文章编号:1000-5404(2005)02-0095-03

论著

5-Aza-CdR增强TRAIL对胃癌细胞的抗瘤活性与caspase-8表达的关系

张汝钢,房殿春,杨柳芹,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化病专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨5-Aza-CdR对凋亡诱导分子TRAIL抗胃癌细胞活性的影响。**方法** 采用MTT方法检测TRAIL蛋白的抗癌活性;采用RT-PCR方法检测caspase-8 mRNA的表达。**结果** TRAIL 200 ng/ml作用72 h对SGc 7901、Kato 3和AGS胃癌细胞的生长抑制率分别为9.83%、11.94%和4.04%;经5-Aza-CdR处理后,对3株胃癌细胞的抑制率分别提高到38.98%、52.42%和30.72%;用5-Aza-CdR处理后3株胃癌细胞caspase-8 mRNA表达明显增加。**结论** 5-Aza-CdR能增强胃癌细胞对TRAIL的敏感性,其机制可能与caspase-8的表达上调有关。

关键词:胃癌;5-Aza-CdR;TRAIL;caspase-8
中图法分类号:R392-33; R73-36; R735.2 **文献标识码**:A

Enhanced TRAIL antitumor activity on human gastric cancer cells induced by 5-Aza-CdR is involved in up-regulation of caspase-8

ZHANG Ru-gang, FANG Dian-chun, YANG Liu-qin, LUO Yuan-hui (Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of demethylation agent 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the antitumor activity of tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) against gastric carcinoma. **Methods** Expression of caspase-8 mRNA was examined by RT-PCR. Antitumor activity of TRAIL protein was measured by MTT method. **Results** The inhibition rates of treatment with 200 ng/ml TRAIL for 72 h on gastric cell lines SGc 7901, Kato 3, and AGS were 9.83%, 11.94%, and 4.04%. After treatment with 5-Aza-CdR, the inhibition rates of 200 ng/ml TRAIL on gastric cell lines increased to 38.98%, 52.42%, and 30.72%. Before exposure to 5-Aza-CdR, expression of caspase-8 mRNA was low and an increased expression of the caspase-8 was found in the three gastric cancer cells after treatment with 5-Aza-CdR. **Conclusion** Treatment with 5-Aza-CdR can increase TRAIL antitumor activity on human gastric cancer and its mechanisms might be involved in the up-regulation of caspase-8 gene.

Key words: gastric carcinoma; 5-Aza-2'-deoxycytidine; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; caspase-8

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子家族中的新成员,与TNF、FASL具有高度的同源性,又名APO-2L[1,2]。研究表明,TRAIL可选择性杀伤多种组织来源的恶性肿瘤细胞、转化细胞、病毒感染细胞,而对正常细胞则无细胞毒性。TRAIL可诱导大多数肿瘤细胞发生凋亡,但也有部分肿瘤细胞对其不敏感[3]。某些肿瘤细胞因子caspase-8基因启动子区5′CpG岛高甲基化而使基因沉寂[4,5],导致肿瘤细胞对TRAIL的耐药。去甲基化药5-氮-2′-杂脱氧胞苷(5-Aza-CdR)能逆转caspase-8基因的高甲基化状态,恢复mRNA表达和对TRAIL的敏感性[6]。为探讨5-Aza-CdR对TRAIL抗胃癌作用的影响,我们检测了3株对TRAIL耐药的胃癌细胞SGc 7901、Kato 3、AGS经5-Aza-CdR处理前后caspase-8 mRNA表达及与TRAIL抗癌活性的关系。

1 材料和方法

1.1 TRAIL蛋白的表达、分离和纯化

导入有可溶性TRAIL (sTRAIL)(氨基酸114-281,带六聚组氨酸尾)基因的pET-d质粒的大肠杆菌BL21(DE3) PLysS由本实验室构建。按本室建立的方法进行TRAIL蛋白的表达、分离和纯化[7]。含有sTRAIL基因的pET-d质粒的大肠杆菌BL21(DE3) PLysS用IPTG(Promega)诱导后经溶液Ⅰ、Ⅱ处理,上清即含有TRAIL蛋白,用HisTrip Kit(美国法玛西亚公司)分离、纯化;纯化后在PBS溶液中脱盐,Lowry法定量;最后用含20%小牛血清的RPMI1640培养基将TRAIL蛋白稀释并于4 ℃保存、备用。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞株SGc 7901、Kato 3、AGS由中科院上海细胞所提

