

## Smac 在 TRAIL 诱导人骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡中的作用

金 军, 赵 健, 李博华, 张 霞, 张瑞萍, 李晓东, 钱卫珠, 郭亚军\*

(第二军医大学科研部国际合作肿瘤研究所, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**初步研究 Smac 在 TNF 相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)诱导的人骨肉瘤 Saos-2 细胞凋亡中的作用。**方法:**观察细胞形态变化和以琼脂糖凝胶电泳分析 TRAIL 作用的 Saos-2 细胞 DNA 片段, 利用流式细胞术及细胞计数法比较 Smac 或 Bcl-2 表达不同的细胞的凋亡程度, 同时以 Western 印迹半定量检测细胞胞质内 Smac 表达水平。**结果:**Saos-2 细胞在 TRAIL 的作用下出现典型的凋亡样改变。在 TRAIL 作用 Saos-2 细胞时, Smac 在胞质中的含量明显增加。在 TRAIL 作用 24 h 后, Smac 在 Saos-2 细胞中过表达, 细胞凋亡率由 12.7% 增加到 31.4%。TRAIL 作用 Saos-2 细胞 48 h 后, 转染 Bcl-2 的细胞与转染空载体的 Saos-2 细胞相比, 凋亡率显著降低(由 24% 降至 15%), 且胞质中 Smac 的表达水平也明显降低。**结论:**在 TRAIL 诱导的凋亡中 Smac 起促进作用, Bcl-2 可以通过阻止 Smac 从线粒体释放到胞质中来抑制细胞凋亡。

**[关键词]** Smac; TNF 相关的凋亡诱导配体; 凋亡; 骨肉瘤

**[中图分类号]** R 738.1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0087-03

### Role of Smac in TRAIL-induced apoptosis of human osteosarcoma cell Saos-2

JIN Jun, ZHAO Jian, LI Bo-Hua, ZHANG Xia, ZHANG Rui-Ping, LI Xiao-Dong, QIAN Wei-Zhu, GUO Ya-Jun (International Cooperation Cancer Institute, Division of Scientific Research, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the function of Smac in TRAIL-induced human osteosarcoma cell Saos-2 apoptosis. **Methods:** Morphological changes and DNA electrophoresis were used to identify the cell apoptosis. The apoptosis rates were measured by FCM (flow cytometry) and cell counting; the Smac expression was detected with Western blotting. **Results:** TRAIL induced Saos-2 cell apoptosis. During the TRAIL-induced apoptosis, cytosol Smac was significantly increased and the increase could be inhibited by over-expressed Bcl-2. After TRAIL treatment for 24 h, the apoptosis rate of Smac over-expressed Saos-2 cells increased to 31.4% compared to that of control (12.7%). After TRAIL treatment for 48 h, the apoptosis rate of Bcl-2 over-expressed Saos-2 cells decreased to 15% compared to that of the control (24%). **Conclusion:** Smac takes part in the TRAIL-induced cell apoptosis, and it improves the TRAIL-induced cell apoptosis. Bcl-2 may inhibit the cell apoptosis by limiting the Smac release into the cytosol in TRAIL-induced cell apoptosis.

**[KEY WORDS]** second mitochondria-derived activator of caspase; TNF-related apoptosis inducing ligand; apoptosis; osteosarcoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1):87-89]

Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) 是线粒体内除细胞色素 C 外的第 2 个促凋亡蛋白, 当细胞受到凋亡刺激时, Smac 由细胞的线粒体释放到胞质中, 与抑制 Caspases (一组天门冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶) 活性的凋亡抑制蛋白 (inhibiting apoptosis proteins, IAPs) 结合, 使 IAPs 失去与 Caspases 结合的能力, 从而达到促凋亡的作用<sup>[1,2]</sup>。通过活化或抑制 Caspases 系统来诱导或抑制细胞凋亡, 成为治疗凋亡相关疾病研究方向之一<sup>[3~5]</sup>。许多研究证明 Smac 参与线粒体途径的细胞凋亡<sup>[6,7]</sup>。本实验研究 Smac 在 TNF 相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 诱导的典型的死亡受体凋亡途径中的作用, 为研究有效的肿瘤治疗提供一定的

