

Smac/DIABLO 结合 GPX4 促进铁 死亡分子机制和表型研究

完成人

李雨珊

指导小组成员

王陈继 副研究员

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	II
一、前言.....	1
1.1 铁死亡及其成因.....	1
1.2 GPX4 的抗氧化防御功能.....	1
1.3 Smac 与细胞死亡.....	2
1.4 总结.....	3
二、材料与方法.....	4
2.1 材料.....	4
2.1.1 细胞株.....	4
2.1.2 载体与宿主菌.....	4
2.2 试剂.....	4
2.2.1 抗体.....	4
2.2.2 商品化试剂.....	4
2.2.3 主要配置的试剂.....	5
2.2.3.1 质粒构建相关试剂.....	5
2.2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关试剂.....	6
2.2.3.3 细胞培养相关试剂.....	7

2.3	主要仪器.....	8
2.4	实验方法.....	8
2.4.1	免疫共沉淀 CO-IP.....	8
2.4.2	免疫印迹 Western Blot.....	9
2.4.3	差速离心法分离线粒体.....	9
2.4.4	检测线粒体蛋白定位.....	9
2.4.5	CRISPR 基因敲除技术.....	10
三、	研究结果.....	15
3.1	Smac 与 GPX4 相互作用验证.....	15
3.2	Smac 与 GPX4 的亚细胞定位验证.....	16
3.3	敲除 Smac 验证调控功能.....	17
四、	讨论.....	19
	参考文献.....	21
	致谢.....	23

摘 要

铁死亡是一种新型的程序性细胞死亡形式，其发生过程依赖于铁离子。谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）的失活使细胞内脂质过氧化物和活性氧自由基过度积累，破坏了细胞膜的完整性，进而导致铁死亡的发生。GPX4 是铁死亡过程中的关键分子，但目前尚不清楚细胞如何内源性地调控 GPX4 的活性。课题组前期通过免疫亲和纯化质谱筛选并验证 Smac/DIABLO 是一个新的 GPX4 互作蛋白，暗示了 Smac 有可能是调控 GPX4 活性的内源因子。

本文针对细胞铁死亡过程中 Smac 对 GPX4 活性的调控展开研究，以 293T 细胞系为研究对象，通过免疫共沉淀、Western Blot 等实验技术，验证了 Smac 和 GPX4 的相互作用情况，继而通过分离细胞组分进行 Western Blot 确定了 Smac 和 GPX4 的亚细胞定位，最后通过 CRISPR 敲除 Smac 基因，检测细胞内 GPX4 酶活及其他生化指标，发现 Smac 能够抑制 GPX4 的活性，从而使细胞对铁死亡更加敏感。本研究揭示了 Smac 结合 GPX4 而对其功能的影响，为调控铁死亡的分子机制提供了进一步的数据与支持。

关键词：铁死亡，谷胱甘肽过氧化物酶 4，Smac，内源调控

Abstract

Ferroptosis is a novel form of programmed cell death which is dependent on iron ions. The inactivation of glutathione peroxidase (GPX4) allows excessive accumulation of intracellular lipid peroxides and reactive oxygen species (ROS), which damages the integrity of cell membranes and leads to ferroptosis. GPX4 is a key molecule in the process of ferroptosis. However, it is not clear how cells endogenously regulate GPX4 activity. Smac/DIABLO was screened by immunoaffinity purification mass spectrometry and confirmed to be a novel GPX4 interacting protein, implying the possibility that Smac is an endogenous factor regulating GPX4 activity.

In this paper, we investigated the regulation of Smac on GPX4 activity during ferroptosis. The 293T cell line was used as the research object, and the interaction between Smac and GPX4 was verified by immunoprecipitation, Western Blot and other experimental techniques. Then, the distribution of Smac and GPX4 in cells was determined by Western Blot in isolated mitochondria. Finally, the Smac gene was knocked out by CRISPR, and the enzyme activity of GPX4 and other biochemical indicators in cells were detected. It was found that Smac could inhibit the activity of GPX4, thus making cells more sensitive to ferroptosis. This study revealed the effect of Smac binding GPX4 on its function, and provided further data and support for the molecular mechanism regulating ferroptosis.

Key words: ferroptosis, glutathione peroxidase 4, Smac, endogenous regulation

一、前言

1.1 铁死亡及其成因

铁死亡是一种新型的调节性细胞死亡形式，其发生过程依赖于铁离子。最初是通过高通量筛选发现一些小分子药物，如 erastin 和 RSL-3 可以诱导肿瘤细胞产生这种不同于凋亡、坏死等途径的新型细胞死亡形式^[1]。其形态学特征包括细胞膜破裂，还有特殊的线粒体异常：线粒体膜浓缩、线粒体嵴减少或缺失，以及外膜破裂，这些特征是检测铁死亡是否发生的重要标志。其生化特征包括铁离子、活性氧自由基（ROS）积累和脂质过氧化^[2]。

科学研究已经证实，铁死亡产生的直接原因，就是细胞内的脂质分子发生了自氧化链式反应。一方面，细胞中积累的二价铁离子参与芬顿反应产生的大量羟基自由基，作为活性氧自由基中最具有化学活性的物质，驱动着脂质自氧化链式反应的发生。细胞膜上有丰富的含不饱和脂肪酸的磷脂分子，羟基自由基氧化磷脂分子形成的脂质自由基(L·)，再被氧分子氧化(LOO·)。被氧化的脂质自由基从附近的脂质分子中提取氢，生成新的脂质自由基和脂质过氧化氢(LOOH)，前者再与其他脂质分子结合继续参与反应，而后者则与二价铁离子反应，被还原成氧化磷脂从而可以继续参与反应，从而引发一系列脂质链式氧化^[3]。

另一方面，铁可以促进脂氧合酶（LOX）氧化磷脂分子的酶促反应。三种关键酶参与脂质过氧化的酶促反应，即长链脂酰辅酶 A 合成酶 4（ACSL4）、花生四烯酸 15 脂氧合酶（ALOX15）和溶血磷脂酰胆碱转移酶 3（LPCAT3）。其中，ACSL4 可以酯化游离的不饱和脂肪酸，LPCAT3 帮助其被纳入膜磷脂，而 ALOX15 作为 LOX 家族的一员，参与膜磷脂的过氧化^[4]。在细胞内的抗氧化防御系统失活时，细胞内广泛存在的 PUFA 发生的大量氧化可能会改变细胞膜的结构，使得膜的渗透性和流动性发生变化，破坏膜的完整性，进而导致细胞死亡。

