DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.18.021
第25卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 18
1640 2003年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)18-1640-03

TRAIL与5-Fu合用对结肠癌细胞系SW480杀伤作用的研究

李小安[1],房殿春[1],司佩任[1],张汝刚[1],杨柳芹[1],蒋明德[2],秦建平[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心 400038,[2]成都军区总医院消化内科 610083)

提 要:目的 观察TRAIL与5-Fu联合应用对结肠癌SW480细胞的作用。方法 采用MTT法检测TRAIL与5-Fu联合应用对结肠癌SW480细胞存活分数的影响;TUNEL法检测TRAIL与5-Fu联合应用对结肠癌SW480细胞凋亡率的影响。结果 MTT法证实30~300 ng/ml的TRAIL与3.0 mmol/L 5-Fu联合应用对结肠癌SW480细胞存活分数的影响有协同作用,TUNEL法表明3.0 mmol/L 5-Fu可显著增强TRAIL诱导结肠癌SW480细胞凋亡的作用。结论 5-Fu可提高结肠癌SW480细胞对TRAIL的敏感性。

关键词:肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体;5-氟尿嘧啶;联合应用;协同作用
中图法分类号:R392.11;R735.3+5;R979.1 文献标识码:A

Anti-tumor effect of combination of TRAIL and 5-Fu on colon cancer cell line SW480

LI Xiao-an, FANG Dian-chun, SI Pei-ren, ZHANG Ru-gang, YANG Liu-qin, JIANG Ming-de, QIN Jian-ping (Center for Gastroenterology of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the anti-tumor effect of combination of TRAIL and 5-Fu on colon cancer cell line SW480. Methods The survival fraction of SW480 cells was measured by MTT assay and apoptosis rate was determined by TUNEL method. Results A cooperative effect of 30~300 ng/ml TRAIL and 3.0 mmol/L 5-Fu on survival fraction of SW480 cells was found. TUNEL revealed that 3.0 mmol/L 5-Fu could enhance TRAIL-induced apoptosis of colon cancer cell line SW480. Conclusion The sensitivity of colon cancer cell line SW480 to TRAIL-mediated apoptosis is improved by 5-Fu.

Key words: TRAIL; 5-Fluorouracil; combination; cooperation

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是TNF家族成员,在体外可诱导多种肿瘤细胞系凋亡,但也有部分细胞系对TRAIL耐受[1]。5-Fu是临床上常用的化疗药物,长期应用,肿瘤细胞易对之产生耐受性。因此,TRAIL与5-Fu联合应用如能产生协同作用将对克服肿瘤细胞对药物的耐受性有一定的理论和实践意义。本研究就这一问题进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂

可溶性TRAIL蛋白(氨基酸114-281,带六聚组氨酸尾)由本实验室生产;MTT购自上海生物工程技术公司;TUNEL原位凋亡检测试剂盒购自罗氏公司;RPMI1640培养基购自Sigma公司;结肠癌细胞株SW480由本实验室保种。

1.2 细胞培养

SW480细胞培养于含10%灭活的小牛血清、100 U/ml青霉素和链霉素的RPMI1640的培养液中,培养条件为37 ℃、5% CO_2、饱和湿度,每2~3 d用0.25%胰酶消化,以1∶3~1∶5传代。

1.3 MTT法检测5-Fu与TRAIL合用对SW480细胞存活分数的影响

1.3.1 实验分组及给药剂量 分为5-Fu组、TRAIL组、TRAIL+5-Fu组。5-Fu组分别给予0.1、0.3、1.0、3.0、10 mmol/L 5-Fu;TRAIL组分别给予3、10、30、100、300 ng/ml TRAIL;TRAIL+5-Fu组除按TRAIL组剂量给药外,每孔另加3.0 mmol/L 5-Fu。每组均设对照,24 h后测值。

