

TRAIL 及其受体在乳腺癌组织中的表达及意义

吴晓波,曹亚丽,谢春伟,刘秋明,瞿 伟

Expression and Significance of TRAIL and Its Receptors in Breast Cancer

WU Xiaobo, CAO Yali, XIE Chunwei, LIU Qiuming, QU Wei

The Breast Cancer, The Third Hospital of Nanchang, Nanchang 330009, China

Corresponding Author: CAO Yali, E-mail: caoyali@medmail.com.cn

Abstract: Objective To study the expression and receptors(DR4, DR5, DcR1, DcR2) of TRAIL in breast cancer tissues. **Methods** Expression of TRAIL and its receptors(DR4, DR5, DcR1, DcR2) were assayed by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR) in 60 breast cancer tissues and corresponding normal breast tissues. **Results** The expression of TRAIL and its receptors(DcR1, DcR2) were lower in breast cancer tissues than those of normal breast tissues ($P < 0.05$). The expression of TRAIL and its receptors(DR4, DR5, DcR1, DcR2) showed no correlations to the tumor grade and clinical stage ($P > 0.05$). **Conclusion** TRAIL and its receptors play an important role in the apoptosis of breast cancer. The low expression of TRAIL and the loss of the decoy receptors(DcR1, DcR2) in breast cancer may be concerned significantly with its pathogenesis.

Key words: Breast cancer; TRAIL; DR4; DR5; DcR1; DcR2; RT-PCR

摘要:目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)及其受体(DR4、DR5、DcR1、DcR2)在乳腺癌组织的表达及意义。**方法** 用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 60 例乳腺癌及对应的正常乳腺组织中 TRAIL 及其受体的表达。**结果** 乳腺癌组织中 TRAIL、DcR1、DcR2 表达均低于正常乳腺组织($P < 0.05$),且 TRAIL 及其受体的表达与乳腺癌的分期、分级等无关($P > 0.05$)。**结论** TRAIL 及其受体在乳腺癌凋亡过程中起着重要的作用,TRAIL 及其诱骗受体低表达同乳腺癌的发生关系密切。

关键词: 乳腺癌; TRAIL; DR4; DR5; DcR1; DcR2; RT-PCR

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A

0 引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,在我国有逐年升高且年轻化的趋势,严重危害了广大女性的健康和生命,故探知肿瘤的发生和找到有效的治疗方法就显得尤其重要。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是发现不久的肿瘤坏死因子(TNF)家族成员,能选择性地诱导多种肿瘤细胞凋亡,而对大多数正常的组织细胞没有毒性^[1],使其在肿瘤治疗中有重要的研究价值。TRAIL 对肿瘤细胞的诱导与其受体密切相关。本研究用反转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测乳腺癌及正常乳腺组织中 TRAIL 及其受体的表达,探讨其与乳腺癌的关系,并为 TRAIL 是否能在乳腺癌治疗中起作用提供

依据。

1 资料与方法

1.1 资料来源

标本取自南昌市第三医院乳腺中心一科 2009 年 3 月—2010 年 5 月期间经病理证实并行改良根治的乳腺癌患者 60 例,均为女性,年龄 29~69 岁,平均年龄 48.7 岁,术前未行化疗,根据乳腺癌世界卫生组织(WHO)组织学病理分级:Ⅰ级 11 例,Ⅱ级 21 例,Ⅲ级 28 例。根据国际抗癌联盟(UICC)乳腺癌的临床分期:Ⅰ期 18 例,Ⅱ期 29 例,Ⅲ期 13 例。另对应取此患者距恶性肿瘤灶 5 cm 以远正常乳腺组织 60 例。所有标本离体后 30 min 内放入液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 提取

取约 60 mg 组织放入有 0.8 ml 变性液(Denaturing Solution)的玻璃匀浆器中。按华美生物工程有限公司总 RNA 提取系统试剂盒说明书提取总 RNA,并测定其浓度、纯度以及检测 RNA 的完整性。

收稿日期:2012-05-04;修回日期:2012-09-11

基金项目:南昌市科技局重点攻关及产业化项目资助课题(洪科发计字[2007]116)

作者单位:330009 南昌,南昌市第三医院乳腺中心

通信作者:曹亚丽, E-mail: caoyali@medmail.com.cn

作者简介:吴晓波(1972-),男,硕士,副主任医师,主要从事乳腺肿瘤的研究

1.2.2 将总 RNA 反转录成 cDNA

反应体系如下:总 RNA 5 μ l、寡脱氧胸苷酸₁₈ [Oligo(dT)₁₈ primer] (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l、无 RNA 酶去离子水(RNase-Free Water)6 μ l 混匀后 70 $^{\circ}$ C 水浴 5min,再加入 5 \times 反转录酶缓冲液 4 μ l、RNA 酶抑制剂(20 u/ μ l) 1 μ l、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP Mix) (10 mmol/l) 2 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后加入禽类髓纤维细胞瘤病毒反转录酶(AMV_{RT}) (20 u/ μ l) 1 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴 60 min, 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min 终止反应, 制成 cDNA 冷冻保存。

