基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1516-04

白黎芦醇联合 TRAIL 基因对胃癌 SGC-7901 细胞增殖与抑制作用的实验研究

王 川[1],吴 莹[1],姜 政[1],黄爱龙[2],王丕龙[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨白黎芦醇(Resveratrol,Res)联合肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand,TRAIL)在体外对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡作用及其机制,为将 Res 作为抗癌药物的临床应用提供理论和实验依据。方法:以人胃癌 SGC-7901 细胞株为研究对象,将 Res 与转染了 pBUD-TRAIL 质粒的胃癌 SGC-7901 细胞共同培养,以 MTT 法检测细胞增殖抑制率;以 FCM 检测细胞凋亡率;以 TUNEL 法检测细胞凋亡等,观察联合应用对肿瘤细胞的抑制作用。结果:MTT 和 FCM 检测结果显示:TRAIL 组肿瘤细胞抑制率为 54.28%,凋亡率 17.12%,Res 联合 TRAIL 组抑制率和凋亡率均明显提高,分别为 70%和 22.03%,与对照组相比,具有显著性差异;TUNEL 检测结果显示:TRAIL 与 Res 联合组与对照组相比较,细胞核明显棕黄色深染,且阳性染色细胞数目明显增多,表明 TRAIL 与 Res 联合作用凋亡细胞明显增加。结论:Res 联合 TRAIL 基因可显著抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的凋亡,说明 Res 可增强 TRAIL 促进肿瘤细胞凋亡,两者具有协同作用。

【关键词】白藜芦醇;肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体;增殖;凋亡

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-31

Experimental study on the effects and mechanism of resveratrol combined with TRAIL in inducing apoptosis and inhibiting proliferation of SGC-7901 cells

WANG Chuan, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of resveratrol (Res) combined with TRAIL on gastric cancer and understand its mechanism, in order to lay experimental and theoretical foundation for clinical application of Res tumortherapy. *Methods*: SGC-7901 cells transfected with pBUD-TRAIL were processed with a 1/2 IC_{50} concentration of Res. The inhibition of cell proliferation were examined by methyhhiazdyl tetrazolium (MTT) method, and cell apoptosis were detect by TUNEL method and flow cytometry using PI staining analysis. The findings in SGC-7901 cells transfected with pBUD and those in SGC-7901 cells transfected with pBUD-TRAIL were compared. *Results*: Compared with control group, the inhibition rate of the proliferation and apoptosis rate of SGC7901 cells in Res combined with TRAIL group were higher (70% vs 54.28%, 22.03% vs 17.12%, respectively) by MTT and FCM. Karyopycnosis, nuclear chromosomal condensation and segmentation were observed by TUNEL. Res could significantly induce the apoptosis of tumor combined with TRAIL. *Conclusion*: Res combined with TRAIL could inhibit the proliferation and induce apoptosis of SGC7901 cell, demonstrating that Res could intensify the effect of TRAIL in promoting tumor cell apoptosis and have a synergistic action with TRAIL.

【Key words】Resveratrol; TRAIL; Proliferation; Apoptosis

肿瘤不仅是细胞增殖与分化的异常,同时也存在调亡的异常。人们逐渐认识到肿瘤的生成是细胞增殖和凋亡平衡失调的结果,细胞周期失控导致细胞过度增殖,更重要的是细胞凋亡受阻,直接导致了衰老、受损及异常细胞的生命延长。因此,通过诱导肿瘤细胞凋亡来根除肿瘤不愧是一种新的治疗理念。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand,TRAIL)作为一种能选择性杀伤肿瘤细胞的促凋亡基因,将有望成为一种新型有效的抗癌基因应用于临床[1,2]。

TRAIL 蛋白具有膜结合型(即全长 TRAIL)和可溶型(sTRAIL)2 种形式,在体内仅有膜结合型存在。二者都能与细胞膜上的特异受体结合,通过胞内信号转导,迅速诱导表达 TRAIL 特异受体的细胞发生凋亡,这在我们前期的实验中得