1.3.2 MTT法测细胞存活分数[2] 以0.25%胰蛋白酶消化细胞,用含5%小牛血清的RPMI1640培养液配成单个细胞悬液,按每孔3×10^3个细胞接种于96孔板,每孔终体积为200 μl,CO_2孵箱内培养2~3 d后加上述各组药物。测值4 h前每孔加20 μl 5 mg/ml MTT,孵育后吸去孔内上清,每孔加150 μl DMSO,振荡10 min,酶联免疫检测仪测A_{570}值。细胞存活分数(Survival Fraction)=实验组A_{570}/对照组A_{570}×100%。实验重复3次,取平均值。

基金项目:全军"十五"科研基金资助项目(01MA172)
作者简介:李小安(1968-),男,安徽省东至县人,博士,主治医师,主要从事消化道肿瘤方面的研究,发表论文6篇,现在成都军区总医院消化内科。电话:(028)86570307,E-mail:zlcd1991@yahoo.com.cn
收稿日期:2002-08-19;修回日期:2002-12-04

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

1.4　TUNEL 法检测 TRAIL 与 5-Fu 合用对 W480 细胞凋亡率的影响

1.4.1　实验分组及给药剂量[3]　分为 TRAIL 组、5-Fu 组、TRAIL+5-Fu 组和对照组。TRAIL 组给予 30、100、300 ng/ml TRAIL, 5-Fu 组给予 3.0 mmol/L 5-Fu, TRAIL+5-Fu 组除按 TRAIL 组剂量给药外, 每孔另加 3.0 mmol/L 5-Fu, 对照组则给予同体积的 PBS。

1.4.2　细胞爬片　将无菌的盖玻片置于 6 孔板中, 每孔一片。取对数生长期细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液配成单个细胞悬液, 稀释成 5×10^5 个/ml。取 0.5 ml 滴于盖玻片上, 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下孵育 2 h 后, 每孔加培养液 2 ml, 培养 1 d 后, 每孔加入上述浓度的药物。

1.4.3　TUNEL 法检测细胞凋亡率　24 h 后按 TUNEL 试剂盒说明操作, DAB 显色后, 高倍镜(400×)下随机数 200 个细胞, 记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 共数 5 个视野。细胞凋亡率(apoptosis rate)= 凋亡细胞数/(凋亡细胞数+未凋亡细胞数)×100%.

1.5　统计学处理

使用 SPSS 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　TRAIL 与 5-Fu 合用对 SW480 细胞存活分数的影响

各组结果见表 1。采用 Weeb 系数来判定两药之间的相互作用[4]。预估效应 C=A×B, A、B 指两药单用时各自的存活分数。当两药合用时其实际存活分数< 70% 预估效应时, 两药有协同作用。结果表明当 TRAIL 在 30~300 ng/ml 时, 与 3.0 mmol/L 5-Fu 合用, 有协同作用, 小于 30 ng/ml 的 TRAIL 与 3.0 mmol/L 5-Fu 合用无协同作用。

表 1　5-Fu 与 TRAIL 合用的协同作用分析

Tab 1　Analysis of cooperative effect of combination of TRAIL and 5-Fu

Group	Dosage		Surlival rate(%)	70% predictable effect (%)
	TRAIL(ng/ml)	5-Fu(mmol/L)		
5-Fu	0	3	61.20	
TRAIL1	3	0	101.18	
TRAIL2	10	0	97.26	
TRAIL3	30	0	92.16	
TRAIL4	100	0	80.39	
TRAIL5	300	0	65.1	
TRAIL1+5-Fu	3	3	56.47	43.35
TRAIL2+5-Fu	10	3	47.06	41.67
TRAIL3+5-Fu	30	3	37.65△	39.48
TRAIL4+5-Fu	100	3	27.84△	34.44
TRAIL5+5-Fu	300	3	21.18△	27.76

△: The survival fraction is less than 70% of the predicted effect, suggesting that the combination of TRAIL and 5-Fu is of cooperative effect

2.2　TRAIL 与 5-Fu 合用对 SW480 细胞凋亡率的影响

3.0 mmol/L 的 5-Fu 能明显增强 TRAIL 诱导 SW480 细胞凋亡的作用。两药合用时 SW480 细胞凋亡率显著高于单独使用 TRAIL 或 5-Fu 时的细胞凋亡率($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见表 2。

