

[文章编号] 1000-4718(2007)07-1347-05

Xaf1 调节 TNFR 信号转导而诱导 细胞凋亡的机制研究*

夏焱, 檀卫平, 梁立阳, 苏浩彬, 郭海霞, 方建培, 黄绍良
(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 利用基因开关调节的 Xaf1-Saos 诱导细胞株, 检测 Xaf1 对 TNFR 信号转导通路的影响, 探索 Xaf1 与 TNF- α 协同诱导细胞凋亡的机制。方法: 以免疫印迹法和 RT-PCR 检测 Xaf1 对 TNFR1 表达的影响, 细胞周期 DNA 含量流式细胞术检测 NF- κ B 对 Xaf1 诱导细胞凋亡的影响, gel mobility shift assay 检测 NF- κ B 的 DNA 结合活性, luciferase 活性检测法及 RT-PCR 检测 NF- κ B 的转录活性, 激酶分析法检测 SAPK/JNK 激酶的活性。结果: Xaf1 不影响 TNFR1 蛋白及 mRNA 水平的表达, 细胞内诱导活性的 NF- κ B 可抑制 Xaf1 诱导的细胞凋亡, Xaf1 的表达抑制 TNF- α 所介导的 NF- κ B 的 DNA 结合活性和转录活性, 也抑制了 SAPK/JNK 激酶的活性。结论: Xaf1 对 TNFR 信号转导的抑制是 Xaf1 协同 TNF- α 诱导细胞凋亡的机制之一。

[关键词] Xaf1; 细胞凋亡; 受体, 肿瘤坏死因子; 信号转导

[中图分类号] R730.3 **[文献标识码]** A

Xaf1 regulates TNFR signal pathway and induces apoptosis

XIA Yan, TAN Wei-ping, LIANG Li-yang, SU Hao-bin, GUO Hai-xia, FANG Jian-pei, HUANG Shao-liang

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China. E-mail: kellyxia2005@gmail.com)

[ABSTRACT] **AIM:** Xaf1-Saos inducible cell lines, which contain "gene switch" system were used to detect the effect of Xaf1 on tumor necrosis factor receptor(TNFR) signal pathway and to investigate the mechanism of cooperation between Xaf1 and TNF- α in inducing cell apoptosis. **METHODS:** Xaf1 on TNFR1 expression was measured by RT-PCR and Western blotting. The effect of NF- κ B on Xaf1 induced apoptosis was detected by DNA content flow cytometry after co-transfection. DNA binding activity of NF- κ B was identified by gel mobility shift assay and transcription activity of NF- κ B was analyzed by luciferase assay and RT-PCR. SAPK/JNK activity was checked by SAPK/JNK assay. **RESULTS:** Xaf1 did not modulate TNFR1 at protein and mRNA levels. Increased NF- κ B activity in cells inhibited Xaf1 induced apoptosis. Expression of Xaf1 impaired modestly TNF- α induced NF- κ B DNA binding activation and transcription activation, also modestly reduced SAPK/JNK activity. **CONCLUSION:** Xaf1 inhibits TNFR signal pathway, partly contributing to cooperation with TNF- α to induce apoptosis.

[KEY WORDS] Xaf1; Apoptosis; Receptors, tumor necrosis factor; Signal transduction

细胞凋亡的阻滞是恶性肿瘤发生和细胞耐药的主要原因, 大多数化疗药物是通过诱导细胞凋亡而达到清除肿瘤的目的。因此, 探索如何诱发肿瘤细胞的凋亡, 一直是肿瘤治疗的研究热点和基本策略。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶类(caspases)是肿瘤细胞凋亡的核心因子, 而 IAP(凋亡抑制蛋白, inhibitor of apoptosis)是哺乳动物体内唯一存在抑制胱冬肽酶活性的一组蛋白酶。XIAP 是 IAP 家族中调节作用最

强的凋亡抑制蛋白^[1]。Xaf1 是从酵母双杂交系统中鉴定到的 XIAP 负性调节因子(XIAP associate factor 1)^[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]。已有报道证实 Xaf1 可以增强一些凋亡激动剂的作用, 但具体机制尚未明了^[2]。我们利用四环素调控“基因开关”诱导表达 Xaf1 细胞株^[4](Xaf1-Saos, 人骨肉瘤细胞株)的系列研究发现, Xaf1 与