1.2 GPX4 的抗氧化防御功能

谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）是调节细胞脂质氧化代谢的关键因子，它依赖于还原型谷胱甘肽（GSH）作为必要的辅助因子。GPX4 利用了谷胱甘肽的

高还原性，将细胞内的脂质过氧化物还原为稳定无毒的脂醇类化合物，从而减少了细胞膜上脂质的过氧化，避免细胞死亡^[5]。研究表明，敲低 GPX4 的细胞或其低表达的细胞，对铁死亡更加敏感^[6]。

GSH 的合成需要胱氨酸作为原料。System X_c⁻位于细胞膜上，由 SLC7A11 和 SLC3A2 两个亚基通过二硫键连接组成，负责从胞外摄取胱氨酸^[7]。因为 GPX4 发挥抗氧化功能需要 GSH 的辅助，因而，System X_c⁻对胱氨酸的转运影响着 GSH 的合成，进而影响了 GPX4 的功能。研究发现，包括 p53^[8]、BAP1^[9]等在内的多个基因可以通过控制 System X_c⁻的表达情况，来调控细胞内 GSH 的水平，进而调控 GPX4 的功能。除此之外，erastin 等铁死亡诱导剂，也可以通过直接抑制 System X_c⁻的转运功能，限制 GSH 的合成^[10]，这间接抑制了 GPX4 的活性，导致铁死亡^[3]，并且这种诱导的细胞死亡可以通过添加外源性 GSH 来抑制^[11]。

除了 erastin 等铁死亡诱导剂，RSL-3 也可以抑制 GPX4 的活性，不过，它通过共价结合 GPX4 的活性位点直接抑制 GPX4 的活性，导致铁死亡的发生。因为 RSL-3 诱导的铁死亡没有抑制胱氨酸的摄取，也没有消耗 GSH，所以这种诱导的细胞死亡不能通过添加外源 GSH 来抑制^[12]。

1.3 Smac 与细胞死亡

目前有关于 GPX4 酶活的调控主要依赖于 RSL-3 的抑制作用，而关于细胞内源蛋白调控 GPX4 酶活的研究很少。在这样的背景下，课题组前期通过质谱鉴定出 GPX4 的内源互作蛋白 Smac，暗示了 Smac 很可能是调控 GPX4 酶活的细胞内源因子。

Smac 蛋白在细胞凋亡信号的刺激下，从线粒体运输到细胞质，对细胞凋亡有促进作用^[13]。Smac 蛋白在胞质中合成，被转运到线粒体的过程中，其 N 端的线粒体靶向序列会被切除，形成 N 端为 IBM（IAP 结合基序）的成熟蛋白^[14]，IBM 基序由 Ala-Val-Pro-Ile 这四个氨基酸残基组成，被称为 AVPI 序列^[15]。

在细胞凋亡过程中，胞浆中凋亡抑制蛋白（IAP）通过 BIR 结构域与半胱天冬酶（caspase）结合，抑制其活性，从而抑制细胞凋亡^[16]。在凋亡信号的刺激下，Smac 被释放到细胞质中，通过 AVPI 序列结合到 IAP 的 BIR 结构域上，使得 IAP 脱离 caspase，失去对 caspase 的抑制作用，起到促进凋亡的功能^[15, 17]。

就是这样一个在细胞凋亡过程中发挥重要功能的 Smac 蛋白，被发现与 GPX4 这个在铁死亡发生过程中的关键分子有着联系，因此，我们想要进一步探究 Smac 和 GPX4 两者的相互作用情况，以及两者之间的调控作用，为阐释铁死亡发生过程中具体的分子机制提供基础。

1.4 总结

本研究旨在揭示 Smac 参与调控铁死亡的分子机制，为解释 Smac 的生物学功能以及铁死亡的多维度调控拓宽视野。近年来肿瘤发病率逐渐增加，目前的治疗效果不容乐观，所以，找到新的抗肿瘤治疗靶点尤为重要。癌症的一个重要表现就是对凋亡的抵抗，因而非凋亡的调节性细胞死亡形式很可能提供新的可行性治疗方案，来达到抗肿瘤的目的。越来越多的研究发现铁死亡与各种病理状况和疾病相关，同时，铁死亡被认为是一种重要的肿瘤抑制机制，研究表明，靶向铁死亡通路可以提高化疗、放疗、免疫治疗等传统抗肿瘤治疗手段的疗效^[18, 19]，而铁死亡通路受损则会有利于肿瘤的发展^[9, 20]。因此，进一步探究铁死亡发生过程中的分子调控机制，有助于我们理解肿瘤对铁死亡诱导剂的反应机制，增加抗肿瘤药物靶点，为肿瘤的治疗提供新途径。

二、材料与方法

2.1 材料

2.1.1 细胞株

HEK 293T 细胞	本室保存
-------------	------

2.1.2 载体与宿主菌

PCMV-FLAG	Clontech 公司
pX459/pSpCas9(BB)-2A-Puro	本室保存
DH5 α -感受态细胞	本室保存

2.2 试剂

2.2.1 抗体

Anti-actin	Abcam 公司
Anti-IgG	Abclonal 公司
Anti-FLAG	Abclonal 公司
Anti-Myc	Abclonal 公司
Anti-GPX4	Abclonal 公司
Anti-Smac	Abclonal 公司
Anti-PDHA1	Abclonal 公司
Anti-Tom20	Abclonal 公司
Anti-Cytochrome C	Abclonal 公司
Anti-HSP60	Abclonal 公司
Anti-TIMM13	Abclonal 公司
Anti-VDAC1	Abclonal 公司
Anti-SLC7A11	CST 公司

2.2.2 商品化试剂

DMEM 培养基	GIBCO 公司
----------	----------

胎牛血清	GIBCO 公司
青/链霉素	GIBCO 公司
EDTA-胰蛋白酶 (0.25%)	GIBCO 公司
DNA 胶回收试剂盒	Thermo 公司
DNA 扩增酶	Toyobo 公司
限制性内切酶	New England Biolabs 公司
T4 连接酶	Takara 公司
Lipo 2000 转染试剂	Invitrogen 公司
蛋白 Marker	Thermo 公司
DNA Marker	华美生物
CCCP	碧云天
GPX 检测试剂盒	碧云天
CCK-8 试剂盒	碧云天
活性氧检测试剂盒	碧云天

2.2.3 主要配置的试剂

2.2.3.1 质粒构建相关试剂

1) LB 培养基

组分	LB 液体培养基 (1 L)	LB 固体培养基 (1 L)
Tryptone	10 g	10 g
Yeast Extract	5 g	5 g
NaCl	10 g	10 g
Agar	—	15 g
加水定容至	1000 mL	1000 mL
高温高压灭菌，固体培养基 1:1000 加入氨苄青霉素		

