

• 实验研究 •

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体联合化疗药物杀伤胰腺癌细胞的研究

公伟 李占元 曾庆东 梁飞 吕斌 王磊 周勇 刘军

【摘要】目的 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体以及联合应用亚毒性剂量的化疗药物对胰腺癌的治疗作用。**方法** 半定量 RT-PCR 检测 TRAILR mRNA 在胰腺癌细胞株 Canpan-2 中的表达。DNA 琼脂糖凝胶电泳检测细胞凋亡情况。应用不同浓度的 TRAIL 及联合亚毒性剂量的氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、吉西他滨(gemcitabin)处理胰腺癌细胞,通过 MTT 法检测细胞毒性作用,流式细胞仪分析细胞凋亡率。**结果** 死亡受体 DR4、DR5 及诱骗受体 DcR1、DcR2 在胰腺癌细胞株 Canpan-2 中均有表达。DNA 琼脂糖凝胶电泳可见到典型的凋亡梯形带。TRAIL100 ng/ml 作用胰腺癌细胞 24 h 后,细胞杀伤率为(29.5±1.2)%,且其作用存在浓度依赖性;联合应用亚毒性剂量的氟尿嘧啶、吉西他滨能够大大提高 TRAIL 的细胞毒活性,杀伤率分别为 TRAIL+氟尿嘧啶(43.7±1.4)%, TRAIL+吉西他滨(49.8±1.2)%,联合用药前后差异有显著性($P<0.01$)。**结论** TRAIL 受体在胰腺癌细胞普遍表达,并存在受体类型的表达差异;TRAIL 与化疗药物氟尿嘧啶、吉西他滨有协同杀伤胰腺癌细胞的作用。

【关键词】 胰腺肿瘤; TRAIL; 化疗; 细胞凋亡

Synergistic cytotoxic effects of TRAIL and chemotherapeutic agents on pancreatic carcinoma cells GONG Wei, LI Zhanyuan, ZENG Qingdong, et al. Organ Transplantation Center, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, P. R. China

【Abstract】Objective To investigate the synergistic cytotoxic effects of TRAIL and chemotherapeutic agents on pancreatic carcinoma cells. **Methods** The expression of TRAILR mRNA was assayed by semiquantitative RT-PCR in pancreatic carcinoma cell line of Canpan-2. DNA ladder assay was employed for the determination of cell apoptosis. After the pancreatic carcinoma cells were exposed to different concentrations of TRAIL and subtoxic chemotherapeutic agents, the cytotoxicity was detected by MTT assay and the apoptotic rate determined by flow cytometry. **Results** The expression of death receptor 4 (DR4), death receptor 5 (DR5), decoy receptor 1 (DcR1) and decoy receptor 2 (DcR2) was found in the pancreatic carcinoma cells. There were characteristic ladder bands after Canpan-2 was treated by TRAIL (100ng/ml) for 24 h. After the pancreatic carcinoma cells were exposed to 100ng/ml TRAIL for 24h, the killing rate was (29.5±1.2)% and the chemotherapeutic agents dramatically augmented TRAIL-induced cytotoxic function. There was significant difference in the cytotoxicity between the group of single agent and that of agents in combination with TRAIL. **Conclusions** TRAILR expression is prevalent in pancreatic carcinoma cells with existence of different receptors. The combination of human TRAIL with chemotherapeutic agents such as 5-Fu and gemcitabine can exert synergistic effects on pancreatic carcinoma.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; TRAIL; Chemotherapy; Apoptosis

肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是新近发现的肿瘤坏死因子家族成员,体内外实验表明 TRAIL 可选择性的诱导某些肿瘤细

胞凋亡,而对大多数正常细胞无明显的杀伤作用^[1,2]。本研究采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TRAIL 受体在胰腺癌细胞株 Canpan-2 中的表达情况,并探讨 TRAIL 对胰腺癌细胞的作用,以及 TRAIL 联合亚毒性剂量的化疗药物氟尿嘧啶、吉西他滨是否具有协同作用,为 TRAIL 的临床应用提供依据。

