

# Smac/DIABLO 与肿瘤治疗

郭晓强

关键词: Smac/DIABLO; 线粒体; 细胞凋亡; 肿瘤治疗

中图分类号: R730.53 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)09-0593-03

## 0 引言

Smac/DIABLO 被称为第二个线粒体来源的胱氨酸酶激活剂(second mitochondria-derived activator of caspase, Smac)或低等电点 IAP 直接结合蛋白(direct IAP-binding protein with low pI, DIABLO),是 2000 年才发现的一种存在于线粒体并且调节细胞凋亡的蛋白质<sup>[1]</sup>,经过仅 4 年来的研究,现在成为了细胞凋亡研究中的一个热点,并且在肿瘤治疗方面也有重要应用。

## 1 Smac/DIABLO 调节的细胞凋亡

### 1.1 Smac/DIABLO 与细胞凋亡

细胞凋亡是机体自我调节的一种重要方式,其中胱氨酸酶(caspase)在凋亡机制中处于中心位置,但是它受到一个严格的调控,以保持细胞数目的平衡。在细胞中有一类蛋白质称为凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis protein, IAP),这是一个大的蛋白家族,在功能上抑制胱氨酸酶的活性,但这种抑制作用可以被其它因素所减弱或去除,其中从线粒体中释放的 Smac/DIABLO 就是一类可以减弱 IAP 功能的蛋白质<sup>[2]</sup>,研究表明在一定程度上 Smac/DIABLO 从线粒体的释放是决定细胞凋亡还是生存的重要因素<sup>[3]</sup>。

### 1.2 Smac/DIABLO 的释放

人类 Smac/DIABLO 基因位于第 12 条染色体的长臂,由 7 个外显子组成,初始编码的蛋白质含有 239 个氨基酸残基,其中 N 端 55 个为线粒体靶序列(mitochondrial targeting sequence, MTS),在转运到线粒体后 MTS 被裂解,最终生成含有 184 个氨基酸残基的成熟蛋白,并且以二聚体的形式存在于线粒体的膜间隙<sup>[1]</sup>。

Smac/DIABLO 只有在外界一定因素的作用下才会被释放进入细胞质,如抗癌药物、化学或物理的凋亡信号等。研究表明 Smac/DIABLO 释放的同时往往伴随细胞色素 c 的释放,因此共同促进细胞

的凋亡,但两者的释放机制可能不同<sup>[4]</sup>,尽管如此两者在释放过程中线粒体膜电势均出现去极化<sup>[5]</sup>,因此关于 Smac/DIABLO 的具体释放机制还需要进一步研究。

### 1.3 Smac/DIABLO 和 IAP 的相互作用

Smac/DIABLO 释放进入细胞质后,会选择性的和 IAP 家族的特定成员结合而发挥功能。IAP 家族是细胞内重要的胱氨酸酶家族的抑制剂,主要包括 c-IAP1, c-IAP2, XIAP 等,其中 X 连锁的 XIAP 最为重要。IAP 家族的普遍特征是含有 BIR (baculoviral-IAP-repeat) 结构域, BIR 是 IAP 家族和胱氨酸酶结合的结构基础,同时也是和 Smac/DIABLO 结合的结构基础。

Smac/DIABLO 在 N 端含有一段保守序列 Ala-Val-Pro-Ile (AVPI),这段序列对于 Smac/DIABLO 发挥着重要作用。许多实验都表明 AVPI 序列可以和 BIR 结构域结合<sup>[1]</sup>,而最近发现一种含有 BIR 结构域的蛋白 Apollon 可以和 Smac/DIABLO 结合而阻断 Smac/DIABLO 诱导的细胞凋亡<sup>[6]</sup>,从而进一步说明了 Smac/DIABLO 的功能基础。鉴于 AVPI 序列的重要性,因此成为药物设计的重要目标。

Smac/DIABLO 和 IAP 通过与胱氨酸酶竞争性结合而抑制 IAP 的功能,在此过程中 AVPI 序列与 BIR 结构域起着十分重要的作用。开始认为只要 BIR 结构域存在即可与相应蛋白有效结合,但进一步研究<sup>[7]</sup>发现, XIAP 只有在 BIR2 和 BIR3 两个结构域同时存在的前提下, Smac/DIABLO 才能够有效的缓解 XIAP 介导的细胞凋亡抑制作用。Smac/DIABLO 和 IAP 是一种竞争性作用,因此可以通过增加 Smac/DIABLO 浓度实现促进细胞凋亡的目的,此外 Smac/DIABLO 还具有其它机制来调节 IAP 的功能。研究发现<sup>[8]</sup>, Smac/DIABLO 可以增强 IAP 泛素连接酶活性而降解 IAP 蛋白使其含量降低,如 Smac 可以选择性的使 c-IAP1 和 c-IAP2 泛素化而导致两者浓度降低<sup>[9]</sup>,这样可以进一步增加 Smac/DIABLO 的相对浓度促进细胞凋亡。研究还发现<sup>[10]</sup>, Smac/DIABLO 本身可以依靠其他分