2) 50×TAE

组分	用量 (1 L)
Tris 碱	242 g
冰乙酸	57.1 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 mL

加水定容至 1000 mL

2.2.3.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳相关试剂

1) 10% SDS-PAGE 胶

组分	分离胶 (8 mL)	浓缩胶 (3 mL)
30%聚丙烯酰胺	2.7 mL	0.5 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	2 mL	—
1 M Tris (pH 6.8)	—	0.38 mL
10% SDS	80 μ L	30 μ L
20% APS	80 μ L	30 μ L
TEMED	4 μ L	3 μ L
加水至	8 mL	3 mL

2) 电泳 (转膜) 缓冲液

组分	5×电泳缓冲液	10×转膜缓冲液
Tris 碱	15.15 g	30.3 g
Glycine	94 g	144 g
10% SDS	50 mL	—
加水定容至	1000 mL	1000 mL

3) 1×电泳转膜缓冲液

组分	用量
10×电泳转膜缓冲液	250 mL
甲醇	500 mL
加水定容至	2.5 L

4) 4×SDS-PAGE 上样缓冲液

组分	用量
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 mL
SDS 粉末	0.8 g
丙三醇	4 mL
0.1 M DTT	40 μ L
溴酚蓝	少许

加水定容至	10 mL
-------	-------

5) 10×TBS

组分	用量
Tris 碱	60.6 g
NaCl	45 g
ddH ₂ O	450 mL
调节 pH 至 7.4	
加水定容至	500 mL

6) 1×TBST

组分	用量
10×TBS	100 mL
ddH ₂ O	定容至 1 L
Tween-20 溶液	1 mL

7) WB 封闭液（5% 脱脂牛奶）

组分	用量
Skimmed milk powder	2.5 g
1×TBST	定容至 50 mL

2.2.3.3 细胞培养相关试剂

1) 1×PBS

组分	用量
NaCl	4 g
KCl	0.1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.79 g
KH ₂ PO ₄	0.12 g
ddH ₂ O	400 mL
调节 pH 为 7.4，高温高压灭菌	

2) DMEM 完全培养基

组分	用量
DMEM 培养基	500 mL
fetal bovine serum	50 mL
青、链霉素混合液	5 mL

2.3 主要仪器

PCR 扩增仪	东胜创新
蛋白电泳仪	Bio-Rad 公司
蛋白转膜仪	Bio-Rad 公司
移液器	德国 Eppendorf 公司
CO ₂ 细胞培养箱	Heraeus 公司
NanoDrop 2000 超微量分光光度计	Thermo 公司
常温冰箱	中国美的公司
低温冰	Thermo Fisher
-80℃超低温冰箱	日本三友电器有限公司
HMT20 型恒温水浴锅	Heto 公司
台式离心机	德国 Eppendorf 公司
恒温摇床	中国威尔
紫外检测仪	上海复生公司
SW-CJ-JFD 型净化工作台	江苏太仓科教器材厂
台式恒温振荡器 (HZ-C 型)	江苏太仓科教器材厂
电子天平	美国 Ohaus 公司

2.4 实验方法

2.4.1 免疫共沉淀 CO-IP

收集 10 cm 培养皿的 HEK 293T 细胞，吸去培养基后用 PBS 清洗

每皿细胞加入 1.5 mL 0.1% NP40 裂解液，4℃摇床裂解 15 min，此时可预冷离心机

将细胞裂解液转移到 1.5 mL EP 管中，4°C低温离心，12000 rpm，15 min

取 100 μ L 上清液作为 input 对照，取剩余上清，加入 10 μ L FLAG beads，4°C 免疫反应过夜

次日提前预冷离心机，将样品 2000 rpm 离心 3 min，弃上清

加入 1 mL NP40 吹洗，4°C，2000 rpm 离心 3 min，弃上清，重复洗三次

向沉淀中加入 40 μ L 1 $\times$ SDS loading 溶液，99°C放置 10 min，样品可供免疫印迹实验使用

2.4.2 免疫印迹 Western Blot

样品制备：取出需要电泳鉴定的细胞，吸去培养基后用 PBS 洗一遍，加入 300 μ L 1 $\times$ SDS 于 4°C摇床上裂解 5 min

后收取至 1.5 ml EP 管中，于 95°C金属浴中煮样 10 min，后置于冰箱备用

制胶并上样：制备 SDS-PAGE 蛋白分离胶，使用微量枪头上样

电泳及转膜：

	上层浓缩胶 80 V	下层分离胶 120 V
电泳条件	恒压 30 min	恒压 60 min
转膜条件	恒流 300 mA	60 min

剪膜封闭：加 5% skimmed milk，4°C摇床上封闭 1 h

孵育一抗：用 1 $\times$ TBST 溶液洗膜 3 遍，在一抗溶液中孵育，4°C摇床过夜

孵育二抗：用 1 $\times$ TBST 溶液洗膜 3 遍，每次 5 min，然后在二抗溶液中孵育，4°C摇床 1 h

显色：用 1 $\times$ TBST 溶液清洗 3 遍，每次 5 min，在膜上滴曝光液，避光孵育 2 min，于曝光仪中曝光并分析结果

2.4.3 差速离心法分离线粒体

细胞样品加入 Isolation Buffer（140 mM KCl, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20 mM Hepes, pH 7.4），加入蛋白酶抑制剂，用玻璃匀浆器将细胞样品在冰上研磨

离心，500 g，10 min

收集上清，再离心，9000 g，35 min

收集沉淀，用 Wash Buffer（800 mM KCl, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 20 mM Hepes pH 7.4）洗 3 次，得到线粒体

2.4.4 检测线粒体蛋白定位

差速离心法分离线粒体，并用 100 μ L PBS 溶液重悬

对照组不做处理，实验组加入终浓度为 3 μ M 的 proteinase K，另一组实验组加入 3 μ M 的 proteinase K 和 0.1%-0.5%的 Triton X-100 溶液，置于 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 30 min

反应结束后，样品中加入 SDS loading 溶液溶解样品，99 $^{\circ}$ C 恒温金属浴中放置 10 min，样品离心后可用于免疫印迹检测

2.4.5 CRISPR 基因敲除技术

1) 设计引物

sg Smac1: GTGTGCGGTTTCCTATTGCAC

sg Smac2: AGCTTCAATCAACGCATATG

sg Smac3: CACGACAGTACCTGTGCAAT

2) 载体酶切

组分	用量
pX459	1 μ g
FastDigest BbsI (Fermentas)	1 μ L
FastAP (Fermentas)	1 μ L
10 $\times$ FastDigest Buffer	2 μ L
ddH ₂ O	Up to 20 μ L
37 $^{\circ}$ C 金属浴 30 min;	
琼脂糖凝胶电泳，割胶回收	

