

Smac/DIABLO 在过氧化氢所致 C₂C₁₂ 肌原细胞凋亡中的作用*

蒋碧梅 肖卫民 石永忠 刘梅冬 唐道林 肖献忠**

(中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 长沙 410078)

摘要 为探讨 Smac/DIABLO 在过氧化氢 (H₂O₂) 所致 C₂C₁₂ 肌原细胞凋亡中的作用, 采用 Hoechst 33258 染色, 观察 H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理 C₂C₁₂ 肌原细胞不同时间后, 细胞核形态学改变并计算凋亡核百分率, DNA 抽提及琼脂糖电泳观察凋亡特征性梯状带, 利用细胞成分分离后蛋白质印迹分析 H₂O₂ 是否导致 Smac/DIABLO 从线粒体释放, 采用 Caspase 检测试剂盒及蛋白质印迹分析 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化, 转染 Smac/DIABLO 基因, 观察 Smac/DIABLO 过表达对 H₂O₂ 所致的 C₂C₁₂ 肌原细胞凋亡的影响。结果表明: H₂O₂ 处理 1 h 后, Smac/DIABLO 从 C₂C₁₂ 肌原细胞线粒体释放入胞浆, 2 h 更明显; H₂O₂ 处理 4 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 活化, 12 h 达高峰; H₂O₂ 处理 24 h 后, C₂C₁₂ 肌原细胞显示特征性的凋亡形态改变, 凋亡核百分率明显升高, DNA 电泳出现明显“梯状”条带。与单纯过氧化氢损伤组相比, Smac/DIABLO 高表达的 C₂C₁₂ 肌原细胞经过氧化氢损伤组的 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化、凋亡核百分率的升高、“梯状”条带的出现均更明显。结果表明, H₂O₂ 可导致 Smac/DIABLO 从 C₂C₁₂ 肌原细胞线粒体释放, 促进 Caspase-9 和 Caspase-3 的活化而促进细胞凋亡的发生。

关键词 细胞凋亡, C₂C₁₂ 肌原细胞, 过氧化氢, Smac/DIABLO

学科分类号 R361.1

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 在心血管疾病发生发展中具有重要作用, 是导致心肌缺血损伤、心肌再灌注损伤等急性心肌损伤的重要致病因素。长期以来, 人们一直认为活性氧损伤心肌时主要以细胞坏死为主。随着细胞凋亡现象的发现, 大量的实验结果表明, 心肌细胞凋亡亦是活性氧所致心肌损伤的重要细胞机制之一^[1, 2]。至于活性氧通过何种途径引起心肌细胞凋亡, 目前还不清楚。深入研究活性氧所致心肌细胞凋亡的机制对多种心血管疾病及病理过程的防治具有非常重要的意义。

Smac/DIABLO^[3, 4] 是 2000 年新发现的一种促凋亡分子。它正常时位于线粒体膜间隙, 在凋亡诱导因素的作用下, 可释放入胞浆, 与凋亡抑制蛋白 (inhibitors of apoptosis proteins, IAPs) 结合并解除其对 Caspases 的抑制作用, 从而激活 Caspases-3 和 Caspase-9, 促进细胞凋亡发生^[3, 5]。Smac/DIABLO 是细胞凋亡线粒体信号通路中的重要调节分子之一。Deng 等^[6]发现, TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的发生需要线粒体释放 Smac/DIABLO。Sun 等^[7]发现, Bcl-2 和 Bcl-X_L 通过抑制从线粒体释放 Smac/DIABLO 来抑制 CD95 介导的 T 淋巴细胞凋亡。Smac/DIABLO 在心肌组织中含量丰富, 但它是否促进或参与活性氧所致的心肌细胞凋亡发生, 目前

国内外均尚未见报道。本实验采用活性氧过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 处理 C₂C₁₂ 肌原细胞, 观察细胞凋亡的发生, 并探讨 Smac/DIABLO 在凋亡发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

C₂C₁₂ 肌原细胞株由中南大学湘雅医学院细胞中心提供; DMEM 培养基, Gibco 公司产品; 无支原体小牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 十二烷基磺酸钠 (SDS), 琼脂糖, Hoechst 33258, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗鼠 IgG 或羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司; 蛋白酶 K 购自美国生命技术公司; 丙烯酰胺, N, N'-亚甲基双丙烯酰胺购自 Fluka 公司; 兔抗 Caspase-3、Caspase-9 多克隆抗体, 购自 Santa Cruz Biotechnology; 兔抗 Smac 多克隆抗体购自 R&D 公司; 二硫苏糖醇 (DTT), 过硫酸铵, TEMED, 硝酸纤维素膜购自 Promega 公司;

