

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2016.11.036

XIAP在TRAIL抗性细胞HCT116 $bax^{-/-}$ 中的作用机制研究

龙添珍, 黄学琴, 刘海朋, 冯海燕, 徐阳, 梁朋

(四川大学生命科学学院, 成都 610064)

摘要: 为了探索结直肠癌细胞HCT116抗TRAIL诱导凋亡的分子机制, 本课题以其抗性细胞HCT116 $bax^{-/-}$ 为实验对象进行了研究。通过利用目前最热的基因定点编辑技术 Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas)9 系统将 HCT116 $bax^{-/-}$ 的 XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) 基因彻底敲除后, 用 TRAIL 处理, 发现其恢复了对 TRAIL 的敏感, 形态学发生了明显凋亡, 而且 western blot 检测显示 PARP 蛋白发生了完全剪切。由此证明敲除 XIAP 基因能克服 HCT116 $bax^{-/-}$ 对 TRAIL 的抗性。这些发现对肿瘤细胞抗 TRAIL 的分子机理研究以及肿瘤的个性化治疗有非常重要的意义。

关键词: TRAIL; HCT116 $bax^{-/-}$; XIAP; CRISPR/Cas9; 细胞凋亡

中图分类号: Q291 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1398-05

The Mechanism of XIAP and TRAIL Resistance in HCT116 $bax^{-/-}$

LONG Tian-Zhen, HUANG Xue-Qin, LIU Hai-Peng, FENG Hai-Han, XU Yang, LIANG Peng
(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064)

Abstract: To explore the mechanism of human colorectal cancer HCT116 resistant to TRAIL, the resistant cells HCT116 $bax^{-/-}$ which are targeted deletion of bax gene were used to study in this project. By using the gene-targeting technology CRISPR/Cas 9 system, the XIAP gene was knocked out completely. Then treated with TRAIL, the resistant cells recovered the sensitive to TRAIL. It not only presented apoptosis at morphology lever, but also the PARP was cleaved completely on western blot. It showed that, the loss of XIAP led to HCT116 $bax^{-/-}$ cells to overcome TRAIL resistance caused by bax deletion. This finding is significant for future study of the molecular mechanism behind cancer cell resistance to TRAIL and may help future personalized anti-cancer treatment.

Keywords: TRAIL; HCT 116 $bax^{-/-}$; XIAP; CRISPR/Cas9; Apoptosis

1 引言

癌症是威胁人类健康的头号杀手, 其主要是由于机体内原癌基因被激活而抑癌基因缺失或失活, 癌细胞不断生长分裂并转移所致。TRAIL 是肿瘤坏

死因子超家族中的一员, 也是人体唯一自身产生的肿瘤细胞杀伤因子, 它能与多种肿瘤细胞表面特异性跨膜受体结合^[1], 激活肿瘤细胞内的细胞凋亡信号通路, 使多种肿瘤细胞发生程序性细胞凋亡, 对正常细胞却没毒害作用, 因此 TRAIL 是一种有潜力的

收稿日期: 2015-12-22

基金项目: 国家自然科学基金(81171955); 国家重点基础研究发展计划(202CB910702)

作者简介: 龙添珍(1990-), 女, 湖南郴州人, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究。E-mail: 1027559985@qq.com

通讯作者: 梁朋。E-mail: liangpeng@scu.edu.cn

治癌药物^[2]. 但是, 有部分肿瘤细胞能逃脱 TRAIL 诱导凋亡, 产生抗性, 这阻碍了 TRAIL 的临床应用.

