

重组人肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体蛋白 (rh TRAIL) 逆转人肺腺癌细胞 A549/ CDDP 耐顺铂效应的初步研究

张梅春¹, 胡成平¹, 陈琼¹, 杨红忠¹, 刘洪波²

Reversing Effect of rhTRAIL on Cisplatin-resistant Human Lung Adenocarcinma Cell Line A549/ CDDP

ZHANG Mei-chun¹, HU Cheng-ping¹, CHEN Qiong¹, YANG Hong-zhong¹, LIU Hong-bo²

1. Department of Respiration, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008, China; 2. Department of Infectious disease

Abstract : Objective To explore the reversal effects of rhTRAIL on the multidrug-resistant cell line A549/ CDDP. **Methods** A549/ CDDP was treated with combinations of rhTRAIL. IC₅₀ values and reversing drug-resistance index (RI) of the chemotherapeutic drug were analyzed by MTT assay. **Results** After treated with rhTRAIL, IC₅₀ values of CDDP of A549/ CDDP cell line were reduced very significantly ($P < 0.01$), while RI augmented significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** rhTRAIL has reversal effects on multi-drug resistant cell line A549/ CDDP, which is a very promising biological drug for drug resistant lung cancer.

Key words: rhTRAIL; Lung cancer; Drug resistance; Reversal

摘 要:目的 探讨重组人可溶性肿瘤坏死因子相关诱导配体蛋白 (rh TRAIL) 对人肺腺癌细胞 A549/ CDDP 耐顺铂的逆转效应。方法 以顺铂 (CDDP) 联合不同浓度的 rhTRAIL 处理 A549/ CDDP, 以四氮唑蓝盐 (MTT) 比色法检测顺铂的半效抑制浓度 IC₅₀, 并计算耐药逆转倍数 RI。结果 rhTRAIL 体外可明显降低 A549/ CDDP 对 CDDP 的 IC₅₀, 提高耐药逆转倍数。结论 rhTRAIL 体外可较大程度逆转 A549/ CDDP 细胞对 CDDP 的耐药性, 有望成为抗耐药性肺癌的一种新的生物制剂。

关键词: rhTRAIL; 肺癌; 多药耐药; 逆转

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2005) 07-0398-03

0 引言

肿瘤细胞的多药耐药 (Multi-drug resistance, MDR) 是肿瘤化疗失败的主要原因, 筛选有效的耐药修饰剂用于逆转肿瘤细胞的 MDR, 是提高抗癌药物疗效的关键问题。肿瘤坏死因子相关诱导配体蛋白 (TNF related apoptosis induced ligand, rhTRAIL, 简称 TRAIL) 与 TNF- α 同属 TNF 蛋白家族的成员, 研究表明, TRAIL 可特异性杀伤肿瘤细胞, 而赦免正常细胞^[1]; TRAIL 可诱导肿瘤细胞凋亡, 对化疗药物所诱导的细胞凋亡也具有协同作用^[2,3]。本研究在体外试验中将其用于人肺腺癌多耐药细胞系 A549/ CDDP, 观察其对该细胞耐药性的影响, 以期寻找一种新的药物, 以解决肺癌治疗中出现的多耐药性的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 重组人可溶性肿瘤坏死因子相关配体蛋白 (rhTRAIL) 由中南大学湘雅医院传染科刘洪波博士馈赠, 顺铂 (CDDP, 山东齐鲁制药厂产品, 批号: 0307006), 3-(4,5)-双甲基-2-噻唑(2,5)-二苯基溴化四氮唑蓝 (MTT, Sigma 公司产品), 二甲基亚砷 (DMSO, Sigma 公司产品), 其余试剂均为分析纯试剂。药物均用生理盐水稀释成储存液备用。

1.1.2 主要仪器设备 超净工作台 (上海力申科学仪器厂)、CO₂ 恒温培养箱 (QWJ 300T 型, 美国 QUEUE 产品)、倒置相差光学显微镜 (OLYMPUS, 日本)、酶标仪 (wellscan MK3, 芬兰)、振荡器 (北京六一仪器厂产品)、96 孔培养板 (Costar 公司产品)。

1.1.3 细胞株来源 人肺腺癌细胞株 A549 及其耐药细胞株 A549/ CDDP 均购自中南大学湘雅医学院细胞中心。

收稿日期: 2004-07-20; 修回日期: 2004-12-16

作者单位: 1. 410008 长沙, 中南大学湘雅医院呼吸内科, 2. 感染科

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌细胞株 A549 及其耐顺铂细胞株 A549/CDDP 均置 37 ℃, 5% CO₂, 饱和湿度下的恒温培养箱中培养, 培养液为含 10% 新生小牛血清的完全 RPMI1640 培养基(为 Gibco 公司产品), 含青/链霉素的浓度为 100U/mL。对 A549/CDDP 细胞株常规加入 1μg/mL 的顺铂以维持其耐药性。