作者单位:250012 济南市,山东大学齐鲁医院普外科(公伟、李占元、曾庆东、吕斌、王磊、周勇);作者现工作单位:250021 山东省立医院器官移植中心(公伟、刘军);普外科(梁飞)

材料与方 法

1. 主要试剂和材料:人重组 TRAIL 蛋白购自英国 Peptotech 公司,MTT、氟尿嘧啶为美国 Sigma 公司产品,吉西他滨为法国 Lilly 公司产品,MMLV 逆转录酶为 Promega 公司产品,Taq DNA 聚合酶购自上海博亚生物公司。Alphalmager2200 凝胶电泳扫描仪为美国 Alpha Innotech 公司产品。Annexin V 试剂盒购自美国 Beckman 公司,MS 型酶标仪为芬兰 Maltiskan 公司产品,Epics XL 型流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品。

2. 细胞培养:人胰腺癌细胞株 Canpan-2 细胞在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下,培养于含 10% 灭活的小牛血清(杭州四季青公司)、100U/ml 青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司)中,0.25% 胰蛋白酶消化,2~3 d 传代一次。实验时取对数生长期细胞。

3. RT-PCR:异硫氰酸胍法提取总 RNA,取 5μl 总 RNA 逆转录合成 cDNA,5μl cDNA 进行 PCR 反应。各引物序列见表 1,扩增片断长度分别为 525,567,550,464,298bp。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,56℃ (DR4、DcR1、β-actin) 或 61℃ (DR5、DcR2) 退火 45 s,72℃ 延伸 45s,循环 30 次,末次 72℃ 延长 7 min。取 RT-PCR 产物 10 μl,加入 1.5% 琼脂糖凝胶中(含少量溴化乙锭),75V 电泳 40 min;电泳结果用凝胶成像分析系统照相并测出 TRAIL 受体与 β-actin 的吸光度值,以 TRAIL 受体与 β-actin 吸光度值的比值,表示 TRAIL 受体的相对表达强度。

4. DNA 琼脂糖凝胶电泳:将不同组(TRAIL 100 ng/ml 处理 24 h 组和不加 TRAIL 对照组)5×10⁵ 个细胞分别移入 1.5 ml EP 管中,4℃ 2000 r/min 离心 5 min,弃上清,加 20 μl 细胞裂解液,充分混匀后,再加 10 μl RNA,37℃ 水浴孵育 1 h,加蛋白酶 K 20 μl(10 mg/ml),50℃ 孵育 2 h。取 20 μl DNA 样品加入 2% 琼脂糖凝胶中,35V 电泳 4 h,凝胶电泳扫描仪照相观察。

5. MTT 细胞毒性分析:将生长状态良好的 Canpan-2 胰腺肿瘤细胞,调整密度为 5×10⁴,每孔 100 μl 接种于 96 孔培养板,培养 24 h 后弃上清,换成含不同浓度 TRAIL(1,25,50,100,200,400 ng/ml) 并选择合适的剂量和亚毒性剂量的化疗药(氟尿嘧啶 0.1 μg/ml,吉西他滨 0.3 μg/ml)联合作用,每孔 100 μl,每个浓度 3 个复孔,并设置无药物对照组和万方数据

空白对照组。作用 24 h 后,每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续孵育 4 h,小心吸弃上清,每孔加入 150 μl DMSO,酶标仪测定各孔的吸光度 A_{570 nm} 值。细胞抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。实验重复 3 次。

6. 细胞凋亡分析:将胰腺癌细胞 1×10⁶ 个接种于 100 ml 培养瓶中,培养 24 h 后吸弃培养液,分别加入含 100 ng/ml TRAIL、0.1 μg/ml 氟尿嘧啶、0.3 μg/ml 吉西他滨、100 ng/ml TRAIL 和 0.1 μg/ml 氟尿嘧啶、100 ng/ml TRAIL 和 0.3 μg/ml 吉西他滨的培养液,作用 24 h 后收集细胞,PBS 液洗 2 次后加入 300 μl Binding Buffer。加入 Annexin V-FITC 和碘化丙锭(PI),4℃ 避光孵育 15 min,流式细胞仪检测凋亡率。

