

Xaf1 诱导 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡机制的研究

夏 焱, 檀卫平, 郭海霞, 刘 勇, 苏浩彬, 方建培
(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510100)

摘 要:【目的】利用 XIAP^{-/-}成纤维细胞,检测在剔除 XIAP 的情况下 Xaf1 诱导细胞凋亡的作用,探索 Xaf1 诱导细胞凋亡的机制。【方法】Xaf1 诱导的 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡由流式细胞 DNA 含量来表示,免疫荧光显微镜检测 XIAP^{-/-}成纤维细胞中 Xaf1 的亚细胞分布,共转染并细胞周期 DNA 含量流式细胞术检测 Bcl2 对 Xaf1 诱导的细胞凋亡的影响,细胞色素 C 流式细胞术检测 Xaf1 对细胞色素 C 释放的调节。【结果】Xaf1 与 TNF α 显著协同诱导 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡,凋亡峰值 27%。Bcl2 能抑制 Xaf1 诱导的 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡,凋亡峰值由 27%下降至 6%。在剔除 XIAP 的情况下,Xaf1 仍可诱导细胞色素 C 释放,峰值为 21%。【结论】Xaf1 通过胱冬肽酶非依赖机制释放细胞色素 C 而诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词: Xaf1; 凋亡; XIAP

中图分类号:R730.3

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)03-0283-04

Investigation of Mechanism of Xaf1 Induction Apoptosis in XIAP^{-/-} Fibroblasts

XIA Yan, TAN Wei-ping, GUO Hai-xia, LIU Yong, SU Hao-bin, FANG Jian-pei

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 XIAP^{-/-} fibroblasts were used to detect the effect of Xaf1 on cell apoptosis without XIAP and to investigate the mechanism of Xaf1 induces cell apoptosis. 【Methods】 The effect of Xaf1 on cell apoptosis were measured by flow cytometry. The sub-cellular localization of Xaf1 in XIAP^{-/-} fibroblasts was estimated by immunofluoresces assay. The effect of Bcl2 on Xaf1 induced apoptosis were measured by DNA content flow cytometry after co-transfection. Regulation cytochrome C releasing by Xaf1 was measured by cytochrome C flow cytometry. 【Results】 Flow cytometry demonstrated that Xaf1 dramatically cooperated with TNF α to induce in XIAP^{-/-} fibroblasts apoptosis, the peak was 27%. Introduction of Bcl2 in XIAP^{-/-} fibroblasts inhibited Xaf1 induced apoptosis, the peak decreased from 28% to 6%. Xaf1 released cytochrome C without XIAP, the peak was 21%. 【Conclusions】 Xaf1 releases cytochrome C and induces cell apoptosis by a caspase independent mechanism.

Key words: Xaf1; apoptosis; XIAP

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(3):283-286, 293]

凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP)是哺乳动物体内的唯一的调节细胞凋亡核心因子——胱冬肽酶活性的一组蛋白酶,其中 XIAP 是 IAP 家族中调节作用最强的凋亡抑制蛋白^[1]。Xaf1 是 XIAP 负性调节因子(XIAP-associate factor 1)之一^[2]。研究表明,Xaf1 在肿瘤细胞中低表达或无表达,这提示 Xaf1 是一种具有潜能的肿瘤抑

制因子^[3]。已有报道发现 Xaf1 结合 XIAP 并使之移位至细胞核,抑制 XIAP 的活性从而诱导细胞凋亡^[2]。我们利用“基因开关”诱导表达 Xaf1 细胞株^[4]的系列研究发现,Xaf1 与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF α) 显著协同诱导细胞凋亡,但其协同机制不是解除 XIAP 对胱冬肽酶活性的抑制^[5],可能还存在一些未明的 Xaf1 诱导凋亡的

收稿日期:2007-12-25

基金项目:国家中医药管理局基金(2005LHR08)

作者简介:夏 焱(1970-),女,云南昆明人,博士,副主任医师,E-mail: kellyxia2005@gmail.com;苏浩彬,通讯作者

旁路机制。为此,本文将 Xaf1 转染入 XIAP 基因敲出的成纤维细胞,在剔除 XIAP 影响的情况下,探讨肿瘤抑制因子 Xaf1 诱导肿瘤细胞凋亡的机制,为将 Xaf1 导入肿瘤细胞表达,增强肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性提供实验理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 XIAP^{-/-}成纤维细胞(取自 XIAP 基因敲出小鼠胚胎),由 Dr.Andrew Phillips 惠赠,由 doxycycline 诱导稳定表达 Xaf1 的 Saos-2 细胞系已建系成功^[4]。

