

· 论 著 ·

TRAIL 抑制原代卵巢癌细胞增殖及诱导凋亡的实验研究

李东林[#], 孙丽君[△]

(遵义医学院附属医院妇产科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 观察肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)对原代卵巢癌细胞的生长抑制和诱导凋亡情况。方法 选择 12 例患者的原代卵巢癌细胞, 每例癌细胞分为 6 组, 分别给予 TRAIL 0、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$, 分别作用 24、48、72、96 h。(1)噻唑蓝(MTT)比色法检测 TRAIL 对原代卵巢癌细胞生长抑制情况。(2)免疫荧光细胞化学法检测原代卵巢癌细胞的凋亡。结果 TRAIL 对原代卵巢癌细胞的抑制呈剂量依赖性, 浓度大于 20 $\mu\text{g/L}$ 后抑制下降; 相同浓度 TRAIL 对原代卵巢癌细胞的抑制呈时间依赖性, 72 h 后抑制下降; TRAIL 浓度相同时随作用时间延长凋亡细胞数增多, 5 $\mu\text{g/L}$ 24、96 h 凋亡细胞数分别为 (28 ± 1.18) 和 (55 ± 4.12) , 凋亡也呈剂量、时间依赖性。结论 TRAIL 抑制了原代卵巢癌细胞的增殖、生长并诱导了癌细胞的凋亡。

关键词:原代卵巢癌细胞; TRAIL; 免疫荧光细胞化学; 凋亡**中图分类号:**R737.31**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)08-0927-03

Effects of TRAIL on proliferation and apoptosis of primary human ovarian cancer cell

LI Dong-lin[#], SUN Li-jun[△]

(Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of TRAIL in proliferation and apoptosis of primary human ovarian cancer cell in vitro. **Methods** Primary human ovarian cancer cell came from twelve patients. Every patient's cell was separated to six groups, and treated with TRAIL (5–100 $\mu\text{g/L}$) for 24–96 h respectively. (1) Growth inhibition rates of primary human ovarian cancer cell were measured with MTT. (2) The apoptosis in primary human ovarian cancer cell was measured with immunofluorescence cytochemistry. **Results** (1) Growth inhibition rates increased in dose-dependent when the concentration is 5 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ and 20 $\mu\text{g/L}$, and in time-dependent when the concentration is the same at 24 h, 48 h, 72 h. (2) The apoptosis number increased along with the time lasting. It was 28 ± 1.18 with the concentration of 5 $\mu\text{g/L}$ at 24 h, and 55 ± 4.12 at 96 h. **Conclusion** (1) TRAIL inhibits proliferation and growth of primary human ovarian cancer cell. (2) It induces apoptosis

Key words: primary ovarian cancer cell; TRAIL; immunofluorescence cytochemistry; apoptosis

化学治疗是卵巢癌主要治疗方法, 目前的化疗药物都有一定的不良反应, 可能诱导耐药性。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumour necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是近来发现的 TNF 家族新成员, 有选择性细胞毒作用的生物学特性。研究发现 TRAIL 对卵巢癌 3AO 及 HO-8910 细胞株、胃癌细胞株 SGC27901、MKN28、AGS、MKN45 具有抑制生长和促进凋亡作用, 还发现 TRAIL 与化疗药物联合有协同抑制作用。但细胞株和原代细胞是有区别的, 细胞株是由增殖和环境适应能力强的细胞系构成, 原代卵巢癌细胞中由分化和增殖能力不同的细胞所组成细胞群, 生物学特性更接近于活体内原位肿瘤细胞。因此, 作者选择原代卵巢癌细胞为研究对象, 为将来的动物实验和人体运用打下一定的基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008 年 3~8 月诊断为上皮性卵巢癌患者 12 例, 术前抽取腹水 100 mL, 离心法获取脱落细胞用含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基接种于培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱饱和湿度下培养, 术后病理结果均为卵巢浆液性囊腺癌, 分化 I 级 10 例, I~II 级 2 例, 临床分期均为 III 期, 年龄 35~56 岁。

