

文章编号:1005-6947(2008)01-0021-04

· 肝肿瘤专题研究 ·

TRAIL联合喜树碱体外诱导肝癌细胞凋亡的研究

王广义, 吕国悦, 张平, 张强, 纪柏, 孟宪瑛

(吉林大学第一医院 普通外科, 吉林 长春 130021)

摘要: **目的** 探讨喜树碱增加 TRAIL 诱导肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡能力的分子机制。**方法** 应用流式细胞仪分析 TRAIL 单独或联合应用喜树碱对肝癌细胞系 HepG2 和 Hep3B 细胞凋亡的影响; Western blot 检测 HepG2 和 Hep3B 细胞在处理前后凋亡信号传导蛋白 caspase-8, caspase-3, caspase-9, DR4, DR5, DcR1, c-FLIP, RIP, cytc, Smac 和 Bid 表达的变化。**结果** 喜树碱能增强 TRAIL 诱导肝癌细胞凋亡的能力, 两者联用具有明显的协同作用。喜树碱预先处理能下调 c-FLIP 及 RIP 的表达及增加 cytc, Smac, Bid 的表达, 但对 DR4, DR5, DcR1 的表达无明显影响。**结论** TRAIL 联合喜树碱可以诱导肝癌细胞凋亡; 其机制是下调 c-FLIP 及 RIP 的表达, 活化凋亡发生的死亡受体通路, 上调 Bid 的表达激活线粒体通路。死亡受体的表达不参与这一变化过程。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 21-24]

关键词: 肝肿瘤; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Study of TRAIL combined with camptothecin in induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines

WANG Guangyi, LU Guoyue, ZHANG Ping, ZHANG Qiang, JI Bai, MENG Xianying

(The Department of General Surgery, the First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism of camptothecin enhancement of TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines. **Methods** The HepG2 and Hep3B cell cycles were analysed by flow cytometry after co-treated with camptothecin and TRAIL, and the expression of signal transduction protein, such as Caspase-8, Caspase-3, Caspase-9, DR4, DR5, DcR1, c-FLIP, RIP, Cytc, Smac, Bid were detected by Western blot before and after the treatment. **Results** Pretreatment with lower dose of Camptothecin could increase the sensitivity of HepG2 and Hep3B cells to TRAIL-induced apoptosis, and could downregulate the expression of c-FLIP and RIP, upregulate the expression of Cytc, Smac and Bid, but had no effect on the expression of DR4, DR5 and DcR1. **Conclusions** Camptothecin could sensitize HepG2 and Hep3B cells to TRAIL-induced apoptosis, and the mechanism is by downregulation of c-FLIP and RIP, activation of apoptosis death receptor pathway, upregulation of Bid and amplification of the mitochondrial pathway. The expression of death receptor not involved in this process.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 21-24]

Key words: Liver Neoplasms; TRAIL; Apoptosis

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期:2007-04-28; 修订日期:2007-08-16。

作者简介:王广义,男,吉林大学第一医院教授,主要从事器官移植及腹腔镜外科方面的研究。

通讯作者:吕国悦 E-mail:lgy08@sina.com

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 虽然能诱导大多数肿瘤细胞发生凋亡, 但其单独用药在肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的治疗上作用有限^[1]。本实验利用小剂量常用化疗药物喜树碱 (camptothecin, CPT) 联合 TRAIL 处理 HCC 细胞系 HepG2 和 Hep3B, 旨在探讨其是否能增强 TRAIL 诱导肝癌细胞的凋亡能力及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和抗体

肝癌细胞系 HepG2 和 Hep3B 购自 ATCC 公司; 重组可溶性 TRAIL 由 PeproTech 公司 (Rocky Hill, NJ) 提供; CPT 购自 Sigma 公司, 以 DMSO 配制成 50 mg/mL 的溶液常温避光保存; 鼠单克隆抗 caspase-8, 9, 抗 cFLIP, 抗 RIP 抗体购自 Alexis 公司; 兔多克隆抗 caspase-3, 抗 ERK1/2, 抗 DR4, DR5, DcR1 抗体购自 Stress Gen Biotechnologies 公司; 抗 cytc, Smac, Bid 抗体购自 BD Pharmingen 公司; HRP 标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗购自 Jackson IR Labs。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HepG2, Hep3B 使用 DMEM 高糖培养基 (内含 10% 小牛血清, 1% 青-链霉素合剂), 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。