3) 引物退火

组分	用量
正向引物	1 μ L
反向引物	1 μ L
10 $\times$ T4 Ligation Buffer (NEB)	1 μ L
T4 PNK (NEB)	0.5 μ L
ddH ₂ O	Up to 10 μ L

PCR 仪中 95℃退火 5 min，关闭 PCR 仪缓慢冷却过夜

4) 质粒连接

组分	用量
酶切的 pX459 载体	50 μg
退火的引物	1 μL
10×T4 Ligation Buffer (NEB)	1 μL
T4 Ligase (NEB)	1 μL
ddH ₂ O	Up to 10 μL
PCR 仪中 16℃反应 4 h	

5) 转化

取出 10 μL 连接产物，加入 33 μL 感受态细胞中混合均匀，置于冰上 10 min

42℃金属浴热激 90 s 后在冰上静置 3 min

全部转移到 LB 固体培养基上，用吸管的管头涂布均匀且无液体后倒置于 37℃培养箱过夜

在转化的平板上选取合适的单克隆菌落进行划线扩大培养，同时取少量对应菌体于 10 μL ddH₂O 中，用 PCR 仪 99℃煮菌 10 min

取出后高速离心 2 min，取上清 1 μL 作为 PCR 验证模板

6) 菌落 PCR 验证

验证体系		反应条件	
组分	用量	98℃	30 s
2×Taq 酶	10 μg	98℃	10 s
正向引物	0.5 μL	60℃	30 s
反向引物	0.5 μL	72℃	30 s/kb
模板	1 μL	72℃	5 min
ddH ₂ O	8 μL	4℃	forever
总反应体系	20 μL	步骤 2-4 重复 30 个循环	

PCR 结束后，取出体系在 0.1%的琼脂糖凝胶中电泳，电泳结束后在紫外灯下曝光，选取最亮的条带进行克隆测序

7) 接种及质粒抽提

向 50 mL 的 EP 管中加入 30 mL 的 LB 液体培养基,加入 30 μ L 1000 $\times$ Ampicillin
挑选测序正确的菌株加入培养基中, 放置在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中摇晃过夜
用试剂盒抽提质粒后, 使用 NanoDrop 测浓度

8) 转染

用真空泵吸掉培养皿中的培养液, 沿壁缓慢滴加 2 mL PBS 轻晃清洗, 吸去
加入 1 mL 胰酶, 将培养皿放到 37 $^{\circ}$ C 培养箱中消化 2 min
取出后加入 1 mL DMEM 培养基终止胰酶的消化, 将贴壁细胞全部吹打重悬并
混匀
将细胞转移到离心管中, 1000 rpm 离心 3 min; 同时在 12 孔板中加入适量培养
基
离心结束后吸去上清, 加入 1 mL DMEM 培养基重新悬浮细胞后取 23 μ L 均匀
铺至 12 孔板中, 晃匀后放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养至合适密度
准备无菌 1.5 mL EP 管 A, 加入 50 μ L Opti-MEM、1.5 μ L 需转染的质粒、2 倍
质粒量的 P3000
另准备同样数量的 1.5 mL EP 管 B, 向每个管中加入 50 μ L Opti-MEM、1 倍质
粒量的 lipofectamine 3000
室温静置 5 min 后将加入了 lipofectamine 3000 的管 B 中液体全部转移至管 A
中混匀, 室温静置 20 min
将混合溶液沿壁缓慢加入待转染细胞培养液中, 摇匀, 放回 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养

9) 嘌呤霉素筛选

转染 48 h 后, 在各组细胞中加入适量 puromycin 以筛选转染成功的细胞
72 h 后如果空白对照组 (没有转染 sg 质粒) 无细胞存活, 就用真空泵吸掉实
验组的培养基, 用 PBS 洗三遍, 加入新的 DMEM 培养基, 放回培养箱中培养
至细胞状态良好
如果空白对照组仍有细胞存活, 则继续加 puromycin 进行筛选

10) 种单克隆

用真空泵吸掉培养基，使用 PBS 洗一遍

加入 50 μ L 胰酶于培养箱中消化 2 min

取出后加入 200 μ L DMEM 培养液吹打重悬，将细胞全部收集到 1.5 mL 管中，高速离心 40 s，同时，向新的 10 cm 培养皿中加入适量培养基

离心结束后吸去上清，加入 200 μ L DMEM 培养基重悬，充分吹打混匀，保证细胞尽量分离成单个，取 1-2 μ L 铺至新皿中，摇匀后放回 37°C 培养箱中培养待细胞生长至肉眼可见的单克隆时，吸去培养基，使用 PBS 洗一遍

取 2 μ L 胰酶小心地滴加在单克隆细胞群上，放入 37°C 培养箱中消化 2 min

取出消化好的细胞，取 6 μ L DMEM 培养基缓慢滴加在消化好的单克隆细胞上
将细胞团轻轻地吹打下来转移到加入适量培养基的 24 孔板中，放入 37°C 培养箱中培养

11) Western Blot 初验证

将细胞消化、离心、重悬，混匀后取一半细胞均匀铺至 12 孔板中，摇匀后放回培养箱中

另一半细胞进行 Western Blot 验证：4°C 离心机中 1000 rpm 离心 3 min；吸掉上清后加入适量 PBS 洗一遍；再离心 3 min

吸掉上清后加入 300 μ L 1 $\times$ SDS Lysis Buffer，在 105°C 金属浴中煮 10 min

点样进行 Western Blot 跑胶，用 Smac 抗体孵育验证。

12) PCR 及测序验证

将细胞消化、离心、重悬，混匀后取一半细胞均匀铺至 12 孔板中，摇匀后放回培养箱中过夜培养

另一半细胞于 PCR 仪中 95°C 煮 5 min；取出后高速离心 2 min，取上清 1 μ L 作为模板进行 PCR 验证

PCR 验证体系及反应条件如下：

验证体系	反应条件
------	------

组分	用量	98℃	30 s
2×Taq 酶	10 μg	98℃	10 s
正向引物	0.5 μL	60℃	30 s
反向引物	0.5 μL	72℃	30 s/kb
模板	1 μL	72℃	5 min
ddH ₂ O	8 μL	4℃	forever
总反应体系	20 μL	步骤 2-4 重复 30 个循环	

