

重组人TRAIL蛋白联合顺铂对人卵巢癌细胞生长及凋亡的影响

冯 忻^{1,2}, 王彩霞³, 欧志英²

1. 南方医科大学中西医结合医院, 南方医科大学中西医结合肿瘤中心, 广东 广州 510310
2. 广州市妇女儿童医疗中心, 广东 广州 510623 ;
3. 武警广东总队医院妇产科, 广东 广州 510507

[摘要] **背景与目的:** 研究发现肿瘤坏死因子的相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)可以增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用。本研究旨在探讨TRAIL与顺铂联合应用对体外培养的卵巢癌细胞SKOV3和OVCAR3生长凋亡的影响及可能的诱导机制。**方法:** 利用MTT法和流式细胞仪检测在顺铂和重组人TRAIL蛋白共同作用下, SKOV3和OVCAR3细胞的增殖抑制效应及细胞凋亡程度; 并应用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测药物处理后TRAIL死亡受体DR4、DR5的mRNA表达水平; 同时用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测DR4、DR5的蛋白表达水平。**结果:** SKOV3和OVCAR3细胞均对TRAIL蛋白敏感, 随着TRAIL蛋白浓度的升高, 细胞的生长抑制率可达64%; 而TRAIL与顺铂联合用药对两种细胞的抑制率均达到92%以上, 对细胞的增殖抑制呈现高效协同作用, 与单独用药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); TRAIL和顺铂联合组两种细胞凋亡率分别为(31.50±0.79)%和(36.60±1.31)%, 显著高于单独用药组; RTFQ-PCR和Western blot检测结果显示, SKOV3和OVCAR3细胞在TRAIL与顺铂联合用药后, 死亡受体DR4、DR5表达水平均显著上调。**结论:** 在体外, TRAIL与化疗药物顺铂联用能明显抑制卵巢癌细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡。TRAIL能明显增强顺铂对卵巢癌细胞的敏感性, 其诱导机制可能与死亡受体DR4、DR5表达水平上调有关。

[关键词] 卵巢癌; 肿瘤坏死因子的相关凋亡诱导配体; 顺铂; 死亡受体; 细胞凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.08.002

中图分类号: R737.31 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)08-0648-07

Effect of recombinant human TRAIL protein combined with cisplatin on the growth and apoptosis of human ovarian cancer cells FENG Xin^{1,2}, WANG Caixia³, OU Zhiying² (1.TCM-Integrated Hospital of Southern Medical University, TCM-Integrated Cancer Center of Southern Medical University, Guangzhou 510310, Guangdong Province, China; 2.Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, Guangdong Province, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, Armed Police Corps Hospital of Guangdong, Guangzhou 510507, Guangdong Province, China)

Correspondence to: FENG Xin E-mail: xinf@hotmail.com

[Abstract] **Background and purpose:** The study has found that tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) can enhance the cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs on tumor cells. The aim of our study was to investigate the effects of the tumor TRAIL and cisplatin combined application on the growth and apoptosis of human ovarian cancer cell lines SKOV3 and OVCAR3, and the possible mechanism. **Methods:** Under the combined application of cisplatin and TRAIL, MTT method and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of SKOV3 of OVCAR3 cells; the mRNA expression levels of death receptors, DR4 and DR5, were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). At the same time, the protein expression levels of DR4 and DR5 were detected by Western blot. **Results:** SKOV3 and OVCAR3 cells were sensitive to TRAIL protein, and with the increasing of TRAIL protein concentration, cell growth inhibitory rate up to 64%. When the

combination application of TRAIL and cisplatin, the inhibition rate of the two cells reached more than 92%, and the two drugs showed high synergistic effect, compared with the single drug group ($P < 0.05$). Flowcytometry analysis indicated that the synergistic killing effect of TRAIL and cisplatin was mainly due to the cell apoptosis. RTFQ-PCR and Western blot detection results showed that the DR4 and DR5 were up-regulated under the combined application of TRAIL and cisplatin. **Conclusion:** *In vitro*, TRAIL and cisplatin combined application can significantly inhibit the proliferation of human ovarian cancer cells and induce tumor cell apoptosis. TRAIL can obviously enhance the sensitivity of cisplatin to tumor cells. The mechanism may be related to the increased death receptor DR4 and DR5 expression level.

