

# TRAIL 抑制人前列腺癌细胞 PC-3M 体外生长的实验研究

陈江,陈晓春,曾甫清

Experimental Study of the Growth Inhibition in Vitro on Human Prostate Cancer Cell Line

PC-3M by TRAIL

CHEN Jian g, CHEN Xiao -chun, ZENG Fu -qing

Department of Urology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

**Abstract: Objective** To observe the effect of TRAIL protein on the growth of human prostate cancer cells and illustrate its mechanisms. **Methods** The growth inhibition rates of human prostate cancer cell line PC-3M by various concentration TRAIL protein were studied by MTT method, cell apoptosis of PC-3M cells was observed by SP immunohistochemical method. **Results** TRAIL could inhibit the growth of PC-3M effectively with the increase of apoptosis cell, which depended on the reaction time and concentration of drug. bcl-2 expression of PC-3M cell was not changed significantly. **Conclusion** TRAIL could significantly inhibit the growth of bladder cancer cells. TRAIL induced cell apoptosis did not depend on bcl-2 gene.

**Keywords:** TRAIL; Prostate cancer; Cell apoptosis; PC-3M cell

**摘要:**目的 观察 TRAIL 对前列腺癌细胞 PC-3M 的生长抑制作用。方法 采用 MTT 法检测不同浓度 TRAIL 对人非激素依赖性前列腺癌细胞株 PC-3M 的生长抑制率, 原位末端酶标记技术检测细胞凋亡。免疫组化法观察 bcl-2 的表达。结果 TRAIL 可有效地抑制 PC-3M 细胞生长, 具有时间、浓度依赖性特点。经药物作用后, 前列腺癌细胞凋亡明显增多, 凋亡率随作用时间的延长而增高, PC-3M 细胞中的 bcl-2 基因表达无显著变化。结论 TRAIL 蛋白可显著抑制前列腺癌细胞 PC-3M 生长, 其诱导细胞凋亡不依赖 bcl-2 基因表达。

**关键词:** TRAIL; 前列腺癌; 细胞凋亡; PC-3M 细胞

中图分类号: R737.25 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)07-0395-03

## 0 引言

肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL), 又称 APO-2L。是新近发现的肿瘤坏死因子家族成员。自发现以来, 人们已完成了其可溶片段的克隆, 表达及蛋白的纯化, 用这些纯化的 TRAIL 蛋白进行的许多研究证实: TRAIL 可诱导许多恶性肿瘤细胞凋亡, 包括血液系统恶性肿瘤、乳腺癌等。PC-3M 是一种高恶性的雄激素非依赖性前列腺癌细胞系, 具有较强的转移性。TRAIL 对其抑制作用如何? 本实验对不同浓度的 TRAIL 蛋白抑制人前列腺癌的生长作用进行了初步研究, 现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

收稿日期: 2003-08-20; 修回日期: 2003-11-13  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070756)  
作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科

**实验试剂:** 纯化重组 TRAIL 蛋白购自英国 PEPROTECH 公司, 取 TRAIL 10 μg (1 支) 以磷酸缓冲液 (PBS) 配成 1 μg/ml 的 TRAIL 存储液, -4℃ 保存备用。使用时, 以 RPMI 1640 培养液稀释至 50 ng/ml、100 ng/ml、200 ng/ml、500 ng/ml 的浓度。

**细胞:** 人非激素依赖性前列腺癌细胞株 PC-3M 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心, 用含 10% 小牛血清及青霉素和链霉素各 100 U/ml 的 RPMI-1640 培养基, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。

### 1.2 实验方法

1.2.1 采用 MTT 法检测不同浓度 TRAIL 对人非激素依赖性前列腺癌细胞株 PC-3M 的生长抑制率

取  $2 \times 10^5$ /ml 的细胞接种于 96 孔培养板, 待细胞贴壁后分别加入 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml 的 TRAIL 蛋白液。每一浓度设 5 个复孔, 并设对照组。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下分别培养 12h、24h、48h、72h, 每孔加入 0.5% MTT 20 μl, 继续培养, 弃去上清液, 每孔加入 DMSO 100 μl, 震荡至结晶溶解, 酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度值。按如

下公式计算抑制率：

抑制率 = (1 - 实验组平均吸光度值 / 对照组平均吸光度值) × 100%

1.2.2 采用原位末端酶标记技术检测细胞凋亡  
细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,其操作依照说明书进行。光学显微镜下见细胞体积缩小,核染色呈特异的棕黄色即为凋亡。