肿瘤细胞表面 TRAIL 的特异性受体是 TRAIL-R1/DR4 和 TRAIL-R2/DR5^[3]. 它们均为 I 型跨膜蛋白, 从细胞膜外横跨到细胞质中, 末端是死亡结构域, 能将细胞外的死亡信号传递到细胞内^[4]. 当 TRAIL 结合到 DR4 或 DR5 上时能使死亡受体募集形成三聚体结构, 受体死亡结构域聚集成簇, 形成死亡诱导信号复合物, 募集衔接分子 FADD, FADD 通过效应结构域募集并激活 caspase-8^[5]. I 型细胞中, 激活 caspase-8 就能激活 caspase-3, 诱导细胞凋亡^[6]. 但是 II 型细胞中, 例如人结肠癌细胞 HCT116, 还需要线粒体途径级联扩大, 具体过程为 caspase-8 分裂并激活 BID 活化形成 tBID, BID 是 Bcl-2 家族中的一员^[7], 是只有 BH-3 结构域的前体凋亡因子, tBID 转移到线粒体膜上, 与 Bax 或 Bak 蛋白结合并相互作用, 使线粒体外膜通透性发生改变, 释放细胞色素 c 和 smac 到细胞质中^[8]. 细胞色素 c 与 APAF-1、procaspase-9 形成凋亡小体, 激活 caspase-9, 然后再进一步激活 caspase-3, 引发细胞凋亡^[9]. Smac (second mitochondrial activator of caspases) 则发挥着中和 IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) 的作用^[10], IAPs 包括 cIAP1、cIAP2 和 XIAP, XIAP 能通过 BIR (baculovirus IAP repeat) 结构域直接结合 caspase-3, 抑制 caspase-3 进一步激活, 从而阻止细胞凋亡^[11].

HCT116 为 II 型细胞, 野生型 HCT116 即 HCT116 WT (Wild Type) 中, 仅仅 2% 有两个完整的 *bax* 等位基因, 94% 只有一个完整 *bax* 等位基因, 还有 4% 两个都是突变的 *bax* 基因^[12]. 当两个 *bax* 都突变时, 即 HCT116 *bax*^{-/-}, 不能释放细胞色素 c 和 smac, XIAP 抑制了 caspase-3 的进一步激活, 因此不能被 TRAIL 诱导凋亡^[13], 产生了对 TRAIL 的抗性. 而且有研究发现用 RNAi 干扰 XIAP 后, 能使 HCT116 WT 对 TRAIL 更敏感^[14]. 为了进一步研究 *bax* 和 XIAP 与肿瘤细胞抗 TRAIL 的机制, 我们将 HCT116 *bax*^{-/-} 的 XIAP 进行了敲除.

CRISPR/Cas 9 是基于细菌的获得性免疫系统改造而成第三代基因组定点编辑技术^[15], 其特点是制作简单、成本低、突变效率高^[16-18], 我们用 CRISPR/Cas9 系统将 XIAP 完全敲除后, 使抗 TRAIL 的 HCT116 *bax*^{-/-} 重新恢复对 TRAIL 的敏

感. 这些结论暗示着, 当肿瘤细胞发生 *bax* 突变对 TRAIL 产生抗性后, 可以通过联合抑制 XIAP 的药物来克服肿瘤对 TRAIL 的抗性, 这对 TRAIL 的临床应用和个性化治疗有着非常重要的意义.

2 材料与方法

2.1 材料

结肠癌细胞 HCT116 WT、HCT116 *bax*^{-/-} 均来自 Bert Vogelstein 教授. 细胞培养于 37°C, 5% CO₂ 孵箱中, 培养基使用 RPMI-1640 (Sigma), 其中加入 10% 胎牛血清 (Hyclone) 和 1% 青霉素-链霉素双抗 (Life Technologies). FuGENE 6 转染试剂购自 Promega 公司. TRAIL 由四川三叶草生物制药公司提供.

2.2 方法

2.2.1 western blot 取出细胞培养皿, 弃去培养基, 用预冷的 PBS 溶液清洗细胞两次. 加入 0.5 mL 裂解液 (20 mM HEPES pH 8.0, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) 裂解细胞 5 min. 收集细胞到 1.5 mL EP 管中, 涡旋震荡 15 s 后放入 4°C 离心机中, 8000 r/min 离心 30 s, 收集上清, 测蛋白浓度. 调整至 50 μg/孔跑 SDS-PAGE, 80 V 恒压转膜 1.5 h, 用溶于 PBST 的 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 孵育不同抗体, 最后用显影液显影. 抗体来源: Bax 抗体 (SouthernBiotech clone 2D2); PARP 抗体 (Cell Signaling # 9542); XIAP 抗体 (BD610716); actin 抗体 (Sigma)

