DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.004
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0095-03

论著

胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 caspase-8 基因甲基化状态的关系

张汝钢,房殿春,杨柳芹,罗元辉 (第三军医大学西南医院全军消化内科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨 caspase-8 基因启动子区 5′CpG 岛甲基化状态与 TRAIL 抗癌作用的关系。方法 采用甲基化特异 PCR 方法检测 5 种胃癌细胞株 caspase-8 基因启动子区的甲基化状态;采用 MTT 方法检测 TRAIL 蛋白的抗癌活性。结果 5 种胃癌细胞株对 TRAIL 的敏感性不尽相同,caspase-8 基因启动子区均为非甲基化状态;5-Aza-CdR 处理可提高耐药细胞对 TRAIL 的敏感性,但不影响胃癌细胞的甲基化状态。结论 5-Aza-CdR 可提高多数胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性,胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性与 caspase-8 基因甲基化状态无关。

关键词:5-Aza-CdR;TRAIL;caspase-8 甲基化;胃癌
中图法分类号:R392.11;R73-36;R735.2 文献标识码:A

Sensitivity of human gastric cancer cells to TRAIL is not associated with caspase-8 promoter methylation status

ZHANG Ru-gang, FANG Dian-chun, YANG Liu-qin, LUO Yuan-hui (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of methylation state of C5 of the cytosine in the CpG di-nucleotide of caspase-8 promoter on tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) antitumor activity in gastric carcinomas. **Methods** The methylation states of the caspase-8 promoter region of 5 kinds of gastric carcinoma strains were measured by methylation-specific PCR method. The antitumor activity of TRAIL protein was measured by MTT method. **Results** No methylation of caspase-8 promoter was found in gastric carcinoma cells. Treatment with demethylation agent 5-Aza-2′-deoxycytidine (5-Aza-CdR) increased sensitivity of gastric cancer cells to TRAIL, but did not change methylation status of caspase-8 promoter in gastric carcinoma cells. **Conclusion** Caspase-8 promoter methylation status is not associated with TRAIL antitumor activity.

Key words: 5-Aza-CdR; TRAIL; caspase-8 methylation; gastric carcinoma

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子家族中的新成员,与 FASL 具有高度的同源性,又名 APO-2L[1,2]。研究表明,TRAIL 可选择性杀伤多种组织来源的恶性肿瘤细胞、转化细胞和病毒感染细胞,而对正常细胞则无细胞毒性。国内外研究表明,TRAIL 可诱导大多数肿瘤细胞发生凋亡,但也有部分肿瘤细胞对其不敏感[3]。业已发现,某些肿瘤细胞因 caspase-8 基因启动子区 5′CpG 岛高甲基化而使基因沉寂[4,5],导致肿瘤细胞对 TRAIL 的耐药。甲基转移酶抑制剂 5-氮-2′-杂脱氧胞苷(5-Aza-2-deoxycytidine, 5-Aza-CdR)能逆转 caspase-8 基因的高甲基化状态,恢复肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性[6]。为探讨 5-Aza-CdR 对 caspase-8 基因甲基化状态的影响及与 TRAIL 抗胃癌作用的影响,我们检测了 5 种胃癌细胞株 SGc 7901、Kato 3、AGS、MKN 28 和 MKN 45 经 5-Aza-CdR 处理前后 caspase-8 甲基化状态及与 TRAIL 抗癌活性的关系。

1 材料和方法

1.1 实验材料

胃癌细胞株 SGC 7901、Kato 3、AGS、MKN 28、MKN 45 细胞由中科院上海细胞所提供,本实验室保存;导入有可溶性 TRAIL(氨基酸 114-281,带六聚组氨酸尾)基因的 pET-d 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) PLysS 由本实验室构建;HisTrip Kit 购自美国法玛西亚公司,IPTG、MTT、DMSO、RT-PCR 检测系统和预染蛋白分子量标准购自 Promega 公司;对苯二酚、亚硫酸氢钠、透析袋(直径:27 mm)、*Taq* DNA 聚合酶购自上海生工公司。caspase-8 基因非甲基化型、甲基化型引物由上海生工公司合成。

1.2 TRAIL 蛋白的表达、分离和纯化

按本室建立的方法进行 TRAIL 蛋白的表达、分离和纯化[7]。具体为,导入有 sTRAIL 基因的 pET-d 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3) PLysS 在含 60 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养平板上培养至肉眼可见菌落后挑取单菌落;转入 1 L 60 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中 37 ℃ 130 r/min,振荡培养 2 h,达对数生长期后加 1 ml 1 mol/L IPTG 溶液至终浓度 1 mmol/L,继续培养 3~5