1.2.2 实验分组 采用嵌套分组法进行实验分组如下:(1) 单用顺铂组:CDDP + 细胞 + RPMI1640;(2) 单用 TRAIL 组:TRAIL + 细胞 + RPMI1640;(3) TRAIL + 顺铂联合用药组:TRAIL + CDDP + 细胞 + RPMI1640;(4) 阴性对照组:细胞 + RPMI1640;(5) 空白调零组:RPMI1640。以上各组均设三个复孔进行试验, 试验组中采用 4 种不同浓度的 CDDP (1、3、5、7 μg/mL) 加不同浓度的 TRAIL^[4]。

1.2.3 细胞毒性测定 采用 MTT 比色法进行。先将生长良好的培养细胞消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 5 × 10⁴/mL, 并接种至 96 孔板中, 接种细胞数为 5 × 10³/孔, 待细胞进入对数生长期后开始按组别加入相应浓度的 CDDP 或 TRAIL, 每孔终体积为 200μL, 置恒温培养箱中, 在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下, 培养 24h 后进行 MTT 比色试验。即于培养后的每孔细胞中加入 MTT 溶液 20μL (5mg/L), 继续置恒温培养箱中孵育 4h, 再尽量完全吸弃孔中培养液, 并每孔加入二甲基亚砜 (DMSO) 150μL, 置振荡仪上振荡 10 ~ 15min, 待形成的紫蓝色结晶物完全溶解后, 于酶标仪上检测 492nm 下每孔吸光度值 (A₄₉₂), 记录结果, 并计算细胞存活率和细胞生长抑制率。细胞存活率 = A_{试验组} / A_{对照组} × 100%。细胞生长抑制率 = 1 - 细胞存活率。应用加权线性回归方法求得半数抑制浓度 IC₅₀, 药物逆转作用以逆转倍数 RI 表示, RI = IC₅₀(单用 CDDP) / IC₅₀(CDDP + TRAIL)。耐药倍数 = IC₅₀(A549 细胞) / IC₅₀(A549/CDDP 细胞) 空白组用于吸光度值的调零。

1.3 统计学方法

结果取 3 次实验的均值, 标准差均小于 5%。不同药物间的比较应用完全随机设计的方差分析, P < 0.05 为差异有显著性, P < 0.01 为差异具有非常显著性。组间显著性检验用 SPSS 12.0 统计软件包进行。

2 结果

2.1 TRAIL、CDDP 单用对 A549 和 A549/CDDP

的杀伤效应

TRAIL 浓度为 12.5 ng/mL 和 25ng/mL 时, A549 细胞存活率分别为 97.5% 和 87.4%; 而 A549/CDDP 细胞存活率分别为 92.4% 和 85.9%, 和对照组相比差异均无显著性 (P > 0.05), 上述浓度的 TRAIL 对该两种细胞均未见明显细胞毒性作用。CDDP 对 A549 和 A549/CDDP 的 IC₅₀ 分别为 1.21 mg/L 和 14.35mg/L, A549/CDDP 耐顺铂的耐药倍数约 11.9 倍。

2.2 TRAIL 和 CDDP 联用对 A549 的杀伤效应

12.5ng/mL 和 25ng/mL TRAIL 分别与 CDDP 联用时, CDDP 对 A549 的 IC₅₀ 分别为 1.43mg/L 和 1.69mg/L, 与单用 CDDP 组相比较, 差异无显著性 (P > 0.05)。

2.3 TRAIL 对 A549/CDDP 耐顺铂的逆转效应

当用 12.5、25ng/mL TRAIL 分别与 CDDP 联合作用于 A549/CDDP, 根据加权线性回归方程求得 IC₅₀ 值分别为 7.26mg/L 和 5.95mg/L。CDDP 对 A549/CDDP 的 IC₅₀ 随 TRAIL 浓度的增加而降低 (见表 1), 与单用药组相比较, 差异均有明显的显著性 (P < 0.01), 逆转倍数分别为 1.97 和 2.41 倍。

表 1 TRAIL 逆转人肺腺癌 A549/CDDP 耐顺铂效应的比较

TRAIL 浓度 (ng/mL)	IC ₅₀ (mg/L)	细胞存活率 (%)	逆转耐药 倍数
0	14.35	93.8	
6.25	13.89 ¹⁾	84.0	1.04 ³⁾
12.5	7.26 ²⁾	69.3	1.97 ⁴⁾
25	5.95 ²⁾	52.7	2.41 ⁴⁾

注: 和单用顺铂组比较: 1) P > 0.05; 2) P < 0.05; 3) P > 0.05; 4) P < 0.05

3 讨论

近来研究表明, 某些细胞因子, 如 TNF-α、IFN 等, 具有逆转肿瘤 MDR 的作用, 并可提高肿瘤化疗疗效^[5], 因此, 细胞因子作为 MDR 逆转剂的研究引起了越来越多的学者的关注。