1.2 方法

1.2.1 肿瘤细胞获取、纯化、鉴定^[1] (1) 术前抽取患者腹水 100 mL, 离心法获取肿瘤细胞, 将细胞沉淀加入含 20% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基调整浓度制成 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 细胞悬液, 接种 15 cm^2 培养瓶, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养。(2) 采用酶消化法和反复贴壁法纯化卵巢癌细胞^[1]

(图 1~3)。按细胞浓度 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 取 2 mL 接种于带盖玻片的塑料 6 孔板中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养。细胞生长到覆盖玻片 80% 时加入 TRAIL 浓度为 0、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 含 20% 胎牛血清 RPMI1640 培养基, 继续培养 24、48、72、96 h。(3) 肿瘤细胞的鉴定。免疫荧光细胞化学法检测肿瘤细胞凋亡。①洗去细胞培养基; ②贴壁加入 200 μL Binding Buffer; ③加 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 的碘化丙啶(PI), 轻轻混匀, 暗室避光室温反应 15 min; ④加 300 μL Binding Buffer, 立即荧光显微镜下检测拍照, 取细胞数大于或等于 100 个/高倍视野的 3 个视野, 计数 100 个细胞中发生凋亡的细胞数和晚期凋亡的细胞数, 取平均数(Annexin V-FITC 试剂盒由 Biovision 提供)。

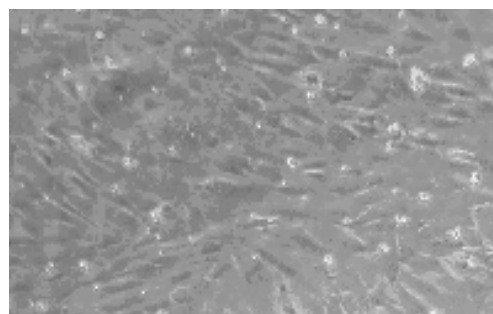


图 1 原代卵巢癌细胞纯化($\times 200$)

1.2.2 MTT 比色法测定光吸收值 (1) 以每孔 5×10^3 个细胞接种到 96 孔板, 体积 200 μL , 重复 3 孔。(2) 培养细胞贴壁

[#] 现华中科技大学在读博士生。 [△] 通讯作者。

表 1 TRAIL 作用于原代卵巢癌细胞后的吸光值(A)($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.25±0.06	0.28±0.02	0.28±0.02	0.28±0.02
5 μg/L 组	0.20±0.01*	0.19±0.01*	0.15±0.02* [#]	0.11±0.01* [#]
10 μg/L 组	0.18±0.01*	0.17±0.01* [#]	0.13±0.02* [#]	0.09±0.02* [#]
20 μg/L 组	0.16±0.01*	0.16±0.02*	0.11±0.02* [#]	0.08±0.02* [#]
50 μg/L 组	0.17±0.02*	0.15±0.02* [#]	0.11±0.01* [#]	0.09±0.01* [#]
100 μg/L 组	0.16±0.02*	0.16±0.02*	0.10±0.01* [#]	0.09±0.01* [#]

与对照组比较,* : $P<0.05$;与 24 h 比较,[#] : $P<0.05$ 。

表 2 TRAIL 诱导原代卵巢癌细胞凋亡情况($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	2±1.26	3±1.69	2±2.15	3±1.34
5 μg/L 组	28±1.18*	42±2.13* [#]	48±4.32* [#]	55±4.21* [#]
10 μg/L 组	39±2.82*	49±4.16* [#]	58±3.35* [#]	63±5.33* [#]
20 μg/L 组	46±3.31*	57±4.57* [#]	66±3.16* [#]	74±4.26* [#]
50 μg/L 组	51±2.36*	59±3.11* [#]	66±4.12* [#]	75±3.18* [#]
100 μg/L 组	53±5.89*	61±3.65* [#]	68±3.49* [#]	75±5.46* [#]

与对照组比较,* : $P<0.05$;与 24 h 比较,[#] : $P<0.05$ 。

表 3 TRAIL 诱导原代卵巢癌细胞晚期凋亡情况($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	2±1.26	3±1.69	2±2.15	1±1.12
5 μg/L 组	6±1.12	8±2.11	11±4.32* [#]	13±2.21* [#]
10 μg/L 组	10±2.82*	15±4.16*	18±3.35* [#]	24±3.22* [#]
20 μg/L 组	15±3.31*	21±4.57*	28±3.16* [#]	32±3.69* [#]
50 μg/L 组	18±2.36*	20±3.11*	29±4.12* [#]	35±3.45* [#]
100 μg/L 组	19±5.89*	22±3.65*	30±3.49* [#]	38±4.56* [#]