2.2.2 CRISPR/Cas9 系统敲除目标基因 将目标基因的外显子 DNA 序列输入到 CRISPR 在线设计工具中 (<http://tools.genome-engineering.org>) 中, 选择合适的 Guide 序列, 并在 2 条 oligo 单链 5' 端添加 BbsI 酶切位点, 送给公司合成. 将合成的 oligo 单链退火形成双链 DNA, 用 T4 连接酶与载体 pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) 连接. 连接产物转化 DH5α 感受态, 筛选阳性克隆, 测序检测, 正确后即可提取质粒, 转染细胞. 对照组 (control) 只转染载体 pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459). 最后用 puro 筛选稳定细胞株^[19]. 我们设计的 XIAP oligo 单链为

Guide1:

5'-caccggcatcaacactggcagcagc-3'

5'-aaacgctcgtgccagtgtgatgcc-3'

Guide2:

5'-caccgggggttaggtgagcatagtc-3'

5'-aaacgactatgctcacctaacc-3'

3 结果与分析

3.1 HCT116 WT 表达 Bax 蛋白, 而 HCT116 $bax^{-/-}$ 不表达 Bax 蛋白

HCT116 是人的结肠癌细胞, 能被 TRAIL 诱导凋亡, 是一个广泛地用于研究结肠癌的电细胞系. 但是 HCT116 WT 中, 有部分细胞抗 TRAIL, 而且有研究发现 HCT116 细胞有 4% 的细胞发生了 bax 基因突变^[12], 从而不能被 TRAIL 诱导凋亡^[13]. 为了更好地研究 bax 基因与 TRAIL 抗性的关系, Bert Vogelstein 通过基因重组敲除了 bax 基因, 获得了 HCT116 $bax^{-/-}$ 细胞系^[12]. 我们通过 western blot 对这两个细胞系进行了检测(图 1), actin 为内参, 与之前结果一致^[12], HCT116 WT 表达了 Bax 蛋白, 而 HCT116 $bax^{-/-}$ 没有表达 Bax 蛋白.

3.2 TRAIL 能诱导 HCT116 WT 凋亡, 而 HCT116 $bax^{-/-}$ 抗 TRAIL

为了验证 TRAIL 能否诱导 HCT116 WT 和 HCT116 $bax^{-/-}$ 细胞凋亡, 将 HCT116 WT 和 HCT116 $bax^{-/-}$ 铺到 60mm 培养皿中, 待细胞铺满 80% 左右时, 加入 250ng/mL TRAIL, 对照添加同体积的 PBS, 4 h 后 HCT116 WT 和 HCT116 $bax^{-/-}$ 细胞边缘开始出泡, 皱缩, 由梭形贴壁变圆, 慢慢脱离培养皿, 漂浮起来^[20], 但是 10h 后, HCT116 $bax^{-/-}$ 开始又慢慢贴壁而 WT 没有. 24h 后, 95% HCT116 WT 已成碎片, HCT116 $bax^{-/-}$ 又恢复成梭形贴壁(图 2). 提取全蛋白, 通过 western blot 检测凋亡蛋白 PARP 剪切情况, HCT116 WT 加 TRAIL 后 PARP 发生了剪切, 说明细胞发生了凋亡, 而 HCT116 $bax^{-/-}$ 没有剪切, 即细胞没有发生凋亡, actin 为内参(图 3). 由此可得出 TRAIL 能诱导 HCT116 WT 凋亡, 而 HCT116 $bax^{-/-}$ 对 TRAIL 有抗性.

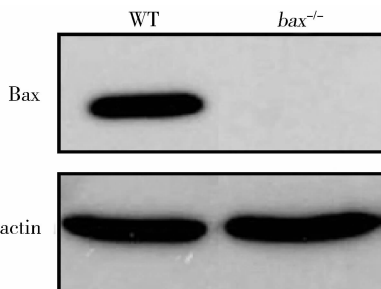


图 1 western blot 分析 HCT 116 WT 和 HCT 116 $bax^{-/-}$ 中 Bax 蛋白表达情况

Fig. 1 western blot analysis of Bax expression in HCT 116 WT and HCT 116 $bax^{-/-}$