TRAIL 是 TNF 细胞因子家族的新成员, 和 TNF、FasL 一样, TRAIL 也是通过与细胞膜上的相应的死亡受体结合, 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^[6]。但 TRAIL 的死亡受体只在肿瘤细胞中有表达, 而在正常组织细胞中几乎未见有表达, 因此它可以选择性杀伤多种肿瘤细胞, 而赦免正常组织细胞^[1]。Spierings DC 等发现, 非小细胞肺癌组织中同样有 TRAIL 的死亡受体 DR4 和/或 DR5 的

表达,而目前体外研究也证实,NSCLC 细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡敏感^[2,7,8]。A549/CDDP 是经体外长期培养诱导 A549 敏感细胞而成的多药耐药细胞株,其对 CDDP、足叶乙甙(VP16)、卡铂(CBP)等均存在交叉耐药性。本实验表明,A549/CDDP 对 CDDP 的耐药性是 A549 敏感细胞株的 11.9 倍,耐药性能稳定。TRAIL 和一些化疗药物如阿霉素(ADM)、5-氟尿嘧啶(5-Fu)等联用后,这些化疗药物可上调肿瘤细胞表面的死亡受体 DR4 和/或 DR5 的表达,从而增加细胞对 TRAIL 所诱导的细胞凋亡敏感性,并进一步降低化疗药物的用药剂量^[9,10]。而将 TRAIL 与维生素 A 类似物质 CD435 联用同样能上调人 NSCLC 细胞 DR5 的表达^[11]。本研究发现,单用浓度为 12.5 ng/mL、25ng/mL 的 TRAIL 对人肺腺癌敏感细胞株 A549 和耐药株 A549/CDDP 均无明显的生长抑制作用,细胞存活率均大于 85%,但和顺铂联合用药后,TRAIL 能明显增强 CDDP 对 A549/CDDP 的细胞毒性,这说明 TRAIL 可逆转 A549/CDDP 对 CDDP 的耐药性,25ng/mL 低浓度时其耐顺铂的逆转倍数可达 2.41 倍,且其逆转效应具有剂量依赖性。

TRAIL 逆转 A549/CDDP 耐药性的作用机制仍不明确。已有研究发现,TNF 逆转肿瘤细胞 MDR 的可能机制有:通过直接下调 *mdr1* 基因的表达,或通过其表达调控机制来影响 *mdr1* 的表达量;通过各种途径来影响 *mdr1* 的功能,使细胞内药物浓度蓄积减少,进而逆转由 P-gp 引起的经典 MDR;通过下调 GST 的表达,使细胞内解毒功能减低而逆转 MDR;通过改变拓扑异构酶的活性来逆转非经典的 MDR;通过诱导耐药肿瘤细胞的细胞凋亡通路,增加细胞凋亡对药物的敏感性。TRAIL 是否与 TNF 类似,通过降低耐药相关因子的表达,增加化疗药物在肿瘤细胞中的蓄积;抑或通过促进 CDDP 所诱导的细胞凋亡而逆转 A549/CDDP 细胞对 CDDP 的耐药性,均有待于进一步阐明。总之,本研究发现,rhTRAIL 体外可较大程度逆转耐顺铂人肺腺癌 A549/CDDP 的耐药性,并以其独特的生物学效应,可望成为肺癌综合治疗的一种新

的辅助治疗药物。

参考文献:

- [1] Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y. Regulation of TRAIL-Induced Apoptosis by Ectopic Expression of Antiapoptotic Factors[J]. *Vitam Horm*, 2004, 67: 453-483.
- [2] Odoux C, Albers A, Amoscato AA, et al. TRAIL, FasL and a blocking anti-DR5 antibody augment paclitaxel-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 97(4): 458-465.
- [3] Kim DM, Koo SY, Jeon K, et al. Rapid induction of apoptosis by combination of flavopiridol and tumor necrosis factor (TNF)-alpha or TNF-related apoptosis-inducing ligand in human cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(3): 621-626.
- [4] 刘文哲, 李金翰, 胡义德, 等. 顺铂诱导 A549 细胞凋亡德研究[J]. *中国肺癌杂志*, 2002, 5(4): 254-256.
- [5] Walther W, Stein U, Fichtner I, et al. Mdr1 promoter-driven tumor necrosis factor-alpha expression for a chemotherapy-controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors[J]. *Cancer Gene Ther*, 2000, 7(6): 893-900.
- [6] Lane D, Cartier A, L'Esperance S, et al. Differential induction of apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human ovarian carcinoma cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 93(3): 594-604.
- [7] Spierings DC, de Vries EG, Timens W, et al. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(9): 3397-3405.
- [8] Abou El Hassan MA, Mastenbroek DC, Gerritsen WR, et al. Overexpression of Bcl2 abrogates chemor- and radiotherapy-induced sensitization of NCI-H460 non-small-cell lung cancer cells to adenovirus-mediated expression of full-length TRAIL[J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(1): 171-177.
- [9] Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, et al. Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2003, 104(4): 409-417.
- [10] Lacour S, Hanmann A, Wotawa A, et al. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(4): 1645.
- [11] Sun SY, Yue P, Hong WK, et al. Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis by the synthetic retinoid 6-[3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(24): 7149-7155.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]