1.2.3 RT-PCR 扩增

从 GenBank 查取基因 TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2 及 β -actin 序列, 计算机辅助设计长度分别为 192、307、402、507、600 及 495bp 大小, 其序列分别为: TRAIL: 5'-GGAACCCAAGGTGGG-TAGAT-3' (上游), 5'-TCTCACCACACTG-CAACCTC-3' (下游); DR4: 5'-CAGAGGGATG-GTCAAGGTCAAG-3' (上游), 5'-TTGCTGCT-CAGAGACGAAAGTG-3' (下游); DR5: 5'-GCCT-CATGGACAATGAGATAAAGGTGGCT-3' (上游), 5'-CCAAATCTCAAAGTACGCACAAACG-G-3' (下游); DcR1: 5'-CAACGCTTCCAACAAT-GAC-3' (上游) 5'-ATGGTGCATGAGAGGTA-ATGAG-3' (下游); DcR2: 5'-TTTGCTTCTT-GCCTGTATG-3' (上游), 5'-CTCCTCTG-GCGACTCTACAGT-3' (下游); β -actin: 5'-AAG-TACTCCGTGTGGATCGG-3' (上游), 5'-ATGC-TATCACCTCCCCTGTG-3' (下游)。在扩增反应体系中加入 RNase-Free Water 26.5 μ l、10 \times PCR 缓冲液 5 μ l、2 mmol/L dNTP 5 μ l、基因上下游引物各 2 μ l、Taq DNA 聚合酶 1 μ l、25 mmol/L MgCl₂ 3.5 μ l、模板 DNA(cDNA) 5 μ l, 总体积 50 μ l 放入 PCR 扩增仪, TRAIL 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 循环 40 次, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。DR4、DcR1 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 35 次, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。DR5 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54.9 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 循环 35 次, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。DcR2 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55.4 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 35 次, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。 β -actin 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 35 次, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用内参对照 β -actin 检测反转录效率。取最终反应产物 10 μ l 点样到 2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 溴化乙锭(EB) 显色, 在紫外透射仪下

观察摄像分析结果, 且用 DL 2000 DNA Marker 分子大小作为对照阳性条带。

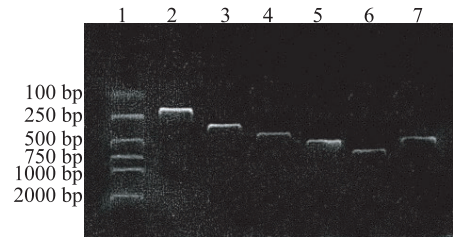
1.3 统计学方法

采用 χ^2 法检验或 Fisher 精确检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。应用 SPSS 11.0 软件包处理全部数据。

2 结果

2.1 PCR 产物的电泳结果

将 TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2 及 β -actin 的 RT-PCR 产物进行凝胶电泳后, 其条带与标准 Marker 相比较, 只有一条产物带, 有较好的特异性, 其分子量大小与预先设计的相一致, 见图 1。



1: Marker; 2: TRAIL (192bp); 3: DR4 (307bp); 4: DR5 (402bp); 5: DcR1 (507bp); 6: DcR2 (600bp); 7: β -actin (495bp)

图 1 基因组 DNA PCR 扩增结果

Figure 1 The results of amplification of genomic DNA PCR

2.2 TRAIL 及其受体在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达情况

在正常乳腺组织中 TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2 均有高表达。乳腺癌组织中 DR4、DR5 有高表达, 而 TRAIL、DcR1、DcR2 却是低表达或不表达, 与正常组织比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 乳腺癌组织中 TRAIL 及其受体的表达在临床病理特征间的关系

在不同的临床分期和病理分级的乳腺癌组织中 TRAIL、DR4、DR5、DcR1、DcR2 表达之间差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

3 讨论

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)基因最早由 Wiley 等^[2]在 1995 年从人心肌 cDNA 文库中克隆得到并命名, TRAIL 基因位于人染色体 3q26, 编码 281 个氨基酸, 分子量为 32.5kD, 是一种 II 型跨膜蛋白, TRAIL 广泛表达于健康人体的各种组织^[3]。TRAIL 可选择性诱导多种肿瘤细胞凋亡, 如白血病细胞、淋巴瘤、骨髓瘤、结肠癌、肺癌以及乳腺癌细胞等, 而对正常细胞无损伤^[4], 这一特点使它

