

[文章编号] 1000 - 4718(2007)01 - 0142 - 04

TRAIL 和顺铂对横纹肌肉瘤细胞凋亡时 caspase - 3 活性和线粒体膜电位的影响

徐玉生¹, 苗金红^{2△}, 王利民¹, 王义生¹, 许建中¹, 杨迪生³
 (郑州大学第一附属医院¹骨科,²内科, 河南 郑州 450052;
³浙江大学医学院附属第二医院骨科, 浙江 杭州 310009)

[摘要] 目的: 探讨肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (TRAIL) 蛋白和顺铂协同抑制横纹肌肉瘤细胞生长和诱导凋亡作用及其机制。方法: 将不同浓度的 TRAIL 和顺铂作用于培养的人 RD 胚胎型横纹肌肉瘤细胞, 通过 MTT 比色法、形态学改变、流式细胞仪检测细胞凋亡、caspase - 3 活性和线粒体膜电位的改变, 分析其对横纹肌肉瘤细胞的作用及和顺铂协同作用的效果和机制。结果: TRAIL 浓度为 1.0、10.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 时, 细胞毒性指数分别为 18.9%、20.8%、43.5%; 顺铂浓度为 1.0、5.0、10.0 mg/L 时, 细胞毒性指数分别为 9.8%、23.4% 和 43.8%。而浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 TRAIL 与浓度为 5 mg/L 的顺铂联合作用时, 细胞毒性指数明显高达 66.4%, FCM 分析显示联合应用后细胞线粒体跨膜电位降低, 同时提高 caspase - 3 的活性, 与细胞凋亡率增加相一致。结论: TRAIL 和顺铂联合应用对横纹肌肉瘤细胞具有明显的协同杀伤效果, 这一作用与增加 caspase - 3 活性及降低线粒体跨膜电位有关。

[关键词] 横纹肌肉瘤; 肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体; 顺铂; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Mitochondrial membrane potential and caspase - 3 are involved in apoptosis of RD cells induced by TRAIL and cisplatin

XU Yu - sheng¹, MIAO Jin - hong², WANG Li - min¹, WANG Yi - sheng¹, XU Jian - zhong¹, YANG Di - sheng³

(¹ Department of Orthopaedics, ² Department of Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China. E - mail: xuyusheng2@sina.com; ³ Department of Orthopaedics, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the synergistic induction of apoptosis by TRAIL and cisplatin in rhabdomyosarcoma cells and investigate the role of mitochondrial membrane potential and caspase - 3 in this process. **METHODS:** Rhabdomyosarcoma cells were treated with TRAIL, cisplatin for 3 days, respectively or combination. The cytotoxicity was observed by MTT assay. The apoptotic rates and change of mitochondrial membrane potential and caspase - 3 were determined by flow cytometry (FCM). The obvious morphological changes in rhabdomyosarcoma cells were confirmed by electron microscope. **RESULTS:** Rhabdomyosarcoma cells were treated with TRAIL (1.0, 10.0 and 100.0 $\mu\text{g/L}$), the cytotoxicity indices were 18.9%, 20.8% and 43.5%, respectively. With cisplatin (1.0, 5.0 and 10.0 mg/L), the indices of cytotoxicity were 9.8%, 23.4% and 43.8%, respectively. When TRAIL and cisplatin treatment used simultaneously, the cytotoxicity index increased obviously. The activity of caspase - 3 in rhabdomyosarcoma cells was upregulated and the mitochondrial membrane potential was downregulated with cisplatin, which were paralleled by the apoptotic rates. The obvious apoptosis morphological changes in rhabdomyosarcoma cells were shown by electron microscope. **CONCLUSION:** TRAIL and cisplatin are able to kill rhabdomyosarcoma cells. TRAIL in combination with cisplatin shows synergistic effect on rhabdomyosarcoma cells by increasing the caspase - 3 activity and suppressing mitochondrial membrane potential.