收稿日期: 2004-11-25; 修回日期: 2005-04-01

作者单位: 050081 石家庄, 解放军白求恩军医学院生化教研室

子的协助而抑制自身泛素化减少降解,如一种 NADE(p75NTR-associated cell death executor) 分子可以和 Smac 作用而减少其泛素化,从而有利于 Smac 的功能发挥。

## 2 Smac/DIABLO 与肿瘤治疗

### 2.1 Smac/DIABLO 与肿瘤的关系

大多数恶性肿瘤细胞都对于化疗药物具有抗性,原因是大多数化疗药物是通过诱导细胞凋亡而发挥杀伤效应,而肿瘤细胞的一个典型特征是下调了细胞凋亡通路,如过表达 bcl-2,从而抑制了细胞色素 c 和 Smac 的释放而抑制细胞死亡。在人类白血病中,Smac 可以有效的促进细胞凋亡和抑制细胞增殖从而减缓了肿瘤的形成过程<sup>[11]</sup>,而在肾细胞癌形成过程中,XIAP 的 mRNA 和蛋白水平均有一定程度的升高,相对而言 Smac/DIABLO 的 mRNA 和蛋白水平则没有明显变化,结果造成 XIAP 和 Smac/DIABLO 之间的比例升高而使 Smac/DIABLO 抑制凋亡功能减弱,因此 XIAP 和 Smac/DIABLO 之间的平衡在肿瘤恶化过程中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。

### 2.2 Smac/DIABLO 与肿瘤的治疗

由于 Smac/DIABLO 在细胞凋亡诱导方面的功能,其已经逐渐成为了肿瘤细胞凋亡治疗的重要方面<sup>[13]</sup>。研究表明<sup>[14]</sup> Smac/DIABLO 并不能诱导健康的细胞凋亡,但是含有过量 Smac 的细胞对凋亡促进药物的敏感性大大加强,而耐药性大大降低。如含有转 Smac 基因的多种肿瘤对细胞毒性药物的诱导凋亡能力加强<sup>[15]</sup>,转 Smac 基因的卵巢癌细胞在药物作用下死亡率明显增多<sup>[16]</sup>。

除了转 Smac 基因的肿瘤细胞对化疗的敏感性增加外,单纯的 Smac 小肽也具有重要的抗肿瘤效果。研究表明<sup>[17]</sup>,Smac 小肽可以有效增加体外和体内化疗诱导的肿瘤细胞死亡效果,Smac 小肽还可以强烈增强 TRAIL 的抗肿瘤活性,因此联合 Smac 小肽和 Apo2L/TRAIL 进行肿瘤治疗一方面可以增加药物效果,另一方面还可以减少药物毒性<sup>[15]</sup>。将 Smac/DIABLO 的 N 端部分氨基酸与载体肽融合,可以增加多种抗肿瘤药物细胞凋亡的诱导能力和长期的抗增殖效应,而且这种融合多肽可以跨过细胞膜增加药物的治疗效果<sup>[18]</sup>。

由于 Smac/DIABLO 的 N 端 AVPI 序列是 IAP 结合的重要结构域,因此这四肽也成为了药物设计的基础。研究人员通过应用荧光标记而开发了一种高通量的药物筛选方法<sup>[19]</sup>,为 Smac/DIABLO 功能类似物的研制开发奠定了基础,而以结构为基

础的 Smac 构象设计药物也显示出了巨大的应用潜力,如得到的一种模拟物 12d 可以有效的增加顺铂诱导的人类前列腺癌细胞的凋亡效果<sup>[20]</sup>,Li 等<sup>[21]</sup>最近从 180 种以 AVPI 四肽为基础设计的文库中筛选得到化合物 3,它和 Smac 在功能上类似,与 IAP 具有较高的亲和力,可以阻断 XIAP 和胱氨酸酶 9 的结合而促进细胞凋亡,具有很大的应用前景。

## 3 Smac/DIABLO 的研究展望

癌症是当前生命科学研究面临的一个重大挑战,对于大多数癌细胞而言,它们的一个重要特征就是细胞具有逃脱凋亡的能力(“不死性”),并且这种能力还与肿瘤的侵袭性和对化疗的耐受性相关,因此努力开发能够重新激活肿瘤细胞凋亡的新药成为当前癌症治疗的一个重要方面<sup>[22]</sup>。Smac/DIABLO 的发现为此提供了一个机会,因此虽然 Smac/DIABLO 的发现才仅仅四年左右的时间,但许多科学家已经在这方面努力尝试以发现其在肿瘤生成调节和癌症治疗方面的作用。