1.1.2 质粒 pCDNA 3.1 HA-Xaf1,pCMV CD20,pCDNA 3.1 Baculovirus P35,pCDNA 3.1 Ik-B SR 和 pCMV Bcl2 表达质粒由 Dr.Andrew Phillips 惠赠。

1.1.3 抗体 抗 HA F7 单克隆抗体(购自美国 Santa Cruz F289),抗 Actin 单克隆抗体(购自美国 Sigma F6188),抗细胞色素 C 单克隆抗体(购自美国 Pharmingen 556432),Ig-FITC 荧光抗体(购自美国 DAKO,F0479),辣根过氧化物酶(HRP)偶和抗鼠抗体(购自美国 Amersham Biosciences)。

1.1.4 试剂 细胞培养液 Dulbecco's modified Eagle's medium 和胎牛血清(购自美国 Cellgro),MEF 培养基,体外钙离子沉淀真核细胞转染试剂组,DNA 染色及流式细胞检测试剂组,以及改良细胞色素 C 胞内染色试剂组由 Dr.Andrew Phillips 提供。doxycycline(购自美国 Fisher,2 g/L),TNF α (购自美国 Endogen 3 μ g/L),Digitonin(购自美国 Calbiochem,50 mg/L),RNase A(购自美国 Fisher,50 mg/L),PVDF 膜(购自美国 Amersham Hybond-P),大剂量质粒扩增提纯试剂盒(购自美国 Qingene)。

1.2 方法

1.2.1 成纤维细胞的培养 处死 XIAP^{-/-}孕鼠,酒精浸泡后剪开子宫,剥离胞膜并剪掉头和内脏,PBS 冲洗胚胎 2 次,切碎胚胎,快速反复吹打液体,4 $^{\circ}$ C 离心后弃上清,胰酶消化 30 min,将细胞悬液倒入 10 mL 的 MEF 培养基的离心管中,以 200 目尼龙过滤网过滤并离心后收集细胞,10 mL 的 MEF 培养基洗涤 2 次,按以下要求种植。

1.2.2 流式细胞 DNA 含量检测 3×10^5 XIAP^{-/-}成纤维细胞种植于六孔板中过夜培养,收集细胞以 PBS 洗涤和甲醛固定后,用 Propidium iodide 荧光染色 DNA,并以 RNase 消化 RNA。用流式细胞仪检测 DNA 的含量,DNA 含量低于 2 倍(2N)的细胞群为凋亡细胞。

1.2.3 共转染 CD20 染色合并细胞周期 DNA 含量流式细胞仪检测 5×10^6 XIAP^{-/-}成纤维细胞在含有 100 mg/L 胎牛血清的 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)中培养。钙离子沉淀法共转染 10 μ g 目的表达质粒和 2 μ g pCMV CD20 表达质粒(转染标记)进入细胞。去除钙离子沉淀 18 h 后加入 TNF α (3 μ g/L)24 h,收集悬浮和帖壁的细胞。经多聚甲醛在 4 $^{\circ}$ C 固定 2 h,以磷酸盐缓冲液洗涤数次后,用 Propidium iodide 荧光染色 DNA,并以 RNase 消化 RNA。转染细胞的鉴定分离用文献报道方法,转染表达 CD20 并染色细胞,CD20 染色阳性的细胞为转染细胞。用流式细胞仪检测转染细胞中 DNA 的含量,DNA 含量低于 2 倍(2N)的细胞群为凋亡细胞。

1.2.4 共聚焦免疫荧光显微镜检测 XIAP^{-/-}成纤维细胞种植于盖玻片上培养经 doxycycline 处理后 18 h,以 40 g/L 多聚甲醛固定后,以 4 $^{\circ}$ C 的含 2 g/L TritonX-100 磷酸缓冲液处理细胞 5 min,用含 3 mL/L 白蛋白和 10 mL/L 胎牛血清的磷酸缓冲液封闭 30 min,分别以一抗(抗 HA F7 单克隆抗体(1:100)),识别 HA-Xaf1 蛋白;和二抗(抗鼠荧光抗体 Alexa 488 (1:200))孵育细胞各 1 h,再以 DAPI 染色 10 min,用抗荧光退色剂将盖玻片固定于载玻片上,以共聚焦免疫荧光显微镜检测带有荧光的 Xaf1 蛋白和细胞核染色质。

