

TRAIL 受体在胰腺癌中的表达及意义

公伟¹ 梁飞² 李占元³ 曾庆东³ 刘军¹ 王磊³ 吕斌³ 周勇³

山东省立医院 ¹ 器官移植中心 ³ 普外科 (山东 济南 250021)

² 山东大学齐鲁医院 普外科 (山东 济南 250012)

【摘要】目的:研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)受体在胰腺癌中的表达及意义。方法:应用半定量 RT-PCR 检测 TRAILR mRNA 在胰腺癌组织、正常胰腺组织及胰腺癌细胞系 ASPC-1、Canpan-2 中的表达。结果:死亡受体 DR4、DR5 在所有胰腺癌组织、正常胰腺组织及胰腺癌细胞系中均有表达,诱骗受体 DcR1、DcR2 在所有正常胰腺组织及细胞系中均有表达。死亡受体 DR4、DR5 在胰腺癌组织中有较高的表达,而在正常胰腺组织中呈中低水平表达($P < 0.01$)。胰腺癌细胞系中死亡受体 DR4、DR5 呈高水平表达,而诱骗受体 DcR1、DcR2 仅呈中低水平表达。结论:TRAIL 受体在胰腺癌普遍表达,并在受体类型的表达差异,死亡受体在胰腺癌中高表达,可能在 TRAIL 诱导胰腺癌细胞凋亡的机制中发挥重要的作用。

【关键词】胰腺肿瘤·肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体·肿瘤坏死因子相关凋亡配体受体

【中图分类号】R735.9

【文献标识码】A

【文章编号】1009-9905(2005)05-0281-03

Expression and significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors in pancreatic carcinoma

GONG Wei¹ , LIANG Fei² , LI Zhan-yuan³ , ZENG Qing-dong³ , LIU Jun¹ , WANG Lei³ , Lü Bin³ , ZHOU Yong³

¹Center of organ Transplantation , ³Department of General Surgery , Shandong Provincial Hospital(Jinan 250021 , China)

²Department of General Surgery , Qilu Hospital of Shandong University(Jinan 250012 , China)

【ABSTRACT】Objective: To investigate the expression and significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) receptors in pancreatic carcinoma. **Methods:** The expression of TRAILR mRNA was assayed by semiquantitative RT-PCR in 30 pancreatic carcinoma tissues , 18 normal pancreatic tissues and 2 pancreatic cancer cell lines of ASPC-1、Canpan-2. **Results:** The expression of death receptor 4(DR4) and death receptor 5(DR5) was detected in all pancreatic carcinoma tissues , normal pancreatic tissues and pancreatic cancer cell lines , decoy receptor (DcR1) and decoy receptor 2(DcR2) were expressed in normal pancreatic tissues and pancreatic cell lines. The expression of DR4 and DR5 in the pancreatic carcinoma tissues was significantly higher than that in the normal pancreatic tissues($P < 0.01$).

Conclusion: TRAILR expression is prevalent in pancreatic tissues with different receptor types existing. High death receptor expression may play an important role in TRAIL inducing pancreatic carcinoma apoptosis.

【KEY WORDS】Pancreatic neoplasms · TRAIL · TRAIL receptor

检测 TRAIL 受体在胰腺癌组织、正常胰腺组织及两株胰腺癌细胞系中的表达分布情况,为探讨 TRAIL 诱导胰腺癌凋亡的作用机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌组织 30 例,为 2002~2004 年山东大学齐鲁医院普外科及山东省立医院普外科手术标本,18 例正常胰腺组织来源于同期切除良性胰腺肿瘤的边缘正常组织,所有标本均在手术切除后迅速冻存于液氮中,然后 -80℃ 低温保存。全部病例术前均未经放化疗,术后经病理检查证实。人胰腺癌细胞株 ASPC-1 来自中国科学院上海细胞研究所,Canpan-2 细胞株来自北京协和医院病理教研室。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 RPMI1640 培养液(Gibco 公司)中。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。AlphaImager2200 凝胶电泳扫描仪为美国 Alpha Innotech 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计和合成 根据文献^[5,6],设计了 DR4、DR5、DcR1、DcR2 及内参照 β-actin 的引物,序列如表 1 所示,扩增片段分别为 525bp、567bp、550bp、464bp、和 298bp。上述引物均由上海博亚生物公司合成。

