基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0709-03

化疗药物联合 TRAIL 对鼻咽癌细胞株增殖抑制的实验研究

余晓燕,邓 碧,沈 娜,叶 琳,张潜英,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:探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis indncing ligmard,TRAIL)联合化疗药物顺铂(Cisplatin,DDP)、5 氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)作用于鼻咽癌 HNE-1 细胞株后对其细胞毒作用及凋亡影响的研究。方法:MTT 法检测其增殖抑制率,FCM 法检测细胞凋亡率。结果:TRAIL 与 DDP、5-FU 联合作用于 HNE-1 细胞株时,其抑制率、凋亡率高于单独作用时的抑制率和凋亡率。结论:TRAIL 与 5-FU、DDP 联合作用有协同抑制 HNE-1 细胞株增殖、诱导 HNE-1 细胞株凋亡的作用。

【关键词】TRAIL;DDP;5-FU;HNE-1 细胞株
【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-05

Effects of Trail combined with chenotherapeutics on proliferation and apoptosis of HNE-1 cell line

YU Xiao-yan, et al
(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To observe the effects of different concentrations of TRAIL and chemotherapeutic drugs(5-FU, DDP) on proliferation and apoptosis of HNE-1 cell lines ,both singlely and jointly. *Methods*:MTT was used to detect the inhibition rate. FCM was used to detect the apoptosis rate of cell. *Results*:The inhibition rate and apoptosis rate of combination use of TRAIL and 5-FU, DDP

作者介绍:余晓燕(1981-),女,硕士,
研究方向:头颈部肿瘤。
通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。
基金项目:重庆市卫生局资助(项目编号:07-1-021)。

ng/ml GM-CSF 刺激时,CCR2 mRNA 和蛋白含量表达最高。而不同时间刺激条件下,经过 36 h 刺激后,CCR2 mRNA 和蛋白表达趋于稳定,与对照组相比有明显升高。但是 GM-CSF 如何诱导 THP-1 细胞 CCR2 mRNA 和蛋白表达的机制尚不清楚。该作用在人体外周血单核细胞能否显现,尚需进一步实验加以证实。CCR2 受体的激活可能与以下几种途径有关:直接抑制腺苷酸环化酶活性,减少细胞内 cAMP 水平;活化磷脂酶 C 和蛋白激酶 C,引起胞质中 Ca^{2+} 水平升高;活化 JAK/STAT 途径等。详细的机制还需要进一步的研究。总之,利用细胞因子来促进血栓的溶解可能成为今后静脉血栓性疾病治疗的一个重要发展方向。

参 考 文 献

[1] Ali T, Humphries J, Burnand K, et al. Monocyte recruitment in venous thrombus resolution [J]. Vasc Surg, 2006, 43(3):601-608.
[2] McGuinness C L, Humphries J, Waltham M, et al. Recruitment of labelled monocyte by experimental venous thrombi[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(6):1018-1024.
[3] Humphries J, McGuinness C L, Smith A, et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) accelerates theorganization and resolution of venous thrombi[J]. Vasc. Surg, 1999, 30: 894 - 899.
[4] Lu D, Yuan X J, Evans R J J, et al. Cloning and functional characterization of the rabbit C-C chemokine receptor 2[J]. BMC Immunol, 2005, 6:15.
[5] Serbina N V, Pamer E G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine recepetor CCR2[J]. Nat Immunol, 2006, 7(3):311-317.
[6] Okuma T, Terasaki Y, Kaidita K, et al. C-C chemokine receptor2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenua tion of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases[J]. J Pathol, 2004, 204:594-604.
[7] Tsou C L, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4):902-909.
[8] Henke P K, Varga A, De S, et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(6):1130-1137.
[9] Phillips R J, Lutz M, Premack B, et al. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor 2 during monocyte maturation[J]. J Inflamm (Lond), 2005, 2:14.
[10] Henke P K, Pearce C G, Moaveni D M, et al. Targeted deletion of CCR2 imp airs deep vein thombosis resolution in a mouse model[J]. J Immunol, 2006, 177(5): 3388-3397.
[11] Charo I F, Taubman M B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease [J]. J Circ. Res, 2004, 95:858-866.

(责任编辑:冉明会)

were significantly increased, compared with those of single use of TRAIL. *Conclusion*: The inhibition of proliferation and apoptosis of HNE-1 cell line can be induced by TRAIL, and the effects were higher by TRAIL combined with 5-FU and DDP.

