

# 建立 doxycycline 诱导表达 Xaf1 的肿瘤细胞株

夏焱<sup>1</sup>, 苏浩彬<sup>1</sup>, 马国川<sup>2</sup>, 陈纯<sup>1</sup>, 郭海霞<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 510120; 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】为探索 XIAP 相关因子 1(Xaf1) 调节肿瘤细胞凋亡的机制, 利用基因开关调节系统(Tet-on), 拟建立由 doxycycline 调控表达的 Xaf1 诱导细胞株。【方法】将 pTREHA-Xaf1 和 pWZL-Hyg 质粒用基因转染技术转入稳定表达 rtTA 的 Saos-2 细胞中。经过 hygromycin 的抗性筛选, 挑出并扩增表达 Xaf1 的细胞株。在 8 例实验组中加入 doxycycline, 和不加 doxycycline 的 8 例对照组比较, 重复 3 次实验用免疫印迹法和免疫荧光显微镜检测 doxycycline 对 Xaf1 表达的调控。Xaf1 诱导的细胞凋亡由流式细胞检测 DNA 含量来表示。【结果】在 30 个抗 hygromycin 的细胞株中, 免疫印迹法筛选出 5 个明显由 doxycycline 调控诱导表达 Xaf1 的细胞株, 免疫荧光显微镜检测显示 doxycycline 诱导 Xaf1 表达于细胞核内。流式细胞检测 Xaf1 于 8h 开始诱导 Saos 细胞凋亡, 凋亡率最高约 20%, 而且不影响细胞周期。【结论】Xaf1-Saos 诱导细胞株是研究 Xaf1 调节肿瘤细胞凋亡机制的良好细胞模型; Xaf1 是一种核蛋白, 能独立诱导肿瘤细胞凋亡。

**关键词:** Tet-on 系统; XIAP 相关因子 1(Xaf1); 凋亡; 肿瘤; 诱导细胞株

中图分类号: R730.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)05-0528-5

## Establishment of a Cell Line Expressing Xaf1 Induced by Doxycycline

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

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

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

**Abstract:**【Objective】To investigate the mechanism of apoptosis of tumor cells modulated by XIAP associate factor 1 (Xaf1), we generated Xaf1 inducible cell lines, using Tet-on system, "gene switch" system, which can induce Xaf1 gene expression by administration of doxycycline. 【Methods】Plasmids pTREHA-Xaf1 and pWZL-Hyg encoding hygromycin were co-transfected in the human osteosarcoma Saos-2 cells, which express rtTA stably. Following hygromycin screening, the survived cells expressing Xaf1 were selected and enriched. Compared with the untreated cells (8 cases), the regulating effect of doxycycline on the expression of Xaf1 gene in the treated cells (8 cases) was estimated respectively with Western blot analysis and immunofluoresces assay in three respective experiments. The effect of Xaf1 induction on apoptosis was measured by flow cytometry. 【Results】From the 30 hygromycin-resistant cell strains, we selected 5 cell strains expressing Xaf1 in response to stimulation by doxycycline. Immunofluoresces assay showed that Xaf1 located in the nucleus. Flow cytometry demonstrated that apoptotic cells began to accumulate at 8 h, reached the peak of 20% and the cell cycle was not effected. 【Conclusions】Xaf1-Saos inducible cell line is a good system to investigate the mechanism of apoptosis of tumor cells induced by Xaf1. Xaf1 is a nuclear protein and can induce apoptosis alone without effecting cell cycling.

**Key words:** Tet-on system; XIAP associate factor 1(Xaf1); apoptosis; cancer; inducible cell line

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(5):528-532]

恶性肿瘤是现代社会的导致死亡的主要疾病。尽管恶性肿瘤的治疗已取得进展, 但仍不尽人意。肿瘤细胞耐药是导致治疗失败的重要原因。细胞凋亡机制的破坏可导致恶性肿瘤发生和发展, 同

时也可诱导肿瘤细胞耐药。因此, 探索如何诱发肿瘤细胞的凋亡, 一直是提高肿瘤化疗和放疗疗效, 降低肿瘤耐药性的研究热点。胱冬肽酶(caspases)是一组引起细胞凋亡的重要蛋白酶。凋亡抑制蛋

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助项目(E00d003012)

作者简介: 夏焱(1970-), 女, 云南昆明人, 留美博士, 主治医师。E-mail: kellyxia2005@gmail.com.

