文章编号:1000-5404(2006)12-1273-03

论著

对TRAIL耐药的肝癌细胞 *caspase*-8 基因甲基化状态及其mRNA表达

张汝钢,房殿春 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究肝癌细胞株HepG2和SMMC 7721对肿瘤坏死因子相关与凋亡诱配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)的敏感性与 *caspase*-8 基因启动子区5′CpG岛的甲基化状态和mRNA表达的关系及5′-氮-2′-杂脱氧胞苷(5-Aza-CdR)对TRAIL抗癌活性的影响。**方法** 采用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR method, MSP)方法检测 *caspase*-8 基因5′CpG岛甲基化状态;采用RT-PCR方法检测 *caspase*-8 mRNA表达;采用吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色方法检测细胞凋亡。**结果** 2株肝癌细胞均属TRAIL耐药细胞,*caspase*-8 基因5′CpG岛均为非甲基化状态;5-Aza-CdR即不能增加 *caspase*-8 mRNA表达,亦不能提高肝癌细胞对TRAIL的敏感性。**结论** 肝癌细胞对TRAIL的敏感性与 *caspase*-8 基因的甲基化状态及mRNA表达无关,5-Aza-CdR不能提高肝癌细胞对TRAIL的敏感性。

关键词:5-Aza-CdR; TRAIL; *caspase*-8; 肝癌; 凋亡
中图法分类号:R394.2;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

Methylation status and mRNA expression of *caspase*-8 in human hepatocellular carcinoma cells resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

ZHANG Ru-gang, FANG Dian-chun (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the association of methylation status of C5 of the cytosine in the CpG dinucleotide of *caspase*-8 promoter and expression of *caspase*-8 mRNA with the resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human hepatocellular carcinoma cell lines, and to evaluate the effect of demethylation agent 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-CdR) on the resistance to TRAIL of human hepatocellular carcinoma cell lines. **Methods** Methylation status of *caspase*-8 promoter was measured with methylation-specific PCR method (MSP). Expression of *caspase*-8 mRNA was detected with RT-PCR. Apoptosis induced by TRAIL was observed by Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) staining. **Results** Unmethylated status of *caspase*-8 promoter was found in both HepG2 and SMMC 7721 hepatocellular carcinoma cells. 5-Aza-CdR neither up-regulated *caspase*-8 mRNA expression nor increased the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to TRAIL. **Conclusion** *caspase*-8 promoter methylation status and *caspase*-8 mRNA expression are not related to the resistance to TRAIL. 5-Aza-CdR can not increase the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to TRAIL.

Key words: 5-Aza-CdR; TRAIL; *caspase*-8; hepatocellular carcinoma; apoptosis

肿瘤坏死因子相关与凋亡诱配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)为肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员之一,其与TNF-α和Fas L不同的是它仅能诱导病毒感染细胞、转化细胞和肿瘤细胞凋亡,而不引起炎症反应和杀伤正常细胞。TRAIL能诱导大多数肿瘤细胞凋亡,但亦有部分肿瘤细胞对其不敏感[1]。业已发现,某些肿瘤细胞因 *caspase*-8 基因启动子区5′CpG岛高甲基化而使基因沉寂[2,3],导致肿瘤细胞对TRAIL产生耐药性。5-Aza-CdR能逆转 *caspase*-8 基因的高甲基化状态,恢复其基因表达和对TRAIL的敏感性[4]。为探讨肝癌细胞对TRAIL的敏感性与 *caspase*-8 基因启动子区5′CpG岛甲基化状态和mRNA表达的关系及5-Aza-CdR对

基金项目:全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA172)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA (01MA172)
作者简介:张汝钢(1967-),男,河南省睢县人,博士研究生,主治医师,主要从事胃癌发病机制及防治方面的研究,发表论文5篇。电话:13647654283
通讯作者:房殿春,E-mail: fangdianchun@hotmail.com
收稿日期:2005-06-13;**修回日期**:2005-09-24

