DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.006
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0727-04

论著

转染 bcl-2 基因对心肌细胞缺氧耐受性的影响

杨永健[1],刘世玉[1],胡厚祥[2],祝善俊[3],祝之明[2] ([1]成都军区成都总医院心血管内科,成都 610083;[2]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所高血压中心,重庆 400042;[3]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨转染 bcl-2 基因能否提高心肌细胞对缺氧的耐受性。方法 ①重组真核细胞表达载体:将含编码人 bcl-2 cDNA 完整开放阅读框的 bcl-2 cDNA 重组至逆转录病毒载体-pLXSN 的 *EcoR* Ⅰ位点上,用脂质体包裹重组质粒导入 PA317 细胞株,并经 G418 筛选阳性克隆;②用含高滴度重组病毒的上清感染心肌细胞,原位杂交鉴定其转染是否成功;③观察转染心肌细胞在缺氧环境下的生存率。结果 ①重组了含 bcl-2 的真核细胞表达质粒;②转染 bcl-2 基因能明显提高心肌细胞对缺氧的耐受能力。结论 转染 bcl-2 基因能显著提高心肌细胞在缺氧环境下的存活能力。

关键词:心肌细胞;缺氧;bcl-2;逆转录病毒载体;基因转染
中图法分类号:R322.11;R845.22 文献标识码:A

Effect of transfecting bcl-2 gene into cardiomyocytes on their hypoxic tolerance *in vitro*

YANG Yong-jian, LIU Shi-yu, HU Hou-xiang, ZHU San-jun, ZHU Zhi-ming (Department of Cardiovaslogy, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To study whether transfecting bcl-2 gene into cardiomyocytes can improve their hypoxic tolerance *in vitro*. Methods bcl-2 cDNA containing human full-length open reading frame was recombined into *EcoR* I site of retrovirus vector pLXSN. The plasmids were packed with liposome and transfected into cell line PA317. PA317/s-bcl-2 was selected from the transfected cells by its resistance to G418. Cardiomyocytes were infected with high titer recombined virus produced by PA317/s-bcl-2. The transfection was identified with *in situ* hybridization. The growth properties and tolerance to hypoxia of the cardiomyocytes were studied in bcl-2 gene-transfected cardiac and non-cardiac cells. Results Eukaryotic cell expression plasmid containing bcl-2 gene was constructed and it could increase the survival of cardiomyocytes under hypoxic condition. Conclusion Transfecting bcl-2 gene into cardiacmyocytes can significantly enhance their hypoxic survival rate.

Key words: cardiomyocyte; hypoxia; bcl-2; retrovirus vector; gene transfection

bcl-2 基因是从 B 细胞淋巴瘤染色体上克隆得到的一个原癌基因。通过转基因动物和基因转染实验证实,bcl-2 基因对细胞死亡有明显的抑制作用,被称为"抗死亡基因"(Anti-death gene)[1],bcl-2 基因这种抗死亡效应无细胞周期特异性。为此我们将含完整开放阅读框的 bcl-2 cDNA 基因构建于哺乳动物细胞表达的逆转录病毒载体上,再利用基因转染技术将 bcl-2 导入心肌细胞,以探讨转染 bcl-2 基因对心肌细胞缺氧耐受性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

PB4(AMP$^+$)[2] 为含 910 bp 的人 bcl-2 cDNA 的 PcDNA 重组质粒,bcl-2 cDNA 克隆于 PcDNA3.1 的 *EcoR* Ⅰ位点,它含有编码人 bcl-2 cDNA 完整开放阅读框,该质粒由留美医学博士惠赠。pLXSN(AMP$^+$,Neo$^+$)为一种哺乳动物细胞表达的逆转染病毒载体(由第三军医大学附属大坪医院高血压中心实验室提供)。

作者简介:杨永健(1965—),男,重庆市万州区人,博士研究生,主治医师,主要从事心肌重构有关信号转导方面的研究。电话:(028)6570331

收稿日期:1999-09-23;修回日期:2000-06-12

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

宿主细菌：*E. coli* $DH_{5\alpha}$株和M109株为大坪医院高血压中心实验室保存菌种。酶类：*EcoR*Ⅰ、*BamH*Ⅰ（BM），T4连接酶（Promega），无DNA酶的RNAase（华美）。DNA分子量标准：PCR Markers、λDNA/*EcoR*Ⅰ＋*Hind*Ⅲ购自华美公司。RNA探针标记试剂盒（Promega），M199（Sigma）。