PI = (500 个细胞内凋亡细胞数 / 500) × 100%

1.2.3 采用免疫组织化学方法分析 PC-3M 细胞中 bcl-2 基因表达 bcl-2 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。PC-3M 细胞与各浓度的 TRAIL 作用 12h、24h、48h、72h 后,经冷丙酮 4 固定 10 分钟,依次与鼠抗人 bcl-2 单抗(4, 24h)和酶偶联的羊抗鼠二抗(25, 30min)孵育,用 0.5% DAB 底物反应显色。苏木素复染,梯度酒精脱水和二甲苯透明,中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为空白对照。

结果判定:阴性切片细胞不显色。阳性切片细胞的细胞膜和细胞浆着棕黄色。

1.2.4 透射电镜观察细胞凋亡 细胞准备:将处于指数生长期的人前列腺癌细胞 PC-3M 和正常前列腺细胞以  $5 \times 10^5$ /ml 浓度分别接种于培养瓶中,常规于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37、5%CO<sub>2</sub> 条件下常规培养。细胞贴壁后,更新培养液,TRAIL 终浓度为 100ng/ml,并各设一个空白对照。常规培养 48h 后,制样,送检。电镜下观察、照片。

### 1.3 统计学方法

采用方差分析及 *t* 检验,应用 SAS 统计软件包进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 MTT 检测结果

不同浓度 TRAIL 作用的癌细胞生长抑制率,见表 1。由表 1 可知,TRAIL 均可有效地抑制体外培养的 PC-3M 细胞生长,其作用随时间延长和浓度提高而增强。不同浓度 TRAIL 之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),不同时间组之间也有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 细胞凋亡检测结果

对照组细胞凋亡率为 3.78%。经 100ng/ml TRAIL 作用 12h、24h、48h 和 72h 后,PC-3M 细胞凋亡率分别为 8.23%、18.87%、26.65%、34.78%。经 *t* 检验,实验组各时段效果与对照组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),不同时段的效果之间有极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。说明 TRAIL 作用 PC-3M 细胞后,可明显地诱导细胞凋亡。

表 1 不同浓度 TRAIL 作用 24~72h 的癌细胞生长抑制率(%)

TRAIL 浓度	12h	24h	48h	72h
50ng/ml	6.52	11.50	20.32	29.43
100ng/ml	10.36	18.39	27.76	36.58
200ng/ml	15.18	23.74	35.29	45.85
500ng/ml	20.58	28.47	39.64	49.32

### 2.3 免疫组织化学分析结果

对照组细胞阳性率为 92.5%。经 200ng/ml TRAIL 作用 12、24、48 和 72 小时后,PC-3M 细胞中 bcl-2 表达阳性率分别为 85.5%、88.5%、90.2%、93.4%,见图 1、2。实验组各时间效果与对照组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。说明 TRAIL 在诱导细胞凋亡中,没有引起 bcl-2 基因表达的上调或下调,bcl-2 蛋白在 TRAIL 作用后无显著改变,TRAIL 诱导细胞凋亡的途径,与 bcl-2 基因的表达无关。

### 2.4 透射电镜观察结果

对照组细胞膜完整,清晰,微绒毛丰富,胞浆内大量结构完整的线粒体,粗面内质网,核膜清晰,核内染色质分布均匀,核仁清晰,见图 3、4。实验组,即用 100ng/ml 浓度 TRAIL 作用后,PC-3M 前列腺癌细胞形态完整,体积缩小,胞浆内不典型溶酶体增多,可见细胞器和空泡,核膜完整,核内染色向核膜聚集并呈凝块状,可见凋亡小体。说明 TRAIL 可明显地诱导 PC-3M 癌细胞凋亡,见图 5,而对正常前列腺细胞无影响,见图 6。

## 3 讨论

前列腺癌在我国发病率持续上升,确诊时往往已发生局部扩散和远处转移。晚期前列腺癌的治疗仍然以手术去势或药物去势诱导癌细胞凋亡为主。但这只对雄激素依赖性前列腺癌有效,而非雄激素依赖性者无效。寻求积极有效的前列腺癌治疗方法一直是令人关注的研究方向。

