维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0951-03

TRAIL 联合化疗药物诱导喉癌 HEP-2 细胞株凋亡的研究

余晓燕,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(Tumor necrosis factor related apoptosis-inducingligand,TRAIL)与化疗药物氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂(DDP)联合使用诱导喉癌 HEP-2 细胞株凋亡。方法:不同浓度的 TRAIL、5-FU、DDP 单独及 TRAIL 与 5-FU、DDP 联合处理 HEP-2 细胞,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测其细胞毒作用,荧光显微镜下观察并计算凋亡率,流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率。结果:HEP-2 细胞对低毒性的 TRAIL 不敏感,对化疗药物相对敏感,TRAIL 与低毒性的化疗药物联合作用于细胞后可增强杀伤效应。结论:TRAIL 与低毒性的 5-Fu、DDP 联用表现出高效的杀灭肿瘤细胞作用。

【关键词】TRAIL;化疗;HEP-2 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】2007-12-19

Synergistic induction of apoptosis of HEP-2 cell line by the combination of TRAIL and 5-FU,DDP

YU Xiao-yan,et al

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

【Abstract】*Objective*:To investigate whether TRAIL can synergize 5-Fu and DDP to kill HEP-2 cell line. *Methods*:MTT was used to detecet the cytotoxicity of HEP-2 cell line intervented in 5-FU,DDP,TRAIL,5-FU+TRAIL and DDP+TRAIL. Fluorescence microscope and FCM were used to detecet the apoptosis rate of cell. *Results*:HEP-2 cell line was insensitive in TRAIL,but the apoptosis rate obviously was upgraded after intervented in 5-FU+TRAIL and DDP+TRAIL. *Conclusion*:TRAIL in combination with subtoxic dose of 5-FU and DDP can effectively kill HEP-2 cell line. The combination of TRAIL,5-FU and DDP induced apoptosis of HEP-2 cell line.

【Key words】 TRAIL;Chemotherapy;HEP-2 cell line

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 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,然而大剂量的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。最近研究[2]发现,使用一些低剂量的化疗药物能够显著增加 TRAIL 的效果,因此,联合用药治疗肿瘤成为较热门的研究方向。5-FU 和 DDP 是临床常用于治疗喉癌的化疗药物,本研究旨在探讨 TRAIL 与亚毒性剂量化疗药物协同诱导 HEP-2 细胞凋亡,为 TRAIL 的临床应用提供客观的实验依据。

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,副教授,E-mail:www.yanbbww128@163.com。

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 人喉癌表皮细胞株(HEP-2)购于南京凯基生物制品公司。HEP-2 细胞在含有 10%小牛血清及青霉素、链霉素的 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,4~6h 细胞贴壁后按照 1.0、10.0、100.0 μg/ml 的 5-FU 浓度;1.0、5.0、10.0 μg/ml 的顺铂浓度和 1.0、10.0、100.0、1 000.0ng/ml 的 TRAIL 浓度分别加入,设阴性对照和空白对照组,每个浓度设 7 个复孔,培养 24h 后每孔加入

维普资讯 http://www.cqvip.com

50μl MTT 试剂培养 4h，小心吸弃上清后每孔加入 100μl 二甲亚砜振荡 10min，酶标仪上 570nm 波长检测各孔吸光度值(A)。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及计算凋亡率 玻片置于 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-FU10.0μg/ml，DDP 1.0μg/ml，TRAIL 100.0 ng/ml，5-FU 10.0μg/ml+TRAIL 100.0ng/ml，DDP 1.0μg/ml +TRAIL 100.0ng/ml 以及阴性对照，用 PBS 洗涤 2 次，将爬有细胞的玻片置于载玻片后均匀加 AnneXin-V/PI 染料，避光室温反应 5min，于荧光显微镜下、双色滤光片观察、记数。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)分析 培养细胞，药物处理同荧光显微镜法，作用 24h 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 0.5h 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($\bar{x}\pm s$)表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析，t 检验。

2 结 果

2.1 MTT 细胞毒性分析结果

HEP-2 细胞株对 TRAIL 不敏感，表现为较低浓度之间的细胞毒作用差异不显著($P>0.05$)，HEP-2 细胞株对化疗药物较敏感，表现为较低浓度的化疗药物具较强的细胞毒作用，单用低浓度的化疗药仅有有限的细胞凋亡，加入低浓度 TRAIL(100.0ng/ml)后其细胞毒作用明显增强(见表 1)。