[KEY WORDS] Rhabdomyosarcoma; TNF - related apoptosis - inducing ligand; Cisplatin; Caspase - 3

近几年肿瘤生物治疗热点之一是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡从而达到肿瘤治疗目的, 此种疗法称肿瘤的凋亡疗法。有关该疗法的重要进展之一是肿

瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 的发现, TRAIL 及其受体在诱导肿瘤细胞凋亡的同时能保护正常细胞而免于细

[收稿日期] 2005 - 12 - 13 [修回日期] 2006 - 04 - 11

△通讯作者 Tel: 0371 - 67912312; E - mail: xuyusheng2@sina.com

胞毒副反应^[1]。横纹肌肉瘤 (rhabdomyosarcoma, RMS) 是儿童最常见的一种软组织肉瘤, 恶性程度高^[2]。对横纹肌肉瘤的生物治疗研究报道很少。本研究以横纹肌肉瘤细胞为对象, 通过 TRAIL 和顺铂 (cisplatin, CDDP) 联合应用, 观察体外对横纹肌肉瘤细胞生长抑制和诱导凋亡作用, 探讨肿瘤的生物治疗与化疗联合治疗的可行性, 为临床肿瘤治疗提供参考。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 材料 TRAIL 购于晶美公司 (USA)。RD 型人横纹肌肉瘤细胞株购买于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 主要试剂和仪器 MTT 试剂 (Sigma); 顺铂 (购自山东齐鲁制药厂); 流式细胞仪 (FAC Scan 美国 Becton Dickinson 公司); 罗丹明 (rhodamine123) (购自 Becton Dickinson 公司, 美国); caspase-3 抗体 (购自 Becton Dickinson 公司, 美国); 酶标仪 (Sigma960 型); 扫描电镜 (Philips TECNAI, 荷兰)。

2 方法

2.1 细胞的培养 RD 型人横纹肌肉瘤细胞培养于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 (Gibco) 培养液中, 于 5% CO₂、37 °C 培养箱培养, 维持细胞处于对数生长期, 备用。

2.2 细胞增殖和衰亡的快速比色法 采用 96 孔板, 每孔接种 5×10^3 个细胞, 按 1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L 的顺铂浓度作用于细胞和/或 1.0 μg/L、10.0 μg/L、100.0 μg/L 的 TRAIL 浓度, 于第 3 d 每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL, 继续孵育 4 h, 终止培养。小心吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 10 min, 选择 570 nm 波长, 在自动酶联检测仪上测定各孔吸光度 (A) 值, 重复实验 3 次, 并计算其生长抑制率 (CI)。CI = (阴性对照组 A 值 - 试验组 A 值) / 阴性对照组 A 值 × 100%。

2.3 流式细胞仪 (FCM) 分析 3 mL 培养液含 5×10^5 个 RD 细胞培养于 6 孔板, 按 5 mg/L 的顺铂浓度作用于细胞和/或 100.0 μg/L 的 TRAIL 浓度作用于细胞, 共作用 3 d 后收集细胞, PBS 液洗涤 2 遍, 再用预冷的体积分数 70% 的乙醇固定, 4 °C 过夜, 采用 PI (50 mg/L) 染色分析亚二倍体峰, 分析细胞凋亡比例。

2.4 线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的测定 收集药物作用后的各组细胞 1×10^6 个, PBS 液洗涤 2 遍, 然后与 10.0 mg/L 的 Rh123 [rhodamine 123 由线粒体摄取的阳离子亲脂染料, 细胞内 Rh123 的摄取量与线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 变化呈正相关] 在室温条件下共同孵育 30 min, 用 PBS 洗去未结合的染色剂然后置 FACSCalibur 流式细胞仪进行 Rh123 荧光强度测定,

用其表示线粒体膜电位的大小。将所得数据采用专用软件 CellQuest 3. 1f 进行收集、储存和分析。

2.5 Caspase-3 活性测定 收集药物作用后的各组细胞 6×10^5 个, 用 PBSS 缓冲液洗涤 2 次, 加入细胞裂解液 A 500 μL, 充分混匀后, 室温作用 30 min, 加入 PBSS 缓冲液 3 mL, 1 500 r/min 离心 5 min; 弃上清液加入细胞裂解液 B 100 μL, 再加入 PE-conjugated polyclonal rabbit anti-active caspase-3 抗体 10 μL (1 g/L) 及相应的同型对照抗体 10 μL (1 g/L) 混匀, 室温作用 20 min 加入 PBS 缓冲液 1.5 mL, 1 500 r/min, 离心 5 min 弃上清, 加入 1% 多聚甲醛 500 μL, 用 FACSCalibur 流式细胞仪检测分析, 激发波长为 488 nm、吸收波长为 570 nm 处的荧光强度。

2.6 丫啶橙染色 10 mg 丫啶橙溶于 100 mL pH 为 6.8 的 PBS 中, 滤过, 4 °C 避光保存。收集药物作用后的各组细胞, PBS 液洗涤 2 遍, 制成活细胞悬液, 浓度为 10^{10} cells/L, 取 95 μL 细胞悬液, 加入 5 μL 丫啶橙储存液混匀, 吸 1 滴混合液点于洁净玻片上, 直接用盖玻片封片, 荧光显微镜观察, 摄片。