[收稿日期] 2006-01-18 [修回日期] 2006-05-10

* [基金项目] 国家中医药管理局基金资助项目(No. 国中 2005LHR08)

Tel: 020-81332335; E-mail: kellyxia2005@gmail.com

TNF- α (肿瘤坏死因子 α , tumor necrosis factor α) 能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。为此,本研究围绕肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 的信号转导通路,进一步探讨肿瘤抑制因子 Xaf1 协同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基础。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 细胞 由 doxycycline 诱导稳定表达 Xaf1 的 Saos-2 细胞系已建系成功,见参考文献^[4]。

1.2 质粒 pCMV CD20, pCDNA 3.1 Baculovirus P35, pCDNA 3.1 I κ -B SR 和 pCMV NF- κ B 表达质粒, NF-3 luciferase 报告质粒(启动子含 3 个 NF- κ B 结合位点)和 pCMV β -galactosidase 由 Dr. Andrew Phillips 惠赠。

1.3 抗体 抗 HA F7 单克隆抗体 (Santa Cruz F289), 抗 Actin 单克隆抗体 (Sigma, F6188), 抗-TNFR1 单克隆抗体 (Imgenex, IMG-648), 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶和抗鼠抗体 (Amersham Biosciences)。

1.4 试剂 细胞培养液 Dulbecco's modified Eagle's medium 和胎牛血清 (Cellgro), 体外钙离子沉淀真核细胞转染试剂, DNA 染色及流式细胞检测试剂, 免疫印迹试剂, gel mobility shift assay 试剂, SAPK/JNK 激酶分析试剂, luciferase 活性检测试剂由 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), cDNA 合成试剂盒 (Invitrogen, superscript II), PVDF 膜 (Amersham Hybond-P), 大剂量质粒扩增提纯试剂盒及核酸探针洗提试剂盒 (Qingene)。

2 方法

2.1 RT-PCR 1×10^7 Xaf1-Saos 细胞按图示时间段加入 doxycycline (2 g/L), TNF- α (3 μ g/L), 以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 以 oligo dT 作为引物, 用 superscript II 试剂盒合成 cDNA。用自行设计的引物和根据实验确定的循环参数和优化的反应条件, 扩增模版 cDNA。GAPDH 为内参基因。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在多向分析凝胶成像系统中扫描并分析。

2.2 免疫印迹 3×10^5 Xaf1-Saos 细胞按图示时间段加入 doxycycline (2 g/L), TNF- α (3 μ g/L) 后收集, 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 样品缓冲液, 煮沸 5 min, 加样于 100 mg/L SDA-PAGE, 100-150 V 跑胶 6 h 后 4 $^{\circ}$ C 过夜转至 PVDF 膜上, 以含 5 mL/L skim milk 的 TBST 封闭 PVDF 膜 2 h, 再以 I 抗 [抗-TNFR1 单克隆抗体 (1:2 000), 识别 TNFR1 蛋白] 和 II 抗 [辣根过氧化物酶 (HRP) 偶和抗鼠抗体 (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。

2.3 细胞周期 DNA 含量流式细胞术检测 将 5×10^6 Xaf1-Saos 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 (如图所示) 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 doxycycline (2 g/L), TNF- α (3 μ g/L) 24 h, 收集悬浮和贴壁的细胞。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 2N 的细胞群为凋亡细胞。