作者介绍:王 川(1984-),男,硕士,研究方向:消化系统肿瘤方面。

通讯作者:姜 政,男,教授,E-mail:jiangz1753@163.com。

到证实[3,4]。而白黎芦醇(Resveratrol,Res)作为一种天然的抗肿瘤药物,已被证实具有肯定诱导肿瘤细胞凋亡的作用[5-10],因此本实验以探讨 Res 与 TRAIL 联合治疗胃癌为其目的,通过体外实验来探索 Res 与 TRAIL 是否具有协同作用及其可能的作用机制,以期为临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901 购于中科院上海细胞研究所;Res 购自西安冠宇生物有限公司,其纯度 99%,采用 DMSO 溶解配成 100 mmol/L 的原溶液,-20℃避光保存备用,实验前以 RPMI1640 培养液稀释成不同浓度,DMSO 终浓度 <0.2%;MTT、DMSO 购自 Sigma 公司;1640 培养液为 Gibco 产品;胎牛血清为杭州四季青公司产品;Roche 试剂盒为中杉公司产品。重组质粒 pBUD-TRAIL 由重庆医科大学李彦硕士提供(TRAIL 基因位于 *Xho* Ⅰ 和 *Bgl* Ⅱ 酶切位点之间)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及转染 sac-7901 胃癌肿瘤细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃孵箱,5%CO_2 饱和湿度条件下培养。细胞单层贴壁,每 2~3 d 传代 1 次,细胞传代时用 0.1% 的胰酶消化,800 r/min 离心 5 min,去除上清,加适量新鲜培养液,吹打混匀成细胞悬液后接种。实验时取对数生长期细胞,细胞存活率均 >98%。转染前 1 d,将细胞用无抗生素的含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养,置 37℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h,使细胞达 50%~80% 汇片时开始转染,质粒与脂质体以 1∶2 比例,同时按说明书要求用适当比率培养液稀释后再混和,轻轻混匀后室温孵育 20 min,使 DNA 与脂质体结合。吸掉细胞中培养液,并用无血清无抗生素培养液轻轻洗涤 3 次,将混和液轻轻加入培养板中,轻轻的前后晃动培养板使其均匀分布在细胞上,置37℃、5%CO_2 培养箱培养 5 h,换成含 10% 胎牛血清的培养基继续培养以检测相关指标,24 h 后在荧光显微镜下观察荧光的表达情况。

1.2.2 MTT 检测 Res 联合 TRAIL 基因对细胞增殖抑制率 收集对数生长期肿瘤细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/L,以 1×10^4 个/孔(每孔 100 μl)接种于 96 孔板中,调零组只加入等体积培养液。细胞生长占培养孔底 50%~80% 时进行转染(转染方法同前),并随机分为阴性对照组(转染空质粒),TRAIL 组(转染重组质粒 pBUD-TRAIL),TRAIL 基因与 Res 联合实验组(在转染 TRAIL 基因的基础上加入 1/2 IC_{50} 浓度的 Res)和调零组(加入等体积培养液),每组设 5 个平行孔。转染后培养 24 h,弃掉各孔培养基,TRAIL 基因与 Res 联合实验组加入 1/2 IC_{50} 浓度的 Res,阴性对照组,TRAIL 实验组和调零组分别加入等体积培养液。在 37℃,5%CO_2 条件下分别培养 24、48 h 和 72 h 后,加 5 g/L MTT 20 μl(调零组除外),继续培养 4 h 后小心吸去上清液,每孔加入 150 μl DMSO 溶解样品,震荡混匀。用酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 吸光度(A)值,取 5 孔 A 值的均数按公式计算细胞生长抑制率(IR):IR(%)=(1- 试验孔 A 均值/对照孔均值)×100%,比较 TRAIL 单独及联合用药前后对肿瘤细胞的抑制率的变化,以时间(T)为横坐标,细胞生长抑制率(IR)为纵坐标绘制细胞生长抑制曲线。推断 Res 与 TRAIL 是否有协同或拮抗作用。

1.2.3 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率 同方法 1.2.2 培养和分组转染细胞,转染后培养 24 h,弃掉各孔培养基,TRAIL 基因与 Res 联合实验组加入 1/2 IC_{50} 浓度的 Res,阴性对照组,TRAIL 实验组和调零组分别加入等体积培养液。继续作用 48 h 后,收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次,70% 冷乙醇固定过夜,PBS 离心洗涤 2 次,加入 10 μl RNA 酶(50 μg/ml),37℃温浴 30 min 后,PI 染液冰浴作用 30 min,用流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 收集对数生长期肿瘤细胞,接种于放有盖玻片的 24 孔板中(3×10^4 个/孔),转染后培养 24 h,加入 1/2 IC_{50} 浓度的 Res,继续培养 48 h 后吸弃培养液,37℃PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,加新鲜配制的 4% 多聚甲醛,室温固定 60 min。PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,再加 3% 过氧化氢 - 甲醇室温作用 10 min,PBS 洗 3 次,把培养孔板放在冰上,加 0.1% Triton X-100,冰浴 5 min,用 PBS 洗 3 次,加 TUNEL 反应液,DAB 显色,光镜观察结果并照相。