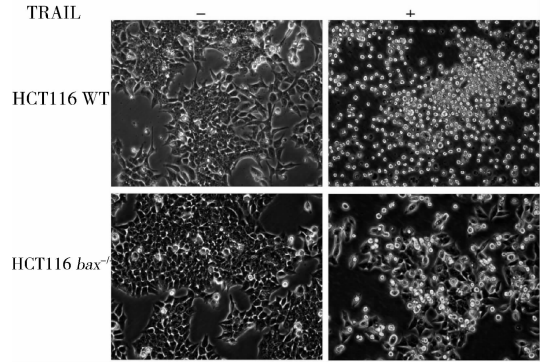


图 2 HCT 116 WT 和 HCT 116 $bax^{-/-}$ 加 TRAIL 处理后显微照片

Fig. 2 phase contrast photomicrographs of HCT 116 WT and HCT116 $bax^{-/-}$ after treatment with TRAIL

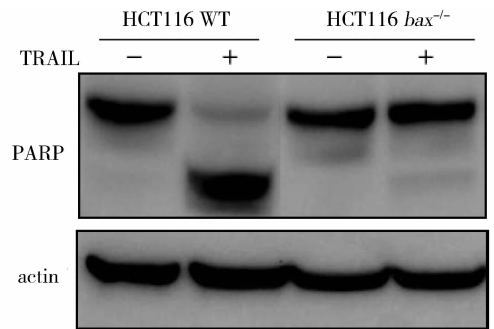


图 3 Western blot 分析 HCT 116 WT 和 HCT116 $bax^{-/-}$ 加 TRAIL 后 PARP 剪切情况

Fig. 3 western blot analysis of PARP cleave in whole cell lysates of HCT 116 WT and HCT116 $bax^{-/-}$ after treatment with TRAIL

3.3 用 CRISPR/Cas9 敲除 HCT116 $bax^{-/-}$ 的 XIAP 基因

肿瘤细胞凋亡分为 I 型和 II 型. I 型细胞只需要外源信号通路激活即可使 caspase-3 完全剪切, 细胞凋亡, 而 II 型细胞, 还需要通过线粒体途径级联放大, 才能使 caspase-3 完全剪切, 从而使得细胞凋亡, HCT116 为 II 型细胞^[6]. bax 突变后, 阻碍了线粒体膜通透性改变, 从而不能释放释放细胞色素 c 和 smac. 没有 smac 中和 XIAP, 从而 XIAP 抑制了 caspase-3 的进一步剪切, 同时还促使激活的 caspase-3 降解. 因此, 我们猜测, 如果把 XIAP 敲除, 则能克服 HCT116 $bax^{-/-}$ 对 TRAIL 的抗性. 我们利用 CRISPR-cas9 系统, 将 HCT116 $bax^{-/-}$ 的 XIAP 外显子 2 敲除了, 通过 western 检测, XIAP 敲除的 HCT116 $bax^{-/-}$ 已经没有表达 XIAP 蛋白, 而对照组(转染 px459, HCT116 $bax^{-/-}$ control)仍然表达 XIAP 蛋白(如图 4). 因此, 我们得到了 XIAP 敲除的 HCT116 $bax^{-/-}$ 细胞, 即 HCT116 $bax^{-/-}$ XIAP KO.