1.2.5 细胞色素 C 联合 DNA 含量的流式细胞仪检测法 Xaf1-Saos 细胞或 XIAP^{-/-}细胞以 2×10^5 密度种植,并用 doxycycline(2 g/L)处理细胞或转染后 24 h。细胞以胰酶消化,PBS 缓冲液漂洗,在 200 μ L digitonin 缓冲液(含 digitonin 50 mg/L,0.1 mol/L KCl 的 PBS)中于冰上孵育 5 min,40 g/L 多聚甲醛 500 μ L 于室温固定 20 min。用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 3 次,用 500 μ L 封闭液(含 30 g/L 牛血清白蛋白,0.5 g/L sapnin 的磷酸盐缓冲液)封闭 1 h 后,以抗细胞色素 C 抗体于 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。经磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,细胞用 50 μ L 抗 Ig-FITC 抗体孵育 1 h;再次以磷酸盐缓冲液漂洗,重

悬浮于 400 μL 含有 propidium iodide 和 RNase A 的磷酸盐缓冲液中室温孵育 1 h 后待检。在流式细胞仪上以 FL2 分析 DNA 含量,FL1 检测细胞色素 C 荧光。

2 结 果

2.1 Xaf1 诱导 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡

瞬时转染 Xaf1 表达质粒入 XIAP^{-/-}成纤维细胞后 24 h,RT-PCR 已测定 Xaf1 mRNA 在细胞内高表达,共转染标记 CD20 染色阳性的细胞鉴定为被转染细胞。在 CD20 阳性的转染细胞中,Xaf1 可诱导约 15.6% ± 2.3% 的细胞凋亡,是对照转染空质粒载体的 2 倍多(5.1% ± 2.1%,图 1)。免疫荧光染色显示蛋白水平的 Xaf1 在 XIAP^{-/-}成纤维细胞中仍位于细胞核内(图 2,试验结果重复 3 次)。

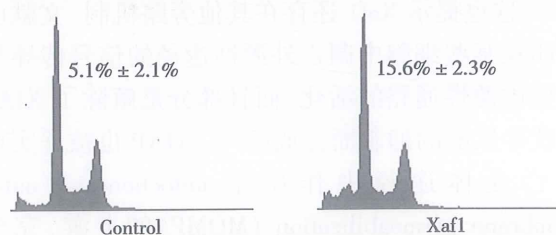


图 1 Xaf1 诱导 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡

Fig.1 Xaf1 induced apoptosis in XIAP^{-/-}fibroblasts

Flow cytometric profiles showing DNA content (x-axis) against cell number (y-axis) for XIAP^{-/-}fibroblasts which were transfected with plasmids driving expression of Xaf1 or control empty vector and pCMV-CD20. Percentage figure indicates cells with less than 2N DNA content.

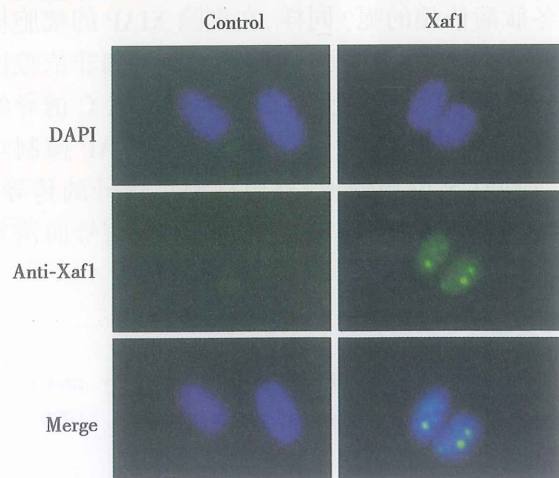


图 2 XIAP^{-/-}成纤维细胞中 Xaf1 的免疫荧光染色

Fig.2 Immunofluorescence of Xaf1 in XIAP^{-/-}fibroblasts

Immunofluorescence of cells expressed Xaf1. Cells are stained with anti-HA (Xaf1 Green) and DAPI (Blue).

