

TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
李小安,男,1968年生,安徽省东至县人,汉族,2001年第三军医大学博士研究生毕业,现为成都军区总医院主治医师,主要从事消化系统疾病诊治研究。
全军“十五”科研基金资助课题, NO.01MA172
项目负责人:房殿春,400038,重庆市,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心。 fangdianchun@hotmail.com
电话:023-68754124 传真:023-68754124
收稿日期:2002-07-31 接受日期:2002-08-16

Cytotoxicity of TRAIL on colon cancer cell line SW480

Xiao-An Li, Dian-Chun Fang, Liu-Qin Yang, Ru-Gang Zhang, Pei-Ren Si

Xiao-An Li, Dian-Chun Fang, Liu-Qin Yang, Ru-Gang Zhang, Pei-Ren Si, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China
Correspondence to: Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China. fangdianchun@hotmail.com
Received: 2002-07-31 Accepted: 2002-08-16

Abstract

AIM: To study cytotoxic effect of TRAIL on colon cancer cell line SW480.

METHODS: The viability of SW480 cells was measured by MTT assay and the apoptotic rate was determined by TUNEL method.

RESULTS: Results of TUNEL and MTT assay showed that TRAIL had high antitumor activity in a time- and concentration-dependent manner. Survival rate of SW480 cells after TRAIL (1 000 µg/L) treatment was 18.7 %. The apoptotic rates of SW480 cells after exposure TRAIL at concentration of 0, 50, 150, 500, 1 500 and 5 000 µg/L were 6.7 %, 29.4 %, 42.8 %, 50.8 %, 84.6 % and 87.4 %, respectively. The apoptotic rates of SW480 cells after treatment with 500 µg/L TRAIL for 0, 6, 12, 18, 24 and 30 hours were 7.8 %, 21.4 %, 41.8 %, 60.6 %, 73.8 % and 77.3 %, respectively.

CONCLUSION: The results demonstrate that TRAIL can induce apoptosis and destruction of SW480 cells, and is a potential new cytotoxic drug in cancer therapy.

Li XA, Fang DC, Yang LQ, Zhang RG, Si PR. Cytotoxicity of TRAIL on colon cancer cell line SW480. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(3):298-301

摘要

目的: 观察 TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用。

方法: 采用 MTT 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响; TUNEL 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细

胞凋亡率的影响。

结果: TRAIL 能有效地杀伤结肠癌 SW480 细胞, MTT 法显示 1 000 µg/L 的 TRAIL 作用 24 h SW480 细胞存活分数仅为 18.7 %。TUNEL 法均显示 0, 50, 150, 500, 1 500, 5 000 µg/L TRAIL 蛋白诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 6.7 %, 29.4 %, 42.8 %, 50.8 %, 84.6 % 和 87.4 %; 500 µg/L TRAIL 蛋白于 0, 6, 12, 18, 24 和 30 h 诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 7.8 %, 21.4 %, 41.8 %, 60.6 %, 73.8 % 和 77.3 %。TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞的作用存在较好的量效关系和时效关系。

结论: TRAIL 能通过诱导细胞凋亡的方式杀伤 SW480 细胞, 有可能成为有效的抗结肠癌新药。

李小安,房殿春,杨柳芹,张汝刚,司佩任. TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用. 世界华人消化杂志 2003;11(3):298-301