* 国家自然科学基金资助项目 (30000069 和 30270533), 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G2000056908) 和教育部博士点专项基金 (20020533032)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-2355021, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

收稿日期: 2003-04-10, 接受日期: 2003-05-28

SABC 免疫荧光染色试剂盒, DAB 显色试剂盒购自博士德生物工程有限公司; ApoAlert™ LM PCR ladder Assay Kit 购自 BD Biosciences 公司; Lipofectamine™ 2000, Invitrogen Life Technologies 公司产品; Caspase Colorimetric Assay Kit 购自 R&D 公司; 含 Smac 全长 cDNA 的真核表达质粒 (pcDNA3.1-Smac) 由美国德克萨斯大学西南医学中心王小东博士赠送。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 将 C₂C₁₂ 肌原细胞以每瓶 5 ml 接种 1×10^6 个细胞, 于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 24 h 后做实验。

1.2.2 H₂O₂ 浓度测定: 按 Spitz 等^[8]报道的方法, 在紫外分光光度计测 A₂₄₀ 值后, 按公式: $c(\text{H}_2\text{O}_2) / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}) = A_{240} \times 1000 / 39.4$ 计算。

1.2.3 凋亡形态学观察及凋亡核百分率计算: 常规细胞涂片, 固定, Hoechst 33258 染色后封片。荧光显微镜下, 见正常细胞核呈弥散均匀荧光, 凋亡细胞则表现为浓染致密的颗粒块状荧光。观察后照相并计数 500 个细胞核, 计算凋亡核百分率。凋亡核百分率 = 凋亡细胞核数 / 500 × 100%。

1.2.4 蛋白质印迹分析: 用 1 × SDS 加样缓冲液裂解细胞, 收集蛋白质, 采用 Bradford 法进行蛋白质定量, 制备好的蛋白质样品置 -80℃ 冰箱保存备用。以每泳道上样 20 μg 蛋白, 经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离、转膜和 2% 白蛋白 4℃ 封闭过夜后, 依次加入一抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗, 室温孵育 2 h, DAB 显色, 拍摄照片, 记录实验结果。

1.2.5 Caspases 活性检测: 根据 R&D 公司提供的 Caspase 活性检测试剂盒说明书进行。用裂解液 (每 1×10^6 个细胞加 50 μl) 将细胞于冰上裂解 10 min, 4℃ 离心, 12 000 g 1 min, 取 5 μl 上清进行蛋白质定量后, 测定 A₅₉₅ 值; 另 45 μl 加 50 μl 2 × 反应缓冲液及 5 μl 反应底物, 37℃ 孵育 1 h, 分光光度计测定吸光度值 (A₄₀₅), 再计算 Caspases 活性 (活性 = A₄₀₅ / A₅₉₅)。

1.2.6 线粒体及胞浆组分分离: 将细胞用冰冷的 PBS 洗 2 次, 用 3 倍体积的缓冲液 A (250 mmol/L 蔗糖, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1.0 mmol/L EDTA-Na, 1.0 mmol/L EGTA-Na, 1.0 mmol/L DTT, 20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.5

和 0.1 mmol/L PMSF) 悬浮细胞, 冰上放置 10 min, 匀浆 30 次, 4℃ 离心 750 g 10 min 2 次, 取上清再次离心 10 000 g 15 min, 所得沉淀为线粒体组分, 上清继续于 4℃ 离心 100 000 g 1 h, 上清为胞浆组分 (简称 S100), 分别贮存于 -70℃ 备用。

1.2.7 Smac 真核表达质粒的瞬时转染: 根据 Invitrogen Life Technologies 公司提供的脂质体转染操作说明书进行。将细胞传代并贴壁 24 h 后, 取 8 μg pcDNA3.1 空白表达质粒、Smac 真核表达质粒 (pcDNA3.1-Smac) 分别加入 500 μl 的无血清 DMEM 培养基中, 再分别加入 500 μl 含 20 μl 脂质体的无血清 DMEM 培养基, 室温下孵育 5 min, 将两者混合, 再于室温下孵育 20 min。细胞用无血清 DMEM 培养基洗涤 3 遍后, 然后分别加入 1 ml 上述质粒与脂质体的混合物, 于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱孵育 4~6 h, 再加完全 DMEM 培养基 4 ml, 继续孵育达 36 h, 48 h 后做实验。