[Key words] Ovarian cancer; Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; Cisplatin; Death receptor; Apoptosis

卵巢癌是严重危害女性健康的疾病之一,致死率较高,治疗方法有手术治疗、放疗和化疗等,其中以铂类药物为基础的联合化疗是主要的治疗手段。铂类药物的耐药性及其极强的不良反应,使寻找新的、更有效的杀灭肿瘤细胞的治疗方法迫在眉睫。近年来,有关细胞凋亡的研究已成为寻找新的化疗方法和提高化疗疗效的研究热点。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是一类导致细胞凋亡的重要细胞因子, TNF相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是TNF超家族中的新成员,能选择性地诱导肿瘤细胞凋亡,而对正常组织和细胞没有明显的毒性^[1]。Sheridan等^[2]的研究发现, TRAIL可以增强化疗药物对人肝癌细胞的杀伤作用。对人肝癌细胞HepG2的研究发现, TRAIL联合化疗药物可以通过上调死亡受体DR5的表达诱导肝癌细胞凋亡,而死亡受体DR4的表达变化差异无统计学意义^[3]。前期的研究充分说明了TRAIL在细胞凋亡中的作用,其与化疗药物联合对细胞的增殖抑制呈现高效协同作用。然而, TRAIL诱导凋亡作用的机制是否通过DR4或DR5的表达变化实现,在不同种类肿瘤细胞和不同研究成果上存在差异^[4-5]。这就需要更深入地研究TRAIL对特定肿瘤细胞的杀伤作用及其机制。本实验研究了TRAIL蛋白及化疗药物顺铂与TRAIL联合作用对人卵巢癌细胞株SKOV3和OVCAR3生长及凋亡的影响。同时,通过实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase

chain reaction, RTFQ-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)研究化疗药物顺铂与TRAIL蛋白联合作用对TRAIL死亡受体DR4、DR5表达水平的影响,最终证明TRAIL与顺铂联合对卵巢癌细胞产生协同杀伤作用,为提高化疗疗效及进一步的临床应用提供了良好的实验室基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

重组人TRAIL蛋白购自德国PromoCell公司; MTT和二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司; RNA提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; RTFQ-PCR试剂盒购自美国Fermentas公司; DR4和DR5抗体及其二抗购自美国Santa Cruz公司; BCA蛋白定量试剂盒和ECL化学发光底物购自美国Pierce公司; 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成; Annexin V FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司; 酶标仪为Thermo Multiskan MK3; 流式细胞仪为美国BD Accuri C6; RTFQ-PCR仪为ABI ViiA 7; 卵巢癌细胞株SKOV3和OVCAR3购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT检测细胞增殖

顺铂与不同浓度TRAIL蛋白联合用药抑制SKOV3和OVCAR3细胞生长量效曲线的测定: 分别取对数生长期的SKOV3和OVCAR3细胞

2.5×10⁴个/孔接种于96孔培养板, 培养24 h后加入含有顺铂(5 μg/mL)和不同浓度TRAIL蛋白(0、10、20、50、100、200和400 ng/mL)的培养基200 μL, 每个浓度设4个复孔, 培养24 h后, MTT法检测吸光度(*D*₄₉₀)值。同样分别取对数生长期的SKOV3和OVCAR3细胞接种于96孔培养板, 分为4组: 空白对照组、TRAIL(200 ng/mL)组、顺铂组(5 μg/mL)和联合用药组(TRAIL 200 ng/mL+顺铂5 μg/mL), 每组设4个复孔, 分别培养24、48、72、96和120 h后, MTT法检测*D*₄₉₀值。得到数值后按如下公式进行计算: 细胞生长抑制率(%)=[1-(*D*_{试验}-*D*_{空白})/(*D*_{对照}-*D*_{空白})]×100%。

1.2.2 流式细胞仪检测TRAIL对SKOV3和OVCAR3细胞凋亡的影响

分别取对数生长期的SKOV3和OVCAR3细胞2.5×10⁵个/孔接种于6孔板, 分为4组: 空白对照组、TRAIL组(200 ng/mL)、顺铂组(顺铂5 μg/mL)和联合用药组(TRAIL 200 ng/mL+顺铂5 μg/mL), 每组3孔, 温箱中培养24 h后, 收集细胞, 以流式细胞仪测定各组细胞凋亡率, 重复3次。

