

# Fas 死亡受体及 FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 赵秀兰, 张诗武, 孙保存

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 张诗武, 孙保存, 天津医科大学肿瘤研究所 天津市 300060  
赵秀兰, 天津医科大学病理教研室 天津市 300070  
天津市自然科学基金资助项目, No. 013611511  
通讯作者: 孙保存, 300060, 天津市河西区体院北环湖西路, 天津医科大学肿瘤研究所.  
电话: 022-23340123-5221  
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

## 摘要

**目的:** 比较不同大肠癌细胞 Fas 受体及其下游通路抑制因子 FLIP 的表达差异, 探讨 Fas、FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响。

**方法:** 体外培养大肠癌细胞, 应用直接免疫荧光流式细胞术检测细胞表面 Fas 表达率, 半定量 RT-PCR 法测定 FLIP mRNA 的水平, 并采用 Annexin V 法评价细胞对 Fas 介导的凋亡的敏感性。

**结果:** 大肠癌细胞表面 Fas 表达率不同, 其中 HT-29 细胞的表达率为  $42.46 \pm 4.32\%$ , 明显高于其他 3 株细胞。SW620 和 HT-29 细胞 FLIP mRNA 含量较高, Colo205 居中, Lovo 则呈阴性; 且相对于任何一株 FLIP 表达阳性的细胞, FLIP<sub>L</sub> 的表达水平均高于 FLIP<sub>S</sub>。给予凋亡诱导型抗 Fas 抗体 (CH-11) 刺激后, 4 株大肠癌细胞凋亡敏感性均较低。

**结论:** 不同的大肠癌细胞株可能通过不同途径逃避 Fas 介导的凋亡, 其中包括下调 Fas 的表达和上调 FLIP 的含量。

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 赵秀兰, 张诗武, 孙保存. Fas 死亡受体及 FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1590-1592  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1590.asp>

## 0 引言

大肠癌是胃肠道最常见的恶性肿瘤之一, 其作为黏膜相关淋巴组织, 细胞表面重要的凋亡受体 Fas 表达率与凋亡敏感性不一致的现象一直吸引人们的关注<sup>[1]</sup>. 近年来, 在某些人类恶性肿瘤如恶性黑色素瘤、部分恶性淋巴瘤和白血病、卡波氏肉瘤等的胞质中相继分离出一种重要的凋亡相关蛋白, 即 FLIP (FADD-like IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein)<sup>[2]</sup>. 由于该蛋白与凋亡关键因子 Caspase-8 在结构上有相似性, 推测其可能在 Fas 等受体介导的凋亡途径中起到十分重要的作用. FLIP 在蛋白水平上有长型 FLIP (FLIP<sub>L</sub>) 和短型 FLIP (FLIP<sub>S</sub>) 2 种形式, 均能抑制 Caspase-8 与 FADD (Fas-associated death domain) 的结合, 进而阻断 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[3]</sup>. 本研究以体外培养的大肠癌细胞株为实验对象, 通过检测细胞表面 Fas 的表达率和胞内 FLIP mRNA 的水平, 进一步

分析大肠癌细胞凋亡敏感性差异的具体机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** FITC 标记鼠抗人 Fas 单抗 (UB2)、凋亡诱导型鼠抗人 Fas 单抗 (CH-11)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Beckman Coulter 公司, ImProm- II<sup>TM</sup> 反转录酶购自 Promega 公司, 其余 RT-PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司 EP-ICS-XL 型), PCR 仪 (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 型), 凝胶成像分析仪 (Kodak 440CF 型)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 大肠癌细胞株 Lovo、HT-29、Colo205 由天津肿瘤医院中心实验室保存, SW620 由 Joe O' Connell 教授惠赠. 细胞置于含 100 nmol/L 胎牛血清 (Hyclone 公司) 和青霉素 100 kU/L、链霉素 100 mg/L 的 RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司) 中, 培养箱内含 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 温度 37℃。