TRAIL 是由 Wiley 等<sup>[1]</sup>新近发现的 TNF 超家族成员。属于 II 型膜蛋白,广泛表达于机体的正常组织。TRAIL 是通过受体介导的, p53 非依赖途径诱导转化细胞或肿瘤细胞凋亡,但对正常细胞无毒性作用。这种选择性杀伤作用是由 TRAIL 受体表达的差异所致。目前已经发现有五种 TRAIL 受体,包括两种死亡受体 TRAILR1 (DR4)、TRAILR2 (DR5) 和三种假受体 TRAILR3 (DcR1)、TRAILR4 (DcR2) 及分泌型受体 OPG<sup>[1]</sup>。正常细胞上广泛表达死亡受体和假受体。肿瘤细胞仅表达死亡受体,极少或不表达假受体。肿瘤细胞上死亡受体在 TRAIL 作用下形成“受体三聚化”而有效地下传凋亡信号,促进凋亡发生<sup>[2-4]</sup>。而正常细胞上因大量

假受体竞争性参与受体三聚化过程,不能形成单纯的死亡受体三聚化,从而不能形成凋亡信号,使得免受 TRAIL 攻击。因此,TRAIL 对肿瘤细胞呈高选择性的杀伤效应。

PC-3M 为一低分化的雄激素非依赖性前列腺癌细胞系,研究表明,PC-3M 存在 bcl2 基因的异常表达,而 bcl2 的异常可以阻断激素及化疗药物诱导肿瘤细胞的凋亡,同时高表达的 bcl2 蛋白可保护癌细胞产生的抗药性。因此,雄激素非依赖性前列腺癌治疗效果差。而 TRAIL 诱导细胞凋亡,完全不同于这个途径<sup>[5]</sup>。它通过其本身特异性受体 TRAIL-R1,TRAIL-R2(死亡受体)启动细胞凋亡。本试验结果与已有研究表明:TRAIL 诱导细胞凋亡不依赖 bcl2。这就可能为激素非依赖性前列腺癌带来一条新的有效的治疗途径。

本研究用纯化重组的人 TRAIL 蛋白诱导前列腺癌细胞 PC-3M 凋亡,以 MTT 法测定不同浓度 TRAIL 对 PC-3M 细胞的抑制率。结果显示 TRAIL 可有效地抑制 PC-3M 细胞的体外生长,具有时间、浓度依赖性特点。500ng/ml TRAIL 作用 48 小时后,细胞生长抑制率达 49.32%。经 TRAIL 作用后,PC-3M 凋亡细胞增多,细胞凋亡率随时间延长而增加,从而证实 PC-3M 细胞对 TRAIL 作用

敏感,目前,通过基因工程,克隆 TRAIL-cDNA,通过载体让其在大肠杆菌表达、纯化得到可溶的 TRAIL 蛋白,再注射到体内,杀伤肿瘤。现在实验所用 TRAIL 蛋白都是基因工程产物,体外杀癌细胞明显。而 TRAIL 体内副作用及在体内对前列腺癌局部注射效果如何,尚需进一步研究。

(本文图见封 2)

#### 参考文献:

- [1] wileySR,Schoole yK,SmolakPJ,etal.IdentificationandcharacterizationofanewmemberofTNFfamilythatinducesapoptosis[J].*Immunity*,1995,3 (6):673-682.
- [2] BodmerJL,MeierP,TschoppJ.Cysteine230isessentialforthe structureandactivityofthecytotoxicligandTRAIL[J].*Biol Chem*,2000,275 (27):20632-20637.
- [3] HymowitzSG,ConnellMP,UltschMH,etal.AuniqueZinc-binding site revealed by high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2/ TRAIL[J].*Biochemistry*,2000,39 (4):633-640.
- [4] GriffithTS,RauchCT,SmolnikPJ,etal.Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies[J].*J Immunol*,1999,162 (5):2597-2605.
- [5] SineadAKeogh,HenningsWalczak,LisaBouchier-Hayes,etal.Failureofbcl-2to block cytochrome redistribution during TRAIL-induced apoptosis[J].*FEBS Letter*,2000,471 (1):93-98.