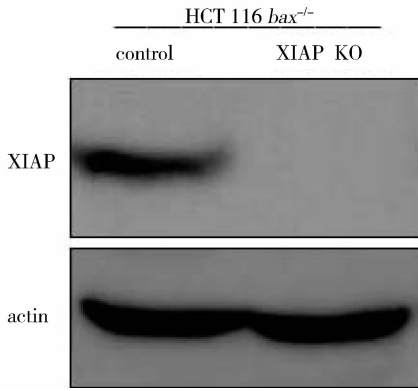


图 4 Western blot 分析 HCT116 *bax*^{-/-} 中 XIAP 敲除情况

Fig. 4 western blot analysis of XIAP knocking out in HCT 116 *bax*^{-/-}

3.4 HCT116 *bax*^{-/-} 敲除 XIAP 后克服了对 TRAIL 的抗性

为了验证 HCT116 *bax*^{-/-} 敲除 XIAP 后是否能被 TRAIL 诱导凋亡,我们将 HCT116 WT、HCT116 *bax*^{-/-}、HCT116 *bax*^{-/-} control 和 HCT116 *bax*^{-/-} XIAP KO 细胞均铺至 60mm 培养皿中,待细胞铺满 80% 左右时,加入 100ng/mL TRAIL,24 h 显微观察,可看到 HCT116 *bax*^{-/-} XIAP KO 和 HCT116 WT 一样,细胞凋亡成细胞碎片,而 HCT116 *bax*^{-/-} control 和 HCT116 *bax*^{-/-} 均为梭形贴壁状(图 5)。提取全蛋白,检测凋亡蛋白 PARP 的剪切情况,HCT116 *bax*^{-/-} XIAP KO 和 HCT116 WT 加 TRAIL 后 PARP 发生了剪切,说明细胞发生了凋亡,而 HCT116 *bax*^{-/-} control 和 HCT116 *bax*^{-/-} 的 PARP 蛋白基本没剪切(图 6)。这些结果证明 HCT116 *bax*^{-/-} 敲除 XIAP 基因后克服了对 TRAIL 的抗性。

4 讨论

TRAIL 能诱导多种肿瘤细胞凋亡,而对正常细胞没有毒副作用,是很有前景的治疗癌症的药物。可是有少数癌细胞能逃脱 TRAIL 的作用,对 TRAIL 产生抗性,也使 TRAIL 没能在临床上得到广泛应用^[5]。了解肿瘤细胞抗 TRAIL 的分子机理,并研究克服肿瘤细胞抗 TRAIL 的方案,对 TRAIL 应用于临床治疗癌症有极其重要的意义^[5]。

据统计,结直肠癌是癌症中发病率和致死率较高的一种癌症。HCT116 WT 细胞系是研究结直肠癌典型细胞系,能被 TRAIL 诱导凋亡,但是据我们观察,有 5% 左右细胞会逃脱 TRAIL 诱导凋亡。而在 HCT116 WT 中,有 5% 左右的细胞两个 *bax* 等位

基因都发生了突变^[12]。研究发现,*bax* 突变,阻断了细胞凋亡的线粒体通路,smac 不能释放到细胞质中中和 XIAP,从而导致 XIAP 抑制 caspase-3 进一步剪切^[10] *bax* 突变和 XIAP 对肿瘤细胞抗 TRAIL 是否有直接关系? 如何克服发生 *bax* 突变的肿瘤细胞抗 TRAIL 的机制? 我们通过 CRISPR/Cas9 系统将 HCT116 *bax*^{-/-} 的 XIAP 基因有效敲除后,恢复了其对 TRAIL 的敏感,这些结果有力地证明了 HCT116 *bax*^{-/-} 抗 TRAIL 的主要原因是 XIAP,敲除或有效抑制 XIAP 能克服 HCT116 *bax*^{-/-} 对 TRAIL 的抗性。

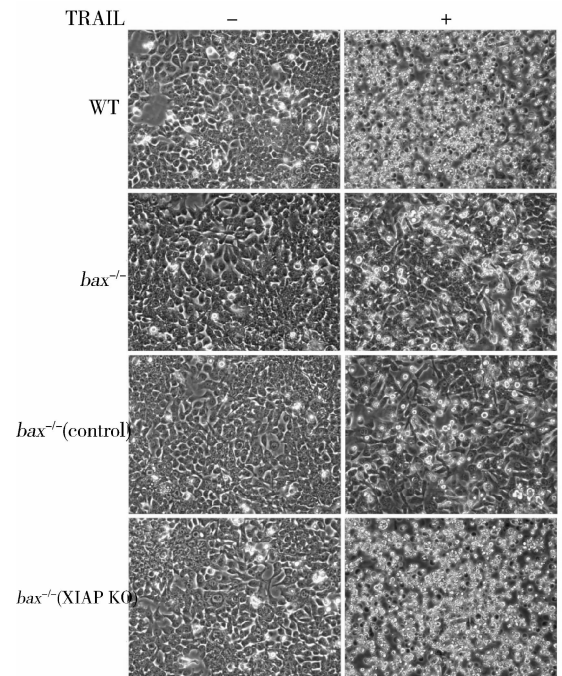


图 5 HCT116 [WT、*bax*^{-/-}、*bax*^{-/-} (control)、*bax*^{-/-} (XIAP KO)]加 TRAIL 处理后显微照片