表 2　TRAIL 与 5-Fu 合用对 SW480 细胞凋亡率的影响

Tab 2　Effect of combination of TRAIL and 5-Fu on apoptosis rate of SW480 cells

Group	Dosage		Apoptosis rate (%) ($\bar{x}\pm s$)
	TRAIL	5-Fu	
Control	PBS		10.1±2.2
5-Fu	3.0 mmol/L	30.1±4.3**	
T1	30 ng/ml	0 mmol/L	22.5±2.6*
T2	100 ng/ml	0 mmol/L	28.3±4.5*
T3	300 ng/ml	0 mmol/L	36.7±4.6**
T1+Fu	30 ng/ml	3.0 mmol/L	47.7±5.7**△
T2+Fu	100 ng/ml	3.0 mmol/L	62.3±6.5**△△
T3+Fu 组	300 ng/ml	3.0 mmol/L	75.9±9.2**△△

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* control;　△: $P<0.05$　△△: $P<0.01$ *vs* 5-Fu;　#: $P<0.05$,　##: $P<0.01$, TRAIL+5-Fu *vs* the corresponding dose in TRAIL group

3　讨论

TRAIL 基因是 Wiley 小组于 1995 年克隆和命名的, 属 TNF 家族成员[5]。TRAIL 有 DR4(Death receptor4)、DR5(Death receptor5)、DcR1(Decoy receptor1)、DcR2(Decoy receptor1)和 OPG 5 种受体, TRAIL 与 DR4、DR5 结合后可诱导细胞凋亡, 但与 DcR1、DcR2 和 OPG 结合不能诱导细胞凋亡[6~9]。人们利用大肠杆菌表达出可溶性 TRAIL 并证实可诱导很多肿瘤细胞系凋亡, 但 TRAIL 对正常细胞几乎没有杀伤作用[1, 10, 11]。我们在国内较早地表达和纯化出 TRAIL 蛋白(氨基酸 114~281, 带六聚组氨酸尾), 并证实 TRAIL 对结肠癌细胞系 SW480 有杀伤作用[12]。在此基础上, 本研究进一步研究了 TRAIL 与 5-Fu 联合应用对结肠癌细胞系 SW480 的作用。

我们用 MTT 法证实 30~300 ng/ml 的 TRAIL 与 3.0 mmol/L 5-Fu 联合应用对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响有协同作用, TUNEL 法更进一步表明 3.0 mmol/L 5-Fu 可显著增强 TRAIL 诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡的作用。小于 30 ng/ml 的 TRAIL 与 5-Fu 联合应用则没有协同效应, 因此, 这种协同效应的产生是剂量依赖性的。5-Fu 是临床上常用的化疗药, 其抗肿瘤作用与其激活 caspase-3, 导致线粒体释放细胞色素 C, 并最终导致细胞凋亡有关[13]。TRAIL 在诱导细胞凋亡时, 也涉及 caspase 的激活线粒体细胞色素 C 的释放[14~16]。因此, 在 TRAIL 和 5-Fu 都达到可以诱导细胞凋亡的剂量时, 激活了细胞凋亡的共同途径。这可能是 TRAIL 与 5-Fu 在一定的剂量时产生协同作用的机理。当然, 我们需进一步积累更多直接的实验证据来证实这一点。

5-Fu 在单独使用时易产生耐受性, 虽然大多数细胞系对 TRAIL 都很敏感, 但也有部分细胞系对 TRAIL

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

耐受[11]。本研究表明，在 TRAIL 与 5-Fu 的剂量较小时，单独使用仅有少量 SW480 细胞被杀伤，二者联合应用时其抗肿瘤效果超过单用各药之和，并达到很理想的效果，因此这种协同作用对于克服肿瘤细胞对药物的耐受性有一定的理论意义。此外，这种联合应用减低了每种药物各自的用药剂量，临床应用时有可能使药物毒副作用降低。总之，本研究为 TRAIL 将来应用于临床提供了实验基础。

参考文献：

[1] 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.