2.2 Xaf1 协同 TNFα 诱导细胞凋亡

在剔除 XIAP 的影响下,Xaf1 和 TNFα 可协同诱导 27.3% ± 2.8% 的 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡,和转染空质粒载体的对照组相比,协同作用十分显著(图 3,试验结果重复 3 次)。

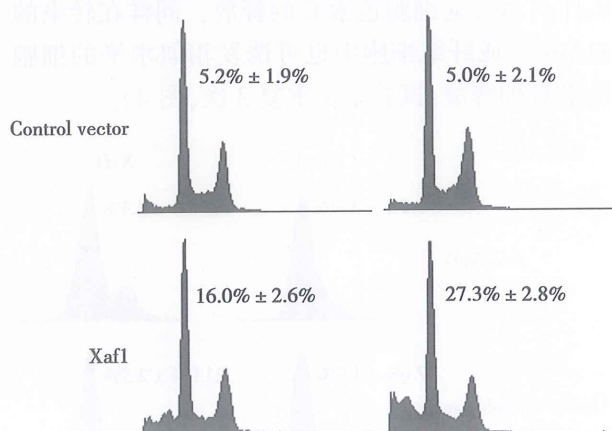


图 3 Xaf1 协同 TNFα 诱导 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡

Fig.3 Xaf1 cooperated with TNFα in XIAP^{-/-} fibroblasts

Flow cytometric profiles showing DNA content (x-axis) against cell number (y-axis) for XIAP^{-/-}fibroblasts which were transfected with plasmids driving expression of Xaf1 or control empty vector and pCMV-CD20. The cells were treated with TNFα for 24 hours. Percentage figure indicates cells with less than 2N DNA content.

2.3 Xaf1 参与调节内源性的信号传导

本研究用瞬时转染技术将表达凋亡抑制蛋白的质粒转染入 XIAP^{-/-}成纤维细胞中,用 TNFα 处理细胞,分析被转染的 XIAP^{-/-}细胞凋亡的情况。Baculovirus P35 是广谱特异的胱冬肽酶抑制剂,可抑制由 Xaf1 独立诱导或 Xaf1 协同 TNFα 诱导的细胞凋亡,作为阳性对照;NF-κB 活性抑制蛋白(Iκ-B 超抑制子)对所诱导的凋亡没有影响,作为阴性对照。结果发现在细胞内诱导表达 Bcl-2 能抑制由 Xaf1 独立或 TNFα 诱导的细胞凋亡,这提示在无 XIAP 的参与下,Xaf1 仍然调节内源性凋亡信号的传导(表 1;试验结果重复 3 次)。

表 1 Bcl2 抑制由 Xaf1 诱导的 XIAP^{-/-}成纤维细胞凋亡

Table 1 Bcl-2 controlled apoptosis of XIAP^{-/-} fibroblastocyte induced by Xaf1 (%)

Apoptotic cells	Control	Xaf1	Xaf1+TNFα
Vector	4.9 ± 2.1	15.7 ± 1.8	28.0 ± 2.9 ¹⁾
I-κBsr	5.0 ± 2.2	14.8 ± 2.4	29.5 ± 2.6
P35	6.6 ± 1.9	7.2 ± 2.1	7.2 ± 2.1
Bcl2	3.9 ± 2.7	5.1 ± 2.2	6.0 ± 2.1 ¹⁾

1) Compared with the control, P < 0.05

2.4 Xaf1 不依赖胱冬肽酶释放细胞色素 C 诱导肿瘤细胞凋亡

本研究以 Xaf1 诱导细胞株 (Saos-Xaf1) 作为对照, 以改良文献报道的定量测定细胞色素 C 释放的方法。结果显示, 在对照的 Xaf1 诱导细胞中, Xaf1 可诱导的细胞色素 C 的释放, 同样在转染的 XIAP^{-/-}成纤维细胞中也可诱发相似水平的细胞色素 C 的释放(试验结果重复 3 次, 图 4)。