2.4 Gel mobility shift assay 1×10^6 Xaf1-Saos 细胞按图示加入 doxycycline (2 g/L) 24 h 后, 加入 TNF- α (3 μ g/L) 0、5、10、30、60 或 120 min, 以 100 μ L 2 倍的 ELB 缓冲液 [100 mmol/L Hepes (pH7.0), 0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mg/L NP-40, 含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂] 收集细胞, 将 6 μ L 细胞提取液与 2 μ L 的 5 倍 EMSA 缓冲液 [50 mmol/L Hepes (pH7.0), 400 mmol/L KCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 30% glycerol], 0.5 μ g 的 poly dIdC, 0.5 μ g 的鲑鱼精子 DNA 和 1 μ L [32 P] 标记的 NF- κ B 探针混合。孵育 30 min 后, 加样于 100 mg/L 的非变形聚丙烯酰胺凝胶上, 放射自显影于 X 线片上。合成 [32 P] 标记的 NF- κ B 探针步骤有: 将保守的 NF- κ B 结合的双链寡核苷酸经寡核苷酸链 NF- κ B SC-2505A (5'-GGAGTTGAGGGACTTTCCAGGC-3'), NF- κ B SC-25055B (5'-GGCCTGGGAAAGTC-CCCTCAACT-3') 退火, 用 Klenow 酶按文献方法标记 [32 P] 合成, 以 Qiagen QIAquick 核酸探针洗提试剂盒洗提探针。

2.5 SAPK/JNK 激酶分析 1×10^6 Xaf1-Saos 细胞按图示加入 doxycycline (2 g/L) 24 h 后, 加入 TNF- α (3 μ g/L) 0、5、10、30、60 或 120 min, 用 700 μ L 细胞裂解液 (CLB) 冰上孵育 5 min。4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后, 加入 c-Jun 融合蛋白珠, 4 $^{\circ}$ C 过夜旋转轻摇, 离心

后以 500 μL 细胞裂解液和激酶缓冲液分别洗涤细胞。再以 50 μL 含 100 $\mu\text{mol/L}$ ATP (1 μL) 的激酶缓冲液重新悬浮, 30 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 离心后再弃去上清液。加入 25 μL 3 倍 SDS - PAGE 样本缓冲液, 免疫印迹法检测磷酸化的 c - Jun, 以 c - Jun 含量表示 SAPK/JNK 活性。

2.6 Luciferase 活性检测 过夜种植 1×10^6 Xaf1 - Saos 细胞, 以钙离子沉淀法共转染 5 μg NF - 3 luciferase 报告质粒 (启动子含 3 个 NF - κB 结合位点) 和 2 μg pCMV β - galactosidase 质控质粒入细胞。在加入 TNF - α (3 $\mu\text{g/L}$) 24 h 前从细胞中洗去钙离子沉淀, 按图示时间点收集细胞。以 1 倍的报告溶解剂溶解细胞, 根据产品指示推荐的方法在 luminometer 检测仪上检测 luciferase 活性。在同一细胞提取物中检测 β - galactosidase 活性来标准化转染效率。2 μL 细胞提取物和 100 μL CPR4 (chlorophenol red B - D - galactopyranoside) 工作缓冲液混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 在 luminometer 上检测 $A_{574\text{nm}}$ 的吸光度值。

结 果

1 Xaf1 不影响 TNFR1 的水平

RT - PCR 和免疫印迹的结果发现, Xaf1 不影响 TNFR 在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达; 而且 TNFR1 受体表达水平也不受 TNF - α 或 TNF - α 与 Xaf1 协同作用的影响 (图 1)。

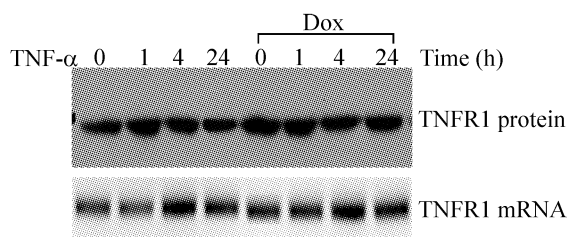


Fig 1 Xaf1 did not modulate TNFR at protein and mRNA expression levels. Top panel: Western blotting showing TNFR1 levels after treatment with doxycycline (Dox), TNF - α or Dox and TNF - α . Lower panel: RT - PCR showing TNFR1 mRNA levels after treatment with Dox, TNF - α or Dox and TNF - α .