从表可以看出低浓度 5-FU(10.0μg/ml)、DDP(1.0μg/ml)细胞抑制率为(14.200±0.030)%、(29.000±0.080)%，与 TRAIL(100ng/ml)联合作用后细胞毒性增强为(57.500±0.075)%、(70.000±0.122)%，提示 TRAIL 与低浓度的化疗药物有协同杀伤 HEP-2 细胞株的作用。

表 1 MTT 法检测细胞毒性分析

	A 值	抑制率(%)
5-FU(μg/ml)		
1.0	0.588±0.048	10.090±0.053
10.0	0.557±0.042	14.200±0.030
100.0	0.342±0.043	43.300±0.030
DDP(μg/ml)		
1.0	0.459±0.031	29.000±0.080
5.0	0.345 ±0.043	46.700±0.080
10.0	0.142 ±0.043	78.000±0.065
TRAIL(ng/m)		
1.0	0.635±0.082	4.3500±0.110
10.0	0.619±0.073	5.2800±0.079
100.0	0.572±0.059	10.280±0.113
1000.0	0.520±0.023	19.000±0.123
5FU 1.0(μg/ml)+ TRAIL 100.0(ng/ml)		
	0. 510 ± 0.077	57.500±0.075
DDP 1.0(μg/ml)+ TRAIL 100.0(ng/ml)		
	0.341±0.065	70.000±0.122

2.2 荧光显微镜观察、记数

Annexin-V/PI 双染后荧光显微镜下观察，AnnexinV-FITC 荧光信号呈绿色(图 2)提示早期凋亡；PI 荧光信号呈红色(图 1)提示晚期凋亡。普通背景下以一个高倍镜(×200)视野下细胞计数，荧光背景下观察凋亡细胞并计数，计算各处理组细胞凋亡率，选取三个视野计算凋亡率后取平均值。5-FU 与 TRAIL、DDP 与 TRAIL 联合作用后凋亡率分别为(65.200 ±0.076)%、(81.400 ±0.082)%明显高于 5-FU、DDP 单独作用诱导的细胞凋亡率(16.800±0.112)%、(35.200±0.056)%($P<0.05$)。



图 1 细胞核红染

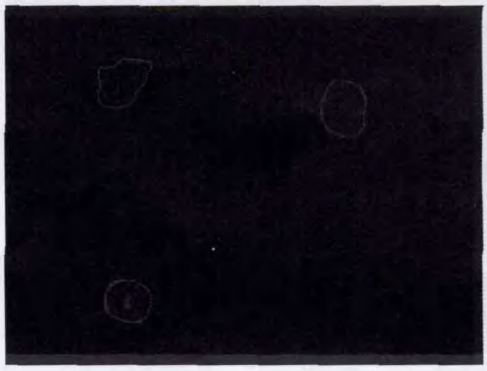


图 2 细胞膜绿染

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 流式细胞仪(FCM)检测结果

5-FU、DDP、TRAIL 单独作用及 5-FU+TRAIL、DDP+TRAIL 联合作用时凋亡率分别为(8.900 ± 0.076)%、(25.400 ± 0.102)%、(3.600 ± 0.042)%、(49.300 ± 0.11)%、(64.700 ± 0.083)%,可以看出联合作用时凋亡率明显提高($P<0.05$)。