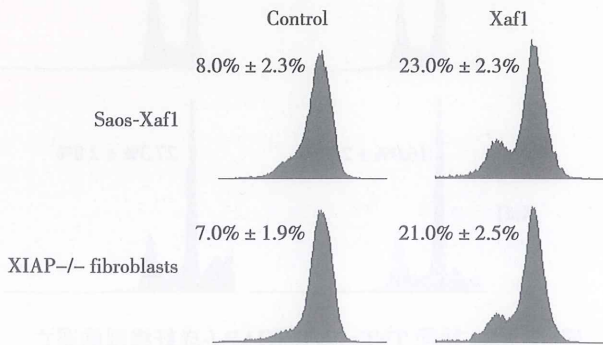


图 4 Xaf1 不依赖胱冬肽酶释放细胞色素 C 细胞凋亡

Fig.4 Xaf1 triggers cytochrome C release by a caspase independent mechanism

The effect of Xaf1 induced cytochrome C release was measured by flow cytometry. Xaf1 inducible cells were treated with doxycycline and XIAP^{-/-} fibroblasts were transfected with Xaf1 for 24 hours and harvested for flow cytometry. Flow cytometric profiles showing log cytochrome C fluorescence (x-axis) and cell number (y-axis). Percentage figure indicates cells with released cytochrome C.

3 讨论

Xaf1 是首先作为 XIAP 的结合蛋白而被克隆出来的, 可引起 XIAP 重新从细胞质移位到细胞核, 拮抗 XIAP 对胱冬肽酶 3 的抑制效应^[6]。利用骨肉瘤细胞株 Xaf1-saos 的系列研究发现 Xaf1 可独立诱导细胞凋亡, 推测这种作用就是 Xaf1 解除了 XIAP 对胱冬肽酶的抑制效应。但是进一步的研究没有发现任何证据显示 Xaf1 和 XIAP 有关联性, 两者也分布于不同的细胞区域, 显然 Xaf1 诱导细胞凋亡还存在其他 XIAP 非依赖性的旁路机制^[4,5]。基于上述结果, 我们推测还存在一种可能性, 即微量的 Xaf1 足以完全抑制细胞浆内 XIAP 的功能, 所以即使能观察到 Xaf1 诱导凋亡的作用, 但检测不到 Xaf1 和 XIAP 有关联性。那么, Xaf1 诱导细胞凋亡是否为 XIAP 非依赖性的呢?

为此, 我们设计了剔除 XIAP 的细胞模型, 进一步探索 Xaf1 诱导细胞凋亡的作用^[7]。本研究从 XIAP 基因敲出小鼠胚胎中分离培养到 XIAP^{-/-}成纤维细胞, 瞬时转染 Xaf1 表达质粒后以 TNF α 处理细胞, 发现在剔除 XIAP 的影响下, Xaf1 仍然能独立诱导细胞凋亡, 与 TNF α 也有显著的协同作用, 而且 Xaf1 在亚细胞区域的分布没有因为 XIAP 的剔除而改变, 这强烈提示 Xaf1 确实通过非依赖 XIAP 的旁路机制诱导细胞凋亡。

Xaf1 能显著协同 TNF α 诱导细胞凋亡, 提示 Xaf1 在细胞凋亡的外源性信号通路(即死亡受体通路)中起着特殊的作用, 我们前期的研究证实 Xaf1 虽然参与了调节 TNFR 信号传导, 但是 Xaf1 对 TNF α 介导的 NF- κ B 和 JNK/SAPK 活性影响并不显著, 这种 Xaf1 对 TNFR 信号传导的轻度抑制, 只是 Xaf1 协同 TNF α 诱导细胞凋亡的机制之一^[5], 这也提示 Xaf1 还存在其他旁路机制。文献已证明在某些细胞中凋亡外源性途径的信号传导是需要内源性通路的活化, 而且部分是解除了 XIAP 对胱冬肽酶的抑制而完成的^[8]。XIAP 也被证实死亡受体途径中作用于 mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) 的上游, 完全抑制胱冬肽酶 3 的活化而抑制细胞凋亡^[9]。我们的研究证实 Bcl-2 可抑制 Xaf1 诱导的细胞凋亡, 提示 Xaf1 参与调节内源性通路的信号传导, 深入的研究发现 Xaf1 通过触发线粒体释放细胞色素 C 来扩大和增强凋亡信号。那么, 这个调节机制是 Xaf1 解除 XIAP 对胱冬肽酶的抑制呢? 还是非胱冬肽酶依赖的呢? 同样, 在剔除 XIAP 的细胞模型中, 本研究结果显示 Xaf1 以胱冬肽酶非依赖性方式作用于线粒体上游, 释放细胞色素 C 诱导细胞凋亡。综上所述, Xaf1 除了解除 XIAP 抑制功能, 协同(至少部分地)外源性凋亡信号的传导, 还通过 XIAP 非依赖机制活化内源性信号而诱导细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (3):239-252.
- [2] Liston P, Fong WG, Kelly NL, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(2):128-133.