Fig. 5 phase contrast photomicrographs of HCT116 [WT、*bax*^{-/-}、*bax*^{-/-} (control)、*bax*^{-/-} (XIAP KO)]after treatment with TRAIL

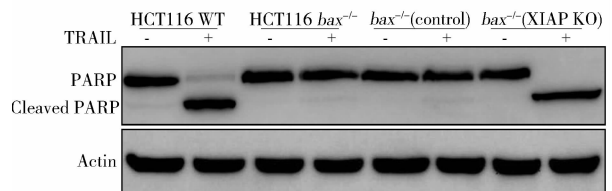


图 6 Western blot 分析 HCT116 [WT、*bax*^{-/-}、*bax*^{-/-} (control)、*bax*^{-/-} (XIAP KO)]加 TRAIL 后 PARP 剪切情况

Fig. 6 western blot analysis of PARP cleave in whole cell lysates of HCT116 [WT、*bax*^{-/-}、*bax*^{-/-} (control)、*bax*^{-/-} (XIAP KO)] after treatment with TRAIL

我们的研究结果对 TRAIL 的临床应用及肿瘤个性化治疗也有一定意义。当肿瘤细胞 *bax* 基因发生突

变时,我们可以将 TRAIL 联合抑制 XIAP 的药物来治疗.但是临床效果还需要临床实验来进一步验证.

参考文献:

- [1] Pan G, Ni J, Wei Y, *et al.* An antagonist decoy receptor and a death domain - containing receptor for TRAIL[J]. *Science*, 1997, 815:818.
- [2] Rakesh K, Srivastava. TRAIL/Apo-2L: Mechanisms and Clinical Applications in Cancer[J]. *Neoplasia*, 2001, 535:546.
- [3] LeBlanc H N, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2003, 66:75
- [4] Wang S, El-Deiry W. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors[J]. *Oncogene*, 2003, 8628:8633
- [5] Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL [J]. *Oncogene*, 2010, 1:14
- [6] Ozoren N, El-Deiry W. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL [J]. *Neoplasia*, 2002, 551:557.
- [7] Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2005, 228:237.
- [8] Deng Y, Lin Y, Wu X, *et al.* TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO[J]. *Genes & Development*, 2002, 33:45.
- [9] Ravi R, Bedi A. Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced Apoptosis of Colorectal Cancers: Synergism with Sulindac-mediated Inhibition of Bcl-xL [J]. *Cancer Research*, 2002, 1583:1587.
- [10] Gillissen B, Richter I A, Richter A, *et al.* Targeted therapy of the XIAP/proteasome pathway overcomes TRAIL-resistance in carcinoma by switching apoptosis signaling to a Bax/Bak-independent 'type I' mode[J]. *Cell Death and Disease*, 2013, 4:e643.
- [11] Lane D, Cote M, Grondin R, *et al.* Acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis in human ovarian cancer cells is conferred by increased turnover of mature caspase-3[J]. *Mol Cancer Ther* 2006, 509:21.
- [12] Zhang L, Yu J, Park B, *et al.* Role of BAX in the Apoptotic Response to Anticancer Agents[J]. *Science*, 2000, 290.
- [13] Leblanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, *et al.* Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax[J]. *Nature Medicine*, 2002, 8:3.
- [14] Connolly K, Mitter R, Muir M, *et al.* Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 307:316
- [15] 方锐, 畅飞, 孙照霖, 等. CRISPR/Cas9 介导的基因组定点编辑技术[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(8): 691-702.
- [16] Wang H, Yang Hui, Shivalila C, *et al.* One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering[J]. *Cell*, 2013, 910:918.
- [17] Shalem O, Sanjana N, Hartenian E, *et al.* Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells[J]. *Science*, 2014, 343: 84.
- [18] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, *et al.* A Programmable Dual-RNA - Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity[J]. *Science*, 2012, 337:816.
- [19] Ran F, Hsu P, Wright J, *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8, 11:2281.
- [20] Somasekharan S, Koc M, Morizot A, *et al.* TRAIL promotes membrane blebbing, detachment and migration of cells displaying a dysfunctional intrinsic pathway of apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2013, 324:336.