

Smac 蛋白与肿瘤辐射敏感性

刘强^{1,2}, 杜利清¹, 曹嘉¹, 王彦¹, 王宏¹, 陈凤华¹, 付岳¹, 郭艳婷¹, 樊飞跃¹

(1. 中国医学科学院放射医学研究所;

2. 天津市分子核医学重点实验室, 天津 300192)

摘要: 电离辐射作用于肿瘤细胞并且导致其死亡的重要机制就是诱导细胞发生凋亡。Smac 蛋白是一种存在于线粒体内并且调节细胞凋亡的蛋白质, 主要通过 IAP 作用促进细胞的凋亡。作为一个重要的凋亡调节子, 其功能是解除 IAP 的凋亡抑制作用, 促进细胞凋亡。应用 Smac 蛋白或者由其衍生的活性小分子多肽将成为未来肿瘤治疗的新方法, 将为临床肿瘤放疗提供新的辅助手段, 尤其是对于具有明显辐射耐受的肿瘤, 可以提高其辐射敏感性, 提高放疗疗效, 延长肿瘤患者的生存期, 改善其生活质量。

关键词: 辐射敏感性; 肿瘤; 凋亡抑制蛋白; 细胞凋亡; Smac 蛋白

中图分类号: Q691

Smac protein and the radiosensitivity of tumor cells

Liu Qiang, Du Liqing, Cao Jia, Wang Yan, Wang Hong, Chen Fenghua, Fu Yue, Guo Yanting, Fan Feiyue

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Tianjin 300192)

Abstract: Apoptosis is the main mechanism of the tumor cell damage caused by radiation. Smac is a protein in the mitochondrion can promote apoptosis. Smac can inhibit the active of the inhibitor of apoptosis protein (IAPs) because of the special binding to IAPs and then increase the radio-sensitivity of tumor cells. This is the advancing front nowadays in the area of radiation biology. It may be great value in the exploring new drug by using the Smac or derivative peptide for radio-sensitization and increase the effect of radiation therapy.

Key words: Radiosensitivity; Tumor; Inhibitor of apoptosis protein; Apoptosis; Smac

0 引言

电离辐射可造成 DNA 损伤、细胞周期调控紊乱和细胞死亡, 这些效应是肿瘤放射治疗的理论基础。对于某些辐射高敏感性肿瘤来说, 放射治疗是其临床治疗的重要手段。近年来, 随着放射外科的飞速发展, 为适于放射治疗的肿瘤患者提供了非常有效的治疗手段, 然而各种肿瘤甚至同种肿瘤不同病理类型、不同病人其治疗效果却有很大差异, 其中一个重要的原因就是肿瘤细胞对射线作用的敏感性不同, 可见, 不同患者个体之间辐射敏感性的不同影响到了治疗效果和副作用的发生。

基金项目: 国家自然科学基金 (30800281, 31170804); 天津市自然科学基金重点项目 (10JCZDJC16900, 11ZCGYSY02400); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (200800231051, 20101106110046)。

作者简介: 刘强 (1974-), 男, 研究员, 主要从事放射生物学研究

通信联系人: 樊飞跃 (1958-), 男, 研究员, 主要从事放射生物学研究. E-mail: faithyfan@yahoo.cn

1 肿瘤细胞的辐射敏感性与细胞凋亡

线粒体 DNA4977 片断缺失的定量分析可以在某种程度上预测肿瘤细胞的辐射敏感性^[1,2]。在某一剂量照射条件下, 该片断缺失的量越多, 说明待测肿瘤细胞的辐射敏感性越高。因此, 我们可以对原代细胞经过照射处理后, 检测其线粒体 DNA4977 的定量缺失, 进而为临床设计个体化的放疗方案提供依据。

