文章编号:1000-5404(2009)05-0423-03

论著

TRAIL联合5氟尿嘧啶诱导喉癌细胞株的凋亡

余晓燕,张潜英,沈 娜,叶 琳,邓 碧,陈鸿雁 (重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨TRAIL与化疗药物5氟尿嘧啶(5-FU)单独和联合对喉癌HEP-2细胞株增殖、凋亡的影响并探讨其可能机制。**方法** 不同浓度的TRAIL、5-FU单独及联合作用于HEP-2细胞株,MTT法检测其增殖抑制作用,FCM法检测细胞凋亡率,荧光显微镜下观察细胞形态,Western blot法检测c-FLIP、NF-κB蛋白的表达。**结果** TRAIL与5-FU联合作用于HEP-2细胞株时,其抑制率、凋亡率较单独作用时高,c-FLIP、NF-κB蛋白的表达水平低于单独作用时的表达水平。**结论** TRAIL与5-Fu联合作用有协同诱导HEP-2细胞株凋亡的作用,可能机制为下调c-FLIP、NF-κB蛋白的表达水平。

关键词:TRAIL;5-FU;HEP-2细胞株
中图法分类号:R73-36;R739.65;R979.1 **文献标识码**:A

Effects of TRAIL combined with 5-FU on apoptosis of HEP-2 cell line

YU Xiao-yan, ZHANG Qian-ying, SHEN Na, YE Lin, DENG Bi, CHEN Hong-yan (Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To observe the effects TRAIL, 5-FU and their combination on the proliferation and apoptosis of HEP-2 cell line, and to explore the possible mechanism. **Methods** TRAIL (10.0 ng/ml) and 5-FU (1.0 μg/ml) were used. HEP-2 cells were divided into control group, TRAIL treated group, 5-FU treated group, 5-FU + TRAIL treated group. The inhibition on the proliferation of HEP-2 cells respectively treated with TRAIL, 5-FU and their combination was detected by MTT and their apoptosis rate was detected by FCM. Cell morphology was observed by fluorescence microscopy. The protein expressions of c-FLIP and NF-κB in all groups were detected by Western blotting. **Results** The inhibition rate and apoptosis rate of 5-FU + TRAIL treated cells was significantly higher than those of TRAIL treated cells and those of 5-FU treated cells. The expressions of c-FLIP and NF-κB in TRAIL treated cells and 5-FU treated cells were higher than those in TRAIL + 5-FU treated cells. **Conclusion** TRAIL alone or combined with 5-FU can induce the inhibition and apoptosis of HEP-2 cell line, and the mechanism may be through restraining the protein expressions of c-FLIP and NF-κB.

Key words: TRAIL; 5-fluorouracil; HEP-2 cell line

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand,TRAIL)是TNF家族的成员之一,是一种较新的抗肿瘤因子。它仅诱导转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞发生凋亡,而对正常细胞无明显的杀伤作用[1]。传统化疗是肿瘤治疗的一个重要手段,然而大剂量化疗药物对机体组织可造成相当的副作用,如骨髓抑制、肝脏损害等。Ashkenazi等[2]发现多种肿瘤细胞(如肺肿瘤细胞、乳腺肿瘤细胞等)能被TRAIL诱导凋亡,且与化疗有协同作用。因此,联合用药治疗肿瘤成为较热门的研究方向。本研究旨在探讨TRAIL与低毒性的5-FU协同诱导HEP-2细胞株的凋亡,为TRAIL的临床应用提供一定实验室依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

兔抗人TRAIL蛋白由重庆医科大学实验动物中心谭毅教授惠赠。MTT试剂、AnneXin-V/PI凋亡试剂购自南京凯基生物制品公司,5-FU购自南通精华制药公司,兔抗人NF-κB多克隆抗体购于武汉博士德公司,兔抗人c-FLIP多克隆抗体购于eBioscience公司,羊抗兔二抗购于北京中杉生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人喉癌表皮细胞株(HEP-2)购于南京凯

基金项目:重庆市卫生局资助项目(07-1-021)
Supported by the Chongqing Bureau of Public Health (07-1-021)
作者简介:余晓燕,女,四川省遂宁市人,硕士,主要从事头颈部肿瘤方面的研究。E-mail:yuxiaoent@sina.com
通信作者:陈鸿雁,E-mail:www.cchhyy787@sohu.com
收稿日期:2008-06-11;修回日期:2008-07-28