PCR 结束后，取出体系在 0.1%的琼脂糖凝胶中电泳，电泳结束后在紫外灯下曝光，选取最亮的条带进行克隆测序。

三、研究结果

3.1 Smac 与 GPX4 相互作用验证

通过构建 Smac-FLAG、GPX4-Myc 以及 Smac- Myc、GPX4- FLAG 质粒，分组转染进 293T 细胞，37℃培养 36 h 后收细胞，分别进行内源、半内源和外源免疫共沉淀，检测 Smac 和 GPX4 的相互作用情况。内源免疫共沉淀用抗 Smac 免疫沉淀，检测到了 GPX4 蛋白的存在（图 1 A）。半内源实验转染 Smac-FLAG 质粒，免疫沉淀 FLAG，检测到了相对微弱的 GPX4 条带（图 1 B）。外源实验分别转染了 Smac-FLAG、GPX4-Myc 和 Smac- Myc、GPX4- FLAG 质粒，免疫沉淀 FLAG 均可以检测到明显的 Myc 条带（图 1 C、D），即带 FLAG 标签的 Smac（GPX4）与带 Myc 标签的 GPX4（Smac）存在着相互作用，我们从内源、半内源和外源水平，均验证了细胞内 Smac 蛋白和 GPX4 蛋白存在着相互作用。

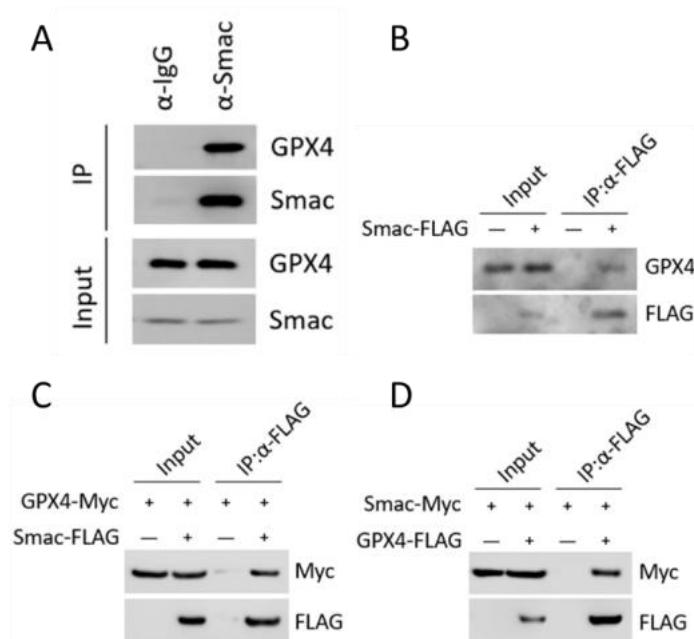


图 1 Smac 与 GPX4 内源、半内源、外源免疫共沉淀结果图

（A）内源免疫共沉淀：全细胞裂解液作为 Input 对照，用 anti-IgG（对照组）和 anti-Smac（实验组）的 beads 进行免疫沉淀，分别用 GPX4 抗体和 Smac 抗体进行检测；（B）半内源免疫共沉淀：实验组转染 Smac-FLAG 质粒，对照组未转染质粒，Input 对照为全细胞裂解液，用 anti-FLAG 的 beads 进行免疫沉淀，分别用 GPX4 抗体和 FLAG 抗体进行检测；（C）外源免疫共沉淀：对照组转染 GPX4-Myc 质粒，实验组转染 GPX4-Myc 和 Smac-FLAG 质粒，用 anti-FLAG 的 beads 进行免疫沉淀，分别用 Myc 抗体和 FLAG 抗体进行检测；（D）外源免疫共沉淀：对照组转染 Smac-Myc 质粒，实验组转染 Smac-Myc 和 GPX4-FLAG 质粒，用 anti-FLAG 的 beads 进行免疫沉淀，分别用 Myc 抗体和 FLAG 抗体进行检测

3.2 Smac 与 GPX4 的亚细胞定位验证

由于 Smac 蛋白会在凋亡状态下从线粒体释放到胞质中，所以在分子水平上验证了 Smac 与 GPX4 的确存在着相互作用之后，我们需要进一步探究两种蛋白的亚细胞定位（线粒体/胞质）。线粒体在细胞代谢过程中发挥着关键作用，同时也是活性氧 ROS 产生的重要来源。我们用线粒体自噬诱导剂 CCCP 对细胞进行处理来探究线粒体中 Smac 和 GPX4 的表达情况。

CCCP（Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone）是一种线粒体自噬诱导剂，可以通过自噬过程使溶酶体选择性降解线粒体，理论上线粒体被自噬降解之后，线粒体相关蛋白也就不存在了。在 CCCP 分别处理 293T 细胞 0、2、4、6、12、24 h 之后，收细胞进行 Western Blot，分别用 Smac、GPX4 的抗体，以及位于胞质/线粒体不同组分的标志性蛋白的抗体进行检测：丙酮酸脱氢酶（PDHA）、Tom20（线粒体外膜的蛋白转位因子）、细胞色素 C1（位于线粒体内膜）、HSP60（位于线粒体基质的分子伴侣）的抗体，肌动蛋白 Actin 为内参，确保蛋白上样量一致。可以看到，随着线粒体自噬诱导剂 CCCP 处理时间的增加，位于线粒体外膜、内膜和基质的标志性蛋白均呈现减少直至处理 24 h 后消失的现象，而 Smac 和 GPX4 也呈现条带减弱的趋势，说明随着线粒体自噬程度的增加，Smac 和 GPX4 蛋白量逐渐减少，也进一步说明了这两种蛋白在线粒体中是存在的（图 2 A）。

为了进一步探究 Smac 和 GPX4 在线粒体中的定位，我们用差速离心法分离出线粒体组分来进行实验。我们设计了一个空白对照组和四个实验组：因为线粒体外膜的通透性本身比较高，我们加温和去垢剂 Triton X-100 来增加线粒体内膜的通透性，同时用胰蛋白酶 Trypsin 处理消化线粒体蛋白，最后加入胰蛋白酶抑制剂 TI 进行回补，实验组和对照组具体设计如下（“—”表示没有加相应的处理，“+”表示加了相应的处理，“++”表示增加相应的处理量）：