**1.2.2 直接免疫荧光流式细胞术** 细胞经消化液 (2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA) 作用后, PBS 洗涤 2 次, 取  $5 \times 10^5$  细胞重悬于 100  $\mu$ L PBS, 实验管加入 20  $\mu$ L FITC 标记的抗 Fas 抗体 (UB2, 10 mg/L), 对照管加入等体积 FITC 标记的同型相配抗体, 室温避光孵育 20 min. 细胞悬液经流式细胞仪检测, 并以 Coulter XL System II<sup>TM</sup> 软件分析荧光阳性细胞百分比。

**1.2.3 半定量 RT-PCR** 收集对数生长期的细胞, PBS 洗涤, TRIZOL (Gibco 公司) 提取总 RNA, 以 Random 6mers 为引物进行逆转录, 随后进入 PCR 扩增. FLIP<sub>L</sub> 上游引物: 5' -ACCGAGACTACGACAGCTTTGTG-3', 下游引物: 5' -CAATGTGAAGATCCAGGAGTGGG-3', 扩增片段长 429 bp; FLIP<sub>S</sub> 上游引物: 5' -ACCTTGTGGTTGAGTTGGAGAAAC-3', 下游引物: 5' -ACAATTTCCAAGAATTTTCAGATCAG-3', 扩增片段长 259 bp<sup>[3]</sup>; 内参照  $\beta$ -actin 上游引物: 5' -ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 下游引物: 5' -CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 扩增片段长 318 bp. PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 65℃ 退火 45 s (其中 FLIP<sub>S</sub> 的最佳退火温度为 60℃), 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min. 产物在 13 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 经凝胶成像系统进行半定量比较, 计算扩增片段的相对含量. 扩增片段相对含量 (%) = 扩增片段 Net. Int. /  $\beta$ -actin Net. Int.  $\times 100\%$ .

**1.2.4 Annexin V-FITC 染色法** 以凋亡诱导型鼠抗人 Fas 单抗 (CH-11, 0.1 mg/L) 刺激细胞, 孵箱培养 16 h,

收集细胞,调整密度至  $5 \times 10^5$ /管, PBS 洗涤 2 次,重悬于 100  $\mu$ L 反应缓冲液,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC (5 mg/L) 和 2.5  $\mu$ L PI (250 mg/L), 冰上避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测. 凋亡敏感性 (%) = 刺激后细胞凋亡率 (%) - 刺激前细胞凋亡率 (%).

**统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件系统处理, 各组间差异比较为单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 细胞表面 Fas 表达率** 经流式细胞仪多次测定比较发现, 4 种大肠癌细胞株之间 Fas 的表达水平差异显著 ( $F = 297.808$ ,  $P < 0.01$ ), HT-29、Colo205 高于 SW620、Lovo, 其中 HT-29 的 Fas 表达水平远远高于其他 3 种大肠癌细胞株, 而 SW620、Lovo 则呈低水平表达 (表 1).

表 1 不同大肠癌细胞株 FasR 表达率 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	Fas
HT-29	3	42.4 600 $\pm$ 4.3 189
Colo205	3	7.2 333 $\pm$ 1.2 529 <sup>a</sup>
SW620	4	2.6 300 $\pm$ 0.2 627 <sup>b</sup>
Lovo	4	1.4 700 $\pm$ 0.2 223 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HT-29.

**2.2 FLIP mRNA 含量** 半定量 RT-PCR 检测结果显示, 2 种形式的 FLIP (FLIP<sub>L</sub> 和 FLIP<sub>S</sub>) 在不同大肠癌细胞株中表达水平明显不同 ( $F = 849.513$   $P < 0.01$ ;  $F = 143.571$   $P < 0.01$ ). SW620 和 HT-29 的表达水平较高, Colo205 的表达水平居中, 而 Lovo 则几乎不表达任何形式的 FLIP. 且相对于任何一个 FLIP 表达阳性的细胞, 均存在着 FLIP<sub>L</sub> 的表达水平明显高于 FLIP<sub>S</sub> 的现象 (图 1, 表 2).