白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)是至今发现唯一存在于哺乳动物体内的调节 caspase 活性的一组蛋白酶。XIAP(X-linked inhibitor 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。目前发现, XIAP 有两组功能不同的负性调节因子,其中一种是新近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)。研究表明, Xaf1 作为 XIAP 的负调节因子,在肿瘤细胞中低表达或无表达,而 XIAP 却高度表达,使肿瘤发生和发展,并且使细胞极易产生对化疗药物的耐受,这提示 Xaf1 是一种具有潜能的肿瘤抑制因子。因此,把 Xaf1 作为肿瘤抑制因子导入肿瘤细胞表达,增强肿瘤细胞对化疗和放疗的敏感性,可能成为肿瘤治疗或克服肿瘤耐药的一个突破性进展。本研究拟建立一个由四环素调控“基因开关”(Tet-On 系统)的诱导表达 Xaf1 的肿瘤细胞株,探索其如何诱导肿瘤细胞凋亡,为进一步的临床研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 稳定表达 rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator) 的人骨肉瘤细胞系 Saos-2 细胞系,由 Dr. Andrew Phillips 惠赠。

1.1.2 质粒 Tet-On 系统质粒包括:pTet-On, pTRE (购自美国 BD Biosciences), pCDNA3.1 HA-Xaf1 和 pWZL-hygromycin 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),抗鼠荧光抗体 Alexa 488 (购自美国 Molecular Probe A11008),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),大剂量质粒扩增提纯试剂盒(购自美国 Qingene),TA 克隆试剂盒(购自美国 Clontech)。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,免疫印迹试剂组和免疫荧光检测试剂组由 Dr. Andrew Phillips 提供。

1.1.5 引物序列 上游引物 CTGAATTCATGGAAGGAGACTTCTCG, 下游引物 CTGAATTCTCATTGTAGTACCTTTCCTT。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒的构建 以 PCR 法用带有 EcoRI 酶切位点的引物扩增 pCDNA3.1HA-Xaf1 的 DNA 片段 HA-Xaf1, 克隆 PCR 产物到 TA 质粒上, EcoRI 酶切 TA 质粒上的 HA-Xaf1 片段, 亚克隆 HA-Xaf1 片段到 pTRE 质粒的启动子下游, 构建重组的 pTRE HA-Xaf1 质粒, 扩增并提纯质粒, DNA 序列测定证实 HA-Xaf1 片段在 pTRE 正确读码框内。

1.2.2 真核细胞转染和细胞克隆抗性筛选  $5 \times 10^6$  Saos-2 细胞培养在含 100 mL/L 胎牛血清的 Dulbecco's modified Eagle's medium 中, 以钙离子沉淀法转染共转染 pTRE HA-Xaf1 和编码 hygromycin 的 pWZL-hygromycin 质粒 20  $\mu$ g 入 Saos-2 细胞中。转染的细胞在 Hygromycin 抗性培养液中分离培养, 存活的抗性细胞克隆经扩增后由免疫印迹法再筛选出可被 doxycycline 诱导 Xaf1 表达, 同时具有较低背景的诱导细胞株。在建立 Xaf1 诱导细胞株的同时转染空质粒载体 pTRE 入 Saos-2 细胞, 生成具有相同 hygromycin 抗性的阴性对照细胞株。

1.2.3 流式细胞 DNA 含量检测  $3 \times 10^5$  Xaf1-Saos 细胞种植于六孔板中过夜培养, 经 doxycycline 处理后按不同时间点收集细胞, 以磷酸缓冲液洗涤和甲醛固定后, 用 Propidium iodide 荧光染色 DNA, 并以 RNase 消化 RNA。用流式细胞仪检测 DNA 的含量, DNA 含量低于 2N(2 倍染色体)的细胞群为凋亡细胞。

1.2.4 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 多聚甲醛固定后, 4% 的含 2 g/L Triton X-100 的磷酸缓冲液处理细胞 5 min, 用含 30 mL/L 白蛋白和 100 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不同荧光的 Xaf1 蛋白和细胞核染色质。

1.2.5 免疫印迹  $3 \times 10^6$  Xaf1-Saos 细胞经 doxycycline 处理后 24 h 收集, 细胞裂解液(CLB)裂解细胞, 离心后取上清液加入相同体积 SDS-PAGE 样本缓冲液, 煮沸 5 min, 加样于 100 mg/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(1:1000), 识别 HA-Xaf1 蛋白); 和二抗(偶和辣根过氧化物

酶(HRP)抗鼠抗体(1 4000)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 建立由 doxycycline 诱导稳定表达 Xaf1 的细胞株