1.2.2 细胞活力分析 采用酸性磷酸酶法 (acid phosphatase assay, AP), 将生长状态良好的各细胞系, 调整密度为 $(0.8 \sim 1.0) \times 10^5$ 个/mL, 每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 细胞贴壁后, 加入 100 μ L 可溶性 TRAIL 并使其终浓度分别为 10, 30, 100, 300, 1 000 ng/mL 总体积为 200 μ L, 每一浓度设 8 个复孔, 同时设无药物对照组和空白对照组。对于 TRAIL + CPT, 每孔 75 μ L 接种细胞于 96 孔板, 细胞密度为 10 000 个/孔; 待培养 24 h 细胞贴壁后, 加入 75 μ L CPT, 使其终浓度为 0.3, 0.6, 1.25, 2.5 μ g/mL, 8 h 后加入 50 μ L TRAIL, 使其终浓度为 100 ng/mL, 最后总体积为 200 μ L; 24 h 后, 弃每孔上清, 用预冷的 DPBS 200 μ L 洗 1 遍; 每孔加入 AP 检测液 100 μ L, 于 CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h 后, 每孔加入 10 μ L 1 mol 的 NaOH 终止反应。酶标仪上测定各孔在 405 nm 处的吸光度值, 取 8 孔的均值。细胞生存率 = 测得均值 A405 / 对照组均值 A405 \times 100%。以上实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.3 PI 单染色法流式细胞仪测定细胞晚期凋亡率 将 HepG2 和 Hep3B 细胞设置为对照组,

TRAIL (100 ng/mL) 组, CPT 组, CPT + TRAIL 组。TRAIL 作用 24 h 后消化收集细胞, 70% 乙醇避光固定过夜。最后将 0.5 mL 细胞悬液加入 1 mL PI 染色液中, 室温避光孵育至少 30 min。流式细胞仪分析, 每例标本测定 20 000 个细胞。实验结果使用 Cell Quest 软件分析, 比较各实验组 SubG₁, G₀/G₁, S, G₂/M 期百分率, 计算晚期细胞凋亡率。

1.2.4 免疫印迹 (Western blot) 检测细胞系凋亡相关蛋白的表达 收集不同处理组细胞标本, 使用细胞裂解液制备细胞总蛋白, 以 Bradford 蛋白分析系统按操作程序检测蛋白浓度。取等量总蛋白上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜过夜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入各种一抗 4℃ 过夜, 之后加入相应二抗室温孵育 1 h, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后, 加入显影剂, 暗室显影。

1.3 统计学处理

实验数据采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异采用 *t* 检验。P < 0.05 时为差异有显著性。

2 结果

2.1 HepG2 和 Hep3B 细胞对 TRAIL 单独用药的耐受性

HepG2 及 Hep3B 细胞经不同浓度的 TRAIL 处理 24 h 后, AP 法细胞活力分析显示: 1 000 ng/mL TRAIL 作用后, Hep3B 及 HepG2 细胞的生存率分别为 96.39% \pm 5.66% 及 96.91% \pm 5.69%, 与对照组 100% 相比, 无统计学差异 (P > 0.05)。

2.2 CPT 预处理后 HepG2 和 Hep3B 细胞对 TRAIL 敏感性的变化

不同浓度的 CPT (0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 μ g/mL) 预处理 8 h 后再应用 TRAIL (100 ng/mL) 处理 24 h, 结果显示: 当 CPT 浓度为 0.3 μ g/mL 时, CPT + TRAIL 组 HepG2 细胞生存率为 11.21% \pm 1.21%, 显著低于 CPT 组的 76.05% \pm 5.52% (P < 0.01)。对于 Hep3B 细胞, 当 CPT 浓度为 0.6 μ g/mL 时, CPT + TRAIL 组细胞生存率为 20.57% \pm 2.42%, 显著低于 CPT 组的 78.25% \pm 5.03% (P < 0.01)。细胞周期分析表明, 单独应用 CPT, 可以引起细胞生长的 S 期阻滞, 但细胞凋亡率较低, CPT 与 TRAIL 联用, 细胞明显出现 G₁ 期生长阻滞, 大量细胞明显形成了先于 G₁ 峰出现的 SubG₁ 凋亡峰, 在 CPT 浓度为 0.3 μ g/mL 及 0.6 μ g/mL 时, HepG2 及 Hep3B 的 SubG₁ 百分率分别为 93.15% \pm 6.14% 及 75.77% \pm 5.98%, 显著高于 CPT 组的 10.96% \pm 1.36% 与 15.63% \pm 1.63% (P < 0.01) (图 1)。