1.2.8 DNA “梯状”条带的检测: 根据 BD Biosciences 公司提供的操作说明书进行。收集细胞后, 用细胞裂解液裂解细胞, 抽提基因组 DNA, 于分光光度计定量, 取 0.5 μg 基因组 DNA, 加入 35 μl 连接缓冲液, 16℃ 反应 14 h, 再取含 150 ng 基因组 DNA 的连接混合液置 PCR 专用管中, 加入 PCR 反应缓冲液及酶, 进行 DNA 扩增, 取每孔为 10~15 μl 的 PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖电泳, 经溴乙锭染色后观察是否出现 DNA “梯状”条带。

1.2.9 统计处理: 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 H₂O₂ 导致 C₂C₁₂ 肌原细胞凋亡、Smac/DIABLO 的释放及 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化

2.1.1 H₂O₂ 可诱导 C₂C₁₂ 肌原细胞发生凋亡: 实验发现, H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理 24 h 可诱导 C₂C₁₂ 肌原细胞发生凋亡。Hoechst 33258 染色显示正常心肌细胞核呈弥散均匀蓝色荧光, H₂O₂ 损伤后出现许多凋亡细胞, 即出现许多浓染致密的颗粒块状荧光, 细胞凋亡核百分率明显升高 (图 1), 同时 DNA 碎片的琼脂糖凝胶电泳显示, H₂O₂ 损伤 24 h 后, 细胞 DNA 电泳出现典型的 “梯状”条带 (图 2)。

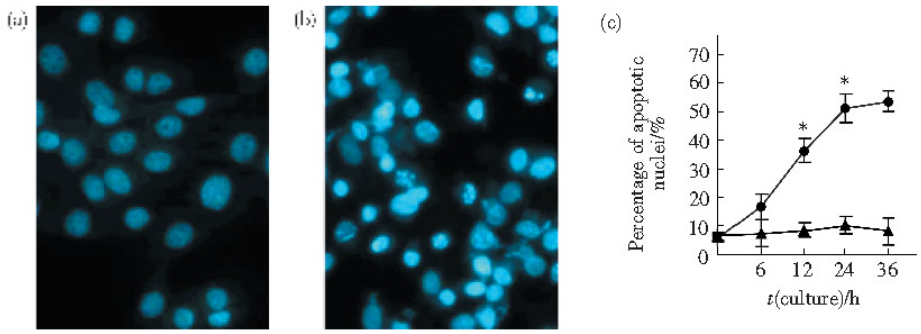


Fig. 1 Effect of H₂O₂ on the changes of apoptotic morphology in C₂C₁₂ myogenic cells

(a) The nuclei of normal cells with dispersion chromatin were showed in control group; (b) A lot of apoptotic cells with condensed chromatin were showed in H₂O₂ group; (c) Percentage of apoptotic nuclei. * $P < 0.01$, vs control group, $n = 4$. ●—●: H₂O₂ group; ▲—▲: control group.

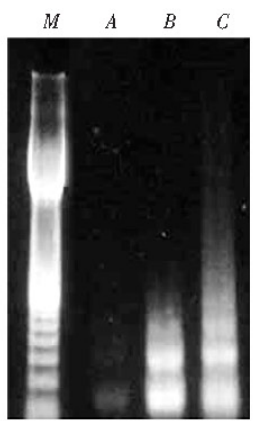


Fig. 2 Photograph of a 1.2% agarose gel electrophoresis of DNA extracted from normal or H₂O₂-treated C₂C₁₂ myogenic cells

M: DNA marker; A: untreated C₂C₁₂ cells; B: C₂C₁₂ cells treated with 0.5 mmol/L H₂O₂ for 24 h; C: C₂C₁₂ cells treated with 0.5 mmol/L H₂O₂ for 36 h.