与对照组比较,* : $P<0.05$;与 24 h 比较,[#] : $P<0.05$ 。

生长后加入不同浓度的 TRAIL(5、10、20、50、100 μg/L)培养基分别培养 24、48、72、96 h。(3)每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL 继续孵育 4 h,终止培养,加 150 μL 甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min,充分溶解结晶物。(4)选择 492 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光吸收值,未加 TRAIL 组为对照组。

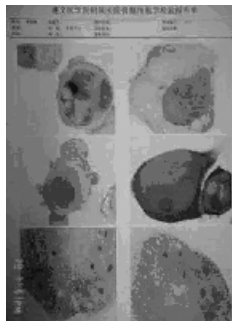


图 2 原代卵巢癌细胞(瑞氏染色鉴定为恶性肿瘤细胞、油镜)

抑制增加,当浓度大于 20 μg/L 时抑制增幅减慢;同一浓度 TRAIL 24、48 h 间抑制率差异无统计学意义($P>0.05$),48、72、96 h 相互间差异有统计学意义($P<0.05$),对原代卵巢癌细胞生长的抑制呈剂量、时间依赖性,见表 1。

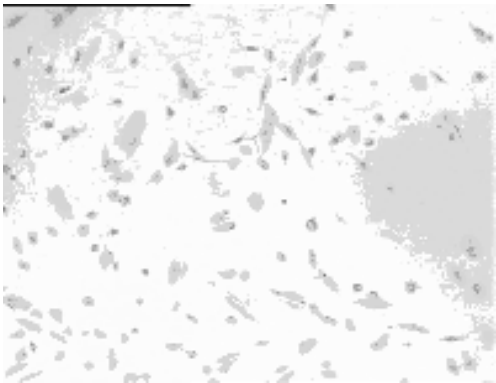


图 3 原代卵巢癌细胞 CK7 阳性(×200)

1.3 统计学方法 统计学资料运用 SPSS13.0 单因素方差分析,多个样本均数的两两比较采用 Dunnett 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TRAIL 对原代卵巢癌细胞的抑制率 MTT 比色法检测得出 5、10、20 μg/L 浓度时,随浓度增加对原代卵巢癌细胞的

2.2 TRAIL 诱导各组卵巢癌细胞凋亡的情况 当 TRAIL 浓度相同时,随作用时间延长凋亡细胞数增加,5、10、20 μg/L 3 组各时段的凋亡细胞数比较差异有统计学意义($P<0.05$),呈剂量依赖性。同一浓度 24、48 h 凋亡细胞数比较差异有统计学意义($P<0.05$),72、96 h 样本间比较差异无统计学意义

($P>0.05$)(表 2)。各组的晚期凋亡细胞数也呈剂量、时间依赖性,见表 3。

3 讨 论

化学治疗是卵巢癌主要治疗方法,目前的化疗药物都有一定的不良反应,可能诱导耐药性。TRAIL 是近来发现的 TNF 家族新成员,有选择性细胞毒作用的生物学特性。研究发现 TRAIL-R 信号复合物通过 Caspase 信号途径激活级联反应后诱导细胞凋亡。Uchida 等^[2]发现还可以通过线粒体介导的凋亡途径活化 Caspase3 引起细胞凋亡。周莉和丰有吉^[3]发现 TRAIL 对卵巢癌细胞 3AO 及 HO-8910 细胞株的生长抑制和凋亡均敏感,显示剂量依赖的生长抑制和诱导凋亡。杨柳芹等^[4]发现胃癌细胞株 SGC27901、MKN28、AGS、MKN45 对 TRAIL 的敏感性与 Caspase3 的高表达有关,而与 bcl-2 的表达无关;余晓燕等^[5]发现 TRAIL 与 5-氟脲嘧啶(5-Fu)、顺铂(DDP)联合作用有协同抑制 HEP-2 细胞株增殖、诱导 HEP-2 细胞株凋亡的作用。

