

TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用

李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平

李小安, 秦建平, 中国人民解放军成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 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, 1968-09-01 生, 安徽省东至县人, 汉族, 2002 年第三军医大学博士毕业. 现工作单位为成都军区总医院消化内科. 发表文章 10 篇, 研究方向为消化道肿瘤.

全军“十五”科研基金资助项目, No.01MA172

项目负责人: 房殿春, 400038, 重庆市高滩岩, 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.

电话: 028-86570349

收稿日期: 2002-08-24 接受日期: 2002-10-12

Role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells

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

Xiao-An Li, Jian-Ping Qing, Department of Gastroenterology, Chinese PLA, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Dian-Chun Fang, Pei-Ren Si, Ru-Gang Zhang, Liu-Qin Yang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the Scientific Research Programs Foundation during the Tenth Five-Year Plan of PLA, No. 01MA172

Correspondence to: Dian-Chun Fang, Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Received: 2002-08-24 Accepted: 2002-10-12

Abstract

AIM: To observe the role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells.

METHODS: The survival fraction of SMMC-7721 cells was measured by MTT assay; Apoptosis rate was determined by TUNEL method and the ultramicrostructure of apoptotic cells induced by TRAIL was observed by electron-microscopy.

RESULTS: The role of TRAIL in survival fraction and apoptosis rate demonstrated a good relationship and the typical structure of apoptotic cells was found in some cells treated by TRAIL.

CONCLUSION: TRAIL can induce apoptosis in SMMC-7721 cells.

Li XA, Fang DC, Si PR, Zhang RG, Yang LQ, Qing JP. Role of TRAIL in inducing apoptosis of SMMC-7721 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(9):1369-1371

摘要

目的: 观察 TRAIL 诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用.

方法: 采用 MTT 法检测细胞存活分数; TUNEL 法检测细胞

凋亡率; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期; 电镜观察凋亡细胞超微结构.

结果: TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的存活分数和凋亡率的影响呈典型的量效关系, 经 TRAIL 作用后的细胞, 流式细胞仪检测呈标准的亚二倍峰, 电镜观察发现经 TRAIL 作用的部分细胞具有凋亡细胞的典型形态特征.

结论: TRAIL 可诱导 SMMC-7721 细胞凋亡.

李小安, 房殿春, 司佩任, 张汝刚, 杨柳芹, 秦建平. TRAIL 诱导肝癌细胞系 SMMC-7721 的凋亡作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(9):1369-1371

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1369.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因是 Wiley 小组于 1995 年最早克隆和命名的, 为 TNF 家族成员^[1]. 近年来, 人们发现其可以诱导肿瘤细胞凋亡, 对正常细胞的影响却很少, 因而受到了国内外学者的广泛重视^[1, 2]. 在本文中, 我们研究了 TRAIL 诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的作用.

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)由本实验室生产; 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; 肝癌细胞株 SMMC-7721 由本实验室保种.

1.2 方法 细胞培养: SMMC-7721 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 的培养液中, 培养条件为 37 °C, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度, 每 2-3 d 用 2.5 g/L 胰酶消化, 以 1:3-1:5 传代. MTT 法测细胞存活分数^[3]: 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 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板, 每孔终体积为 200 μL, CO₂ 孵箱内培养 2-3 d 后按 50 μg/L, 150 μg/L, 500 μg/L, 1 500 μg/L, 5 000 μg/L 的剂量分别给予 TRAIL, 对照组给予同体积的 PBS, 药物作用 24 h. 测值前 4 h 每孔加 20 μL 5 g/L MTT, 孵育后吸去孔内上清, 每孔加 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 酶联免疫检测测 A₅₇₀ 值. 细胞存活分数(survival fraction)=实验组 A₅₇₀/对照组 A₅₇₀ × 100%. 实验重复 3 次, 取平均值.

TUNEL 法检测 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响: 将无菌的盖玻片置于六孔板中, 每孔一片. 取对数生长期细胞以 2.5 g/L 胰蛋白酶消化细胞, 用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 细胞培养液配成单个细胞悬液, 稀释成 $5 \times 10^8/L$. 取 0.5 mL 滴于盖玻片上, 37 °C、50 mL/L CO₂、饱和湿度下孵育 2 h 后, 每孔加培养液 2 mL, 次日, 每孔加入不同浓度(剂量同 MTT 法)的 TRAIL. 24 h 后, 按 TUNEL 试剂盒说明操作, DAB 显色后, 高倍镜(400×)下随机数 200 个细胞, 记下凋亡细胞数和未凋亡细胞数, 共数 5 个视野. 细胞凋亡率(apoptosis rate)= 凋亡细胞数/(凋亡细胞数+未凋亡细胞数)×100%. 流式细胞仪测定 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的凋亡率和细胞周期的影响: 按 0 μg/L(对照组)、200 μg/L(T1 组)、400 μg/L(T2 组)给予 TRAIL, 24 h 后收集不同浓度药物处理组的细胞, PBS 漂洗 2 次, 750 mL/L 冷乙醇固定 24 h, PI 染色后, 用流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率. 电镜: 待 SMMC-7721 细胞长至对数生长期, 取两瓶细胞, 分别加 100 μg/L 的 TRAIL 和同体积的 PBS, 作用 24 h 后, 常规胰酶消化细胞, PBS 洗 2 次, 30 g/L 的戊二醛固定后送检.

