维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0604-04

多西紫杉醇联合 TRAIL 诱导人胃癌细胞 SGC7901 的凋亡观察

苏艳新,王 立

(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨多西紫杉醇联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(Tumor Necrosis Factor-related poptosis-inducing ligand, TRAIL)体外诱导胃癌细胞凋亡的作用及可能机制。方法:采用 MTT 法检测不同浓度(1、5、10、20、40 μg/ml),不同时间(12、24、36、48h)下多西紫杉醇的抗癌活性并计算其亚毒性剂量。用流式细胞仪检测多西紫杉醇(亚毒性剂量)及 TRAIL(200ng/ml)单独及联合应用后 SGC7901 的凋亡率。RT-PCR 法检测 DR4,DR5 在加药前后的表达。结果:对照组(C 组)、亚毒性剂量的多西紫杉醇(P 组)、TRAIL(T 组)及二者联合(T+P)作用 24h 后胃癌细胞的凋亡率分别为 2.09%、10.65%、7.79%和 24.51%,T+P 组凋亡率明显升高,与 C 组、T 组、P 组两两比较时,差异具有统计学意义($P<0.05$)。多西紫杉醇处理组 DR5 表达增加。结论:多西紫杉醇与 TRAIL 具有协同抗胃癌作用,其机制可能与 DR5 表达的上调有关。

【关键词】多西紫杉醇;TRAIL;胃癌

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-14

Experimental study on treatment of human gastric cancer cell line SGC7901 with combination of TRAIL and paclitaxe

SU Yan-xin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and potential mechanism of combined paclitaxe and tumor necrosis factor-related poptosis-inducing ligand(TRAIL) on apoptosis of human gastric cancer cell in vitro. *Methods*: SGC7901 cells were cultured with paclitaxe at different concentrations(1,5,10,20,40 μg/ml) and different time(12,24,36,48h).Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to measure the anticancer activity of paclitaxe. The ability of TRAIL alone、paclitaxe alone and TRAIL in combination with paclitaxe to induce apoptosis was measured by a flow cytometer.Expression of DR4,DR5 mRNA was examined by RT-PCR. *Results*: The apoptosis rate of control group(C group), paclitaxe group(P group), TRAIL group(T group) and combination group(T+P)in 24h were 2.09%, 10.65%, 7.79% and 24.51% respectively. T+P group was significantly higher than that in C group, T group and P group($P<0.05$).Before exposure to paclitaxe, expression of DR5 mRNA was low and an increased expression of DR5 was found in SGC7901 cells after treatment with Paclitaxe. *Conclusion*: Paclitaxe can enhance the effect of TRAIL in anticancer therapy and its mechanisms might be involved in the up-regulation of DR5 gene.

【Key words】 Paclitaxe; TRAIL;Gastric cancer

TRAIL 是新近发现的一类能选择性地诱导肿瘤细胞或转化细胞发生凋亡的配体,因其能从线粒体途径和细胞表面受体途径触发多种肿瘤细胞发生快速、高效的凋亡反应,而对正常细胞无明显毒性[1],成为近年来人们研究抗肿瘤治疗的热点。然而越来越多的研究证实并不是所有的肿瘤细胞都对 TRAIL 敏感,特别是那些高度恶性的肿瘤细胞,因而如何增强 TRAIL 对肿瘤细胞的敏感性成为当今重要的研究课题。有研究表明,某些化疗药物能够在一定程度上克服肿瘤细胞对 TRAIL 的耐受[2-3],且这种耐受的打破与死亡受体表达的改变密切相关,为此,我们将多西紫杉醇与 TRAIL 联合及单独作用于人胃癌细胞株 SGC7901,以观察其是否具有协同作用,并通过检测胃癌细胞死亡受体的表达情况来探讨其可能性机制。

作者介绍:苏艳新(1980-),男,硕士,
研究方向:消化系统肿瘤的治疗。

通讯作者:王 立,女,教授,E-mail:wangli380@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 试验材料