经过含有 hygromycin 抗性的细胞培养液分离培养 12 周后, 从转染的 Saos-2 细胞中获得 30 个具有独立抗性的抗 hygromycin 单细胞克隆。经过 8 周的扩增培养后, 用免疫印迹法从这 30 个细胞株中筛选 5 个明显由 doxycycline 调控诱导表达 Xaf1 的细胞株, 为 A1,A4,A6,A8,A10 克隆。同时, 以空载体 pTRE 抗性细胞株作为阴性对照。5 个细胞株在无 doxycycline 存在的条件下不表达 Xaf1, 在加入 doxycycline (2 μg/mL) 后 8 h 可检测到微量的 Xaf1, 随着时间的增加, Xaf1 的表达量也随之增高(图 1)。

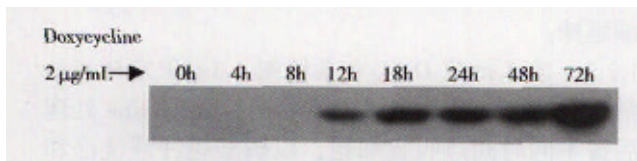


图 1 Doxycycline 不同时间段诱导表达 Xaf1  
Fig.1 Expression of Xaf1 induced by doxycycline at different time points.

Shows accumulation of Xaf1 after addition of doxycycline at different time points

### 2.2 Xaf1 能独立诱导细胞凋亡

Xaf1 诱导的细胞凋亡由 propidium iodide 染色 DNA 和流式细胞检测 DNA 含量来表示。图 2 所示为肿瘤细胞群的细胞周期 Sub-G1, G1, S, G2 期的分布, G1 期细胞 DNA 含量 2N(2 倍染色体), G2 期细胞 DNA 含量 4N(4 倍染色体); Sub-G1 期细胞 DNA 含量小于 2N(小于 2 倍染色体的细胞, 被认为已开始发生凋亡), 为凋亡细胞。Xaf1 诱导细胞凋亡开始出现在加入 doxycycline 12 h 后 (12%), 并在 24 h 达到高峰 (20%~25%), 48~72 h 仍维持在 20%左右。但是, Xaf1 的表达对细胞周期的分布没有影响。图 3 所示为 3 个独立重复实验(对照组和实验组各 8 例)流式细胞检测凋亡细胞百分数的平均值。

### 2.3 Xaf1 是核蛋白

Xaf1-Saos 细胞在加入 doxycycline 后, 免疫荧光显微镜检测显示大部分 Xaf1 蛋白聚集在细胞核内。图 4 所示 绿色荧光的 Xaf1 蛋白和蓝色荧光的细胞核可重叠, 这表示 Xaf1 在细胞核内表

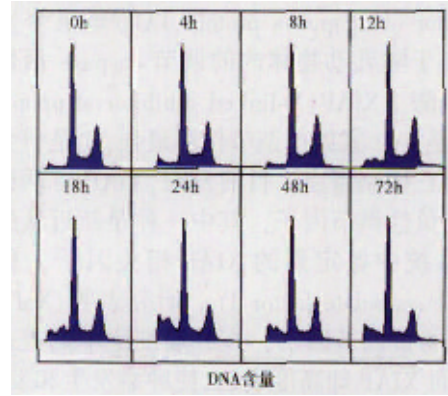


图 2 流式细胞检测细胞凋亡

Fig.2 Determination of DNA content and apoptotic cells by flow cytometry

Shows DNA content (X axis) against cell number (Y axis) for Xaf1 inducible cells treated with doxycycline for the time indicated in the figure (same as Fig.1)

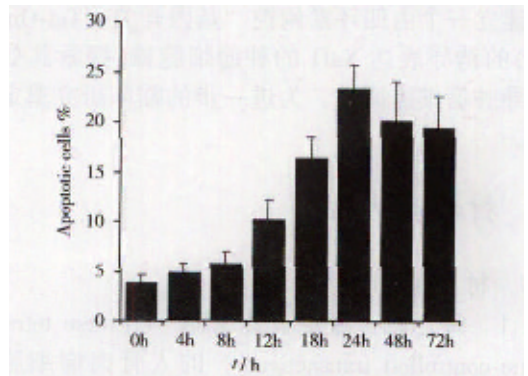


图 3 Xaf1-Saos 诱导细胞凋亡百分数条形图

Fig.3 The percentage of apoptotic cells in Saos-Xaf1 inducible cells

Shows the average percentage apoptosis in cell culture (cells with less than 2N DNA content scored as apoptotic) after addition of doxycycline treatment for the times indicated in the figure (same as Fig.1)