尽管对 Smac/DIABLO 有了较为全面的认识,但还有一系列问题并未完全解决。研究者发现针对肺癌的鬼臼乙叉苷(etoposide)治疗过程中,Smac 并没有发挥自己重要的作用<sup>[23]</sup>,因此对于 Smac 是否对所有的肿瘤化疗均具有辅助效果还需进一步确定。Okada 等<sup>[24]</sup>通过同源重组而将 Smac 基因剔除,所获得的 Smac 基因缺陷小鼠并没有表现出任何表型上的异常,因此认为在细胞内可能还有其他可以弥补 Smac 功能的分子存在。

总之,随着对 Smac/DIABLO 的深入研究,一些关键性问题如过量的 Smac 是否有害,Smac 在不同肿瘤化疗中的辅助效果,Smac 化学类似物的毒性等被阐明,Smac/DIABLO 将在肿瘤治疗方面有一个广阔的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 旷兴林,罗云萍.促凋亡因子 Smac/DIABLO 的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2003,24(4):213-214.
- [2] Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology[J]. Trends Biochem Sci, 2004,29(9):486-494.
- [3] Takasawa R, Tanuma S. Sustained release of Smac/DIABLO from mitochondria commits to undergo UVB-induced apoptosis [J]. Apoptosis,2003,8(3):291-299.
- [4] Springs SL, Diavolis VM, Goodhouse J, et al. The kinetics of translocation of Smac/DIABLO from the mitochondria to the cytosol in HeLa cells[J]. J Biol Chem,2002,277(48):45715-45718.
- [5] Rehm M, Dussmann H, Prehn JH. Real-time single cell analysis of Smac/DIABLO release during apoptosis[J]. J Cell Biol,

- 2003,162(6):1031-1043.
- [6] Hao Y, Sekine K, Kawabata A, et al. Apollon ubiquitinates Smac and caspase-9, and has an essential cytoprotection function[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(9): 849-860.
- [7] Huang Y, Rich RL, Myszka DG, et al. Requirement of both the second and third BIR domains for the relief of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated caspase inhibition by Smac[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 49517-49522.
- [8] Creagh EM, Murphy BM, Duriez PJ, et al. Smac/Diablo antagonizes ubiquitin ligase activity of inhibitor of apoptosis proteins [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(26): 26906-26914.
- [9] Yang QH, Du C. Smac/DIABLO Selectively Reduces the Levels of cIAP1 and cIAP2 but Not That of XIAP and Livin in HeLa Cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 16963-16970.
- [10] Yoon K, Jang HD, Lee SY. Direct interaction of Smac with NADE promotes TRAIL-induced apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319(2): 649-654.
- [11] 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.
- [12] Yan Y, Mahotka C, Heikaus S, et al. Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(7): 1349-1357.
- [13] Arnt CR, Kaufmann SH. The saintly side of Smac/DIABLO: giving anticancer drug-induced apoptosis a boost [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(10): 1118-1120.
- [14] Hunter AM, Kottachchi D, Lewis J, et al. A novel ubiquitin fusion system bypasses the mitochondria and generates biologically active Smac/DIABLO [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(9): 7494-7499.
- [15] Fulda S, Wick W, Weller M, et al. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo [J]. *Nat Med*, 2002, 8(8): 808-815.
- [16] McNeish IA, Bell S, McKay T, et al. Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2003, 286(2): 186-198.
- [17] 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(4): 831-837.
- [18] Arnt CR, Chiorean MV, Heldebrandt MP, et al. Synthetic Smac/DIABLO Peptides Enhance the Effects of Chemotherapeutic Agents by Binding XIAP and cIAP1 in Situ [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44236-44243.
- [19] Glover CJ, Hite K, DeLosh R, et al. A high-throughput screen for identification of molecular mimics of Smac/DIABLO utilizing a fluorescence polarization assay [J]. *Anal Biochem*, 2003, 320(2): 157-169.
- [20] Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Yang CY, et al. Structure-based design, synthesis, and evaluation of conformationally constrained mimetics of the second mitochondria-derived activator of caspase that target the X-linked inhibitor of apoptosis protein/caspase-9 interaction site [J]. *J Med Chem*, 2004, 47(17): 4147-4150.
- [21] Li L, Thomas RM, Suzuki H, et al. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF-mediated cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1471-1474.
- [22] Denicourt C, Dowdy SF. Targeting apoptosis pathways in cancer cells [J]. *Science*, 2004, 305(5689): 1411-1413.
- [23] Bartling B, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Endogenously released Smac is insufficient to mediate cell death of human lung carcinoma in response to etoposide [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 298(1): 83-95.
- [24] Okada H, Suh WK, Jin J, et al. Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(10): 3509-3017.

[编辑: 贺文]