

FADD, Caspase-8的表达缺失在肝细胞癌TRAIL耐受机制中的作用

赵永忠, 何松青, 林中, 王波, 周英琼, 王丽兰

赵永忠, 林中, 王丽兰, 桂林医学院附属医院消化内科 广西壮族自治区桂林市 541001
何松青, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430030
王波, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
周英琼, 桂林医学院附属医院病理科 广西壮族自治区桂林市 541001
广西科技厅科学研究与技术开发计划基金资助项目, No. 桂科攻0632007-1H
作者贡献分布: 赵永忠与何松青对此文所作的贡献均等; 此课题由赵永忠与何松青共同设计; 研究过程主要由赵永忠与何松青操作完成, 林中、王波、周英琼及王丽兰参与部分研究工作; 数据分析由赵永忠完成; 本论文写作由赵永忠与何松青共同完成。
通讯作者: 赵永忠, 541001, 广西壮族自治区桂林市乐群路15号, 桂林医学院附属医院消化内科. zyz-1968@163.com
电话: 0773-2823740
收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-03-05
接受日期: 2009-03-06 在线出版日期: 2009-04-18

Influence of loss of FADD and Caspase-8 on TRAIL resistance in hepatocellular carcinoma

Yong-Zhong Zhao, Song-Qing He, Zhong Lin, Bo Wang, Ying-Qiong Zhou, Li-Lan Wang

Yong-Zhong Zhao, Zhong Lin, Li-Lan Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Song-Qing He, Hepatic Surgery Center; Affiliated to Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Bo Wang, Department of Gastroenterology, Affiliated to Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Wuhan 430030, Hubei Province, China

Ying-Qiong Zhou, Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Supported by: the Foundation of Scientific Research, from Department of Science and Technology in Guangxi Zhuang Autonomous Region, No. Guikegong 0632007-1H

Correspondence to: Yong-Zhong Zhao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College, 15 Lequn Road, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. zyz-1968@163.com

Received: 2009-01-11 Revised: 2009-03-02

Accepted: 2009-03-06 Published online: 2009-04-18

Abstract

AIM: To investigate the influence of loss of FADD and Caspase-8 on TRAIL resistance in

hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Immunohistochemistry method was used to detect FADD expression in HCC, and in situ hybridization was employed to determine Caspase-8 expression. The effects of TRAIL in combination with chemotherapeutic agents or anticancer cytokines on promoting apoptosis in the HCC cell lines were analyzed, the Caspase-8 activity was detected by Caspase-8 Fluorescent Assay Kit and FADD expression was detected by Western blot before and after treatment.

RESULTS: Fifteen out of 60 HCC cases were found to express FADD protein. The positive rate was significantly lower in HCC than in non-cancerous adjacent liver tissues (25% vs 70%, $P < 0.01$). Caspase-8 positive rate (19/20) was higher in normal liver tissues than in HCC (33/60) ($P < 0.01$). Chemotherapeutic agents (mitomycin, 5-FU or actinomycin D) dramatically augmented TRAIL-induced apoptosis in HCC cell lines by increasing FADD and Caspase-8 expression.

CONCLUSION: The down-regulated expression of FADD and loss of Caspase-8 expression might play important roles in resistance to TRAIL-induced apoptosis.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand; FADD; Caspase-8; Apoptosis; Resistance

Zhao YZ, He SQ, Lin Z, Wang B, Zhou YQ, Wang LL. Influence of loss of FADD and Caspase-8 on TRAIL resistance in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(11): 1143-1146

摘要

目的: 探讨FADD和Caspase-8表达缺失在肝细胞癌TRAIL耐受机制中的作用。

方法: 免疫组织化学方法检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中FADD蛋白的表达, 原位杂交方法检测HCC中Caspase-8的表达, 并结合临床资料进行分析。

