heavy chain mRNA[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(1): C257－265.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net