

文章编号: 0258-7025(2009)10-2609-05

紫外辐射诱导的细胞凋亡中 PUMA 与 Bcl-2 家族蛋白间调控的分子成像研究

张英杰 邢 达 刘 镭

(华南师范大学生物光子学研究院激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

摘要 紫外辐射诱导的细胞凋亡是一个包括 DNA 损伤、死亡受体启动、线粒体破裂等一系列反应的复杂过程。有研究报道,由紫外辐射引发的 DNA 损伤可以激活肿瘤抑制因子 p53,从而触发细胞凋亡级联反应,其中一个重要的事件就是上调促凋亡蛋白(p53 up-regulated modulator of apoptosis, PUMA)的表达。但是, PUMA 在紫外辐射诱导凋亡过程中的作用机制尚不清楚。利用荧光共振能量转移技术(Fluorescence resonance energy transfer, FRET),在人类肺腺癌细胞(ASTC- α -1)内实时研究了紫外辐射诱导凋亡过程中 PUMA, Bax, Bcl-Xl 三者之间的相互作用关系,从而揭示 PUMA 的作用机制。用 120 mJ/cm² 的紫外辐射剂量诱导细胞凋亡,通过共转染荧光探针 GFP-PUMA 和 YFP-Bcl-Xl 或者 CFP-Bcl-Xl 和 YFP-Bax,在激光共聚焦扫描显微镜下实时检测 PUMA 和 Bcl-Xl 或者 Bcl-Xl 和 Bax 之间的相互作用。结果显示,紫外辐射后 GFP-PUMA 与 YFP-Bcl-Xl 之间的 FRET 现象逐渐增强,说明 PUMA 与 Bcl-Xl 的作用越来越强;CFP-Bcl-Xl 与 YFP-Bax 之间的 FRET 现象逐渐减弱,说明 Bcl-Xl 与 Bax 的作用越来越弱,此过程伴随有 YFP-Bax 在线粒体的明显定位。该实验结果暗示 PUMA 是竞争结合了 Bcl-Xl,解除了 Bcl-Xl 对 Bax 的抑制作用,进而活化了 Bax。

关键词 紫外辐射; 上调促凋亡蛋白; Bax; Bcl-Xl; 荧光共振能量转移技术

中图分类号 O436 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093610.2609

PUMA Promotes Bax Translocation by Competitive Binding to Bcl-Xl during UV Irradiation-Induced Apoptosis

Zhang Yingjie Xing Da Liu Lei

(Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education, Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract UV-mediated apoptosis is a highly complex process in which different molecular pathways are involved. These include DNA damage, triggering of cell death receptors and the broken of mitochondria. It has been reported that DNA damage which is induced by UV irradiation can active the tumor suppressor p53 and trigger a cascade response of cell apoptosis. One of the most important thing is the expression of PUMA is upregulated. However, the mechanism of PUMA-mediated apoptosis and Bax translocation after UV irradiation remains unclear. In this study, the fluorescence resonance energy transfer (FRET) technique was used to study the dynamic interaction among PUMA, Bax and Bcl-Xl in living single-cells. ASTC-a-1 cells were transiently co-transfected with GFP-PUMA and YFP-Bcl-Xl or CFP-Bcl-Xl and YFP-Bax, followed with 120 mJ/cm² UV irradiation. We found that the FRET intensity of GFP-PUMA and YFP-Bcl-Xl increased while the FRET intensity of CFP-Bcl-Xl and YFP-Bax decreased suggesting PUMA has a more strong interaction with Bcl-Xl than Bax. At the same time, GFP-Bax translocated to the mitochondria from the cytosol in typical cells started at about 7 h after UV irradiation. Taken together, the results

收稿日期: 2008-10-12; **收到修改稿日期**: 2008-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(30870676, 30870658)、“长江学者与创新团队计划”创新团队项目(IRT0829)和广东省自然科学基金(7117865)资助课题。

作者简介: 张英杰(1983—),男,博士研究生,主要从事活体中生物单分子行为检测方面的研究。

E-mail: yjzhang@scnu.edu.cn

导师简介: 邢 达(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事活体中生物单分子行为检测方面的研究。

E-mail: xingda@scnu.edu.cn

indicated that PUMA promotes Bax translocation by competitive binding to Bcl-Xl during UV-induced apoptosis.