[编辑:刘红武;校对:贺文]

(上接第 394 页)

白通过与一类范围较宽的效应蛋白相互作用而调节其生物进程。尽管活化的 ras 常与促进细胞生长和恶性转化相联系,但它同样可以诱导生长抑制效应,包括促进细胞衰老,诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞,促肿瘤细胞向终末分化<sup>[1,2]</sup>。如 RASSF1 作为 ras 的下游效应物介导细胞凋亡<sup>[3]</sup>。研究表明:由 ras 介导的增殖分化或凋亡是由其下游的效应物决定的<sup>[4]</sup>。

RASSF2 (Ras association domain family 2) 是新近发现的具有潜在的细胞周期阻滞和促凋亡作用的基因。其 ras 相关区域与 RASSF1 的相关区域同源率为 28%,与 NORE1 相关区域同源性达 31%<sup>[2]</sup>。免疫共沉淀结果显示:RASSF2 可通过 ras 效应物结构域以 GTP 依赖的方式与 K-ras 结合,而与 H-ras 相互作用很弱。激活状态的 K-ras 可以增强 RASSF2 介导的细胞生长抑制<sup>[2]</sup>。

胰腺癌细胞株 PANC-1 是 K-ras 突变的细胞株<sup>[5]</sup>,本实验利用胰腺癌细胞株 PANC-1 存在内源性 K-ras 高频突变这一特点,将构建的质粒 pcDNA 3.1/RASSF2 转染入该细胞株,进行细胞效应的比较研究。实验的初步结果显示:在转染了重组质粒

的胰腺癌细胞株中 RASSF2 的表达明显上调,肿瘤细胞株的生长明显受到抑制。这为后期进一步确定 RASSF2 在信号传导中发挥促凋亡的作用及生物学意义,探讨其促进肿瘤细胞凋亡的机制,以及为胰腺癌的发生机制的研究和基因治疗提供初步的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] SergioC,BiancaMC,GabriellaMF,etal.Isolationandmolecular characterization of RASFA1, a novel gene in the vicinity of the bovine prion gene[J].*Mammalian Genome*,2001,12 (2):150-156.
- [2] MicheleDV,ChadAE,CandiceE,etal.RASSF2IsaNovelK-Ras-specific Effector and Potential Tumor Suppressor[J].*The Journal of Biological Chemistry*,2003,278 (30):28045-28051.
- [3] MicheleDV,ChadAE,AaronB,etal.Rasuses thenovel suppressor RASSF1 as a effector to mediate apoptosis[J].*The Journal of Biological Chemistry*,2000,275 (46):35669-35672.
- [4] AnneBV,ChanningJD.Increase in complexity of the Ras signaling pathway[J].*J Biol Chem*,1998,273 (32):19925-19928.
- [5] GuhaS,LunnJA,SantiskulvongC,etal.Neurotensin stimulates proteinkinase C-dependent mitogenic signaling in human pancreatic carcinoma cell line PANC-1[J].*Cancer Res*,2003,63 (10):2379-2387.

[编辑:贺文;校对:刘红武]

## TRAIL 抑制人前列腺癌细胞 PC-3M 体外生长的实验研究

(正文见 395 页)