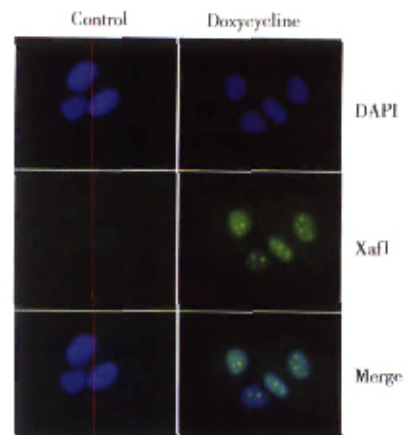


图 4 Xaf1 免疫荧光染色图

Fig.4 Xaf1 immunofluorescence microscopy

Shows immunofluorescence of cells treated as indicated with doxycycline for 18 h. Cells are stained with anti-HA (Xaf1 green) and DAPI (blue)

达。同时我们发现, Xaf1 在细胞核内的分布呈现一些绿色荧光亮点, 提示 Xaf1 存在于细胞核内的亚核结构中, 对比 DAPI 染色的细胞核, 推测这些亚核结构是 Nucleoli。

### 3 讨论

#### 3.1 Xaf1-Saos 诱导细胞株是研究 Xaf1 功能的良好细胞模型

Xaf1 是新近发现的参与调控细胞凋亡的关键蛋白, 由于在肿瘤细胞中低表达或无表达, 因此无法探索 Xaf1 诱导肿瘤细胞凋亡的机制。介导 Xaf1 进入肿瘤细胞, 进一步检测其功能, 是这一领域的研究起点和当务之急。瞬时表达 Xaf1 受到转染效率和表达时间的限制, 表达不稳定, 而且难以将转染和非转染细胞分类后继续研究其功能也是应用这一方法的障碍。目前, 建立稳定表达靶基因细胞株的方法很多, 用直接导入法介导某些具有细胞毒性或可导致细胞死亡的靶基因进入细胞, 直接整合于染色体并开始表达基因, 极易导致转染细胞的凋亡, 无法进一步研究。因此, 建立有“基因调控开关”的诱导细胞株, 通过药物或其它激动剂调控“基因开关”, 是研究这类基因的良好模型。

现在, 很多诱导质粒的启动子来源于真核细胞。这些真核来源的启动子, 可以受到真核细胞内某些内源性因子的影响, 对靶基因表达的调控作用呈非特异性; 而调控这些启动子的激动剂如皮质激素, 已存在细胞内, 致使调节作用不明显, 无针对性和不具有安全性。另外, 这些激动剂可能本身具有毒副作用, 更加使这些启动子不适合临床的研究和用于进一步的基因治疗。

四环素 Tet-on 基因开关调控系统, 是目前运用成熟, 技术先进的基因调控系统, 非常实用于对细胞具有毒性的基因的研究。它是利用改良的大肠杆菌 *E.coli* 的调节系统, 靶基因的表达受四环素(Tet)的衍生物 doxycycline 精确调节; 相对真核细胞来说, doxycycline 是一种外源性因子, 具有低毒性, 因而它的调节作用是特异性的和高度敏感的, 并不影响细胞内其他基因的活性。这些优点使 Tet-on 系统具有广泛的临床应用价值。

Tet-on 系统由调节性质粒和反应性质粒组成。调节性质粒表达 rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator), rtTA 在 doxycycline 存在的条件下, 可结合于反应性质粒启动子的 TRE(tet-response element)部位, 激活下游靶基因的表达。在

该系统中, 目的基因的表达是与药物剂量直接相关, 受到其精确和特异性的调控。和瞬时转染相比, 四环素基因调控系统具有较高的基因表达效率, 而且可以维持基因稳定表达, 有利于分析细胞内该基因的功能。

本研究中, 我们将带有 Xaf1 基因的反应性质粒转染入已经含有调节性质粒, 稳定表达 rtTA 的 Saos-2 细胞中, 从转染细胞中经抗性分离培养获得单细胞克隆。单细胞克隆扩增培养后, 用免疫印迹法筛选出对 doxycycline 反应良好的细胞株。这些细胞株中, 带有启动子的 Xaf1 基因已整合于染色体, 但处于不表达状态, 不诱发细胞凋亡, 也不影响细胞生长; 直至加入 doxycycline 开启“基因调控开关”, Xaf1 才开始表达。在诱导细胞株中, Xaf1 受 doxycycline 的精确调节, 证明 Xaf1 诱导细胞株建系成功。Xaf1-Saos 诱导细胞株的建立为研究 Xaf1 功能, 提供了良好细胞模型, 而且为进一步的肿瘤基因治疗和克服肿瘤耐药研究奠定了试验基础。

