

IFN- γ 联合阿霉素或依托泊苷增强 TRAIL 对神经母细胞瘤细胞的诱导凋亡作用*

佟海侠^① 郑旭^② 王弘^③ 陆春伟^④ 王秋实^① 马良艳^①

摘要 目的:探讨半胱-天冬氨酸蛋白酶 8(Caspase 8)和死亡受体(DR)在肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导神经母细胞瘤(NB)细胞凋亡中的作用。方法:应用 RT-PCR 方法检测 γ 干扰素(IFN- γ)作用前后 NB 细胞 Caspase 8 mRNA 的表达;应用 Western blot 方法检测 Caspase 8、DR4 和 DR5 蛋白表达;应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法及流式细胞术检测 IFN- γ 、TRAIL、IFN- γ +TRAIL、Caspase 8 抑制剂+TRAIL 及 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 对 NB 细胞株生长及凋亡的影响。结果:IFN- γ 在 NB 细胞株 SKNDZ 中诱导了 Caspase 8 mRNA 及蛋白表达。SY5Y 细胞对 TRAIL 不敏感,而 IFN- γ 与 TRAIL 或阿霉素/依托泊苷联用对 SY5Y 细胞有明显诱导凋亡作用。IFN- γ +TRAIL 组 SY5Y 细胞早期凋亡率(23.09 \pm 2.35)%高于 TRAIL 组[(6.15 \pm 0.54)%(P <0.01)],但低于 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 组[(43.41 \pm 6.46)%/(38.86 \pm 7.29)%(P <0.01)]。阿霉素或依托泊苷可以诱导 NB 细胞株 DR5 蛋白表达,但未诱导 DR4 蛋白表达。IFN- γ 诱导后表达 Caspase 8 的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用仍不敏感,而阿霉素或依托泊苷处理后同时表达 DR5 的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用相对敏感。IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 组 SKNDZ 细胞早期凋亡率(11.54 \pm 2.49)%/(13.38 \pm 1.65)%高于 IFN- γ +TRAIL 组(P <0.01)。结论:IFN- γ 上调 Caspase 8 表达及化疗药阿霉素或依托泊苷诱导 DR5 表达可以恢复 NB 细胞对 TRAIL 的敏感性,Caspase 8 和 DR5 在 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡中起着十分关键的作用。

关键词 神经母细胞瘤 IFN- γ 阿霉素 依托泊苷 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.07.002

Combination of IFN γ and Etoposide or Doxorubicin Enhances Tumor Necrotic Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis of Neuroblastoma Cells

Haixia TONG¹, Xu ZHENG², Hong WANG³, Chunwei LU⁴, Qiushi WANG¹, Liangyan MA¹

Correspondence to: Haixia TONG, E-mail: tonghx2009@163.com

¹Department of Blood Transfusion, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China

²Department of Oncology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China

³Pediatric Department, Hematology Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110022, China

⁴Section of Health Testing, College of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30950021 and 81101528)

Abstract Objective: This study aims to evaluate the role of Caspase 8 and death receptor (DR) in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of neuroblastoma (NB) cell lines. **Methods:** Caspase 8 mRNA expression in NB cells before and after treatment with IFN γ was monitored through reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Caspase 8, DR5, and DR4 protein expression was monitored through Western blot analysis. The effects of IFN γ , TRAIL, IFN γ +TRAIL, Caspase 8 inhibitor+TRAIL, and IFN γ +etoposide/doxorubicin+TRAIL on the growth and apoptosis of NB cells were detected through MTT and flow cytometry. **Results:** The expression of Caspase 8 mRNA and protein was induced by IFN γ in the NB cell line SKNDZ. SY5Y cells were resistant to TRAIL. However, the combination treatment of IFN γ +TRAIL and IFN γ +etoposide/doxorubicin+TRAIL significantly induced cell apoptosis in SY5Y cells. The early stage apoptosis rate of SY5Y cells in the IFN γ +TRAIL group [(23.09 \pm 2.35)%] was significantly higher than that in the TRAIL group [(6.15 \pm 0.54)%] (P <0.01), but was significantly lower than that in the IFN γ +dox/eto+TRAIL group [(43.41 \pm 6.46)%/(38.86 \pm 7.29)%] (P <0.01). Moreover, etoposide or doxorubicin induced DR5 but not DR4 in NB cell lines. SKNDZ cells expressing Caspase 8 after treatment with IFN γ were still resistant to TRAIL but subsequently became sensitive to TRAIL after the induction of DR5 through the treatment of etoposide or doxorubicin. The early stage apoptosis rate of the IFN γ +dox/eto+TRAIL group [(11.54 \pm 2.49)%/(13.38 \pm 1.65)%] was significantly higher than that of the IFN γ +TRAIL group (P <0.01). **Conclusion:** Sensitization of NB cells to TRAIL may be mediated by the upregulation of Caspase 8 with IFN γ and DR5 with etoposide or doxorubicin. The results suggest that Caspase 8 and DR5 play key roles in TRAIL-induced apoptosis of NB cells.