TRAIL抗肝癌作用的影响，我们检测了2株肝癌细胞经5-Aza-CdR处理前后TRAIL抗癌活性的变化及*caspase*-8基因启动子区5′CpG岛甲基化状态和*caspase*-8 mRNA表达。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

肝癌细胞株HepG2和SMMC 7721细胞由本实验室保存；DMEM(高糖型)购于Hycolne公司；对苯二酚、亚硫酸氢钠、透析袋(直径27 mm)、*Taq* DNA聚合酶和PCR Marker购自上海生工公司。RT-PCR检测试剂盒购自Promega公司；*caspase*-8基因非甲基化型、甲基化型引物，*caspase*-8和β-actin mRNA引物均由上海生工公司合成。AO和EB购于Ameresco公司。

1.2 细胞凋亡检测

采用AO/EB染色方法检测细胞凋亡。细胞培养于含10%胎牛血清(天津TBD)、100 U/ml青霉素和100 U/ml链霉素的DMEM培养液中，培养条件为37 ℃、5% CO_2、饱和湿度。对数生长期细胞用0.25 %胰酶、0.02% EDTA消化为单个细胞悬液后接种于100 ml培养瓶，24 h后分别加入0、10、100、1 000 nmol/L 5-Aza-CdR。5-Aza-CdR作用3 d后用胰酶/EDTA消化并接种于24孔培养板(1×10^4细胞/孔)；于5-Aza-CdR作用5 d时弃培养液，加入重组人TRAIL(Bender MedSystems)，终浓度分别为0、12.5、25、50、100 ng/ml；继续培养24 h后，每孔加入40 μl AO/EB溶液(1份PBS中100 μg/ml AO溶液，1份PBS中100 μg/ml EB溶液)，轻微混合后吸弃培养液、立即在荧光显微镜(OLYMPUS，70×70)下观察、成像，结果重复3次。

1.3 *caspase*-8基因启动子区5′CpG岛甲基化状态检测

采用MSP方法检测*caspase*-8基因启动子区5′CpG岛甲基化状态。癌细胞基因组DNA提取采用酚/氯仿法，紫外分光光度计(Beckman DU640 spectrotometer)定量。基因组DNA的亚硫酸氢钠修饰见文献[5]。

检测甲基化状态所用引物参照文献[6]合成。*caspase*-8非甲基化引物序列为5′-TAGGGGATTTGGAGATTGTGA-3′(正义)，3′-AACAAAACTTACATCTATATACCA-5′(反义)，扩增产物322 bp；甲基化引物序列为5′-TAGGGGATTCGGAGATTGCGA-3′(正义)，3′- AGCAAAGCTTACATCTATATGC-5′(反义)，扩增产物320 bp。PCR反应在DNA Thermal Cycler 480(USA)上进行，扩增参照Herman的方法[5]。PCR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™)上照相。

1.4 肝癌细胞*caspase*-8 mRNA表达检测

采用RT-PCR方法检测*caspase*-8 mRNA表达。细胞总RNA提取采用Tripure™ RNA分离试剂盒(Roche公司)并参照说明书进行，紫外分光光度计(Beckman DU640 spectrotometer)定量。参照文献[2]合成人*caspase*-8 mRNA引物，序列为：5′-TCTGGAGCATCTGCTGTCTG -3′(正义)，3′-TTGACGTCTGTGGTCCGTCC -5′(反义)，扩增产物427 bp；β-actin序列为：5′-CAACTCCATCATGAAGTGTAAC -3′(正义)，3′-CAACACGGAGTACTTGCGCTG-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；首先48 ℃逆转录45 min，然后94 ℃变性5 min，最后采用降落PCR扩增，具体为94 ℃、30 s，最高退火温度为65 ℃、最低退火温度为61 ℃、72 ℃延伸1 min，共35循环，然后72 ℃延伸7 min。取*caspase*-8和β-actin扩增产物各6 μl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™)上照相。

1.5 统计学处理

用统计软件SPSS 11.5建立数据库，采用双因素重复试验方差分析。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR对TRAIL抗癌活性的影响