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/298.htm>

0 引言

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是 TNF 家族的新成员, 其基因是 Wiley 小组于 1995 年克隆和命名的. 与 TNF 和 FasL 不同, TRAIL 仅诱导被病毒感染的细胞、转化细胞和肿瘤细胞的凋亡, 而对正常细胞几乎无杀伤作用^[1-4]. 目前大肠癌的治疗仍以手术切除为首选^[5,6], 晚期的疗效仍不理想, 因此探索新的有效的治疗手段已成为大肠癌研究领域的热点之一^[7-13], TRAIL 独特的生物学特点给肿瘤治疗带来了新的希望. 我们在国内较早地利用大肠杆菌表达、并成功分离纯化出有活性的可溶性 TRAIL 蛋白(氨基酸 114-281, 带六聚组氨酸尾)^[14]. 现进一步研究 TRAIL 对结肠癌细胞株 SW480 的细胞毒作用, 希图为 TRAIL 的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 可溶性 TRAIL 蛋白(氨基酸 114-281, 带六聚组氨酸尾)由本实验室制备; MTT 购自上海生物工程技术公司; TUNEL 原位凋亡检测试剂盒购自罗氏公司; RPMI1640 培养基购自 Sigma 公司; 结肠癌细胞株 SW480 由本实验室保种. SW480 细胞培养于含 100 ml/L 灭活的小牛血清、100 KU/L 青霉素和链霉素的 RPMI1640 培养液中, 培养条件为 37 °C 50 ml/L 饱和湿度, 每 2-3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化, 以 1:3-1:5 传代。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响 TRAIL 对 SW480 细胞存活分数的量效关系按 10、30、100、300、1 000、3 000 $\mu\text{g/L}$ 给予 TRAIL, 同时设对照, 18 h 后测值^[4]; TRAIL 对 SW480 细胞存活分数的时效关系按每孔加 TRAIL 1 000 $\mu\text{g/L}$, 取孵育 0、6、12、18、24、30 h 细胞分别测值, 每个时段均设对照. 细胞长至对数生长期时, 以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含 50 ml/L 小牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 按每孔 3×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 每孔终体积为 200 μL , CO_2 孵育箱内培养 2-3 d 后加上上述各组药物. 测值 4 h 前每孔加 5 g/L 浓度的 MTT 20 μL , 孵育后吸去孔内上清, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测仪测 A_{570} 值. 细胞存活分数 (survival fraction) = 实验组 A_{570} / 对照组 $A_{570} \times 100\%$.

1.2.2 TUNEL 法检测 TRAIL 对 SW480 细胞凋亡率的影响 TRAIL 对 SW480 凋亡率的量效关系按 0、50、150、500、1 500、5 000 $\mu\text{g/L}$ 的剂量给予 TRAIL, 18 h 后测凋亡率; TRAIL 对 SW480 细胞凋亡率的时效关系按每孔加 TRAIL 1 000 $\mu\text{g/L}$, 取孵育 0、6、12、18、24、30 h 细胞分别测凋亡率. 将无菌的盖玻片置于 6 孔板中, 每孔 1 片. 取对数生长期细胞以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用 100 ml/L 小牛血清的 RPMI1640 配成单个细胞悬液, 稀释成 $5 \times 10^3/\text{L}$, 取 0.5 ml 滴于盖玻片上, 37°C , 50 ml/L CO_2 , 饱和湿度下孵育 2 h 后, 每孔加培养液 2 ml, 培养 1 d 后, 每孔加入上述浓度的药物. TUNEL 法检测细胞凋亡率按 TUNEL 试剂盒说明操作, DAB 显色后, 高倍镜 (400 \times) 下随机数 200 个细胞, 共数 5 个视野, 记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数. 细胞凋亡率 (apoptosis rate) = 凋亡细胞数 / (凋亡细胞数 + 未凋亡细胞数) $\times 100\%$.

2 结果

2.1 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的影响 不同剂量的 TRAIL 与结肠癌 SW480 细胞共同孵育 18 h 后, 细胞存活分数从 10 $\mu\text{g/L}$ 的 98.8 % 下降至 3 000 $\mu\text{g/L}$ 的 16.0 %, 其量效关系曲线近似标准的 “S” 形, 近似直线部分位于 100-1 000 $\mu\text{g/L}$ 之间 (图 1). 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 TRAIL 作用于细胞, 细胞的存活分数随时间的延长而减少, 从 6 h 的 65.3 % 到 30 h 的 16.6 %. 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 TRAIL 作用 24 h 即达到满意的效果, 其存活分数为 18.7 % (图 2).

