角蛋白在诱导细胞凋亡的爪蟾卵提取物中 发生特异降解

朱山 卢智刚 孙英丽 翟中和*

(北京大学生命科学院, 北京 100871. * 联系人, Email: zhaizh@lsc.pku.edu.cn)

摘要 细胞色素 c 加入非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵提取物 S-150, 激活爪蟾凋亡特异蛋白酶 XCPP32, 诱导非细胞体系凋亡. 伴随凋亡诱导过程, 卵提取物 S-150 表现出一定的变化, 其蛋白组成, 特别是骨架蛋白变化明显. Western 检测证明爪蟾卵提取物中 42 ku 酸性角蛋白被 XCPP32 特异降解. 酸性角蛋白的降解在凋亡过程中可能具有重要作用.

关键词 细胞凋亡 角蛋白 非洲爪蟾卵提取物 细胞色素 c XCPP32

细胞凋亡及其机理的研究是当前细胞生物学领域的重要课题之一. 近年来研究表明, IL-1 β 转化蛋白酶(ICE)家族的活化是细胞走向凋亡的决定性事件. 这些酶都含有 QACXG 保守序列(其中 Cys 为催化残基), 水解具有特定残基序列的底物蛋白, 且均在 Asp 羧基端水解肽键, 故统称为 Caspase 家族^[1]. 凋亡过程即由一系列 caspases 的级联活化所执行并完成, 其中 caspase-3 亚家族蛋白酶起较为核心的作用^[2]. 细胞凋亡时, 其结构蛋白, 如支持核膜的核纤层蛋白 lamin^[3]和细胞核有丝分裂器蛋白 NuMA^[4]以及质膜骨架蛋白 fodrin^[5]等被 caspases 水解; 而 ICAD/DFF45 被 caspase-3 降解, 释放被抑制的 DNase(DFF40/CAD), 染色质 DNA 在核小体间发生降解, 形成电泳可见的梯状带型, 即 DNA ladder^[6,7]; 还有一些与 DNA 修复相关的蛋白等被水解失活^[2,8]. 这一细胞基本死亡程序(basic cell death program)在凋亡细胞中都是一致的, 这也正是不同细胞发生凋亡却具有类似的形态学变化的分子基础.

本实验室研究结果表明, 细胞色素 c 加入非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵提取物 S-150 后, 可诱导加入的小鼠肝细胞核发生凋亡^[9], 而卵提取物也表现出凋亡特异的 DNase 活性^[10]. 在实验中, 观察到卵提取物 S-150 在凋亡时表现出一定的变化. Triton X-100 抽提结果显示骨架蛋白变化明显, 而 Western 检测则进一步证明爪蟾卵提取物中酸性角蛋白被特异降解.

1 材料与方法

卵粗提取物的制备按本实验室常用方法^[9]. 卵粗提取物中加入蛋白酶抑制剂 aprotinin 与 leupeptin 至终浓度分别为 6 与 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 经 150 000g(HITACHI55P-72 型, 转头 RPS 50-II)超速离心 2 h, 其中可溶性胞质组分, 称为 S-150, 液氮速冻保存. 卵提取物中加入 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 细胞色素 c (马心纯化产品, Sigma), 22 $^{\circ}\text{C}$ 温育数小时, 即转化为可诱导外源细胞核凋亡的非细胞凋亡体系.

在 50 μL 细胞色素 c 诱导的爪蟾卵提取物中加入 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Ac-DEVD-CHO(购自 Sigma)的卵提取物中加入 10^5 个小鼠肝细胞核(按文献[9]提取), 22 $^{\circ}\text{C}$ 温育一定时间, 加入 SDS/蛋白酶 K, 按文献[9]提取核酸并电泳.

诱导后的卵提取物和对照样品各 50 μL 用 1% Triton X-100-CSK (100 mmol/L KCl, 300 mmol/L 蔗糖, 100 mmol/L PIPES[pH = 6.8], 3 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L PMSF)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理

5 min 后, 5 000 r/min 离心. 沉淀物用蛋白电泳的样品缓冲液溶解. 电泳参照《分子克隆》一书. 浓缩胶、分离胶浓度分别为 5%, 10% 或 15%, 胶经考马斯亮蓝染色检测.

蛋白样品 SDS-PAGE 分离后, 转移至硝酸纤维素膜上. 3% BSA 封闭后, 一抗 37℃ 反应 3 h, 洗涤后, 加入生物素偶联的二抗反应, 再加入碱性磷酸酶偶联的亲合素(检测 XCPP32), 或直接加入碱性磷酸酶偶联二抗反应(检测角蛋白), 最后加入底物(NBT 和 BCIP)避光显色.