1.1.1 细胞系 人胃癌细胞 SGC7901 由重庆医科大学病理生理教研室馈赠。

1.1.2 试验试剂及器材 多西紫杉醇(多帕菲)购自山东齐鲁制药;人重组可溶性 TRAIL(PeproTech)购自晶美生物工程有限公司;RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;新生牛血清购自杭州四季青公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;二甲基亚砜购自美国 Sigma 公司。Annexin V-FITC 试剂盒为南京凯基生物工程有限公司产品;自动酶标仪型号为美国的 Bio-Tek Elx800;流式细胞仪为美国 FACS Calibur BD;RT-PCR 试剂盒为日本 TaKaRa 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 胃癌细胞 SGC7901 培养于含 10%小牛血清、100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中,培养条件为 37℃、5%CO_2、饱和湿度、每隔 2~3d 用 0.25%胰酶消化传代 1 次。

1.2.2 MTT 法检测多西紫杉醇的抗癌活性并计算多西紫杉醇的 IC_{10} 取对数生长期的 SGC7901 细胞,调整细胞浓度为 5×10^4 个/ml,接种于 96 孔板,每孔 100μl(约 5 000 个细胞),用 37℃、5% CO_2 孵箱孵育过夜,待细胞贴壁后,分别加入终浓度 0、1、5、10、20、40μg/ml 的多西紫杉醇(并使各孔终体积为 200μl)。以上每组各设 6 个复孔,置于培养箱中分别培养 12、24、36、48h。试验终止前 4h,每孔加入 MTT 液 20μl(5mg/ml),继续培养 4h 后去除每孔溶液,加入 DMSO150μl/孔,振荡 10min 后用自动酶标仪在 570nm 波长处测定每孔的 A 值。以多西紫杉醇浓度的对数为因变量,细胞抑制率与存活率之比的对数为应变量,作出一回归方程 Y=bX+a。利用该方程求出 IC_{10}(即抑制率为 10%时的药物浓度)作为亚毒性剂量,进行下一步试验。

1.2.3 Annexin V-FITC 法检测多西紫杉醇及 TRAIL 单独及联合应用后 SGC7901 的凋亡率 取对数生长期的人 SGC7901 胃癌细胞 4 瓶,每瓶细胞数目 $>10^6$ 个。去培养液,PBS 洗涤后分别加正常培养液(C 组),含有多西紫杉醇(P 组)、TRAIL(T 组)及二者联合加药后的培养液(T+P),多西紫杉醇浓度为 MTT 结果求得的 IC_{10},TRAIL 浓度依据参考文献[9]选用 200ng/ml,联合用药浓度同上述单药浓度。培养 24h 后,吸出各瓶内培养液,0.25%胰酶消化细胞,终止消化,离心收集去上清,PBS 洗涤后收集细胞,加少量 PBS 悬浮细胞后送流式检测。