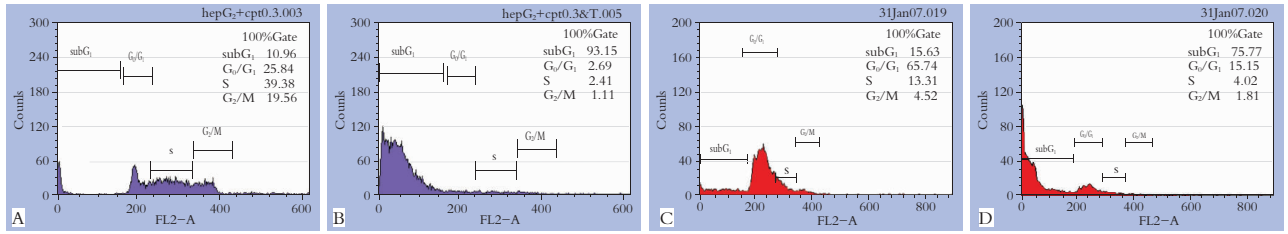


图1 PI法流式细胞仪分析CPT预处理8h及联用TRAIL后HepG2和Hep3B细胞周期的变化 A:单用0.3 μg/mL CPT,HepG2细胞周期; B:TRAIL联用CPT,相同浓度下,HepG2细胞周期; C:单用0.6 μg/mL CPT,Hep3B细胞周期; D:TRAIL联用CPT,相同浓度下,Hep3B细胞周期

2.3 Western blot 检测结果

2.3.1 CPT 预先处理对凋亡传导蛋白 caspase-8 及 caspase-3 表达的影响 对照组、CPT 组仅见 caspase-8 及 caspase-3 的前体 p55/53, p43/41, p32, 而不见其活化裂解带的表达; CPT + TRAIL 组则明显出现 caspase-8, 3 的激活, 除观察到 caspase-8, 3 的前体外, 还可见裂解带 P18, P24/20/17 的表达(图2), 结果表明, TRAIL 与 CPT 联用, 能激活凋亡信号传导通路 caspase 级联反应的起始蛋白 caspase-8, 并活化效应蛋白 caspase-3。

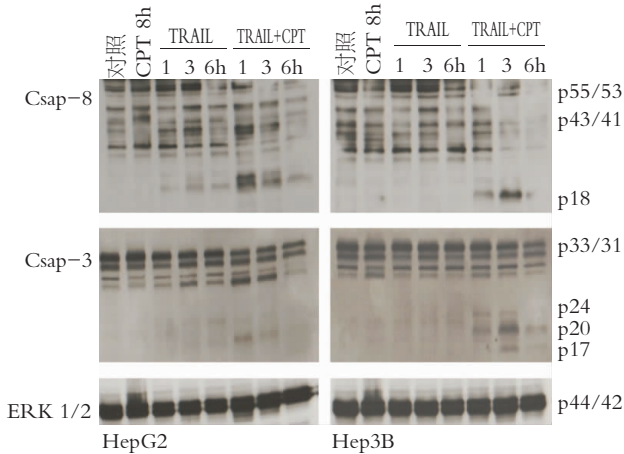


图2 Western blot 检测 TRAIL 单用和联用 CPT 后,HepG2 和 Hep3B 细胞 caspase-8, caspase-3 蛋白表达的变化, ERK1/2 用做对照

2.3.2 CPT 预先处理对死亡受体、凋亡调节蛋白 c-FLIP (cellular Fas-associate death domain-like interleukin-1β-converting enzyme-inhibitory protein) 及 RIP (Receptor-interacting protein) 表达的影响 CPT 预处理对 TRAIL 的死亡受体 DR4 DR5 及假受体 DeR1 的表达无明显影响; 但 caspase-8 的上游调节蛋白 c-FLIP 的两种活性形式, 即 p55 的 c-FLIP_L, p25 的 c-FLIP_S 及 RIP 的表达明显下调(图3)。说明 TRAIL 联用 CPT, 可以通过下调 c-FLIP 及 RIP 的表达, 解除 caspase-8 受抑状况, 恢复凋亡信号的传导。

