

文章编号:1005-6947(2006)11-0821-05

· 基础研究 ·

# 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的抗胰腺癌细胞的作用

田锐, 秦仁义, 杜志勇, 夏维

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 胆胰外科, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 探讨腺病毒介导的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 基因对人胰腺癌株 Panc-1 细胞的抑制作用及其机制。方法 利用腺病毒载体 Ad-TRAIL 将人类 TRAIL 全长 cDNA 转导入 Panc-1 细胞。分别利用 RT-PCR 和 Western blot 检测 TRAIL 在 mRNA 水平及蛋白水平的表达。利用 MTT 法测定细胞增殖活性及 TRAIL 基因的旁观效应。利用流式细胞仪检测胰腺癌细胞的凋亡率, 并用 Western blot 检测 procaspase-8 和 procaspase-3 蛋白的表达。结果 Panc-1 细胞感染 Ad-TRAIL 腺病毒后, 可稳定地高表达 TRAIL。Ad-TRAIL 能显著抑制 Panc-1 细胞的生长。高表达 TRAIL 的转染细胞能通过旁观效应导致未转染细胞的生长抑制。Ad-TRAIL 实验组的凋亡率显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 且 Ad-TRAIL 能使 procaspase-8 和 procaspase-3 蛋白表达下降。结论 Ad-TRAIL 对胰腺癌 Panc-1 细胞具有明显的抑制作用, 其机制可能与促凋亡和旁观效应有关。

**关键词:** 胰腺肿瘤/药物疗法; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体/药理学; 人胰腺癌株 panc-1/药物作用; 细胞凋亡; 旁观效应

中图分类号: R735.9; R730.3

文献标识码: A

## Antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene transfection mediated by adenovirus in human pancreatic carcinoma cell

TIAN Rui, QIN Ren-yi, DU Zhi-yong, XIA Wei

(Department of Pancreatic-Biliary Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the antitumor effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene transfection mediated by adenovirus into human pancreatic carcinoma cell line Panc-1, and the mechanisms involved in this effect. **Methods** TRAIL gene was transfected into pancreatic cancer cell line Panc-1 by an adenovirus vector (Ad-TRAIL). Level of TRAIL mRNA expression was determined using RT-PCR, and TRAIL protein synthesis was evaluated with Western blot. Cell-growth activities were determined by MTT assay. The bystander effect was observed by co-culturing the Panc-1 cells with and without the transfected TRAIL gene at different ratios. Apoptosis in pancreatic cancer cells was detected by flow cytometry. Proaspase-8 and procaspase-3 proteins were determined by Western blot. **Results** The stable overexpression of TRAIL was detected in Panc-1 cells transfected by Ad-TRAIL. Ad-TRAIL significantly inhibited cell viability of Panc-1 cells. Furthermore, co-culture of cancer cells transfected with TRAIL resulted in the nontransfected cell inhibition by bystander effect. Moreover, the percentage of apoptotic cells was significantly higher in the Ad-TRAIL-treatment group compared to the control groups ( $P < 0.01$ ), and there was a diminished amount of procaspase-8 and procaspase-3 after infection with Ad-TRAIL transfection. **Conclusions** The overexpression of TRAIL gene in Panc-1 cells by Ad-TRAIL exerts a marked antitumor effect, and the mechanisms involved in this effect may be related to proapoptosis and bystander effect.

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30471693)。

**收稿日期:** 2006-04-17; **修订日期:** 2006-06-29。

**作者简介:** 田锐, 男, 湖北荆门人, 华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生, 主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。