2.1.2 H₂O₂ 可诱导 C₂C₁₂ 肌原细胞 Smac/DIABLO 从线粒体释放: 对线粒体及胞浆组分进行蛋白质印

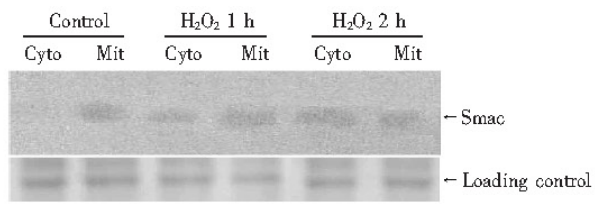


Fig. 3 Western blot analysis demonstrating the effect of H₂O₂ (0.5 mmol/L) on the release of Smac / DIABLO from mitochondria in C₂C₁₂ cells

Cyto: cytoplasm; Mit: mitochondria. The rest of the same gel was stained by Coomassie bright blue and taken as loading control. Representative of 3 separate experiments.

迹分析显示, 正常 C₂C₁₂ 肌原细胞 Smac/DIABLO 主要位于线粒体, 胞浆中含量很少. H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理 C₂C₁₂ 肌原细胞 1 h 后, 可见线粒体中 Smac/DIABLO 减少, 而胞浆中 Smac/DIABLO 增多, 2 h 后上述变化更加明显, 表明 H₂O₂ 可导致 Smac/DIABLO 从线粒体快速释放入胞浆 (图 3).

2.1.3 H₂O₂ 导致 C₂C₁₂ 肌原细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化: Caspase 活性测定显示, H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理 4 h 后, Caspase-3, Caspase-9 均开始活化, 处理 12 h 后, Caspase-3, Caspase-9 的活性明显升高, 24 h 后有所回降 (图 4).

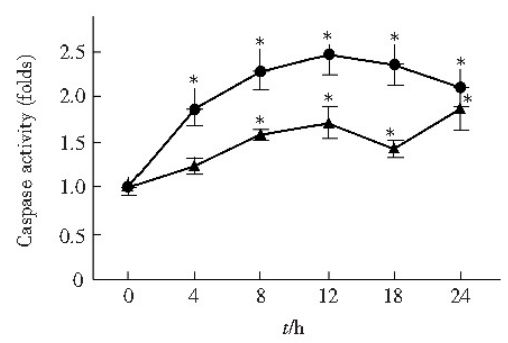


Fig. 4 Effect of H₂O₂ (0.5 mmol/L) on the activation of Caspase-3 and Caspase-9 in C₂C₁₂ myogenic cells

* $P < 0.01$, vs control group, $n = 6$. ●—●: Caspase-3; ▲—▲: Caspase-9.

蛋白质印迹分析表明, 正常 C₂C₁₂ 肌原细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 均以无活性的前体形式存在 (分别为 P31, P45). H₂O₂ (0.5 mmol/L) 处理

4 h 后, 即可见其裂解片段 (分别为 P11, P10), 表明 Caspase-3 和 Caspase-9 均被活化, 而且其活化趋势与 Caspase 活性测定结果相似 (图 5)。

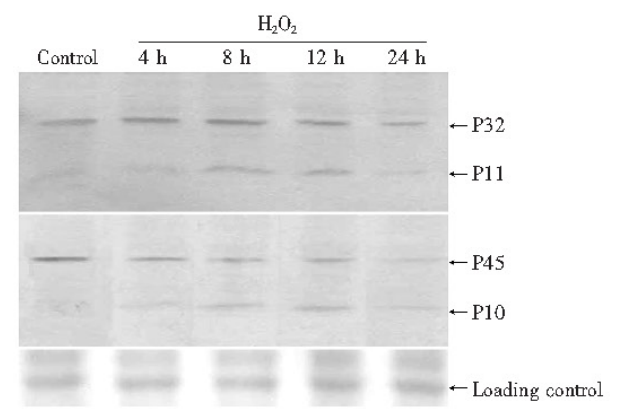


Fig. 5 Western blot analysis demonstrating the effect of H_2O_2 (0.5 mmol/L) on activation of Caspase-3 and Caspase-9 in C_2C_{12} myogenic cells

The rest of the same gel was stained by Coomassie bright blue and taken as loading control. Representative of 3 separate experiments.