众所周知, 辐射诱导肿瘤细胞的凋亡是肿瘤放疗的主要生物学基础。细胞凋亡信号通路主要有两条, 一是外部途径, 即死亡受体介导的细胞凋亡信号通路。通过胞外死亡受体与相应配体结合, 激活细胞内的凋亡执行分子 caspase; 二是内部途径, 即线粒体介导的细胞凋亡信号通路, 如 DNA 损伤、缺氧和生长因子缺乏等。主要通过调控线粒体膜通透性、释放凋亡激活因子和细胞色素 C 来激活凋亡执行分子 caspase。这些活化的凋亡执行分子 caspase 将细胞内的重要蛋白降解, 诱发一系列的级联反应, 诱导细胞凋亡。线粒体作为细胞内的产能中心和代谢中心, 线粒体 DNA (mtDNA) 与体内能量、代谢直接相关。我们的前期研究发现, 肿瘤细胞接受不同剂量照射之后, 可以诱发 mtDNA4977 片断的缺失^[1,2], 该片断包括 ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4 和 ND5 等编码的基因。缺失的发生使线粒体氧化磷酸化复合物 I 的第 5 亚单位基因与复合物 V (ATPase) 的第 8 亚单位基因融合, 容易导致 ATP 的合成和利用减少, 影响线粒体的氧化磷酸化, 使呼吸链功能失衡, 引发细胞衰老、凋亡甚至死亡。可见, mtDNA 损伤或许就是细胞凋亡的诸多调控因素之一, 然而, 其下游蛋白水平的凋亡信号通路调控也许起到了同样重要的作用。

2 IAPs 与肿瘤辐射敏感性

在放疗过程中, 肿瘤细胞往往产生对辐射的耐受。肿瘤细胞内凋亡信号通路调控的异常, 往往是肿瘤细胞对放射治疗诱导的凋亡产生耐受性的原因之一。肿瘤细胞内凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)的高水平表达会抑制凋亡 caspase, 从而降低细胞对各种治疗手段诱导细胞凋亡的敏感性^[3]。IAPs 是一类结构相关的抑制细胞凋亡的蛋白家族, 包括 XIAP、cIAP1、cIAP2、ML-IAP 和 Survivin 等。IAP 家族蛋白抑制凋亡主要是通过其 BIR 结构域与 caspase 结合, 抑制 caspase 的激活及其活性来实现。肿瘤细胞内 IAP 蛋白家族和其他一些凋亡抑制蛋白表达的上调正是肿瘤细胞产生辐射抗性的基础。因此, 以肿瘤细胞内

IAP 分子为靶点, 治疗肿瘤已成为放射生物学和放射肿瘤学的研究前沿方向之一。

3 Smac 分子对肿瘤细胞凋亡的促进作用

Smac/DIABLO被称为第二线粒体来源的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶激活剂(second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)或低等电点的凋亡抑制蛋白家族直接结合蛋白(direct IAP binding protein with low pI, DIABLO)。是2000年7月由Du^[4,5] 等的实验小组首次报道从Hela细胞中分离出的一种新型线粒体蛋白质, 免疫分析确定Smac/DIABLO定位于线粒体内, 凋亡刺激(包括抗癌药物、电离辐射、化学信号和DNA损伤)可使其与细胞色素c(Cyt-C)一同从线粒体膜间区释放出来, 发挥促凋亡作用。

Smac/DIABLO是一种存在于线粒体并且调节细胞凋亡的蛋白质, 主要通过
与IAP作用促进细胞的凋亡。作为一个重要的凋亡调节子, 其功能是解除IAP的
凋亡抑制作用, 促进细胞凋亡^[6~9]。已如前述, 细胞凋亡中主要的途径包括死亡
受体途径和线粒体途径, 这两条途径都有caspases家庭成员的参与。IAPs正常情
况下, 与caspase结合而使其丧失活性, 从而抑制细胞凋亡^[10]。Smac/DIABLO在
凋亡刺激物作用下, 从线粒体中释放出来, 特异地与IAP家族的XIAP相互作用^[11,12]。我们可以预见, 应用Smac/DIABLO或者由其衍生的活性小分子多肽将成为未来肿瘤治疗的新方法。

人类 Smac/DIABLO 基因位于 12 号染色体长臂, 由 7 个外显子组成。由该基
因编码的 Smac/DIABLO-L 蛋白被转运到线粒体内, 而野生型的 Smac/DIABLO
蛋白, 即成熟的 Smac/DIABLO 蛋白则以纯二聚体的形式存在于线粒体的膜间隙
内。全长的 Smac/ DIABLO 蛋白没有促凋亡活性, 在其被转运到线粒体后, 切
除了其 N 端含有 55 个氨基酸残基的信号肽分子, 获得促凋亡活性。

