TRAIL联合喜树碱诱导胰腺癌细胞凋亡的研究

高显峰　王广义　谢淑丽　吕国悦

摘要　目的：探讨喜树碱（CPT）增强TRAIL诱导胰腺癌细胞PANC-1凋亡的机制。**方法：**通过MTT检测TRAIL组、喜树碱组、二者联合组对胰腺癌细胞PANC-1生长抑制的影响；利用Hoechst33258荧光染色检测各组细胞凋亡情况；应用Western-blot方法检测PANC-1在喜树碱应用前后凋亡信号传导蛋白分子DR4、DR5、Caspase-8、Caspase-3以及c-flip的表达情况。**结果：**PANC-1细胞经不同浓度TRAIL（10、30、100、300、1 000ng/mL）作用24h后，当浓度在100ng/mL及以上时与对照组相比有统计学差异（$P<0.01$），虽然存在差异，但当TRAIL浓度为1 000ng/mL时，其细胞抑制率仅为（10.60±2.36）%，TRAIL与不同浓度的喜树碱（10、30、100、300、1 000ng/mL）联合作用后其细胞抑制率与单独应用喜树碱相比有显著性差异（$P<0.05$）；Hoechst33258荧光染色结果显示：联合组有大量细胞出现细胞核聚集、边缘化、核碎裂等典型细胞凋亡形态，而其余各组未见明显凋亡征象；Western-blot结果显示：单独TRAIL组及单独喜树碱组仅能看到Caspase-8和Caspase-3的前体，而二者联合后不仅看到了其前体，而且还看到其裂解带，并且发现经过喜树碱预处理后，PANC-1细胞中c-Flip蛋白的表达被明显下调了，CPT组及联合组与对照组及单独TRAIL相比均有显著性差异（$P<0.05$），而喜树碱应用前后对DR4和DR5表达无显著效应。**结论：**TRAIL联合喜树碱对胰腺癌细胞PANC-1诱导的凋亡具有协同作用，其机制是喜树碱下调了c-Flip蛋白的表达，解除了其对Caspase-8的抑制，激活了死亡受体通路，与DR4和DR5无关。

关键词　肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体　c-Flip　喜树碱　细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2010.23.004

Research on TRAIL Combined with Camptothecin in Inducing Apoptosis of Pancreatic Carcinoma Cell Line PANC-1

GAO Xianfeng, WANG Guangyi, XIE Shuli, LV Guoyue

Corresponding author: WANG Guangyi; E-mail: wgymd@sina.com

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

Abstract　Objective: To investigate the mechanism behind campotothecin (CPT) enhancement of TRAIL-induced apoptosis of PANC-1 pancreatic carcinoma cell line. **Methods:** The growth inhibition rates of PANC-1 cells in the TRAIL, CPT and CPT+TRAIL groups were assayed by MTT. Cellular apoptosis in each group was tested by fluorescent staining with Hoechst 33258. The level of apoptotic signal transduction proteins, such as Caspase-8, Caspase-3, DR4, DR5 and c-Flip, were detected using Western blot. **Results:** Twenty-four hours after PANC-1 cells were treated with TRAIL of various concentrations (10, 30, 100, 300, and 1000 ng/mL), there were significant differences between the treatment and control groups at 100ng/ml and higher ($P<0.01$). Despite these differences, the inhibition rate was only 10.60 ± 2.36% with a TRAIL concentration of 1000ng/mL. There were significant differences between the TRAIL+CPT combination group (10, 30, 100, 300, 1000 ng/mL) and the CPT alone group ($P<0.05$). Results of Hoechst 33258 fluorescent staining showed that typical characteristics of apoptosis such as nucleus aggregation, marginalization and nuclear fragmentation occurred in the TRAIL+CPT group. However, no obvious signs of apoptosis were seen in the groups treated only with TRAIL. Western blot results showed that pro-caspase-8 and pro-caspase-3 could only be seen in the groups treated with TRAIL or CPT alone. However, bands for both the precursors and the cleaved products were seen in the groups treated with both drugs. In addition, the expression of c-Flip protein in PANC-1 cells was down-regulated after CPT treatment. There were significant differences in the expression of c-Flip protein between the CPT and combination treatment group and the groups treated with TRAIL alone and the control groups. There were no significant differences in the expression of DR4 and DR5 before and after the CPT treatment. **Conclusion:** CPT combined with TRAIL may have a synergistic effect on induced apoptosis in PANC-1 cells. CPT down-regulates the expression of c-Flip protein, may possibly reverse the inhibition of caspase-8, and can activate the apoptotic signaling pathway. DR4 and DR5 do not play significant roles.