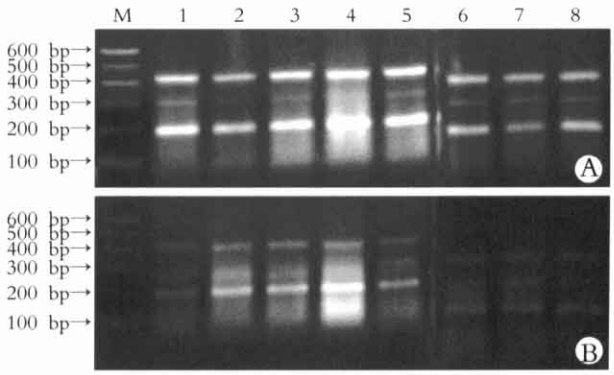
虽然TRAIL能剂量依赖性地诱导HepG2和SMMC 7721细胞凋亡，但24 h的凋亡诱导率均低于10%。统计学分析结果显示，2株细胞应用5-Aza-CdR前后各剂量点的凋亡诱导率无显著差异($P>0.05$)，5-Aza-CdR与TRAIL的交互作用不显著($P>0.05$)。

2.2 肝癌细胞*caspase*-8基因启动子区5′CpG岛甲基化状态

肝癌细胞株HepG2和SMMC 7721细胞*caspase*-8基因启动子区5′CpG岛甲基化状态检测结果显示，5-Aza-CdR处理前应用*caspase*-8基因非甲基化引物扩增可见明显电泳条带，而应用甲基化引物扩增未见明显的电泳条带，提示2株肝癌细胞用药前*caspase*-8基因5′CpG岛均呈非甲基化状态。经1 μmol/L 5-Aza-CdR处理7 d，2株肝癌细胞*caspase*-8基因的甲基化状态无明显变化，提示5-Aza-CdR对HepG2和SMMC 7721细胞*caspase*-8基因启动子区甲基化状态无明显影响。

2.3 5-Aza-CdR对*caspase*-8 mRNA表达的影响

5-Aza-CdR对*caspase*-8 mRNA表达的影响见图1。统计学分析结果显示，5-Aza-CdR的浓度和作用时间对HepG2和SMMC 7721肝癌细胞*caspase*-8 mRNA表达均无显著性影响($P>0.05$)。



A：HepG2；B：SMMC 7721；M：PCR分子质量标准；1：对照组；2：1 nmol/L，5 d；3：10 nmol/L，5 d；4：100 nmol/L，5 d；5：1 μmol/L，5 d；6：1 μmol/L 3 d；7：1 μmol/L 5 d；8：1 μmol/L 7 d

图1 5-Aza-CdR对肝癌细胞株*caspase*-8 mRNA表达的影响

3　讨论

TNF-α 和 Fas L 均能诱导肿瘤细胞凋亡，但对正常细胞的致死性炎症反应和肝损害限制了其在临床上的应用。TRAIL 属于肿瘤坏死因子超家族成员，能诱导多数肿瘤细胞和移植瘤细胞凋亡，而对正常组织和细胞无毒性[1]。尽管 TRAIL 对多种肿瘤细胞具有选择性杀伤作用，但一些组织来源的肿瘤细胞对 TRAIL 仍然具有耐受性[7]。本研究采用 AO/EB 方法检测了 TRAIL 对 2 株肝癌细胞的抗癌作用，发现即使用饱和剂量 TRAIL(100 ng/ml)作用 24 h 2 株肝癌细胞的凋亡率仍低于 10 %，提示此 2 株肝癌细胞均为 TRAIL 耐药细胞。深入研究此 2 株肝癌细胞肝癌细胞的耐药原因，寻找提高肝癌细胞对 TRAIL 敏感性的方法，对肝癌的治疗有重要意义。