表 1 TRAIL 及其受体在乳腺癌及正常乳腺组织中的表达情况(阳性例数)

Table 1 Expression of TRAIL and its receptors in breast cancer tissues and normal breast tissues (positive case)

Groups	n	TRAIL	DR4	DR5	DcR1	DcR2
Breast cancer tissues	60	17	44	48	19	17
Normal breast tissues	60	52	39	41	38	35
χ^2		41.773	0.977	2.131	12.063	10.995
P		0	0.323	0.144	0.001	0.001

表 2 乳腺癌组织中 TRAIL 及其受体的表达在临床病理特征间的关系(阳性例数)

Table 2 Relationship between the expression of TRAIL and its receptors and the clinicopathologic character in breast cancer (positive case)

Clinicopathologic character	n	TRAIL	DR4	DR5	DcR1	DcR2	
TNM stage	I	18	5	13	14	6	4
	II	29	9	22	23	9	8
	III	13	3	9	11	4	5
Differentiation	I	11	3	10	8	4	2
	II	21	6	14	16	6	7
	III	28	8	20	24	9	8

Note: the positive numbers of three groups were compared between each of two groups, P all > 0.05

越来越受到人们的关注。TRAIL 只有通过与其特异性的受体结合才能发挥作用,研究发现 TRAIL 有 5 种受体^[5],按功能分为死亡受体和诱骗受体两大类:死亡受体包括 DR4、DR5,两者都有胞质死亡结构域(DD);诱骗受体包括 DcR1、DcR2;还有一种可溶性受体(osteoprotegerin, OPG),只有死亡受体和诱骗受体与细胞凋亡有关。

TRAIL 的生物学效应主要是通过与其细胞膜上的相应受体结合而产生的,它与死亡受体 DR4、DR5 结合后形成寡聚体(多为三聚体),来激活 Caspase3、8 和 Fas 相关死亡域(fas associated death domain, FADD),通过并依赖 Caspase8 和 FADD 在细胞内和细胞外途径实现细胞凋亡^[6],而正常组织在表达 DR4、DR5 时,也表达 DcR1、DcR2。DcR1、DcR2 与 DR4、DR5 竞争结合 TRAIL,由于 DcR1、DcR2 缺乏 DD 或 DD 不完整,故不能诱导细胞凋亡,因而 TRAIL 对正常组织细胞没有受伤。本研究结果显示,正常乳腺组织中 TRAIL、DR4、DR5、DcR1 和 DcR2 均有高表达,DcR1、DcR2 与 TRAIL 有较高的亲和力^[7],就使得正常乳腺组织免遭破坏,这与很多研究相一致。

本研究结果显示,乳腺癌组织中 TRAIL 的表达远低于正常乳腺组织中的表达,提示在乳腺癌的发生过程中可能与 TRAIL 的丢失有关,也可能与 TRAIL 表达低使其同死亡受体结合减少,导致异常分化的肿瘤细胞凋亡不够,出现凋亡逃逸,从而引起乳腺癌的发生。提示 TRAIL 与浸润性乳腺癌的发生和发展有关。这与国内外的一些研究认为

TRAIL 在乳腺癌组织中低表达且与乳腺癌的发生、发展有关的结论相一致^[8]。TRAIL 在乳腺癌组织中的表达与肿瘤 TNM 分期及组织学分级无关,这与国内的一些研究一致^[9],但在其他肿瘤如卵巢癌^[10]、骨肉瘤^[11]、结肠癌^[12]等中 TRAIL 的表达与其分期分级密切相关。与本研究不相一致,这可能与不同组织来源肿瘤复杂的成因有关,有待进一步证实,同时也提示 TRAIL 可能不能成为乳腺癌的预后指标。本研究还显示,在乳腺癌组织中死亡受体 DR4、DR5 有高表达,而诱骗受体 DcR1、DcR2 不表达或低表达,这样本来可以使乳腺癌细胞在无诱骗受体的保护下得到凋亡,但由于 TRAIL 的低表达,同死亡受体结合减少,使得乳腺癌细胞凋亡受到抑制。这也为 TRAIL 应用于乳腺癌的治疗奠定了基础。TRAIL 的出现在肿瘤治疗方面引起了广泛关注。近年来体内、体外的实验都有证明 TRAIL 能特异性地诱导一些肿瘤细胞凋亡^[13-14],还能联合放射和化疗协同作用增加 TRAIL 的杀瘤效应^[15-17],有研究表明这种协同作用是因为化疗及放疗上调了死亡受体 DR4、DR5,激活了 Caspase3、8,从而增强了 TRAIL 诱导的凋亡。

