

## Xaf1 与 TNF 协同诱导细胞凋亡机制的初步探索

夏焱<sup>1</sup>, 马国川<sup>2</sup>, 郭海霞<sup>1</sup>, 苏浩彬<sup>1</sup>, 方建培<sup>1</sup>, 黄绍良<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510100; 2. 广东省体育运动技术学院体育医院, 广东 广州 510100)

**摘要:**【目的】利用 Xaf1 诱导细胞株, 检测 Xaf1 与一些细胞凋亡激动剂协同诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 初步探索 Xaf1 诱导凋亡的机制。【方法】Xaf1 与细胞凋亡激动剂协同诱导的细胞凋亡由流式细胞检测 DNA 含量来表示, 免疫荧光显微镜检测法与细胞核浆分离法检测 Xaf1 诱导细胞中 Xaf1 与 XIAP 的亚细胞分布, 免疫沉淀法检测 Xaf1 与 XIAP 的关联性。【结果】流式细胞术 DNA 含量检测发现 Xaf1 与 TNF 显著协同诱导细胞凋亡, 凋亡峰值为 49%, 而 Xaf1 与阿霉素无协同作用, 凋亡峰值为 27%, 免疫荧光显微镜检测及细胞核浆分离法结果显示 Xaf1 位于细胞核内, 而 XIAP 却位于细胞质。【结论】Xaf1 与 TNF 显著协同诱导细胞凋亡, 其协同机制可能不是解除 XIAP 对胱冬肽酶活性的抑制。

关键词: Xaf1; XIAP; 凋亡; TNF

中图分类号: R730.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0374-04

## Primary Investigation of Mechanism of Xaf1 Cooperated with TNF Induced Apoptosis

XIA Yan<sup>1</sup>, MA Guo-chuan<sup>2</sup>, GUO Hai-xia<sup>1</sup>, SHU Hao-bin<sup>1</sup>, FANG Jian-pei<sup>1</sup>, HUANG Shao-liang<sup>1</sup>

(1. Department of Pediatric, Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. Sports Hospital, Sports Technical Institute of Guangdong, Guangzhou 510100, China)

**Abstract:**【Objective】Xaf1 inducible cell lines were used to detect the ability of Xaf1 cooperating with some apoptosis inducers and to investigate the mechanism of Xaf1 induced apoptosis. 【Methods】The effect of Xaf1 cooperated with some apoptosis inducers on apoptosis was measured by flow cytometry. The sub-cellular localization of Xaf1 and XIAP in Xaf1 inducible cells was estimated respectively by immunofluorescence assay and cell fractionation assay. The association between Xaf1 and XIAP was detected by immunoprecipitation. 【Results】Flow cytometry demonstrated that Xaf1 dramatically cooperated with TNF to induce apoptosis, the apoptosis peak was 49%, but Xaf1 did not cooperate with adriamycin, the apoptosis peak was 27%. Immunofluorescence assay and cell fractionation assay showed that Xaf1 located in the nucleus while XIAP located in the cytosol. 【Conclusions】Xaf1 cooperated with TNF dramatically to induce apoptosis. The mechanism of cooperation may not be releasing XIAP mediated caspase inhibition.

Key words: Xaf1; XIAP; Apoptosis; TNF

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):374-377,382]

胱冬肽酶 (caspases) 是肿瘤细胞凋亡的中心介导因子。凋亡抑制蛋白 (inhibitors of apoptosis protein, IAP) 是至今发现唯一存在于哺乳动物体内的调节胱冬肽酶活性的蛋白酶。XIAP (X chromosome-linked inhibitors of apoptosis protein) 是 IAP 家族中调节作用最强, 也是研究最广泛的凋

亡抑制蛋白<sup>[1]</sup>。目前发现, XIAP 有两组功能不同的负性调节因子, 其中一种是从酵母双杂交系统中鉴定到的 XIAP 相关因子, 称为 Xaf1 (XIAP associate factor 1)<sup>[2]</sup>。研究表明, Xaf1 在肿瘤细胞中低表达或无表达, 提示 Xaf1 是一种具有潜能的肿瘤抑制因子。已有报道 Xaf1 可以增强一些凋亡激

收稿日期: 2005-09-06

基金项目: 国家中医药管理局基金资助项目 (2005LHR08)

作者简介: 夏焱 (1970-), 女, 云南昆明人, 博士, 主治医师; 马国川, 副主任医师, 通讯作者. E-mail: maguochuan@gmail.com.