1.3 统计学分析

使用 SPSS12.0 统计软件对数据进行处理,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。细胞的生长抑制率采用方差分析;细胞凋亡率采用方差分析(*One-way ANOVA*),$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒 pBUD-TRAIL 转染细胞情况

胃癌 SGC-7901 细胞转染质粒 pBUD-TRAIL 后,在荧光显微镜下均可见到绿色荧光蛋白的表达,胃癌细胞贴壁,生长状态较好,可见少许细胞死亡,随着培养时间的延长,细胞内荧光逐渐增多增强,在 48 h 时达高峰(图 1)。

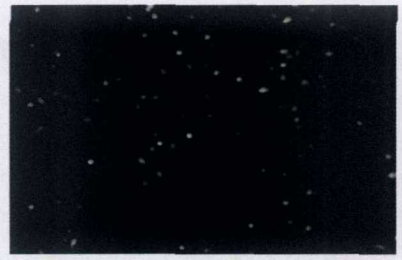


图 1 镜下观察 pBud-EGFP-TRAIL 转染 SGC-7901 细胞绿色荧光表达结果(×200)

2.2 MTT 检测 Res 联合 TRAIL 基因对细胞增殖抑制率

TRAIL 基因分别单独或联合 IC_{50} 浓度的 Res 共同处理胃癌 SGC-7901 细胞 24、48 h 和 72 h 后,MTT 法测定其对胃

癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用。结果显示:TRAIL 基因与 Res 联合作用后细胞生长抑制率明显增强,与其它实验组相比较,具有显著的差异。检测细胞生长抑制率并绘制出生长抑制曲线(图 2),曲线表明 Res 与 TRAIL 基因有协同增效作用。

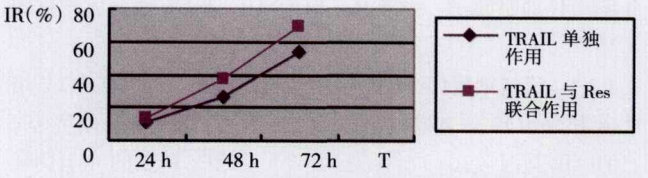


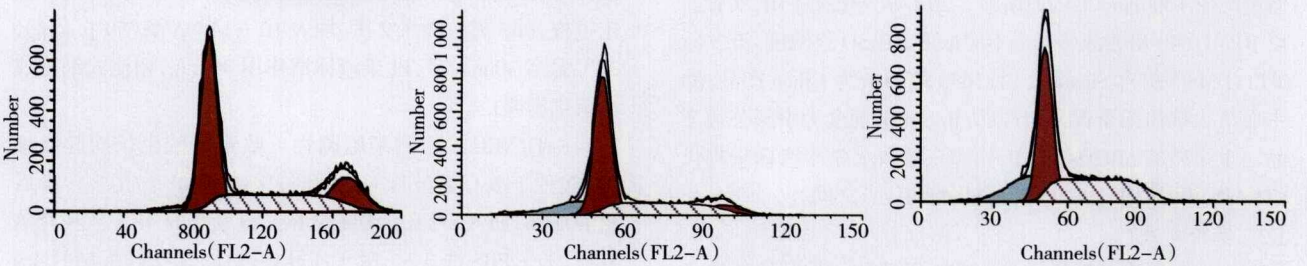
图 2　TRAIL 单独或联合 Res 对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用

2.3　流式细胞仪检测细胞凋亡率

作用 48 h 后,收集 TRAIL 与 Res 联合实验组,TRAIL 实验组和对照组(转染空质粒)细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果如图 3 所示,联合实验组与其它实验组相比较,细胞凋亡率明显增高,同时细胞周期阻滞在 S 期。

