

# Bax 对人卵巢癌细胞的凋亡诱导作用及其机制研究\*

曾俊<sup>1</sup>, 杨靖<sup>2</sup>, 陈登榜<sup>3</sup>, 曹康<sup>4△</sup>

1. 成都医学院学报编辑部(成都 610500); 2. 湖北医药学院微生物学教研室(十堰 442100);

3. 成都医学院临床医学实验教学中心(成都 610500); 4. 成都医学院病原生物学教研室(成都 610500)

**【摘要】** 目的 观察 Bax 对人卵巢癌 A2780 细胞的凋亡诱导作用,并探讨其作用机制。方法 构建重组质粒 pcDNA-Bax,将重组质粒 pcDNA-Bax 转染 A2780 细胞,采用 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡、MTT 法检测细胞活力,采用 Western blot 法检测 Bax 基因的过表达、线粒体细胞色素 C 的释放及 Caspase-9 和 Caspase-3 的激活。结果 经酶切和测序鉴定,重组质粒 pcDNA-Bax 构建成功。转染质粒 pcDNA-Bax 能明显诱导 A2780 细胞凋亡,Hoechst 染色显示凋亡的细胞出现细胞核形态学改变;MTT 结果显示转染质粒 pcDNA3.1-Bax 后,细胞活力明显下降;Western blot 结果表明转染质粒 pcDNA-Bax 后的 A2780 细胞线粒体释放细胞色素 C,激活了 Caspase-9 和 Caspase-3。结论 Bax 能促进卵巢癌细胞线粒体细胞色素 C 释放,从而诱导细胞凋亡。

**【关键词】** Bax 线粒体 真核表达 凋亡

**The Mechanisms by which Bax Induces the Apoptosis of Human Ovarian Cancer Cells** ZENG Jun<sup>1</sup>, YANG Jing<sup>2</sup>, CHEN Deng-bang<sup>3</sup>, CAO Kang<sup>4△</sup>. 1. Editorial Board of Journal of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 2. Department of Microbiology, Hubei University of Medicine, Shiyan 442100, China; 3. Teaching Center of Clinical Experiment, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China; 4. Department of Pathogen Biology, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

△ Corresponding author, E-mail: caokang94@126.com

**【Abstract】** **Objective** The purpose of this study was to observe the apoptosis of A2780 cells transfected with the recombinant plasmid of pcDNA-Bax and to observe the release of cytochrome C from the mitochondria. **Methods** The recombinant plasmid of pcDNA-Bax was constructed and transfected into A2784 cells. The Hoechst 33258 stain method was applied to evaluate the apoptosis of the transfected cells and MTT method was used to test the cell viability. Western blot analysis was performed to determine the overexpression of Bax and the release of cytochrome C from the mitochondria. **Results** The recombinant plasmid of pcDNA-Bax was successfully constructed by using endonuclease digestion and the sequence analysis. The apoptosis of A2780 cells was induced after transfected with pcDNA3.1-Bax as demonstrated with Hoechst staining. The cell viability were decreased in the pcDNA3.1-Bax transfected group by MTT assay. The release of cytochrome C from the mitochondria was observed when using Western blotting analysis. And the caspase-9 and the caspase-3 were activated. **Conclusion** Our data suggested that Bax exhibited potent pro-apoptotic activity against the ovarian cancer cells. This study is a foundation for the further research in the pro-apoptotic activity of Bax.

**【Key words】** Bax Mitochondria Eukaryotic expression Apoptosis

细胞凋亡是肿瘤学研究的热点之一。细胞凋亡是由基因控制的细胞的程序性死亡,其在胚胎发育、神经系统完善和肿瘤控制等方面有重要作用<sup>[1]</sup>。目前发现多种疾病的发生与凋亡异常有关,特别是肿瘤,其发生发展的主要原因是细胞凋亡的失控。Bax 是 Bcl-2 家族重要的促凋亡分子之一,其促凋亡途径主要通过线粒体凋亡途径<sup>[2]</sup>。目前人们在探

索新治疗手段的过程中,基因治疗已成为治疗恶性肿瘤中非常重要的策略之一<sup>[3]</sup>。本研究使用 pcDNA-Bax 质粒转染卵巢癌细胞 A2780,观察细胞凋亡和线粒体细胞色素 C(CytC)的释放,旨在证实 Bax 能通过诱导卵巢癌 CytC 的释放来促进卵巢癌细胞的凋亡,初步探讨以 Bax 为靶点的卵巢癌的基因治疗。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