3 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 10.0 统计软件, 采用方差分析法进行处理。

结 果

1 RD 细胞在不同浓度顺铂和 TRAIL 联合作用后的 A、CI 值

结果见表 1。

表 1 RD 细胞在不同浓度顺铂和 TRAIL 联合作用后的 A、CI 值

Tab 1 The A and CI value of RD cells induced by TRAIL and cisplatin ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	Cisplatin (mg/L)	TRAIL (μg/L)	A (value)	CI (%)
1	0	0	1.181 ± 0.049	
2	0	1.0	0.957 ± 0.026	18.9
3	1.0	1.0	0.903 ± 0.017	23.5*
4	5.0	1.0	0.758 ± 0.022	35.8*
5	10.0	1.0	0.406 ± 0.012	65.6*
6	0	10.0	0.937 ± 0.045	20.8
7	1.0	10.0	0.840 ± 0.042	28.9 [△]
8	5.0	10.0	0.718 ± 0.048	39.2 [△]
9	10.0	10.0	0.374 ± 0.062	68.3 [△]
10	0	100.0	0.667 ± 0.011	43.5
11	1.0	100.0	0.623 ± 0.021	47.2 [■]
12	5.0	100.0	0.397 ± 0.024	66.4 [■]
13	10.0	100.0	0.310 ± 0.016	73.8 [■]

* $P < 0.05$ vs the second group; [△] $P < 0.05$ vs the sixth group;

[■] $P < 0.05$ vs tenth group.

2 TRAIL 和顺铂对 RD 细胞凋亡的诱导作用

顺铂 5 mg/L 作用 3 d 后的凋亡率为 7.41% ; 100.0 μg/L TRAIL 作用 3 d 后的凋亡率为 10.26% ; 顺铂 5 mg/L 和 100.0 μg/L TRAIL 联合作用 3 d 后的凋亡率为 16.54% ; 而未加药对照组的凋亡率为 2.62% 。

3 线粒体跨膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的测定

未加药组细胞线粒体跨膜电位为 7.76% , 以此为对照, TRAIL 作用 3 d 后细胞线粒体跨膜电位降低为 9.01% , 顺铂作用 3 d 后细胞线粒体跨膜电位降低为 24.13% ($P < 0.05$) , TRAIL 联合顺铂作用 3 d 后细胞线粒体跨膜电位降低为 37.48% , 见图 1 。

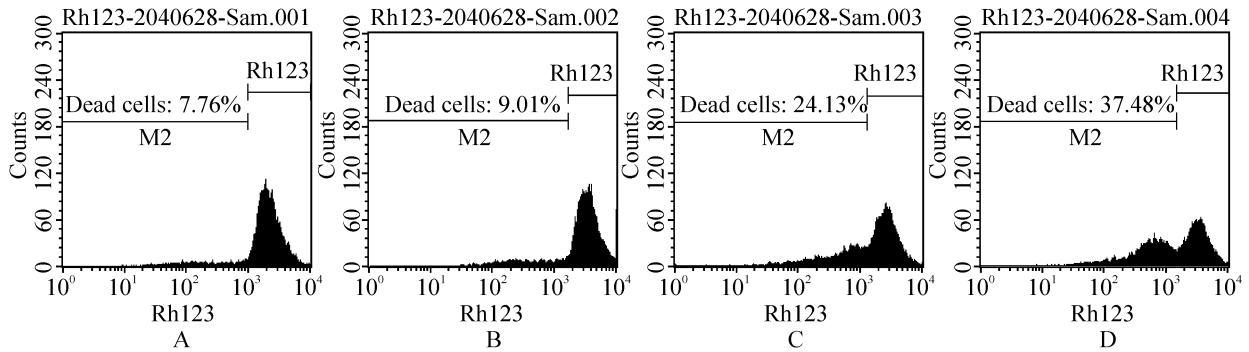


Fig 1 Flow cytometry analysis of mitochondrial membrane potential treated by untreated (A) , TRAIL(B) , cisplatin (C) , TRAIL + cisplatin (D) . The mitochondrial membrane potential of untreated cells was 7.76% . Treatment of the cells with TRAIL and cisplatin, the mitochondrial membrane potential was 9.01% and 24.13% , respectively. TRAIL combined with cisplatin resulted in 37.48% .