■背景资料

TRAIL通过与细胞膜上的死亡受体结合, 可选择性诱导某些肿瘤细胞凋亡, 而对绝大多数正常细胞无毒性作用, 这一特性提示TRAIL在肿瘤治疗中具有很好的应用前景。然而有研究表明, 约60%肿瘤细胞株对TRAIL不敏感, 从而限制了TRAIL抗肿瘤的临床应用。因此, 如何提高这些肿瘤细胞对TRAIL的敏感性成为国内外学者研究的热点。

■同行评议者

姜春萌, 教授, 大连医科大学附属第二医院消化科; 范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研发前沿

深入研究肝癌细胞发生TRAIL诱导凋亡抵抗的机制无疑是今后抗癌治疗研究中的重点之一。弄清楚TRAIL通路的确切调控机制以及肿瘤的遗传背景,对TRAIL在肿瘤治疗中的应用无疑具有决定性作用。

采用TRAIL联合应用亚毒性剂量的化疗药及细胞因子,观察其对于肝癌细胞株(HepG2、SMMC-7721)的胞毒作用,荧光分光光度计检测Caspase-8活性变化,Western blot检测FADD表达的变化。

结果: 60例HCC中FADD阳性率,显著低于癌旁肝组织FADD阳性率(25% vs 70%, $P<0.01$); HCC中33例Caspase-8表达阳性率,低于癌旁组织阳性率(19/20, 95%)。亚毒性剂量的化疗药(丝裂霉素、5-氟尿嘧啶、放线菌素D)可显著增强TRAIL的细胞毒活性,治疗后Caspase-8活性及FADD表达量显著增高。

结论: HCC中FADD、Caspase-8的表达下调可能参与TRAIL耐受的机制,化疗药物可通过上调FADD的表达、增强Caspase-8活性来加强TRAIL的抗癌作用。

关键词: 肝细胞癌; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; FADD; Caspase-8; 凋亡; 耐受

赵永忠, 何松青, 林中, 王波, 周英琼, 王丽兰. FADD, Caspase-8的表达缺失在肝细胞癌TRAIL耐受机制中的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(11): 1143-1146
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/1143.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)因具有特异性杀伤肿瘤细胞的作用倍受重视^[1]。我们以前的研究发现肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞株对TRAIL不敏感,提示存在抑制TRAIL诱导凋亡的因素^[2]。在TRAIL的凋亡信号传递过程中FADD、Caspase-8起关键性作用^[3]; 推测FADD、Caspase-8可能在HCC对TRAIL耐受中起重要作用。据此我们检测了HCC中FADD、Caspase-8的表达。同时,采用TRAIL联合应用亚毒性剂量的化疗药及细胞因子,观察其对肝癌细胞株(HepG2、SMMC-7721)的胞毒作用,并检测了Caspase-8活性及FADD表达的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2、SMMC7721由华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心实验室冻存。细胞培养于RPMI 1640培养液,内含100 mL/L胎牛血清,青霉素(100 kU/L)、链霉素(100 mg/L)。培养条件为37℃, 50 mL/L CO₂,

饱和湿度。60例肝细胞癌组织及20例癌旁组织选自外科手术切除标本,全部标本均经病理检查证实。其中男53例,女7例,年龄18-75(平均45.8±13.5)岁,HBsAg阳性55例。根据TMN分期将60例肝细胞癌分为I级5例、II级23例、III级27例、IV级5例。根据组织学观察,高中低分化成HCC分别为35、15、10例。所有标本均选自术前未经化疗或放疗或免疫治疗,且无广泛坏死的肿瘤组织。所有标本均经40 g/L多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μm连续切片备用。正常对照肝组织20例。

1.2 方法

1.2.1 HCC组织FADD蛋白的检测: 羊抗人FADD蛋白的单抗(Santa Cruz Biotech公司产品,购自武汉博士德生物工程公司),采用免疫组化SABC法检测。结果判定: FADD阳性着色为细胞质染成棕黄色,阳性程度分为三级: 低倍镜视野阳性细胞少于1/3为(+), 1/3-2/3为(++), 大于2/3为(+++)。