	1	2	3	4	5
Triton-X-100	—	—	—	+	+
Trypsin	—	+	++	++	++
TI	—	—	—	—	+

用 Western Blot 检测 Smac、GPX4 和位于线粒体不同组分的标志性蛋白：HSP60（位于线粒体基质）、TIMM13（位于线粒体膜间隙）、VDAC1（位于线粒体外膜）（图 2 B）。结果显示，相比于对照组，在只用胰蛋白酶处理的实验组中，没有检测到位于线粒体外膜的 VDAC1，表明蛋白被水解了，增加胰蛋白酶的处理量之后，位于线粒体膜间隙的 TIMM13 也被水解了；在此基础上使用 Triton X-100 处理之后，所有的蛋白都没有检测到条带，位于线粒体基质的 HSP60 也进一步被水解了，同时，Smac 和 GPX4 的条带也消失了，而增加胰蛋白酶抑制剂的处理之后，所有的蛋白都检测到了，说明消失的条带对应的蛋白确实是被胰蛋白酶水解了，而 Smac 和 GPX4 是大部分存在于线粒体内膜及以内的。

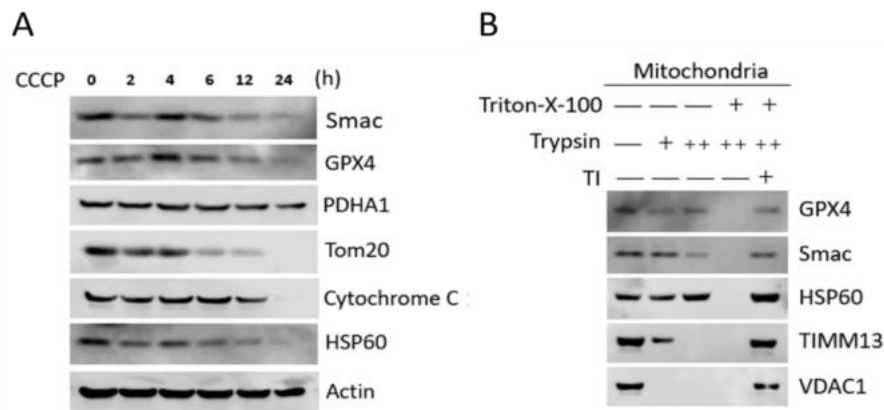


图 2 Smac 与 GPX4 亚细胞定位验证的 Western Blot 结果图

（A）CCCP 处理 293T 细胞不同时间后进行 Western Blot 检测；（B）分离线粒体组分进行 Western Blot 检测，泳道 1 为不加任何处理的对照组，泳道 2 加胰蛋白酶 Trypsin 处理，泳道 3 增加胰蛋白酶的处理量，泳道 4 在增加胰蛋白酶处理量的同时加入 Triton-X-100 进行处理，泳道 5 在用胰蛋白酶、Triton-X-100 的同时，使用胰蛋白酶抑制剂，分别对 Smac、GPX4 和位于线粒体不同组分的标志性蛋白 HSP60、TIMM13 和 VDAC1 进行检测

3.3 敲除 Smac 验证调控功能

在成功敲除 Smac 之后（图 3 A），我们用试剂盒分别测了 GPX4 的酶活、在铁死亡诱导剂 Erastin 处理下细胞的幸存数目和活性氧自由基 ROS，从遗传的角度来探究敲除 Smac 对细胞相关生化指标和形态指标的影响。结果显示，敲除 Smac 的两组实验组其 GPX4 酶活水平相对于空白对照组有极显著性增加($p < 0.01$)（图 3 B），说明 Smac 能抑制 GPX4 的活性。在用铁死亡诱导剂 Erastin 处理 12 h 之后，检测到细胞的幸存数目开始下降，在处理 24 h 的时候敲除 Smac 的实验组相比于空白对照组产生了显著性差异，敲除 Smac 之后细胞幸存数目显著增加（图

3 C), 我们推测这是因为敲除 Smac 之后, 解除了对 GPX4 的抑制作用, 使得 GPX4 在清除脂质过氧化物和活性氧自由基的过程中发挥更大的功能, 从而使细胞对铁死亡的敏感性降低, 细胞的幸存数目显著增加, 这进一步验证了 Smac 能抑制 GPX4 活性的结论。除此之外, 敲除 Smac 之后, 细胞内活性氧自由基的水平也显著下降 (图 3 D), 这与 GPX4 的活性水平显著提升有关。实验验证了我们对 Smac 功能的推测, 即它能抑制 GPX4 的活性, 使细胞对铁死亡更加敏感。

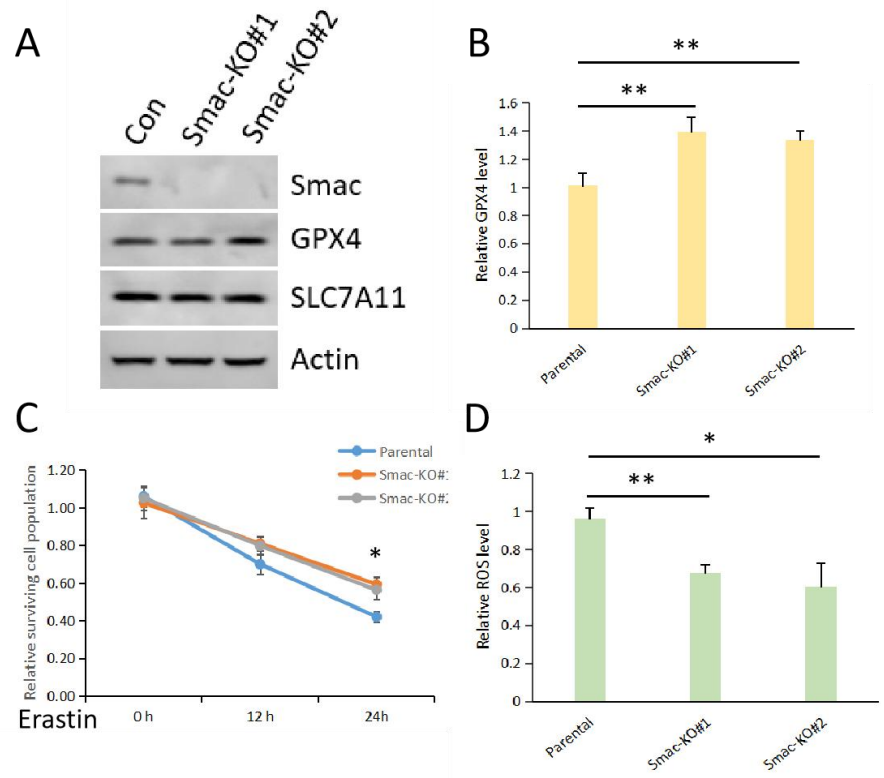


图 3 敲除 Smac 对细胞生化指标的影响

(A) Smac 敲除成功的免疫印迹图: 相比于对照组, Smac 敲除组可以检测到除 Smac 之外的其他相关蛋白; (B) 敲除 Smac 之后检测细胞内的 GPX4 水平: 两组实验组相对于对照组皆有显著性提升; (C) 用 Erastin 对细胞分别进行 0/12/24 h 的铁死亡诱导处理, 检测对照组与 Smac 敲除组的细胞幸存数目; (D) 检测对照组与 Smac 敲除组细胞内的 ROS 水平; 统计学显著性分析采用 Student's t test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