Key words UV irradiation; p53 up-regulated modulator of apoptosis; Bax; Bcl-Xl; fluorescence resonance energy transfer

1 引 言

p53 up-regulated modulator of apoptosis(PUMA)是肿瘤抑制因子 p53 的下游靶向基因,同时也是 Bcl-2 家族中编码 BH3-only 蛋白的一员^[1]。一般情况下,PUMA 在细胞中的表达水平很低,但是当细胞受到 DNA 断裂因子的刺激如化学药物,离子或者紫外辐射时,其表达水平就会显著提高^[1]。由 DNA 损伤而引起的 PUMA 的激活依赖于 p53 的活性,而且是通过 p53 直接跟 PUMA 基因的启动子区域的结合来介导完成的^[1]。PUMA 在多种因子诱导的细胞凋亡中都起了重要作用^[2]。

紫外辐射可以通过直接损伤细胞的 DNA 而激活 p53,进而促进细胞的凋亡^[3]。DNA 损伤可以改变 p53 的磷酸化水平,诱导细胞进入周期停滞或者凋亡。由于 p53 的激活而诱发的细胞凋亡的信号网络最终通过两个主要的凋亡途径来实现^[4]。其中外源的凋亡途径是通过死亡受体家族的受体与其相应的配体的结合而引发的^[4]。另外,DNA 受到损伤后,p53 可以与其靶向基因启动子区域的特殊 DNA 序列相结合^[5],这些被转录激活的基因可以引发细胞凋亡,细胞周期停滞,DNA 修复以及其他的应激反应^[6]。PUMA 就是 p53 众多下游靶向基因中的一个,其启动子区域有两个 p53 的结合位点,p53 可以直接结合到任何一个位点上并激活 PUMA 基因的转录^[7]。

促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 是线粒体凋亡途径的重要调节因子^[8]。Bak 定位与线粒体外膜,Bax 在正常情况下均匀分布于细胞浆中,但是在细胞凋亡的过程中会从胞浆转位到线粒体外膜^[8]。转位至线粒体后,Bax 会以多聚化的方式在线粒体外膜形成小孔或者打开线粒体外膜上的其他通道来诱导细胞色素 C 的释放^[9]。然而有报道指出,类似 Bcl-2 的因子如 Bcl-Xl 可以抑制这个过程的发生^[10]。

我们前期工作证明了 Bax 在 TNF α 和 cisplatin 的诱导下都会从胞浆转位到线粒体^[11,12],为了深入理解 PUMA 在紫外辐射诱导细胞凋亡中的重要作用,在人类肺腺癌细胞中,利用荧光共振能量转移技术(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)来研究 PUMA, Bax 以及 Bcl-Xl 三者之间动态的相互作用关系,以揭示 PUMA 促进 Bax 转位的分子机制。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

激光共聚焦扫描显微镜(LSM 510/ConfoCor2)购于德国 Zeiss 公司,转染试剂 Lipofectamine 购于美国 Invitrogen 公司,细胞培养基 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)购于英国 GIBCO 公司,p53 抑制剂(Pifithrin- α)购于美国的 BioVision 公司。pGFP-PUMA 质粒由美国匹兹堡大学于建教授赠送^[1], pDsRed-Mit 质粒由日本东京大学 Y. Gotoh 教授赠送,pYFP-Bax 和 pCFP-Bcl-xL 以及 pGFP-Bax 质粒分别由英国曼彻斯特大学的 Andrew 教授和 Richard J. 教授赠送,pYFP-Bcl-Xl 质粒由英国曼彻斯特大学的 Gilmore 教授赠送^[13]。其他试剂主要购于 Sigma 公司。