质粒 pcDNA3.1(+)来自 Invitrogen 公司;胶

\* 四川省教育厅面上项目(No. 11ZB170)、四川省卫生厅科研课题(No. 120489)和成都医学院校基金(No. CYZ10-004, No. CYZ11-0059)资助

△ 通讯作者, E-mail: caokang94@126.com

回收试剂盒 Gel Extraction Min Kit 由上海华舜生物公司生产;质粒提取试剂盒由 Omega 公司生产;各种限制性核酸内切酶来自 Fermentas 公司;T4 DNA 连接酶来自 Promega 公司;Premix Taq 和 DNA marker 购自 TaKaRa 公司;人卵巢癌细胞株 A2780 购自美国模式培养物集存库(ATCC);DMEM、RPMI1640 细胞培养基和胎牛血清、胰酶等购自 Gibico 公司;脂质体 Lipofectamine™ 2000 由 Invitrogen 公司生产;线粒体提取试剂盒购自晶美生物工程公司;Hoechst 33258 染色试剂购自 Sigma 公司; $\beta$ -actin 抗体购自正能生物公司;Bax、CytC、环氧合酶 4(Cox-IV)、Caspase-9 和 Caspase-3 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;其余试剂均为分析纯试剂。

## 1.2 方法

**1.2.1 人卵巢癌 A2780 细胞的培养** 使用含 10% 胎牛血清和双抗的 RPMI1640 培养基,置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 A2780 细胞。

**1.2.2 质粒构建** Bax 基因(Puc-Bax 质粒)由四川大学华西医院肿瘤生物治疗国家重点实验室聂春来教授赠送。根据 Primer Premier 5 软件设计引物如下:上游引物 5'-CTCAAGCTTATGGACGGGTCCGGGAGCAG(下划线为 Hind III 酶切位点)-3',下游引物 5'-GCAGAATTCTCAGCCCATCTTCTTCCAGATG(下划线为 RcoR I 酶切位点)-3',扩增片段长度为 597 bp。引物由擎科生物公司合成。RT-PCR 反应条件为:94 °C 4 min 后,94 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 1 min(后 3 步骤 30 个循环),最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 Hind III 和 RcoR I 酶切,然后连接到 pcDNA3.1(+ )质粒,转化感受态细菌之后使用氨苄青霉素筛选获得重组质粒 pcDNA3.1-Bax。重组质粒 pcDNA3.1-Bax 经过双酶切鉴定重组之后,送上海生工公司测序。

**1.2.3 转染 A2780 细胞** 取 4  $\mu$ g 重组质粒[对照组使用质粒 pcDNA3.1(+)]加入 250  $\mu$ L 无血清和双抗的 RPMI1640 细胞培养基,颠倒混匀。另外将含 6  $\mu$ L 脂质体的 250  $\mu$ L 无血清和双抗的 DMEM 培养基在室温下静置 5 min。然后将含有脂质体和质粒的培养基加到一起,充分混匀后室温放置 20 min。之后吸去 6 孔板中的细胞培养液,每个需转染的孔中加入上述含脂质体和质粒的无血清和双抗的培养液(转染复合物)500  $\mu$ L,同时补入 1.5 mL 无血清和双抗的 DMEM 培养液后继续培养。

**1.2.4 Hoechst 33258 染色** 转染后的 A2780 细

胞[分为 pcDNA3.1-Bax 转染组和 pcDNA3.1(+ )转染组]继续培养 2 d。弃去培养液后加入 4%(体积分数)甲醛溶液固定;固定后每孔加入 1  $\mu$ L Hoechst 33258,20 min 后水洗,在荧光显微镜高倍镜( $\times$ 400)下观察结果。以未处理的 A2780 细胞作为对照组(未转染组)。从每组中随机抽取 5 张未经剪切处理的原始照片,统计每张照片中有明显凋亡现象的细胞数,取均值。

