

·论著·

Tat-SmacN7 蛋白对食管癌 109 细胞辐射敏感性的影响

陈凤华 沈秀 李德冠 付岳 王津晗 郭艳婷 樊飞跃 刘强

【摘要】目的 探讨 Tat-SmacN7 蛋白(其中, Tat: 反式激活蛋白; Smac: 第二线粒体来源的 caspase 激活因子; N7: Smac 的 N 端含有 Ala-Val-Pro-Ile 的七肽)对食管癌 109(EC109)细胞放疗敏感性的影响。**方法** 对 EC109 细胞给予 Tat-SmacN7、照射、以及联合处理, 观察不同处理在 24 h 和 48 h 时对细胞的抑制作用, 采用 Western blot 检测各组细胞中 Smac 蛋白表达水平。**结果** 通过水溶性四唑盐 1 检测发现 Tat-SmacN7 单独使用对细胞的抑制作用不明显, 但与 Tat-SmacN7 组和照射组相比, Tat-SmacN7 联合照射组可以明显增强对细胞的抑制(24 h: $t=16.821$ 和 9.825 , $P<0.05$; 48 h: $t=23.553$ 和 11.930 , $P<0.05$)。说明 Tat-SmacN7 能增强 EC109 细胞对放射的敏感性。Western blot 证明了 Tat-SmacN7 可以使细胞内 Smac 蛋白表达增加。**结论** Tat-SmacN7 蛋白能通过细胞高表达 Smac, 增强 EC109 细胞对辐射的敏感性。

【关键词】 辐射耐受性; 凋亡抑制蛋白质类; Smac

The effects of Tat-SmacN7 protein on radiosensitivity of esophageal carcinoma 109 CHEN Feng-hua*, SHEN Xiu, LI De-guan, FU Yue, WANG Jin-han, GUO Yan-ting, FAN Fei-yue, LIU Qiang. *Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China
Corresponding author: LIU Qiang, Email: dr.qiangliu@yahoo.com.cn

【Abstract】Objective To investigate the effects of Tat-SmacN7 protein on sensitivity of esophageal carcinoma 109 (EC109) to radiation. **Methods** Cells were treated with Tat-SmacN7 peptides, radiation or combination, the inhibition rate of EC109 cells were detected by water-soluble tetrazolium salt-1 assay. The protein level expression of Smac was determined by Western blot. **Results** The cells were resistant to Tat-SmacN7 as a single agent, but it could improve the sensitization of EC109 to radiation. Compared with the Tat-SmacN7 group and the radiation group, the Tat-SmacN7 combined with radiation group was inhibited significantly (24 h: $t=16.821$ and 9.825 , both $P<0.05$; 48 h: $t=23.553$ and 11.930 , both $P<0.05$). Western blot assay showed that Tat-SmacN7 could increase the expression of Smac protein. **Conclusions** Tat-SmacN7 could improve the radiosensitization of EC109 cell by increasing the expression of Smac.

【Key words】 Radiation tolerance; Inhibitors of apoptosis proteins; Second mitochondria-derived activator of caspase

第二线粒体来源的 caspase 激活因子(second mitochondria-derived activator of caspases, Smac)也称为低等电点的凋亡抑制蛋白(inhibitors of apop-

tosin proteins, IAPs)家族直接结合蛋白, 是一个从线粒体释放到细胞质中具有促凋亡活性的蛋白^[1], 它在凋亡信号的刺激作用下, 从线粒体释放到细胞质, 与 IAPs 结合并抑制其抗凋亡活性, 从而产生促进凋亡的作用。国内外大量科学研究证实, Smac 模拟活性小分子可以显著增强化疗以及放疗对肿瘤细胞的凋亡诱导效应^[2-6], 为未来的肿瘤治疗提供了一种新的手段。而 Smac 蛋白中 N 末端的四肽 Ala-Val-Pro-Ile(以下简称 AVPI)是诱导细胞凋亡的重要部分, 本研究中将反式激活蛋白(trans-

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.03.005

基金项目: 国家自然科学基金(31170804); 天津市自然科学基金(10JCZDJC16900, 11ZCGYSY02400); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20101106110046); 卫生行业科研专项(201002009)

作者单位: 300192 天津, 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室(陈凤华, 沈秀, 李德冠, 付岳, 郭艳婷, 樊飞跃, 刘强); 300134, 天津商业大学食品工程学院(王津晗)