1.2.3 RTFQ-PCR检测化疗药物对SKOV3和OVCAR3细胞DR4、DR5的mRNA表达水平的影响

细胞分组及处理同1.2.2。首先采用RNA提取试剂盒提取细胞的总RNA, 用紫外分光光度计测定其浓度及纯度。参照RTFQ-PCR的试剂盒操作说明, 以上述准备好的总RNA为模板进行反转录获取cDNA。采用2×SYBR Green PCR Master Mix, 以获得的适量cDNA为模板, 用25 μL反应体系进行扩增, 每个待测样本设置3个平行样本, 分别检测DR4和DR5基因, 并以GAPDH基因为内参照, 具体的引物序列如下:

DR4-F: 5'-GTGGCTGTGCTGATTGTCTGTT-3'; DR4-R: 5'-GCGTTGCTCAGAATCTCGTTG-3'; DR5-F: 5'-TCTCCCACTCAGCCATCCAA-3'; DR5-R: 5'-CGAGACCACCCTGAGCAACAT-3'; GAPDH-F: 5'-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3';

GAPDH-R: 5'-GCGGCGCAATACGAA TGCCCC-3'。

1.2.4 Western blot检测化疗药物对SKOV3和OVCAR3细胞DR4和DR5的蛋白表达水平的影响

取细胞裂解液并用Western blot检测DR4和DR5蛋白表达水平, 扫描显影条带, 采用Phoretix 2D软件进行灰度值分析, 以同一样品的DR4、DR5与GAPDH条带的灰度值比值作为DR4和DR5蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

用SPSS 12.0统计学软件对数据进行方差分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 顺铂与不同浓度的TRAIL蛋白联合作用对SKOV3和OVCAR3细胞生长的影响

在顺铂终质量浓度为5 μg/mL的情况下, 随着TRAIL蛋白浓度的升高, 其对SKOV3和OVCAR3细胞生长抑制率均升高, 即细胞生长抑制率与TRAIL蛋白存在正相关的浓度-效应关系。同时, 在TRAIL质量浓度为200 ng/mL时, 两种细胞的生长抑制率明显升高(*P*<0.05), 故选择200 ng/mL作为后续实验TRAIL蛋白最佳工作浓度(图1)。

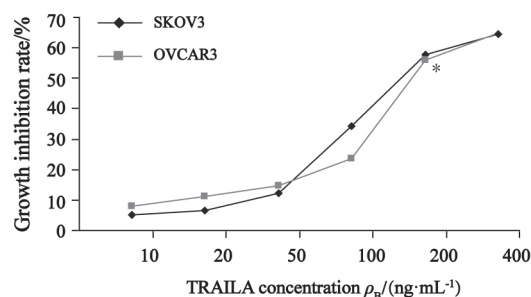


图1 SKOV3和OVCAR3细胞在顺铂与不同浓度TRAIL作用下的生长抑制曲线

Fig. 1 Inhibitory curves of SKOV3 and OVCAR3 cells at the different concentrations of cisplatin and TRAIL

*: *P*<0.05, compared with other TRAIL concentration

2.2 顺铂与TRAIL蛋白联合作用不同时间段对SKOV3和OVCAR3细胞生长的抑制效果

随着药物作用时间的逐渐延长，三组不同条件下的细胞在不同时间段的抑制率均与时间长短成正比关系，且三组用药效果中联合用药组的抑制率升高更明显(图2)，一定程度上说明顺铂与TRAIL蛋白的联合使用具有协同效果。

2.3 TRAIL联合顺铂对SKOV3和OVCAR3细胞凋亡的影响

收集细胞，采用Annexin V FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒染色后，使用BD Accuri C6流式细