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 年根据其胞外区域与 CD95L 和 TNF 的同源性从人 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]:①受体途径。目前已发现了两类 TRAIL 受体,一类为功能型受体,如 TRAILR1 和 TRAILR2,因含有死亡结构域(Death domain,DD)而分别被称为死亡受体 4(Death receptor 4,DR4)和死亡受体 5(Death receptor 5,DR5)。另一类为无功能型受体,如 TRAIL R3 又称诱捕受体 1(Decoy receptorl,DcR1),TRAIL R4 又称诱捕受体 2(Decoy receptor2,DcR2)。TRAIL 通过与细胞膜上的相应受体结合形成寡聚体[4],这种寡聚体可使胞浆内的死亡功能区彼此靠近、聚集,进而诱使胞浆内的胱冬肽酶(Caspase)级联式反应发生诱导凋亡。②转录因子途径。最重要的就是 NF-κB 和 PPAR-7。NF-κB 是一种 DNA 结合蛋白,在正常情况下,NF-κB 以无活性的 NF-κB/IκB 复合体状态存在于胞浆之中,当 IκB 从复合体上解离并被分解后,可解除对 NF-κB 的抑制,从而调节凋亡的发生。PPAR-7 也是一种 DNA 结合蛋白,PPAR-7 能够识别靶基因上启动子区域的特定 DNA 序列并与之结合。当它与配体结合后,可以引起构象改变,从而激活靶基因。③核受体途径。可能是 TRAIL 与相应的受体结合后,通过一系列信号传导激活转录因子 NF-κB 和 PPAR-7 等,后者作用于相应的靶基因,从而转录合成与调节凋亡有关的蛋白质。④线粒体与细胞凋亡。线粒体是真核细胞的重要细胞器,是动物细胞生成 ATP 的主要地点。线粒体跨膜电位的耗散与细胞凋亡有密切关系,一旦线粒体跨膜电位耗散,细胞就会进入不可逆的凋亡过程。

肿瘤的凋亡疗法,是近几年肿瘤治疗研究的热点之一。该方法通过诱导肿瘤细胞发生凋亡而达到肿瘤治疗目的,有关该疗法的重要进展之一就是 TRAIL 的发现。单独应用 TRAIL 并不能对所有的肿瘤细胞产生毒性作用,然而 TRAIL 与亚毒性的化疗药物联合作用后可增强其杀伤肿瘤细胞的效应。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[5,6]。

喉癌是耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤,大部分属于鳞癌,早期喉癌主要以放疗为主,晚期喉癌以手术加化疗为主,严重降低了患者的生活质量。目前有学者报道喉癌患者采用放疗同时结合化疗,或放疗之前加用化疗药物能大大降低其复发率。美国约翰·霍普金斯医院西德尼金米尔综合癌症中心的弗拉斯蒂尔认为用顺铂加氟尿嘧啶诱导化疗后再放疗是目前局部晚期喉癌病人喉全切手术标准的替代疗法。

本文主要研究了 TRAIL 与低毒性的 DDP、5-FU 能否协调诱导喉癌 HEP-2 细胞凋亡。研究证实喉癌 HEP-2 细胞株对低浓度的 TRAIL 不敏感,低毒性的化疗药物可增强 HEP-2 细胞对 TRAIL 的敏感性,且 TRAIL 也可增强化疗药物对 HEP-2 细胞的杀灭作用,呈现出低浓度的 TRAIL 与低毒性的化疗药物协同高效杀灭肿瘤细胞现象。

肿瘤细胞对 TRAIL 不敏感的原因尚未被人们完全认识,认为可能与以下因素有关:细胞表面存在诱捕型受体,该受体与凋亡型受体竞争性结合 TRAIL,却并不诱导凋亡[7];细胞内存在凋亡抑制性蛋白,可以高效阻断凋亡链延续[8]。TRAIL 与化疗药物的协同性杀伤作用主要是通过诱导细胞凋亡实现的,这种诱导细胞凋亡的协同效果可能是由于凋亡链中的正反馈而表现为凋亡的级联放大。有证据表明 TRAIL 与化疗药联用可以促进受试细胞本身大量表达 TRAIL 及其相关受体[9],亦可能为亚毒性剂量化疗药物即可高效阻断凋亡抑制性蛋白或 TRAIL 诱捕型受体的生成,肿瘤细胞自身凋亡与增殖的平衡被破坏,增殖被抑制,以致 TRAIL 诱导凋亡显得容易而高效。此外,一些化疗药物可以高效激活凋亡链中的 caspase8 酶而起到促进其它药物的凋亡诱导效果[10],5-Fu、DDP 可能存在这方面的功能。