2 结果

2.1 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞存活分数的影响 TRAIL 作用于肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h, 细胞的存活分数从 50 μg/L 的 89.1 % 降至 5 000 μg/L 27.2 %, 存在较好的量效关系.

2.2 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响 TRAIL 能明显诱导 SMMC-7721 细胞凋亡, 存在较好的量效关系, 见图 1.

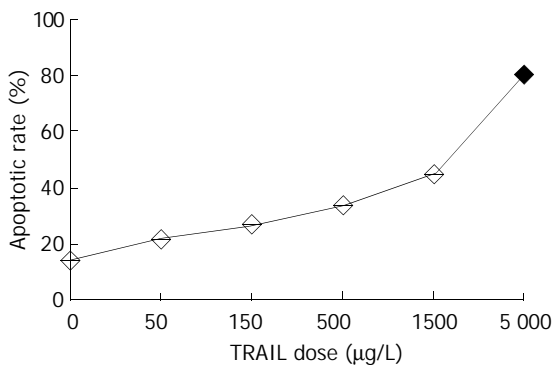


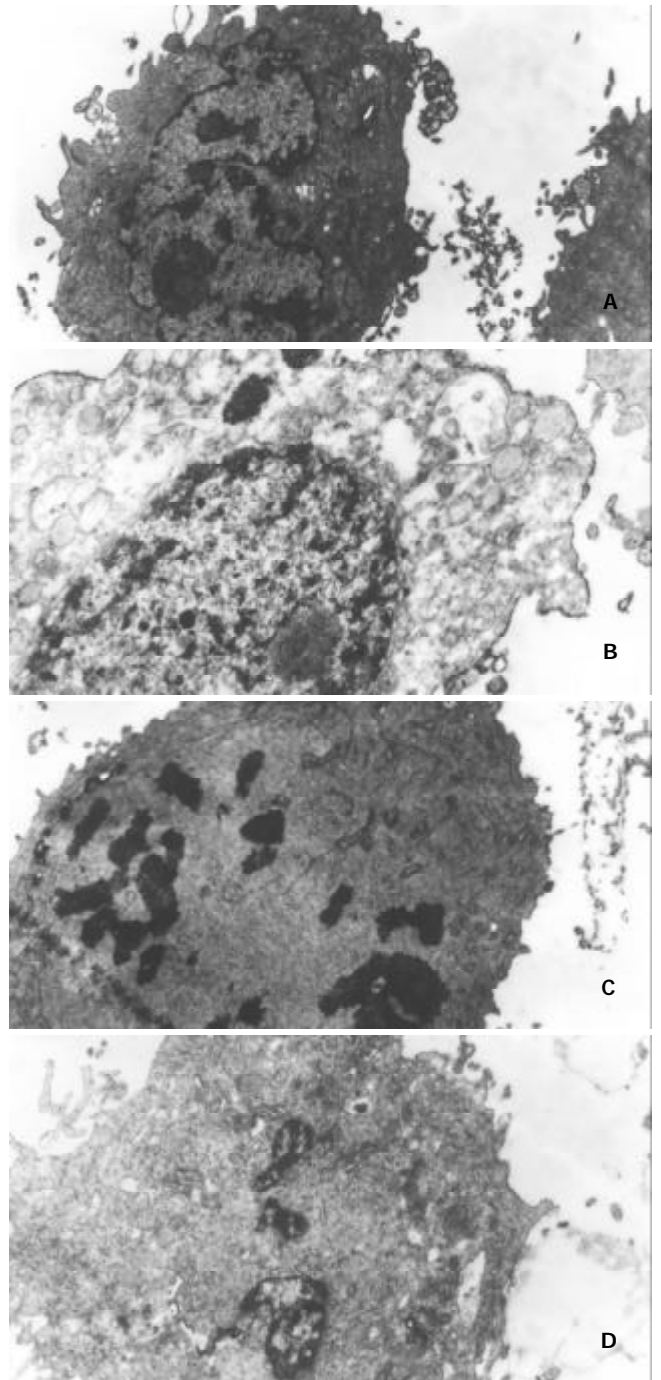
图 1 TRAIL 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响.

2.3 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞的凋亡率和细胞周期的影响 400 μg/L 的 TRAIL 作用于 SMMC-7721 细胞, 可见明显的亚二倍峰形成, TRAIL 还可使 S 期细胞的比例增加, G₂M 期细胞的比例减少, 结果见表 1.

2.4 电镜 未经处理的 SMMC-7721 细胞, 胞膜微绒毛和伪足多见, 核大、核内有多个核仁(图 1A). 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 线粒体空泡化(图 1B), 核浓缩、碎裂(图 1C), 凋亡小体形成(图 1D).