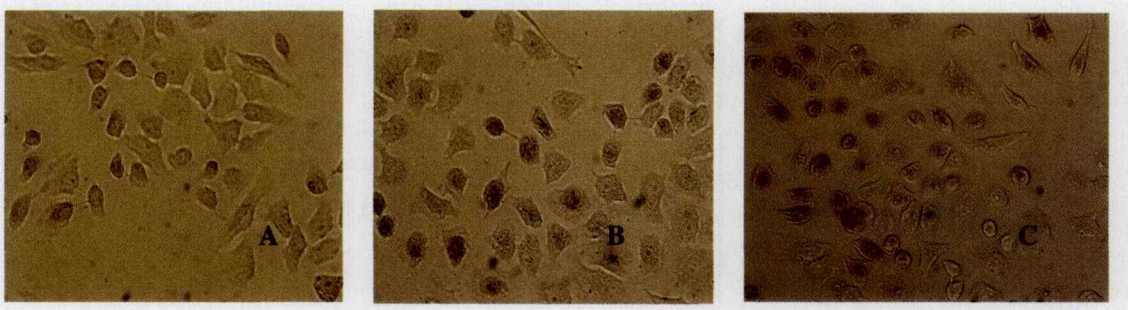
2.4　TUNEL 法检测细胞凋亡

经 TUNEL 检测结果显示:TRAIL 与 Res 联合实验组与 TRAIL 实验组 和对照组相比较,细胞核明显棕黄色深染,且阳性染色细胞数目明显增多, 表明 TRAIL 与 Res 联合作用,凋亡细胞明显增加(图 4)。



A. 对照组; B. TRAIL 基因组; C. TRAIL 基因与 Res 联合作用组

图 3　48 h 流式细胞仪检测 SGC-7901 细胞的凋亡



A. 对照组; B. TRAIL 基因组; C. TRAIL 基因联合 Res 实验组

图 4　TUNEL 检测 SGC-7901 细胞的结果(×200)

3　讨　论

TRAIL 是近年来发现的 TNF 超家族新成员,最主要的生物学特点为选择性细胞毒作用,即诱导肿瘤细胞、转化细胞或病毒感染细胞凋亡,而不能诱导正常细胞凋亡,从而在正常机体起免疫监视作用。但越来越多的肿瘤细胞系和肿瘤对重组可溶型 TRAIL 产生耐受性,推测可能与多种因素相关[11-14],而且 TRAIL 重组蛋白在动物体内容易被蛋白酶降解,半衰期较短;TRAIL 重组蛋白在体内抑制肿瘤所需的剂量较大,有可能产生免疫原性,因此单独应用 TRAIL,难以获得满意的临床效果。近来研究发现,化疗药物与放射治疗能够明显增强 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的作用[15-21],因此以 TRAIL 为基础的联合用药已经成为一种新的研究手段。

而 Res 对植物本身起保护作用,是植物在不利条件下,如紫外线照射、真菌感染、以及机械性损伤所产生的"植物补体"。随着研究的深入,人们逐渐发现 Res 具有抗肿瘤特性和抗氧化性、抗突变等作用,可显著抑制多种人类肿瘤细胞的生长、诱导肿瘤细胞凋亡的作用。我们前期实验结果也表明:Res 呈浓度、时间依赖性抑制肿瘤细胞的生长与增殖以及诱导肿瘤细胞的凋亡,不仅能抑制 Bcl-2 表达和诱导 Bax和 Fas 上调,而且还诱导 Caspase-3 mRNA 和蛋白表达并增强 caspase-3 的活性,其 IC_{50} 为 150 μmol/L,肿瘤细胞的抑制率和凋亡率分别为 43.05%和 14.64%[22]。鉴于此,本实验通过体外实验来探索 Res 与 TRAIL 联合应用是否具有协同作用及其机制,以期为临床应用提供理论依据。

本实验以胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象,观察 TRAIL 基因联用 Res 前后,对肿瘤细胞的抑制和凋亡诱导活性的变化,探讨新的胃癌治疗方案的可行性。研究结果表明,TRAIL 基因转染胃癌 SGC-7901 细胞可引起细胞抑制率达54.28%,同时可诱导 17.12%的细胞发生凋亡。与 Res 联合应用后,肿瘤细胞的抑制率和凋亡比率均明显提高分别为 70%和22.03%,

与 TRAIL 基因组和 Res 组[22]以及对照组相比，具有显著性差异，说明 Res 与 TRAIL 联合应用具有显著的协同作用，这与文献报道相一致，据 Fulda 和 Debatin 报道，联合应用 Res 和 TRAIL 后发现 Res 可以激活 Caspase-8、Caspase-9 和 Caspase-3，清除 Survivin 蛋白(1AP 超家族成员)，促进TRAIL 诱导凋亡，逆转肿瘤对 TRAIL 的耐药性[23]。

综上所述，Res 不仅单独应用对胃癌 SGC-7901 细胞有诱导凋亡的作用，而且与 TRAIL 联合应用可明显增强抗肿瘤活性，增强抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡，因此对胃癌的治疗具有潜在的应用前景。

参 考 文 献

[1] Wang Y, Huang F, Cai H, et al. Potent antitumor effect of TRAIL mediated by a novel adeno-associated viral vector targeting to telomerase activity for human hepatocellular carcinoma[J]. J Gene Med, 2008, 10(5): 518-526.