1.2.4 RT-PCR 方法检测胃癌细胞 DR4、DR5 的表达 取对数生长期的人 SGC7901 胃癌细胞 4 瓶,待细胞贴壁达到 80%时,倒去原培养液,分别加新鲜的(C 组)、含 200ng/ml TRAIL(T 组)、含 5μg/ml 多西紫杉醇(P 组)及二者都有(T+P)的培养液,培养 24h 后收集细胞。细胞总 RNA 提取按照 RNAroseReagent 总 RNA 快速抽提试剂说明书进行。DR4、DR5 及 H-GDPDH 引物序列由重庆升博公司设计并合成,序列见表 1 所示,扩增片段长度分别为 430bp、500bp、149bp。RT-PCR 反应采用二步法。逆转录反应:取总 RNA 4μl、20pmol/μl Oligo (dT)1μl,70℃反应 10min 后冰上冷却 10min。然后冰上依次加样:dNTP 混合物(dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10mmol/l)4μl、10×RT buffer 2μl、RNA 酶抑制剂(50U/μl)0.5μl、RT007 AMV 逆转录酶(10U/μl)0.5μl、RNase free water 8μl,总体反应体积 20μl,42℃反应 60min,99℃反应 5min,所得 cDNA 作 PCR。PCR 体系为:cDNA4μl,10×PCR buffer 5μl、dNTP 混合物 (dATP、dUTP、dCTP、dGTP 各 10mmol/l)2μl,目的基因引物(上游引物,下游引物浓度各为 20pmol/μl)共 1.5μl、H-GDPDH 引物(上游引物,下游引物浓度各为 20pmol/μl) 共为 1.5μl、Taq 酶(5U/μl)0.5μl、ddH_2O 35.5μl,总反应体积 50μl。DR4 及 H-GDPDH 循环条件为: ①94℃ 2min; ②94℃ 30s,59℃30s,72℃ 1min,36 个循环;③72℃ 10min。DR5 及 H-GDPDH 循环条件为:① 94℃ 2min;②94℃ 30s,55℃30s,72℃ 1min,36 个循环;③72℃ 10min。产物各取 10μl 加 2μl 6×loading buffer 经 2%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,片段大小与 Marker 比较确认特异性产物。最后在凝胶成像仪上照像并进行密度扫描分析,DR4、DR5 受体相对表达强度用以下公式进行计算:目的基因相对表达强度=(目的基因灰度值-空白区域灰度值)/(H-GDPDH 灰度值-空白区域灰度值),各灰度值取随机取 10 次的均值。

1.2.5 统计学处理 数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用配对 t 检验和 F 检验进行分析。

2 结 果

表 1 各基因引物序列

引物名称		序列	产物长度
DR4	上游引物	5'-CCCACTGAGACTCTGATGCTGTTC-3'	
	下游引物	5'-TTCTGACCTCAAGTGATCCACCC-3'	430bp
DR5	上游引物	5'-ACGATGCTGATAAAGTGGGTCAA-3'	
	下游引物	5'-TCAAAGTACGCACAAACGGAATG-3'	500bp
H-GDPDH	上游引物	5'-TGGACCTGACCTGCCGTCTA-3'	
	下游引物	5'-GCAGTGGGTGTCGCTGTTGA-3'	149bp

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.1 多西紫杉醇的抗癌活性及其 IC_{10}

采用 MTT 法检测多西紫杉醇的抗癌活性,结果见表 2。可见随着浓度的增高及时间的延长多西紫杉醇对 SGC7901 胃癌细胞的抑制率增大,即多西紫杉醇对胃癌细胞的抑制作用呈现时间 - 剂量依赖性。根据紫杉醇作用 24h 后的抑制率及其浓度,求出的直线回归方程为 Y=-1.823 5+1.128 3X,当细胞抑制率为 10%算出多西紫杉醇浓度约为 5μg/ml,即 IC_{10} 为 5μg/ml。

2.2 Annexin V 联合 PI 双参数检测胃癌细胞凋亡

表 2 MTT 法检测不同浓度、不同时间多西紫杉醇对胃癌细胞的抑制率($\bar{x} \pm s$)

紫杉醇浓度 (μg/ml)	抑制率(%)				
	12h	24h	36h	48h	
1	3.83 ± 0.34	5.40 ± 0.21	5.89 ± 0.87	7.96 ± 0.64	F=39.18
5	5.69 ± 0.68	7.95 ± 0.96	9.91 ± 0.38	15.10 ± 1.20	P<0.01
10	10.02 ± 0.74	14.55 ± 1.10	26.78 ± 0.88	35.80 ± 1.63	
20	24.28 ± 1.11	33.02 ± 1.36	50.42 ± 1.47	63.95 ± 2.10	F=8.92
40	42.77 ± 1.58	60.91 ± 2.41	71.14 ± 2.89	86.22 ± 3.36	P<0.01