Wistar大鼠乳鼠由第三军医大学附属大坪医院动物中心实验室提供。

1.2 实验方法

1.2.1 PB4质粒转化，提取及酶切鉴定 ①将PB4质粒和pLXSN质粒分别接种于*E. coli* DH5α株和M109感受细菌中，37 ℃孵箱倒置12～16 h。②挑取转化组平板上分隔良好的单菌落接种于3 ml含AMP的LB培养中，37 ℃振荡培养12 h。③用碱裂解法提取菌液中质粒。④据PB4和pLXSN酶切图谱，经*EcoR*Ⅰ酶切鉴定。⑤碱裂法大量抽提PB4和pLXSN质粒。

1.2.2 bcl-2 cDNA片段分离提纯和线性化pLXSN制备 以*EcoR*Ⅰ酶切质粒PB4，琼脂糖电泳分离分别切下所要的DNA条带，用“V”型电泳槽回收，再用酚、氯仿抽样提取少量电泳和紫外分光光度仪测DNA浓度。

1.2.3 连接反应和转化 用重组子的初步筛选：接下式将bcl-2 cDNA片段与线性化pLXSN接bcl-2 cDNA片段6 μl（80 ng/μl），线性化pLXSN 2.5 μl（50 ng/μl），10× T_4 DNA连接酶缓冲液1 μl，T_4连接酶0.5 μl（1 ng/μl），于14～16 ℃保温16 h，然后将连接产物转化于新鲜制备的M109感受态细菌。37 ℃培养12～16 h，用快速细胞破碎法（Cracking gel）对重组子进行筛选，分别将单菌落接种于编号的含1 ml的LB培养液中，37 ℃培养12 h分别取0.5 ml菌液离心，去上清加60 μl Cracking gel缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl，1%SDS，2 mmol/L EDTA，400 mmol/L蔗糖，0.01%溴酚蓝），混匀，37 ℃孵育30 min，15 000 r/min离心15 min，取上清点样电泳，染色观察质粒DNA迁移距离，根据质粒DNA迁移速率快慢可初步判定阳性重组子。

1.2.4 重组子的进一步鉴定 将提取的可凝重组子分别用*EcoR*Ⅰ和*BamH*Ⅰ的酶切，鉴定，用地高辛标记bcl-2用斑点杂交，对所构建质粒进行鉴定。

1.2.5 脂质体将质粒DNA导入PA317细胞及阳性克隆的筛选[3] 用脂质体包裹重组质粒将bcl-2质粒导入PA317细胞株，转染后48 h更换选择培养基（G418，400 μg/ml，筛选3周左右）。设pLXSN-b/s-bcl-2、pLXSN二组。

1.2.6 心肌细胞培养 按Scott法进行，将消化心肌细胞悬液接种于盖玻片上，设pLXSN-b/s-bcl-2、pLXSN二组，转染48 h后将转染pLXSN-b/s-bcl-2、pLXSN心肌细胞作原位杂交，bcl-2 mRNA探针标记按试剂盒说明进行，原位杂交按常规方法进行。

1.2.7 转染bcl-2基因心肌细胞对缺氧的耐受能力 将消化心肌细胞悬液，接种于24孔细胞培养板，分别感染上述二组转染液，加完全培养基后放入10%CO_2条件下培养，每12 h取各两种转染类型的细胞各1孔，经台盼蓝染色，计数细胞总数和活细胞数，计算存活百分率，每一时相重复6次取平均值，用q检验作组间差异性检验，绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 碱裂解法小量提取质粒PB4和pLXSN以*EcoR*Ⅰ酶切

PB4为0.91 kb和5.41 kb的两条DNA区带，前者为人bcl-2 cDNA片段，后者为PcDNA载体；PcDNA为5.84 kb的一条DNA区带。

2.2 bcl-2 cDNA片段的制备

用*EcoR*Ⅰ大量酶切PB4质粒后，对0.91 kb的DNA片段用“V”型电泳槽回收，并纯化。

2.3 重组子的初筛

将0.91 kb的bcl-2 cDNA片段与线性pLXSN连接，转化后对转化子采用快速细胞破碎法初筛，判断阳性重组子，初筛为阳性重组子的特点是：质粒DNA迁移速率较非重组子的迁移率慢。经初筛得到4个可疑阳性重组子。