表 1 5 种引物序列

引物名称	序列
DR4	上游引物 5'-CTTCAAGTTTGTCTGCTCG-3'
	下游引物 5'-GAGCCGATGCAACAACAGAC-3'
DR5	上游引物 5'-GCGGTCCTGCTGTTGGTCTC-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'-CTTTTCCGGCGGCTTCATGCTCCTC-3'
	下游引物 5'-GTTTCTCCAGGCTGCTTCCCTTTGTAG-3'
β-actin	上游引物 5'-CGCGGCTACAGCTTACCACG-3'
	下游引物 5'-GCCGTACAGTCTTTGCCGATG-3'

1.2.2 RT-PCR

1.2.2.1 RNA 的提取 肿瘤细胞培养至对数生长期时,消化、离心收集,取约 5 × 10⁶ 个细胞,加预冷变性液 500μl,充分摇动,使细胞裂解完全。取 100mg 组织置组织匀浆器中,加预冷变性液 500μl,在冰浴中充分匀浆,加乙酸纳 50μl,颠倒混匀。加水饱和酚 500μl,氯仿/异戊醇(49:1)100μl,剧烈振荡混匀,置冰上 10min。4℃ 离心,14000r/min × 10min。小心吸取上层含有 RNA 的水相,并转移至一新的离心管中。加入等体积的异丙醇,置 -20℃ 至少 30min,沉淀 RNA。4℃ 离心,14000r/min × 10min,弃上清。加入 75% 乙醇 700μl,洗涤 RNA 沉淀 2 次。4℃ 离心,14000r/min × 10min,弃上清,将沉淀晾干。加入适量 DEPC 水 20~30μl 溶解 RNA。

1.2.2.2 逆转录反应 取总 RNA 5μl, Olig(dT) 1μl, dH₂O 5μl, 70℃ 5min 后,冰上放置 2min,再加入 5 × buffer 4μl, dNTP 2μl, Rnase inhibitor 0.5μl, dH₂O 1.5μl, 37℃ 5min。加 MMLV 1μl, 42℃ 1h, 70℃ 10min, 4℃ 取出, -20℃ 保存。

1.2.2.3 PCR 反应 20μl PCR 反应体系中,分别含有 cDNA 2μl, 上下游引物(12.5μmol/L) 0.8μl, 10 × PCR Buffer 2μl, MgCl₂ 1.2μl, dNTP 0.4μl, Taq 酶 0.1μl。DR4、DcR1 及 β-actin 的反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 56℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s, 循环 30 次, 末次 72℃ 延长 7min。DR5、DcR2 的反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 61℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 45s, 循环 30 次, 末次 72℃ 延长 7min。

万方数据 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析 取 RT-PCR

产物 10μl, 加入 1.5% 琼脂糖凝胶中(含少量溴化乙锭), 75V 电泳 40min, 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。

1.3 统计学分析 采用 SPSS10.0 对相关数据进行分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

死亡受体 DR4、DR5 在所有胰腺癌组织、正常胰腺组织及胰腺癌细胞系中均有表达,诱骗受体 DcR1、DcR2 在所有正常胰腺组织及胰腺癌细胞系中均有表达,而在胰腺癌组织仅有 18 例表达诱骗受体 DcR1, 20 例表达诱骗受体 DcR2。TRAIL 受体 DR4、DR5、DcR1、DcR2 及内参照 β-actin 的 RT-PCR 产物,琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。半定量分析表明,死亡受体 DR4、DR5 在胰腺癌组织中有较高的表达,而在正常胰腺组织中呈中低水平表达。胰腺癌组织中的 DR 表达量显著强于正常胰腺组织(P < 0.01)。胰腺癌细胞系中死亡受体 DR4、DR5 呈高水平表达,而诱骗受体 DcR1、DcR2 仅呈中低水平表达。见表 2。