注:右侧 F 和 P 值为时间组之间比较的方差分析(F 检验)结果,F 侧 F 和 P 值为浓度组之间比较的方差分析(F 检验)结果。

表 3 流式细胞仪检测 24h 后各组诱导胃癌细胞 SGC7901 的凋亡率

组 别	细胞分配比率(%)				
	LL	UL	UR	LR	UR+LR
C 组	97.89	0.03	1.03	1.06	2.09
T 组	92.05	0.16	4.40	3.39	7.79
P 组	89.19	0.16	7.25	3.40	10.65
T+P 组	74.40	1.09	15.27	9.24	24.51*

注:与 C 组、T 组及 P 组相比,*P<0.05。

表 4 加药前后胃癌细胞 DR4 mRNA 表达水平的比较

组别	条带密度均值			DR4/ 内参
	空白	内参	DR4	
C 组	447	6 857	2 059	0.251 4
T 组	503	5 092	1 716	0.264 3
P 组	581	6 041	1 688	0.202 7
T+P 组	526	4 423	1 371	0.216 8

注:各组间两两相比,P>0.05。

表 5 加药前后胃癌细胞 DR5 mRNA 表达水平的比较

组别	条带密度均值			DR5/ 内参
	空白	内参	DR5	
C 组	818	5 889	2 102	0.253 2
T 组	674	5 970	2 202	0.288 5
P 组	594	7 420	4 028	0.503 2*
T+P 组	735	4 909	3 596	0.686 2*

注:与对照组相比,*P<0.05。

维普资讯 http://www.cqvip.com

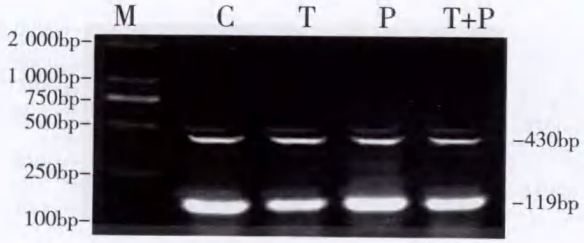


图 1 RT-PCR 法检测各组胃癌细胞 DR4 mRNA 的表达率

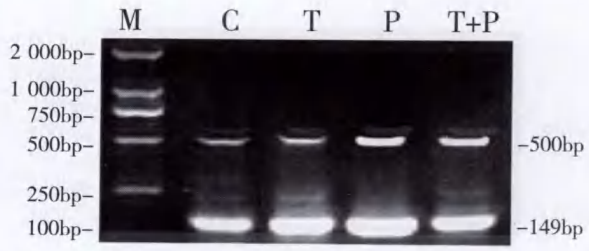


图 2 RT-PCR 法检测各组胃癌细胞 DR5 mRNA 的表达

流式细胞仪检测结果见表 3。死亡细胞(UL):PI(+)FITC(-);凋亡后坏死细胞(UR):PI(+)F1TC(+);凋亡细胞(LR):PI(-)FITC(+);正常细胞(LL):PI(-)FITC(-)。细胞的总凋亡率应是 UR+ LR。可见 T+P 组凋亡率(24.51%)最高,在与 C 组(2.09%)、T 组(7.79%)及 P 组(10.65%)进行两两比较时,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 胃癌细胞 DR4、DR5 的表达

多西紫杉醇、TRAIL 单独及联合应用于胃癌细胞前后 DR4、DR5 的表达见图 1、2。以 DR4、DR5 受体与 H-GDPDH 条带的平均光密度值的比值来进行半定量分析,结果见表 4,表 5。T 组 DR4、DR5 的表达水平与 C 组相比无差异($P>0.05$);P 组与 T+P 组的 DR4、DR5 表达水平相比亦无差异($P>0.05$);P 组及 T+P 组的 DR5 表达水平较正常对照组及 T 组增加($P<0.05$),但增加的幅度不是很大。