**1.2.5 MTT 法检测细胞活力** 分别用 0.25% 胰酶消化收集 A2780 细胞。将细胞转移至 96 孔板培养至 70% 的密度,之后分别转染 pcDNA3.1-Bax 质粒和 pcDNA3.1(+ )质粒,以未处理的 A2780 细胞为对照组(未转染组)。培养 24 h 和 48 h 后加入 5 mg/mL MTT 试剂 20  $\mu$ L。4 h 后加入 100  $\mu$ L DMSO,用酶标仪在 570 nm 测定每个孔的光密度(OD)值。以未处理组的平均 OD 值作为 100% 相对生存率,其他组的平均 OD 值与未处理组的平均 OD 值的比值作为该组的相对生存率。

**1.2.6 Western bolt 鉴定 Bax 和 Caspase-3、Caspase-9 在 A2780 细胞中的表达** 实验分组同上。收集 6 孔板中各组 A2780 细胞至 5 mL EP 管中,加入 RIPA 裂解液。放置 5 min 后离心弃去沉淀,然后加入 SDS loading buffer,做 SDS-PAGE 电泳后转膜 20 min。依次加入一抗、二抗振摇 1 h。最后使用化学发光法在凝胶成像系统中观察结果。使用 Quantity One 4.6.2 软件计算各条带的灰度值,以目的蛋白条带与内参  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

**1.2.7 Western bolt 鉴定 A2780 细胞线粒体 CytC 的释放** 实验分组同上。收集各组细胞,PBS 洗涤,离心后用细胞质提取缓冲液重悬。800 r/min 离心 10 min 后弃沉淀,取上清液 10 000 r/min 4 °C 离心 30 min,分别收取以下两部分:一是线粒体的部分,用线粒体提取缓冲液重悬沉淀物;二是细胞质的部分,取上清液部分 10 000 r/min 离心 1 h 后再留取上清液;然后采用 Western bolt 分别对胞质及线粒体内的 CytC 水平进行检测,用 Cox-IV 作为线粒体上样量对照。具体操作方法同 1.2.6。

**1.2.8 统计学方法** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pcDNA3.1-Bax 的鉴定

重组质粒 pcDNA3.1-Bax 使用 RcoR I / Hind III 双酶切后, 10 g/L 琼脂糖电泳可见大小约 600 bp 的片段, 见图 1。将重组质粒 pcDNA3.1-Bax 测序后在 GenBank 中比对, 证实所克隆的 Bax 基因没有突变。

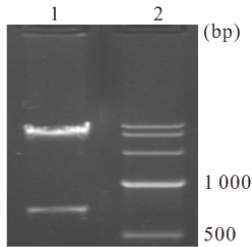


图 1 双酶切鉴定 pcDNA3.1-Bax 质粒

Fig 1 Identification of the pcDNA3.1-Bax by restriction enzyme digestion

1: pcDNA3.1-Bax digested by RcoR I and Hind III; 2: DNA marker

### 2.2 Bax 基因在 A2780 细胞中的过表达

Western blot 结果表明: pcDNA3.1-Bax 转染组 Bax 蛋白表达明显增加, 而 pcDNA3.1(+) 转染

组和未转染组仅有少量 Bax 蛋白表达; pcDNA3.1-Bax 转染组 Bax 蛋白表达量高于 2 个对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

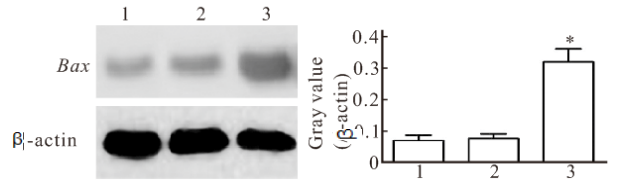


图 2 Bax 基因的过表达

Fig 2 The overexpression of Bax gene in A2780 cells

1: Untreated group; 2: pcDNA3.1(+) group; 3: pcDNA3.1-Bax group. \*  $P < 0.05$ , vs. untreated and pcDNA3.1(+) groups

### 2.3 重组质粒转染对 A2780 细胞凋亡的影响

pcDNA3.1-Bax 转染组的 A2780 细胞的核染色变深, 变得致密、出现核碎裂。而 pcDNA3.1(+) 转染组和未转染组均未出现凋亡的现象, 见图 3。计数凋亡细胞的结果显示: pcDNA3.1-Bax 转染组凋亡细胞数较另 2 组增加 ( $P < 0.05$ )。

