

· 论 著 ·

TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞凋亡中
Caspase 8 活性的变化 *

陆春伟 佟海侠^① 张继红^① 张锦华^①

中国医科大学公共卫生学院卫生检验教研室 (沈阳市 110001)

摘要 目的:探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导神经母细胞瘤细胞株 CHP212 细胞凋亡过程中 Caspase 8 活性的变化。方法:应用流式细胞仪检测 TRAIL、Caspase 8 抑制剂(zIETD-FMK)+TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用;应用比色法测定 Caspase 8 相对活性;应用透射电镜对凋亡细胞进行形态学观察。结果:CHP212 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用敏感,存在剂量依赖性。随 TRAIL 作用时间的延长,Caspase 8 活性逐步升高,于作用 16h 达高峰;不同浓度 TRAIL 处理组 Caspase 8 相对活性随浓度增加而递增。zIETD-FMK 能阻断 Caspase 8 的活化而抑制 TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用。透射电镜可见到典型的细胞凋亡特征。结论:TRAIL 通过 Caspase 8 信号传导通路诱导 CHP212 细胞凋亡并伴随 Caspase 8 活性增高。

关键词 神经母细胞瘤 凋亡 半胱-天冬氨酸蛋白酶 8 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

Change of Caspase 8 Activity in TRAIL-induced Apoptosis of
Neuroblastoma Cells

Lu Chunwei Tong Haixia Zhang Jihong et al

Section of Health Ecsomatics, College of Public Health, China Medical University, Shenyang

Abstract Objective: To study the change of Caspase 8 activity in TRAIL-induced apoptosis of CHP212 neuroblastoma cells. **Methods:** The effects of TRAIL and Caspase 8 inhibitor zIETD-FMK+TRAIL on the apoptosis of CHP212 cells were detected using flow cytometry. Relative Caspase 8 activity was measured by colorimetric assay. Apoptotic cells were visually detected using a transmission electron microscope (TEM). **Results:** CHP212 cells were sensitive to TRAIL and this sensitivity was dose-dependent. The relative Caspase 8 activity in CHP212 cells increased gradually with prolonged exposure to TRAIL and with increased TRAIL concentration. The zIETD-FMK inhibitor could block the activation of Caspase 8 and diminish the TRAIL-induced apoptosis of CHP212 cells. Typical features of apoptosis were seen under TEM. **Conclusion:** TRAIL could induce the apoptosis of CHP212 cells through a Caspase 8 signal transduction pathway, with an increase in Caspase 8 activity.

Key words Neuroblastoma Apoptosis Caspase 8 TRAIL

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是 肿瘤坏死因子(TNF)超家族中的一员,与 TNF、FASL (FAS 配体)不同的是它可在多种转化细胞和恶性肿

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:39470739),卫生部科学研究基金(编号:20122167), 辽宁省博士启动、自然科学基金(编号:20041047),辽宁省教育厅科研基金资助(编号:202013121)

① 中国医科大学盛京医院血液研究室
通讯作者:陆春伟 luchunwei2002@yahoo.com.cn

瘤细胞中诱导凋亡,而对正常组织和细胞无明显毒性作用^[1]。这种特性使 TRAIL 可能成为一种低毒而有前途的抗肿瘤药。本实验观察 TRAIL 体外诱导神经母细胞瘤(neuroblastoma,NB)细胞株 CHP212 细胞凋亡过程中半胱-天冬氨酸蛋白酶 8(cysteine containing aspartate specific protease,Caspase 8)活性的变化,从而探讨 Caspase 8 在 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

NB 细胞株 CHP212 由美国国立卫生研究院 Carol J. Thiele 教授提供。重组人可溶性 TRAIL 购自英国 Pepro Tech 公司,Caspase 8 抑制剂 zIETD-FMK 和 Caspase 8 活性检测试剂盒购自英国 R&D 公司。Annexin-V-FITC 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 NB 细胞株 CHP212 在含有 10% 胎牛血清、100IU/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 PRMI 1640 培养液中,置于 37℃、5% CO₂、100% 湿度的二氧化碳培养箱中培养。

1.2.2 细胞凋亡检测 分为对照组、实验组和 Caspase 8 抑制剂组。实验组分别用 10、25、50、100、200μg/L TRAIL 处理 24h;相应抑制剂组先加 5μmol/L zIETD-FMK 预处理 1h 后再用不同浓度 TRAIL 处理 24h。加药处理结束后收获细胞,PBS 洗两遍,用 250μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞浓度为 10⁶/ml;取 100μl 细胞悬液于流式管中,加 5μl Annexin-V 和 10μl PI,室温下闭光染色 15min 后,再加 400μl PBS,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。每组实验重复 3 次,取 3 次实验的平均值。