3 讨 论

临床上对于肿瘤患者的化疗是为了有效的诱导肿瘤细胞的凋亡。但是其效果很大程度上局限于患者的耐受能力及肿瘤细胞存在的或发展的成熟障碍所致的凋亡障碍。针对激活细胞表面死亡受体(如 TRAIL 受体)诱导肿瘤细胞凋亡,已被证实为对多数肿瘤细胞均有效的一种新型治疗方法。体内实验也表明,重组 TRAIL 蛋白能够明显抑制荷瘤动物体内肿瘤细胞的生长,甚至使肿瘤消退,而对宿主没有明显的损害[5]。但也有相当多的肿瘤细胞对其表现为耐受,我们采用 Annexin V 联合 PI 双参数法检测 TRAIL 对胃癌细胞的诱导凋亡作用,结果显示 200ng/ml 的 TRAIL 作用于胃癌细胞 SGC7901 24h 后凋亡率仅为 7.79%,说明 SGC7901 胃癌细胞是 TRAIL 的耐药细胞。而将低剂量(IC_{10})的多西紫杉醇联合 TRAIL 作用胃癌细胞,发现细胞凋亡率得到提高,大于单药效应及二者累加之和($P<0.05$)。提示多西紫杉醇可提高 SGC7901 胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性。

死亡受体(DR4、DR5)是转导 TRAIL 凋亡信号的受体,与 TRAIL 特异性结合后可通过胞浆死亡区激发和传导凋亡信号,激活 Caspase 蛋白酶解级联反应,导致细胞凋亡,且二者过度表达可不依赖相应的配体而直接诱导细胞凋亡。研究表明,TRAIL 耐受与 DR4、DR5 的低表达或不表达密切相关[6]。Tomasetti M 等[7]学者报道,TRAIL 抗性的间皮瘤细胞表面只表达低度的 DR4 和 DR5,经过非致死剂量的 α-生育酚琥珀酸酯的处理,能够上调 DR4、DR5 的表达,从而建立抗 TRAIL 间皮瘤细胞对 TRAIL 所诱导的凋亡敏感性。本研究发现,SGC7901 胃癌细胞能够表达 DR4 和 DR5,经过多西紫杉醇处理后其 DR5 水平得到提高,提示胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 DR5 表达上调有关,这与 Nimmanapalli R 等在对前列腺癌的研究中得到的结果类似[8],但没有观察到 DR4 表达的增加,推测与肿瘤细胞的类型差异相关。近来有学者报道[9],DR5 表达上调主要通过化疗药物(芬维 A 胺)增强转录因子 CHOP 的表达及 DR5 启动子的活性来实现的。也有学者[10]推断 DR5 启动子可能有 1 个可结合转录阻抑蛋白 Yin Yang 1(YY1)的位点,DR5 表达上调可能与化疗药物(顺铂,长春新碱等)抑制转录阻抑蛋白YY1 有关。至于多西紫杉醇增强 DR5 表达的机制目前尚不清楚。

本实验观察到多西紫杉醇联合 TRAIL 诱导胃癌细胞凋亡率仅为 24.51%,增加幅度并不是很大,可能与 DR5 表达水平增加幅度不是很高,且不伴有 DR4 表达增高有关。此外,考虑到 TRAIL 耐药机制的多层次性,存在肿瘤细胞的类型差异性,并与凋亡通路中多种促凋亡因子及抗凋亡因子有关,可以推测 SGC7901 胃癌细胞对 TRAIL 的耐受并不完全是由于死亡受体的低表达所致,有关机制还待更深

(下转第 633 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

善动脉氧合,改善通换气功能,同时减轻对肺循环的影响。同时该治疗措施对病人损伤小,有利于提高病人的耐受性,减少有创机械通气带来的呼吸机相关性肺炎、呼吸机相关性肺损伤、呼吸肌萎缩等相应并发症,提高抢救成功率;同时缩短 ICU 住院时间,降低医疗费用。临床实践中选择 IPAP6～10cmH_2O,EPAP 4～6cmH_2O,备用频率 12～18 次/min 的较低呼吸机参数开始。依据病情变化逐渐调节参数,以 $FiO_2<0.5$,使 $PaO_2\geq60$mmHg 时的 EPAP 值视为理想。随着病情好转转换为 CPAP 等模式,逐渐撤离呼吸机。