2.2 细胞培养及处理

细胞培养液为 DMEM,添加 10% 小牛血清(FCS),100 units/mL 青霉素和 100 μ g/mL 的链霉素,在 5% 体积分数的 CO₂ 和 37 $^{\circ}$ C 恒温条件下培养。人肺癌细胞用胰蛋白酶消化,转至细胞培养皿,培养 24 h 左右,使细胞汇合 30% ~ 50%,使用 Lipofectin 试剂和无血清 DMEM 培养基转染,5 h 后用含有血清的 DMEM 培养基取代转染试剂,继续培养 24~48 h 后即可进行观察。用紫外辐射处理细胞时,先吸干培养皿内的细胞培养液,用 PBS 将细胞清洗 3 遍后即可用紫外辐射处理,然后再加入新的细胞培养液并检测。一般情况下,采用 120 mJ/cm² 的紫外辐射剂量来诱导细胞凋亡。

2.3 GFP-Bax 转位的分析

为了在活细胞内检测 GFP-Bax 的转位情况,在人类肺腺癌细胞中瞬时共转染 pGFP-Bax 和 pDsRed-Mit 质粒,利用激光共聚焦扫描显微镜(LSM510),可以在紫外辐射诱导细胞凋亡的过程中时时观测到 GFP-Bax 和 DesRed-Mit(一种线粒体标记物)的定位情况。Bax 的再定位情况可以通过 GFP-Bax 和 DesRed-Mit 的发射荧光来评价。当细胞中的 GFP-Bax 聚集成荧光很强的点状并与 DesRed-Mit 的分布重合时,就认为这个细胞内的 Bax 转位到了线粒体上。

2.4 FRET 分析

FRET 实验在激光共聚焦扫描显微镜上操作完

成。选用一个带有可调节过滤器的氩离子激光器发出的 458 nm 激光作为激发光源。激发光经过一个双色镜(主分光器)的反射,然后通过一个 40 倍的油镜打到样品上。分别用 470~500 nm 和 535~545 nm 的滤光器来收集 CFP 和 YFP(FRET 受体)的发射光,用 500~520 nm 和 535~545 nm 的滤光器来收集 GFP 和 YFP(FRET 受体)的发射光。然后用 Zeiss Rel3.2(Zeiss, Germany)图像处理软件来分析荧光的强度。减掉背景的影响后,每个像素的平均荧光强度都被计算出来。在对照实验中,荧光探针的漂白可以忽略不计。

2.5 细胞活性和凋亡的分析

以 5×10^3 /孔的密度在 96 孔板内培养人类肺腺癌细胞,24 h 后,细胞被分成 5 个实验小组,分别用 0 (control), 80, 100, 120 和 150 mJ/cm² 的紫外辐射剂量处理细胞。然后用 Cell Counting Kit-8

分别在紫外辐射细胞后的 3,6,9,12 和 15 h 检测细胞的活力。通过酶标仪 (DG5032, Hua dong, Nanjing, China) 读取 96 孔板内每个孔在 450 nm 处的 OD 值,进而确定细胞的活性状况。

3 结 果

3.1 紫外辐射诱导细胞凋亡具有时间和剂量的依赖性

为了找到一个合适的诱导细胞凋亡的紫外辐射剂量,选用了不同的剂量来照射人类肺腺癌细胞。然后用 Cell Counting Kit-8 分别在紫外辐射细胞后的 3,6,9,12 和 15 h 检测细胞的活力。450 nm 处的吸光度值(OD₄₅₀)反映了细胞的活力状况。结果显示,OD₄₅₀ 的值随着紫外辐射剂量的加大和时间的延长而下降,这意味着紫外辐射对细胞凋亡的影响是有时间和剂量的依赖性的,如图 1(a)。