图 1 Xaf1 不影响 TNFR1 的蛋白和 mRNA 表达水平

2 Xaf1 抑制 TNF - α 诱导的 NF - κB 的活性

本研究利用瞬时转染技术将一系列表达凋亡抑制蛋白的质粒转染入 Xaf1 - Saos 诱导细胞中, 以 doxycycline (诱导细胞内表达 Xaf1), TNF - α 或两者联合处理细胞。以流式细胞仪检测被转染细胞 (转染标记 CD20 染色阳性的细胞) 的 DNA 含量, 分析凋亡的情况。Baculovirus P35 是广谱的胱冬肽酶抑制

剂, 作为阳性对照; NF - κB 活性抑制蛋白 (I κ - B 超抑制子), 作为阴性对照, 结果发现在细胞内诱导表达 NF - κB 能抑制由 Xaf1 独立或协同 TNF - α 诱导的细胞凋亡 (图 2)。

Gel mobility shift assay 分析 NF - κB 的 DNA 结合活性, 结果显示 TNF - α 在 Saos - 2 细胞中可引起 NF - κB 的快速激活, 在 10 min 出现 NF - κB 活性增加, 120 min 达高峰。Xaf1 的表达抑制了 NF - κB 的活性, 活性抑制的程度为 50% (图 3)。

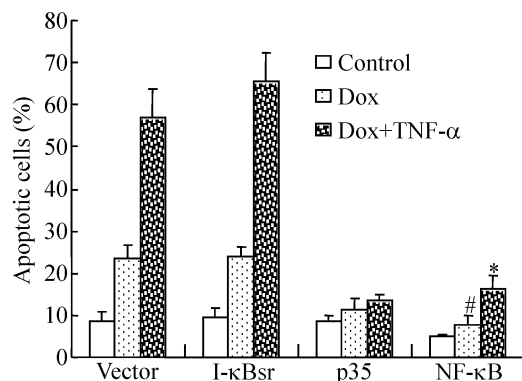


Fig 2 NF - κB inhibited Xaf1 induced cell apoptosis. The Xaf1 inducible cells were transiently transfected with plasmids encoding the genes and pCMV - CD20 to allow identification of transfected cells. After transfection, the cells were washed and treated for 24 h with Dox, TNF - α , or TNF - α as indicated in the figure. The cells were harvested and DNA content was measured by flow cytometry. The graph shows the average apoptotic rate for cells expressing CD20. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs vector/Dox; # $P < 0.05$ vs vector/Dox + TNF - α .

图 2 NF - κB 抑制 Xaf1 诱导的细胞凋亡

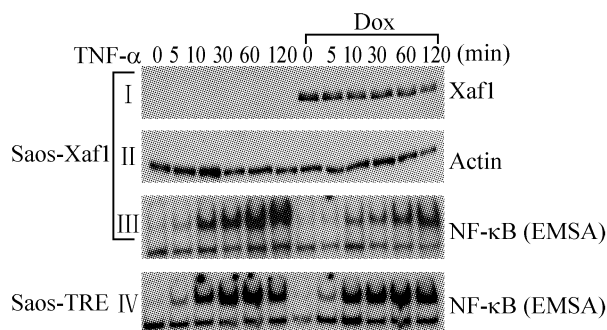


Fig 3 Xaf1 expression impaired NF - κB activation. Xaf1 expression on TNF - α induced NF - κB activity was tested. The Xaf1 inducible cells or pTRE control lines were pretreated with or without doxycycline, then treated with TNF - α for the times indicated. Extracts were made and Western blotting for Xaf1 and actin (panel I and II), gel shift analysis of NF - κB binding activity in Xaf1 and pTRE inducible cell lines (panel III and IV).

图 3 Xaf1 表达抑制了 NF - κB 的活性

3 Xaf1 抑制 TNF-α 诱导的 JNK/SAPK 的活性

蛋白激酶分析法检测 Xaf1 的表达是否影响 TNF-α 活化的 JNK/SAPK 激酶的功能。TNF-α 处理细胞后可引起 JNK/SAPK 激酶活性的短暂增高,在 30 min 时达高峰,120 min 后活性降至基本水平, Xaf1 对 JNK/SAPK 活性的抑制不显著(图 4)。

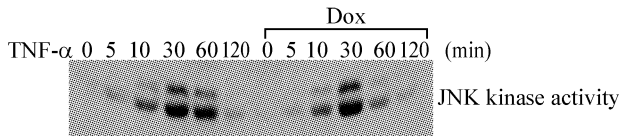


Fig 4 Xaf1 expression impaired JNK/SAPK activation. Xaf1 expression on TNF-α induced JNK/SAPK activity was tested. The Xaf1 inducible cells were pre-treated either with or without Dox and TNF-α for the time indicated, and JNK/SAPK activity was measured in cell extracts.