2.2 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的影响 0、50、150、500、1 500、5 000 $\mu\text{g/L}$ TRAIL 蛋白诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 6.7 %, 29.4 %, 42.8 %, 50.8 %, 84.6 % 和 87.4 %, 显示有较好的量效关系 (图 3). 采用 500 $\mu\text{g/L}$ TRAIL 蛋白于 0、6、12、18、24 和 30 h 诱导结肠癌 SW480 细胞的凋亡率分别为 7.8 %, 21.4 %, 41.8 %, 60.6 %, 73.8 % 和 77.3 %, 显示有效好的时效关系 (图 4).

显示有效好的时效关系 (图 4).

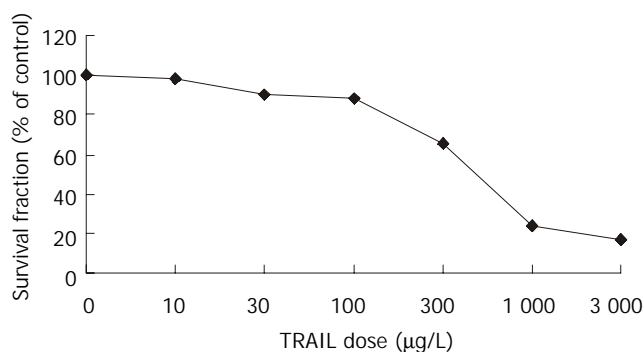


图 1 TRAIL 对结肠癌细胞 SW480 存活分数的量效关系.

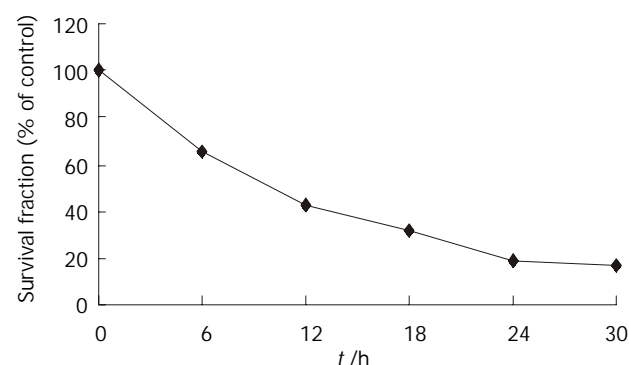


图 2 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数的时效关系.

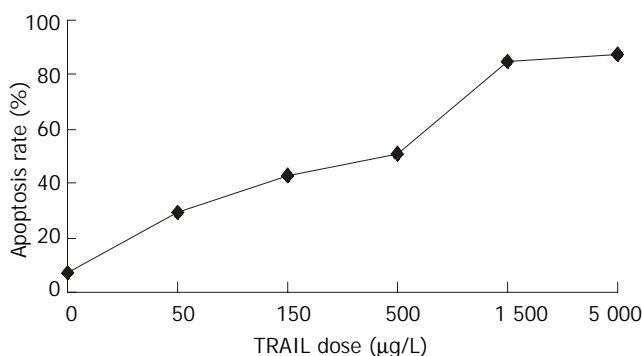


图 3 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的量效关系.

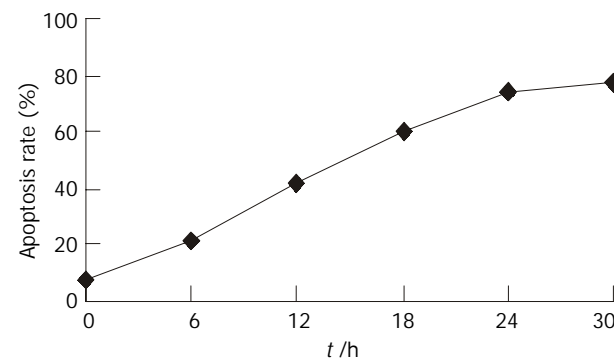


图 4 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞凋亡率的时效关系.

