DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.012

人类bcl-2蛋白在CHOdhfr⁻细胞中的表达

何凤田* 朱锡华 (第三军医大学基础医学部免疫学教研室)重庆,400038

提 要 **目的**:建立表达人类bcl-2蛋白的哺乳类细胞模型,为探讨bcl-2的作用机制及其与其它基因间的关系奠定基础。**方法**:通过将910bp的含有完整开放阅读框的人类bcl-2 cDNA以正向克隆于逆转录病毒载体pLXSN的EcoRI位点而构建重组真核表达载体pLXSN/s-bcl2。利用电穿孔技术将pLXSN/s-bcl2转染于CHOdhfr⁻细胞,筛选出G418抗性克隆,经免疫印迹检测人类bcl-2蛋白在CHOdhfr⁻细胞中的表达,观察在正常培养条件下,bcl-2蛋白的表达对该细胞的增殖与存活能力的影响。**结果**:①得到了人类bcl-2 cDNA以正向插入的重组真核表达载体pLXSN/s-bcl2。②免疫印迹表明转染有pLXSN/s-bcl2的CHOdhfr⁻细胞表达了人类bcl-2蛋白(相应细胞命名为CHO/s-bcl2)。③在正常培养条件下,CHO/s-bcl2细胞的增殖与存活能力正常。**结论**:①表达人类bcl-2蛋白CHO/s-bcl2细胞模型的建立,为深入研究奠定了基础。②在正常培养条件下,人类bcl-2蛋白的表达对CHOdhfr⁻细胞的增殖与存活表型无明显影响。

关键词 人类bcl-2 cDNA;真核基因表达;中国仓鼠卵巢细胞

中图法分类号 Q78.33

细胞凋亡的发生及其意义是近年来医学生物学领域的研究热点之一。有人预言,此项研究的不断深入,将为某些疾病的防治,特别是肿瘤的防治开辟一个崭新的领域[1]。bcl-2为目前众多凋亡相关基因中具有重要意义的一个,被称之为能够抑制凋亡的所谓"存活基因",它参与机体的多种生理和病理过程[2,3]。然而关于bcl-2如何作用和在什么环节上发挥作用,目前尚知之甚少。因此,对bcl-2作用机制的研究是一关键。构成bcl-2表达细胞模型,是研究bcl-2的一个重要手段。本研究将人类bcl-2 cDNA克隆于逆转录病毒载体pLXSN,经电穿孔法导入CHOdhfr⁻细胞并获得了表达,建立了表达人类bcl-2蛋白的哺乳类细胞模型,从而为探讨bcl-2的作用机制及其与其它基因间的相互作用提供了条件。

1 材料与方法

1.1 质粒载体

pB4和pLXSN均由访美学者带回。在pB4质粒的EcoRI位点克隆有910 bp的人类bcl-2 cDNA,在该cDNA的近3'端约1/3处有一BamH I酶切位点。

1.2 主要试剂

T4 DAN连接酶购自宝灵曼公司,G418购自Gibco BRL公司,鼠抗人bcl-2单克隆抗体(McAb)购自Santa Cruz生物技术公司。λ-DNA/Hind Ⅲ标准购自华美公司(DNA片段大小依次为:23130,9416,6557,4361,2322,2027,567和125 bp),pBR328/BamH I+pBR328/Bql I+pBR328/Hind I标准购自宝灵曼公司(DNA片段大小依次为:4907,2176,1766,1230,1033,653,517,453,394,298,234,220和154 bp)。

1.3 CHOdhfr⁻细胞株

购自中科院上海细胞所,常规培养于含10%新生牛血清的F12培养基中。

1.4 重组真核表达载体的构建及其转染

用EcoR I切割质粒pB4,经低熔点琼脂糖凝胶电泳法分离回收910 bp的含完整开放阅读框的人类bcl-2 cDNA,然后与经EcoR I线性化的pLXSN连接并转化于大肠杆菌MC1061。经快速细胞破碎法初筛、EcoR I及BamH I酶切等步骤鉴定出bcl-2 cDNA以正、反向插入的重组真核表达载体pLXSN/s-bcl2(s:sense orientation)和PLXSN/as-bcl2(as:antisense orientation)。以电穿孔法将pLXSN/s-bcl2导入CHOdhfr⁻细胞,利用含G418(500μg/ml)的选择培养基培养2~3周,筛选出G418抗性克隆并行扩增培养。同法筛选出空载体pLXSN转染的CHOdhfr⁻细胞。

1.5 Western blotting(WB)检测bcl-2蛋白的表达

按文献[4]的方法提取细胞总蛋白,经SDS-PAGE(12%凝胶)分离,按常规转移至NC膜上。以1.5% BSA封闭后,相继用1∶80的鼠抗人bcl-2 McAb和1∶300的HRP-羊抗鼠IgG与之反应,最后以DAB底物溶液显色。

1.6 细胞一般生长特性观察

将bcl-2表达细胞、转染空载体的细胞及未经任何转染的细胞制成单细胞悬液,接种于24孔板,3×10^4细胞/孔。在正常培养条件下,每隔24 h,取部分孔中的细胞,经苔盼蓝染色后,计数细胞,绘制不同时相点的细胞数量变化曲线,计算存活细胞百分率。实验设两个平行孔,取其平均值。