图 4 Xaf1 的表达抑制 JNK/SAPK 活性

4 Xaf1 的表达抑制 TNF-α 所诱导的 NF-κB 的转录活性

为检测 Xaf1 是否影响 NF-κB 介导的基因表达,本实验将 NF-3 luciferase 报告质粒转入 Xaf1 诱导细胞中瞬时表达,以 luciferase 的活性来表示 NF-κB 诱导基因的表达活性。对照组中显示 Xaf1 可独立激活少量的 NF-κB,远远低于 TNF-α 独立激活大量的 NF-κB,而 Xaf1 抑制 TNF-α 所诱导的 NF-κB 的转录活性(图 5)。RT-PCR 检测 c-IAP1、c-IAP2、XIAP、TRAF1 和 TRAF2 的表达水平,结果显示在 Saos-2 细胞中只有 c-IAP2 对 TNF-α 具有反应性;而且 Xaf1 不影响所有这些基因的转录表达水平(图 6)。

讨 论

我们的系列研究证实在 Saos-2 细胞中, Xaf1 与 XIAP 在细胞内分布于不同的亚细胞区域(Xaf1 位于细胞核而 XIAP 位于细胞质),这提示 Xaf1 与 XIAP 无直接相关性。显然在 Saos-2 细胞中 Xaf1 不是解除 XIAP 对胱冬肽酶的抑制而诱导细胞凋亡,而是通过其它未知的机制起作用。尽管 Xaf1 不影响 TNFR 蛋白或 mRNA 水平的表达,但还有一种可能是 Xaf1 直接增强了细胞表面 TNFR 的数量而诱导凋亡;p53 就具有这种增强死亡受体信号的功能^[5],我们用流式细胞仪检测法分析了细胞表面 TNFR 的水平,发现 Xaf1 的表达没有影响细胞表面 TNFR 的数量(结果未示)。

TNF-α 直接处理细胞后,并不能引起广泛的细胞凋亡,这是因为肿瘤坏死因子受体(TNFR)激活后,同时激活了 2 条信号转导通路(亲凋亡性和抗凋

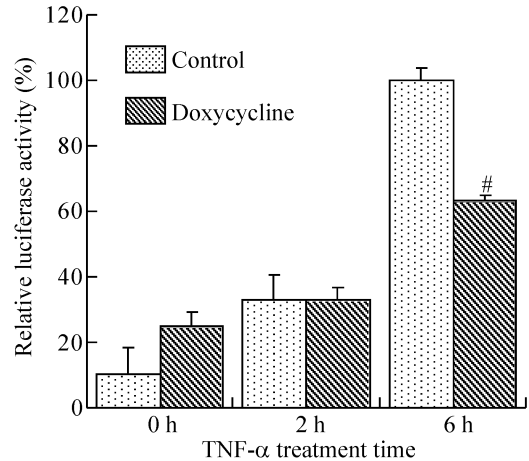


Fig 5 Xaf1 had effects on NF-κB mediated gene expression. Xaf1 expression on TNF-α induced NF-κB transcriptional activity. The Xaf1 inducible cells were transiently transfected with an NF-κB luciferase reporter gene and pCMV-B-galactosidase, treated with TNF-α (0, 2 and 6 h), and luciferase and B-galactosidase activity was measured. The graph represents average NF-κB luciferase activity after normalization. $\bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$ vs Dox in TNF-α treatment 6 h group.