酸性角蛋白单克隆抗体 AE1 由纽约大学孙同天教授惠赠; 角蛋白抗体 C-2562(抗多种角蛋白单抗的混合物)为 Sigma 公司产品; 抗人 CPP32 多克隆抗体由 Texas 西南医学中心王晓东教授惠赠.

2 结果与讨论

2.1 细胞色素 c 激活卵提取物中凋亡特异蛋白酶 XCPP32

爪蟾卵细胞提取物的非细胞体系加入细胞色素 c 后, 可诱导转化为凋亡体系, 并使加入的细胞核裂解, 染色质 DNA 降解, 电泳形成 ladder(图 1(a)). 在凋亡过程中, 居于核心地位的 Caspase-3 是以 32 ku 酶原形式存在, 活化时被水解成 20 和 10 ku 两个亚单位, 并相互结合成 $(p20/p10)_2$ 的活性酶分子. 在爪蟾中与 caspase-3(CPP32)的同源蛋白 XCPP32 已克隆和测序, 相互间具有很高的同源性^[11]. 我们的免疫检测实验证明, 与 HeLa 非细胞体系一样, 在卵提取物体系中, 细胞色素 c 加入后半小时即激活爪蟾卵提取物体系中的 XCPP32 酶原, 产生能被抗人 CPP32 多抗识别的 20 ku 有活性的酶分子亚单位(图 1(b))^[12]. 卵提取物中 XCPP32 激活是依赖 caspase-9 的激活(类似 HeLa 模式)^[13]还是直接被 CED-4 激活(类似线虫模式)^[14]有待进一步的研究.

图 1 在 30 μ L 卵提取物 S-150 中加入 10^5 小鼠肝细胞核, 加入 1 μ mol/L 细胞色素 c 于 22℃ 温育, 诱导非细胞凋亡

(a) 温育 4 h 后, 提取 DNA 电泳观察. 诱导样品染色质 DNA 降解形成 ladder (Lane 1), Lane 2 为对照样品; (b) 温育 0.5, 1 和 2 h (图中为 1, 2, 3) 分别取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后, 用抗人 CPP32 抗体检测 XCPP32 的激活. 结果表明, 诱导 0.5 h 后 p32 的酶原被激活, 产生 p20 的活性蛋白(C: 温育 2 h 但未加细胞色素 c 诱导的对照).

2.2 诱导后的卵提取物具有不同的形态和骨架蛋白组成

正常卵提取物 S-150 除了所含的卵细胞胞浆组分(cytosol)外, 还含有相当数量的形成核膜

的 200 nm 前体小膜泡. 在温育过程中, 卵提取物 S-150 中纤维蛋白单体聚合形成骨架体系, 结合膜泡组分形成可见的膜状结构^[15]. 而细胞色素 c 诱导后的卵提取物 S-150 的溶液变得清亮, 骨架体系和膜泡组分塌缩形成相对较小且致密的物质(图 2(a)箭头所示). 卵提取物 S-150 诱导凋亡时的形态变化似乎类似于细胞在凋亡中的剧烈的形态变化. 因此, 我们检测了卵提取物形成中的骨架蛋白体系在诱导凋亡过程中的变化. 在诱导细胞凋亡前后卵提取物的总蛋白电泳中看不到很大的区别, 但经过 Triton X-100 抽提后, 骨架蛋白由于不溶于 Triton X-100 而被离心沉淀, 得到相对富集. SDS-PAGE 电泳后, 清晰显示发生细胞凋亡的卵提取物中的骨架蛋白发生一定变化(图 2(b)). 正常卵提取物中存在的分子量约 240 ku 骨架蛋白条带在诱导细胞凋亡 4 h 后的卵提取物中消失, 并出现约 100 ku 的蛋白带, 推测很可能是 240 ku 蛋白的降解产物. 同时, 正常卵提取物中 42, 46, 56 ku 的骨架蛋白在诱导凋亡后也有减少或消失. 诱导 12 h 的卵提取物抽提后, 电泳可观察到含有大量的 100 ku 蛋白, 少量的 56 ku 蛋白和大量的肌动蛋白(结果未显示).