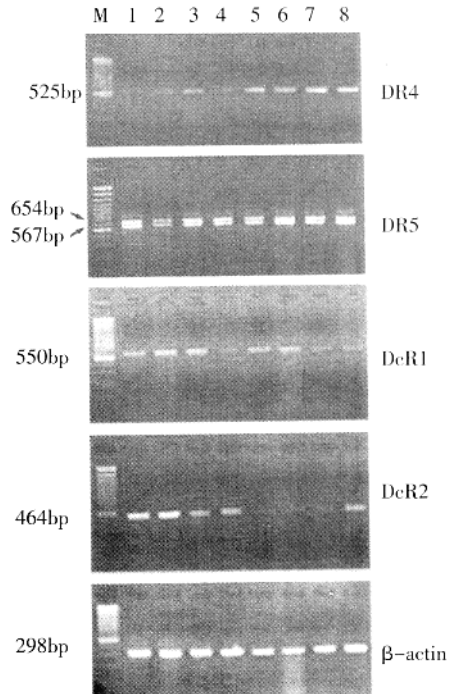


图 1 DR4、DR5、DcR1、DcR2 和 β-actin 在胰腺癌组织、正常胰腺组织和胰腺癌细胞中的表达
M: 100bp Marker 1、2、3 正常胰腺组织 4: ASPC-1 5: Canpan-2 6、7、8 胰腺癌组织

表 2 胰腺癌、正常胰腺与胰腺癌细胞株 TRAIL 受体表达水平的比较

组别	DR4	DR5	DcR1	DcR2
胰腺癌组织	0.651 ± 0.021	0.881 ± 0.009	0.448 ± 0.021	0.520 ± 0.42
正常胰腺组织	0.364 ± 0.021	0.431 ± 0.020	0.518 ± 0.040	0.468 ± 0.051
胰腺癌细胞株				
ASPC-1	0.616 ± 0.021	0.792 ± 0.031	0.299 ± 0.016	0.431 ± 0.026
Canpan-2	0.634 ± 0.032	0.742 ± 0.043	0.376 ± 0.015	0.383 ± 0.076

3 讨论

TRAIL 又称 Apo-2L, 是由 Wiley^[1]于 1995 年发现并克隆成功的,它是继 TNF 和 FasL 之后发现的第 3 个 TNF 超家族中的凋亡分子。TRAIL 表达于人体多种正常组织,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。TRAIL 通过与靶细胞膜相应的受体结合而发挥生理作用,目前发现 TRAIL 有 5 个受体^[7-9]: 死

亡受体 DR4、DR5, 诱骗受体 DcR1、DcR2 及可溶性受体 OPG。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 蛋白酶解级联反应, 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 竞争与 TRAIL 的结合, 抑制配体介导的细胞凋亡。OPG 在体内有抑制破骨和增加骨密度的功能, 并与 TRAIL 有交叉性调节作用, 但是不能诱导细胞凋亡。TRAIL 受体的发现揭示了一种新的细胞凋亡调控机制, 即通过假受体竞争性抑制配体, 从而诱导细胞凋亡。

TRAIL 分子与其膜表面受体结合, 是 TRAIL 发挥其诱导凋亡功能的关键一步。研究 TRAIL 受体在胰腺癌中的表达, 对进一步研究 TRAIL 诱导胰腺癌细胞凋亡的机制具有重要的意义。研究发现, 死亡受体 DR4 和 DR5 在许多肿瘤细胞和正常细胞都有不同程度的表达, 而诱骗受体 DcR1 和 DcR2 多在正常细胞中高表达, 肿瘤细胞常缺乏表达。我们的研究发现, 胰腺癌组织普遍存在 TRAIL 受体的表达, 并存在受体类型的表达差异, 肿瘤组织中的 DR 表达量显著强于正常胰腺组织 ($P < 0.01$)。胰腺癌组织中死亡受体 DR4、DR5 高表达, 可能在 TRAIL 诱导胰腺癌细胞凋亡的机制中发挥重要的作用。但 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的敏感性是否与死亡受体的表达水平相一致, 尚待进一步研究证实。另外, 诱骗受体 DcR1、DcR2 在胰腺癌组织、正常胰腺组织及胰腺癌细胞系中均有不同程度的表达, 说明 TRAIL 受体分布的差异性, 并非 TRAIL 通路选择性杀伤作用的唯一因素, 除受体调控模式外, 还应当有其它的因素参与。

目前发现许多抗肿瘤治疗与诱导肿瘤细胞凋亡有关, 但诸多诱导凋亡物质可引起非选择性杀伤作用或其他副作用而难以进入临床作用, 如 TNF 启动严重的炎症反应, Fas 引起严重的肝损伤。研究表明, TRAIL 在体内外均具有选择性

诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 而未发现明显的副作用, 且其作用为 P53 依赖性, 因此 TRAIL 在肿瘤的治疗中具有良好的应用前景, 可能为胰腺癌提供一种新的治疗途径。