[2] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版社，1996. 186—187.

[3] 刘昌孝，孙瑞元. 药物评价实验设计与统计学基础[M]. 北京：军事医学科学出版社，1999. 17.

[4] Yeh Y A, Herenyiova M, Weber G. Quercetin: synergistic action with carboxyamidotriaxole in human breast carcinoma cells[J]. Life Sci, 1995, 57(13): 1285—1292.

[5] 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.

[6] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptor: signaling and modulation[J]. Science, 1998, 281(5381): 1305—1308/

[7] Srivastava R K. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer[J]. Neoplasia, 2001, 3(6): 535—546.

[8] Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins G J, *et al*. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis[J]. Int J Cancer, 2002, 99(4): 491—504.

[9] Emery J G, McDonnell P, Burke M B, *et al*. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. J Biol Chem, 1998, 273(23): 14363—14367.

[10] 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.

[11] 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 Bio Chem, 1996, 271(22): 12687—12690.

[12] 李小安，房殿春，杨仕明，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.

[13] Wu X X, Kakehi Y, Mizutani Y, *et al*. Activation of caspase-3 in renal cell carcinoma cells by anthracyclines or 5-fluorouracil[J]. Int J Oncol, 2001, 19(1): 19—24.

[14] Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A, *et al*. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 265(1): 130—133.

[15] Rokhlin O W, Guseva N, Tagiyev A, *et al*. Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis[J]. Oncogene, 2001, 20(22): 2836—2843.

[16] Thomas W D, Zhang X D, Franco A V, *et al*. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5612—5620.

（编辑 张 宁）

（上接 1639 页）

2.2 慢性肾功能不全(肾衰竭期)

①治疗前后对比：两组病人治疗后 MAP、BUN、Cr 均明显下降($P<0.05$)，PGE_1 组 Cr 下降更明显($P<0.01$)，两组病例治疗前后 Hb、HCT、RBC 变化无统计学意义；②治疗后组间对比差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

PGE_1 治疗慢性肾功能不全已有报道，我们的研究结果进一步显示：①慢性肾功能不全氮质血症期在传统治疗的基础上加 PGE1 静滴能使肾功能进一步改善，血压控制更理想，贫血程度减轻，其机制与 PGE_1 静脉滴注具有补充慢性肾功能不全病人 PGE 合成不足。扩张血管、降压、抑制血小板凝聚从而阻止血栓素 A2(TXA2)的合成，增加前列环素(PGI2)与 TXA2 的比值，RI 降低，肾血管内径增加，肾血流量增加，肾缺血改善，血浆 ET 水平下降；拮抗 Ang II 引起的肾小球细膜细胞收缩及水钠重吸收[1]。通过上述作用，肾功改善。PGE_1 在改善肾功能同时贫血也得到改善，可能与肾血供增加，促红细胞生成素合成增加及肾功能改善后人体内环境趋于稳定后，抑制红细胞生成的因子减少，红细胞脆性下降有关[2]。②慢性肾功能不全肾衰竭期病例在传统治疗基础上加用 PGE_1 其疗效没有进一步改善，可能与肾间质纤维化广泛、严重、肾血管床稀少，PGE_1 难以发挥效应有关。

此外，治疗糖尿病肾病引起的慢性肾功能不全，无论是否使用了 PGE_1，其肾功能改善程度均较差，原因有待进一步研究。我们仅对 PGE_1 治疗慢性肾功能不全作了近期疗效观察，其远期疗效有待进一步研究。本组患者用 PGE 后部分患者有头痛、静脉炎、腹泻，但均能耐受。

关键词：慢性肾功能不全；前列腺素
中图法分类号：R692.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 叶任高，陆再英. 内科学[M]. 第 5 版. 北京：人民卫生出版社，2001. 514.

[2] 陈主初，五树人. 病理生理学[M]. 北京：人民卫生出版社，2001. 379—385.

（编辑 张大春）

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