表 1 TRAIL 对 SMMC-7721 细胞细胞周期和凋亡率的影响

分组	TRAIL 剂量(μg/L)	细胞周期			凋亡率(%)
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ M	
对照组	0	0.39	0.08	0.53	0.72
T1 组	200	0.47	0.28	0.25	19.31
T2 组	400	0.30	0.45	0.25	23.83



A 未处理细胞, 胞膜微绒毛和伪足多见, 核大、核内有多个核仁.
 B 经 TRAIL 作用后的细胞线粒体空泡化.
 C 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 核浓缩、碎裂.
 D 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 凋亡小体形成.

3 讨论

TRAIL 是 TNF 家族成员, 有五种受体即 DR4, DR5, DcR1, DcR2 和 OPG. TRAIL 与 DcR1, DcR2 和 OPG 结

合不能诱导细胞凋亡, 但与 DR4, DR5 结合可导致细胞凋亡^[4-20]. 我们以前曾证实 TRAIL 对结肠癌细胞系 SW480 有杀伤作用^[21]. 本研究我们发现 TRAIL 可以诱导 SMMC-7721 细胞凋亡. 经 TRAIL 作用后的 SMMC-7721 细胞经流式细胞仪检测, 出现典型的亚二倍峰, 该峰的出现是凋亡的特征之一^[22]. 此外, 我们的电镜结果发现, 经 TRAIL 作用后的细胞, 胞膜微绒毛和伪足减少, 核浓缩、碎裂, 凋亡小体形成, 具有凋亡细胞的典型形态特征. 因此, 我们有充足的证据表明 TRAIL 是通过诱导细胞凋亡的方式起抗肿瘤作用的. TRAIL 诱导的细胞凋亡涉及线粒体膜电位的改变, 线粒体释放细胞色素 C^[8-10, 23-26], 而我们用电镜观察到经 TRAIL 作用后的 SMMC-7721 细胞线粒体空泡化, 这种功能和形态的变化有可能存在一定的联系. 流式细胞仪的结果表明 TRAIL 可使 SMMC-7721 细胞 G₂M 期细胞的比例减少, 证实 TRAIL 可能有抑制细胞增生的作用, S 期为细胞的 DNA 合成期, TRAIL 为什么使 SMMC-7721 细胞 S 期细胞的比例增加, 值得进一步研究.

早期的研究发现 TRAIL 诱导细胞凋亡有很高的选择性, 即仅诱导被病毒感染的细胞、转化细胞和肿瘤细胞凋亡, 对正常细胞的影响很小^[1, 2]. 最近人们发现 TRAIL 可诱导正常肝细胞凋亡, 但 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, 可能与 TRAIL 诱导不同的细胞凋亡存在不同的传导通路有关^[27]. 我们发现 TRAIL 可诱导肝癌细胞凋亡, 并提示可能与线粒体通路有关.

4 参考文献

- 1 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
- 2 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
- 3 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 第 1 版. 西安: 世界图书出版社, 1996:186
- 4 Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308
- 5 Srivastava RK. TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer. *Neoplasia* 2001;3:535-546
- 6 Evdokiou 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
- 7 Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998;273:14363-14367
- 8 Yamada H, Tada-Oikawa S, Uchida A, Kawanishi S. TRAIL causes cleavage of bid by caspase-8 and loss of mitochondrial membrane potential resulting in apoptosis in BJAB cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:130-133
- 9 Rocklin OW, Guseva N, Tagiyev A, Knudson CM, Cohen MB. Bcl-2 oncoprotein protects the human prostatic carcinoma cell line PC3 from TRAIL-mediated apoptosis. *Oncogene* 2001;20:2836-2843
- 10 Thomas WD, Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria. *J Immunol* 2000;165:5612-5620
- 11 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113
- 12 Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818
- 13 Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 1997;7:693-696
- 14 Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-5397
- 15 Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-821
- 16 Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997;186:1165-1170
- 17 MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1997;272:25417-25420
- 18 Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* 1997;7:1003-1006
- 19 Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813-820
- 20 Pan G, Ni J, Yu G, Wei YF, Dixit VM. TRUND, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS Lett* 1998;424:41-45
- 21 李小安, 房殿春, 杨仕明, 罗元辉. 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
- 22 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1999: 11-12
- 23 Sarker M, Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Lopez-Rivas A. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells. *Oncogene* 2002;21:4323-4327
- 24 Rohn TA, Wagenknecht B, Roth W, Naumann U, Gulbins E, Krammer PH, Walczak H, Weller M. CCNU-dependent potentiation of TRAIL/Apo2L-induced apoptosis in human glioma cells is p53-independent but may involve enhanced cytochrome c release. *Oncogene* 2001;20:4128-4137
- 25 Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES, Calabretta B. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 2001;21:3025-3036
- 26 Holler N, Zaru R, Mischeau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000;1:489-495
- 27 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