Keywords　TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL); c-Flip; Camptothecin; Apoptosis

作者单位：吉林大学第一医院普外一科（长春市130021）

通讯作者：王广义　wgymd@sina.com

胰腺癌是生存率较低的恶性肿瘤之一，许多胰腺癌患者被诊断时均处于肿瘤晚期，失去了最佳的手术时机，同时对放疗、化疗、免疫治疗均不敏感，临床对其缺乏有效的治疗手段，因此严重威胁着人类的健康。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand，TRAIL）是一种新兴的诱导肿瘤细胞凋亡的化疗药物，因其具有选择性杀伤肿瘤细胞而不伤害正常细胞的特性[1]，已经成为大家研究的热点，但随着人们对其研究的深入，发现部分肿瘤对TRAIL不敏感，而与化疗药物联合应用后可逆转肿瘤对它的耐受[2]。

喜树碱是从喜树枝干中提取出的一种生物碱，其抗肿瘤谱较广泛，因其可以阻断拓扑异构酶Ⅰ，从而抑制细胞周期中DNA的合成，达到抑制肿瘤的作用[3]。近年研究发现，喜树碱抗肿瘤的机制还与其他途径有关，如抑制血管生成[4]、诱导肿瘤细胞凋亡[5]等。目前关于TRAIL联合喜树碱对胰腺癌细胞PANC-1的作用国内外鲜有报道，因此本实验采用TRAIL联合喜树碱作用于胰腺癌细胞PANC-1，以观察二者的协同作用并探讨其中的机制。

1　材料与方法

1.1　实验材料

人胰腺癌细胞株PANC-1购自上海中国科学院细胞库。重组可溶性TRAIL购自PeproTech公司，喜树碱购自南京凯基生物有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　人胰腺癌细胞株PANC-1培养于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液中，置于37℃、5% CO_2细胞培养箱中生长。

1.2.2　细胞抑制率测定　采用MTT方法，将处于对数生长期的PANC-1细胞调整密度为0.8×10^5个/mL，每孔100μL接种于96孔板内，培养过夜后细胞贴壁良好。TRAIL组：加入可溶性TRAIL 100μL使其终浓度分别为10、30、100、300、1 000ng/mL，总体积合计为200μL；CPT组：加入CPT 100μL，使其终浓度为10、30、100、300、1 000ng/mL，总体积合计为200μL；CPT联合TRAIL组，每孔75μL对数生长期细胞接种于96孔板，细胞密度为8 000个/孔，培养过夜后加入CPT 75μL，使其终浓度分别为10、30、100、300、1 000ng/mL，8h后加入可溶性TRAIL 50μL，使其终浓度为100ng/mL，总体积合计为200μL。以上各组每个浓度设3个复孔，并设无药对照组。作用24h后每孔加入MTT溶液（5mg/mL）20μL，37℃孵育4h后，吸弃孔内培养上清液，每孔加入150μL DMSO，振荡10min，使甲臜充分溶解。选择490nm波长，用酶标仪测定各孔光吸收值，记录结果。重复实验3次，取平均值描绘细胞抑制率曲线。

细胞抑制率=（1-实验组D490/对照组D490）×100%。

1.2.3　Hoechst33258荧光染色检测凋亡　将处于对数生长的细胞消化均匀向24孔板内（内含盖玻片）按每孔1mL、密度为2.5×10^4/mL进行接种，将其分为4组，分别为对照（培养液）组、CPT组、TRAIL组、CPT+TRAIL组，每组设3个复孔，CO_2孵箱培养过夜后约铺满片上80%并加药。TRAIL组加20μL TRAIL工作液使其终浓度为100ng/mL，CPT组加3μL CPT工作液使其终浓度为300ng/mL，CPT+TRAIL组则先加入CPT 3μL，24h后加入TRAIL 20μL，待用药24h后进行固定。小心吸弃培养液，使用PBS液洗涤细胞2次。加入4%多聚甲醛室温固定细胞20min，弃去甲醛，再用PBS液洗涤2次，自然晾干。滴加100μL Hoechst33258工作液，室温避光染色10min，去离子水冲净晾干，以紫外光340nm波长激发，荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4　Western-blot检测各种蛋白的表达　收集不同处理组细胞，并用蛋白裂解液将其裂解收集总蛋白，使用紫外分光光度仪检测各组蛋白吸光度，根据BCA蛋白检测试剂盒绘制的曲线计算出各组蛋白浓度。取各组等量总蛋白上样进行SDS-PAGE蛋白电泳，然后进行切胶、转膜，5%脱脂奶粉封闭过夜，室温一抗孵育2h，TBST洗脱，室温二抗2h，TBST洗脱，ECL发光，暗室内显影。