#### 3.2 Xaf1 诱导肿瘤细胞凋亡机制的探讨

由于 XIAP 在肿瘤细胞中的重要调节作用, 因此, 寻求和研究 XIAP 的调节因子一直是研究肿瘤细胞凋亡机制的热点。迄今发现, XIAP 有两组功能不同的负性调节因子。一组为来源于线粒体的 Smac/Omi, 现已证实 Smac/Omi 与胱冬肽酶 9 (Caspase9) 竞争结合 XIAP, 解除 XIAP 对胱冬肽酶活性的抑制, 从而诱发细胞凋亡。另一种是 Xaf1。目前对 Xaf1 如何参与调节凋亡知之不多。研究发现, 在肿瘤细胞中 Xaf1 低表达或无表达, 可能由于 Xaf1 对 XIAP 调节作用的减弱或消失, XIAP 在肿瘤细胞中高度表达, 强烈抑制胱冬肽酶活性, 使肿瘤细胞耐受凋亡, 并对化疗药物不敏感。Xaf1 在某些特定的细胞株中, 能改变 XIAP 的分布, 使 XIAP 暂时位移至细胞核而解除 XIAP 对 caspase 活性的抑制。已有的研究显示 Xaf1 必须和一些凋亡刺激剂协同作用才能诱发肿瘤细胞凋亡。本研究首次报道 Xaf1 可独立诱发 Saos 细胞凋亡, 而且不影响细胞周期。研究证实在细胞内存在亲凋亡蛋白及抗凋亡蛋白, 这两大类蛋白通过不同途径和水平的相互作用而达到平衡, 只有打破这种平衡才能诱发凋亡。Xaf1 通过何种机制增强凋亡亲和性蛋白或抑制抗凋亡蛋白的活性, 从而诱发凋亡还有待进一步的探索。

我们的结果证实, Xaf1 在细胞核中表达, 是一种核蛋白, 这和已有的报道吻合。有趣的是, 本研究首次发现, Xaf1 分布在细胞核内的亚核结构,

推测其为 Nuclei。这些结果提示 Xaf1 作为核蛋白,可能介导某些未知蛋白进入细胞核而调节其功能;或者 Xaf1 可能是亚核结构内具有转录调节活性的核蛋白,参与调节某些蛋白质的合成,例如调节亲凋亡蛋白及抗凋亡蛋白的合成,最终诱发细胞凋亡。因此,用基因芯片技术和亚核结构免疫荧光染色进一步的研究,将为探索 Xaf1 调节细胞凋亡的机制提供线索。

参考文献:

[1] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-90.

[2] Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis [J]. *Genes Dev*, 1999, 13 (3): 239-52.

[3] 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): 128-33.

[4] Fong WG, Liston P, Raican-Separovic E, et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines [J]. *Genomics*, 2000, 70(1): 113-22.

[5] Reeves PJ, Kim JM, Khorana HG, et al. Structure and function in rhodopsin: a tetracycline-inducible

system in stable mammalian cell lines for high-level expression of opsin mutants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(21): 13413-8.

[6] Ludwig A, Schlierf B, Schardt A, et al. Sox10-rtTA mouse line for tetracycline-inducible expression of transgenes in neural crest cells and digodendrocytes [J]. *Genesis*, 2004, 40(3): 171-5.

[7] Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 439-44.

[8] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.

[9] Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(1): 432-8.

[10] Ng KC, Campos EI, Martinka M, et al. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(6): 1127-34.

(编辑 张恩健)



(上接第 522 页 from page 522)

infections and tubal infertility [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2004, 108(3): 617-23.

[3] 陈木开, 韩建德, 陈小红, 等. MoPn 沙眼衣原体致小鼠生殖道感染模型的初步研究[J]. *中国人畜共患病杂志*, 2004, 20(8): 687-9.

[4] Morre SA, Lyons JM, Ito JI Jr, et al. Murine models of Chlamydia trachomatis genital tract infection: use of mouse pneumonitis strain versus human strains[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12):7209-11.

[5] Ramsey KH, DeWolfe JL, Salyer RD. Disease outcome subsequent to primary and secondary urogenital infection with murine or human biovars of Chlamydia trachomatis[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12):7186-9.

[6] Tammy K, Cain and Roger G. Local Th1-Like respons-

es are induced by intravaginal infection of mice with the mouse pneumonitis biovar of Chlamydia trachomatis [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(5): 1784-9.

[7] Lichtenwalner AB, Patton DL, Van Voorhis WC, et al. Heat shock protein 60 is the major antigen which stimulates delayed-type hypersensitivity reaction in the macaque model of Chlamydia trachomatis salpingitis[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(2):1159-61.

[8] Debatista J, Timms P, Allan J, et al. Immunopathogenesis of Chlamydia trachomatis infections in women [J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(6): 1273-87.

(编辑 刘清海)