1.2.3 Caspase 8 相对活性的测定 分为对照组、实验组和 Caspase 8 抑制剂组。实验组分别用 10、25、50、100、200μg/L TRAIL 处理 24h 以及 100μg/L TRAIL 处理 2、4、8、16、24h。实验结束后收集细胞,按试剂盒说明书操作。同时设不加细胞溶解物的空白对照组并从实验组减去空白对照值。每一个实验重复 3 次。

1.2.4 透射电镜检测细胞凋亡形态 分为对照组、100μg/L TRAIL 处理 24h 组。两组细胞分别以 2.5% 戊二醛固定,梯度丙酮脱水,Epon812 包埋制超薄切片于透射电镜下观察并照相。

1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件进行统计分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测结果

TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用见图 1。对照组、不同浓度 TRAIL 处理组细胞凋亡率分别为 (2.03 ± 0.25)%、(6.27 ± 0.36)%、(15.34 ± 0.58)%、(29.44 ± 5.02)%、(38.75 ± 4.67)% 和 (40.12 ± 3.98)%。各浓度间比较可见 100μg/L 与 200μg/L TRAIL 比较无意义 ($P > 0.05$),其余各组间比较差异均显著 ($P < 0.05$)。表明 CHP212 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用很敏感,且存在剂量依赖性。相应抑制剂组的细胞凋亡率与 TRAIL 组比较均明显减低 (P 均 < 0.05),说明 Caspase 8 抑制剂 zIETD-FMK 可拮抗 TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用。

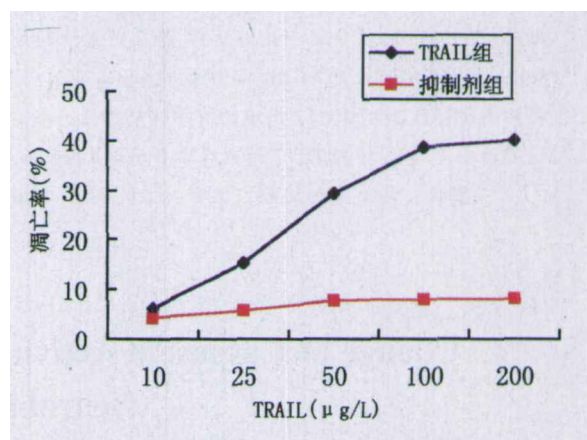


图 1 不同浓度 TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用

2.2 Caspase 8 相对活性的测定结果

CHP212 细胞 Caspase 8 相对活性的测定结果见图 2,3。随 TRAIL 作用时间的延长,Caspase 8 活性逐步升高,于作用 16h 达到高峰。各时间段比较可见 2h、4h 与 16h、24h 比较差异均非常显著 ($P < 0.01$);8h 与 16h 比较差异显著 ($P < 0.05$)。预先用 zIETD-FMK 后 Caspase 8 相对活性明显降低,表明 Caspase 8 确实被活化。TRAIL 组与相应的抑制剂组及对照组比较差异均显著 ($P < 0.01$)。对照组和抑制剂组 Caspase 8 相对活性随时间延长并未发生明显变化,各时间段间比较差异不显著 ($P > 0.05$)。不同浓度 TRAIL 处理组 Caspase 8 相对活性随浓度增加有递增趋势,与相应浓度的抑制剂组比较差异均显著 ($P < 0.01$)。

2.3 凋亡细胞形态学观察

透射电镜下可见到对照组细胞形态多数正常:核内染色质均匀,核膜清晰,可看到线粒体、核糖体、溶酶体等细胞器。TRAIL 组可见到典型的凋亡细胞:细胞皱缩,体积缩小,胞膜完整,核染色质凝聚,有的染色质边集,呈环状或呈新月状附在核膜周边;有些细胞伸出伪足样突起,有的胞膜突起气泡,核碎裂,凋亡小体形成。