图 1 流式细胞仪分析线粒体膜电位的变化

4 Caspase - 3 活性测定

未加药组细胞 caspase - 3 活性为 6.31% , 以此为对照, TRAIL 作用 3 d 后细胞 caspase - 3 活性为 38.25% , 顺铂作用 3 d 后细胞 caspase - 3 活性为 23.49% , TRAIL 联合顺铂作用 3d 后细胞 caspase - 3 活性为 64.21% , 均明显高于对照组亦明显高于两者单独应用, 见图 2 。

5 荧光显微镜下观察

丫啶橙荧光染色可较清楚地显示凋亡细胞的胞体与胞核形态, 有可能发现较早期的凋亡细胞, 故而敏感度可能更高。顺铂和 TRAIL 作用后, 荧光显微镜下表现为典型的细胞凋亡特征性变化: 凋亡细胞核呈固缩状的或半月形绿色荧光或橘黄色荧光; 未加药细胞组: 核结构正常、均染着绿色荧光。

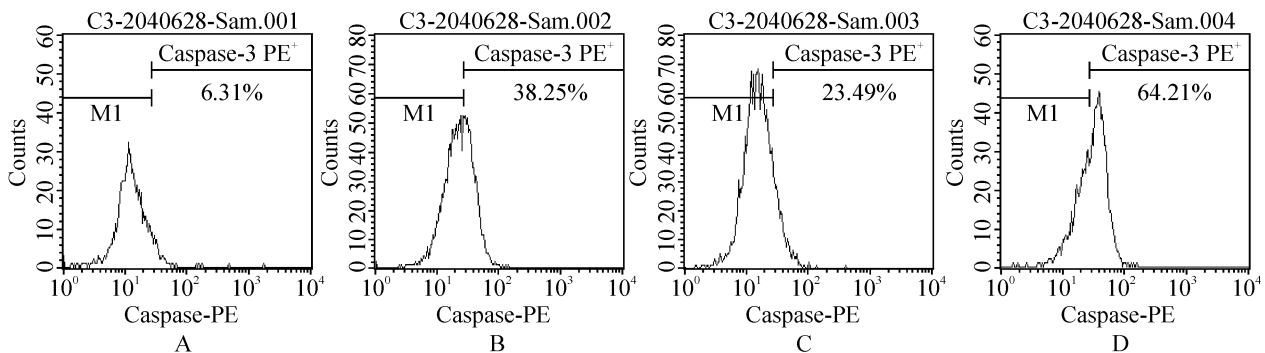


Fig 2 Flow cytometry analysis of caspase - 3 activation treated by untreated (A) , TRAIL(B) , cisplatin (C) , TRAIL + cisplatin (D) . The caspase - 3 activation of untreated cells was 6.31% . Treatment of the cells with TRAIL and cisplatin, caspase - 3 activation was 38.25% and 23.49% , respectively. TRAIL combined with cisplatin resulted in 64.21% .

图 2 流式细胞仪分析 caspase - 3 的活性

讨 论

TRAIL 是 TNF 家族的一员, 对多种肿瘤细胞具有诱导凋亡作用, 而对正常的组织和细胞不具有明显的毒性效应。本研究中, MTT 还原试验、流式细胞仪分析和透射电镜的形态学观察表明, TRAIL 可

以明显地诱导横纹肌肉瘤细胞凋亡, 而且随着 TRAIL 的浓度增加凋亡增多。

在体外实验中发现一些化疗药物能够明显地促进 TRAIL 诱导凋亡的作用, 因此将两者联合应用已经引起了学者们的注意^[3,4]。这种协同作用的机制目前还没有完全清楚。本实验证实 TRAIL 与顺铂联用协同诱导了横纹肌肉瘤细胞的凋亡, 为临床选

择方便、有效的横纹肌肉瘤化疗增效方法提供实验依据。

顺铂是一种烷化剂的金属铂类化合物,为化疗常用的药物。本研究显示顺铂浓度为已知临床血浆高峰浓度的一半(5 mg/L)时,细胞毒性指数为23.4%,顺铂浓度增加1倍后细胞毒性指数为37.1%,当不增加顺铂浓度而和100 μg/L浓度的TRAIL联合应用时细胞毒性指数明显升高,因此,TRAIL与顺铂不但各自对横纹肌肉瘤细胞有生长抑制和诱导凋亡作用,而且联合应用后提高了肿瘤的抑制率和凋亡比例,两者具有协同作用,与Vignati等^[5]报道一致。提示联合应用可以减少化疗药物的剂量,并可减少不良反应。