图 2 爪蟾卵细胞提取物在诱导凋亡后形态(a)和蛋白组成(b)的变化

(a) 200 μ L 的卵提取物 S-150 在 22 $^{\circ}$ C 温育 4 h 和经 1 μ mol/L 细胞色素 c 诱导后形成的致密结构(箭头所示: C 为对照样品; I 为诱导样品); (b) 50 μ L 的 S-150 在 22 $^{\circ}$ C 温育 4 h 样品经 Triton X-100 抽提后, 不溶性骨架蛋白沉淀用蛋白上样缓冲液溶解, SDS-PAGE(胶浓度为 15%)电泳观察蛋白组成的变化. 对照样品(Lane 1)和诱导样品(Lane 2)的总蛋白(上样量为 1 μ L S-150)电泳看不出明显变化, 而抽提后的骨架蛋白样品电泳后, 对照样品(Lane 3)中 p240 蛋白在诱导样品(Lane 4)中大部分降解, 并出现 p100 蛋白条带, 而 p42, p46 和 p56 等蛋白量也减少或消失

2.3 诱导凋亡的卵提取物中酸性角蛋白被特异水解

卵提取物 S-150 被诱导凋亡时骨架蛋白包括角蛋白发生极大变化, 为确定角蛋白是否发生凋亡特异降解, 用抗全角蛋白抗体 C-2562 对可能的降解片段进行免疫印迹检测. 结果表明, 正常卵提取物中, C-2562 可识别 42, 46, 48 和 56 ku 共 4 种角蛋白, 其中 56 ku 蛋白量较大, 而 48 ku 蛋白较少. 诱导细胞凋亡 4 h 后, 42 ku 角蛋白带几乎消失殆尽, 并出现大小约 30, 32 ku 的降解条带, 有时可检测到极少量的 24 和 26 ku 降解条带(结果未显示). 46 和 48 ku 角蛋白量较少, 在凋亡前后条带位置几乎没有变化. 而 56 ku 角蛋白表现为迁移率略有差异的前后两条带, 后带有可能是由于大量 56 ku 角蛋白在凋亡时被过度磷酸化影响迁移率所致(图 3(a), (c)).

图3 爪蟾卵提取物中 42 ku 酸性角蛋白被 XCPP32 水解, 50 μ L 卵提取物 S-150 经 1 μ mol/L 细胞色素 c 诱导后, 对照样品经 Triton X-100 抽提骨架蛋白

(a) 经 10%SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜, 用 C-2562 抗全角蛋白抗体检测. 结果表明 p42 蛋白条带量明显减少, 并出现 p32 和 p30 降解条带(箭头所示); (b) 经 15%SDS-PAGE 电泳后转膜, 用酸性角蛋白单抗 AE1 检测. 结果表明酸性角蛋白 p42 蛋白条带量明显减少, 并出现 p10 的降解条带(箭头所示); (c) 在卵提取物诱导凋亡的同时, 分别加入 5 μ mol/L Ac-YVAD-CHO (Lane 3) 和 Ac-DEVD-CHO (Lane 4), 观察对蛋白降解的影响, Lane 1 为未经细胞色素 c 诱导的卵提取物 S-150 中的角蛋白; 结果表明, Ac-DEVD-CHO 可以抑制酸性角蛋白的降解(Lane 4), 而 Ac-YVAD-CHO 不具有抑制效应 (Lane 3), 间接说明角蛋白是被细胞色素 c 激活的 XCPP32 水解

当使用酸性角蛋白单抗 AE1 时, 在正常卵提取物中检测有 42 和 46 ku 两种角蛋白, 在凋亡后的卵提取物抽提样品中可见 42 ku 蛋白量大为降低, 并在约 10 ku 处有降解条带出现(图 3(b)箭头所示). 可能 AE1 与 C-2562 识别 42 ku 角蛋白的抗原表位不同, 正好识别不同的降解片段.

为确定角蛋白的降解中凋亡蛋白酶的作用, 向卵提取物中加入 5 μ mol/L Caspase-3 蛋白酶特异抑制小肽 Ac-DEVD-CHO, 抽提后角蛋白免疫印迹结果表明, 细胞色素 c 不能诱导卵提取物的非细胞体系凋亡, 而 42 ku 角蛋白的降解被抑制(图 3(c), Lane 4), 但 5 μ mol/L Caspase-1 蛋白酶的抑制小肽 Ac-YVAD-CHO 却不能抑制细胞色素 c 诱导的非细胞体系凋亡和酸性角蛋白的降解, 表明酸性角蛋白的降解是由于细胞色素 c 激活的 XCPP32 蛋白酶在其特定的残基序列位点的水解作用. 此外, 降解形成的 100 ku 蛋白尚不能确定是何种蛋白, 有待进一步研究.

2.4 在细胞凋亡中爪蟾卵提取物中角蛋白的变化及其意义

细胞色素 c 激活 caspase-3 是哺乳动物细胞内较为普遍的激活方式^[16], 我们的研究显示, 在爪蟾卵提取物的非细胞体系中 XCPP32 也被细胞色素 c 激活, 此结果进一步表明凋亡机制在凋亡进化过程中的保守性.