**通讯作者:** 秦仁义 E-mail: ryqin@tjh.tjmu.edu.cn。

**Key words:** Pancreatic Neoplasms/drug ther; TRAIL/pharm; Human Pancreatic Carcinoma Cell/drug eff;

Apoptosis; Bystander effect

**CLC number:** R735.9; R730.3

**Document code:** A

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因是肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员<sup>[1]</sup>。近来, TRAIL因其具有特异性杀伤肿瘤细胞的作用而成为肿瘤治疗中的焦点分子。有报道称<sup>[1-2]</sup>,重复注射重组可溶性TRAIL能抑制肿瘤生长,提高荷瘤小鼠的生存率,而无显著的毒性作用。而且,TRAIL与化疗药有协同效应,能显著地抑制实体肿瘤的生长<sup>[3]</sup>。本实验利用腺病毒载体,介导TRAIL基因在胰腺癌细胞株Panc-1细胞中转染,并研究其抗肿瘤作用及其机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人胰腺癌细胞株Panc-1细胞和人胚肾293细胞购于ATCC;携带TRAIL的腺病毒载体Ad-TRAIL及携带绿色荧光蛋白的腺病毒Ad-GFP由本实验室合成;DMEM,胎牛血清以及0.25%胰蛋白酶购于GIBCO公司;兔抗人anti-TRAIL, anti-caspase-8和anti-caspase-3等多克隆抗体购于Santa Cruz公司;Anti- $\beta$ -actin抗体,四甲基偶氮唑盐(MTT)和二甲基亚砷购于Sigma公司;Trizol试剂购于Invitrogen公司;Trizol试剂, oligo(dt), dNTP, MMLV逆转录酶和Taq DNA多聚酶均购于美国Promega公司;增强化学发光(ECL)试剂盒购于Pierce公司;Annexin V凋亡检测试剂盒购于Clontech公司。引物序列由大连宝生物公司合成。

### 1.2 实 验 方 法

1.2.1 细胞培养 Panc-1细胞及293细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,在37℃,95%湿度及5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。每48h用胰酶消化传代细胞1次,并取对数期的细胞用于实验。

1.2.2 Ad-TRAIL及Ad-GFP的扩增、纯化及滴度测定 重组腺病毒Ad-TRAIL及Ad-GFP的构建参见本实验室以前工作<sup>[4,5]</sup>。取重组腺病毒上清液500  $\mu$ L,加至80%融合的293细胞中,于37℃,

5%CO<sub>2</sub>孵箱中培养。镜下观察到95%~98%细胞出现病变效应、荧光显微镜下看到满视野绿色荧光后,收集细胞;反复冻融3次,离心;收集上清,氯化铯梯度离心纯化病毒。应用50%组织培养感染剂量法(TCID<sub>50</sub>)测定病毒滴度。

1.2.3 实验分组及病毒的感染 实验分为实验组(感染Ad-TRAIL)、空载体对照组(感染Ad-GFP)及空白对照组[加入磷酸盐缓冲液(PBS)];吸除各组细胞的培养液,用0.1 mol/L PBS清洗2次后,按感染复数(multiplicities of infection, MOI)为20的量加入Ad-TRAIL或Ad-GFP,空白对照组加入0.1 mol/L PBS。感染2h后,加入含血清的DMEM继续培养。

1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测TRAIL的mRNA表达 上述各组细胞感染病毒72h后,用Trizol试剂抽提总RNA,步骤按说明手册进行。用逆转录酶和oligo(dt)按37℃60min,95℃5min条件进行cDNA的合成。取5  $\mu$ L逆转录产物进行PCR扩增。反应条件为:95℃变性5min;95℃30s,55℃30s,72℃60s,30个循环;72℃延伸10min。反应体系以 $\beta$ -actin为内参照,PCR产物在含溴化乙啶的1.5%琼脂糖凝胶上电泳后置于紫外光下分析。TRAIL引物序列:上游引物5'-gta etc caa aag tgg cat t-3',下游引物5'-cca ttg gtt tgt cgt tct t-3'(476bp)。 $\beta$ -actin上游引物5'-gtg cgt gac att aag gag-3',下游引物5'-cta agt cat agt ceg cct-3'(520bp)。

1.2.5 免疫印迹法(Western blot)检测TRAIL、procaspase-8和procaspase-3蛋白的表达 各组细胞感染病毒72h后,用细胞裂解液裂解各组细胞,14000r/min,4℃离心10min,并集上清液作为样本。配制SDS-PAGE,按每孔30  $\mu$ g上样后进行电泳。电泳后用去离子水及转移缓冲液洗涤凝胶和硝酸纤维素(PVDF)膜,采用电转移法转膜。电转移蛋白至PVDF膜,用5%脱脂奶粉封闭过夜,加入一抗后于封闭袋中4℃孵育过夜,二抗孵育1h。参照ECL试剂盒说明进行化学发光法显示结果,X