7. 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件对相关数据进行单因素方差分析和 t 检验。

表 1 TRAIL 受体及 β-actin 引物序列

引物名称	序 列
DR4	上游引物 5'-CTTCAAGTTTGTGTCGTCGTCG-3' 下游引物 5'-GAGCCGATGCAACAACAGAC-3'
DR5	上游引物 5'-GCGGTCTCTGCTGTTGGTCTC-3' 下游引物 5'-GCTTCTGTCCACACGCTCAG-3'
DcR1	上游引物 5'-ACATACTGGAGCCTGTAACC-3' 下游引物 5'-GGTGCATGAGAGGTAATGAG-3'
DcR2	上游引物 5'-CTTTTCCGGCGGGCGTTCATGTCCTTC-3' 下游引物 5'-GTTTCTTCCAGGCTGCTTCCCTTTGTAG-3'
β-actin	上游引物 5'-CGCGGCTACAGCTTACCACG-3' 下游引物 5'-GCGTACAGGCTTTGCGGATG-3'

结 果

1. TRAIL 受体的表达:RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,凝胶电泳扫描仪照相,与 Marker 对照,于相应扩增片断长度处出现发亮的荧光即表示有相应 TRAIL 受体的表达。结果表明死亡受体 DR4、DR5 及诱骗受体 DcR1、DcR2 在 Canpan-2 细胞中均有表达(图 1)。半定量分析表明,死亡受体 DR4、DR5 呈高水平表达,分别为 0.634±0.032 和 0.742±0.043。而诱骗受体 DcR1、DcR2 仅呈中低水平表达,分别为 0.376±0.015 和 0.383±0.046。

2. DNA 琼脂糖凝胶电泳:药物处理组呈现典型的凋亡梯形带,而对照组仅显示基因组 DNA(图 2)。

3. MTT 细胞毒性分析: MTT 结果显示,

TRAIL 可有效的杀伤胰腺癌 Canpan-2 细胞,其作用随药物浓度的提高而增强,呈现一定的剂量依赖性(图 3)。TRAIL 1 ng/ml 只杀伤约(6.8±0.8)% 的细胞,TRAIL 100 ng/ml 及 400 ng/ml 作用 24 h 的杀伤率分别为(29.5±1.2)%、(42.8±1.5)% ,不同浓度作用组相比,差异均具有显著性($P<0.05$)。不同浓度的 TRAIL 与亚毒性剂量的氟尿嘧啶联合应用时,TRAIL100 ng/ml 与 0~50 ng/ml 相比,对细胞的杀伤率显著增加;与 200~400 ng/ml 相比,杀伤率无明显差异。表明 100 ng/ml 是 TRAIL 与亚毒性剂量的化疗药物联合应用的最佳剂量。单独应用亚毒性剂量的化疗药物对胰腺癌细胞仅有微弱的杀伤作用,结果分别为:氟尿嘧啶(9.2±0.5)%、吉西他滨(11.5±0.7)% ;而联合使用 100 ng/ml TRAIL 和亚毒性剂量的化疗药物能够大大提高杀伤率,结果分别为:TRAIL+ 氟尿嘧啶(43.7±1.4)% ,TRAIL+ 吉西他滨(49.8±1.2)% 。联合用药前后差异有显著性($P<0.01$),说明氟尿嘧啶和吉西他滨可以显著提高 TRAIL 的杀伤率。