2.4 重组质粒的进一步筛选及正、反义bcl-2 cDNA重组子的进一步鉴定

初筛为阳性的重组子用碱裂解法小量抽提质粒，结果见图1，阳性重组子质粒均切出0.91 kb的DNA条带。经*EcoR*Ⅰ酶切鉴定为阳性的重组质粒再用*BamH*Ⅰ酶切，根据酶切图谱的不同可鉴定出bcl-2 cDNA的插入方向。如图2所示，以2，3电泳道重组质粒中目的cDNA为正向插入，命名为pLXSN/s-bcl-2，第1，4泳道的重组质粒中的目的cDNA为反向插入，命名为pLXSN/as-bcl-2。



图1 重组子***EcoR***Ⅰ酶切鉴定

Fig 1 Recombinant plasmid identified by *EcoR*Ⅰ digestion

1：λDNA/*EcoR*Ⅰ＋*Hind*Ⅲ markers；2～5：Recombinant bcl-2/*EcoR*Ⅰ

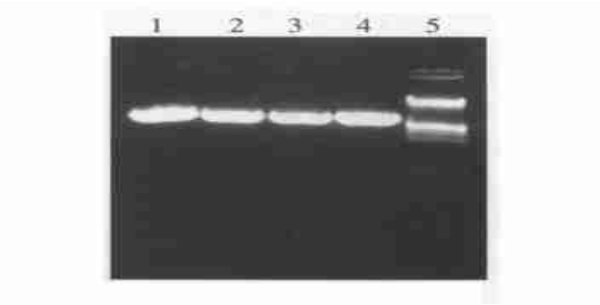


图2 重组子***BamH***Ⅰ酶切鉴定

Fig 2 Recombinant plasmid identified by *BamH*Ⅰ digestion

1～4：Recombinant bcl-2/*BamH*Ⅰ；5：λDNA/*EcoR*Ⅰ＋*Hind*Ⅲ markers

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

2.5　重组子斑点杂交

用 bcl-2 片段标记探针, 进行斑点杂交, bcl-2 片段, PB4 及 pLXSN-bcl-2 均阳性, 而 pLXSN 载体为阴性, 见图 3。



图 3　重组子 **bcl-2** 斑点杂交

Fig 3　bcl-2 cDNA dot blot hybridization of recombinant plasmid

1: bcl-2 section; 2: pLXSN; 3: PB4 plasmid; 4: pLXSN-bcl-2

2.6　bcl-2 mRNA 原位杂交结果显示

杂交阳性信号为紫蓝色颗粒, 位于胞浆。转染 bcl-2 48 h 后, 转染组心肌细胞较对照组心肌细胞着色明显深。图像分析系统分析结果为, 转染组平均光密度值(IOD)为 0.735±0.091, 对照组为 0.591±0.064, 两组比较差异显著($P<0.01$), 表明转染组 bcl-2 mRNA 表达明显增加。