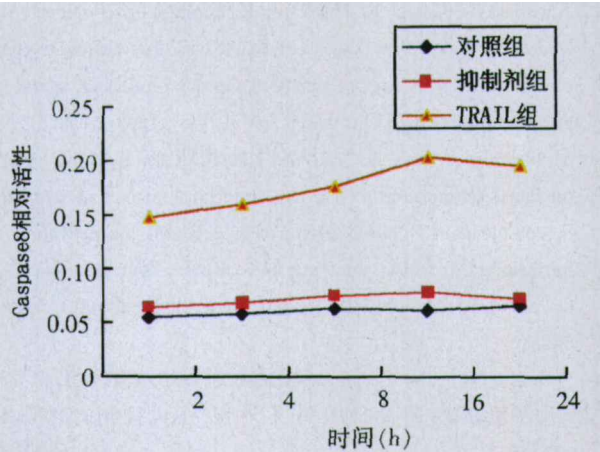


图2 TRAIL 作用 CHP212 细胞不同时间 Caspase 8 相对活性

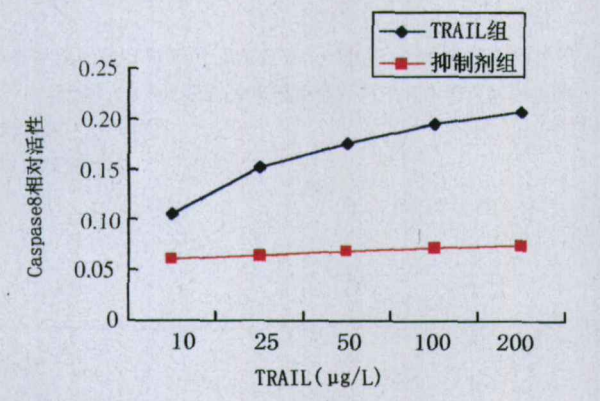


图3 不同浓度 TRAIL 作用 CHP212 细胞 24h Caspase 8 相对活性

3 讨论

NB 是儿童最常见的颅外实体瘤，年龄超过 1 岁、伴随 1 号染色体短臂杂合性缺失、有 N-MYC 扩增的 NB 患儿预后不良，其中对传统化疗耐药和肿瘤转移扩散是临床面临的主要难题。因此寻找新的抗癌药物和抗癌疗法已经迫在眉睫。TRAIL 选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特性使其具有良好的临床应用前景。大量研究表明,Caspase 家族蛋白酶的激活在 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的执行过程中起着重要作用。在目前已发现的 Caspase 家族成员中,Caspase 8 与细胞凋亡的关系最为密切，参与多种因素诱导的细胞凋亡。根据 Caspase 在凋亡中的作用不同分为起始 Caspase 和效应 Caspase 两个亚类,其中 Caspase 8 属上游起始 Caspase。在细胞凋亡的信号传导过程中,TRAIL 粘附于死亡受体后激活 Caspase 8，活化的 Caspase 8 裂解并激活下游效应 Caspase 3，启动级联反应引起细胞凋亡。Caspase 的蛋白酶解级联反应能够不断传递和放大凋亡信号，从而引发对 TRAIL 敏感的细胞发生大量、快速的凋亡反应。本实验我们以表达 Caspase 8 的 CHP212 细胞为研究对象,探讨 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡过程中 Caspase 8

活性的变化。

我们通过透射电镜超微结构观察到,TRAIL 处理 CHP212 细胞后，可见典型的细胞凋亡形态学改变。流式细胞术结果表明 TRAIL 处理的 CHP212 细胞凋亡率随药物浓度的增加有升高趋势。结合典型的细胞凋亡形态及流式细胞术检查证实,TRAIL 有诱导 CHP212 细胞凋亡的作用。为进一步明确 Caspase 8 是否参与凋亡调控，我们检测加入 Caspase 8 抑制剂 zIETD-FMK 前后 TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用。结果发现，加入 zIETD-FMK 后 TRAIL 对 CHP212 细胞的诱导凋亡作用显著减弱，证实 Caspase 8 参与了 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡的调控^[2]。Caspase 8 相对活性的测定结果说明 TRAIL 诱导 CHP212 细胞凋亡的过程中伴随 Caspase 8 活性的增加，且有一定的时间和剂量依赖性。用 zIETD-FMK 后 Caspase 8 活性明显降低，可见 zIETD-FMK 能抑制 Caspase 8 的活化,阻断 Caspase 级联反应，从而阻断细胞内凋亡信号的传导。

近年来关于 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的研究报道较多,已有研究表明 TRAIL 与细胞因子、化疗药或桦木醇酸等联用可明显提高各种耐药的肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性^[3,4]。Liedtke 等^[5]报道 IFN- γ 通过上调 Caspase 8 转录促进 TRAIL 诱导肝细胞瘤细胞凋亡且伴随 Caspase 8 活性的增加。Kanehara 等^[6]用 TRAIL 处理胃癌细胞株 24 小时后发现 Caspase 8 活性与 TRAIL 抗癌效应相关，并认为 TRAIL 的抗癌效应可用 TRAIL 处理后 Caspase 8 活性来预测。Muhlethaler-Mottet 等^[7]在 NB 细胞中通过逆转录病毒稳定转染 Caspase 8，恢复 Caspase 8 表达的同时也恢复了 NB 细胞对 TRAIL 的敏感性。佟海侠等^[8-10]用 IFN- γ 和 5-氮杂胞苷诱导 NB 细胞株 Caspase 8 表达后，发现 NB 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用敏感性增强。本研究与上述研究结果均表明 Caspase 8 在 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡中起着极其重要的作用。