四、讨 论

我们通过免疫共沉淀,从内源、半内源以及外源水平均验证了 Smac 和 GPX4 在细胞内确实可以发生相互作用,之后进一步探究它们发生相互作用的亚细胞定位。通过线粒体自噬诱导剂 CCCP 对细胞不同时间梯度的处理,根据细胞不同组分标志性蛋白含量的变化情况,检测 Smac 和 GPX4 蛋白水平的变化,推断两者均在线粒体中存在。更进一步分离线粒体组分之后,通过组合使用胰蛋白酶、Triton-X-100,以及胰蛋白酶抑制剂的实验设计,根据线粒体不同组分的标志性蛋白的含量变化情况,检测 Smac 和 GPX4 蛋白水平的变化,进一步推测两者大部分存在于线粒体内膜及以内。但仅仅检测 Smac 和 GPX4 蛋白的亚细胞定位还不够,要想进一步探究两者发生相互作用的亚细胞定位,后续还需要在分离线粒体组分之后,通过免疫共沉淀来进一步验证,并且用 Smac 抗体在细胞内进行共定位来确认。除此之外,Smac 与 GPX4 蛋白都具有线粒体定位的信号肽,我们可以通过构建缺失信号肽的突变体,检测它们之间的相互作用,来确定 Smac 调控 GPX4 的具体分子机制。

Smac 基因位于 12 号染色体上,由七个外显子组成。外显子 1 和外显子 3 的前一部分编码线粒体靶向序列 (MTS),使 Smac 定位到线粒体中;外显子 3 的后一部分编码 AVPI 片段,Smac 正是通过 AVPI 片段与凋亡抑制蛋白 IAPs 结合从而发挥促凋亡的作用。Smac 存在 4 种不同的剪切亚型^[21] (图 4),而这些天然剪接体有不同的外显子缺失,比如缺失 1 号的可能进不了线粒体,缺失 3 号的没有 AVPI 片段。我们后续可以通过构建不同的 Smac 天然剪切体,用 CO-IP 的方法检测不同剪接体与 GPX4 的相互作用,来鉴定介导两者相互作用的结构域。同时,我们还可以表达带 His 标签的 Smac 和 GPX4 的原核重组蛋白,在体外检测两者是否存在直接的相互作用。

在研究中,我们构建了 Smac 基因稳定敲除的 293T 细胞系,检测了敲除 Smac 基因对细胞相关生化指标的影响。结果表明,敲除 Smac 基因之后,细胞内 GPX4 的酶活水平产生了极显著性增加,而胞内活性氧自由基的水平相应地显著下降,同时,在用 Erastin 诱导细胞铁死亡 24 h 之后,细胞的幸存数目也产生了显著增加,这说明 Smac 能抑制 GPX4 的活性,导致细胞内活性氧自由基不能及时清除,

使细胞对铁死亡更加敏感。但要进一步确认 Smac 对 GPX4 的调控功能，还需要构建 Smac 野生型以及缺失 AVPI 段突变体的稳定回补细胞系与空白细胞作为共同对照组。同时，为了更深入地了解铁死亡对肿瘤生长及其对治疗敏感性的影响，我们还需要构建其他的肿瘤细胞系来全方位说明问题。

更进一步，后续还可以用 Dox 等化疗药物对细胞进行处理，来检测 Smac 亚细胞定位的变化、Smac 与 GPX4 相互作用强度的变化，以及 Smac 调控 GPX4 酶活与铁死亡表型的变化，进一步拓展铁死亡发生与调控的分子机制，为抗肿瘤治疗提供新的途径和解决思路。

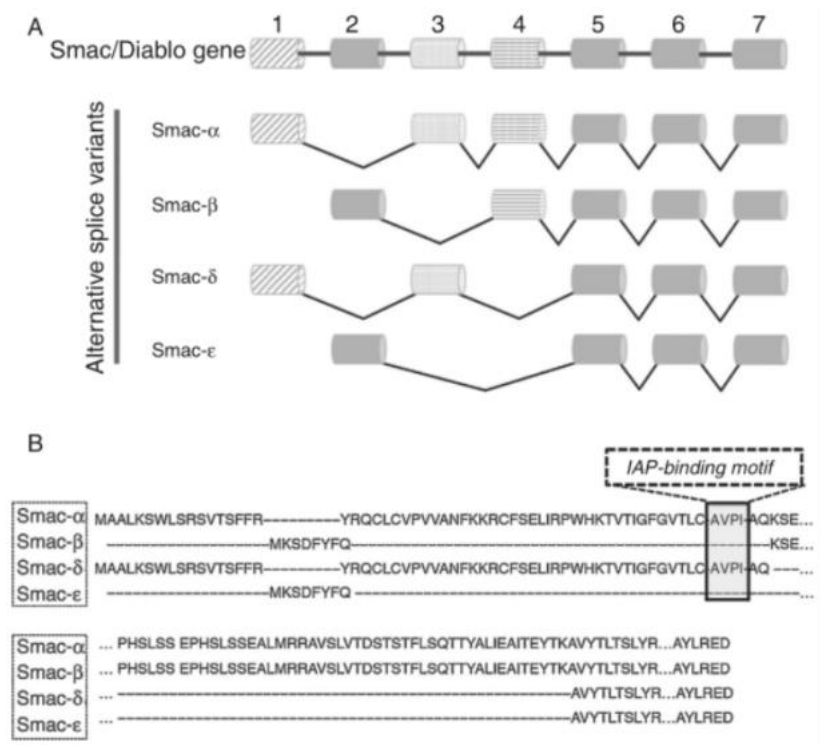


图 4 Smac 基因的选择性剪接变体

(A) Smac 亚型中外显子示意图; (B) Smac 基因各剪接变体亚型氨基酸序列的差异; (AVPI 序列被突出标注显示)