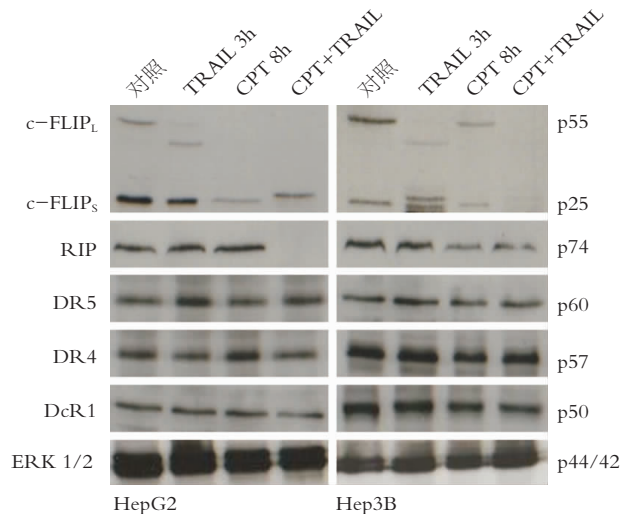


图3 Western blot 检测 TRAIL 单用和联用 CPT 后, HepG2 和 Hep3B 细胞 c-FLIP_L, c-FLIP_S, RIP, DR4, DR5, DeR1 蛋白表达的变化, ERK1/2 用做对照

2.3.3 CPT 预先处理对凋亡传导线粒体通路蛋白表达的影响 CPT 预处理后联合 TRAIL, Bid (Bcl-2 inhibitory BH3-domain protein), cyt-c (cytochrome C), Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) 的表达明显上调, 并使 caspase-9 活化裂解(图4)。说明 TRAIL 联用 CPT, 能活化 Bid, 促进线粒体释放 cyt-c 及 Smac, 裂解效应蛋白 caspase-9, 促使凋亡的发生。

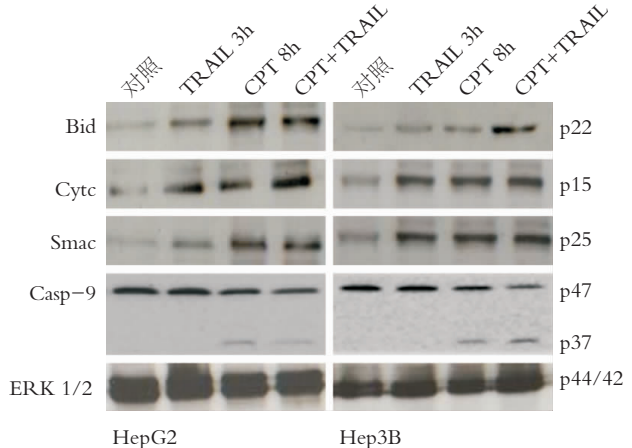


图4 Western blot 检测 TRAIL 单用和联用 CPT 后,HepG2 和 Hep3B 细胞 Bid, cyt-c, Smac, caspase-9 蛋白表达的变化, ERK1/2 用做对照

3 讨论

尽管 TRAIL 对大多数肿瘤细胞表现出强大的诱导凋亡作用,然而,就目前的研究来看,几乎所有的 HCC 细胞系均对 TRAIL 表现出不同的耐药性。本实验检测了 HCC 细胞系 HepG2 及 Hep3B 对单用 TRAIL 的敏感性。结果表明,不同浓度的 TRAIL (10 ~ 1 000 ng/mL) 作用 24 h,对 HCC 细胞的生长影响不大。但经小剂量 CPT 预处理后却能逆转 HCC 细胞对 TRAIL 的耐受。细胞周期分析也提示,CPT 与 TRAIL 联用后明显出现了细胞 G₁ 期生长阻滞,并形成特异性的凋亡峰 SubG₁。此结果与 Yamanaka 等^[2]报道的一致,即化疗药物与 TRAIL 具有协同作用,可以显著增强 TRAIL 诱导的凋亡效应。