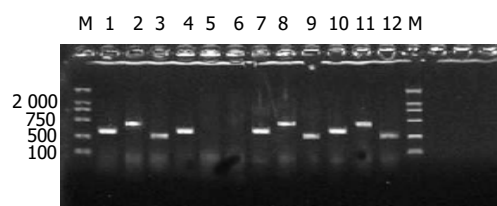


图 1 4 种大肠癌细胞株 FLIP RT-PCR 扩增结果. 1-3: SW620  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 4-6: Lovo  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 7-9: HT-29  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 10-12: colo205  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>.

表 2 大肠癌细胞株 FLIP mRNA 的相对含量 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	FLIP <sub>L</sub>	FLIP <sub>S</sub>
SW620	4	85.64 $\pm$ 3.94	30.43 $\pm$ 4.79
HT-29	4	83.36 $\pm$ 3.44	36.30 $\pm$ 3.44
Colo205	4	61.64 $\pm$ 1.63	17.15 $\pm$ 1.61
Lovo	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

**2.3 凋亡敏感性分析** 凋亡诱导型抗体刺激细胞后, 以 Annexin V-FITC 标记膜表面磷脂酰丝氨酸变化的凋亡早期细胞, 流式细胞仪检测凋亡率, 4 种大肠癌细胞株的凋亡敏感性存在显著差异 ( $F = 44.962$ ,  $P < 0.01$ ), 但凋亡敏感性均较低 (表 3).

表 3 不同细胞的凋亡敏感性 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	凋亡敏感性
SW620	3	2.7 800 $\pm$ 0.4 636
HT-29	3	9.2 100 $\pm$ 1.3 473
Colo205	3	9.9 000 $\pm$ 1.6 350
Lovo	3	1.8 700 $\pm$ 0.0 700

## 3 讨论

大肠癌作为严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 早期便易出现侵袭和转移, 且不同患者对诱导凋亡化疗药的敏感性也不尽相同. 其中, 肿瘤细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的变化一直吸引着人们的关注. 夏成青 *et al* [4] 研究发现, 结肠腺癌组织和正常结肠黏膜组织均有不同程度的 Fas 表达, 但癌组织中的表达水平有所降低. 且与未发生转移的癌组织相比, 发生淋巴结转移的癌组织 Fas 的平均阳性率更低. Fas 表达水平的下调可能是肿瘤细胞对体内免疫系统及外源性刺激产生凋亡抵抗的原因之一. 值得注意的是, 一方面临床上在使用了能够促进 Fas 表达的化疗药后, 仍有一部分大肠癌患者病情未得到明显控制; 另一方面, 在 Fas 高表达的组织细胞中, Fas 的表达水平与其对 Fas 配体 (FasL) 诱导凋亡的敏感性也存在着不一致的现象 [5-6]. 这提示在 Fas 介导的受体凋亡途径中必然存在着其他的抑制调节因子, 肿瘤细胞凋亡敏感性的下降也是不同水平综合作用的结果.

FLIP 是近年来发现的一类含有 DED (death effect domain) 的凋亡抑制蛋白, 在病毒、真核生物、哺乳动物等许多物种中广泛存在. 其在蛋白水平有 2 种存在形式, 即小分子的 FLIP<sub>S</sub> 和大分子的 FLIP<sub>L</sub>, 前者在结构上只含有 2 个 DED, 后者除此之外还含有一个 Caspase 同源结构域, 即 Caspase 蛋白水解酶区, 但该区域中具有催化活性的半胱氨酸残基被酪氨酸残基所取代 [2]. 目前, 对于 FLIP 在抑制凋亡中的具体机制仍未得到阐明. 比较公认的观点为: 由于 FLIP 在结构上与 Caspase-8 极为相似, 其 DED 也可以与 FADD 相结合, 竞争性抑制 Caspase-8 前体结合于 DISC (death inducing signaling complex) 上, 从而抑制凋亡 [7].