实验依据。

### 1 材料和方法

1.1 试剂和材料 兔抗人 Smac 多抗由美国德克萨斯州大学王晓东博士惠赠, 鼠抗人 bax、Bcl-2 单抗购自 Santa Cruz 公司; 化学发光检测试剂为 Pierce 产品; PDVF 膜为 Millipore 公司产品。采用 AdEasy™ Vector 系统分别构建重组缺陷型腺病毒 Ad.Smac (表达 Smac 蛋白) 和对照腺病毒 Ad.GFP

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30000008)。

**[作者简介]** 金 军 (1969-), 男 (汉族), 博士, 主治医师。  
E-mail: jinjunchina@hotmail.com

\*Corresponding author. E-mail: yjguo@smmu.edu.cn

(表达绿荧光蛋白 GFP 蛋白)。

1.2 细胞及其处理 人骨肉瘤细胞 Saos-2 细胞株购于 ATCC;用含 bcl-2 基因的 pcDNA3.0 质粒采用脂质体介导法转染 Saos-2 细胞,G418 筛选后获得的过表达 Bcl-2 的 Saos-2 细胞株。用 1 μg/ml 或 5 μg/ml TRAIL 分别作用于上述细胞,通过镜显微镜观察细胞形态,琼脂糖凝胶电泳分析细胞 DNA 片段。

1.3 Smac 在 TRAIL 诱导细胞凋亡中的促进作用 细胞蛋白按常法提取,Bradford 法定量。用 10 MOI Ad. Smac 或 Ad. GFP 感染 Saos-2 细胞 24 h 后,1 μg/ml TRAIL 分别作用于 2 种 Saos-2 细胞 24 h,流式细胞术检测细胞的 DNA 亚二倍体。

1.4 Bcl-2 与 Smac 及 TRAIL 诱导的细胞凋亡的关系 5 μg/ml TRAIL 分别作用于 Bcl-2 过表达的 Saos-2 细胞及其对照细胞,48 h 时通过锥虫蓝染色,细胞镜下计数,计算细胞的凋亡率。同时进行 Western 印迹分析。

2 结果

2.1 TRAIL 诱导细胞凋亡 显微镜下发现一系列细胞凋亡样形态特征性改变:细胞变小、变圆,胞膜泡样改变,出现典型的凋亡小体。2%琼脂糖凝胶电泳也呈现明显的凋亡特征性梯状条带(图 1)。

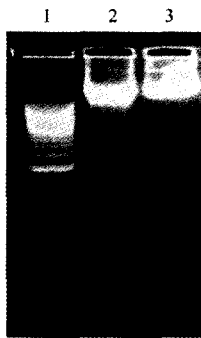


图 1 5 μg/ml TRAIL 诱导 Saos-2 细胞(24 h)凋亡  
Fig 1 5 μg/ml TRAIL induced Saos-2 cell(24 h) apoptosis  
1:Marker; 2:TRAIL; 3:Control

2.2 Smac 在 TRAIL 诱导细胞凋亡中的促进作用 5 μg/ml TRAIL 作用 Saos-2 细胞 24 h 后,细胞胞质中 Smac 蛋白水平明显升高,而无 TRAIL 作用的对照组细胞胞质中则未检测到 Smac。流式细胞术检测表明,Ad. Smac 感染组和 Ad. GFP 感染组细胞凋亡率分别为 31.4%和 12.7%,未用 TRAIL 处理组的细胞凋亡率分别为 1.98%和 1.66%。说明通过感染 Ad. Smac 使 Smac 在细胞中高表达后,显著