动剂的作用,但具体机制尚未明了<sup>[3]</sup>。本文利用四环素调控“基因开关”诱导表达 Xaf1 的细胞株,进一步研究 Xaf1 和一些凋亡激动剂的协同作用,并初步探讨 Xaf1 诱导细胞凋亡的机制,为将肿瘤抑制因子 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 由 doxycycline 诱导稳定表达 Xaf1 的 Saos-2 细胞系已建系成功,见文献[4]。

1.1.2 质粒 pCDNA3.1 HA-Xaf1 和 pEEP-Flag XIAP 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 XIAP 单克隆抗体(购自美国 Stressgen AAM-50),抗 Flag M2 单克隆抗体(购自美国 Sigma F3165),抗鼠荧光抗体 Alexa 488(购自美国 Molecular Probe A11008),辣根过氧化物酶(HRP)耦合抗鼠抗体(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),大剂量质粒扩增提纯试剂盒(购自美国 Qingene)。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,免疫印迹试剂组,免疫沉淀试剂组和免疫荧光检测试剂组由 Dr. Andrew Phillips 提供。doxycycline(购自美国 Fisher), TNF(购自美国 Endogen), CHX (cycloheximide 购自美国 Fisher), TRAIL/Apo2L(购自美国 Cellsciences) 和阿霉素(adriamycin 购自美国 Sigma)。蛋白 A 琼脂糖珠(购自美国 Pierce20398), PVDF 膜(购自美国 Amersham Hybond-P), 抗荧光退色剂(购自美国 Molecular Probes)。

### 1.2 方法

1.2.1 流式细胞 DNA 含量检测  $3 \times 10^5$  Xaf1-Saos 细胞种植于 6 孔板中过夜培养,经 doxycycline (2 g/L), TNF (3  $\mu$ g/L), CHX (4  $\mu$ g/L), TRAIL/Apo2L (4  $\mu$ g/L), 阿霉素 (adriamycin 2 mg/L) 和紫外线 (UV 500J) 处理后 24 h 收集细胞,以磷酸缓冲液洗涤和甲醛固定后,用 propidium iodide 荧光染色 DNA,并以 RNA 酶消化 RNA。用流式细胞仪检测细胞 DNA 的含量, DNA 含量低于 2N (即 2 倍染色体)

的细胞群为凋亡细胞。

1.2.2 共聚焦免疫荧光显微镜检测 Xaf1-Saos 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,4 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,分别以一抗即抗 HA F7 单克隆抗体(1:100)识别 HA-Xaf1 蛋白或抗 HILP/XIAP 单克隆抗体(1:200)识别 XIAP 蛋白;和二抗即抗鼠荧光抗体 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不同荧光的 Xaf1 蛋白、XIAP 蛋白和细胞核染色质。

1.2.3 细胞核浆分离抽提法  $1 \times 10^6$  Xaf1-Saos 细胞中加入 2 g/L doxycycline 和/或 3  $\mu$ g/L TNF 处理 24 h,分离抽提细胞核及细胞浆。以磷酸缓冲液漂洗细胞,胰酶消化,室温离心(2 500 r/min, r=15 cm)5 min。离心沉淀物以冰冻磷酸缓冲液洗涤,重悬浮于 200 mL 缓冲液 A 中,冰上孵育 15 min。加入 12.5  $\mu$ L 10 g/L 的 NP-40,震荡离心沉淀物 15 s,4 快速离心(1 300 r/min, r=15 cm) 1 min,收集含有细胞浆蛋白的上清液。再用缓冲液 A 洗涤离心沉淀物,加入 30  $\mu$ L 缓冲液 C 震荡离心沉淀物 15 min,4 离心(1 300 r/min, r=15 cm) 5 min。收集含有细胞核蛋白的上清液。免疫印迹法检测细胞核和细胞浆提取物。