在本研究中, 我们以凋亡诱导型抗 Fas 抗体体外刺激大肠癌细胞株, 经检测发现 4 株细胞对 Fas 介导的凋亡均不敏感. 进一步研究发现, 4 种细胞株之间 Fas 表达率及 FLIP mRNA 水平也不尽相同. 其中, 除 HT-29 具有一定程度的 Fas 表达外, 其余 3 株细胞的 Fas 表达率均较低,

与先前的报道基本一致<sup>[8]</sup>;而SW620、HT-29的FLIP mRNA含量较高, Colo205居中, Lovo则几乎呈阴性. 这说明, 不同的大肠癌细胞可能存在不同的凋亡抵抗机制: SW620和Colo205很可能通过下调Fas和上调FLIP 2种方式来降低凋亡敏感性;而对于HT-29来说, FLIP的高水平表达可能起到更为重要的作用;至于Lovo, 由于二者的低表达, 以及Fas/FasL表达率与凋亡率之间无明显关联, 提示其很可能不是通过Fas通路发生凋亡的<sup>[9]</sup>. Nita *et al*<sup>[10]</sup>发现与其他大肠癌细胞相比, Lovo高表达Bcl-2和Bcl-XL, 且伴随着Bax的表达下降, 这提示对于Lovo来说, 线粒体凋亡途径似乎起到更为重要的作用.

此外, Krueger *et al*<sup>[11]</sup>发现2种形式的FLIP均可阻断Caspase-8激活的蛋白水解反应. 在BJAB细胞中, 当FLIP<sub>L</sub>过表达时, Caspase-8的第一步水解作用仍可实现, 第二步酶切水解受到抑制; FLIP<sub>S</sub>过表达时, 胞质中检测不到Caspase-8任何的酶切水解成分. 而在我们的实验中, 对于任何一个FLIP mRNA表达阳性的细胞, 均存在着FLIP<sub>L</sub>表达明显高于FLIP<sub>S</sub>的现象. 这种mRNA水平的差异是否与蛋白水平相一致以及究竟哪一种蛋白类型起到更为重要的凋亡抑制作用仍需进一步的探讨.

#### 4 参考文献

- 1 von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanism to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998;58: 526-534
- 2 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoep J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
- 3 Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164:5459-5465
- 4 夏成青, 刑长虹, 唐小奈. 结肠癌组织中Fas表达的定量分析. 临床与实验病理学杂志 2002;18:307-309
- 5 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365
- 6 Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630
- 7 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541-1548
- 8 Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1(CD 95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994;57:371-377
- 9 彭志海, 邢同海, 裘国强, 唐华美. 结肠腺癌细胞株Fas/FasL的表达与凋亡的关系. 中国癌症杂志 2001;11:25-28
- 10 Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998;78:986-992
- 11 Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276:20633-20640

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞的免疫表型

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈涛

撒亚莲, 华映坤, 严新民, 董虹, 沈涛, 云南省第一人民医院临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032  
宋建新, 云南省第一人民医院临床检验中心 云南省昆明市 650032  
贾玲, 云南省第一人民医院肿瘤科 云南省昆明市 650032  
通讯作者: 撒亚莲, 650032, 云南省昆明市金碧路 157#, 云南省第一人民医院. sa\_yi@yahoo.com.cn  
电话: 0871-3638454 传真: 0871-3619076  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

#### 摘要

目的: 用多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细

胞, 并了解其在体外的增殖能力及免疫表型的变化.

方法: 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离获取 10 例大肠癌患者外周血单个核细胞, rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 共孵育. 分别在第 0, 4, 7, 10, 13 d 计细胞数, 并通过流式细胞术检测细胞免疫表型.

结果: 大肠癌患者外周血单个核细胞与 IFN- $\gamma$ , IL-2, Anti-CD3mAb 共孵育 4, 7, 10, 13 d, 细胞数分别增加  $2.69 \pm 0.9$ ,  $14.1 \pm 3.7$ ,  $23.0 \pm 5.0$  和  $31.2 \pm 3.0$  倍. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>