2.2 Smac 过表达明显促进 H_2O_2 所致的 C_2C_{12} 肌原细胞发生凋亡

2.2.1 转染 Smac 基因后 C_2C_{12} 肌原细胞 Smac 的表达情况: 蛋白质印迹分析显示, C_2C_{12} 肌原细胞转染 Smac 基因 36 h, 48 h 后细胞内 Smac 的表达均明显升高 (图 6)。

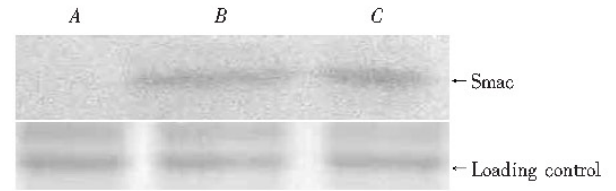


Fig. 6 Western blot analysis demonstrating the expression of Smac in C_2C_{12} cells transfected with vector plasmid, or an expression plasmid encoding Smac for indicated time

A: cells transfected with vector plasmid for 48 h; B, C: cells transfected transiently with Smac for 36 h, 48 h respectively. The rest of the same gel was stained by Coomassie bright blue and taken as loading control.

2.2.2 Smac 高表达可明显促进 H_2O_2 所致的 C_2C_{12} 肌原细胞发生凋亡: 实验发现 (图 7 和图 8), Smac

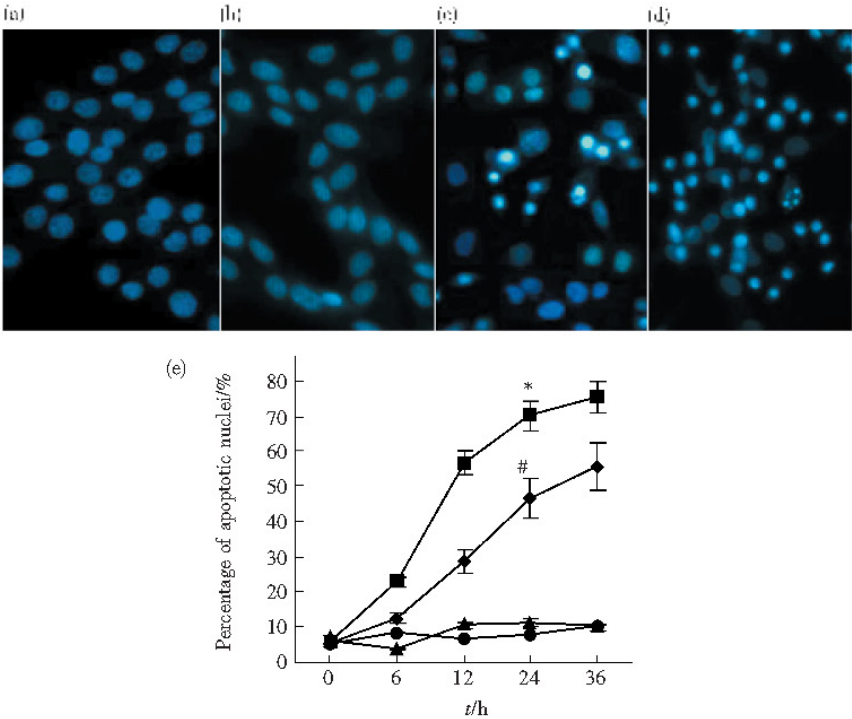


Fig. 7 Hoechst 33258 staining showed the effect of Smac overexpression on H_2O_2 -induced apoptosis

(a) Untreated C_2C_{12} cells transfected transiently with vector plasmid; (b) Untreated C_2C_{12} cells transfected transiently with Smac; (c) C_2C_{12} cells transfected with vector plasmid were treated with 0.5 mmol/L H_2O_2 for 12 h; (d) C_2C_{12} cells transfected with Smac expression plasmid were treated with 0.5 mmol/L H_2O_2 for 12 h; (e) Effect of Smac overexpression on the percent of apoptotic nuclei induced by H_2O_2 at indicated durations. * $P < 0.01$ vs pcDNA3.1 + H_2O_2 group, # $P < 0.01$ vs control group, $n = 4$. ■—■: Smac + H_2O_2 ; ◆—◆: pcDNA3.1 + H_2O_2 ; ▲—▲: pcDNA3.1; ●—●: Smac.