1.2.4 免疫沉淀  $8 \times 10^5$  Xaf1-Saos 细胞过夜培养,以钙离子沉淀法将重组质粒 pCDNA3.1 HA-Xaf1 和 pEEP-Flag XIAP 瞬时转染入细胞,移去钙离子沉淀 18 h 后用细胞裂解液 (CLB) 收集细胞。4 离心(12 000 r/min, r=15 cm) 10 min 清除细胞碎片,以 20  $\mu$ L 含蛋白 A 琼脂糖珠的细胞裂解液 (CLB) 在 4 预处理 30 min 细胞裂解的上清液,再以相应的抗体(抗 HA F7 单克隆抗体或抗 Flag M2) 2  $\mu$ L 在 4 孵育 2 h 后,加入 20  $\mu$ L 蛋白 A 琼脂糖珠 4 孵育 30 min。获得的免疫沉淀物以细胞裂解液 (CLB) 洗涤 4 次,磷酸缓冲液洗涤 1 次,重悬浮于 30  $\mu$ L SDS-PAGE 加样缓冲液,免疫印迹法检测蛋白复合体。

1.2.5 免疫印迹 细胞核和细胞浆提取物加入相同体积 SDS-PAGE 样本缓冲液,煮沸 5 min,加样于 100 g/L SDA-PAGE, 100~150 V 跑胶 6 h 后 4 过夜转至 PVDF 膜上,以含 5 mL/L skim milk 的

TBST封闭 PVDF 膜 2 h, 再以一抗(抗 HA F7 单克隆抗体(1 1 000), 识别 HA- Xaf1 蛋白或抗 HILP/ XIAP 单克隆抗体 (1 2 000), 识别 XIAP 蛋白); 和二抗 (辣根过氧化物酶 (HRP) 耦合鼠抗体 (1 4 000)) 分别孵育 PVDF 膜各 1 h, 洗膜后以 ECL 试剂化学显影于 X 线片上。

## 2 结 果

### 2.1 Xaf1 与 TNF $\alpha$ 协同诱导细胞凋亡

在 Xaf1- Saos 诱导细胞株中, Xaf1 独立诱导的细胞凋亡为 21%。死亡受体配体 - 肿瘤坏死因子 (TNF) 可独立诱导 9% 的细胞凋亡, 二者合并可诱导出约 50% 的细胞凋亡; 这个水平足以清除掉培养体系中所有细胞。另一个死亡受体配体 Apo2L/TRAIL 合并 Xaf1 可诱导出约 22% 细胞凋亡, 与 Xaf1 独立诱导的细胞凋亡水平 (21%) 相似, 但不如 Xaf1 与 TNF 显著。暴露紫外线 (UV) 可引起培养体系中 29% 的细胞凋亡, 协同 Xaf1 则可引起约 50% 细胞凋亡, 但协同作用仍然不如 Xaf1 与 TNF 显著。CHX 是蛋白合成抑制剂, 合并 TNF 作用能诱导 77% 的细胞凋亡, 作为阳性对照。阿霉素 (Adr) 可独立诱导出 28% 的细胞凋亡, 合并 Xaf1

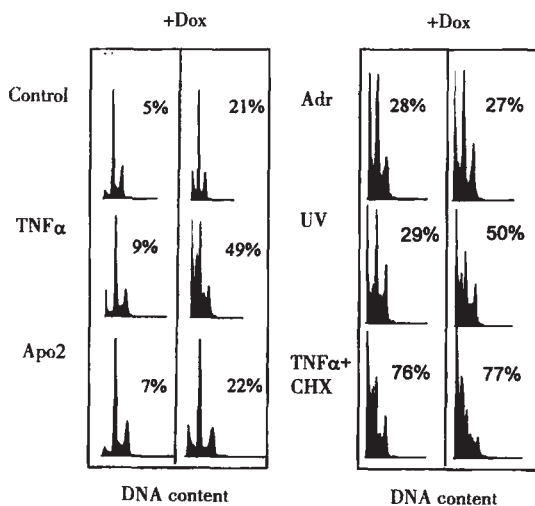


图 1 Xaf1 协同 TNF 诱导凋亡  
Fig.1 Xaf1 cooperated with TNF in the induction of apoptosis

Flow cytometric profiles show Xaf1 inducible cells treated with doxycycline (Dox), TNF, Apo2L, TNF +CHX, adriamycin (Adr) and UV as indicated in the figure. Percentage figure indicates cells with less than 2 N DNA content.