线胶片曝光。一抗分别为 anti-TRAIL, anti-caspase-8, anti-caspase-3 和 anti- $\beta$ -actin。

**1.2.6 MTT 法检测病毒感染后的细胞存活率** 将 Panc-1 细胞以每孔  $2 \times 10^3$  个的量铺入 96 孔板, 每组均设 4 个复孔。培养 24 h 后按 20 MOI 加入 Ad-TRAIL 或 Ad-GFP, 对照组加入 0.1 mol/L PBS; 作用 2 h 后, 加入含血清的 DMEM 继续培养。于 24, 48, 72, 96 h 及 120 h 时点, 每孔加入 5 mg/mL MTT 20  $\mu$ L, 温箱中继续孵育 4 h; 离心, 去上清, 每孔加入二甲基亚砜 150  $\mu$ L。振荡 10 min 后选择 490 nm 波长, 在自动酶联检测仪上测定各孔的吸光度值(A 值)。细胞存活率(%) = 实验组 A 值/对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

**1.2.7 MTT 法检测旁观效应** 以 20 MOI 的 Ad-TRAIL 感染 Panc-1 细胞 24 h 后, 收集该细胞并记为转染细胞。转染细胞与未转染细胞按照不同比例混合, 混合比例为转染细胞分别占总细胞的 0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% 和 100%。将混合的细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个的量铺入 96 孔板, 每个比例均设 4 个复孔。5 d 后, 用 MTT 法检测细胞的存活率。细胞死亡率(%) = 1 - 细胞存活率。如细胞死亡率明显多于转染细胞率, 则提示旁观效应存在。

**1.2.8 用流式细胞仪测肿瘤细胞的凋亡率** 各组细胞感染病毒 72 h 后, 取  $1 \times 10^6$  待测细胞用 PBA (含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液) 洗涤 2 次, 分别加入 FITC 标记的 Annexin V 和碘化丙啶(PI) (操作按说明书进行), 避光放置 15 min。通过流式细胞仪(BD 公司的 FACS Calibur) 检测凋亡。正常活细胞 Annexin V 及 PI 均低染; 凋亡细胞 Annexin V 高染、PI 低染; 坏死细胞 Annexin V 和 PI 均高染。凋亡及坏死细胞比例用 CellQuest 软件进行量化分析。各实验均重复 3 次, 取其均值。

### 1.3 统计分析

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS11.5 软件进行 *t* 检验。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 转染前后胰腺癌 Panc-1 细胞 TRAIL 的 mRNA 及蛋白的表达

RT-PCR 结果显示, 实验组在 476 bp 处出现目的条带, 空载体对照组及空白对照组仅有微弱条带(图 1)。Western blot 结果显示, 实验组在 32 kD 处出现 TRAIL 特异性蛋白目的条带, 空载体对照组及空白对照组不显示特异性蛋白目的条带(图 2)。说明 TRAIL 基因成功转染到 Panc-1 细胞。

### 2.2 Ad-TRAIL 抑制胰腺癌 Panc-1 细胞的增殖及 TRAIL 基因的旁观效应

随着作用时间的延长, Ad-TRAIL 作用下的 Panc-1 细胞的存活率明显减低, 而 Ad-GFP 感染组的 Panc-1 细胞的存活率未受明显影响(图 3)。在旁观效应中, 当已转染 TRAIL 的 Panc-1 细胞的比例为 5%, 10%, 25%, 50%, 75% 及 100% 时, 5 d 后分别有 12.4%, 27.4%, 48.1%, 63.7%, 70.8% 及 74.8% 的混合细胞被杀死(附表)。少量转染细胞的存在导致显著的细胞杀伤作用, 并且细胞死亡率明显多于转染细胞率。提示部分未感染细胞可能被 TRAIL 基因的旁观效应所杀死。