基金项目:全军"十五"科研基金资助项目(01MA172)
Supported by the "Tenth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of PLA (01MA172)
作者简介:张汝钢(1967-),男,河南省睢县人,硕士,主治医师,主要从事胃癌发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68754000-73055
通信作者:房殿春,E-mail:fangdianchun@hotmail.com
收稿日期:2003-06-17;修回日期:2003-08-31

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

h；4 ℃ 2 500 r/min 离心 15 min，弃上清。每克大肠杆菌用 3 ml 溶液Ⅰ悬浮沉淀，并加 8 μl 50 mmol/L PMSF 和 160 μl 5.0 mg/ml 溶菌酶溶液，搅拌约 20 min 裂解物变粘稠后加入 20 μl 1 mg/ml DNaseⅠ，室温放置约 1 h 后，于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min，上清即含有多聚组氨酸标记的可溶性重组 TRAIL(his-sTRAIL)蛋白，通过两层 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用 HisTrip Kit 分离、纯化；纯化后用透析袋在 0.01 mol/L 的 PBS 中于 4 ℃脱盐，用 Lowry 法测定蛋白浓度；将 sTRAIL 蛋白用含 20% 小牛血清的 RPMI1640 的培养液稀释成 20 μg/ml 并于 4 ℃保存、备用。

1.3 细胞培养

人胃癌细胞株 SGC 7901、Kato 3、AGS、MKN 28、MKN 45 细胞均培养于含 10% 灭活小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/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 2～3 天用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化，以 1∶2～1∶3 传代 1 次。

1.4 MTT 法检测 TRAIL 蛋白对胃癌细胞的抗癌活性

胃癌细胞用含 10% 的 RPMI1640 全培液常规培养、传代，取对数生长期细胞以 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化，用上述培液配成单细胞悬液，按 2×10^3 细胞/孔加入 96 孔平底板(Kato 3 不需消化，吹打成单细胞悬液后直接加入 96 孔 U 底板)，每孔终体积为 200 μl，CO_2 孵箱内培养 3 d 后加 TRAIL。量效和时效关系，按 0、50、100、150、200 ng/ml 给予 TRAIL，取孵育 12、24、48、72 h 细胞分别在酶标仪(BIO-RAD 550 型)上测 490 nm 吸光度值，每个时段均设空白对照。测值前 4～6 h 吸净培养液后加入 20 μl 5.0 mg/ml MTT 溶液，4 h 后每孔追加 100 μl DMSO，37 ℃振荡 10 min。细胞抑制率＝(1－实验组 D_{490}/对照组 D_{490})×100%。

1.5 甲基化特异性 PCR(MSP)检测[8]

癌细胞 DNA 提取采用酚/氯仿方法，用 Du-640 紫外分光光度计(USA)定量。取 4 μg 基因组 DNA(100 ng/μl)，加 8 μl 1 mol/L NaOH 使其终浓度为 0.2 mol/L 并在 37 ℃孵育 10 min；向已变性的 DNA 中加入均为新配制的 30 μl 10 mmol/L 对苯二酚和 520 μl 3 mol/L $NaHSO_3$(pH 5.0)，混匀后加入消毒的液体石蜡 50 μl，50 ℃保温 16 h；－20 ℃过夜后除去石蜡，然后于 4 ℃在 TE 缓冲液中(pH 8.0)透析 24 h。透析完毕后加入 300 μl 1 mol/L NaOH 使其终浓度为 0.3 mol/L，室温放置 5 min；加入 0.9 ml 7.5 mol/L NH4Ac(0.2 倍，终浓度为 2.5 mol/L)和 5.4 ml 冷乙醇(2 倍)，混匀后置于－20 ℃过夜；4 ℃ 1 000 r/min 离心 10 min 得 DNA 沉淀；加入 75% 冷乙醇，1 000 r/min 离心 10 min×2 次，弃上清；室温挥发残余乙醇后加入 TE 缓冲液 20 μl 溶解 DNA 沉淀，直接作 MSP 或－20 ℃保存。药物处理：将 2×10^5 个细胞接种于 100 ml 玻璃培养瓶，24 h 后换含 1 μmol/L 5-Aza-CdR 全培基继续培养 7 d 后收获细胞，同时未用药物组作对照。