1.2.2 HCC中Caspase-8表达检测: 地高辛标记的Caspase-8探针及检测试剂盒购自博士德公司, 5 μm厚的经40 g/L多聚甲醛固定、石蜡包埋的组织切片常规脱蜡、水化,预处理30 min, 蛋白酶K消化30 min, 预杂交液20 μL预杂交2-4 h, 加含5-10 ng地高辛标记DNA探针的杂交液30 μL 42℃杂交36 h, 加入抗地高辛抗体, 37℃孵育1 h, DAB显色37℃ 3 h左右, 典型切片加上不含探针的杂交液做阴性对照。

1.2.3 TRAIL联合化疗治疗HCC细胞: 采用TRAIL(100 μg/L, Santa Cruz Biotech公司产品)联合化疗药物[丝裂霉素(0.1 mg/L)、5-氟尿嘧啶(5-FU 0.1 mg/L)或放线菌素D(0.1 mg/L)]处理HCC细胞, MTT法检测细胞活性。原位末端标记检测法及流式细胞仪检测细胞凋亡率。采用荧光分光光度计检测了各组间及治疗前后Caspase-8活性变化,并用Western blot检测FADD表达的变化。Caspase-8活性检测按Clontech公司Caspase-8荧光分析试剂盒操作说明进行,绘制标准曲线,计算Caspase-8活性。

统计学处理 采用SPSS12.0软件进行数据处理,数据以mean±SD表示,多组间差异性检验采用方差分析,两组间比较采用t检验。P<0.05定义为有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC组织中FADD、Caspase-8蛋白的表达 FADD阳性信号为胞质染成棕黄色,主要位于胞

■相关报道

国内有学者研究了TRAIL与化疗药(阿霉素、顺铂、紫杉醇及丝裂霉素C)联用对人骨肉瘤及前列腺癌细胞具有显著的协同抗癌作用,但未见与本文相同报道。

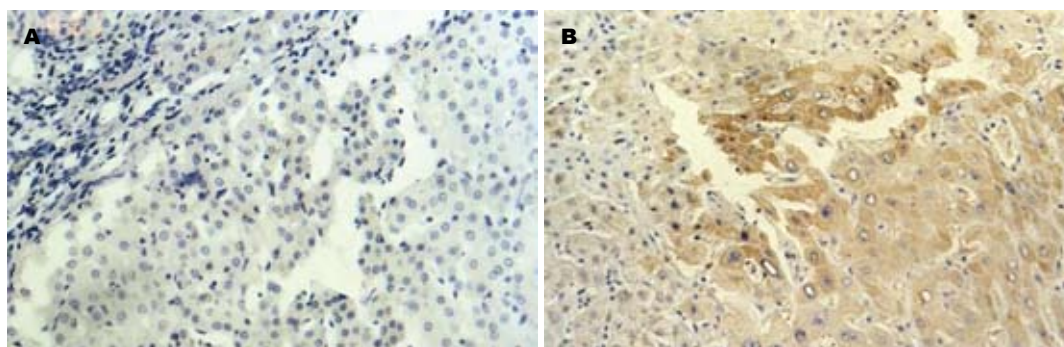


图 1 肝组织中FADD的表达. A: HCC; B: 癌旁(SABC × 200).

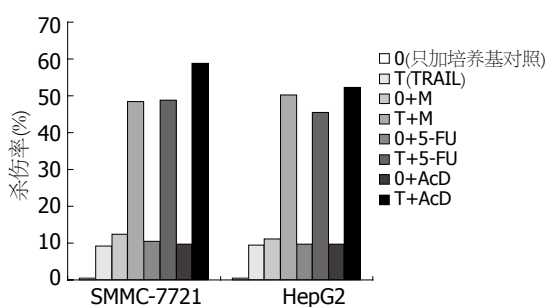


图 2 TRAIL及联合应用抗癌药对肝癌细胞株SMMC-7721、HepG2的杀伤作用(图示均值比较, SD均小于5, 未表示).