胞仪进行细胞凋亡检测。对SKOV3和OVCAR3各组细胞凋亡率进行统计分析，空白对照组为 0.23 ± 0.06 和 0.17 ± 0.06 ，TRAIL组为 9.20 ± 0.44 和 7.56 ± 1.25 ，顺铂组为 12.80 ± 0.76 和 10.60 ± 0.78 ，联合用药组为 31.50 ± 0.79 和 36.60 ± 1.31 。顺铂和TRAIL蛋白均可引起细胞凋亡率增加，且当两者同时存在时，促凋亡作用更加明显，超过两种药物效果的叠加($P<0.05$)，这从细胞凋亡率变化上验证了顺铂与TRAIL蛋白的联合使用具有协同效果(图3)。

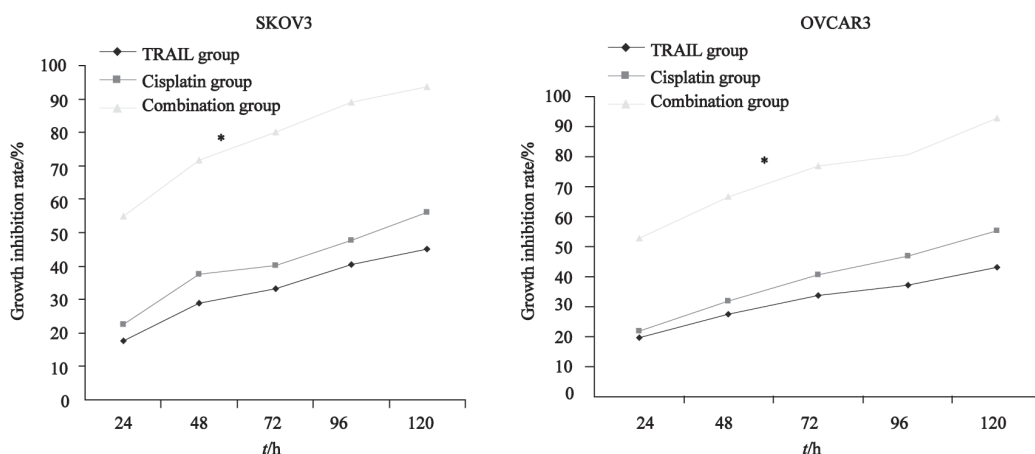


图2 顺铂与TRAIL蛋白联合作用不同时间SKOV3和OVCAR3细胞的生长抑制曲线

Fig. 2 The growth inhibitory curves of SKOV3 and OVCAR3 cells at different time by cisplatin and TRAIL protein

*: $P<0.05$, compared with TRAIL group and cisplatin group

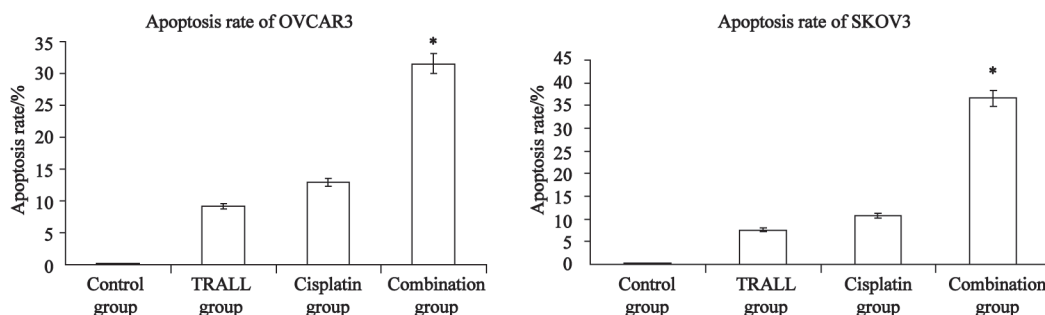


图3 TRAIL联合顺铂对SKOV3和OVCAR3细胞凋亡的影响

Fig. 3 The effect of TRAIL combined with cisplatin on apoptosis of SKOV3 and OVCAR3 cells