2.7　转染 bcl-2 心肌细胞对缺氧的耐受性

在缺氧环境(10% CO_2)下, 转染 bcl-2 心肌细胞存活率(12、24、36、48 h 时相)显著高于对照组心肌细胞($P<0.01$), 见图 4。

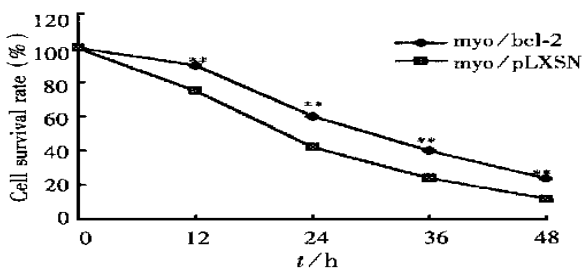


图 4　**myo/bcl-2** 心肌细胞在 **10%** 二氧化碳条件下的存活情况

Fig 4　Suroival condition of bcl-2 gene-transfected cardiomyocytes in 10% CO_2

**: $P<0.01$ *vs* myo/pLXSN

3　讨论

1986 年 Cleary 等[3] 克隆了 bcl-2 基因, 并对其结构和功能做了分析和预测。bcl-2 基因的转录产物有 2 种, 即 bcl-2α 和 bcl-2β 基因 mRNA。对 bcl-2 基因的结构分析表明, bcl-2 基因有 2 个外显子, 其 5' -端的第一个外显子编码 bcl-2 阅读框的大部分。在 2 个外显子间有约 50 kb 的内含子, 通过 bcl-2 cDNA 对 bcl-2 基因编码的蛋白进行预测分析表明, bcl-2α 为 (25~26)×10^3, bcl-2β 为 22×10^3, 二者的区别主要在 C-末端(即 bcl-2 缺失疏水尾)。研究中的 bcl-2 基因一般指 bcl-2α。bcl-2 近 C-端有一个由 19 氨基酸组成的疏水区, 其外侧仅有两个带电氨基酸残基, 其作用是将 bcl-2 锚定于膜性结构, C-端嵌入膜性结构对于 bcl-2 发挥阻止细胞凋亡的功能非常重要[4]。bcl-2 的胞内定位在核周膜、线粒体外膜和内质网膜上。

逆转录病毒载体是目前基因转移中应用最广的一类载体, 大致分为 4 种类型[5]: ①VIP 型, 利用构建于载体内部的外源启动子来调控目的基因的表达; ②LTR 型, 利用 5' -LTR 来调控目的基因的表达; ③MV 型, 含有外源启动子和 LTR, 它们分别调控目的基因和标记基因的表达; ④SIN 型, 在 3' -LTR 缺失了一段序列。本实验选用的 pLXSN 载体来源于MV 型载体中的 N2 载体, 它利用 LTR 调控目的基因的表达, 在调控外源目的基因表达 LTR 要比外源启动子的效率高[5]。载体中外源基因的插入方向会影响重组病毒效价, 如果插入的是 cDNA, 一般不会影响病毒转录, 也不会影响病毒效价。但若插入是基因组 DNA, 由于它们含有转录终止信号, 病毒效价陡然下降, 原因在于外源基因中的 PolyA 信号优先被启用, 这样转录出来的 RNA 不含 3' -LTR, 无法包装成病毒颗粒, 因而重组这类基因到病毒载体上时应尽量切除转录终止信号序列。若基因组 DNA 以反向插入病毒载体, 由于它带有自身的启动子和转录终止信号, 势必会造成两个相反的转录单位互相干扰。因此在构建重组病毒载体时, 应考虑目的基因、选择基因、外加启动子以及病毒载体自身结构顺序之间的协同作用。本实验构建的真核表达的bcl-2 质粒, 是将 bcl-2 基因构建于 pLXSN 载体, 不会影响病毒转录及重组病毒的效价。

bcl-2 基因对细胞死亡和损伤有明显的抑制作用。构建真核细胞表达 bcl-2 质粒, 即重组反转录病毒载体 pLXSN/bcl-2 是探讨 bcl-2 基因的结构与功能、作用途径和机制的重要手段之一, 尤其用于转染哺乳动物细胞。在一些外界病理因素刺激下, 表达导入 bcl-2 基因的细胞模型的抗损伤/凋亡能力如何, 是探讨转染细胞在不同条件下其抗损伤/凋亡能力的重要工具[6]。本结果表明转染 bcl-2 的心肌细胞与对照组比较, bcl-2 mRNA 表达明显增加, 说明转染成功; 而缺氧环境(10%CO_2)培养条件下, 转染 bcl-2 基因心肌细胞的存活率明显提高, 表明转染 bcl-2 基因能明显地提高心肌

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

细胞生存能力。我们下一步工作是将 bcl-2 基因直接导入心脏缺血区心肌细胞，探讨在体心肌细胞能否表达这种外源性抗凋亡基因以及它是否也能发挥其抗凋亡的作用。

参考文献：

[1] Mizuno N, Yoshitomi H, Ishida H, *et al*. Altered bcl-2 and bax expression and intracellular Ca^{2+} signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose induced insulin secretion[J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1 429—1 439.

[2] Reed J C, Cuddy M, Haldar S, *et al*. Bcl-2-mediated tumorigenicity of a human T-lymphoid cell line: synergy with MYC and inhibition by bcl-2 antisense[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(10): 3 660—3 664.