质(图1). 60例HCC中15例FADD阳性(25%), 显著低于癌旁肝组织FADD阳性率(14/20, 70%). HCC组织中FADD的表达与肿瘤分级有关, III/IV期肿瘤FADD的阳性率(4/35, 12.5%)显著低于I/II级表达阳性率(11/28, 39.3%, $P<0.05$). 与FADD表达类似, 60例HCC中共有33例HCC Caspase-8表达阳性, 显著低于癌旁组织阳性率(19/20, 95%). Caspase-8及FADD的表达与患者的性别、年龄、HBsAg阳性与否、AFP水平、肿瘤的大小、分化以及是否转移无关.

2.2 化疗药物可与TRAIL发挥协同细胞毒作用 MTT法检测TRAIL(100 $\mu\text{g/L}$)及联合应用亚毒性剂量的化疗药丝裂霉素(1 mg/L, M)组、5-FU(0.1 mg/L)组、放线菌素D(0.1 mg/L, AcD)对肝癌细胞株SMMC-7721、HepG2的杀伤作用. 结果如图2所示, 单独使用TRAIL及亚毒性剂量的化疗药对肝癌细胞株SMMC-7721、HepG2仅有微弱的杀伤作用, 结果分别为: TRAIL($9.2\% \pm 0.3\%$, $9.5\% \pm 0.6\%$), M($12.5 \pm 0.4\%$, $11.2\% \pm 0.7\%$), 5-FU($10.6\% \pm 1.3\%$, $9.2\% \pm 1.0\%$), AcD($9.8\% \pm 1.5\%$, $9.7\% \pm 1.1\%$); 而联合使用TRAIL和亚毒性剂量的化疗药能够大大提高杀伤率, 结果分别为: TRAIL+M($48.6\% \pm 2.8\%$, $50.2\% \pm 3.6\%$), TRAIL+5-FU($48.8\% \pm 3.0\%$, $46.6 \pm 3.3\%$), TRAIL+AcD($58.9\% \pm 2.9\%$,

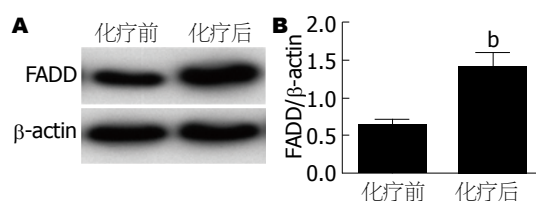


图 3 丝裂霉素化疗后FADD表达量显著增加. A: Western blot检测丝裂霉素(1 mg/L)化疗前后FADD的表达; B: FADD表达的相对定量; $^bP<0.01$.

$52.3\% \pm 3.5\%$). 差异有显著性(与单一治疗比较, 均 $P<0.01$). Caspase-8活性检测发现化疗增加Caspase-8活性2-4倍, Western blot检测发现丝裂霉素(1 mg/L)化疗后FADD表达量较化疗前增加2-3倍(1.425 ± 0.359 , 0.632 ± 0.175 , $P<0.01$, 图3).

3 讨论

TRAIL通过与死亡受体结合, 激活Caspase通路, 传递和放大凋亡信号, 从而诱导靶细胞发生快速、大量、高效的凋亡反应, 特异性地杀伤肿瘤细胞^[4-5]. 其抗肿瘤作用为P53非依赖型^[6]. 我们以前的系列研究表明: HCC普遍存在TRAILR的表达, 并存在受体类型的表达差异, HCC细胞株高表达DR, 同时存在DcR的表达缺失, 但HCC对TRAIL治疗不敏感^[2-3]. 据此推测HCC中TRAIL耐受的主要机制存在于胞内, 其中凋亡信号传递受阻及抗凋亡信号的过度激活可能是某些肿瘤细胞对TRAIL耐受的重要原因. FADD、Caspase-8在TRAIL的凋亡信号传递过程中起关键作用^[7-11]. Hopkin *et al*发现人成纤维神经肿瘤细胞有高度恶性的N型细胞株有Caspase-8的缺失、对TRAIL耐受, 而低恶性的S型细胞株表达Caspase-8、对TRAIL敏感, 临床IV期患者Caspase-8表达下调^[11]. FLIP(Flice inhibitory protein)是Caspase活性抑制剂, 他的序列与procaspase-8的序列相似, 但缺乏重要的催化残基, 他通过与procaspase-8竞争性结合调

■创新盘点

本文立足于HCC中FADD、Caspase-8表达的研究, 揭示了TRAIL与化疗联合可以显著增强TRAIL的抗癌效果.