2 结果

2.1 pLXSN/s-bcl2的构建

经快速细胞破碎法初筛和EcoR I酶切鉴定出重组载体

* 何凤田,男,31岁,讲师,博士

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

后，再以 BamH Ⅰ酶切鉴定出 bcl-2 cDNA 的插入方向，见图 1。

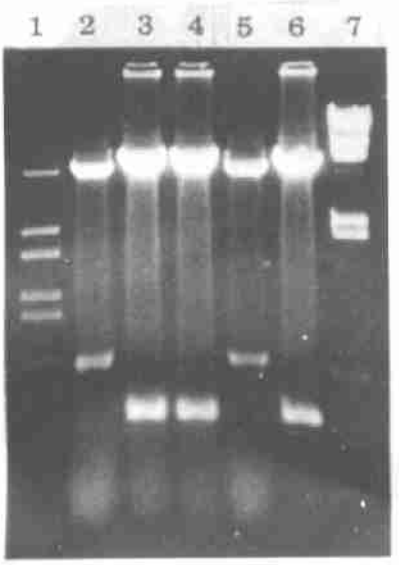


图 1　BamH Ⅰ酶切鉴定 bcl-2 cDNA 在重组载体中的插入方向

Fig 1　Identification of the orientation of bcl-2 cDNA in recombinant vectors by digestion with BamH Ⅰ

1. pBR328/BamH Ⅰ + pBR328/Bgl Ⅰ + pBR328/Hind Ⅲ; 2, 5. pLXSN/as-bcl2/BamH Ⅰ; 3, 4, 6. pLXSN/s-bcl2/BamH Ⅰ; 7. λ-DNA/Hind Ⅲ

2.2　人类 bcl-2 cDNA 在 CHOdhfr⁻ 细胞中的表达

受 pLXSN/s-bcl2 和 pLXSN 转染的细胞分别命名为 CHO/s-bcl2 和 CHO/neo。WB 分析结果如图 2 所示，表明 CHO/s-bcl2 细胞有约(25～26)×10³u 的人类 bcl-2 蛋白表达，而作为对照的 CHO/neo 细胞则无此蛋白表达。

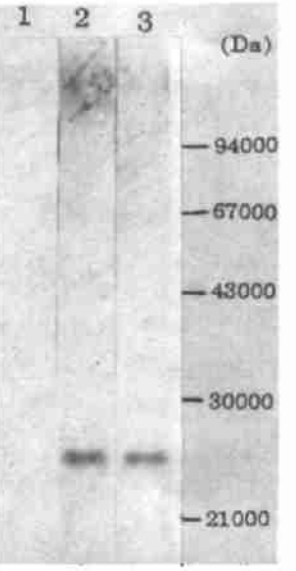


图 2　WB 检测人类 bcl-2 蛋白在 CHOdhfr⁻ 细胞中的表达

Fig 2　Expression of human bcl-2 protein in CHOdhfr⁻ cells detected by western blot analysis

1. CHO/neo; 2, 3. CHO/s-bcl2

2.3　细胞一般生长特性

在正常培养条件下，3 种细胞在各时相点的细胞数间及存活率间差异均不明显($P>0.05$)，见图 3、4。表明在正常情况下，人类 bcl-2 蛋白的表达对 CHOdhfr⁻ 细胞的增殖与存活无明显影响。

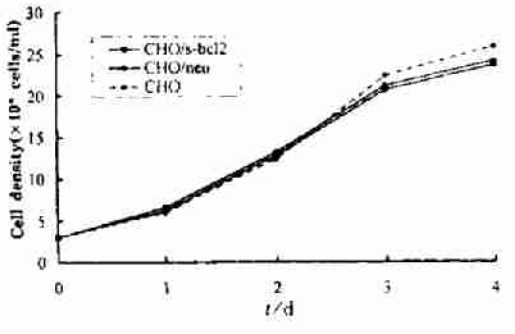


图 3　细胞的时间变化曲线

Fig 3　Changes of time-course of the cells

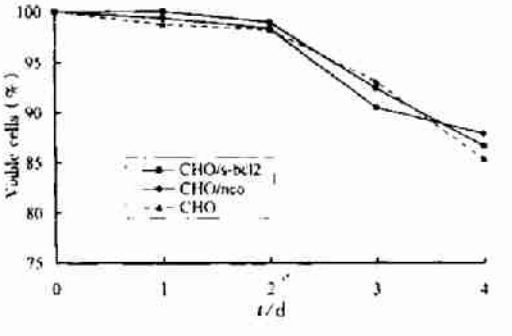


图 4　存活细胞百分率的变化

Fig 4　Changes of percentage of viable cells

3　讨论

bcl-2 基因以其明确的凋亡抑制功能而受到人们的广泛关注。在生理情况下，它与免疫系统功能的稳定和维持、肾脏等组织器官的发育、机体寿命的维持、信息分子的信号传导等密切相关；在病理情况下，它与某些疾病，特别是肿瘤的发生、肿瘤细胞的药物耐受等有关。因此，深入探讨 bcl-2 的作用机制，将对了解机体的某些生理和病理过程乃至在临床上有效地治疗相关疾病产生极其深远的影响[2,3,5]。研究 bcl-2 的一个重要手段，就是构建表达 bcl-2 的细胞模型，利用模型细胞进行研究。应用此策略，人们已证实了 bcl-2 为一原