诱导凋亡后的卵提取物 S-150 中未知的 240 ku 骨架蛋白和 42 ku 的酸性角蛋白的凋亡中降解形成一定分子量的片段, 表明在蛋白的特定位点被水解. 而激活的 caspase-3/XCPP32 在底物 DxxD↓(x 为任一残基)羧基端水解肽链. 免疫印迹结果表明, 42 ku 酸性角蛋白含多个 caspase 凋亡蛋白酶水解位点, 从而形成 30, 32 和 10 ku 等多个降解片段. 然而, 其确切的酶切位点有待爪蟾 42 ku 酸性角蛋白基因的克隆. 另外, 凋亡的卵提取物中, 大量 56 ku 碱性角蛋白可能被磷酸化修饰, 导致角蛋白单体的溶解性增加. 因此, 这些变化将导致卵提取物中形成的角蛋白纤维骨架体系的崩解, 形态发生相应改变.

在上皮细胞凋亡中, 酸性角蛋白 K18 发生凋亡特异降解^[17]. caspase 的水解位点残基序列

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2000-45-11-1149>

在酸性角蛋白中极为保守(VEV/MD↓), 这表明作为细胞中间纤维结构体系中重要一员的角蛋白的降解可能是凋亡的普遍机制. 中间纤维蛋白家族成员是维持细胞形态的重要结构蛋白, 对该家庭蛋白的序列比较结果显示, 位于蛋白杆状区之间的连接区存在 caspase 的水解位点, 不仅在 I 型中间纤维蛋白(酸性角蛋白)中极为保守, 而且在其他的中间纤维, 如 III 型的结构蛋白(VEMD↓)和 GFAP(VELD↓)、IV 型核纤层蛋白 Lamin(VEV/ID↓)和 V 型的低分子量神经丝蛋白 NF-L (VEMD↓)中也存在. 这表明 caspase 降解细胞中间纤维结构体系是凋亡的普遍现象, 同时也是凋亡细胞出现类似的形态学变化的一个重要的分子机制. 此外, 在体内凋亡细胞蛋白结构体系的降解会导致细胞膜系统的变化, 位于内膜的磷脂酰丝氨酸暴露而为吞噬细胞识别, 凋亡细胞由此被清除.

致谢 感谢梁金华老师在实验材料和韩志阳同学在免疫检测上提供的帮助.

参 考 文 献

- 1 Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W, et al. Human ICE/CED3 protease nomenclature. *Cell*, 1996, 87: 171
- 2 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, 88: 355 ~ 365
- 3 Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*, 1996, 135: 1441 ~ 1455
- 4 Weaver V M, Carson C E, Walker P R, et al. Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes. *J Cell Sci*, 1996, 109: 45 ~ 56
- 5 Martin J S, O'Brien G A, Nishioka W K, et al. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem*, 1995, 270: 6425 ~ 6428
- 6 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, 391: 43 ~ 45
- 7 Liu X, Li P, Wildlak P, et al. The 40 kD subunit of DNA fragmentation factor induced DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 8461 ~ 8466
- 8 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S, et al. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 1994, 371: 346 ~ 347
- 9 蒋争凡, 朱 山, 翟中和. 爪蟾非细胞体系诱导小鼠肝细胞核凋亡. *科学通报*, 1998, 43(4): 409 ~ 413
- 10 朱 山, 蒋争凡, 张 博, 等. 诱导凋亡的非洲爪蟾卵提取物中激活的 DNase 特性及其鉴定. *科学通报*. 1998, 43(4): 413 ~ 417
- 11 Yaoita Y, Nakajima K. Induction of apoptosis and CPP32 expression by thyroid hormone in a myoblastic cell line derived from tadpole tail. *J Biol Chem*, 1997, 272: 5122 ~ 5127
- 12 Kluck R M, Martin S J, Hoffman B M, et al. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO J*, 1997, 16: 4639 ~ 4649
- 13 Li P, Nijhawan D, Sudiardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 1997, 91: 479 ~ 480
- 14 Chinnaiyan A M, O'Rourke K, Lane B R, et al. Interaction of CED-4 with CED-2 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*, 1997, 275: 1122 ~ 1126
- 15 Zhang B, Chen Y, Han Z Y, et al. The role of keratin filaments during nuclear envelope reassembly in *Xenopus* egg extracts. *FEBS Letter*, 1998, 428: 52 ~ 56
- 16 Liu X S, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86: 147 ~ 157
- 17 Caulin C, Salvesen G S, Oshima R G. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*, 1997, 138: 1379 ~ 1394

(1999-10-10 收稿, 2000-03-31 收修改稿)