基生物制品公司。HEP-2 细胞在含有 10% 小牛血清及青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养基中，于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度中培养，维持细胞处于对数生长期备用。

1.2.2　细胞毒性指数的测定（MTT 法）　采用 96 孔板，每孔接种 10^5 个细胞，4 h 细胞贴壁后按照 1.0、10.0、100.0 μg/ml 的 5-FU 浓度和 1.0、10.0、100.0、1 000.0 ng/ml 的 TRAIL 浓度分别加入，设阴性对照和空白对照组，各组细胞抑制率（%）=（1 - 实验组吸光度/对照组吸光度）×100%。

1.2.3　荧光显微镜观察凋亡细胞形态　细胞爬片置于 6 孔板内培养细胞、爬片，培养液中加入干预药物使其终浓度分别为 5-FU 1.0 μg/ml，TRAIL 10.0 ng/ml，5-FU 1.0 μg/ml + TRAIL 10.0 ng/ml，以及阴性对照。培养 24 h，用 PBS 洗涤 2 次，均匀加 AnneXin-V/PI 染料，避光室温反应 5 min，于荧光显微镜下、双色滤片观察。

1.2.4　流式细胞仪（FCM）分析　细胞培养、药物处理同荧光显微镜法，收集细胞 5×10^5 个，加入 Annexin-V/PI 染料后充分混匀避光反应 30 min 后进行流式细胞仪检测，计算细胞凋亡率。

凋亡率（%）=［实验组凋亡率 - 对照组凋亡率］/［1 - 对照组凋亡率］×100%

1.2.5　Western blot 法分析 c-FLIP、NF-κB 蛋白的表达水平

培养细胞与药物处理同前，培养 24 h，提取蛋白质 20 μl，沸水浴 4 min，8% SDS-PAGE 电泳，将分离的蛋白转移至 PVDF 膜，脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h，加入一抗，4 ℃冰箱过夜。洗涤后将膜置于二抗中 37 ℃孵育 1 h，充分洗涤后，用 DAB 溶液显色，烘干扫描保存。

1.3　统计学处理

所有实验重复 3 次，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行 t 检验。

2　结果

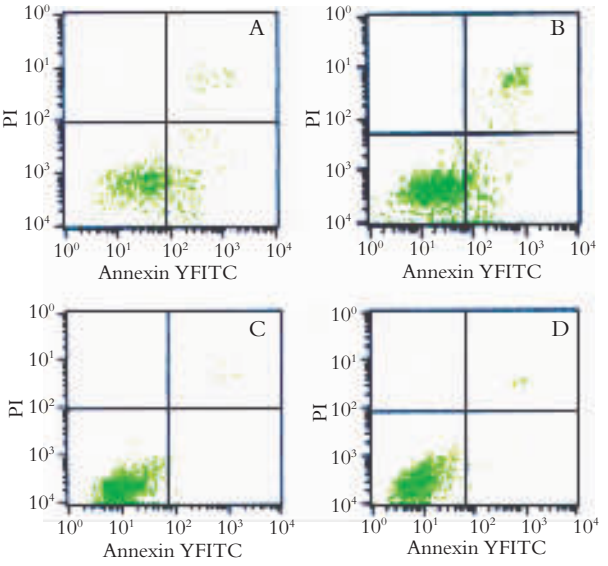
2.1　MTT 细胞毒性分析结果

2.1.1　TRAIL、5-FU 单独作用于 HEP-2 细胞株　1.0 μg/ml 浓度的 5-FU 可以抑制 HEP-2 细胞株的增殖。1.0 ng/ml 浓度的 TRAIL 不能抑制 HEP-2 细胞株的增殖，10.0 ng/ml 及其以上浓度的 TRAIL 可抑制 HEP-2 细胞株的增殖。选取药物浓度为 5-FU 1.0 μg/ml，TRAIL 10.0 ng/ml 进行进一步的实验。

2.1.2　TRAIL 联合 5-FU 作用于 HEP-2 细胞株　TRAIL（10.0 ng/ml）联合 5-FU（1.0 μg/ml）作用于 HEP-2 细胞株后，使用 MTT 法测定抑制率显示出对 HEP-2 细胞株的抑制率可上升到（29.21 ± 9.80）%，比单独作用时对 HEP-2 细胞株的抑制率（5.73 ± 4.31）% 明显提高（$P < 0.05$）。