* $P<0.05$, compared with TRAIL group and cisplatin group

2.4 TRAIL联合顺铂对SKOV3和OVCAR3细胞中DR4、DR5的mRNA表达水平的影响

使用RTFQ-PCR检测DR4和DR5的mRNA表

达情况，选取空白组样品作为对照，其余样品相对于这个样品的相对表达量进行统计分析。DR4的mRNA表达情况为：在SKOV3细胞中，

TRAIL组为 3.56 ± 0.30 , 顺铂组为 4.64 ± 0.23 , 联合用药组为 13.60 ± 0.31 ; 在OVCAR3细胞中, TRAIL组为 2.53 ± 0.13 , 顺铂组为 2.84 ± 0.15 , 联合用药组为 10.60 ± 0.54 。DR5的mRNA的表达情况为: 在SKOV3细胞中, TRAIL组为 2.81 ± 0.24 , 顺铂组为 2.96 ± 0.14 , 联合用药组为 8.51 ± 0.36 ; 在OVCAR3细胞中, TRAIL组为 2.40 ± 0.18 , 顺铂组为 2.43 ± 0.13 , 联合用药组为 8.71 ± 0.67 。联合用药后SKOV3和OVCAR3细胞的DR4、DR5表达水平显著上调($P < 0.05$, 图4)。三组间的上调变化趋势与细胞凋亡率变化趋势相似, 说明细胞凋亡可能是通过死亡受体DR4和DR5的变化实现的。

2.5 TRAIL联合顺铂对SKOV3和OVCAR3细胞中DR4和DR5蛋白表达水平的影响

通过Western blot分别检测SKOV3和OVCAR3细胞在TRAIL和顺铂联合作用下, 其DR4和DR5蛋白表达的情况, 实验均重复3次(图5)。对DR4和DR5蛋白表达的相对含量进行方差分析, 结果见图6。两种细胞中TRAIL组和顺铂组的DR4和DR5蛋白表达均比空白对照组的高, 而联合用药组的表达水平升高程度更明显, 说明TRAIL和顺铂两种药物对DR4和DR5蛋白表达水平的升高具有协同作用, 三组间的蛋白表达水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。从蛋白水平上验证了三组间DR4和DR5表达水平的变化, 与RTFQ-PCR的结果相符。