Smac/DIABLO 在正常细胞不诱发凋亡, 只在受损的细胞中起作用^[5]。两个
Smac/DIABLO 分子通过 H1 N 末端的 1/2 与 H2 C 末端发生同源二聚化, 该二聚
化对其促进细胞凋亡活性是必不可少的^[13]。Smac 蛋白被转运到线粒体后, 切
除了其 N 端含有 55 个氨基酸残基的信号肽分子, 获得促凋亡活性。文献报道, 细
胞凋亡线粒体途径中的 caspase-3 可以激活 procaspase-8, 形成 caspase-8, caspase-8
不仅是细胞凋亡死亡受体途径的关键因子, 而且可以触发进一步的线粒体损伤

95 [14-16], 可见细胞凋亡的两种途径之间存在紧密联系。

前期研究表明, Smac/DIABLO 促凋亡活性的功能基团定位于 N 端的 7 个氨基酸残基, 即 Smac N7^[13,15,17], 氨基酸序列为: H-Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-OH。Smac N7 在细胞溶解提取液中的活性研究表明, Smac N7 能够与 XIAP 特异性结合, 明显促进药物诱导的细胞凋亡活性, 但是, 用免疫荧光技术发现, Smac N7
100 不能从细胞外进入细胞^[16], 无法在细胞内发挥其促凋亡作用。要想把 Smac N7 顺利导入细胞, 必须借助具有细胞穿透能力的引导基团的帮助^[18-19]。

近十年来, 在细胞生物学研究领域, 陆续发现了一些具有细胞穿透功能的氨基酸序列, 长度多数小于 20 个氨基酸, 被命名为穿膜肽(Cell-penetrating peptides, CPPs), 它们可以携带多种物质, 包括亲水性蛋白、多肽、DNA 甚至
105 颗粒性物质等进行细胞间/内的传输, 并且不受细胞类型的限制, 在细胞生物学、基因治疗学以及药学等领域具有很大的研究价值^[20-22]。如今, 陆续有新的 CPPs 被发现, 其中发现较早的果蝇 Antennapedia 蛋白 (ANTP) 同源结构域的第三个 α 螺旋 (43~58 之间的 16 个氨基酸残基) 是具有转导功能的最小蛋白区域, 不依赖于受体、通道、能量及胞吞作用, 可以直接作用于脂质双分子层完成跨膜运动而进入细胞^[17,23,24]。用这个功能区的 16 肽对 Smac N7 分子进行修饰, 即把 Smac
110 N7 分子 C 末端的赖氨酸用一个脯氨酸接头与该 16 肽 N 末端的精氨酸连接, 合成细胞渗透型的 ANTP-Smac N7 融合蛋白, 其氨基酸序列为: H-Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-Pro-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met- Lys-Trp-Lys-Lys-OH。以 ANTP 作为引导肽, 把 Smac N7 分子导入细胞内,
115 进而发挥其促凋亡活性。这对探索新的辐射增敏药物、提高放疗疗效具有很大的指导价值和现实意义。

4 结论

肿瘤的形成是多因素多基因参与的复杂过程, 而 Smac / DIABLO 能通过多种途径, 联合多种基因和细胞因子起到抗肿瘤的作用, 所以对于肿瘤的联合基因
120 治疗, Smac 有良好的应用前景^[25,26]。当然, 基于对 Smac/DIABLO 的功能和作用机制有了一定的认识, 肿瘤细胞内 IAP 蛋白家族和其他一些凋亡抑制蛋白表达的上调正是肿瘤细胞产生辐射抗性的基础^[27]。因此, 以肿瘤细胞内 IAP 分子为靶点, 增强肿瘤细胞对治疗因素的敏感性已成为放射生物学和肿瘤治疗学的一个

研究热点,我们认为针对于在某些 IAPs 过表达或 Smac/DIABLO 低表达的肿瘤,

125 抑制 IAPs 功能的直接治疗能显示出更明显的效果。可以预见的是,

Smac/DIABLO 在肿瘤治疗方面将展现出一片颇为喜人的应用前景。

[参考文献] (References)