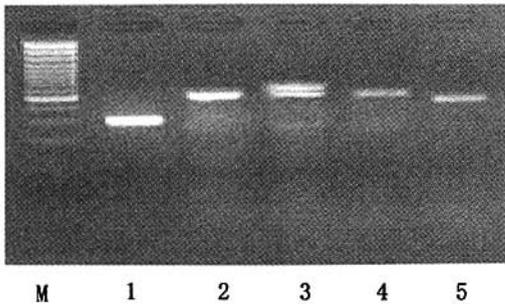


图 1 TRAIL 受体在 Canpan-2 细胞中的表达
M: Marker 1: DR4 2: DR5 3: DcR1 4: DcR2

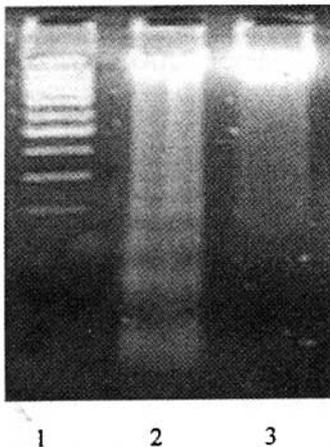


图 2 Canpan-2 细胞经 TRAIL 作用后 DNA 凝胶电泳
1: Marker 2: TRAIL 作用组 3: 对照组
万方数据

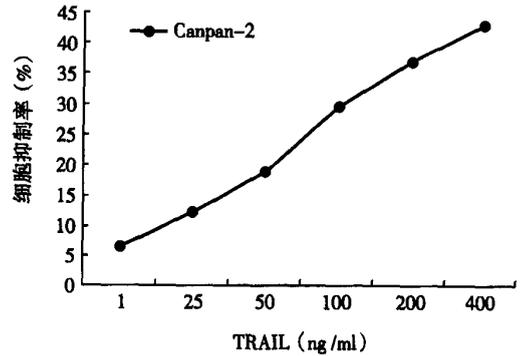


图 3 TRAIL 对胰腺癌 Canpan-2 细胞生长抑制率的量效曲线

4. 流式细胞仪检测结果: Canpan-2 细胞经 TRAIL (100 ng/ml) 处理 24 h 后,凋亡率为 21.3%,与无药物组有显著性差异;单独应用亚毒性剂量的化疗药物的凋亡率分别为氟尿嘧啶 1.5%,吉西他滨 2.1%;TRAIL 与亚毒性剂量的化疗药物联合应用时,凋亡率分别为 TRAIL+ 氟尿嘧啶(42.2%),TRAIL+ 吉西他滨(51.5%),见图 4。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,诱导细胞的凋亡率均显著增加($P<0.01$)。

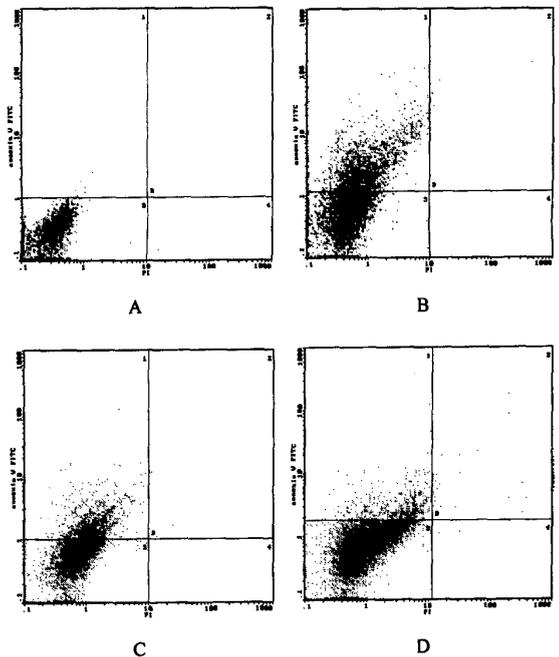


图 4 TRAIL 和亚毒性剂量的化疗药物对 Canpan-2 细胞凋亡的影响

A: 对照组 B: TRAIL 100 ng/ml+ 氟尿嘧啶 0.1 μg/ml
C: TRAIL 100ng/ml D: TRAIL 100 ng/ml+ gemcitabin 0.3 μg/ml