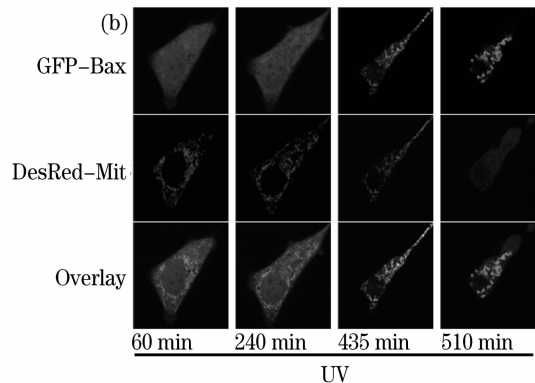
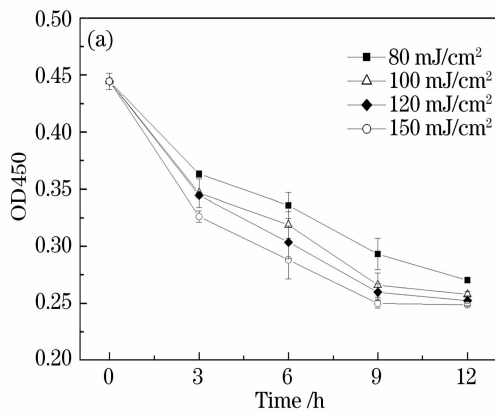


图 1 紫外辐射诱导细胞凋亡和 Bax 转位。(a) 在不同的紫外辐射剂量处理细胞后,分别在 0,3,6,9 和 12 h 检测细胞的活性; (b) GFP-Bax 在紫外辐射后 7 h 左右转位到线粒体

Fig. 1 UV irradiation induces apoptosis and Bax translocation in ASTC-a-1 cells. (a) Cells viability was analyzed using Cell Counting Kit-8 at 0, 3, 6, 9 and 12 h after various fluence UV irradiation; (b). GFP-Bax translocated to mitochondria noticeably at 7 h after UV irradiation

Bax 在正常情况下是均匀分布于细胞浆中的,但是在细胞凋亡的过程中会从胞浆转位到线粒体外膜。为了时时检测在紫外辐射诱导细胞凋亡过程中 Bax 的转位情况,在人类肺腺癌细胞中瞬时共转染 GFP-Bax 和 DesRed-Mit,将细胞放置于 37 °C 培养箱中孵育 48 h,然后用 120 mJ/cm² 的紫外辐射处理。结果显示,在单一的典型细胞中,GFP-Bax 在紫外辐射后的 7 h 左右开始发生转位,如图 1(b)。

3.2 在紫外辐射诱导细胞凋亡的过程中,PUMA 与 Bcl-X1 的相互作用逐渐增强

早期的研究表明,Bcl-2 家族的抗凋亡成员如 Bcl-2 和 Bcl-X1 可以抑制 Bax 介导的凋亡。然而,

Bax 对于 PUMA 诱导的凋亡则是必需的,同时 Bax 可以与 Bcl-X1 发生相互作用。因此推测 PUMA 可以通过影响 Bax 与 Bcl-X1 之间的关系来激活 Bax 的转位。为了检测这种假说,用荧光共振能量转移技术在单个的活细胞内研究了 PUMA,Bax 和 Bcl-X1 之间的动态相互作用。在人类肺腺癌细胞中瞬时共转染 GFP-PUMA 和 YFP-Bcl-X1,然后用上述方法进行处理。结果表明,在紫外辐射细胞后,GFP 通道的光强有所减弱而 FRET 通道的光强则有所增强,如图 2(a),同时 Ratio(FRET/GFP 的比值)和对照组相比也有所上升,如图 2(b),这意味着 GFP-PUMA 和 YFP-Bcl-X1 之间的结合量越来越多。