1.3　统计学方法

实验数据采用SPSS 13.0统计软件进行分析，多组比较采用方差分析，两组比较采用t检验。

2　结果

2.1　TRAIL对胰腺癌细胞株PANC-1生长的影响

PANC-1细胞经不同浓度TRAIL作用24h后，MTT结果显示只有TRAIL浓度在100ng/mL及以上时与对照组相比有统计学差异（$P<0.01$），虽然存在差异，但是当TRAIL浓度为1 000ng/mL时，其细胞抑制率仅为（10.60±2.36）%，可见胰腺癌细胞株PANC-1对TRAIL并不敏感（表1）。

表1　MTT法分析细胞的抑制率　（$n=3$，$\bar{x}\pm s$，η/%）

Table 1　Cell inhibition rate analyzed by MTT (n=3, ± S, η/%)

分组	浓度（ng/mL）	抑制率
对照组	0	0
TRAIL组	10	0.62 ± 0.41
	30	1.03 ± 0.66
	100	7.20 ± 0.79*
	300	8.02 ± 1.33*
	1 000	10.60 ± 2.36*

*与对照组比较$P<0.01$

2.2 TRAIL联合喜树碱对胰腺癌细胞株PANC-1生长的影响

TRAIL与不同浓度的喜树碱(10、30、100、300、1 000ng/mL)联合作用后其细胞抑制率与单独应用喜树碱有明显差异($P<0.05$),并且当喜树碱浓度为300 ng/mL时,联合应用组细胞抑制率为(33.6±4.52)%,与喜树碱组(6.3±1.23)%比较有显著性差异($P<0.01$)(表2),因此我们将300ng/mL作为喜树碱的窗口浓度在接下来实验中进行应用(窗口浓度是指某一浓度下化疗药物单独杀伤细胞能力有限,但预先处理后与TRAIL联合应用显示出明显的协同作用)。

2.3 Hoechst33258荧光染色凋亡结果

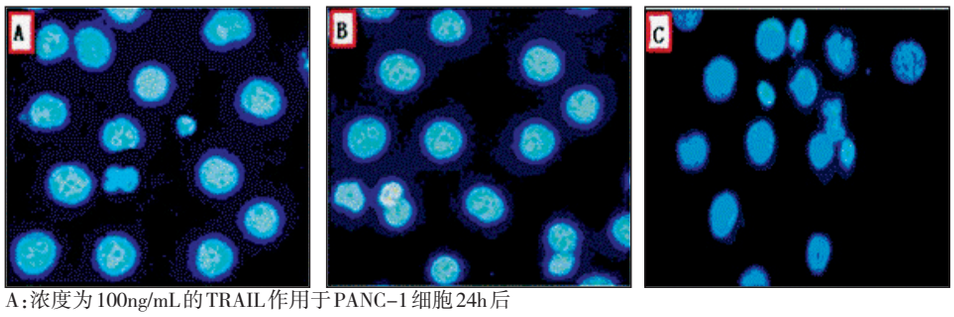
各组通过使用Hoechst33258荧光染色方法检测后结果表明:TRAIL组、CPT组仅见个别细胞出现凋亡形态,而联合组则有大量细胞出现细胞核聚集、边缘化、核碎裂等典型细胞凋亡形态(图1)。

表2 TRAIL联合喜树碱对胰腺癌细胞PANC-1的生长抑制作用 (n=3,$\bar{x}\pm s$,η/%)

Table 2 Inhibition of TRAIL combined with camptothecin on growth of pancreatic cancer PANC-1 cells

CPT(ng/mL)	TRAIL(ng/mL)	
	0	100
10	1.8 ± 0.62	3.3 ± 0.66*
30	3.8 ± 1.31	8.2 ± 1.35*
100	5.2 ± 1.21	10.5 ± 1.97*
300	6.3 ± 1.23	33.6 ± 4.52**
1 000	12.7 ± 1.65	41.5 ± 3.95**