总之,本研究结果提示 TRAIL 有良好临床应用

(下转第 958 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

使内膜腺体增生,分泌旺盛,内膜血管增长,内膜间质分裂活跃,内膜增厚,利于小鼠子宫内膜在 4～5d 的处于接受态,为胚胎着床做好准备。着床后(6d 以后)间质的 Cyclin-E 表达减弱,而腔上皮和腺上皮表达仍维持较高水平,腺体进一步增生,分泌更加旺盛,血液供应更为丰富,间质细胞肥大,胞质含有丰富的糖原颗粒,成为蜕膜细胞,利于胚胎和胎盘的发育。为进一步探讨 Cyclin-E 在胚胎着床过程中的作用,我们应用子宫角注射抗 Cyclin-E 抗体的方法进行功能分析。结果显示,注射生理盐水对小鼠胚泡着床过程无影响;而注射抗 Cyclin-E 抗体后对妊娠小鼠胚泡着床具有明显的抑制作用,随着注射抗体浓度的降低,其抑制作用逐渐减弱,但不能完全抑制着床,表明 Cyclin-E 在胚胎着床过程中起着重要调控因子的作用,但并不是唯一的决定因素。

Cyclin-E 在着床过程中的作用机制尚未完全明了,需要对其更进一步的研究。但对于 Cyclin-E 在胚泡着床中作用的研究在为原发或继发性不孕女性患者的诊断治疗、提高辅助生育的成功率以及开发新的生育调控手段都有着重要意义。

参 考 文 献

[1] 龚建平,陈义发,舒 丹,等.人类主要 Cyclins 在 M0LT-4 细胞阻断动力学下的表达规律[J]. 细胞生物学杂志,2000;22(2):79-83.

[2] 韦 毓,庞 朗,冯秀英.PTEN 和 Cyclin-E 蛋白在子宫内膜癌组织中的表达[J]. 中国肿瘤临床与康复,2005;12(4):293-296.

[3] Reese J,Das SK,Paria BC,et al. Global gene expression analysis of identify molecular markers of uterine receptivity and embryo implantation[J]. Biol Chem,2001;276(47):44137-44145.

[4] Ohtsubo M,Theodoras AM,Schumacher J,et al. Human cyclin E,a nuclearprotein essential for the Gl-to-S phase transition[J]. Mol Cell Bio,1995;15(5):2612-2624.

[5] Musgroye EA.Cyclins:roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation[J]. Growth Factors,2006;24(1):13-19.

[6] Kim YT,Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma[J]. Yonsei Med J,2005;46(5):597-613.

[7] Barton MC,Akli S,Keyomarsi K. Deregulation of cyclin E meets dysfunction in p53:closing the escape hatch on breast cancer[J]. Cell Physiol,2006;209(3):686-694.

[8] Correiada Silva G,Bell SC,Pringle JH. Patterns of uterine cellular Proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy[J]. Placenta,2004;25(6):538-547.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 953 页)

前景。虽然 HEP-2 细胞对其不敏感,但其联合低浓度化疗药物能高效杀灭 HEP-2 细胞,所以此方法既可克服肿瘤细胞耐药,还能有效地减轻因大剂量使用化疗药物而引起的全身毒副作用,可谓一举两得。本研究提出 TRAIL 与化疗药物的协同作用主要通过诱导细胞凋亡实现,目前工作的关键在于寻找到二者协同诱导肿瘤凋亡的机制,这对于化疗药物的正确选择将有一定的指导作用,也为临床用药提供一定的实验室依据。

参 考 文 献

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

[2] Nagane M,Huang HJ. The potential of TRAIL for cancer chemotherapy[J]. Apoptosis,2001;6(2):191-197.

[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] Ashkenaziz,Dixitim.Death recoptora:signaling and modulation[J]. Science,1998;281(5381):1305-1308.

[5] Matsuzaki H,Bruno MS,Alexis U,et al. Combination of tumor neerosis factor-related apoptosis-inducing Ligand(TRAIL)and actinomycin D induces apoptosis even in TRAIL resistant human pancreatic cancer cells[J]. Clin Cancer Res,2001;7(3):407-414.

[6] Mizutani Y,Nakao M,Ogawa O,et al. Enhanced sensitivity of bladder cancer cells to TRAIL mediated apoptosis by DDP and carboplatin[J]. Urol,2001;165(8):263-270.

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

[8] Kim Y,Suh N,Sporn M,et al. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis[J]. Biol Chem,2002;277(25):223-227.

[9] Lacour S,Hammann A,Wotawa A,et al.Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosls-inducing ligand.mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. Cancer Res,2001;61(4):1645-1647.

[10] Xiang H,Fox JA,Totpal K,et al.Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT11 CO-treatment is associated with p21 cleavage and differential regulation of Apo2L/TRAIL ligand and its receptors[J]. Oncogene,2002;21(22):36115-36117.

(责任编辑:关蕴良)