【Key words】TRAIL; DDP; 5-FU; HNE-1 cell line

近几年肿瘤生物治疗的热点之一是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡达到肿瘤治疗目的，此种疗法称肿瘤凋亡疗法，有关该疗法的重要进展之一是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)的发现，TRAIL 及其受体在诱导肿瘤细胞凋亡的同时能保护正常细胞免于细胞毒副反应[1]。研究发现[2]，化疗药物与 TRAII 联合应用可提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性，是一种有极大发展前景的抗肿瘤方案。本文旨在研究 TRAIL、顺铂(Cisplatin, DDP)、5-氟尿嘧啶(5-Fluorouracil, 5-FU)单独和联合应用对 HNE-1 细胞株增殖抑制、凋亡的影响。

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。DDP 购自德州德药有限公司，5-FU 购自南通精华制药公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞株(HNE-1)由重庆医科大学医学超声工程研究所惠赠。HNE-1 细胞在含有 10%小牛血清及青霉素、链霉素的 PRMI1640 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 μg/ml、10.0 μg/ml、100.0 μg/ml 的 DDP 最终浓度；1.0 μg/ml、10.0 μg/ml、100.0 μg/ml 的 5-FU 最终浓度；1.0 ng/ml、10.0 ng/ml、100.0n g/ml、1 000.0 ng/ml 的 TRAIL 最终浓度分别加入，设阴性对照和空白对照组，每个浓度设 4 个复孔，培养 24 h 后每孔加入 50 μlMTT 试剂培养 4 h，吸弃上清后每孔加入 100 μl 二甲亚砜振荡 10 min，酶标仪上 570 nm 波长检测各孔吸光度值(A)。各组细胞抑制率(%)=(1- 实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。

1.2.3 联合用药 选取低剂量的 TRAIL、5-FU、DDP 进行联合用药，终浓度分别为 TRAIL 10.0 ng/ml, 5-FU 1.0 μg/ml, DDP 1.0 μg/ml, TRAIL 10.0 ng/ml+5-FU 1.0 μg/ml, TRAIL 10.0 ng/ml+DDP 1.0 μg/ml(联用时为 2 种药物同时加入)，检测联合用药时对 HEN-1 细胞株的毒性作用。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)分析 培养细胞，单独及联合处理细胞终浓度同前。培养 24 h 后用不含EDTA 的胰酶消化收集细胞 5×10^5 个细胞，加入Annexin-V/PI 染料后充分混匀避光反应 0.5 h 后进行流式细胞仪检测，并按以下公式进行计算细胞凋亡率:凋亡率(%)={实验组凋亡率(%)- 对照组凋亡率(%)}/{1- 对照组凋亡率(%)}×100。

1.3 统计学处理

所有实验均重复 3 次，结果以均数 ± 标准差表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析，t 检验。

2 结 果

2.1 TRAIL 对 HNE-1 细胞生长的影响

MTT 检测细胞毒性结果提示，一定浓度的 TRAIL(10.0 ~ 1 000.0 ng/ml)对 HNE-1 细胞株均有抑制作用，且在此范围内存在剂量依赖性(各组间比较差异具统计学意义)。流式细胞仪检测凋亡率也证明 10.0 ~ 1 000.0 ng/ml 各组间凋亡率差异具统计学意义(见图 1、2)。

2.2 5-FU、DDP 对 HNE-1 细胞生长的影响

MTT 检测细胞毒性结果提示，5-FU、DDP 能杀伤 HNE-1 细胞，药物与细胞毒性间存在浓度依赖性细胞毒效应，随药物浓度的增高细胞毒性作用增强，流式细胞仪检测凋亡率结果也与之相符($P<0.05$；见图 1、2)。

2.3 低剂量的 TRAIL 与低剂量的 5-FU、DDP 联用对 HNE-

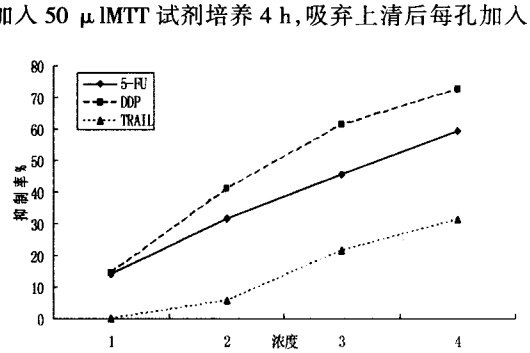


图 1 细胞毒性分析

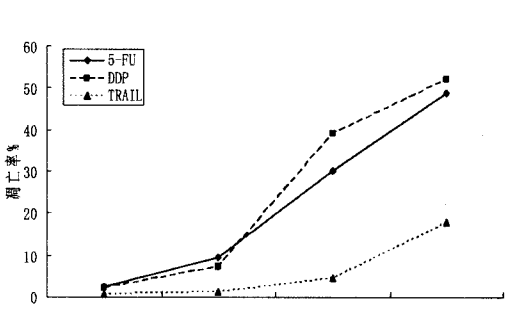


图 2 细胞凋亡分析

1 细胞株增殖与凋亡的分析

MTT 法检测抑制率:提示用 TRAIL(10.0 ng/ml)、5-FU(1.0 μg/ml)、DDP(1.0 μg/ml)单独处理 HNE-1 细胞株 HNE-1 细胞株时的抑制率分别为(21.48 ± 2.51)%、(14.17 ± 9.60)%、(14.62 ± 7.92)%,TRAIL100 ng/ml 分别联合 5-FU 1.0 μg/ml,DDP 1.0 μg/ml 作用于 HNE-1 后,MTT 法测定抑制率显示出对 HNE-1 的抑制率分别上升到(31.89 ± 5.61)%、(38.61 ± 7.56)%,明显比单独作用时对 HNE-1 的抑制率提高了($P<0.05$)。