高表达能明显促进 H_2O_2 所致的 C_2C_{12} 肌原细胞凋亡。a. 形态学变化: Hoechst 33258 染色示空载体对照组细胞核呈弥散均匀蓝色荧光; 单纯转 Smac 质粒组与空载体对照组相似; 空载体 + H_2O_2 损伤组 12 h 后细胞出现少量凋亡细胞, 即出现浓染致密的颗粒块状荧光; 转 Smac 质粒 + H_2O_2 损伤组 12 h 后凋亡细胞明显增多, 细胞凋亡核百分率比空载体 + H_2O_2 损伤组明显升高 (图 7); b. DNA “梯状”条带的检测: 空载体 + H_2O_2 损伤组出现典型的“梯状”条带; 转 Smac 质粒 + H_2O_2 损伤组 H_2O_2 损伤 12 h 后, “梯状”条带更为明显 (图 8)。

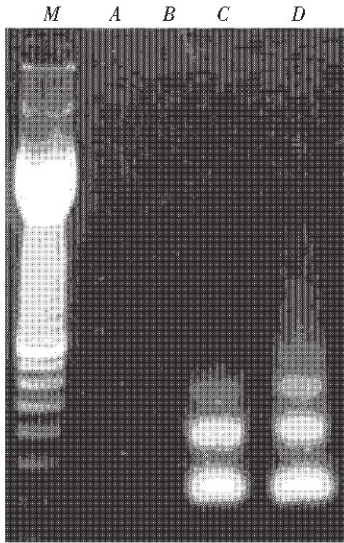


Fig. 8 DNA agarose gel electrophoresis showed the effect of Smac overexpression on H_2O_2 -induced apoptosis

M: DNA marker; A: C_2C_{12} cells transfected with vector control without H_2O_2 treatment; B: C_2C_{12} cells transfected with Smac expression plasmid without H_2O_2 treatment; C: C_2C_{12} cells transfected with vector control were treated with 0.5 mmol/L H_2O_2 for 24 h; D: C_2C_{12} cells transfected with Smac expression plasmid were treated with 0.5 mmol/L H_2O_2 for 24 h.

2.2.3 Smac 高表达促进 H_2O_2 所致 C_2C_{12} 肌原细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化: 蛋白质印迹分析显示, 转空载体对照组与单纯转 Smac 质粒组细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 以无活性的前体形式存在 (分别为 P31, P45); 空载体 + H_2O_2 损伤组细胞经 H_2O_2 (0.5 mmol/L) 处理 8 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 前体产生其裂解片段 (分别为 P11, P10), 表明 Caspase-3 和 Caspase-9 有所活化; 而

转 Smac 质粒 + H_2O_2 损伤组细胞经 H_2O_2 处理 8 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 裂解片段的产生明显增多, 表明其活化明显增强 (图 9)。

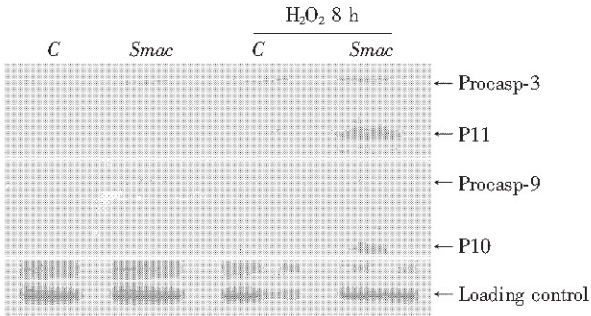


Fig. 9 The effect of Smac overexpression on H_2O_2 -induced activation of Caspase-3 and Caspase-9

C: C_2C_{12} cells transfected with vector control; Smac: C_2C_{12} cells transfected with Smac overexpression plasmid. The rest of the same gel was stained by Coomassie bright blue and taken as loading control.

3 讨 论

实验发现, C_2C_{12} 肌原细胞经 H_2O_2 损伤后可出现大量凋亡细胞, 细胞凋亡核百分率明显升高, DNA 电泳可见明显“梯状”条带. 表明活性氧 H_2O_2 导致了 C_2C_{12} 肌原细胞凋亡的发生。