讨 论

TRAIL 是继 TNF 和 FasI 之后发现的第 3 个 TNF 超家族中的凋亡分子,它表达于人体多种正常组织,通过与特异性受体结合,可以诱导转化细胞、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,且其作用为 p53 非依赖性,因此 TRAIL 在肿瘤的治疗中具有良好的应用前景。

TRAIL 有两类特异性受体:死亡受体 DR4、DR5 和诱骗受体 DcR1、DcR2。DR4 和 DR5 具有与 TNF 受体超家族其它成员类似的胞浆死亡区,与 TRAIL 特异性结合后可通过死亡结构域激发和传导凋亡信号,激活 caspase 蛋白酶级联反应,导致细胞死亡。DcR1 和 DcR2 的胞外区均有 2 个与 DR4、DR5 高度同源的富含半胱氨酸的重复序列,但是 DcR1 无胞内区,DcR2 的胞内死亡区不完整,呈无功能的截断状态。因此 DcR1 和 DcR2 与 TRAIL 结合后都不能传导凋亡信号,其可溶性形式能与 DR4 和 DR5 竞争,同 TRAIL 结合,抑制配体介导的细胞凋亡。本研究显示死亡受体 DR4、DR5 及诱骗受体 DcR1、DcR2 在 Canpan-2 细胞中均有表达,但存在受体表达类型的差异,死亡受体的表达明显高于诱骗受体。这提示死亡受体在 TRAIL 诱导胰腺癌细胞的过程中发挥重要作用,同时说明胰腺癌细胞在受体水平上对 TRAIL 敏感。

本试验应用纯化重组的 TRAIL 作用于胰腺癌细胞株 Canpan-2,发现它对胰腺癌细胞株有明显的杀伤作用,且这种作用存在剂量依赖性,这为 TRAIL 应用于临床治疗胰腺癌提供了实验依据。DNA 断裂是凋亡细胞的特征之一,我们应用 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测发现,经 TRAIL 处理的肿瘤细胞出现典型的 DNA 梯形带,说明细胞发生了凋亡。同时流式细胞仪检测结果与 MTT 的结果相一致,也说明这种杀伤作用主要是通过诱导细胞凋亡实现的。近年来,有研究表明一些临床常用化疗药

物可增强 TRAIL 杀伤细胞的作用^[3]。我们的实验结果显示,单独应用 TRAIL 及亚毒性剂量的化疗药物对胰腺癌细胞仅有微弱的杀伤作用,而联合使用 TRAIL 和亚毒性剂量的化疗药物能够大大提高杀伤率。这种协同作用可能是化疗药物抑制细胞凋亡抑制分子或 TRAIL 诱捕型受体的表达,或上调了死亡受体的水平,亦或是高效激活凋亡链中的 caspase-8 而促进 TRAIL 的凋亡诱导作用^[4~6],从而使对化疗药物耐受的肿瘤对 TRAIL 联合化疗药物诱导的凋亡敏感。

化疗是胰腺癌的重要治疗手段,但胰腺癌对化疗并不敏感,并且化疗药物的毒副作用和耐药性增加了临床治疗难度。化疗药物与 TRAIL 联合应用可以大大降低化疗药物的剂量,减少全身毒副作用,同时化疗药物还可加强 TRAIL 杀伤肿瘤细胞的作用。本研究结果表明,TRAIL 联合化疗药物对胰腺癌治疗有一定的应用前景。

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. *Immunity*, 1995, 3: 673-682.
- 2 Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 1999, 104: 155-162.
- 3 Takenari Y, Katsuya S, Kazuashi S, et al. Chemotherapy agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology*, 2000, 32: 482-490.
- 4 Liu WH, Bodle E, Jessica Y, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 7: 111-120.
- 5 Lacour S, Hammann A, Wotawa A, et al. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res*, 2001, 61: 1645-1651.
- 6 Xing H, Fox JA, Totpal K, et al. Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT-11 co-treated is associated with p21 cleavage and differential regulation of by Apo2L/TRAIL ligand and its receptors. *Oncogene*, 2002, 21: 3611-3619.

(收稿日期:2004-10-29 修回:2005-04-18)