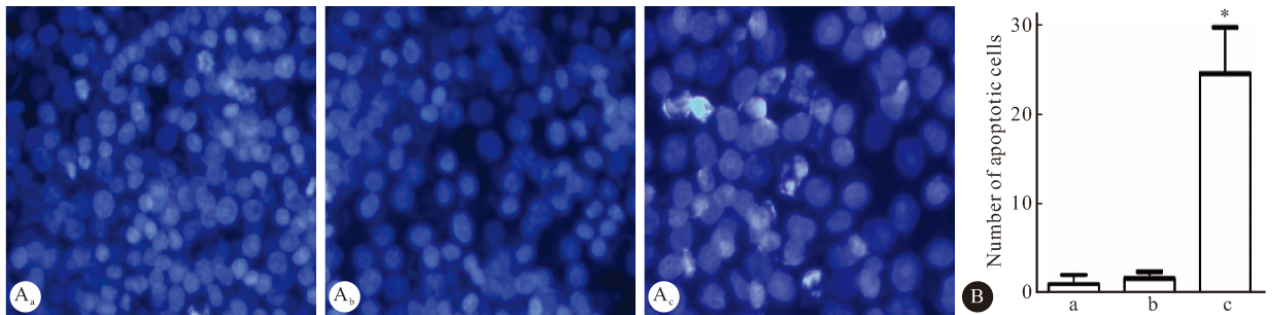


图 3 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡。×400

Fig 3 Apoptotic cells measured by Hoechst 33258 staining. ×400

A: Hoechst 33258 staining of A2780 cells; B: Statistics of number of apoptosis cells; a: Untreated group; b: pcDNA3.1(+) group; c: pcDNA3.1-Bax group. \*  $P < 0.05$ , vs. untreated and pcDNA3.1(+) groups

### 2.4 重组质粒转染对 A2780 细胞活力的影响

MTT 实验结果表明: 未转染组和 pcDNA3.1(+) 转染组的细胞生长状况正常; 而 pcDNA3.1-Bax 转染组的 A2780 细胞出现了明显的生长抑制。转染 24 h 和转染 48 h 的 pcDNA3.1-Bax 转染组细胞存活率低于 2 个对照组 ( $P < 0.05$ ), 而 pcDNA3.1-Bax 转染组 24 h 和 48 h 间细胞存活率的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 4。

### 2.5 重组质粒转染对 A2780 细胞中 Caspase-9 和 Caspase-3 表达的影响

Western blot 结果表明: 相比未转染组和 pcDNA3.1(+) 转染组, pcDNA3.1-Bax 转染组的 A2780 细胞中 Caspase-9 和 Caspase-3 出现激活; pcDNA3.1-Bax 转染组 cleaved Caspase-9 和

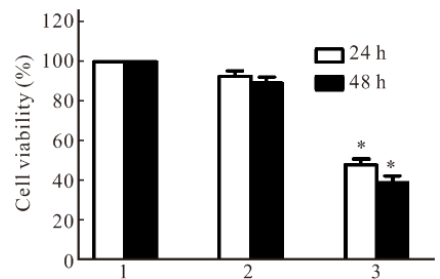


图 4 Bax 基因过表达对 A2780 细胞生长的抑制作用

Fig 4 The inhibition of A2780 cells by overexpression of Bax

1,2,3: Denotes the same as those in fig 2. \*  $P < 0.05$ , vs. untreated and pcDNA3.1(+) groups at the same time point

### 2.6 重组质粒转染对 A2780 细胞线粒体 CytC 释

## 放的促进作用

Western blot 结果表明:相比未转染组和 pcDNA3.1(+) 转染组,pcDNA3.1-Bax 转染组的 A2780 细胞线粒体中 CytC 减少,而细胞质中 CytC 增加,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 6。

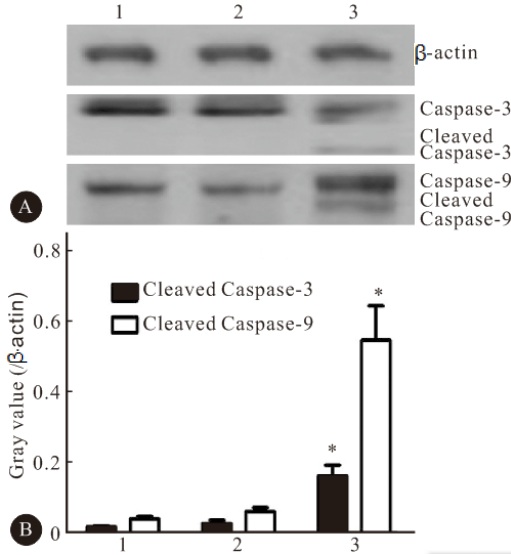


图 5 Western blot 检测 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达

Fig 5 Western blot analysis of expression of Caspase-9 and Caspase-3 in A2780 cells