细胞凋亡过程受抑与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。Caspase 家族成员的激活是细胞凋亡效应期的一个十分重要的生化事件。Caspase 8 是 Caspase 家族中最重要的成员,大多数触发细胞凋亡的因素，最终均需要通过 Caspase 8 介导的信号传导途径导致细胞凋亡。我们的研究结果提示 Caspase 8 的激活与 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡有着密切关系,同时也说明 TRAIL 可以作为一个有效的化疗药物,为对传统化疗耐药的 NB 的治疗提供了新的途径。

参考文献

- 1 Griffith TS, Anderson RD, Davidson BL, et al. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis [J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2886~2894
- 2 Muhlethaler-Mottet A, Balmas K, Auderset K, et al. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in a caspase-8-deficient neuroblastoma cell line by stable re-expression of caspase-8 [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010(6): 195~199
- 3 Fulda S, Jeremias I, Debatin KM. Cooperation of betulinic acid and TRAIL to induce apoptosis in tumor cells [J]. Oncogene, 2004, 23(46): 7611~7620
- 4 Johnsen JI, Pettersen I, Ponthan F, et al. Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon- γ and TRAIL [J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1849~1857
- 5 Liedtke C, Groger N, Manns MP, et al. Interferon- α enhances TRAIL-mediated apoptosis by up-regulating caspase-8 transcription in human hepatoma cells [J]. J Hepatol, 2006, 44(2): 342~349
- 6 Kanehara I, Nakata B, Hirakawa K. Caspase-8 is scarcely silenced and its activity is well correlated with the anticancer effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in gastric cancer cells [J]. Oncol Rep, 2005, 14(5): 1249~1253
- 7 Muhlethaler-Mottet A, Bourlout KB, Auderset K, et al. Drug-mediated sensitization to TRAIL-induced apoptosis in caspase-8-complemented neuroblastoma cells proceeds via activation of intrinsic and extrinsic pathways and caspase-dependent cleavage of XIAP, Bcl-xL and RIP [J]. Oncogene, 2004, 23 (32): 5415~5425
- 8 佟海侠, 张继红, 马力, 等. Caspase-8 和 DR5 在 TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞凋亡中的作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 327~330
- 9 佟海侠, 张锦华, 张继红, 等. 5 氮杂胞苷诱导 NB 细胞 Caspase8 表达及对 TRAIL 敏感性的研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(22): 1681~1685
- 10 佟海侠, 张锦华, 陆春伟. IFN γ 对 TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞凋亡的调节作用 [J]. 中国肿瘤临床, 2005, 32(23): 1321~1324

(2007-01-13 收稿)

(邢颖校对)

· 短篇及病例报告 ·

原发性膀胱类癌 1 例

张建雷 许长起

聊城市光明医院腹部外科 (山东省聊城市 252000)

关键词 膀胱肿瘤 类癌 手术

患者男性, 67 岁。因无痛性肉眼血尿 1 个月余, 于 2006 年 12 月 29 日入院。查体: 以往有高血压及冠心病史多年; BP 22/14kPa; 临床检验除镜下血尿外其他化验均无异常; B 超和 CT 提示膀胱内占位性病变; 膀胱镜检查视野不清未发现肿物。于 2007 年 1 月 1 日以膀胱内占位性病变手术治疗。术中见膀胱三角区尿道内口左侧 1cm 处, 有一 5cm×6cm 菜花样肿物, 质地脆, 触之出血, 无蒂, 基底浸及肌层。术中快速病理: 低分化癌。因患者家属不同意膀胱全切, 对其行膀胱部分切除术, 于 10 日后出院。术后病理诊断: 膀胱类癌。免疫组化结果: CgA+, Syn+, CK+, Villin-。

小结 原发性膀胱类癌是一种罕见的神经内分泌性肿瘤。1979 年由 Anichkow 首先报道, 其起源至今仍不确定。有人考虑起源于膀胱粘膜中的正常神经内分泌细胞, 有人推测

其来源于膀胱的化生上皮。发病年龄多在 60~80 岁, 男女均可发病, 多位于三角区, 临床表现与普通膀胱肿瘤相似。本例有高血压病史, 但无阵发性心动过速、面色潮红及腹泻等类癌综合征。

本病治疗以手术为主, 手术方式取决于肿瘤生长范围、浸润深度、淋巴结转移情况, 行部分膀胱壁或全膀胱切除术。术后定期给予化疗药物膀胱灌注。与其他膀胱癌一样, 临床分期是决定预后的主要因素。

(2007-02-14 收稿)

(2007-04-13 修回)

(邢颖校对)