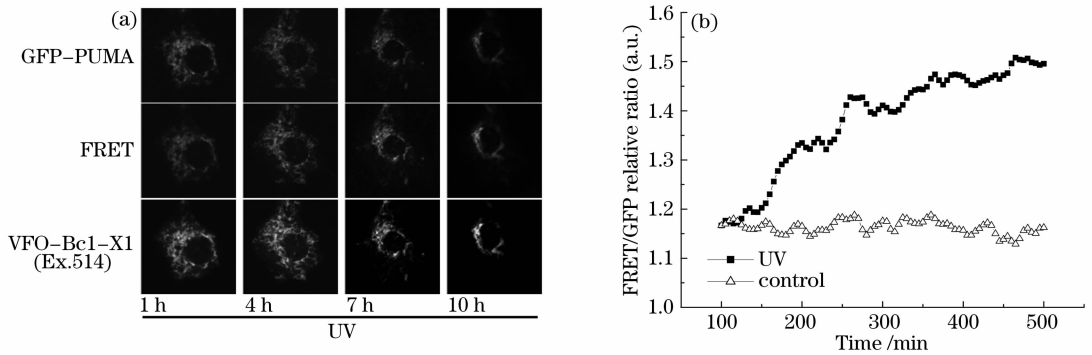


图2 GFP-PUMA 与 YFP-Bcl-X1 之间的 FRET 现象逐渐增强。(a) 在人类肺腺癌细胞中瞬时转染 GFP-PUMA 和 YFP-Bcl-X1, 紫外辐射处理后, FRET 通道的荧光逐渐增强; (b) 与对照组相比, FRET 通道与 GFP-PUMA 通道荧光强度的比值上升

Fig.2 FRET intensity of GFP-PUMA and YFP-Bcl-X1 increased. (a) ASTC-a-1 cells were transiently co-transfected with GFP-PUMA and YFP-Bcl-X1, and then treated with UV irradiation. The intensities of FRET increased; (b) ratio of FRET/GFP-PUMA increased compare to the control group

3.3 在紫外辐射诱导细胞凋亡过程中, Bcl-X1 与 Bax 的相互作用逐渐减弱

为了检测 PUMA 的表达是否对 Bcl-X1 和 Bax 之间的关系产生了影响, 在人类肺腺癌细胞中瞬时共转染 CFP-Bcl-X1 和 YFP-Bax, 然后用上述方法进行处理。结果表明, CFP 通道的光强有所增强而 FRET 通道的光强有所减弱, 如图 3(a), 同时 Ratio

(FRET/CFP 的比值) 和对照组相比也有所下降, 如图 3 (b), 这意味着 CFP-Bcl-X1 和 YFP-Bax 之间的结合量越来越少。另外, YFP-Bax 在紫外辐射细胞后则发生了明显的转位并与 Bcl-X1 实现了共定位, 如图 3(a)。这个结果显示了 PUMA 通过竞争结合 Bcl-X1 而释放了 Bax 并促进了 Bax 的转位。

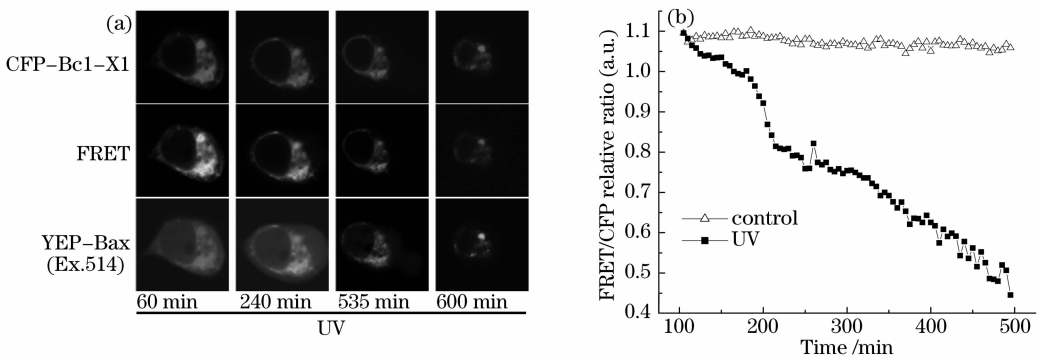


图3 CFP-Bcl-X1 与 YFP-Bax 之间的 FRET 现象逐渐减弱。(a) 在人类肺腺癌细胞中共瞬时转染 CFP-Bcl-X1 和 YFP-Bax, 紫外辐射处理后, FRET 通道的荧光逐渐减弱。(b) 与对照组相比, FRET 通道与 CFP-Bcl-X1 通道荧光强度的比值下降

Fig.3 FRET intensity of CFP-Bcl-X1 and YFP-Bax decreased. (a) ASTC-a-1 cells were transiently co-transfected with CFP- Bcl-X1 and YFP-Bax, and then treated with UV irradiation. The intensities of FRET decreased; (b) ratio of FRET/CFP- Bcl-X1 decreased compare to the control group