通信作者: 刘强(Email: dr.qiangliu@yahoo.com.cn)

activator, Tat) 中既有穿膜特性又无细胞毒性的最小片段 Tat9 肽与 Smac 中含有 AVPI 的 N 端七肽分子合成了具有细胞穿透性的 Tat-SmacN7 蛋白。食管癌是人类常见的消化道恶性肿瘤之一, 本研究中用 Tat-SmacN7 蛋白以及 γ 射线分别或联合处理食管癌 109 (esophageal carcinoma 109, EC109) 细胞, 观察 Tat-SmacN7 蛋白对 EC109 细胞辐射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系及培养条件

人食管癌细胞系 EC109 由天津医科大学总医院惠赠, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (SH3080901B, 赛默飞世尔生物化学制品有限公司), 置 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 培养箱中培养。EC109 细胞为贴壁细胞, 每 2~3 天传代一次, 实验用对数生长期细胞。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清 (10099-141, 美国 invitrogen 公司), 胰酶 (25200-72, 美国 invitrogen 公司), Gammacell 40¹³⁷Cs γ 射线照射源 (加拿大原子能有限公司, 剂量率为 0.71 Gy/min), BioTek 多功能 Synergy HT 酶标仪 (美国 Gene 公司), anti-Smac (AB32023, 英国 abcam 公司), anti- β -actin (CW0623A, 北京康为世纪生物科技有限公司), 抗兔二抗 (ZB-2301, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 抗鼠二抗 (ZB-2305, 北京中杉金桥生物技术有限公司), 水溶性四唑盐 1 (water-soluble tetrazolium salt-1, WST-1) (C0035, 碧云天生物技术研究所以)。

1.3 实验分组

将细胞分为空白对照组 (不做任何处理)、Tat-SmacN7 组 (50 μ mol/L)、照射组 (¹³⁷Cs γ 射线照射源 4 Gy 照射) 和 Tat-SmacN7 联合照射组 (以下简称联合组) (加 Tat-SmacN7 后 4 h 进行 4 Gy 照射)。

1.4 WST-1 检测 EC109 细胞的生长抑制率

取对数生长期的 EC109 细胞, 按每孔 6×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后分组给予相应处理, 包括空白对照组、Tat-SmacN7 组、照射组和 Tat-SmacN7 联合照射组, 每组 6 个复孔, 空白对照组每孔加 100 μ l 培养基, Tat-SmacN7 组和联合组每孔加 100 μ l Tat-SmacN7 稀释液 (浓度为 50 μ mol/L), 4 h 后照射组和联合组进行 4 Gy 照

射, 培养 24、48 h 后用多功能酶标仪测定 492 nm 吸光度值, 测前 4 h 加 20 μ l WST-1 共孵。计算细胞生长的抑制率: 抑制率 (%) = (1 - 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值) \times 100%。

1.5 细胞克隆实验

取对数生长期的 EC109 细胞, 接种到 4 块不同照射剂量 (0、2、4、6 Gy) 的六孔板, 0 Gy 的六孔板内为 500 个细胞/孔, 2 Gy 的六孔板内为 1000 个细胞/孔, 4 Gy 的六孔板内为 2000 个细胞/孔, 6 Gy 的六孔板内为 4000 个细胞/孔, 其中每块板的 3 个孔为对照孔, 3 个孔为加药孔。接种细胞后将细胞摇匀, 放置到孵箱继续培养, 待细胞贴壁后加药孔加 Tat-SmacN7 溶液使其最终浓度为 20 μ mol/L, 4 h 后进行照射, 照射完毕后将细胞放孵箱培养 14 d 左右, 固定、染色、计克隆数, 以 >50 个细胞数为一个克隆, 计算细胞克隆形成率, 绘制存活曲线。

1.6 Western blot 检测各组细胞 Smac 蛋白表达水平

按上述分组分别进行细胞蛋白质的提取、定量, 等量蛋白采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 半干转膜法转移至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂奶粉封闭 3 h, 孵育一抗 (anti-Smac, 1:1000 稀释, anti- β -actin, 1:500 稀释) 3 h 或过夜。tris-buffered saline and tween 20 缓冲液 (简称 TBST 缓冲液) 冲洗 3 次 (10 min/次) 后孵育二抗 (1:2000 稀释) 1 h, TBST 缓冲液冲洗 3 次 (10 min/次) 后显影, 化学发光凝胶成像系统 (411NJC124316, 美国 Cell Biosciences 公司) 曝光。

1.7 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数比较采用 SPSS17.0 软件中的独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同处理对细胞生长的抑制

如图 1 所示, 24 h 后, Tat-SmacN7 组、照射组和联合组细胞抑制率分别为 (5.60 \pm 0.82) %、(14.24 \pm 1.00) % 和 (27.36 \pm 2.08) %, 联合组与 Tat-SmacN7 组、照射组相比, 差异有统计学意义 (*t* = 16.821、9.825, *P* < 0.05); 48 h 后, Tat-SmacN7 组、照射组和联合组细胞抑制率分别为 (6.36 \pm 1.07) %、(18.35 \pm 1.92) % 和 (37.63 \pm 2.03) %, 联合组与 Tat-