2.2　流式细胞仪（FCM）检测结果

FCM 检测细胞凋亡率：提示单独使用 TRAIL（10.0 ng/ml）、5-FU（1.0μg/ml）时，HEP-2 细胞株的凋亡率仅为（0.24 ± 0.02）%、（2.25 ± 0.56）%；两者联合作用后，HEP-2 细胞株的凋亡率明显提高到（14.33 ± 0.78）%。可见低毒性的 TRAIL 不能较好地诱导 HEP-2 细胞株的凋亡，联合用药后可大大提高 TRAIL 及化疗药物诱导 HEP-2 细胞株凋亡的能力（$P < 0.05$）。见图 1。



A：5-FU（1.0 μg/ml）联合 TRAIL（10.0 ng/ml）；B：单用 5-FU（1.0 μg/ml）；C：单用 TRAIL（10.0 ng/ml）；D：对照组

图 1　FCM 检测细胞凋亡率

2.3　荧光显微镜结果

荧光显微镜下能同时观察 FITC 的绿色荧光信号和 PI 的橙红色荧光信号。选取高倍镜（×200）下任一视野，可见 TRAIL、5-FU 单独作用于 HEP-2 细胞株时，荧光显微镜下均可看到极少的发绿色荧光的细胞，TRAIL 联合 5-FU 作用于HEP-2 细胞株时，可见较多的绿色荧光细胞；红色荧光信号的细胞可见凋亡小体。见图 2。

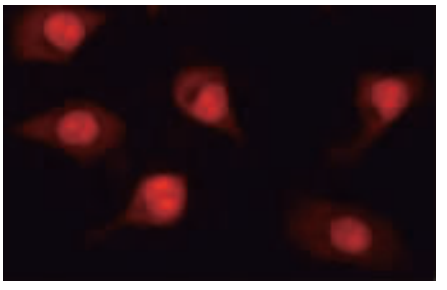
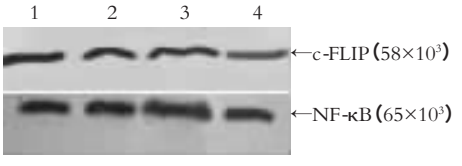


图 2　荧光显微镜观察联合用药后细胞核内可见凋亡小体　（S-P ×400）

2.4　Western blot 检测结果

结果显示，TRAIL 单独作用于 HEP-2 细胞株时不能降低 c-FLIP及 NF-κB 蛋白的表达，TRAIL、5-FU 单独作用时 c-FLIP 及 NF-κB 蛋白的表达水平高于其联合作用时 c-FLIP 及 NF-κB 蛋白的表达水平，且差异具有统计学意义。见图 3。



1：对照；2：TRAIL 组；3：5-FU 组；4：联合组

图 3　c-FLIP、NF-kB 蛋白的表达水平

3　讨论

TRAIL 是肿瘤坏死因子(TNF)超家族的成员之一,由 Wiley 等[1]于 1995 年从人 cDNA 文库中克隆获得。与其他 TNF 家族成员相比,TRAIL 抗肿瘤活性强,对正常细胞几乎无毒性,因此受到人们的广泛关注。就目前的研究来看 TRAIL 诱导凋亡主要有以下几个途径[3]:受体途径、转录因子途径、核受体途径、线粒体途径。

化疗是中晚期喉癌治疗的重要手段之一,由于大剂量的化疗药物对机体组织可造成了相当的副作用,如骨髓抑制、肝脏损害等,因此 TRAIL 联合低剂量化疗以提高抗癌效果显得尤为重要[4]。有文献报道 TRAIL 与多种抗肿瘤药物之间存在协同抑制肿瘤细胞增殖的作用[5]。Jin 等[6]研究显示,单独应用 TRAIL 或紫杉醇加卡铂化疗,只能部分延缓肺癌裸鼠皮下移植瘤的生长,但将它们联合应用则引起了肿瘤的消退及长时间的生长抑制。单用 TRAIL、单用化疗或两者合用对裸鼠肺原位移植瘤的抑制率分别为 60%、57% 和 97%。这与张明等[7]对 HEP-2 细胞株的体外研究的报道一致:他们采用 CCK-8 法检测细胞毒性显示不同浓度的 TRAIL(10.0 ~ 1 000.0 ng/ml)对 HEP-2 细胞株均有抑制作用,且在一定浓度内存在剂量依赖性;FCM 法提示 TRAIL 与 DDP 联合用药促 HEP-2 细胞株凋亡的作用优于单独用药。