*与CPT组比较$P<0.05$;**与CPT组比较$P<0.01$



A:浓度为100ng/mL的TRAIL作用于PANC-1细胞24h后

B:浓度为300ng/mL的CPT作用于PANC-1细胞24h后

C:TRAIL(100ng/mL)联合CPT(300ng/mL)作用于PANC-1细胞24h后

图1 Hoechst33258对PANC-1染色后的免疫荧光细胞凋亡形态 ×20

Figure 1 Fluorescence photomicrograph of PANC-1 cells stained with Hoechst 33258

2.4 Western-blot检测结果

2.4.1 喜树碱预处理前后对凋亡信号传导蛋白Caspase-8及Caspase-3表达的影响 对照组、TRAIL组、CPT组仅能看到Caspase-8前体(P55/53和P43/41)和Caspase-3前体(P32),而TRAIL+CPT组除可以看到Caspase-8、Caspase-3前体外,还可以看见它们各自的裂解片段P18和P24(图2)。

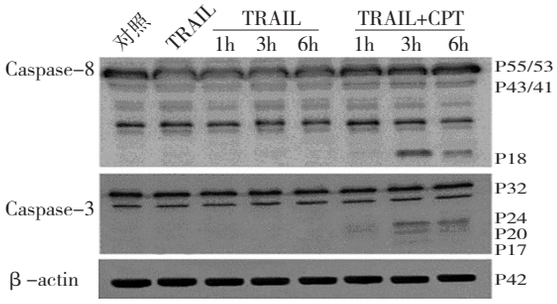


图2 Western-blot分析TRAIL联合CPT对Caspase-8和Caspase-3裂解带表达的影响

Figure 2 Western blot analysis of co-treatment with TRAIL and CPT on the cleavage belt of Caspase-8, Caspase-3 in PANC-1 cell line

2.4.2 喜树碱预处理前后DR4和DR5表达变化 PANC-1细胞经喜树碱处理前后DR4和DR5的表达并未发生明显变化,并用图像分析软件检测其灰度值,无显著性差异(图3)。因此,经过喜树碱预处理之后PANC-1对TRAIL敏感性增加,并不是由于上调了DR4和DR5的表达,一定存在着其它机制。

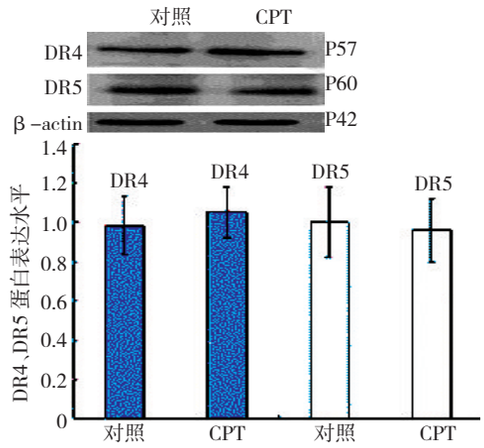
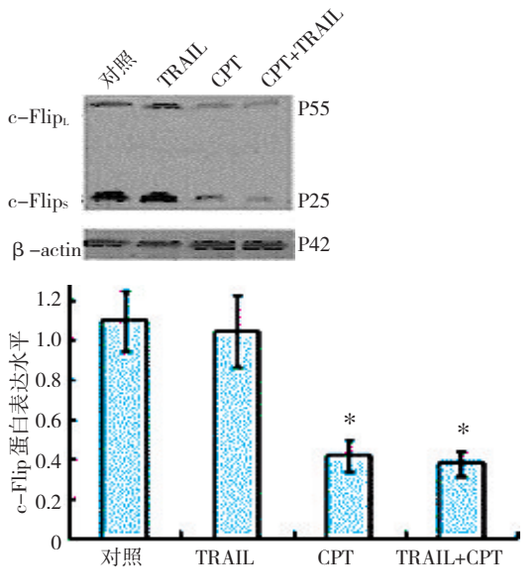


图3 Western-blot分析DR4和DR5在对照组及CPT组中的表达

Figure 3 Western blot analysis of DR4 and DR5 expression in PANC-1 cell line treated with Medium and CPT

2.4.3　喜树碱预处理前后c-Flip蛋白表达变化　经过喜树碱预先处理后，PANC-1细胞中c-Flip蛋白的表达被明显下调，同时用图像分析软件检测其灰度值，证实CPT组及联合组与对照组及单独TRAIL相比均有显著性差异（$P<0.05$），CPT组及联合组之间无显著性差异。因此表明胰腺癌细胞PANC-1经过喜树碱预处理后，可以使c-Flip蛋白的表达下降，从而解除了其对Caspase-8的抑制，恢复了凋亡信号传导通路，引起细胞凋亡（图4）。