本研究在基因水平进一步显示,在正常乳腺组织中 TRAIL 及其受体 DR4、DR5 均有表达,而乳腺癌组织中 DR4、DR5 有高表达,这为将 TRAIL 应用于乳腺癌治疗中奠定了基础。TRAIL、DcR1、DcR2 不表达或低表达,也就是 TRAIL 及诱骗受体的缺失对乳腺癌的发生起重要作用,但其不能成为乳腺癌的预后指标。多数乳腺癌细胞对 TRAIL 都存在

不同程度的耐药性,但化疗药及放疗又能逆转其耐药性,它们的这种协同作用的具体机制有待于进一步研究,且与不同的化疗药的协同机制和安全性需进一步阐明。为临床更好地应用 TRAIL 抗肿瘤提供保障。总之,TRAIL 的出现倍受关注,是近几年发现的 TNF 家族新成员,它选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特点使它在临床抗肿瘤方面有着良好的应用前景,为肿瘤治疗开辟一条新途径。

参考文献:

- [1] Gniffith TS, Lynch DH. Trail: a molecule with multiple receptor and control mechanisms[J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(5): 559-63.
- [2] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673-82.
- [3] Spienings DC, de Vries EG, Vellenga E, *et al.* Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors[J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(6): 821-31.
- [4] Chen Q, Ray S, Hussein MA, *et al.* Role of Apo2L/TRAIL and Bcl-2-family proteins in apoptosis of multiple myeloma [J]. *Leuk Lymphoma*, 2003, 44(7): 1209-14.
- [5] Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer [J]. *Mol Cells*, 2003, 15(3): 283-93.
- [6] Buchsbaum DJ, Zhou T, Lobuglio AF, *et al.* TRAIL receptor-targeted therapy[J]. *Future Oncol*, 2006, 2(4): 493-508.
- [7] Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, *et al.* Apo2L/TRAIL dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to srath receptors 4 and 5 [J]. *Immunity*, 2000, 12(6): 611-20.
- [8] Fukud M, Hamao A, Tanaka A, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/APO2L) and its receptors expression in human squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(5): 1113-9.
- [9] Wang L, Wei JP, Li LM, *et al.* Expression of TRAIL and survivin in invasive breast carcinoma and its significance [J]. *Shanxi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, 40(1): 46-9. [王丽, 卫建平, 李灵敏, 等. 浸润性乳腺癌中 TRAIL 及 survivin 的表达及意义 [J]. *山西医科大学学报*, 2009, 40(1): 46-9.]
- [10] Arts HJ, de Jong S, Hollema H, *et al.* Chemotherapy induces death receptor 5 in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 794-800.
- [11] Liu YM, Zhou MH, Xu CH, *et al.* Expressions of RANKL, OPG and TRAIL in osteosarcoma and its clinical significance [J]. *Lin Chuang Jun Yi Za Zhi*, 2010, 38(4): 509-11, 683. [刘耀明, 周敏慧, 徐崇宏, 等. RANKL、OPG、TRAIL 在骨肉瘤中的表达及其临床意义 [J]. *临床军医杂志*, 2010, 38(4): 509-11, 683.]
- [12] Wang XP, He JP, Luo YX, *et al.* Expression and significance of TRAIL, MMP-2 and TIMP-2 in colorectal carcinoma [J]. *Hebei Yi Yao*, 2011, 7: 972-4. [王雪平, 赫建平, 罗玉贤. TRAIL、MMP-2 及 TIMP-2 在大肠癌中的表达及意义的研究 [J]. *河北医药*, 2011, 7: 972-4.]
- [13] Cretney E, Takeda K, Smyth MJ. Cancer: novel therapeutic strategies that exploit the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/TRAIL receptor pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(2): 280-6.
- [14] Wen J, Zhang Y. Experimental study on anti-tumor effect of TRAIL on human breast cancer, cervical carcinoma and ovarian carcinoma [J]. *Zhongguo Fu You Bao Jian*, 2011, 26(5): 747-8. [闻静, 张阳. TRAIL 对人乳腺癌、宫颈癌、卵巢癌细胞抗肿瘤作用的实验研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2011, 26(5): 747-8.]
- [15] Marini P, Schmid A, Jendmssek V, *et al.* Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5: 5.
- [16] Xu J, Zhou JY, Tainsky MA, *et al.* Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cell to adriamycin [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1203-11.
- [17] Liu J, Liu F, Xia H, *et al.* Sensitization of human cervical cancer HeLa cells to TRAIL-induced apoptosis by apigenin via constitutively activating JNK [J]. *Zhongguo Xian Dai Yi Xue Za Zhi*, 2011, 21(25): 3095-100, 3105. [刘杰, 刘飞, 夏红, 等. 芹菜素通过组成性激活 JNK 敏化 TRAIL 诱导 HeLa 细胞凋亡 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(25): 3095-100, 3105.]

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]