表达并不影响阿霉素诱导的细胞凋亡水平 (27%) (图 1), 两者间无协同作用。

### 2.2 Xaf1 与 XIAP 分布于细胞内不同区域

免疫印迹结果显示 Xaf1 与 TNF 独立或二者合并作用不影响 XIAP 在细胞内的表达 (图 2)。在未经 doxycycline 处理的细胞中, XIAP 位于细胞质中 (XIAP 的染色特性也和在其他细胞中所见相同); 诱导 Xaf1 表达后并不影响 XIAP 的细胞内区域分布, 也不影响 XIAP 的染色特性。和 XIAP 相比, Xaf1 则表达于细胞核内, 二者分布于不同的亚细胞区域 (图 3)。本研究同时采用核浆分离技术分离细胞核和细胞质, 检测核浆中 Xaf1 和 XIAP 的量化含量, 以确证 XIAP 和 Xaf1 确实位于不同的亚细胞区域, 结果显示 XIAP 位于细胞质中, 而 Xaf1 则位于细胞核中 (图 4)。

### 2.3 Xaf1 与 XIAP 在 Saos- 2 不相关联

磷酸钙法瞬时转染 HA- Xaf1 与 Flag- XIAP 进入 Saos- 2 母细胞, 免疫沉淀法检测结果显示, 虽然 Xaf1 与 XIAP 表达较高水平, 但两者间没有检

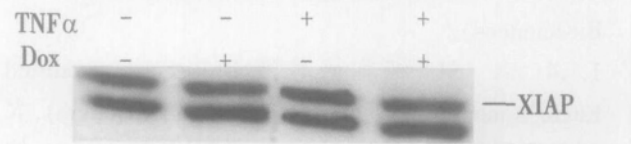


图 2 XIAP 细胞内表达水平

Fig.2 XIAP expression level in cells

Western blot shows XIAP levels after treatment with doxycycline (Dox), TNF for 24 h. The band indicated is XIAP; the slightly higher band is a non- specific cross- reacting band

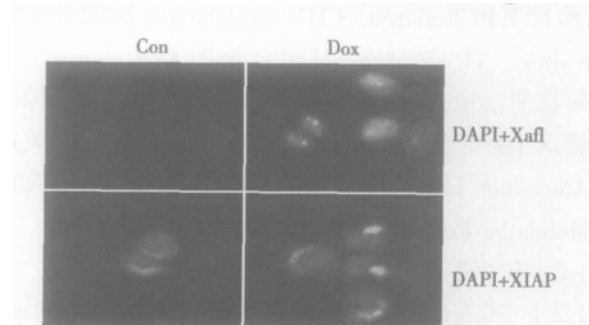


图 3 免疫荧光镜检 Xaf1 和 XIAP 在细胞内的分布

Fig.3 Immunofluorescence of Xaf1 and XIAP located in cells

Immunofluorescence of cells treated as indicated with doxycycline (Dox) for 18 h. In the top panels, the cells are stained with anti- HA (Xaf1 green) and DAPI (blue). In the lower panels, the cells are stained with anti- XIAP (green) and DAPI (blue)

测到关联性(图 5)。

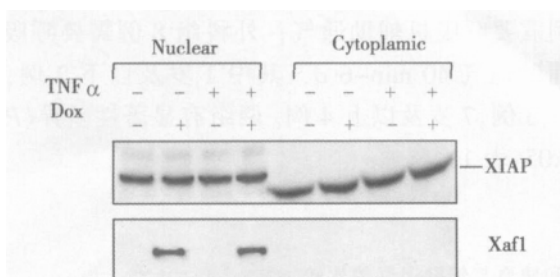


图 4 细胞核质分离物

Fig.4 Nuclear and cytoplasmic fractions

Xaf1 inducible cells were treated with doxycycline (Dox), TNF  $\alpha$ , doxycycline +TNF  $\alpha$  for 24 hours as indicated in the figure. Cells were harvested, nuclear and cytoplasmic proteins were isolated. Western blot showed the levels of Xaf1 and XIAP in nuclear and cytoplasmic fractions