3 讨论

与 TNF 家族的其他成员 TNF 或 Fas 不同, TRAIL 能选

择性地杀死肿瘤细胞,而对正常细胞的影响很小^[15-17],目前国外认为 TRAIL 极有可能成为新一代的抗肿瘤药物。我们在国内较早地完成了可溶性 TRAIL(氨基酸 114-281,带六聚组氨酸尾)的表达、分离纯化和鉴定工作^[14],在此基础上我们研究了 TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞的作用。MTT 的结果表明,TRAIL 对结肠癌 SW480 细胞存活分数存在较好的量效关系和时效关系。不同剂量的 TRAIL 与结肠癌 SW480 细胞共同孵育 18 h 后,细胞存活分数从 10 $\mu\text{g/L}$ 的 98.8 % 降至 3 000 $\mu\text{g/L}$ 的 16.9 %;1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 TRAIL 作用于细胞,细胞的存活分数随时间的延长而减少,从 6 h 的 65.3 % 下降到 30 h 的 16.6 %。以上结果表明,较小剂量的 TRAIL 在很短的时间内对 SW480 细胞有强烈的杀伤作用。TUNEL 法表明 TRAIL 诱导的 SW480 细胞凋亡也具有很好的量效和时效关系,进一步证明了 TRAIL 对 SW480 细胞的杀伤作用。TUNEL 法是检测凋亡的经典方法,在本文中,该方法得到的结果与 MTT 法的结果基本一致,因此可以认为,TRAIL 是通过诱导细胞凋亡的方式杀伤 SW480 细胞的^[18-23]。

TRAIL 诱导细胞凋亡的机制尚未完全明了。研究表明,其主要通过两条途径调控细胞凋亡,亦即 caspase 途径^[24-27]和 NF- κ B 途径^[28]。TRAIL 有 5 种受体,即 DR4, DR5, DcR1, DcR2 和 OPG。TRAIL 通过与 DR4 和 DR5 结合诱导肿瘤细胞凋亡,但与 DcR1、DcR2 和 OPG 结合并不能诱导细胞凋亡^[29], DcR1 和 DcR2 受体启动子的高甲基化可下调其在神经母细胞中的表达^[30]。尽管本文的结果表明 TRAIL 可以诱导 SW480 细胞凋亡,但 TRAIL 受体在 SW480 细胞中的表达如何及 TRAIL 通过那条途径诱导细胞凋亡尚需进一步研究。

尽管最近发现正常人的肝、肾和关节软骨细胞对 TRAIL 也很敏感^[31-33],有可能给 TRAIL 的临床应用带来障碍。但最近 Ozoren et al^[34]发现 caspase-9 的抑制剂 Z-LEHD-FMK 可以保护正常人的肝细胞,而不影响 TRAIL 对一些肿瘤细胞的杀伤作用。近年国外关于 TRAIL 抗肿瘤方面的文章也几乎成倍增长,TRAIL 依然被认为有可能成为最有效的抗肿瘤药物。因此,我们的研究为 TRAIL 将来应用于结肠癌的治疗提供了实验基础。

4 参考文献

- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* 2002;7:449-459
- Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Ashkenazi A, Kourtas DA, Mitsiades N. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002;161:643-654
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:L673-682
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a new Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J Biol*