近年来, 随着分子生物学突飞猛进的发展, 关于细胞凋亡分子机制的研究有了很大的突破, 尤其是发现了线粒体在凋亡发生、发展过程中起着非常重要的作用. 在细胞凋亡早期, 尽管线粒体形态无明显改变, 但已经产生了一系列功能改变, 如膜通透性转换孔 (permeability transition pore, PTP) 开放, 膜通透性升高, 跨膜电位 ($\Delta\psi_m$) 下降, 并释放出细胞色素 c (cytochrome c, Cyt c) 和凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 等进入胞浆. 释放入胞浆的促凋亡分子在其他分子的作用下, 进一步激活 Caspase-3 和 Caspase-9, 使凋亡得以发生^[9,10]. 本实验显示, 在 H_2O_2 所致的 C_2C_{12} 肌原细胞凋亡中, 促凋亡分子 Smac 从线粒体释放并导致 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化, 说明线粒体在此过程中同样起非常重要的作用. 在死亡受体配体、细胞毒性药物以及 DNA 损伤剂等凋亡刺激因子的作用下, 线粒体释放促凋亡分子 Smac/DIABLO 的现象已在淋巴细胞以及多种肿瘤细胞中被发现^[11]. 本实验首次发现, H_2O_2 通过促进 C_2C_{12} 肌原细胞 Smac/DIABLO 从线粒体释放而导致

细胞凋亡, 进一步证明了 Smac/DIABLO 在凋亡过程中的普遍意义.

Caspase 是细胞凋亡发生的关键分子, 它的活性可被 IAPs 调节. 而 Smac/DIABLO 通过与 IAPs 结合, 在 Caspase 前体的活化和活化 Caspase 的酶解两个水平调节凋亡发生. 所有的 IAPs 家族成员至少含有一个杆状病毒 IAP 重复序列 (BIR) 结构区, 不同的 BIR 结构区表现出不同的功能, X 连锁细胞凋亡抑制蛋白 (XIAP) 含有三个 BIR 结构, BIR3 特异地抑制 Caspase-9, 而 BIR2 与其前面的 linker 足以抑制 Caspase-3, Caspase-7, 而 Smac/DIABLO 可通过与不同的 BIR 结合而发挥促凋亡作用^[12]. 自 Smac/DIABLO 发现以来, 大量学者研究发现 Smac/DIABLO 在凋亡发生过程中起关键作用. Roberts 等^[13]发现转 Smac/DIABLO 基因的细胞予以 TNF、etoposide 处理后, 位于线粒体的内源和外源性 Smac/DIABLO 均向胞浆移位, 凋亡细胞数也明显增多; 还有实验^[14]发现细胞色素 c 诱导细胞凋亡必须有 Smac/DIABLO 的释放等等. 在发现 H₂O₂ 可引起 C₂C₁₂ 肌原细胞中 Smac/DIABLO 从线粒体释放的基础上, 为进一步探讨 Smac/DIABLO 是否促进了 Caspase-3, Caspase-9 的活化以及凋亡的发生, 本实验通过 Smac 基因转染, 使 C₂C₁₂ 肌原细胞内 Smac 高表达, 再暴露于 H₂O₂ 中, 发现 Smac 促进 H₂O₂ 所致 C₂C₁₂ 肌原细胞中 Caspase-3, Caspase-9 的活化以及凋亡的发生. 但单纯细胞内 Smac 高表达却不足以产生凋亡. 此结果与文献报道相似. 另外, 有实验^[11]发现 Smac/DIABLO 的释放是一 Caspase 催化事件, 可发生在细胞色素 c 释放的下游, Bcl-2 可通过抑制细胞色素 c 的释放来调节 Smac/DIABLO 的释放. 但本实验发现 Smac/DIABLO 的释放早于 Caspase-3, Caspase-9 的活化, 故推测 Smac/DIABLO 的释放可能是一非 Caspase 催化事件.

Caspases 是凋亡的“执行者”, 而 Smac 是 Caspase 活化的关键调节子. 本实验发现, Smac 促

H₂O₂ 所致 C₂C₁₂ 肌原细胞凋亡的发生, 可能为防治各种心脏疾病时心肌细胞凋亡的发生提供新的思路.