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA172)
Supported by the Scientific Research Foundation of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01MA172)
作者简介:张汝钢(1967-),男,河南省睢县人,硕士,主治医师,主要从事胃癌发病机制及防治方面的研究。电话:13647654283
通讯作者:房殿春,E-mail: fangdianchun@hotmail.com
收稿日期:2004-08-05;修回日期:2004-12-01

供,本实验室保存。细胞培养于含10%灭活小牛血清、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的RPMI1640培养液中,培养条件为37 ℃、5% CO_2、饱和湿度,每隔2~3 d用0.25%胰酶/0.02% EDTA消化,以1:(2~3)传代1次。药物处理:将2×10^5个细胞接种于100 ml玻璃培养瓶,24 h后换分别换含1、10、100、1 000 nmol/L 5-Aza-CdR的全培基继续培养5 d后收获细胞,同时用含1 μmol/L 5-Aza-CdR的全培基分别培养上述细胞3、5、7 d后收获行RT-PCR以检测5-Aza-CdR诱导caspase-8 mRNA表达的量效和时效关系;用含1 μmol/L 5-Aza-CdR全培基培养7 d后的癌细胞进行MTT实验以检测TRAIL蛋白的抗癌活性,未用药物组作对照。

1.3 MTT法检测TRAIL蛋白的抗癌活性

胃癌细胞用含10%小牛血清的RPMI1640全培基常规培养、传代,取对数生长期细胞用0.25%胰酶/0.02% EDTA消化,用上述培养基配成单细胞悬液,按2×10^3细胞/孔加入96孔平底板(Kato 3不需消化,吹打成单细胞悬液后直接加入96孔U底板),培养3 d后加TRAIL。量效和时效关系,按0、50、100、150、200 ng/ml给予TRAIL,取孵育12、24、48、72 h细胞分别在酶标仪(BIO-RAD 550型)上测490 nm光吸收值,每个时段均设空白对照。测值前4~6 h吸净培养液后加入20 μl 5.0 mg/ml MTT溶液,4 h后每孔追加100 μl DMSO,振荡10 min。TRAIL对细胞生长的抑制率(inhibitive rate) = (1 − 实验组 D_{490}/对照组 D_{490}) × 100%。

1.4 检测胃癌细胞caspase-8mRNA表达

采用RT-PCR方法检测caspase-8 mRNA表达。细胞总RNA提取采用Tripure™ RNA分离试剂(Roche公司)参照说明书进行,紫外分光光度计(Beckman DU® 640 spectrotometer)定量;参照文献[8]合成人caspase-8 mRNA引物,序列为:5′-TCT GGA GCA-TCT GCT GTC TG-3′(正义),3′-TTG ACG TCT GTG GTC CGT CC-5′(反义),扩增产物427 bp;β-action序列为:5′-CAA CTC CAT-CAT GAA GTG TAAC-3′(正义),3′-CAA CAC GGA GTA CTT-GCG CTG-5′(反义),扩增产物180 bp。RT-PCR采用一步一管法(Acess RT-PCR system, Promega)扩增。反应体系为:总体积25 μl,1×反应缓冲液、dNTP 0.2 mmol/L、上下游引物各100 ng、$MgSO_4$ 1.0 mmol、AMV逆转录酶2.5 U、Tfl DNA聚合酶2.5 U、RNA模板800 ng;扩增条件为48 ℃、45 min,94 ℃、5 min,94 ℃、30 s,65 ℃、1 min,72 ℃、1 min,循环1次;94 ℃、30 s,64 ℃、1 min,72 ℃、1 min,循环1次;94 ℃、30 s,63 ℃、1 min,72 ℃、1 min,循环1次;94 ℃、30 s,62 ℃、1 min,72 ℃、1 min,循环1次;94 ℃、30 s,61 ℃、1 min,72 ℃、1 min,循环31次;72 ℃、7 min。取8 μl caspase-8扩增产物和4 μl β-action扩增产物在1.4%琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml EB)上电泳,凝胶成像仪(Gel Dos 2000™)上照像。