FCM 检测细胞凋亡率:提示用 TRAIL(10.0 ng/ml)、5-FU(1.0 μg/ml)、DDP(1.0 μg/ml)单独处理HNE-1 细胞株,凋亡率依次为(0.66 ± 0.23)%、(2.43 ± 0.26)%、(2.19 ± 0.52)%;TRAIL100 ng /ml 分别联合 5-FU 1.0 μg/ml,DDP 1.0 μg/ml 作用于 HNE-1 后,HNE-1 细胞株的凋亡率明显提高到(14.70 ± 1.78)%、(14.72 ± 1.20)%,可见低剂量的 TRAIL 不能较好地诱导 HNE-1 细胞株的凋亡,联合用药后可大大提高 TRAIL 及化疗药物诱导 HNE-1 细胞株凋亡的能力($P<0.05$)。

3 讨 论

TRAIL 是新近发现的肿瘤坏死因子 TNF 家族成员,是 1995 年 Wiley 等[1]从人心肌 cDNA 文库中克隆出与细胞凋亡配具有较高同源性的 TNF 超家族成员,命名为 TNF 相关的凋亡配体(TRAIL),它能够选择性地诱导多种肿瘤细胞的凋亡,但对正常细胞无明显的杀伤作用。本实验发现,TRAIL 对 HNE-1 细胞株有杀灭作用,能诱导 HNE-1 细胞株的凋亡,且在一定浓度范围内存在剂量依赖关系。

实验研究报道[3,4]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。低剂量的TRAIL 与低剂量的 5-FU、DDP 联用可高效杀灭 HNE-1 细胞,这为 TRAIL 用于临床治疗提供了一定的参考。Jin 等[5]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。Nagane 等[6]研究证实顺铂和鬼臼乙叉甙等致 DNA 损伤的化疗药物与 TRAIL 联合应用具有协同作用,可以快速诱导细胞凋亡。施敏骅[7]等对非小细胞肺癌的研究发现 TRAIL 可以有效诱导非小细胞肺癌的体外凋亡,其效果与作用浓度呈正相关;TRAIL 和常用抗肿瘤药物有协同促进肿瘤细胞凋亡的作用。徐玉生[8]等对横纹肌肉瘤的研究发现 TRAIL 和顺铂均能有效诱导横纹肌肉瘤细胞凋亡,联合应用具有明显的协同效果。周惠明[9]等对肝癌细胞的研究发现 TRAIL 联合亚毒性剂量化疗药物与单独使用 TRAIL 和单独使用化疗药物相比,对细胞的杀伤率和凋亡率均显著增加($P<0.01$)。

研究显示 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的机制主要以受体途径介导细胞凋亡和转录因子途径介导细胞凋亡为主要手段。Nagane 等[10]研究证实顺铂和鬼臼乙叉甙等致 DNA 损伤的化疗药物,可上调绝大多数胶质瘤细胞株的 DR5 水平,TRAIL 与这些化疗药物联合应用具有协同作用,可以快速诱导细胞凋亡。Shetty[11]等也认为 TRAIL 介导的 NF-κB 通路上调 DR5 的表达,通过放大凋亡信号促进细胞的死亡。本实验将进一步研究 TRAIL 与 5-FU、DDP 联用高效诱导 HNE-1 细胞株的凋亡的可能机制。

综上,TRAIL 与低剂量的 5-FU、DDP 联用,增强了 HNE-1 细胞对 TRAIL 的敏感性,可以高效诱导 HNE-1 细胞株的凋亡,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] Voelkel-Johnson C, King D L, Norris J S, et al. Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL/Apo2L)can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(2):164-172.

[3] 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.

[4] 余晓燕,叶 琳,沈 娜,等.抗肿瘤药物与 TRAIL 联用对喉癌 HEP-2 细胞株增殖、凋亡的影响[J].重庆医学,2008,37(20):2268-2269.

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

[6] Nagane M, Pan G, Emergy J, et al.Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo [J].Cancer Res, 2000, 60(4):847-853

[7] 施敏骅,余 勇,钱 斌,等.TRAIL 联合抗肿瘤药物协同诱导非小细胞肺癌凋亡的研究[J]. 苏州大学学报,2006,26(2):190-192.

[8] 徐玉生,杨迪生.TRAIL 蛋白与顺铂协同诱导横纹肌肉瘤凋亡的实验研究[J]. 实用肿瘤杂志,2006,21(2):121-124.

[9] 周惠明,陈 智,陈公英,等.TRAIL 联合化疗药物诱导肝细胞凋亡的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志,2003,25(2):152-153.

[10] Nagane M, Pan G, Emergy J, et al.Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo [J].Cancer Res, 2000, 60(4):847-853.

[11] Shetty S, Gladden J B, Henson E S, et al.Tumor necrosis factorrelated apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receppror 5 (DR5) mediated by NF-κB activation in derived cell lines[J]. Apoptosis, 2002, 7(5):413-420.

(责任编辑:冉明会)