附表 TRAIL 基因转染对胰腺癌细胞 Panc-1 的旁观效应

混合细胞中转染细胞的 所占比例(%)	OD 值	细胞死亡率 (%)
0	1.119 $\pm$ 0.074	0
5	0.980 $\pm$ 0.075	12.4
10	0.812 $\pm$ 0.056	27.4
25	0.581 $\pm$ 0.341	48.1
50	0.406 $\pm$ 0.021	63.7
75	0.326 $\pm$ 0.016	70.8
100	0.282 $\pm$ 0.013	74.8

### 2.3 TRAIL 基因的转染对胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡的影响

流式细胞术结果显示各组胰腺癌细胞中凋亡细胞所占比率的代表性数值(图 4)。统计分析显示实验组胰腺癌细胞凋亡率(30.0%  $\pm$  2.1%)显著高于空载体对照组(3.8%  $\pm$  0.5%)和空白对照组(3.3%  $\pm$  0.4%) ( $P < 0.01$ )。后两组之间无差异( $P > 0.05$ )。实验组中 caspase 蛋白酶的前体形式 procaspase-8 和 procaspase-3 蛋白的印迹明显减弱(图 2), 这是细胞发生凋亡、caspase 蛋白酶发生剪切激活的表现。表明 Ad-TRAIL 能显著提高胰腺癌细胞 Panc-1 的凋亡率。

图 1 Ad-TRAIL 感染 PANC-1 后 TRAIL mRNA 的表达

图 2 Ad-TRAIL 感染 Panc-1 后 TRAIL, procaspase-8 和 procaspase-3 蛋白的表达

图 3 病毒感染后的细胞存活率

图 4 流式细胞仪测 Panc-1 的凋亡率

### 3 讨论

TRAIL 蛋白是一种 II 型糖蛋白,其 C 末端的胞外区与 TNF 家族的其他成员具有较高的同源性,并能被切割成可溶性的 TRAIL 活性片段<sup>[1]</sup>。目前,TRAIL 已确定有 5 种受体,分别是死亡受体(DR4 和 DR5)、诱骗受体(DcR1 和 DcR2)和可溶性受体 OPG<sup>[6]</sup>。死亡受体多表达于肿瘤细胞,TRAIL 与之结合后能诱导细胞凋亡;而诱骗受体主要表达于正常细胞,由于其缺乏胞质段,不能传递凋亡信号,TRAIL 与之结合不能诱导细胞凋亡;可溶性 OPG 则能通过死亡受体竞争性结合 TRAIL 而阻断 TRAIL 诱导的凋亡<sup>[6]</sup>。

TRAIL 因其具有特异性肿瘤杀伤效应和化疗增敏作用而极有可能发展成为特异性杀死肿瘤细胞的新型抗肿瘤药物。但是,重组可溶性 TRAIL 的不稳定性和昂贵的价格限制了其应用<sup>[2]</sup>。本实验选择了腺病毒载体系统。腺病毒载体因其具有无插入性突变、安全性高、感染能力强、蛋白表达量大等优点,目前已成为基因治疗领域常用的载体之一<sup>[4,5]</sup>。本实验 RT-PCR 和 Western blot 结果显示腺病毒介导的基因转染能使 TRAIL 在 Panc-1 细胞中稳定地高表达,且 MTT 结果显示 Ad-TRAIL 能显著抑制肿瘤细胞的生长。

目前,TRAIL 的肿瘤杀伤效应被认为与 TRAIL 诱导的凋亡相关<sup>[7]</sup>,其具体机制尚未完全明了。有研究<sup>[7]</sup>表明,TRAIL 诱导的凋亡是通过死亡受体通路介导的。TRAIL 与其死亡受体(DR4 和 DR5)的结合能触发死亡诱导信号复合体(death-inducing signal complex, DISC)并导致 caspase-8 的活化,后者进而再活化下游的效应蛋白酶分子 caspase-3 和 caspase-7 而启动级联反应,不断地传递和放大凋亡信号,从而引发对 TRAIL 敏感的细胞发生大量、快速的凋亡<sup>[8]</sup>。本实验所用流式细胞术显示腺病毒介导的 TRAIL 转染能促进胰腺癌细胞凋亡,并导致 procaspase-8 和 procaspase-3 蛋白的剪切激活。这些结果与 Satoh 等<sup>[9]</sup>的报道一致。后者还利用 caspase 蛋白酶抑制剂 zVAD-fmk 显著地抑制可溶性 TRAIL 在胰腺癌细胞中诱导的凋亡作用<sup>[9]</sup>,从另一方面证实了 TRAIL 诱导的凋亡系通过 caspase 传导调控信号。