- Chem* 1996;271:12687-12690
- 刘飞龙,柳文保,阮辉,郝胜华,秦仁义,戴植本. 结肠肛管吻合术治疗中下段直肠癌 52 例. *世界华人消化杂志* 2002;10:604-605
- Makin GB, Breen DJ, Monson JRT. The impact of new technology on surgery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:612-621
- 李新丰,王高雄,陈骥,洪本祖. 区域化疗对结肠癌术后复发及肝转移的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:958-959
- 王青,吴金生,赖大年,马庆久,要秀,潘伯荣. 人直肠癌细胞 HR-8348 导入 p16 基因对细胞周期的影响及其意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:1084
- 黄宗海,钱伟峰,迟德彪,蒋泽生. HSVtk/GCV 体外诱导人大肠癌 LoVo 细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2001;9:194-197
- 李学农,丁彦青,周军. 3,4',5-三羟基芪-3- β -D-葡萄糖苷对大肠癌细胞系蛋白激酶 C 的抑制效应. *世界华人消化杂志* 2001;9:198-201
- 胡建昆,陈志新,陈佳平,严律南,毛咏秋,邹立群,王朝华. 大肠癌化疗药物敏感性与癌细胞 DNA 含量的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:713-714
- 罗和生,李瑾. 丁酸钠和阿司匹林对结肠癌细胞小肠三叶肽表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:465-467
- Cao GW, Qi ZT, Pan X, Zhang XQ, Miao XH, Feng Y, Lu XH, Kuriyama S, Du P. Gene therapy for human colorectal carcinoma using human CEA promoter controlled bacterial ADP-ribosylating toxin genes human CEA: PEA & DTA gene transfer. *World J Gastroenterol* 1998;4:388-391
- 李小安,房殿春,杨仕明. TRAIL 蛋白的表达、纯化和抗肿瘤活性. *第三军医大学学报* 2001;23:1058-1060
- Evdokiu A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, Findlay DM. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2002;99:491-504
- Griffith TS, Fialkov JM, Scott DL, Azuhata T, Williams RD, Wall NR, Altieri DC, Sandler AD. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:3093-3099
- Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, Neuwirtova R, Cermak J, Necas E, Andera L, Stopka T. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002;16:67-73
- Kim JY, Kim YH, Chang I, Kim S, Pak YK, Oh BH, Yagita H, Jung YK, Oh YJ, Lee MS. Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 2002;21:3139-3148
- Inoue H, Shiraki K, Ohmori S, Sakai T, Deguchi M, Yamanaka T, Okano H, Nakano T. Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis. *Int J Mol Med* 2002;9:521-525
- Fulda S, Meyer E, Debatin KM. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 2002;21:2283-2294
- Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:22320-22329
- LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Chow P, Fong S, Schwab R, Sinicropi D, Ashkenazi A. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* 2002;8:274-281
- Wei XC, Wang XJ, Chen K, Zhang L, Liang Y, Lin XL. Killing effect of TNF-related apoptosis inducing ligand regulated by tetracycline on gastric cancer cell line NCI-N87. *World J Gastroenterol* 2001;7:559-562
- Lee MW, Park SC, Kim JH, Kim IK, Han KS, Kim KY, Lee WB, Jung YK, Kim SS. The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Lett* 2002;182:75-82
- Munshi A, McDonnell TJ, Meyn RE. Chemotherapeutic agents enhance TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;50:46-52
- Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor-

- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-5877
- 27 Yuan XJ, Whang YE. PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway. *Oncogene* 2002;21:319-327
 - 28 Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-5877
 - 29 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptor: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308
 - 30 van Noesel MM, van Bezouw S, Salomons GS, Voute PA, Pieters R, Baylin SB, Herman JG, Versteeg R. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res* 2002;62:2157-2161
 - 31 Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000; 6:564-567
 - 32 Nesterov A, Ivashchenko Y, Kraft AS. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) triggers apoptosis in normal prostate epithelial cells. *Oncogene* 2002;21:1135-1140
 - 33 Pettersen I, Figenschau Y, Olsen E, Bakkelund W, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human articular chondrocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:671
 - 34 Ozoren N, Kim K, Burns TF, Dicker DT, Moscioni AD, El-Deiry WS. The caspase 9 inhibitor Z-LEHD-FMK protects human liver cells while permitting death of cancer cells exposed to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Res* 2000;60:6259-6265

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica,EM)》和俄罗斯《文摘杂志》收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆CMCC系统,世界消化学网数据库,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总引比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96.世界华人消化杂志®大16开,128页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262.E-mail: wcjd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)