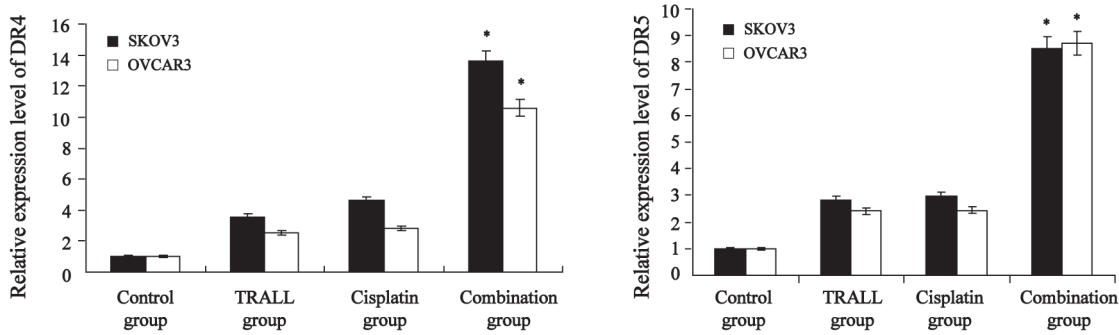


图4 TRAIL联合顺铂对SKOV3和OVCAR3细胞DR4、DR5的mRNA相对表达量结果

Fig. 4 The relative expression levels of DR4 and DR5 mRNA in each group

* $P < 0.05$, compared with TRAIL group and cisplatin group

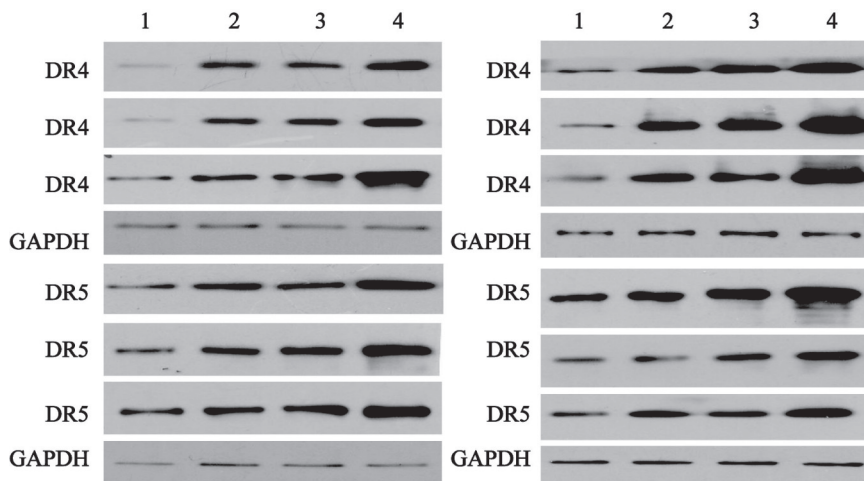


图5 SKOV3和OVCAR3细胞的DR4和DR5蛋白表达情况

Fig. 5 The expression levels of DR4 and DR5 in SKOV3 and OVCAR3 cells

1: Control group, 2: TRAIL group, 3: Cisplatin group, 4: Combination group

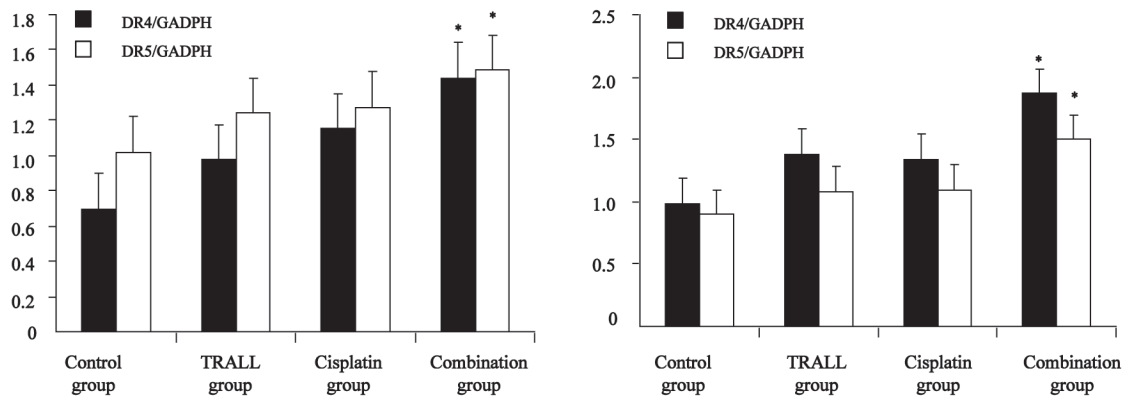


图6 SKOV3和OVCAR3细胞DR4和DR5蛋白的相对含量比较

Fig. 6 The relative expression levels of DR4 and DR5 proteins in SKOV3 and OVCAR3 cells

* $P < 0.05$, compared with TRAIL group and cisplatin group

3 讨 论

TRAIL是新发现的TNF超家族成员,能迅速诱导表达TRAIL特异受体的细胞发生凋亡。目前发现的TRAIL受体有5种:死亡受体DR4和DR5(含有死亡结构域并能向细胞内传递死亡信号,当TRAIL与DR结合时可以诱导靶细胞凋亡)、诱骗受体DcR1和DcR2(当TRAIL与DcR结合时可以逃避TRAIL诱导的细胞凋亡)及可溶性受体OPG(主要起调节骨密度的功能)。TRAIL与死亡受体结合可选择性地诱导多种肿瘤细胞凋亡,而对大多数正常细胞无明显的杀伤作用^[6]。这一特性使其成为寻找新的化疗方法和提高化疗疗效的研究热点。顺铂是临床常用的化疗药物之一,具有抗癌谱广、疗效确切等特点,但其不良反应严重且长期使用容易产生耐药性。顺铂与其他抗癌药物联用,可以显著抑制肿瘤细胞的生长增殖,成为众多学者研究的热点。如辛二酰苯胺异羟肟酸可以有效增强口腔鳞癌细胞对低剂量顺铂的敏感性,减少顺铂的使用量^[7]。

陈儒新^[8]研究TRAIL与卡铂对人卵巢癌细胞A2780凋亡的影响,发现TRAIL联合卡铂使细胞增殖受到明显抑制,凋亡率升高。胡文献等^[9]使用杭白菊提取液和重组腺病毒介导的TRAIL基因联合作用于人结肠癌细胞株DLD1,发现细胞凋亡率和TRAIL的死亡受体DR4和DR5