*$P<0.05$

图4　Western blot分析各组c-Flip$_L$和c-Flip$_S$的蛋白表达

Figure 4　Western blot analysis of c-FlipL and c-FlipS expression in PANC-1 cell line treated with CPT and TRAIL

3　讨论

TRAIL因其具有选择性杀伤肿瘤细胞的特性而被大家所关注，但目前大量研究发现，它对许多肿瘤细胞已表现出耐受或不敏感。Mori等[6]研究表明，胰腺癌细胞系AsPC-1、Suit-2、CFPAC-1、PANC-1均表现出对TRAIL的耐受，但经过放线菌酮预处理后却可以使上述耐药细胞系再次敏感。因此许多学者又将精力集中在TRAIL与化疗药物的联合应用上，这样既可以克服TRAIL对肿瘤细胞的耐药，同时也可以通过减少化疗药物的用量来减轻其毒副作用。

本实验通过单独应用TRAIL、喜树碱及二者联合来处理PANC-1细胞，观察各用药组对PANC-1细胞生长的影响，结果发现TRAIL联合喜树碱对PANC-1细胞的杀伤作用明显强于各单独用药组，表现出明显的协同作用。随后应用Hoechst33258荧光染色技术对各组细胞进行染色，发现联合组中有大量细胞出现细胞核聚集、边缘化、核碎裂等典型细胞凋亡形态，而在TRAIL及喜树碱单独用药组中则鲜有见到，由此说明TRAIL与喜树碱的协同杀伤作用是通过诱导凋亡来实现的。据文献报道[7,8]，许多化疗药物增强TRAIL对肿瘤细胞的杀伤作用都是由于上调了DR4、DR5的表达，因此笔者又检测了DR4、DR5的表达，结果发现喜树碱作用前后DR4、DR5的表达并未发生明显变化，由此表明喜树碱增强TRAIL对肿瘤细胞的杀伤作用并不是由于DR4、DR5表达的上调，一定还存在着其他机制。通过对TRAIL介导的凋亡传导路研究发现，TRAIL与其受体结合后除了将FADD、Caspase-8前体招募到死亡诱导信号复合体（DISC）内以外，c-Flip也被招募到此复合体内，c-Flip是1997年由Imler[9]等发现的，在体内主要以c-Flip$_L$和c-FlipS两种形式存在，因其结构与Caspase-8的前体极其相似，所以可以与Caspase-8竞争性结合FADD，抑制Caspase-8前体的活化，阻断凋亡信号的传导。基于这一理论笔者又检测了c-Flip蛋白的表达，结果发现喜树碱应用前后c-Flip蛋白的表达果然发生了变化，即喜树碱预处理前呈高表达，而预处理后呈明显低表达，由此得出结论，正是由于喜树碱降低了c-Flip蛋白的表达，解除了c-Flip对Caspase-8前体的抑制，恢复了凋亡信号的传导，促进了凋亡的发生。张国强等[10]通过脂质体介导反义c-Flip来降低c-Flip蛋白在胃癌细胞中的表达，证实c-Flip蛋白低表达可以抑制胃癌细胞的生长，诱导肿瘤凋亡。本研究与上述研究结果均显示c-Flip在诱导肿瘤细胞凋亡中起着极其重要的作用。

总之，喜树碱与TRAIL在诱导胰腺癌细胞株PANC-1细胞凋亡上具有明显的协同作用，其机制可能是通过下调c-Flip蛋白的表达从而解除其对Caspase-8的抑制，恢复了细胞信号的传导，促进了凋亡的发生。在TRAIL抗肿瘤的基础上联合其他化疗药物对胰腺癌的治疗是一种有潜在价值的治疗方案，对其进行更深入研究将使TRAIL应用于胰腺癌临床治疗早日变为可能。

参考文献

1　林　海, 侯　敢, 黄迪南. 以TRAIL为靶点的肿瘤治疗研究进展[J]. 生命科学, 2007,19(5):492–495.

2　Vogler M, Walczak H, Stadel D, et al. Small molecule XIAP inhibitors enhance TRAIL–induced apoptosis and antitumor activity in preclinical models of pancreatic carcinoma[J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2425–2434.

3　Rothenberg ML. Topoisomerase Ⅰ inhibitors: review and update [J]. Ann Oncol, 1997, 8(9): 837–855.

4　刘晓明, 安利佳, 王红梅,等. 喜树碱抗血管生成作用的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2005,38(3):168–169.

（下转第1341页）