本研究表明小剂量 TRAIL(5~100 $\mu\text{g/L}$)就有抑制原代卵巢癌细胞增殖、生长和诱导细胞凋亡的活性。TRAIL 5 $\mu\text{g/L}$ 24 h 凋亡细胞数为(28 \pm 1.18),96 h 达(55 \pm 4.12),发生晚期凋亡的细胞数由(6 \pm 1.12)上升到(13 \pm 2.21);5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 3 组各时段凋亡率比较差异有统计学意义($P<0.05$);TRAIL 抑制原代卵巢癌细胞增殖和诱导凋亡呈时间、剂量依赖性。与文献[6]报道对比,对卵巢癌细胞株的抑制率要高,诱导凋亡的作用要强,这可能是原代卵巢癌细胞中由分化和增殖能力不同的细胞所组成细胞群,而细胞株则是增殖和环境适应能力强的细胞系构成。原代卵巢癌细胞更接近于活体内肿瘤

细胞生长特性。

TRAIL 对原代卵巢癌细胞有明显的生长抑制和促进凋亡的作用,TRAIL 将来可能有良好的临床应用前景。

参考文献:

- [1] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2004:68.
- [2] Uchida H,Shinoura N,Kitayama J,et al. caspase-8 gene transduction augments radiation-induced apoptosis in DLD-1 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2002,292(2):347.
- [3] 周莉,丰有吉.重组人促卵巢癌细胞凋亡作用的研究[J].中国癌症杂志,2005,15(3):268.
- [4] 杨柳芹,房殿春,张汝钢,等.胃癌细胞 bcl-2 和 Caspase3 的表达对 TRAIL 抗癌作用的影响[J].重庆医学,2003,32(9):1132.
- [5] 余晓燕,叶琳,沈娜,等.抗肿瘤药物与 TRAIL 联用对喉癌 HEP-2 细胞株增殖、凋亡的影响[J].重庆医学,2008,37(20):2268.
- [6] Ehrhardt H,Fulda S,Schmed I,et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL induced apoptosis mediated by NF-kappaB[J]. Oncogene,2003,22:3842.

(收稿日期:2009-11-05 修回日期:2009-12-07)

(上接第 920 页)

度上反映了胃癌浸润、转移的能力,联合检测胃癌组织中 Flt-1 及 COX-2 的表达对胃癌的转移、浸润和预后评估有重要的价值。

参考文献:

- [1] 刘东屏,王炳元,姜若兰.胃癌组织中血管内皮生长因子及其受体 Flt-1 和 KDR mRNA 的表达[J].中华消化杂志,2000,20(4):252.
- [2] 王元宇,叶再元,赵仲生,等.胃癌组织血管内皮细胞生长因子及其受体 Flt-1 的表达及与胃癌生物学行为的关系[J].中华胃肠外科杂志,2007,10(3):269.
- [3] Pallares J,Rojo F,Iriarte J,et al. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF,bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign,pre-malignant and malignant prostate tissues[J]. Histol Histopathol,2006,21:857.
- [4] Lesslie DP,Summy JM,Parikh NU,et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases[J]. Br J Cancer,2006,94:1710.
- [5] Roberts DM,Kearney JB,Johnson JH,et al. The vascular endothelial growth factor(VEGF) receptor Flt-1 (VEG-

FR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation[J]. Am J Pathol,2004,164:1531.

- [6] Singh B,Berry JA,Shoher A,et al. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells[J]. Int J On Col,2005,26:1393.
- [7] Eibl G,Takata Y,Boros LG,et al. Growth stimulation of COX-2 negative pancreatic cancer by a selective COX-2 inhibitor[J]. Cancer Res,2005,65:982.
- [8] Ranger GS,Thomas V,Jewell A,et al. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer[J]. Anticancer Res,2004,24(4):2349.
- [9] Shiotani H,Denda A,Yamamoto K,et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxid-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor,nirnesulide[J]. Cancer Res,2001,61(4):1451.
- [10] Cheng AS,Chan HL,Tok F. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in hepatitis- B virus associated hepatocellular carcinoma[J]. Int J On Col,2004,24(4):853.

(收稿日期:2009-09-16 修回日期:2009-10-22)