表达水平均显著上调,推断DR4和DR5在TRAIL诱导的细胞凋亡中起作用。本文研究了TRAIL与顺铂对两种常见的卵巢癌细胞株SKOV3和OVCAR3凋亡的影响,发现其对细胞的增殖抑制呈现高效协同作用,诱导凋亡机制可能与死亡受体DR4、DR5表达水平上调有关,这与Arts等^[10]对临床卵巢癌患者的研究结果相符。本研究进一步探讨了TRAIL与铂类化疗药物对卵巢癌细胞的促凋亡作用,丰富了已有研究成果。

目前,临床上针对肿瘤的治疗主要采用手术和放化疗相结合的方法,但效果并不理想。放化疗杀伤肿瘤细胞的同时也会对人体正常细胞产生杀伤作用,极大限制了其应用。TRAIL以其高效低毒的生物学特点,给肿瘤治疗带来了新的希望。因此,充分研究TRAIL与其受体之间的关系,深入探讨TRAIL与放化疗联合作用诱导凋亡的机制,为我们提供了一条治疗肿瘤的新思路。

[参 考 文 献]

- [1] CLARKE P, MEINTZER S M, GIBSON S, et al. Reovirus induced apoptosis is mediated by TRAIL [J]. J Virol, 2000, 74(17): 8135-8139.
- [2] SHERIDAN J P, MARSTERS S A, PITTI R M, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors [J]. Science, 1997, 277(5327): 818-821.
- [3] 鄂长勇. 死亡受体DR4和DR5的表达在TRAIL诱导肝癌细胞凋亡中的研究 [D]. 吉林大学, 2008.

- [4] GIBSON S B, OYER R, SPALDING A C, et al. Increased expression of death 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(1): 205-212.
- [5] INNLER M, THOME M, HAHNE M, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP [J]. *Nature*, 1997, 388(6638): 190-195.
- [6] SONG C J, LIU X S, ZHU Y, et al. Expression of TRAIL, DR4 and DR5 in kidney and serum from patients receiving renal transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(5): 252-256.
- [7] 申俊, 顾亚军, 柏景坪, 等. SAHA与顺铂联用对口腔鳞癌细胞生长抑制作用的研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(8): 583-587.
- [8] 陈儒新. TRAIL与化疗药物联合诱导卵巢癌细胞凋亡的实验研究 [D]. 山东大学, 2005.
- [9] 胡文献, 毛伟芳, 何超, 等. 杭白菊增强TRAIL基因诱导大肠癌细胞凋亡及机制的实验研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 742-747.
- [10] ARTS H J, JONG S, HOLLEMA H, et al. Chemotherapy induces death receptor 5 in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 794-800.
- (收稿日期: 2015-04-07 修回日期: 2015-11-10)

《中国癌症杂志》2016年征订启事

《中国癌症杂志》是由国家教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤学术期刊, 读者对象为从事肿瘤基础、临床防治研究的中高级工作者。主要报道内容: 国内外研究前沿的快速报道、专家述评、肿瘤临床研究、基础研究、文献综述、学术讨论、临床病理讨论、病例报道、讲座和简讯等。《中国癌症杂志》已入选中文核心期刊、中国科技核心期刊及全国肿瘤类核心期刊, 并为中国科技论文统计源期刊, 先后被“中国期刊网”、“万方数据——数字化期刊群”和“解放军医学图书馆数据库(CMCC)”等收录。

《中国癌症杂志》为月刊, 大16开, 80页铜版纸(随文彩图), 每月30日出版, 单价15元, 全年180元。国际标准连续出版物号1007-3639, 国内统一连续出版物号CN 31-1727/R, 邮发代号4-575。

读者可在当地邮局订阅, 漏订者可直接向本刊编辑部订阅。

主 编: 沈镇宙

联系地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院内

《中国癌症杂志》编辑部

邮 编: 200032

电 话: 021-64188274; 021-64175590 × 83574

网 址: www.china-oncology.com

电子邮件: zgazz@163.com

《中国癌症杂志》编辑部