本研究探讨了 TRAIL 与 5-FU 单独和联合作用,对 HEP-2 细胞株增殖、凋亡的影响。结果提示,TRAIL 与低毒性的 5-FU 联合作用,对 HEP-2 细胞的增殖抑制作用及诱导其凋亡的能力明显强于单用时的作用,可见 TRAIL 与低毒性的 5-FU 具有协同诱导 HEP-2 细胞株凋亡的能力[8]。

c-FLIP 是 1997 年 Scaffidi 等[9]在发现肿瘤细胞质中有一种类似于 v-FLIP 的蛋白,它可以抑制恶性黑色素瘤细胞的凋亡,是一个凋亡抑制蛋白,分为 FLIPS 和 FLIPL。FLIPL 结构上与 Caspase8 相似,又称为 Caspase8 抑制蛋白。NF-κB 是一种核转录因子,与它的抑制蛋白结合,以无活性的 NF-κB/IκB 复合体状态存在于细胞质之中;当 IκB 从复合体上解离并被分解后,可解除对 NF-κB 的抑制,结果 NF-κB 出由细胞质进入细胞核促使相关基因表达,从而调节凋亡的发生。研究[10]表明,NF-κB 的活化具有促进肿瘤的发生、发展、浸润和转移,因而通过抑制 NF-κB 的活性,从而抑制肿瘤的发生、发展将大有希望。杨迪生等[11]认为降低 c-FLIP 蛋白的表达可增强 TRAIL 诱导骨肉瘤 U20S 细胞凋亡的能力。Shetty 等[12]认为 TRAIL 介导的 NF-κB 通路通过放大凋亡信号促进细胞的死亡。根据本实验 Western blot 结果,可推测 TRAIL 联合 5-FU 诱导 HEP-2 细胞株凋亡的可能机制与 c-FLIP 和 NF-κB 蛋白的表达降低有关。

综上,可推测 TRAIL 联合低毒性的 5-FU 能高效诱导 HEP-2 细胞株的凋亡,可通过下调 NF-κB、c-FLIP 蛋白的表达来实现其诱导肿瘤细胞凋亡的作用,这为 TRAIL 用于肿瘤的临床治疗前景提供了一定的实验室依据。

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] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, *et al*. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155 - 162.

[3] 冯长根,周汉生. TRAIL 促肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 中国药学杂志,2006,41(8):561 - 564.

[4] Mizutani Y, Nakao M, Ogawa O, *et al*. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated apoptosis by cisplatin and carboplatin[J]. J Urol,2001,165 (1):263 - 270.

[5] Pan G, Ni J, Wei Y F, *et al*. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL[J]. Science, 1997, 277 (5327):815 - 818.

[6] Jin H, Yang R, Fong S,*et al*. Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand cooperates with chemotherapy to inhibit orthotopic lung tumor growth and improve survival[J]. Cancer Res, 2004,64(14):4900 - 4905.

[7] 张　明,周　梁,程　磊,等. TRAIL 与顺铂联合应用对喉鳞癌细胞 HEP-2 的体外作用[J]. 肿瘤,2007,27(7):535 - 537,541.

[8] 高　岭,董明敏,程秀莲. 丁酸钠对 Hep-2 细胞生长、凋亡及细胞周期的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007, 42(2): 318 - 322.

[9] Scaffidi C, Schmitz I, Krammer P H,*et al*. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 1999, 274(3): 1541 - 1548.

[10] Mann A P, Verma A, Sethi G,*et al*. Overexpression of tissue transglutaminase leads to constitutive activation of nuclear factor-kappaB in cancer cells: Delineation of a novel pathway[J]. Cancer Res,2006, 66(17):8788 - 8795.

[11] 杨迪生,苗旭东, 叶招明,等. TRAIL 增强低剂量阿霉素高效诱导人骨肉瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志,2005,27 (10): 595 - 597.

[12] Shetty S, Gladden J B, Henson E S, *et al*. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5(DR5) mediated by NF kappaB activation in epithelial derived cell lines[J]. Apoptosis,2002,7(5): 413 - 420.

(编辑　龙　亮)