在实体瘤的基因治疗研究中发现,不可能将目的基因导入所有癌细胞,因此,旁观效应的作用显得极为重要。尽管旁观效应的存在并不能显著提高转基因效率,但它能增强细胞的杀伤力。本实验提示,转染细胞可能通过旁观效应抑制周边未转染癌细胞的生长,或导致周边未转染细胞的凋亡。旁观效应的机制可能是细胞的毒性代谢产物通过细

胞间的缝隙连接转移到细胞内<sup>[10]</sup>,或通过凋亡囊泡转移<sup>[11]</sup>,或通过局部细胞介导的免疫反应激活<sup>[12]</sup>等。本实验中 TRAIL 作为一种 II 型糖蛋白,其旁观效应可能通过转染细胞的膜表面的 TRAIL 与周边未转染细胞的膜表面的死亡受体结合而介导,也可能通过转染细胞产生可溶性 TRAIL 作用于未转染细胞所介导。

本研究显示,Ad-TRAIL 对胰腺癌 Panc-1 细胞具有明显的抗肿瘤作用,其机制可能与促凋亡和旁观效应有关。

#### 参考文献:

- [1] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, *et al.* Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104 (2): 155 - 162.
- [2] Walczak H, Miller RE, Ariail K, *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo [J]. *Nat Med*, 1999, 5 (2): 157 - 163.
- [3] Nozawa F, Itami A, Saruc M, *et al.* The combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) and Genistein is effective in inhibiting pancreatic cancer growth [J]. *Pancreas*, 2004, 29 (1): 45 - 52.
- [4] Chen L, Liu Q, Qin R, *et al.* Amplification and functional characterization of MUC1 promoter and gene-virotherapy via a targeting adenoviral vector expressing hSSTR2 gene in MUC1-positive Panc-1 pancreatic cancer cells in vitro [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 15 (4): 617 - 626.
- [5] Chen LM, Le HY, Qin RY, *et al.* Reversal of the phenotype by K-rasval12 silencing mediated by adenovirus-delivered siRNA in human pancreatic cancer cell line Panc-1 [J]. *World J Gas-*

*troenterol*, 2005, 11 (6): 831 - 838.

- [6] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. *Science*, 1997, 276 (5309): 111 - 113.
- [7] Walczak H, Bouchon A, Stahl H, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand retains its apoptosis-inducing capacity on Bcl-2-or Bcl-xL-overexpressing chemotherapy-resistant tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (11): 3051 - 3057.
- [8] Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, *et al.* Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (4): 1314 - 1319.
- [9] Satoh K, Kaneko K, Hirota M, *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer [J]. *Pancreas*, 2001, 23 (3): 251 - 258.
- [10] Mesnil M, Yamasaki H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (15): 3989 - 3999.
- [11] Shao R, Xia W, Hung MC. Inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis are involved in E1A-mediated bystander effect and tumor suppression [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (12): 3123 - 3126.
- [12] Bai S, Du L, Liu W, *et al.* Tentative novel mechanism of the bystander effect in glioma gene therapy with HSV-TK/GCV system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259 (2): 455 - 459.

## 新书推荐——《甲状腺·甲状旁腺外科学》

### ——给裘法祖院士的礼物

中国、日本、意大利 3 个国家 23 所一流医学所、40 余位专家联手编写的《甲状腺·甲状旁腺外科学》已出版。

专著内容丰富,包括甲状腺、甲状旁腺的基础理论、外科疾病学和疾病诊断学、手术学、非手术治疗学。名家经验纷呈,仅甲状腺癌就有 3 篇专题分别介绍上海、台湾和日本专家的经验。

专著荟萃了编者 40 年来上万病例的临床经验和外科研究成果,学术观点有独到见解,是富有特色的临床实用型专著。

主编:郑泽霖 耿小平 张德恒;定价:68 元;出版:安徽科学技术出版社 地址:安徽省合肥市跃进路 1 号 邮编:230063