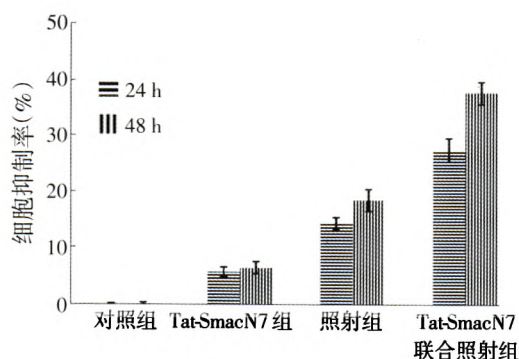


图1 不同时间不同处理组食管癌 109 细胞抑制率 图中, Tat: 反式激活蛋白; Smac: 第二线粒体来源的 caspase 激活因子; N7: Smac 的 N 端含有 Ala-Val-Pro-Ile 的七肽。

SmacN7 组、照射组相比, 差异有统计学意义($t=23.553, 11.930, P<0.05$)。Tat-SmacN7 单独对细胞的抑制作用较弱, Tat-SmacN7 联合照射具有明显的抑制肿瘤生长作用。Tat-SmacN7 对 EC109 细胞有辐射增敏作用。

2.2 细胞克隆实验检测 Tat-SmacN7 对 EC109 细胞的辐射增敏作用

细胞克隆实验如图 2, 随着照射剂量的增大, 细胞存活数明显下降, 而相同照射剂量下, 联合组细胞和照射组细胞相比, 细胞的存活数下降, 联合组细胞的存活曲线明显下移, 说明细胞在 Tat-SmacN7 的作用下, 对辐射的敏感性增强, 凋亡增加。

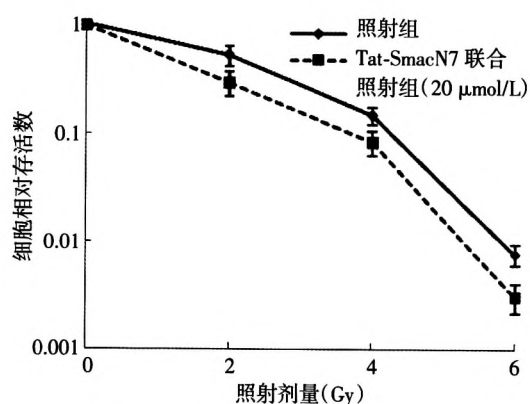


图2 Tat-SmacN7 对食管癌 109 细胞的辐射增敏作用 图中, Tat: 反式激活蛋白; Smac: 第二线粒体来源的 caspase 激活因子; N7: Smac 的 N 端含有 Ala-Val-Pro-Ile 的七肽。

2.3 Western blot 检测各组细胞 Smac 蛋白表达水平

为了进一步证明 Smac 的表达与细胞凋亡的关系, 本研究对细胞进行 Tat-SmacN7、照射以及联

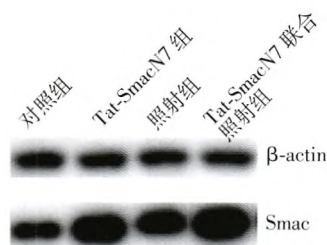


图3 Western-blot 检测 Smac 蛋白在 4 组食管癌 109 细胞中的表达 图中, 其中, Tat: 反式激活蛋白; Smac: 第二线粒体来源的 caspase 激活因子; N7: Smac 的 N 端含有 Ala-Val-Pro-Ile 的七肽。

合处理, 通过 Western blot 检测各组细胞 Smac 蛋白的表达水平, 结果发现 Tat-SmacN7 组和联合组两组的 Smac 蛋白表达明显增多, 照射组的 Smac 表达水平较对照组多一些(图 3)。

3 讨论

X 连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor-of-apoptosis protein, XIAP)是 IAPs 家族中具有潜在抑制活性的一种蛋白质, 它可以与 caspase-3、caspase-7 和 caspase-9(3 种蛋白酶)直接结合, 抑制 caspase 的活性, 从而抑制细胞凋亡的发生。IAPs 家族成员的共同特征是含有几个杆状病毒 IAPs 重复序列。Smac 是 2000 年发现的一种重要的凋亡调节基因, 是 IAPs 特异性的作用靶点, 在各种凋亡刺激因素(电离辐射、抗癌药物、DNA 损伤和化学信号等)的诱导下, 定位于线粒体内的 Smac 可与细胞色素 c 一同从线粒体膜间隙释放出来, 通过结合 XIAP, 破坏 XIAP 与 caspase-3 以及 caspase-9 的结合, 从而解除了 XIAP 对 caspases 家族的抑制作用, 促进细胞的凋亡。