- [1] 褚丽萍, 刘强, 王芹等. Δ mtDNA4977 和彗星分析评价肿瘤细胞辐射敏感性研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2008, 28 (2): 142-145.
- [2] Chinnery PF, Samuels DC, Elson J, et al. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism[J]? Lancet, 2002, 360(9342):1323-1325.
- [3] Kashkar H, Haefs C, Shin H, et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells[J]. J Exp Med. 2003 Jul 21;198(2):341-347.
- 135 [4] DU C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome- dependent caspase activation by elimination IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1):33-42.
- [5] Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell, 2000, 102(1):43-53.
- [6] Giagkousiklidis S, Vogler M, Westhoff M, et al. Sensitization for irradiation induced apoptosis by second mitochondria-derived activator of caspase[J]. Cancer Res. 2005, 65(22): 10502-10513.
- 140 [7] 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, 112-116.
- [8] Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, et al. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain[J]. Nature. 2000, 408, 1004-1008.
- 145 [9] 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, 36152-36157.
- [10] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases[J]. Nature, 1997, 388(6639): 300-304.
- [11] Vucic D, Deshayes K, Ackerly H, et al. SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP)[J]. J Biol Chem. 2002, 277(14):12275-12279.
- 150 [12] Jia L, Patwari Y, Kelsey SM, et al. Role of Smac in human leukaemic cell apoptosis and proliferation[J]. Oncogene. 2003, 22(11):1589-1599.
- [13] Chai J, Du C, Wu JW, et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO[J]. Nature. 2000, 406, 855-862.
- 155 [14] Sohn D, Schulze-Osthoff K, Janicke RU. Caspase-8 can be activated by interchain proteolysis without receptor triggered dimerization during drug-induced apoptosis[J]. J Biol Chem. 2005, 8: 5267-5273.
- [15] Guo F, Nimmanapalli R, hanthi Paranawithana S, et al. Ectopic overexpression of second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO) or cotreatment with N-terminus of Smac/DIABLO peptide potentiates epothilone B derivative-(BMS 247550) and Apo-2L/TRAIL-induced apoptosis[J]. Blood, 2002, 99: 3419-3426.
- 160 [16] 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[J]. Cancer Res. 2003, 63: 831-837.
- [17] Derossi D, Calvet S, Trembleau A, et al. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor- independent[J]. J Biol Chem, 1996, 271(30):18188-18193
- 165 [18] 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[J]. Mol Cancer Ther. 2011 10(4):658-69.
- [19] Schmidt N, Mishra A, Lai GH, et al. Arginine-rich cell-penetrating peptides[J]. FEBS Letters. 2010, 584:1806-1813.
- 170 [20] Kamide K, Nakakubo H, Uno S, Fukamizu A. Isolation of novel cell-penetrating peptides from a random peptide library using in vitro virus and their modifications[J]. Int J Mol Med. 2010; 25(1): 41-51.
- [21] Lim KS, Won YW, Park YS, Kim YH. Preparation and functional analysis of recombinant protein transduction domain-metallothionein fusion proteins[J]. Biochimie. 2010, 92(8):964-70.
- [22] Huerta S, Gao X, Livingston EH, et al. In vitro and in vivo radiosensitization of colorectal cancer HT-29 cells by the smac mimetic JP-1201[J]. Surgery. 2010 Aug;148(2):346-53.
- 175 [23] Cheung HH, Beug ST, St Jean M, et al. Smac mimetic compounds potentiate interleukin-1 beta-mediated cell death[J]. J Biol Chem. 2010; 285(52):40612-23.
- [24] Petersen SL, Peyton M, Minna JD, Wang X. Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107(26): 11936-41.
- 180 [25] Servida F, Lecis D, Scavullo C, et al. Novel second mitochondria-derived activator of caspases (Smac) mimetic compounds sensitize human leukemic cell lines to conventional chemotherapeutic drug-induced and death receptor-mediated apoptosis. Invest New Drugs[J]. 2011, 29(6):1264-75.
- [26] Probst BL, Liu L, Ramesh V, et al. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a

- 185 TNF- α -dependent manner[J]. Cell Death Differ. 2010; 17(10):1645-54.
- [27] Hosokawa Y, Sakakura Y, Tanaka L, Okumura K, Yajima T, Kaneko M. Radiation-induced apoptosis is independent of caspase-8 but dependent on cytochrome c and the caspase-9 cascade in human leukemia HL60 cells[J]. J Radiat Res, 2005;46(3):293-303.