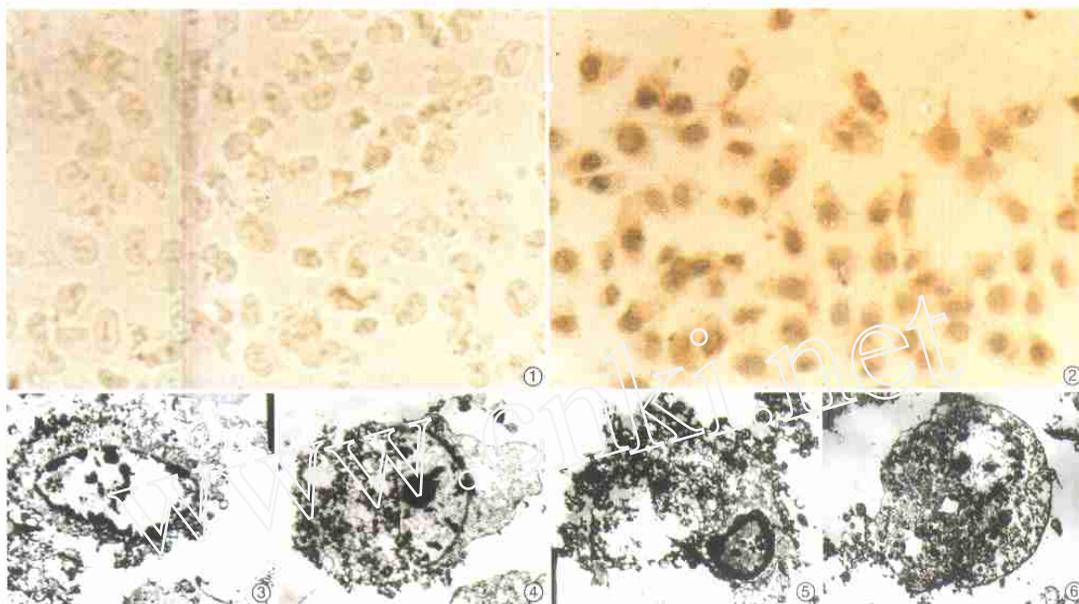


图1 PC-3M 细胞中 bcl-2 的阴性表达 × 200

图2 PC-3M 细胞中 bcl-2 的阳性表达, 可见细胞膜和细胞浆着棕黄色 × 200

图3 正常前列腺细胞对照组透射电镜照片 × 5000

图4 前列腺癌细胞 PC-3M 正常状态透射电镜照片 × 5000

图5 PC-3M 前列腺癌细胞经 TRAIL(100ng/ml)作用后凋亡状态透射电镜照片 × 5000

图6 正常前列腺细胞经 TRAIL(100ng/ml)作用后透射电镜照片 × 5000

## FHIT、Ki67 和 bax 在宫颈癌中的表达及临床意义

(正文见 412 页)

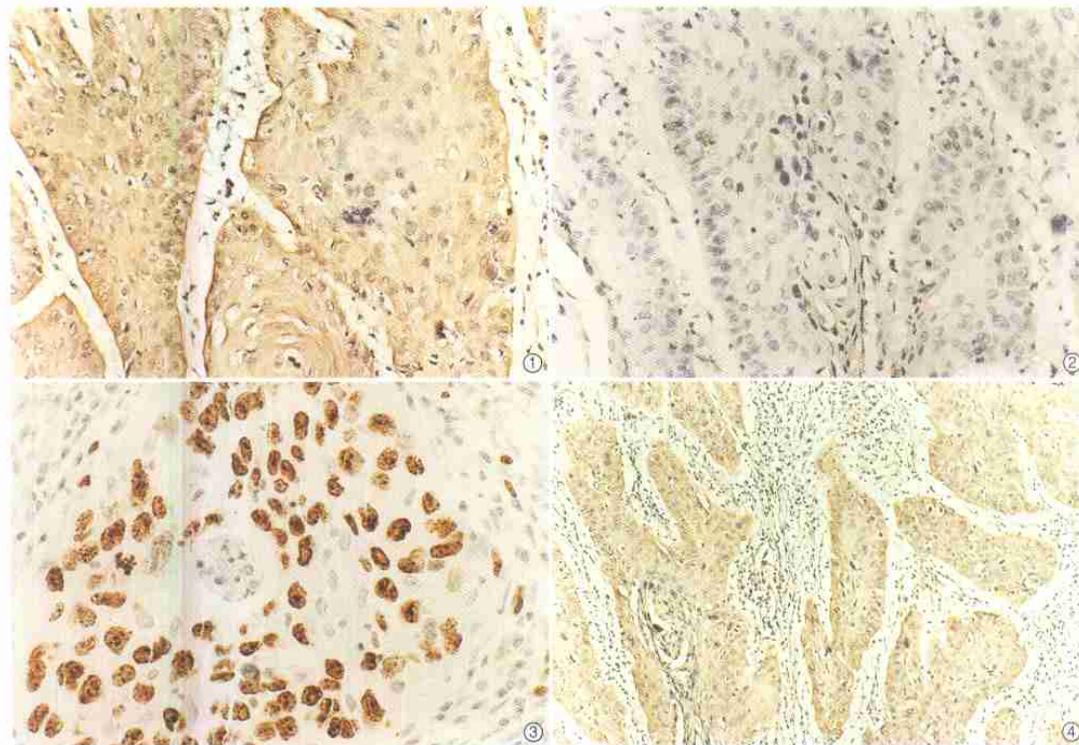


图1 FHIT 在宫颈癌中的阳性表达免疫组化染色 (SP × 200)

图2 FHIT 在宫颈癌中的阴性表达免疫组化染色 (SP × 200)

图3 ki67 在宫颈癌中的阳性表达免疫组化染色 (SP × 400)

图4 bax 在宫颈癌中的阳性表达免疫组化染色 (SP × 100)