本实验发现,CPT 增强 TRAIL 诱导 HCC 细胞系凋亡的能力是通过多种机制实现的。首先,两者的联合可以下调 c-FLIP 及 RIP 的表达,激活凋亡信号传导的关键蛋白 caspase-8,通过活化死亡受体路径诱发细胞凋亡。c-FLIP 是 1997 年 Irmiler 等^[3]在恶性黑色素瘤细胞胞浆中发现的一种类似于 vFLIP 的蛋白,它可通过其 N-端的 2 个 DED 竞争性结合 FADD 和/或 caspase-8,10,阻断死亡诱导信号复合体 (Death-inducing signaling complex, DISC) 的形成和 caspase-8,10 的活化,使 caspases 级联反应不能继续,从而阻断 TRAIL-R 等细胞表面死亡受体介导的凋亡信号转导,起到抑制凋亡的作用^[4]。RIP 是近年来在研究凋亡信号传导的 NF- κ B 途径过程中发现的一种受体作用蛋白,其表达可以抑制 caspase-8 的活化、激活 NF- κ B 途径进而促进细胞增殖^[5]。由于本实验先观察到了 CPT 预处理后再应用 TRAIL,能改变 HCC 细胞 DISC 内的 caspase-8 受抑状态,恢复了凋亡信号的传导,笔者为进一步探求这种作用机制,又检测了 caspase-8 上游调节蛋白 c-FLIP, RIP 的表达及死亡受体 DR4, DR 和假受体 DcR1 的表达在 CPT 作用前后的变化。结果证明,这种预处理和随后的联合,明显下调 c-FLIP 两种活性形式及 RIP 的表达,而对 DR4, DR 及 DcR1 的表达无明显影响。说明 c-FLIP 及 RIP 表达的下调导致 caspase-8 活化,进而激活下游 caspase-3 的前体,促使细胞凋亡发生,这一系列变化可能导致 CPT 改变 HCC 细胞对 TRAIL 的敏感性。

其次,CPT 预处理后,可以活化 Bid 的表达,增加线粒体释放 Cyt-c 及 Smac,激活效应蛋白 caspase-9,通过扩大线粒体途径诱发细胞凋亡。研究^[6]发现,诱导凋亡的两种途径互相关联,如果其死亡受体途径表达较弱,则其作用常被线粒体途径的激活而加强。此现象尤其在肝癌细胞

的凋亡中表现最为明显^[7]。死亡受体途径的 caspase-8 激活后可活化 Bcl-2 家族的 Bid 蛋白,使线粒体外膜的通透性发生改变,其内的 cyt-c 释放到胞浆中,与 caspase-9 和 Apf1 构成凋亡体复合物^[8],该复合物激活 caspase-3,7 的前体,并释放 Smac/DIABLO 与凋亡抑制蛋白 XIAP 结合,从而解除一些蛋白分子对 caspase-9,3 的抑制^[9],最后诱导细胞凋亡。本实验结果也表明,CPT 预处理后,明显上调 Bid, cyt-c 及 Smac 蛋白的表达,并且促使 caspase-9 活化裂解。说明线粒体途径的激活也参与了 CPT 增强 TRAIL 诱导 HCC 细胞凋亡能力的机制。

总之,小剂量 CPT 与 TRAIL 联用在诱导 HCC 细胞凋亡上具有显著的协同作用,明显降低较大剂量 CPT 所带来的副作用。其机制可能是通过下调 c-FLIP 及 RIP 的表达,活化凋亡发生的死亡受体通路及上调 Bid 的表达,激活线粒体通路来实现的。故认为在 TRAIL 抗肿瘤的基础上联用化疗药物对肝癌的治疗是一种有潜在价值的治疗方案,对其进行更深入的研究将有助于开展 TRAIL 应用于肝癌临床治疗的研究。

参考文献:

- [1] Shin EC, Seong YR, Kim CH, *et al.* Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin [J]. *Exp Mol Med*, 2002, 34(2):114-122.
- [2] Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K, *et al.* Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Hepatology*, 2000, 32(3):482-490.
- [3] Irmiler M, Thome M, Hahne M, *et al.* Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP [J]. *Nature*, 1997, 388(6638):190-195.
- [4] Kim Y, Suh N, Sporn M, *et al.* An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(25):22320-22329.
- [5] Goke R, Goke A, Goke B, *et al.* Regulation of TRAIL-induced apoptosis by transcription factors [J]. *Cell Immunol*, 2000, 201(2):77-82.
- [6] Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. *Curr Mol Med*, 2003, 3(6):491-508.
- [7] Pour-Jafari H, Ghavami S, Maddika S, *et al.* Mitochondrial physiology and toxicity; Importance for the immune system, Programmed cell death and cancer [J]. *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory&Anti-Allergy*, 2005, 4(4):439-448.
- [8] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684):626-629.
- [9] Barczyk K, Kreuter M, Pryjma J, *et al.* Serum cytochrome c indicates in vivo apoptosis and can serve as a prognostic marker during cancer therapy [J]. *Int J Cancer*, 2005, 116(2):167-173.