近年的研究证实,线粒体在细胞凋亡控制中发挥决定性作用^[6],因此,有学者将线粒体称为凋亡整合器^[7]。线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)的降低以至消失,是细胞凋亡的特异性标志。本结果显示横纹肌肉瘤细胞在顺铂作用后线粒体跨膜电位降低24.13%,TRAIL联合顺铂作用3d后细胞线粒体跨膜电位降低37.48%,细胞凋亡比例增多。这说明顺铂降低线粒体膜电位是顺铂与TRAIL联用产生协同作用的重要原因之一。

Caspases是一切凋亡信号转导的共同通路,许多调控细胞凋亡的因素通过caspases酶系起作用,各种caspase如同凝血因子一样“瀑布式”(cascades)层层激活,最终引发细胞凋亡^[8]。其中caspase-3为凋亡的效应因子,负责对凋亡途径最后执行阶段的全部或部分关键性蛋白的酶切,称为凋亡的“执行者”^[9]。一些研究表明,顺铂可以通过细胞特异性caspase-3依赖的信号途径诱导凋亡的发生,从而发挥杀瘤效应^[10]。本结果显示顺铂引起细胞中caspase-3的活性增高达23.49%,明显高于对照组的6.31%,提示caspase-3参与了顺铂诱导横纹肌肉瘤细胞凋亡的调控。TRAIL在诱导细胞凋亡时,也涉及caspases的激活,线粒体细胞色素C的释放^[11]。本研究显示TRAIL单独应用可以引起细胞中caspase-3的活性增高达38.25%,联合应用时细胞中caspase-3的活性更高,因此,在TRAIL和顺铂都达到可以诱导细胞凋亡的剂量时,激活了细胞凋亡的共同途径,这可能也是TRAIL与顺铂在一定的剂量时产生协同作用的机制。结合其它文献,TRAIL与顺铂产生协同作用的机制还有^[12]:①顺铂减少了凋亡抑制蛋白cFLIP的产生,从而放大了半胱天冬氨酸蛋白酶(caspase)的蛋白酶解级联反应,不断传递和放大凋亡信号,从而引发横纹肌肉瘤细胞的凋亡反应;②加强了通过Fas途径诱导的横纹肌肉瘤细胞凋亡。

[参 考 文 献]

- [1] Mizutania Y, Nakanishia H, Yoshidab O, et al. Potentiation of the sensitivity of renal cell carcinoma cells to TRAIL-mediated apoptosis by subtoxic concentrations of 5-fluorouracil[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(1):167-176.
- [2] Nishi M, Hatae Y. Epidemiology of malignant neoplasms in soft tissue during childhood[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2004, 23(3): 437-440.
- [3] Cuello M, Ettenberg SA, Nan MM, et al. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 81(3): 380-390.
- [4] Hernandez A, Wang Q, Schwartz SA, et al. Sensitization of human colon cancer to trail-mediated apoptosis[J]. *J Gastrointest Surg*, 2001, 5(1): 56-65.
- [5] Vignati S, Codegoni A, Polato F, et al. Trail activity in human ovarian cancer cells: potentiation of the action of cytotoxic drugs[J]. *Eur J Cancer*, 2002, 38(1):177-183.
- [6] Yang SH, Chien CM, Lu MC, et al. Cardiotoxin III induces apoptosis in K562 cells through a mitochondrial-mediated pathway[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(7): 515-520.
- [7] Ambrina E, Alonso R, Alcalde M, et al. Calcium influx through receptor-operated channel induces mitochondria-triggered paraptotic cell death[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 14134-14145.
- [8] Movsesyan VA, Stoica BA, Yakovlev AG, et al. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: role of calpain and caspase pathways[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(10): 1121-1132.
- [9] Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, et al. C-jun and cyp32 (caspase-3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death[J]. *Pancreas*, 2003, 26(1): 65-70.
- [10] Uray IP, Davies PJ, Fesus L. Pharmacological separation of the expression of tissue transglutaminase and apoptosis after chemotherapeutic treatment of HepG2 cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(6): 1388-1394.
- [11] Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, et al. Effect of NF-kappa B, survivin, Bcl-2 and caspase-3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(1): 22-25.
- [12] 徐玉生, 陶惠民, 陈维善, 等. TRAIL与顺铂协同诱导横纹肌肉瘤细胞凋亡时Fas和cFLIP表达的改变及其意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(10): 1900-1904.