[2] Jacob D, Davis J J, Zhang L, et al. Suppression of pancreatic tumor growth in the liver by systemic administration of the TRAIL gene driven by the hTERT promoter[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(2): 109-115.

[3] 李 彦，向廷秀，姜 政，等.可溶性人 TRAIL 诱导胃癌细胞BCG-823 凋亡的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(11)：1066-1071.

[4] 李 彦，姜 政，向廷秀，等. sTRAIL 真核表达质粒对人胃癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(3)：198-202.

[5] Mousa S S, Mousa S S, Mousa S A. Effect of resveratrol on angiogenesis and platelet/fibrin- accelerated tumor growth in the chick chorioallantoic membrane model[J]. Nutr Cancer, 2005, 52(1): 59-65.

[6] Panzella L, De Lucia M, Amalfitano C, et al. Acid-promoted reaction of the stilbene antioxidant resveratrol with nitrite ions: mild phenolic oxidation at the 4'-hydroxystiryl sector triggering nitration, dimerization, and aldehyde-forming routes[J]. J Org Chem, 2006, 71(11): 4246-4254.

[7] Sengottuvelan M, Viswanathan P, Nalini N. Chemopreventive effect of trans-resveratrol-a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2006, 7(5): 1038-1046.

[8] Wang Y, Lee K W, Chan F L, et al. The Red Wine Polyphenol Resveratrol Displays Bilevel Inhibition on Aromatase in Breast Cancer Cells[J]. Toxicol Sci, 2006, 92(1): 71-77.

[9] Kim Y A, Lim S Y, Rhee S H, et al. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells[J]. Int J Mol Med, 2006, 17(6): 1069-1075.

[10] Choi J S, Choi B C, Kang K W. Effect of resveratrol on the pharmacokinetics of oral and intravenous nicardipine in rats: possible role of P-glycoprotein inhibition by resveratrol[J]. Pharmazie, 2009, 64(1): 49-52.

[11] Bucur O, Ray S, Bucur M C, et al. APO2 ligand/tum or necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in prostate cancer therapy[J]. Front Biosci, 2006, 11: 1549-1568.

[12] Lane D, Cote M, Grondin R, et al. Acquired resistance to TRAIL-induced apoptosis in human ovarian cancer cells is conferred by increased turnover of mature caspase-3[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(3): 509-521.

[13] Choi E, Kim Y, Kim K. The combination ofTRA IL treatment and cancer cell selective expression of TRA IL.death receptor DR4 induces cell death in TRAIL-resistant cancer cells[J]. Yonsei Med J, 2006, 47(1): 55-62.

[14] Tang X, Sun Y J, Half E, et al. Cyclooxygenase-2 over expression inhibits death receptor 5 expression and confers resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis inhuman colon cancer cells[J]. Cancer Res, 2002, 62 (17): 4903-4908.

[15] Kim Y H.Lee Y J.Time sequence of tumor necrosis factor Related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and cisplatin treatment is responsible for a complex paRem of synergistic cytotoxicity[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(5): 1284-1295.

[16] Mirandola P, Sponzilli I, Gobbi G, et al. Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand down-modulating IAP family proteins hat[J]. J Oncol, 2006, 28 (1): 127-133.

[17] Galligan L, Longley D B, M cEwan M, et al. Chemotherapy and TRAIL-mediated colon cancer cell death: the roles of p53, TRAIl receptors, and c-FLIR[J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4 (12): 2026-2036.

[18] Wendt J, yon Haefen C, Hemmati P, et al. TRAIL sensitizes for ionizing irradiation--induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway[J]. Oncogene, 2005, 24(25): 4052-4064.

[19] Marini P, Schmid A, Jendrossek V, et al. Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 5.

[20] Shankar S, Srivastava R K. Enhancement of therapeutic potential ofTRAIL by cancer chemotherapy and iradiation: mechanisms and clinical implications[J]. Drug Resist Unat, 2004, 7(2): 139-156.

[21] Cuello M, Ettenberg S A, Nau M M, et al. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2001, 81: 380-390.

[22] 吴 莹，姜 政，陶小红，等. 白藜芦醇对胃癌细胞系SGC-7901 细胞增殖和凋亡作用的研究[J]. 肿瘤，2009，29(6)：523-526.

[23] Fulda S, Debatin K M. Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratro1[J]. Cancer Res, 2004, 64 (1): 337-346.

(责任编辑：关蕴良)