检测甲基化状态所用引物参照文献[4]合成。caspase-8 非甲基化引物(Unmethylation primers，U)序列为 5′-TAG GGG ATT TGG AGA TTG TGA-3′(正义)，3′-AAC AAA ACT TAC ATC TA T ATA CCA-5′(反义)，扩增产物 322 bp；甲基化引物(Methylation primers，M)序列为 5′-TAG GGG ATT CGG AGA TTG CGA-3′(正义)，3′-AGC AAA GCT TAC ATC TAT ATG C-5′(反义)，扩增产物 320 bp。PCR 反应在 DNA Thermal Cycler 480(USA)上进行，扩增参照 Herman 的方法(在 90 ℃时放入反应管，省去预变性时间)。PCR 产物在 1.4% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml EB)上电泳，凝胶成像仪(BIO-RAD)上照相。

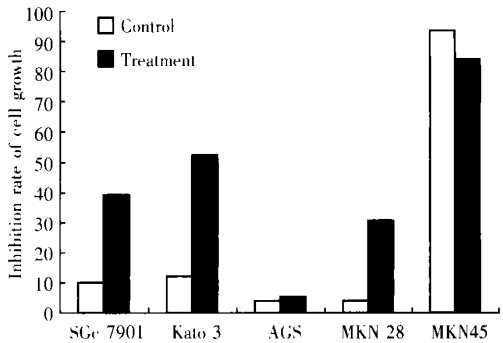
1.6 统计学处理

用统计软件 SPSS 10.0 建立数据库，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 5-Aza-CdR 对 TRAIL 蛋白抗癌活性的影响

5-Aza-CdR 对 TRAIL 蛋白抗癌活性的影响见图 1。由图 1 可见 TRAIL 仅能明显抑制 MKN 45 细胞生长($P<0.05$)，对其余 4 株胃癌细胞无明显抑制作用($P>0.05$)。经 1 μmol/L 5-Aza-CdR 处理 7 d 后再与 TRAIL 孵育，发现 SGc 7901，Kato 3 和 MKN 28 细胞恢复对 TRAIL 的敏感性($P<0.05$)，MKN 45 细胞的敏感性无进一步增加，AGS 仍耐受($P>0.05$)。



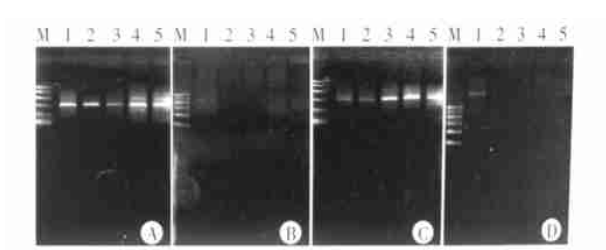
Control：No 5-Aza-CdR pretreatment；Treatment：Gastric cancer cells pretreated with 5-Aza-CdR for 7 d and then treated with TRAIL

图 1 5-Aza-CdR 对 TRAIL 抑制胃癌细胞生长的影响

Fig 1 Influence of 5-Aza-CdR on the inhibitory effect of TRAIL on the growth of gastric tumor cells

2.2 caspase-8 基因甲基化状态与 TRAIL 抗癌活性的关系

MSP 结果显示，见图 2，用 5-Aza-CdR 处理前应用 caspase-8 基因去甲基化引物扩增可见明显电泳条带，而应用甲基化引物扩增未见明显的电泳条带，提示 5 种胃癌细胞株用药前 caspase-8 基因 5′CpG 岛均呈非甲基化状态。经 1 μmol/L 5-Aza-CdR 处理 7 d 后，虽可提高大部分胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性，但 caspase-8 基因的甲基化状态却无明显变化，提示 5-Aza-CdR 增强胃癌细胞的敏感性并非通过改变 caspase-8 基因的甲基化状态来实现的。



A，B：Control；C，D：Treated with 1 μmol/L 5-Aza-CdR for 7 d；1：SGc 7901；2：Kato 3；3：AGS；4：MKN 28；5：MKN 45；M：PCR marker (1 000，750，500，300，150 and 50 bp)

图 2 胃癌细胞细胞株 caspase-8 基因启动子区 5′CpG 岛甲基化检测结果

Fig 2 Methylation of 5′CpG island of caspase-8 gene promoter region gastric cancer cells

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

尽管 TRAIL 对多种肿瘤细胞具有选择性杀伤作用, 但一些组织来源的肿瘤细胞对 TRAIL 仍然具有耐药性。本研究采用 MTT 方法检测了凋亡诱导分子 TRAIL 对 5 株胃癌细胞的抗癌作用, 发现除 MKN 45 细胞对 TRAIL 有较高的敏感性外, 其余胃癌细胞对 TRAIL 均存在不同程度的耐药。这种耐药的机制尚不清楚。早先的研究认为, 对 TRAIL 耐药性的产生取决于它的死亡受体 (DR4/5) 和诱骗受体 (DcR1/2) 表达的相对水平。但是随着研究的深入, 未能证实 TRAIL 受体表达的相对水平与对 TRAIL 的敏感性之间存在显著的相关性。目前发现许多对 TRAIL 敏感的细胞依然表达诱骗受体。这一方面与早期研究仅检测了细胞内 DR 和 DcR mRNA, 而非实际膜蛋白水平的局限性有关, 而另一方面也说明细胞内外对 TRAIL 的信号转导确实存在着一个复杂的调控过程。