A: Western blot analysis of Caspase-9 and Caspase-3; B: Statistics of cleaved Caspase-9 and cleaved Caspase-3; 1, 2, 3; Denotes the same as those in fig 2. \*  $P < 0.05$ , vs. untreated and pcDNA3.1(+) groups

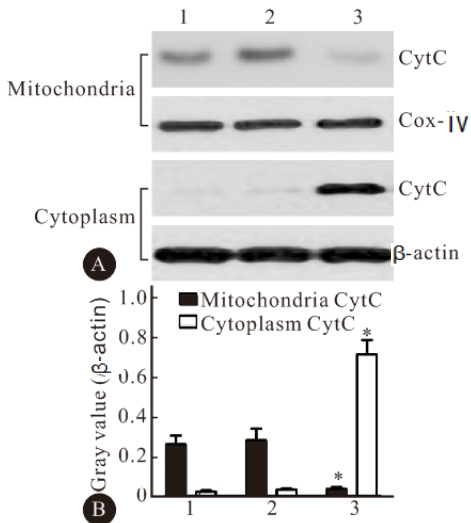


图 6 Western blot 检测 A2780 细胞的线粒体和细胞质中 CytC 的表达  
Fig 6 Western blot analysis of cytochrome C in the mitochondria and the cytoplasm of A2780 cells

A: Western blot analysis of cytochrome C; B: Statistics of cytochrome C in the mitochondria and cytoplasm; 1, 2, 3; Denotes the same as those in fig 2. \*  $P < 0.05$ , vs. untreated and pcDNA3.1(+) groups

## 3 讨论

细胞凋亡是由基因调控的程序性死亡,它是一种维持细胞正常生命活动的生理过程。细胞的凋亡是生物体的一种基本的生命活动,在生物的发育和进化中起着至关重要的作用。

凋亡细胞的形态学改变往往很明显,一般会出现细胞固缩,细胞质变得致密,细胞核浓缩致密,细胞核出现碎片等现象。本研究通过 Hoechst 33258 染色,发现 Bax 能诱导 A2780 细胞凋亡,出现上述典型的凋亡细胞形态学改变。细胞的凋亡机制非常复杂,目前研究比较明了的是外源性途径和线粒体途径。参与调控细胞凋亡的分子有很多。常见的有 Bcl-2 家族、P53 家族还有 Caspase 家族等。Bcl-2 家族的成员众多,大致可以分为促凋亡的 Bcl-2 家族成员和抗凋亡的 Bcl-2 家族成员,Bax 即属于促凋亡的 Bcl-2 家族中的重要成员之一。而 CytC 的释放则是激活下游 Caspase 家族成员的最重要的分子之一,是线粒体凋亡途径中的关键环节<sup>[4-7]</sup>。

Bax 蛋白在凋亡发生的过程中,起到至关重要的作用<sup>[8-10]</sup>。各种原因引起细胞 DNA 损伤后,p53 基因表达增加,通过调控对其下游基因的表达,使细胞生长周期出现停滞,进而出现细胞凋亡<sup>[11]</sup>。p53 会调控 Bcl-2 表达减少,Bax 表达增多,这样 Bcl-2 与 Bax 比例下降。Bax 与 Bcl-2 的拮抗作用主要体现在线粒体水平,Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体出现减少,而相应的 Bax 同源二聚体增多。Bax 能与线粒体膜相结合,组合成渗透性膜转移孔复合物,从而诱导线粒体释放 CytC。CytC 可以和 Caspase-9 结合形成复合体,使下游的 Caspases 蛋白酶发生酶解级联激活,主要是通过 Caspase-3 的激活来诱导细胞凋亡,使得细胞基因组 DNA 裂解,分解细胞骨架<sup>[12-14]</sup>。本研究也证实了 CytC 能被 Bax 诱导,从卵巢癌 A2780 细胞的线粒体中释放出来,进入细胞质后进而激活 Caspase-9 与 Caspase-3,这些效应 Caspases 使得 DNA 发生降解,导致 A2780 细胞出现凋亡。