图 5 Xaf1 影响 NF-κB 介导的基因表达

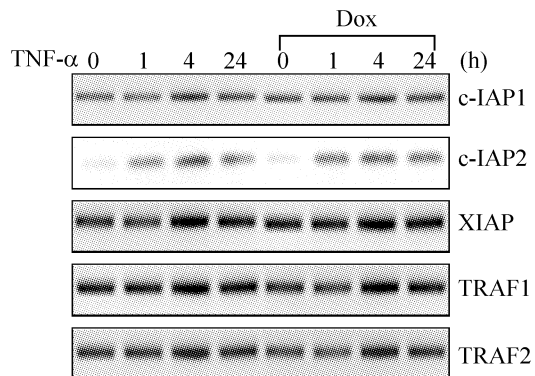


Fig 6 Xaf1 effects NF-κB mediated gene expression. The effect of Xaf1 expression on TNF-α induced NF-κB target gene expression. The Xaf1 inducible cells were pretreated with or without Dox, then TNF-α for the times indicated. RNA was isolated the expression of indicated genes determined by RT-PCR.

图 6 Xaf1 影响 NF-κB 介导的基因表达

亡性的通路);一条为激活胱冬肽酶 8,而开启胱冬肽酶的瀑布式激活而诱发凋亡,另一条是激活胱冬肽酶非依赖性信号途径来负性调节细胞凋亡,包括激活 NF-κB 和 JNK/SAPK 激酶。NF-κB 是细胞内广泛存在的重要的转录因子,能激活一系列抑制细胞凋亡的基因表达,包括 Bcl-2 家族成员 Bcl-X 和 Bfl-1,凋亡抑制蛋白 IAP 家族成员 c-IAP2 和死亡效应物区域(DED)家族基因 c-FLIP 等。NF-κB 活性的升高能增加细胞对凋亡信号的抵抗,研究已

经证实许多实体和血液恶性肿瘤中, NF- κ B 有高活性^[6]。

因此, 围绕 TNFR 信号转导通路, 本研究推测如果 NF- κ B 表达能抑制 Xaf1 诱导的凋亡, 那么提示 Xaf1 可能参与 TNFR 信号转导通路。在细胞内诱导 NF- κ B 活性抑制了 Xaf1 诱导的细胞凋亡证实了这一假设。进一步的检测发现 Xaf1 的表达确实减低了 NF- κ B 的活性, 但是减低的程度并不显著, 表现为活性动力学的延迟, 这不足以解释 Xaf1 与 TNF- α 之间显著的协同作用^[7]。还有一种可能是 Xaf1 对抗凋亡信号的轻微抑制, 在基因水平得到放大, 导致 Xaf1 和 TNF- α 显著的协同作用。为此, 本研究以不同的方法检测了 Xaf1 对信号转导中 NF- κ B 介导的下游基因表达的影响, 排除了这种可能。

综上所述, Xaf1 能显著协同 TNF- α 诱导细胞凋亡, 与 Xaf1 参与调节 TNFR 信号转导有关, 由于 Xaf1 对 TNF- α 介导的 NF- κ B 和 JNK/SAPK 活性影响并不显著, 因此 Xaf1 对 TNFR 信号转导的轻度抑制, 只是 Xaf1 协同 TNF- α 诱导细胞凋亡的机制之一。那么 Xaf1 还通过何种机制诱导或增强细胞凋亡呢? 从 XIAP 的另一组负性调节因子 Smac/DIABLO 和 Omi/HtrA2 可以得到启发, 两者从线粒体释放后与 XIAP 以及其它的 IAPs 结合, 暴露胱冬肽酶^[8]。如果 Xaf1 能通过 Smac/DIABLO 或 Omi/HtrA2 效应机制间接调节 XIAP 的功能, 那么可以预测 Xaf1 可能参与了线粒体凋亡信号的转导, 从而协同 TNF- α 诱导凋亡。

[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.
- [3] Ma TL, Ni PH, 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 Doxycycline 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] Bennett M, Macdonald K, Chan SW, et al. Cell surface trafficking of Fas; a rapid mechanism of p53 – mediated apoptosis[J]. *Science*, 1998, 282(5387): 290 – 293.
- [6] Hofer – Warbinek R, Schmid JA, 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.
- [7] Phillips AC, Ernst MK, Bates S, et al. E2F – 1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways [J]. *Mol Cell*, 1999, 4(5): 771 – 781.
- [8] Yang QH, Church – Hajduk R, Ren J, et al. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(12): 1487 – 1496.