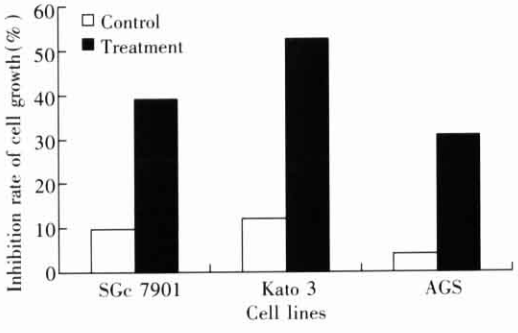
1.5 统计学处理

用统计软件SPSS 10.0建立数据库,数据比较采用χ^2检验。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR对TRAIL抗癌活性的影响

采用MTT法检测TRAIL蛋白的抗癌活性,结果见图1。图1可见,对3株胃癌细胞生长的抑制率均<15%,200 ng/ml TRAIL作用72 h对SGc 7901、Kato 3和AGS胃癌细胞的生长抑制率分别为9.83%、11.94%和4.04%,说明3株胃癌细胞均为TRAIL的耐药细胞。应用1 μmol/L 5-Aza-CdR与不同剂量TRAIL联合应用,TRAIL对胃癌细胞生长的抑制作用见图1。图1显示,TRAIL对3株胃癌细胞的生长抑制作用随剂量的增大和时间的延长增强,在TRAIL剂量200 ng/ml,作用72 h以后,对胃癌细胞的抑制率均达30%以上,200 ng/ml TRAIL作用72 h对3株胃癌细胞的生长抑制率分别为38.98%、52.42%和30.72%,统计学分析显示应用5-Aza-CdR孵育胃癌细胞后能显著性提高TRAIL对胃癌细胞生长的抑制($P<0.05$),提示5-Aza-CdR能增强TRAIL对胃癌细胞的抗瘤活性。



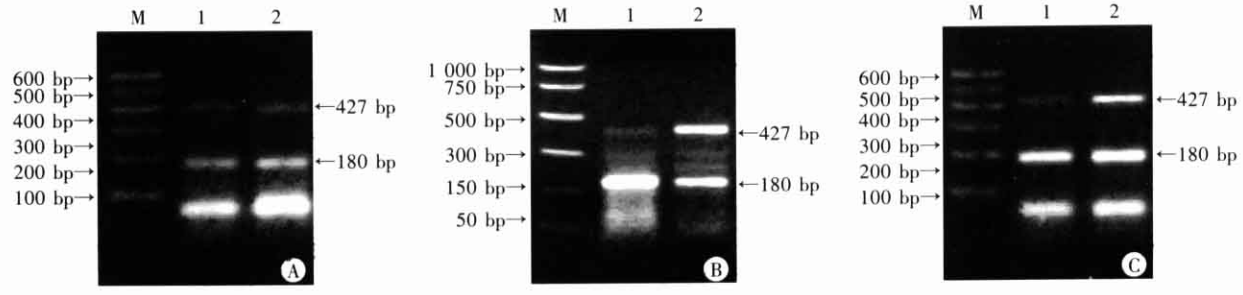
Control: Pretreatment without 5-Aza-CdR pretreatment; Treatment: Gastric cancer cells pretreated with 5-Aza-CdR for 7 d and then treated with TRAIL

图1 5-Aza-CdR对TRAIL抑制胃癌细胞生长的影响

Fig 1 Effects of 5-Aza-CdR on the inhibitory effect of TRAIL on the growth of gastric tumor cells

2.2 胃癌细胞caspase-8 mRNA表达

应用5-Aza-CdR前后caspase-8 mRNA表达见图2。图2显示,与用药前相比,用药后caspase-8 mRNA表达明显增加,提示5-Aza-CdR可上调caspase-8 mRNA的表达。



M: PCR marker; 1: Pretreatment without 5-Aza-CdR; 2: Gastric cells pretreated with 1 μmol/L 5-Aza-CdR for 7 d