4 讨 论

Bcl-2 家族中的 BH3-only 蛋白是一种进化非常保守的蛋白, 它们是线粒体凋亡途径的重要的介导因子。PUMA 和另外一种 BH3-only 蛋白 Noxa 在早期就被鉴定为 p53 的下游靶向基因, 随后又被证明在凋亡中发挥了重要作用^[4]。Bax 被证明是紫

外辐射诱导细胞凋亡所必需的, 最近的研究表明纯化的 p53 有能力激活 Bax 并促使它们在脂膜上多聚化从而引发渗透化^[14]。也有报道指出在紫外辐射诱导细胞凋亡的过程中, BH3-only 蛋白 Bid 对于 Bax 转位不是必要的, 但 p53 对这个过程有一个明显的促进作用^[15]。

PUMA 在凋亡中发挥的作用已经被很好地证明了,但是 PUMA 介导凋亡的分子机制仍旧不清楚。尤其是在紫外辐射诱导细胞凋亡的过程中, PUMA 是如何促进 Bax 转位的。本文的数据清楚地证明了紫外辐射诱导的细胞凋亡具有时间和剂量的依赖性, Bax 在紫外辐射后由胞浆转位到线粒体。同时,用 FRET 技术证明了在紫外辐射细胞后, PUMA 与 Bcl-Xl 的结合量逐渐增加,而 Bax 与 Bcl-Xl 的结合量逐渐减少,即 PUMA 竞争结合了原来与 Bax 结合的 Bcl-Xl。此外,还发现 p53 抑制剂 (Pifithrin- α) 与蛋白合成抑制剂 (CHX) 都可以有效的抑制紫外辐射诱导的细胞凋亡。原因可能是这两种抑制剂降低了 PUMA 蛋白的表达水平,从而导致了没有足够量的 PUMA 去竞争结合 Bcl-Xl。上述结果证明了在紫外辐射诱导细胞凋亡的过程中, PUMA 通过竞争结合 Bcl-Xl 而激活了 Bax 的转位。

参 考 文 献

- 1 J. Yu, L. Zhang, H. Wang *et al.*. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells [J]. *Mol. Cell*, 2001, **7**: 673~682
- 2 J. Yu, L. Zhang. No PUMA, no death: Implications for p53-dependent apoptosis [J]. *Cancer Cell*, 2003, **4**: 248~249
- 3 K. H. Kraemer. Sunlight and skin cancer; another link revealed [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**(1): 11~14
- 4 S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg *et al.*. Apoptosis-the p53 network [J]. *J. Cell Science*, 2003, **116**(20): 4077~4085
- 5 R. Locksley, N. Killeen, M. Lenardo. The TNF and TNF receptor superfamilies integrating mammalian biology [J]. *Cell*, 2001, **104**(4): 4487~4501
- 6 S. E. Kern, K. W. Kinzler, A. Bruskin *et al.*. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein [J]. *Science*, 1991, **252**: 1708~1711
- 7 B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine. Surfing the p53 network [J]. *Nature*, 2000, **408**: 307~310
- 8 M. D. Kaeser, R. D. Iggo. From the cover: chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**: 95~100
- 9 A. Gross, J. Jockel, M. C. Wei *et al.*. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. *EMBO J.*, 1998, **17**(14): 3878~3885
- 10 T. Kuwana, M. R. Mackey, G. Perkins *et al.*. Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane [J]. *Cell*, 2002, **111**(3): 331~342
- 11 L. Zhang, D. Xing, M. Chen. Bim (L) displacing Bcl-x (L) promotes bax translocation during TNF alpha-induced apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2008, **13**(7): 950~958
- 12 L. Liu, D. Xing, Wei R. Chen *et al.*. Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis [J]. *Int. J. Cancer*, 2008, **122**: 2210~2222
- 13 S. Cory J. A. Adams. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. *Nat. Rev. Cancer*, 2002, **2**: 647~656
- 14 J. E. Chipuk, T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes *et al.*. Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis [J]. *Science*, 2004, **303**(5660): 1010~1014
- 15 Y. Wu, D. Xing, W. R. Chen *et al.*. Bid is not required for bax translocation during UV-induced apoptosis [J]. *Cellular Signalling*, 2007, **19**(12): 2468~2478