提高了 TRAIL 诱导细胞凋亡的效率。

2.3 Bcl-2 与 Smac 及 TRAIL 诱导的细胞凋亡的关系 转染空载体的 Saos-2 细胞凋亡率为 24%,Bcl-2 过表达的 Saos-2 细胞凋亡率为 15%。Western 印迹检测此时各细胞 20 μg 胞质成分中 Smac 的表达水平(图 2),显示转染空载体的 Saos-2 细胞胞质中 Smac 的水平明显高于 Bcl-2 过表达的细胞,提示 Bcl-2 可通过对 Smac 的调控抑制细胞凋亡。

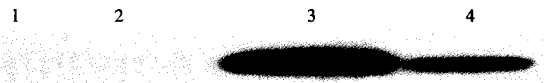


图 2 Bcl-2 在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中对 Smac 的阻滞作用  
Fig 2 Bcl-2 blocking Smac release to cytosol during TRAIL-induced apoptosis

1,3: Cells transfected with empty vector pcDNA3.0 as control; 2,4: Cells transfected with pcDNA3.0 vector containing Bcl-2 gene; 1,2: Without TRAIL treatment; 3,4: TRAIL treated for 48 h

3 讨论

大量研究表明,不同的启动性 Caspase 介导不同的凋亡信号<sup>[8,9]</sup>。Smac 是 2000 年新发现的细胞线粒体内的促凋亡蛋白,主要通过和凋亡抑制蛋白 IAPs 的结合使 IAPs 失去与 Caspases 结合的能力,从而活化 Caspases,发挥促进细胞凋亡的作用。

TRAIL 是近年发现的一类 TNF 家族的新成员,属 II 型细胞膜蛋白,其胞外区与 FasL 具有 28%的同源性,其胞内区仅 17 个氨基酸,在许多正常组织中都有表达,能通过死亡受体途径诱导多种肿瘤细胞迅速凋亡<sup>[10,11]</sup>。本实验发现,TRAIL 作用 24 h 后,Ad. Smac 转染的 Smac 高表达细胞凋亡率明显高于 Ad. GFP 转染的对照 Saos-2 细胞,提示 Smac 在 TRAIL 诱导死亡受体途径的凋亡中起促进作用。Bcl-2 家族是细胞凋亡信号转导的主要调节者,具有稳定线粒体膜,阻止线粒体释放 Caspase、凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C 等功能。在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中,Bcl-2 过表达的细胞胞质中 Smac 的表达和细胞凋亡率明显比对照细胞低,这提示 Bcl-2 可阻滞线粒体中凋亡促进蛋白 Smac 释入胞质与 IAPs 结合,这可能是 Bcl-2 抑制细胞凋亡的机制之一,即在死亡受体途径的细胞凋亡过程中,Bcl-2 通过对 Smac 的调节抑制细胞凋亡。

[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 elimi-

- inating IAP inhibition[J]. *Cell*,2000,102(1):33-42.
- [2] Verhagen AM,Paul GE,Pakusch M,et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. *Cell*,2000,102(1):43-53.
- [3] Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. *Cell*,2000,102(1):1-4.
- [4] Deveraux QL, Reed JC. IAP family protein-suppressors of apoptosis[J]. *Gene Dev*,1999,13(3):239-252.
- [5] Verhagen AM, Vaux DL. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac[J]. *Apoptosis*,2002,7(2):163-166.
- [6] Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis[J]. *Nature*,2001,410(6824):112-116.
- [7] Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2[J]. *EMBO J*,2001,20(23):6627-6636.
- [8] Srinivasula SM, Datta P, Fan XJ, et al. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway[J]. *J Biol Chem*,2000,275(46):36152-36157.
- [9] Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*,2001,15(5):931-956.
- [10] Wiley SR, Schooley K, Smolak PG, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*,1995,3(6):673-682.
- [11] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the TNF cytokine family[J]. *J Biol Chem*,1996,271(22):12687-12690.
- [收稿日期] 2003-06-17 [修回日期] 2003-11-20  
[本文编辑] 余党会

## • 研究简报 •

**STI571 联合异基因外周血干细胞移植治疗加速/急变期慢性髓细胞白血两例****Imatinib mesylate(Glivec) preceding allogeneic peripheral blood stem cell transplantation(Allo-PBSCT) in treatment of 2 patients with accelerated phase or blast phase chronic myelogenous leukemia**