细胞凋亡有两条经典的途径: 死亡受体途径和线粒体途径。Smac 在促进肿瘤细胞凋亡的机制上参与了两条途径。在线粒体凋亡途径中, Smac 蛋白通过其 AVPI 4 个疏水氨基酸残基同 XIAP 的杆状病毒 IAPs 重复序列 2 或杆状病毒 IAPs 重复序列 3 结合, 这两个结构域正是 XIAP 抑制 caspase 活性的结合位点, 从而促进细胞凋亡。在死亡受体途径中, 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是细胞凋亡的死亡受体途径中的重要因子。肿瘤坏死因子家族成员与相应的肿瘤坏死因子受体家族成员结合, 启动 procaspase-8 自身

切割并形成成熟的 caspase-8。通过 TRAIL 激活 caspase-8 的级联反应,可促使成熟的 Smac 蛋白迅速释放到细胞质中。Smac 蛋白再与 XIAP 结合并消除对 caspase-3 的抑制作用,并使 caspase-8 激活 caspase-3,通过 caspase 级联反应诱导靶细胞凋亡^[7]。实验表明,Smac 的高表达可促进 TRAIL 诱导的 caspase-8 和 Bid(一种凋亡诱导蛋白)的加工及细胞色素 c 的释放,进一步引起 caspase-3 的激活及缩短的 Bid 形成,从而促进细胞凋亡^[8]。SmacN7 是 Smac 氨基端的 7 个氨基酸序列,也是 Smac 最小的功能单位,我们前期实验证明了 SmacN7 结合 Tat 引导肽后可以顺利穿透细胞^[9]。研究表明 Smac 蛋白对正常细胞没有破坏作用^[10],并且在本实验中,单独使用 Tat-SmacN7 多肽对肿瘤细胞的抑制作用也不是很强,这和国外多篇文献的报道一致^[3-4]。Tat-SmacN7 联合照射后,对细胞的抑制作用明显增加,24 h 的抑制率为 $(27.36 \pm 2.08)\%$,48 h 的抑制率为 $(37.63 \pm 2.03)\%$,明显高于照射组[抑制率分别为 $(14.24 \pm 1.00)\%$ 和 $(18.35 \pm 1.92)\%$],表明 Tat-SmacN7 的高表达使 EC109 细胞对放射的敏感性增高。这与国外报道的将 Smac 转染人肿瘤细胞,使其过表达,可以大大增强肿瘤细胞对化疗以及放疗的敏感性结果一致^[11-12]。这一结果为提高食管癌患者化疗敏感性、降低不良反应提供了新的思路。同时也为进一步研究 Smac 基因在食管癌细胞体内外生长活性以及食管癌凋亡调控中的作用奠定了实验基础。

参 考 文 献

- [1] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.
- [2] Eschenburg G, Eggert A, Schramm A, et al. Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF- α -independent apoptosis. *Cancer Res*, 2012, 72(10): 2645-2656.
- [3] Yang J, McEachern D, Li W, et al. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(4): 658-669.
- [4] Yang D, Zhao Y, Li AY, et al. Smac-mimetic compound SM-164 induces radiosensitization in breast cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(1): 189-199.
- [5] Yang L, Mashima T, Sato S, et al. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells: therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res*, 2003, 63(4): 831-837.
- [6] Fandy TE, Shankar S, Srivastava RK. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol Cancer*, 2008, 7: 60.
- [7] Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*, 2002, 16(1): 33-45.
- [8] Zhang XD, Zhang XY, Gray CP, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria. *Cancer Res*, 2001, 61(19): 7339-7348.
- [9] Chen F, Xu C, Du L, et al. Tat-SmacN7 induces radiosensitization in cancer cells through activation of caspases and induction of apoptosis. *Int J Oncol*, 2013, 42(3): 985-992.
- [10] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, 102(1): 43-53.
- [11] Ogura A, Watanabe Y, Iizuka D, et al. Radiation-induced apoptosis of tumor cells is facilitated by inhibition of the interaction between Survivin and Smac/DIABLO. *Cancer Lett*, 2008, 259(1): 71-81.
- [12] Pluta A, Wrzesien-Kus A, Cebula-Obrzut B, et al. Influence of high expression of Smac/DIABLO protein on the clinical outcome in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*, 2010, 34(10): 1308-1313.

(收稿日期: 2012-10-26)