[3] Cleary M L, Smith S D, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14; 18) translocation[J]. Cell, 1986, 47(1): 19—28.

[4] Hockewbery D, Nunez G, Milliman C, *et al*. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death[J]. Nature, 1990, 348(2 699): 334—336.

[5] Hwu P, Yannelli J, Kriegler M, *et al*. Functional and molecular characterization of tumor-infiltrating lymphocytes transduced with tumor necrosis factor-α cDNA for the gene therapy of cancer in humans[J]. J Immunol, 1993, 150(3): 4 104—4 115.

[6] Sabbah H N, Sharov V G. Apoptosis in heart failure[J]. Prog Cardiovasc Dis, 1998, 40(6): 549—562.

（编辑 王 红）

（上接726页）

2.2 输血种类

输血种类包括全血、红细胞制剂、各种成分（血小板，冷沉淀，血浆）以及自体血，见表2。

表2 输血统计（$n=276$）

	例数	红细胞(ml)	全血(ml)	各种成分(U)	自体血回输(ml)
1995年	58	4 760	120 400	126	8 600(5例)
1996年	72	35 230	11 686	143	2 800(2例)
1997年	68	33 200	106 618	219	4 200(3例)
1998年	78	89 093	76 200	349	24 200(23例)
合计	276	162 283	419 404	837	39 800(33例)

3 讨论

回顾性观察发现成分输血、自体输血病例数逐年增加，输血时间以入院24 h内用血较多。

创伤失血病人，输血是不可替代的有效措施。本组病例入院时都有不同程度贫血，必须输血。其中1例脾破裂腹腔大出血，Hb术前24 g/L，出血量约2 800 ml，无胃肠损伤，收集自体血2 000 ml自体回输。术中、术后3 d输注库存血2 000 ml。Hb升到134 g/L，康复出院。本组病例对输液未作进一步分类统计，据报道对于严重大出血病人输液以林格氏液为佳，生理盐水适当少输。动物实验证明：对严重大出血的动物复苏时用生理盐水+洗涤红细胞与林格氏液+洗涤红细胞作对比观察，酸中毒前者更重（pH 7.14, pH 7.39）[1]。

成分输血比例逐年增加。与1995年比较：红细胞输血1996年增加7.4倍，1997年增加7.0倍；1998年增加18.7倍；全血用量1996年下降3.6%，1997年下降12.9%，1998年下降58%；成分血1996年增加13.5%，1997年增加73.8%，1998年增加177%。在创伤出血病人救治中成分输血1997年为42%，1998年为67.5%。目前仍然存在对创伤出血病人一概应该输全血的观念。因而，需要加大宣传，更新观念，提高临床输血水平。

自体输血是抢救出血病人的有力措施，我院曾对30例胸腹腔内出血病人自体血回输实验和临床观察，结果表明体腔血过滤前后凝血因子显著减少，凝血功能受损。但是RBC的功能是好的，是出血病人最需要的成分，回输后RBC数增加，凝血功能并未发生严重损害。实践证明是行之有效的[2,3]。美国1994年自体输血占总用血量8%，使用1.013×10^6 U[4]。临床上抢救内出血病人在供血不足时，自体体腔血回输是救命措施。本组病例中自体输血共计33例，回输自体血39 800 ml。节约了血源，挽救了病人生命，值得推广。

关键词：创伤；输血

中图法分类号：R457.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] Healey M A, Davis R E, Liu F C, *et al*. Lactated Ringer's is superior to normal saline in a model of massive hemorrhage and resuscitation[J]. J Trauma, 1998, 45(5): 894—899.

[2] 陈方祥，刘怀琼，葛衡江，等. 体腔血自体回输与凝血纤溶功能的变化[J]. 中华麻醉学杂志，1998，18(2)：82—83.

[3] 葛衡江，陈方祥，刘怀琼，等. 体腔血凝血纤溶指标的变化[J]. 中华麻醉学杂志，1999，18(1)：18—20.

[4] Wallace E L, Churchill W H, Surgenor D M, *et al*. Collection and transfusion of blood and blood components in the United States, 1994[J]. Transfusion, 1998, 38(7): 625—636.

（编辑 谢义霞）

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