参 考 文 献

- 1 Brown J M, Terada L S, Grosso M A, *et al.* Xanthin oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rat hearts. *J Clin Invest*, 1998, **81** (4): 1297 ~ 1301
- 2 Turner N A, Xia F, Azhar G, *et al.* Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-jun NH₂-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30** (9): 1789 ~ 1801
- 3 Du C, Fang M, Li Y, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, **102** (7): 33 ~ 42
- 4 Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 2000, **102** (7): 43 ~ 53
- 5 Srinivasula S M, Hegde R, Saleh A, *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 2001, **410**: 112 ~ 116
- 6 Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev*, 2002, **16** (1): 33 ~ 45
- 7 Sun X M, Bratton S B, Butterworth M, *et al.* Bcl-2 and Bcl-xl inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem*, 2002, **277** (30): 11345 ~ 11351
- 8 Spitz D R, Dewey W C, Li G C. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol*, 1987, **131** (3): 363 ~ 368
- 9 Green D R. Apoptotic pathway: the roads to ruin. *Cell*, 1998, **94** (2): 695 ~ 698
- 10 Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, **281** (5): 1309 ~ 1312
- 11 Adrain C, Creagh E M, Martin S J, *et al.* Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*, 2001, **20** (23): 6627 ~ 6636
- 12 Goyal L. Cell death inhibition: keeping caspases in check. *Cell*, 2001, **104** (6): 805 ~ 808
- 13 Roberts D L, Morrison W, MacFarlane M, *et al.* The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol*, 2001, **153** (1): 221 ~ 227
- 14 Carson J P, Behnam M, Sutton J N, *et al.* Smac is required for cytochrome c-induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res*, 2002, **62** (1): 18 ~ 23

Role of Smac/DIABLO in H₂O₂-induced Apoptosis in C₂C₁₂ Myogenic Cells*

JIANG Bi-Mei, XIAO Wei-Min, SHI Yong-Zhong, LIU Mei-Dong, TANG Dao-Lin, XIAO Xian-Zhong**

(Department of Pathophysiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to explore the role of Smac/DIABLO in H₂O₂-induced apoptosis of C₂C₁₂ myogenic cells, Hoechst 33258 staining was used to examine cell morphological changes and to calculate percentage of apoptotic nuclei. DNA ladder pattern on agarose gel electrophoresis was used to observe DNA fragmentation. The release of Smac/DIABLO from mitochondria to cytoplasm was observed by Western blotting. Activities of Caspase-3, Caspase-9 were assayed with Caspase Colorimetric Assay Kit and Western blotting. Full length Smac/DIABLO gene was transiently transfected in C₂C₁₂ myogenic cells by lipofectamine and then protein levels of Smac/DIABLO were analysed by Western blotting. The results showed that: (1) H₂O₂ (0.5 mmol/L) resulted in a marked release of Smac/DIABLO from mitochondrial to cytoplasm 1 h after treatment, activation of Caspase-3, Caspase-9 4 h after treatment and specific morphological changes of apoptosis 24 h after treatment; (2) Smac/DIABLO overexpression significantly enhanced H₂O₂ induced apoptosis in C₂C₁₂ myogenic cells as shown by specific DNA ladder pattern in agarose gel electrophoresis, increase of percentage of apoptotic nuclei and marked activation of Caspase-3, Caspase-9. These data suggested that H₂O₂ could result in apoptosis of C₂C₁₂ myogenic cells, and that release of Smac/DIABLO from mitochondrial to cytoplasm and the subsequent activation of Caspase-9 and Caspase-3 played important roles in H₂O₂-induced apoptosis in C₂C₁₂ myogenic cells.

Key words apoptosis, C₂C₁₂ myogenic cells, hydrogen peroxide, Smac/DIABLO

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30000069 and 30270533), The Special Funds for Major State Basic Research of China (G2000056908) and The Special Funds for Ph D Training From The Ministry of Education (20020533032).

** Corresponding author. Tel: 86-731-2355021, E-mail: xianzhongxiao@hotmail.com

Received: April 10, 2003 Accepted: May 28, 2003

欢迎订阅《细胞与分子免疫学杂志》

《细胞与分子免疫学杂志》由中国免疫学会和第四军医大学主办,是全国惟一与细胞和分子生物学相关的免疫学专业性杂志,系我国中文核心期刊、科技论文统计源期刊、美国《CA》、《IM》及MEDLINE等刊源。

该刊的主要栏目有基础研究、临床研究、抗体工程、技术方法、综述和信息等,主要报道我国生物学领域细胞与分子免疫学方面的理论及应用研究成果。欢迎有生物学基础和医学临床工作者投稿并订阅。

该刊为双月刊(逢单月出版),国际标准开本(A4)128页,信息量大。彩图随文,铜版纸印刷精装。单价15元,全年90元。国内外公开发售,邮发代号52-184。欢迎广大读者到当地邮局或单位收发室订购。

该刊的联系方式:(邮编710032)陕西西安第四军医大学校内《细胞与分子免疫学杂志》编辑部;

联系电话:029-3374550或军线0901-74550;E-mail:immuedit@fmmu.edu.cn