图2 经1 μmol/L 5-Aza-CdR处理前及处理7 d后SGc7901、Kato 3和AGS细胞caspase-8 mRNA表达

Fig 2 Effects of 5-Aza-CdR on the expression of caspase-8 mRNA

3　讨论

作为凋亡诱导分子，TRAIL 最显著的特征是选择性地诱导肿瘤细胞、转化细胞和病毒感染细胞的凋亡，而对正常的组织和细胞不具有明显的毒性效应[8,9]。体内实验表明，重组 TRAIL 蛋白能够明显抑制荷瘤动物体内肿瘤细胞的生长，甚至使肿瘤消退，而对宿主没有明显的损害[10]。我们采用 MTT 方法检测了 TRAIL 蛋白对 SGc 7901、Kato 3 和 AGS 3 株胃癌细胞的生长抑制作用，结果显示 TRAIL 对 3 株胃癌细胞的生长抑制率均在 15%以下，说明 3 株胃癌细胞均为 TRAIL 的耐药细胞。而 TRAIL 与 5-Aza-CdR 合用，TRAIL 均能明显抑制胃癌细胞生长，对 SGc 7901、Kato 3 和 AGS 3 株胃癌细胞的 24 h 抑瘤率由给 5-Aza-CdR 前的 11.29%、11.70%和 2.026%，分别提高到给 5-Aza-CdR 后的 32.75%、43.43%和 23.25%。提示 5-Aza-CdR 可提高胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性。

细胞凋亡是由 caspase 家族蛋白介导，活化的 caspase 可触发该酶的级联反应，引起染色体 DNA 降解和细胞解体。因此 caspase 家族是细胞凋亡过程的关键元件，它的激活或超常表达均可引起细胞凋亡，因此又称“死亡蛋白酶”。在 TRAIL 诱导的细胞凋亡信号传递过程中，caspase-8 是起始 caspase 并发挥关键作用[8,11,12]。文献[13]报道，神经母细胞瘤、尤文瘤和髓母细胞瘤对 TRAIL 的耐药与 caspase-8 的低表达有关，采用 5-Aza-CdR 诱导神经母细胞瘤 caspase-8 表达后可提高其对 TRAIL 的敏感性。Caspase-8 蛋白呈低表达或表达缺失的 Ewing 瘤细胞株用 5-Aza-CdR 处理后给予 TRAIL，瘤细胞的凋亡率由 5% ~ 10%升至 30% ~ 50%，但 caspase-8 蛋白高表达的 VH-64 细胞用 5-Aza-CdR预处理后凋亡率无进一步增加[5]。本研究采用 RT-PCR 方法检测了 3 株胃癌细胞 caspase-8 mRNA 表达，发现应用 5-Aza-CdR 前胃癌细胞 caspase-8 表达很低，经应用 5-Aza-CdR 处理后，caspase-8 表达量明显增加，提示 5-Aza-CdR 能上调胃癌细胞 caspase-8 表达。本研究还发现，应用去甲基化药物 5-Aza-CdR 前 3 株胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性很低，而应用 5-Aza-CdR 上调 caspase-8 后，胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性明显增加，提示胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 caspase-8 表达上调有关。因此 TRAIL 与 5-Aza-CdR 的联合应用不失为胃癌治疗的有效途径。

参考文献：

[1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al*. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3(6): 673 - 682.

[2] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, *et al*. Ashkenazia. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 12687 - 12690.

[3] Ashkenazi A, Pai R C, Fang S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble APO2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155 - 162.

[4] Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, *et al*. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines[J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5897 - 5901.

[5] Zuzak T J, Steinhoff D F, Sutton L N, *et al*. Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma[J]. Eur J Cancer, 2002, 38(1): 83 - 91.

[6] Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, *et al*. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(3): 356 - 364.

[7] 李小安，房殿春，杨仕明，等. TRAIL 蛋白的表达，纯化和抗肿瘤活性[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1058 - 1060.

[8] Fulda S, Kufer M U, Meyer E, *et al*. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5865 - 5877.

[9] Takita J, Yang H W, Chen Y Y, *et al*. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma[J]. Oncogene, 2001, 20(32): 4424 - 4432.

[10] Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, *et al*. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions [J]. Nat Med, 2001, 7(4): 383 - 385.

[11] Hopkins-Donaldson S, Bodmer J L, Bourloud K B, *et al*. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4315 - 4319.

[12] Seol D W, Li J, Seol M H, *et al*. Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2001, 61(3): 1138 - 1143.

[13] Eggert A, Grotzer M A, Zuzak T J, *et al*. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1314 - 1319.

（编辑　冷怀明）