由于 Bax 在细胞凋亡的线粒体途径中具有重要作用,国内外关于 Bax 的研究很多,但目前国内的文献中还没有 Bax 诱导卵巢癌细胞凋亡的直接报道。本研究成功构建了 pcDNA3.1-Bax 真核表达质粒,该重组质粒在人卵巢癌 A2780 细胞中过表达 Bax 基因,能诱导 A2780 细胞出现线粒体途径的凋亡,释放出线粒体的 CytC,并使 Caspase-9 与

Caspase-3 得以激活。本研究为今后以 *Bax* 为靶点的肿瘤基因治疗打下了基础。

### 参 考 文 献

- 1 Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature*,2000;407(6805):796-801.
  - 2 Wei M, Zong W, Cheng E, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*,2001;292(5517):727-730.
  - 3 袁 铸, 严 飞, 赵新宇等. 小鼠凋亡相关新基因 PNAS-4 真核表达载体的构建、表达及体外抗肿瘤作用. *细胞与分子免疫学杂志*,2007;23(12):1140-1143.
  - 4 Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*,2010;47:99-114. doi: 10.1042/bse0470099.
  - 5 Waterhouse N, Goldstein J, Von Ahsen O, *et al.* Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol*,2001;153(2):319-328.
  - 6 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*,2000;10(9):369-377.
  - 7 施一公. 细胞凋亡的结构生物学研究进展. *生命科学*,2010;22(3):224-228.
  - 8 Schuler M, Maurer U, Goldstein JC, *et al.* p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ*, 2003;10(4):451-460.
  - 9 Fraga H, Bech-Serra JJ, Canals F, *et al.* The mitochondrial intermembrane space oxidoreductase Mia40 funnels the oxidative folding pathway of the cytochrome c oxidase assembly protein Cox19. *J Biol Chem*,2014;289(14):9852-9864.
  - 10 Jimenez-Gutierrez LR, Uribe-Carvajal S, Sanchez-Paz A, *et al.* The cytochrome c oxidase and its mitochondrial function in the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia. *J Bioenerg Biomembr*,2014;46(3):189-196.
  - 11 Widlak P, Garrard W. Roles of the major apoptotic nuclease-DNA fragmentation factor-in biology and disease. *Cell Mol Life Sci*,2009;66(2):263-274.
  - 12 陈登榜, 曹 康, 杨 靖等. *Noxa* 基因的克隆及其诱导 A549 细胞凋亡的研究. *四川大学学报(医学版)*,2013;44(5):713-716.
  - 13 Milosevic J, Hoffarth S, Huber C, *et al.* The DNA damage-induced decrease of Bcl-2 is secondary to the activation of apoptotic effector caspases. *Oncogene*, 2003; 22(44):6852-6856.
  - 14 Jourdain A, Martinou JC. Mitochondrial outer-membrane permeabilization and remodelling in apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*,2009;41(10):1884-1889.
- (2015 - 01 - 13 收稿, 2015 - 04 - 20 修回)  
编辑 余 琳
- 
- (上接第 683 页)
- 9 Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*,2010;32(3):305-315.
  - 10 DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors; implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm*, 2010; 10(2):865-601.
  - 11 Zhang L, Liu D, Pu D, *et al.* The TLR7 agonist Imiquimod promote the immunogenicity of mesenchymal stem cells. *Biol Res*,2015;48(1):6. doi: 10.1186/0717-6287-48-6.
  - 12 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*,2006;124(4):783-801.
  - 13 Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, *et al.* Toll like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*,2007;109(4):1422-1432.
  - 14 Alaina BS, Chen BY, Marc LN, *et al.* Validation of the 2-calculation as alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diag Mol Path*,2006;15(1):56-61.
  - 15 VanPoll D, Parekkadan B, Cho CH, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*, 2008; 47(5):1634-1643.
  - 16 Kong D, Zhuang X, Wang D, *et al.* Umbilical cord mesenchymal stem cells transfusion ameliorated hyperglycemia in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*,2014;60(12):1969-1976.
  - 17 Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, *et al.* Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*,2010;122(23):2419-2429.
  - 18 Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffel SB, *et al.* Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*,2008; 26(1):99-107.
- (2015 - 03 - 12 收稿, 2015 - 07 - 18 修回)  
编辑 余 琳