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, 2(6): 673-682.
- [2] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104: 155-162.
- [3] 王亚军. TRAIL 在胰腺癌研究中的进展 [J]. 中国现代普通外科进展 2004, 2(4): 198.
- [4] 张秋. TRAIL 与消化系统肿瘤 [J]. 中国现代普通外科进展, 2003, 6(3): 141.
- [5] Weihong L, Ethan B, Jessica YC, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and chemotherapy cooperate to induce apoptosis in mesothelioma cell lines [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 25: 111-118.
- [6] Kennichi S, Kenzo K, Morihisa H, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. [J]. *Pancreas*, 2001, 23(3): 251-258.
- [7] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. *Science*, 1997, 276: 111-113.
- [8] Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL [J]. *Science*, 1997, 277: 815-818.
- [9] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 14363-14367.

(收稿日期 2005-05-06)

文章编号: 1009-9905(2005)05-0283-01

静脉注射自控镇痛与硬膜外自控镇痛在腹部术后的应用观察

孙绪杰¹ 王少燕² 乔筱玲¹ 吴小鹏¹

山东大学齐鲁医院 ¹ 普外科 ² 感染科 (山东 济南 250012)

1 资料和方法

60 例腹部手术, 男 42 例, 女 18 例, 年龄 32~60 岁。胃癌根治术 38 例, 结肠癌手术 22 例。分成静脉注射芬太尼自控镇痛组 (PCIA) 和硬膜外芬太尼自控镇痛组 (PCEA) 各 30 例, 均采用静脉复合麻醉 (芬太尼 + 司可林 + 安氟醚)。PCEA 组在麻醉前先行硬膜外穿刺 (结肠癌手术行 T10~11 穿刺置管, 胃癌手术行 T8~9 穿刺置管)。

术后镇痛方法: 手术结束后 PCEA 组经硬膜外导管注入芬太尼 0.1mg (用 0.9% 生理盐水稀释到 5ml), 后接 PCEA 装置; PCIA 组在静脉穿刺套管针联结 PCIA 装置。PCEA 组 0.004% 芬太尼 + 0.15% 布匹卡因 + 5mg 氟哌啶 + 生理盐水共 100ml; PCIA 组 0.004% 芬太尼 + 5mg 氟哌啶 + 生理盐水共 100ml。背景速率 2ml/h。分别于手术后 8、16、24、48h 采用视觉模拟评分法 (VAS) 对各时段疼痛程度进行评分, 对恶心、呕吐情况进行评分, 记录肠蠕动恢复时间, 术后 48h 拔除尿管, 记录尿管留置发生的例数。记录各时段平均动脉压和呼吸频率。术后 48h 对两种镇痛方法满意率按差、一般、良好、优秀进行评级。

2 结果

两组病人一般情况、手术时间及全麻药用量无统计学差异, 两组病人在术后 VAS 评分均较低 ($P > 0.05$), 说明

两种镇痛方法均有效。两组恶心、呕吐发生率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。肠蠕动恢复时间 PCEA 组平均为 60.9h, PCIA 组为 58.8h ($P < 0.05$), PCEA 组尿潴留发生率 (6例 20%) 高于 PCIA 组 (0例) ($P < 0.05$)。两组患者术后各时段呼吸频率及平均动脉压均在正常范围内且无统计学差异 ($P > 0.05$)。术后镇痛优良满意率 PCIA 组 (93.3%) 高于 PCEA 组 (83.3%) ($P < 0.05$)。

3 讨论

采用 PCEA 和 PCIA 在腹部手术都有良好的镇痛效果。本资料两组患者恶心、呕吐均有发生, 但发生率较低, 这可能与应用氟哌啶有关。而 PCEA 组较 PCIA 组尿潴留发生率高和肠蠕动恢复时间慢, 这可能与采用 PCEA 镇痛法, 镇痛药物含有局麻药有关。PCIA 组与 PCEA 组术后平均动脉压及呼吸频率均在正常范围, 说明两种镇痛方式较安全。

PCEA 与 PCIA 行腹部手术后止痛均有良好的镇痛效果, 但 PCIA 组较 PCEA 组相比肠蠕动恢复时间快, 尿潴留发生率低, 病人整体满意率高。因此, 腹部手术后镇痛应提倡使用 PCIA 镇痛法。

(收稿日期 2005-01-26)