DNA 甲基化有重要的生物学意义，与基因表达的控制、染色体完整性的维护和 DNA 重组的调节密切相关[8]。最近，又被认为在抵御外来入侵的寄生 DNA 中起重要作用。Eggert 等[9]发现，神经母细胞瘤对 TRAIL 耐药与 *caspase*-8 表达丢失有关。通过去甲基化处理或基因转染使 *caspase*-8 再表达，可使对 TRAIL 耐药的细胞株变得对 TRAIL 敏感化[2,10]，提示这些细胞的 *caspase*-8 基因高甲基化影响着肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。5-Aza-CdR 是 DNA 甲基转移酶抑制剂，能以时间和剂量依赖性引起基因去甲基化、恢复其 mRNA 和蛋白质表达[11]，然而已有高水平表达的则无进一步增加，且细胞重新甲基化要经过 8 ~ 9 代后才能完全恢复。5-Aza-CdR 曾被用来治疗白血病、镰状细胞贫血、Ⅳ期非小细胞肺癌[12]等。本研究采用甲基化特异性 PCR 方法检测 *caspase*-8 基因启动子区 5′ CpG 岛甲基化状态，发现 2 株肝癌细胞均处于去甲基化状态，应用 5-Aza-CdR 处理后，亦未能提高肝癌细胞对 TRAIL 的敏感性，提示肝癌细胞对 TRAIL 耐受可能与 *caspase*-8 基因的甲基化状态无关。

近年来研究表明，肿瘤细胞 *caspase*-8 的表达在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中起关键作用。Hopkins-Donaldson 等[3]研究了神经母细胞 *caspase*-8 的表达和对 TRAIL 的反应，发现神经母细胞对 TRAIL 耐药与 *caspase*-8 的表达丢失有关。本研究采用 RT-PCR 方法检测 2 株肝癌细胞 *caspase*-8 mRNA 表达，结果显示给予 TRAIL 前后 2 株肝癌细胞 *caspase*-8 mRNA 表达并无明显不同，应用 5-Aza-CdR 处理后既不能增加 *caspase*-8 mRNA 表达，也不能提高 2 株肝癌细胞对 TRAIL 的敏感性，提示肝癌细胞对 TRAIL 的耐药性可能与 *caspase*-8 基因 mRNA 表达无关。究竟哪些基因的甲基化状态及表达影响肝癌细胞对 TRAIL 的敏感性有待深入研究。

参考文献：

[1] SINICROPE F A, PENINGTON R C, TANG X M. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis is inhibited by Bcl-2 but restored by the small molecule Bcl-2 inhibitor, HA 14-1, in human colon cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8284 - 8292.

[2] 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.

[3] 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.

[4] POULAKI V, MITSIADES C S, MCMULLAN C, *et al*. Human retinoblastoma cells are resistant to apoptosis induced by death receptors: role of caspase-8 gene silencing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(1): 358 - 366.

[5] HERMAN J G, GRAFF J R, MYOHANEN S, *et al*. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(18): 9821 - 9826.

[6] 张汝钢，房殿春，杨柳芹，等. 胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 caspase-8 基因甲基化状态的关系[J]. 第三军医大学学报，2004，26(2)：95 - 97.

[7] VIGNESWARAN N, WU J, NAGARAJ N, *et al*. Differential susceptibility of metastatic and primary oral cancer cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Int J Oncol, 2005, 26(1): 103 - 112.

[8] REIK W, DEAN W, WALTER J. Epigenetic reprogramming in mammalian development[J]. Science, 2001, 293(5532): 1089 - 1093.

[9] 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.

[10] NISHIMURA S, ADACHI M, ISHIDA T, *et al*. Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 augments anoikis and inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7009 - 7014.

[11] OKANO M, BELL D W, HABER D A, *et al*. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development[J]. Cell, 1999, 99(3): 247 - 257.

[12] MOMPARLER R L, BOUFFARD D Y, MOMPARLER L F, *et al*. Pilot phase I-II study on 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine) in patients with metastatic lung cancer[J]. Anticancer Drugs, 1997, 8(4): 358 - 368.

（编辑　陈聪连）