■应用要点

TRAIL与化疗药物联用后既能提高肿瘤细胞对TRAIL的敏感性, 同时又可降低化疗药的剂量, 减轻不良反应, 提高患者的生活质量. 为临床开发新的抗癌药物提供了理论依据.

■名词解释

FADD: 指Fas相关死亡结构域, 属于一种死亡受体分子, 可与配体TRAIL结合诱导细胞凋亡。

亡通路上的接合器蛋白分子, 封闭凋亡通路, 阻止Caspase的活化, 从而使细胞逃逸TRAIL诱导的凋亡。本研究结果表明: HCC中存在FADD及Caspase-8的表达缺失, 只有25%的HCC检测到FADD蛋白表达, 阳性率显著低于癌旁组织; 45%的HCC中未见Caspase-8的表达, 而癌旁组织中Caspase-8表达的阳性率为95%。HCC中FADD及Caspase-8的表达缺失可能参与TRAIL耐受。

如何逆转TRAIL耐受是在TRAIL发展成为有效的抗癌药物前必须解决的重要课题。本实验中我们采用亚毒剂量的化疗药物联合TRAIL治疗HCC细胞株, 发现化疗药物可显著加强HCC细胞对TRAIL的敏感性。在以前的系列研究中, 我们发现IL-12可通过抑制survivin表达增强TRAIL对细胞的杀伤作用^[12]。本实验发现化疗药物能显著增加Caspase-8活性及FADD表达量, 提示化疗可通过上调FADD的表达, 增强Caspase-8活性来加强TRAIL的抗癌作用。

本研究表明, HCC中FADD、Caspase-8的表达下调可能参与TRAIL耐受的机制; 化疗药物可通过上调FADD的表达, 增强Caspase-8活性来加强TRAIL的抗癌作用, TRAIL与化疗联合治疗可能是一种新的HCC治疗策略。

■同行评价

本文通过研究FADD、Caspase-8的表达, 探讨HCC对TRAIL的耐受机制, 为今后开发抗HCC药物提供了一定的基础。

4 参考文献

- 1 何松青, 陈孝平. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体及其受体与抗肿瘤治疗. 中华外科杂志 2002; 20: 311-313
- 2 何松青, 陈彦, 陈孝平, 张万广, 王海平, 赵永忠, 王少发. 可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导肝癌细胞凋亡的研究. 中华肿瘤杂志 2003; 25: 116-119
- 3 He SQ, Chen XP, Zhao YZ, Zhang WG, Wang HP,

Yang CH, Wang SF. Expression Profiles of TRAIL Receptors and their Clinical Significance in Human Hepatocellular Carcinoma. *Chin Ger J Clin Oncol* 2003; 2: 25-29

- 4 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: 673-682
- 5 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
- 6 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308
- 7 Peter ME. The TRAIL DISCUSSION: It is FADD and caspase-8! *Cell Death Differ* 2000; 7: 759-760
- 8 Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000; 12: 611-620
- 9 Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 2000; 12: 599-609
- 10 Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC. Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 2000; 19: 4604-4610
- 11 Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlond KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 2000; 60: 4315-4319
- 12 何松青, 陈彦, 陈孝平, 张万广, 王海平, 张必翔. 白细胞介素12通过抑制survivin表达加强肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体诱导的肝癌细胞凋亡. 中华外科杂志 2003; 41: 453-457

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(常务副总编辑: 张海宁 2009-04-18)