本组病例对各种产科危重症后发生 ALI 早期诊断,并早期进行 NIPPV 治疗,明显改善症状,提高 PaO_2/FiO_2,减少其向 ARDS 转化。抢救成功率高,达97.8%(44/45),仅 1 例由于加重为脓毒症休克,继而发展为 ARDS,改行有创通气。

本组结果表明产科人群,特别是病理产科,也是 ALI 发生的高危人群。同时,由于产科病人本身机体状况较好,抢救成功率明显高于文献报道的其他 ALI 病例,因此早期诊断、早期治疗尤为重要。对于产科病例在有胎盘早剥、先兆子痫、羊水栓塞、产后出血等情况下,出现呼吸困难、低氧血症时应高度警惕发生 ALI,对此类病人早期入住 ICU 并行 NIPPV是有效的治疗手段。有助提高病人耐受性,赢得抢救时机,阻断向 ARDS 进展,降低孕产妇死亡率。一旦发现病情进展为 ARDS,及时进行有创机械通气[4]。在救治过程中需严密监测血气分析、生命体征等变化,及时再评估患者缺氧情况,选择最适通气参数并合理调整治疗方案是抢救成功的关键。

参 考 文 献

[1] 中华医学会呼吸病分会.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2000;23(4):203.

[2] Curran CA. Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) in the Obstetric Population[J]. J Perinat Neonatal Nurs.,2002;15(4):37-55.

[3] 张文武.急诊内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.2.

[4] 周发春. 有创与无创序贯性机械通气治疗重度有机磷农药中毒伴呼吸衰竭[J]. 重庆医科大学学报,2005;30(1):114-115.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 607 页)

入的研究。由于联合用药后各药剂量小于单独用药时的剂量,因此联合用药在保证药效的同时降低了单药时毒副作用,对其临床应用有一定的意义,不失为治疗胃癌的一条有效的途径。

参 考 文 献

[1] 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 genetransfer[J]. Oncogene,2001;20(41):5865-5877.

[2] Kondo K,Yamasaki S,Sugie T,et al.Cisplatin-dependent upregulation of death receptors 4 and 5 augments induction of apoptosis by TNF-related apoptosis-inducing ligand against esophageal squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer,2006;118(1):230-242.

[3] Kluttermann K,Banning U,Kachel M,et al. TRAIL-induced cytotoxicity in a melphalan-resistant rhabdomyosarcoma cell line via activation of caspase-2[J]. Anticancer Res,2006;26(1A):351-356

[4] 张汝钢,房殿春,杨柳芹,等. 5-Aza-CdR 增强 TRAIL 对胃癌细胞的抗瘤活性与 Caspase-8 表达的关系[J]. 第三军医大学学报,2005;27(2):95-97.

[5] Lawrence D,Shahrokh Z,Marsters S,et al.Diferential hepatoeyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions[J]. Nat Med,2001;7(4):383-385.

[6] Li YC,Tzeng CC,Song JH,et al.Genomic alterations in human malignant glioma cells associate with the cell resistance to the combination treatment with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy[J]. Clin Cancer Res,2006;12(9):2716-2729.

[7] Tomasetti M,Andera L,Alleva R,et al. Alpha-tocopheryl succinate induces DR4 and DR5 expression by a p53-dependent route: implication for sensitisation of resistant cancer cells to TRAIL apoptosis[J]. FEBS Lett,2006;580(8):1925-1931.

[8] Nimmanapalli R,Perkins CL,Orlando M,et al. Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels[J]. Cancer Res,2001;61(2):759-763.

[9] Baritaki S,Huerta-Yepez S,Sakai T,et al. Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis:up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1[J]. Mol Cancer Ther,2007;6(4):1387-1399.

[10] Kouhara J,Yoshida T,Nakata S,et al. Fenretinide up-regulates DR5/TRAIL-R2 expression via the induction of the transcription factor CHOP and combined treatment with fenretinide and TRAIL induces synergistic apoptosis in colon cancer cell lines[J]. Int J Oncol,2007;30(3):679-687.

(责任编辑:冉明会)