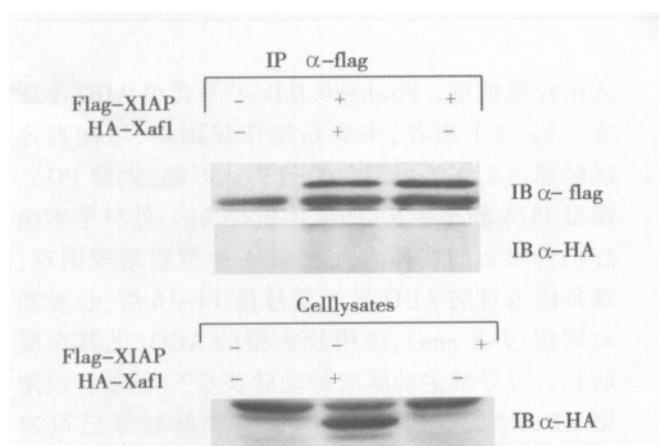


图 5 Xaf1 和 XIAP 免疫沉淀

Fig.5 Immuno-precipitation of Xaf1 and XIAP

Extracts of Saos2 cells transfected with plasmids encoding Flag-XIAP and HA-Xaf1 as indicated were immuno-precipitated with anti-Flag and immuno-blotted with anti-HA and anti-Flag as indicated. Lower panel is a Western blot using extract corresponding to 10% of protein used in the immuno-precipitation

### 3 讨论

#### 3.1 Xaf1 和 TNF 协同诱发细胞凋亡

Xaf1 增强凋亡激动剂的作用是泛化的还是特异的呢? 为此, 本研究采用了一系列外源性和内源性凋亡通路激动剂, 检测其与 Xaf1 协同诱导细胞凋亡的情况。Xaf1 可与死亡受体配体(外源性凋亡通路激动剂) 协同作用诱导细胞凋亡, 而且与 TNF 的协同作用最为显著; 但是 Xaf1 与激活内源性凋亡通路的阿霉素却无协同作用, 提示 Xaf1 可能在增强外源性凋亡信号转导中起着某些特异

的作用<sup>[3,6]</sup>。紫外线曾被认为是内源性凋亡通路的激动剂, 能触发细胞色素 C 从线粒体释放; 但是紫外线在某些细胞中还可激活胱冬肽酶 8, 也可引起细胞受体如 Fas 和 TNFR 的激活和聚集, 参与了外源性凋亡通路的激活<sup>[7]</sup>。我们的研究显示紫外线也可与 Xaf1 有协同作用。因此, Xaf1 虽然与 TNF 有着显著而特异的协同作用, 但这种协同作用是否仅限于外源性的激动剂还需进一步证实。

#### 3.2 Xaf1 与 XIAP 关联性的探讨

TNF 和 Xaf1 之间显著的协同作用提示 Xaf1 在 TNF 诱导的细胞凋亡中起着特殊的作用。Xaf1 是首先作为 XIAP 的结合蛋白而被克隆出来的, 有拮抗 XIAP 对胱冬肽酶 3 的抑制效应, 而且在某些细胞中共转染 Xaf1 与 XIAP, 可引起 XIAP 重新从细胞质移位到细胞核<sup>[2]</sup>。因此, 研究者们提出一个模型, 认为 Xaf1 之所以能增强细胞对凋亡刺激的敏感性是因为 Xaf1 使 XIAP 重新移位, 从而拮抗了 XIAP 的功能。在我们建立的 Xaf1 诱导细胞株中, 发现 Xaf1 与 TNF 有显著的协同作用, 首先推测这种作用可能就是 Xaf1 解除了 XIAP 对胱冬肽酶的抑制效应。我们为此检测 Xaf1 与 TNF $\alpha$  的协同作用是否是 Xaf1 拮抗了 XIAP 的功能。但是, 在 Saos-2 细胞中我们没有发现任何证据显示 Xaf1 和 XIAP 有关联性, 二者也分布于不同的细胞区域, 这显然不是通过解除 XIAP 对胱冬肽酶的抑制。理论上, 如果 Xaf1 诱导细胞凋亡是 XIAP 非依赖性的, 那么如何解释其他研究者发现的这两种蛋白的关联性并报道 XIAP 可抑制 Xaf1 的细胞凋亡呢? 我们从 Smac (XIAP 的另一组负性调节因子) 和 XIAP 关联性可以得到启示。Smac 能拮抗 XIAP 的功能, 而 XIAP 则介导泛素作用而抑制 Smac 的功能。尽管在体外系统 XIAP 的这个作用非常明显, 但具体机制不明。近期的研究报道, giant IAP Apollon 在体外介导 Smac 的降解, 从而抑制由小量 Smac 和胱冬肽酶诱导的细胞凋亡, 这提示 IAPs 抑制其他亲凋亡分子的机制不同于 IAPs 抑制胱冬肽酶的机制<sup>[8]</sup>。