陈少谊,章卫平,王健民,许晓巍(第二军医大学长海医院血液科,上海 200433)

[关键词] 甲磺酸伊马替尼;异基因造血干细胞;细胞移植;慢性髓细胞性白血病

[中图分类号] R 733.72 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)01-0089-01

我科采用 STI571[甲磺酸伊马替尼,商品名:格列卫(Glivec)]治疗加速期及急变期慢性髓细胞性白血病(CML)患者各 1 例,达临床缓解后,再进行异基因外周血造血干细胞移植(Allo-PBSCT),获得良好治疗效果,特报道如下。

**1 临床资料**

病例 1:患者男性,29 岁,自 2001 年底始感左上腹胀不适,触之有硬物感,未在意。2002 年 11 月 4 日因反复出现四肢乏力、盗汗,体质量进行性下降(共减轻约 15 kg)而就诊我院。体检:贫血貌,胸骨压痛,脾肿大平脐,血常规:WBC  $110 \times 10^9/L$ ,Hb 79 g/L,Plt  $280 \times 10^9/L$ 。骨髓象:有核细胞增生明显活跃,原粒细胞 0.08,早幼粒细胞 0.19,提示 CML 加速期(AP)。Ph<sup>1</sup> 染色体(+),bcr/ab1 融合基因(+).骨髓活检提示有骨髓纤维化表现。腹部 B 超显示:肝大,巨脾。予白细胞分离术,羟基脲 1 g 口服 3 次/d,并给予阿糖胞苷(Ara-C)100 mg 静滴(连用 5 d)化疗,治疗后白细胞恢复正常。2002 年 12 月 18 日起予 STI571 400 mg/d。2003 年 2 月 20 日复查骨髓象:提示 CML 完全缓解。患者与其兄 HLA 配型相合。2003 年 2 月 15 日行 Allo-PBSCT,预处理方案为环磷酰胺(CTX) 4.6 g(连用 2 d)+全身照射(TBI)6.0 Gy。供者采用非格司亭(商品名:格拉诺赛特)动员,共回输单个核

细胞(MNC)  $6.0 \times 10^8/kg$ ,CD34<sup>+</sup>细胞  $6.0 \times 10^6/kg$ ,造血重建顺利,复查 bcr/ab1 融合基因阴性。移植后 37 d,患者出现腹泻,无皮疹,肝酶谱轻度增高,考虑为 I 度急性移植物抗宿主病(GVHD),给予甲泼尼龙、环孢素、霉酚酸酯治疗好转。

病例 2:患者男性,21 岁,自 2001 年 1 月 6 日无诱因出现上腹疼痛,伴黑便、头痛、低热。体检:一般情况可,胸骨压痛明显,脾肋下 2 cm,血常规:WBC  $240 \times 10^9/L$ ,早幼粒细胞 0.03,中晚幼粒细胞 0.22,Plt  $210 \times 10^9/L$ 。骨髓象:CML 慢性期(CP),Ph<sup>1</sup> 染色体(+),bcr/ab1 融合基因(+).即予羟基脲 1 g 口服 3 次/d,2001 年 2 月 1 日始用干扰素 300 万 U 皮下注射,隔日 1 次,共 10 个月。2001 年 3 月 22 日起予三尖杉酯 2 mg $\times$ 5 d/月。2002 年 4 月 8 日来我院就诊,复查骨髓象:有核细胞增生明显活跃,原粒细胞 0.13,早幼粒细胞 0.37,红系、巨核系受抑,早期细胞过氧化物酶(POX)多数阳性至强阳性,提示 CML 进入急变期(BC)。4 月 10 日起予 STI571 400 mg/d。4 月 30 日复查骨髓象:CML 慢性期。6 月

(下转第 100 页)

[作者简介] 陈少谊(1971-),男(汉族),硕士生,主治医师。  
E-mail:chenshaoyi168@sohu.com