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

癌基因，阐明了 bcl-2 蛋白的胞内定位，证明了 bcl-2 的 3 个同源域是其发挥功能所必需的，证实了 bcl-2 基因对相同和不同种属细胞的凋亡均具抑制作用，揭示了 bcl-2 基因参与 IL-2R 介导的信号通路的事实，等等[5~7]。关于 bcl-2 的作用机制虽有多种推测，但总的来说，尚不清楚。因此，对 bcl-2 作用机制的研究仍是今后研究的焦点。本研究使人类 bcl-2 cDNA 在 CHOdhfr⁻细胞中获得了表达，建立了表达 bcl-2 蛋白哺乳类细胞模型，从而为探讨 bcl-2 的作用机制及其与其它基因间的关系奠定了基础。实验中之所以使用 CHOdhfr⁻细胞，原因在于该细胞二氢叶酸还原酶基因(dhfr)缺陷，因此，在使用了带选择基因 neo 的真核表达载体(如 pLXSN)进行转染后，还可使用带选择基因 dhfr 的真核表达载体(如 P^{91023})进行转染，反之亦然，这样便可借助带有不同选择标志的载体将 bcl-2 基因和其它基因共同导入 CHOdhfr⁻细胞，观察 bcl-2 基因与其它基因间的相互作用，为 bcl-2 作用机制的阐明积累资料。

体外研究表明，单独 bcl-2 基因转染对细胞增殖无明显影响，本实验结果也支持这一观点。在 CHOdhfr⁻细胞，pLXSN/s-bcl2 转染后，于正常培养条件下，细胞生长及存活率的动态变化均与对照细胞者无明显差异。至于这些体外实验结果能否反映体内情况，尚有待于进一步研究。最近，Miyazaki 等[5]的研究发现，bcl-2 可参与 IL-2 R 介导的信号传导，并且可协同 c-myc 或 $p56^{lck}$ 共同激发细胞增殖，这就提示，bcl-2 可能在某种程度上参与了细胞增殖的调控，只是这种作用只有当其它基因与之协同时才明显表现出来。

(在实验过程中得到刘昕博士、黄云辉、王燕等老师的大力帮助，在此表示衷心感谢！)

参考文献

1 Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. Blood, 1993; 82(1): 15

2 Kamada S, Shimono A, Shinto Y *et al*. bcl-2 deficienccy in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen, polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine. Cancer Res, 1995; 55(3): 354

3 Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 1995; 267(12): 1456

4 Zhang K Z, Westberg J A, Hölttä E *et al*. bcl-2 regulates neural differentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93 (24): 4504

5 Miyazaki T, Liu Z J, Kawahara A *et al*. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, *c-myc*, and *lck* cooperate in hematopoietic cell proliferation. Cell, 1995; 81 (3): 223

6 Vaux D L, Weissman I L, Kim S K. Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. Science, 1992; 258(20): 1955

7 Chittenden T, Flemington C, Houghton A B *et al*. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. EMBO J, 1995; 14: 5589

(收稿：1997-09-12；修回：1998-04-07)
(编辑 仇玉福)

Expression of human bcl-2 protein in CHOdhfr⁻ cells

He Fengtian, Zhu Xihua (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To establish a mammalian cell model expressing human bcl-2 protein to lay a foundation for the studies on both the mechanism of bcl-2 action and the interaction of bcl-2 with other genes. **Methods**: The pLXSN/s-bcl2 eukaryotic expression vector was constructed by cloning a 910bp EcoRI insert of human bcl-2 cDNA containing the full-length open reading frame in sense orientation into the EcoRI site of the pLXSN retrovirus vector. CHOdhfr⁻ cells were transfected with pLXSN/s-bcl2 using electroportion technique and the transfected cells were selected for resistance to G418. The expression of human bcl-2 protein in CHOdhfr⁻ cells was detected with western blotting and the effects of human bcl-2 protein on CHOdhfr⁻ cell growth and survival was investigated under normal culture conditions. **Results**: ① The recombinant eukaryotic expression vector pLXSN/s-bcl2 was constructed, in which human bcl-2 cDNA was inserted in sense orientation. ②Western blotting showed that the CHOdhfr⁻ cells transfected with pLXSN/s-bcl2 could express human bcl-2 protein. ③ Under normal culture conditions, CHO/bcl2 cells exhibited normal proliferation and survival. **Conclusion**: ① The establishment of the CHO/s-bcl2 cell model expressing human bcl-2 protein paves the way for further studies. ② Under normal culture conditions, expression of human bcl-2 protein in CHOdhfr⁻ cells can not affect the cell growth and survival.

Key words human bcl-2 cDNA; eukaryotic gene expression; CHO cell

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