参考文献

- [1] Yang W S, Stockwell B R. Synthetic Lethal Screening Identifies Compounds Activating Iron-Dependent, Nonapoptotic Cell Death in Oncogenic-RAS-Harboring Cancer Cells[J]. *Chemistry & biology*, 2008, 15(3).
- [2] Scott J D, Kathryn M L, Michael R L, Rachid S, Eleina M Z, Caroline E G, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death[J]. *Cell*, 2012, 149(5).
- [3] Behrouz H, Peter V, Tom V B. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6).
- [4] Kagan V E, Mao G, Qu F, Angeli J P F, Doll S, Croix C S, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis.[J]. *Nature chemical biology*, 2017, 13(1).
- [5] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1830(5): 3289-3303.
- [6] Wan S Y, Rohitha S, Matthew E W, Kenichi S, Rachid S, Vasanthi S V, et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2).
- [7] Sato H, Tamba M, Ishii T, Bannai S. Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins.[J]. *The Journal of biological chemistry*, 1999, 274(17).
- [8] Jiang L, Kon N, Li T, Wang S, Su T, Hibshoosh H, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression.[J]. *Nature*, 2015, 520(7545).
- [9] Zhang Y, Shi J, Liu X, Feng L, Gong Z, Koppula P, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression.[J]. *Nature cell biology*, 2018, 20(10).
- [10] 余增, 黄承浩. 脂质代谢调节肿瘤细胞铁死亡研究进展[J]. *生命科学*, 2020, 32(07): 738-745.
- [11] Dixon S J, Patel D N, Welsch M, Skouta R, Lee E D, Hayano M, et al. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis.[J]. *eLife*, 2014, 3.
- [12] Yang W S, Kim K J, Gaschler M M, Patel M, Shchepinov M S, Stockwell B R. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(34): E4966-E4975.
- [13] Srinivasula S M, Datta P, Fan X J, Fernandes-Alnemri T, Huang Z, Alnemri E S. Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/DIABLO and its role in the death receptor pathway.[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275(46).
- [14] Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. *Cell*, 2000, 102(1): 33-42.
- [15] Wu G, Chai J, Suber T L, Wu J W, Du C, Wang X, et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO.[J]. *Nature*, 2000, 408(6815): 1008-1012.
- [16] Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(3): 239-252.
- [17] Liu Z, Sun C, Olejniczak E T, Meadows R P, Betz S F, Oost T, et al. Structural

basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain[J]. *Nature*, 2000, 408(6815): 1004-1008.

[18] Lang X, Green M D, Wang W, Yu J, Choi J E, Jiang L, et al. Radiotherapy and Immunotherapy Promote Tumoral Lipid Oxidation and Ferroptosis via Synergistic Repression of SLC7A11.[J]. *Cancer discovery*, 2019, 9(12).

[19] Ye L F, Chaudhary K R, Zandkarimi F, Harken A D, Kinslow C J, Upadhyayula P S, et al. Radiation-Induced Lipid Peroxidation Triggers Ferroptosis and Synergizes with Ferroptosis Inducers.[J]. *ACS chemical biology*, 2020, 15(2).

[20] Jiang L, Kon N, Li T, Wang S J, Su T, Hibshoosh H, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression[J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.

[21] Victoria A G, Martínez A M, Moreno V L, Meléndez Z J, Martínez R G U. Is there something else besides the proapoptotic AVPI-segment in the Smac/DIABLO protein?[J]. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)*, 2016, 73(6).

致谢

因为疫情无法开展线下实验，很多同学们的实验进度都受到了影响，在这里我要感谢我的毕设导师王陈继老师，在前期就指导我完成一部分实验，让我的毕业设计没有受到太大的影响，论文有内容可写。王老师在科研工作上认真负责、态度严谨、思路清晰，对课题进展总能给出提纲挈领的提点。同时，王老师的亲和力和拉近了我们与导师之间的距离，在交流中指导我在未来的科研生活中需要继续保持学习的动力。其次我要感谢张亮师兄，在我刚进实验室时给我很好的指引，耐心细致地教我各种实验技术，不厌其烦地回答我无知的问题，不论是在实验上还是生活中，都给了我很大的帮助，让我了解了一名科研工作者真正的状态和需要保持的心态，让我面对未来多了一份确定与从容。

除此之外，我还要感谢卢宝荣老师，在我这四年的本科时光里对我的关照与指引，卢老师儒雅随和的亲切感、严谨细致的科学精神，给刚进大学的我留下了深刻的印象。卢老师算是我走向科研道路的启蒙者，去体验“判天地之美、析万物之理”的境界。我还要感谢汪智师兄，在实验进展过程中对我们细致的帮助和指导，让我们在学习中进步，在收获中成长。感谢在复旦教导过我的每一位老师、辅导员，遇到过的每一位同学，感谢复旦自由开放的氛围，包容我，支持我，让我学会独立成长。感谢我的室友们，让我不再孤单与迷茫，每一次夜跑、畅聊，每一次相约去图书馆、互相督促学习，每一次聚餐、出游，都见证了我们友谊的延伸，你们的陪伴让这段时光格外温暖、格外珍贵。感谢 Echo 合唱团，让我找到了自己的热爱与归属感，让我在逐渐步入正轨的大学生活中更加坚定、更加自信。感谢我的家人们，在我去往异地求学的这几年，始终尊重我的选择与决定，一如既往地给予我无限的信任、爱与支持。

我们正在经历一个时代的考验，突如其来的新冠疫情已经延续了快要三年，2022年春季的这波疫情猛烈地袭击了上海，让整个城市都静默了下来，我们被封在学校已经有两个月，封楼管理也一个多月。同学们被封闭在三四十平米的宿舍里，渴望着自由、克服着空间的狭窄带来的各种问题；食堂的后勤人员们每天凌晨就要为保障我们的三餐而辛勤劳作，在送餐的日子里，光是在南区，每顿都需要做出五千多餐，感动与感激已经不足以表达我们的情感；每次看到有关上海

居民的新闻，我都十分感激学校对我们的保护和保障，起码我们不需要为食物和生活物资发愁；在这段比较艰难的日子里，感谢延安、新疆的苹果，感谢攀枝花的番茄，感谢黄老五的零食，感谢源源不断的水果和物资，感谢捐赠物资的广大校友们，感谢志愿者们，让我们平淡的封闭生活尝到一丝惊喜，多了一份温暖。

我正在回顾我本科四年的生活写这篇致谢，一只白头鹎从阳台开着的门跳进了宿舍，在地上溜达了一圈后飞走了。我习惯于打开窗户和门，让自己更贴近于大自然的怀抱，虽然我们的空间被限制了，但我们还能听到悦耳的鸟叫，听到呼啸的风声，看到红瓦白墙，看到绿树蓝天，看到希望与阳光，我相信，一切都会好起来的。人与自然的和谐相处，总归会走到平衡点。