DNA 甲基化是保持基因表达和 DNA 稳定性的决定因素。某些基因的甲基化状态对 TRAIL 的抗瘤活性有直接影响。5-Aza-CdR 是 DNA 甲基转移酶抑制剂, 能时间和剂量依赖性引起基因去甲基化, 恢复其 mRNA 和蛋白质的表达[4]。5-Aza-CdR 引起去甲基化的机制可能是: ①结合于 DNA 甲基化 CpG 位点上的 5-Aza-CdR 能与 DNA 甲基转移酶Ⅰ (DNMTⅠ) 共价结合, 致 DNMTⅠ 迅速失活[9]; ②嵌入 DNA 双螺旋之间的 5-Aza-CdR 能阻止 DNMT 与 DNA 结合[10]; ③ 5-Aza-CdR 可抑制 DNMTⅠ mRNA 合成[11]。本研究应用 5-Aza-CdR 处理后, 可提高多数耐药细胞对 TRAIL 的敏感性, 也提示胃癌细胞对 TRAIL 的耐药可能与某种或某些基因的高甲基化有关。

近年研究表明, 在死亡受体 (DR4/DR5) 介导的细胞凋亡中 caspase-8 起重要的作用。caspase-8 基因定位在染色体 2q33 上, 表达产物只分布于细胞质内, 为起始 caspase。caspase-8 基因 5′CpG 岛启动子区处于去甲基化状态时, 该基因表达正常, 而该基因为高甲基化状态时表达受抑。Hopkins-Donaldson 等[5] 研究了 11 株神经母 (NB) 细胞 caspase-8 的表达和对 TRAIL 的反应, 发现表达 caspase-8 的 4 株对 TRAIL 敏感, 而不表达 caspase-8 的 11 株对 TRAIL 耐受。另有研究表明, 神经母细胞瘤对 TRAIL 耐药与 caspase-8 表达丢失有关[12]。通过去甲基化处理或基因转染使 caspase-8 再表达, 可使对 TRAIL 耐药的细胞株对 TRAIL 敏感化[4,13], 提示这些细胞的 caspase-8 基因高甲基化影响着肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。本研究采用 MSP 方法检测了 5 株胃癌细胞 caspase-8 基因启动子区 5′CpG 岛的甲基化状态, 发现均为非甲基化状态, 应用去甲基化药 5-Aza-CdR 处理后, 虽可增加多数胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性, 但并未改变细胞的甲基化状态, 提示 caspase-8 基因启动子区 5′CpG 岛的甲基化状态与胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性无关。究竟那些基因的甲基化状态影响胃癌细胞对 TRAIL 的敏感性尚有待进一步研究。

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] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, *et al*. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. J Biol Chem, 1996, 271(22): 12687—12690.

[3] 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.

[4] 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 gene transfer[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5865—5877.

[5] Hopkins-Donaldson S, Bodmer J L, Bourloud K B, *et al*. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(16): 4315—4319.

[6] Liang G N, Gonzales F A, Jones P A, *et al*. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2′-deoxycytidine[J]. Cancer Res, 2002, 62(4): 961—966.

[7] 李小安, 房殿春, 杨仕民, 等. TRAIL 蛋白的表达, 纯化和抗肿瘤活性[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1058—1060.

[8] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al*. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18): 9821—9826.

[9] Christman J K. 5-Azacytidine and 5-aza-2′-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy[J]. Oncogene, 2002, 21(35): 5483—5495.

[10] Takita J, Yang H W, Chen Y Y, *et al*. Allelic imbalance on chromosome 2q and alterations of the caspase 8 gene in neuroblastoma[J]. Oncogene, 2001, 20(32): 4424—4432.

[11] Grotzer M A, Eggert A, Zuzak T J, *et al*. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression[J]. Oncogene, 2000, 19(40): 4604—4610.

[12] Eggert A, Grotzer M A, Zuzak T J, *et al*. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1314—1319.

[13] Nishimura S, Adachi M, Ishida T, *et al*. Adenovirus-mediated transfection of caspase-8 augments anoikis and inhibits peritoneal dissemination of human gastric carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7009—7014.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net