如果 Xaf1 在增强 TNF 诱导细胞凋亡中起着特异的作用, 而且不是通过解除 XIAP 对胱冬肽酶的抑制。那么推测 Xaf1 可能直接增强肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 的表达从而诱导细胞凋亡; 或者是 Xaf1 抑制外源凋亡信号转导通路中抗凋亡的胱冬

(下转第 382 页 to page382)

- 中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(1):4- 10.
- [4] CALDERWOOD S K, KHALEQUE M A, SAWYER D B, et al. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(3):164-172.
- [5] TANAKA K, SHIMADA H, NAGANO Y, et al. Outcome after hepatic resection versus combined resection and microwave ablation for multiple bilobar colorectal metastases to the liver [J]. Surgery, 139(2): 263- 273.
- [6] LU M D, XU H X, XIE X Y, et al. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(11):1054- 1060.
- [7] SABEL M S, NEHS M A, SU G, et al. Immunologic response to cryoablation of breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2005, 90(1):97- 104.
- [8] XU H X, LU M D, XIE X Y, et al. Prognostic factors for long - term outcome after percutaneous thermal ablation for hepatocellular carcinoma: a survival analysis of 137 consecutive patients [J]. Clin Radiol, 2005, 60(9):1018- 1025.
- [9] 王海华, 戚仁斌, 张定国, 等. 鱼腥草注射液抗内毒素性心肌损伤作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(3):387- 390.
- [10] MOINUDDIN S G, YOUN B, BEDGAR D L, et al. Secoisolariciresinol dehydrogenase: mode of catalysis and stereospecificity of hydride transfer in podophyllum peltatum[J]. Org Biomol Chem, 2006, 4(5):808- 816.
- [11] VOELLMY R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(2):122- 133.
- [12] SCHUELLER G, KETTENBACH J, SEDIVY R, et al. Heat shock protein expression induced by percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma in vivo[J]. Int J Oncol, 2004, 24(3):609- 613.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 377 页 from page 377)

肽酶非依赖性的信号转导。研究证实 TNF 能激活信号通路导致胱冬肽酶和胱冬肽酶非依赖性通路, 这个胱冬肽酶非依赖性通路包括激活 NFkB 和 JNK。NFkB 是转录活性因子, 能激活一系列抗凋亡基因的活化<sup>[9]</sup>。因此, 本文预测 Xaf1 可能抑制胱冬肽酶非依赖性信号转导, 最终诱导细胞凋亡。

参考文献:

- [1] DEVERAUX Q L, REED J C. IAP family proteins - suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev, 1999, 13 (3): 239- 252.
- [2] LISTON P, FONG W G, KELLY N L, et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti - Caspase activity [J]. Nat Cell Biol, 2001, 3(2):128- 133.
- [3] MA T L, NI P H, ZHONG J, et al. Low expression of XIAP - associated factor 1 in human colorectal cancers [J]. Chin J Dig Dis, 2005, 6(1):10- 14.
- [4] 夏 焱, 苏浩彬, 马国川, 等. 建立 Doxycyline 诱导表达 Xaf1 的肿瘤细胞株[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(9): 326- 328.
- [5] FONG W G, LISTON P, RAICAN - SEPAROVIC E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP - associated factor1 (XAF1) in cancer cell lines[J]. Genomics, 2000, 70(1):113- 122.
- [6] KATSUI K, KURODA M, WANG Y, et al. Cepharanthin enhances adriamycin sensitivity by synergistically accelerating apoptosis for adriamycin-resistant osteosarcoma cell lines, SaOS2 - AR and SaOS2 F - AR [J]. Int J Oncol, 2004, 25(1):45- 56.
- [7] ARAGANE Y, KULMS D, METZE D, et al. Ultraviolet light induce apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/ APO - 1) independently of its ligand CD95L [J]. J Cell Biol, 1998, 140(1):171- 182.
- [8] HAO Y, SEKINE K, KAWABATA A, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase - 9, and has an essential cytoprotection functions [J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(9): 849- 860.
- [9] HOFER - WARBINEK R, SCHMID J A, STEHLIK C, et al. Activation of NF - kappa B by XIAP, the X chromosome - linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1 [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (29): 22064- 22068.

(编辑 张恩健)