Keywords Neuroblastoma; IFN- γ ; Doxorubicin; Etoposide; Apoptosis

作者单位:①中国医科大学附属盛京医院输血科(沈阳市110022);②肿瘤科;③儿科、血液中心;④中国医科大学公共卫生学院卫生检验教研室

*本文课题受国家自然科学基金(编号:30950021、81101528)资助

通信作者:佟海侠 tonghx2009@163.com

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童常见的颅外实体肿瘤,恶性度较高。尽管许多新的治疗方法如造血干细胞移植、靶向及生物免疫治疗等已被引进,但高危 NB 患者的存活率仍低于40%^[1]。因此临床治疗上不断探索新的抗肿瘤方法。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)能选择性诱导多种肿瘤细胞与转化细胞发生凋亡而对大多数正常细胞无影响,因此在肿瘤诱导凋亡治疗中具有良好的临床应用前景。大多数对化疗药耐药的NB细胞株对TRAIL的诱导凋亡作用亦耐受,因此限制了其临床应用。目前认为这种耐药与其半胱-天冬氨酸蛋白酶8(cysteine containing aspartate specific protease, Caspase 8)表达缺失有关,也与细胞表面TRAIL受体的表达和分布有关。正常情况下,TRAIL黏附于5个受体,死亡受体(death receptor, DR)DR4、DR5,诱捕受体(decoy receptor, DcR) DcR1、DcR2及护骨素(osteoprotegerin, OPG)。死亡受体的活化导致Caspase 8的激活,通过细胞内一种叫做FAS相关蛋白的细胞内媒介蛋白,活化的Caspase 8直接激活效应Caspase-Caspase3,引起NB细胞凋亡。肿瘤细胞对TRAIL耐药是其在临床抗肿瘤应用中的难题,明确这种耐药机制并制定新的治疗策略克服其耐药是TRAIL成功应用于临床肿瘤治疗的关键。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人神经母细胞瘤细胞株 CHP212、SH-SY5Y和SKNDZ由美国国立卫生研究院Carol J.Thiele教授提供。

1.1.2 主要试剂 重组人可溶性TRAIL、IFN- γ 购自英国Pepro Tech公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂、阿霉素、依托泊苷为Sigma公司产品。Caspase 8抑制剂zIETD-FMK购自英国R&D公司。动物RNA OUT购自天泽基因工程有限公司,RT-PCR试剂盒、DNA聚合酶购自大连宝生物工程有限公司。抗DR4抗体、抗DR5抗体和Annexin-V-FITC试剂盒购自美国BioVision公司。

1.2 方法

1.2.1 应用RT-PCR检测Caspase 8 mRNA的表达 收获100 μ g/L IFN- γ 处理12、24、48、72 h的SKNDZ细胞;按动物RNA OUT使用手册提取细胞总RNA,按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书合成cDNA,取cDNA 3 μ L进行PCR反应(β -actin为内参照),RT-PCR按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书进行操作。Caspase 8引物序列正义为5'-GATATTGGGGAACAACCTGGAC-3',反义为5'-CATGTCATCATCCAGTTTGCA-3',扩增产物

386 bp。内参照基因 β -actin序列正义为5'-GAGGGCGCCCCAGGCACCA-3',反义为5'-CTCCTTATTGTACGCACGATTTTC-3',扩增产物690 bp。PCR产物电泳后,用Tanon2020型凝胶扫描成像分析系统扫描PCR产物强度,以Caspase 8密度/ β -actin密度比值表示Caspase 8 mRNA的相对含量。

1.2.2 Western blot检测Caspase 8、DR4和DR5蛋白的表达 收获100 μ g/L IFN- γ 处理12、24、48 h的SKNDZ细胞及0.5 mg/L阿霉素、5 mg/L依托泊苷处理24 h后的NB细胞,提取蛋白质后,各取样品50 μ L蛋白定量,以浓度最低管为基准调节蛋白浓度后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。每孔加入样品40 μ L,恒压100V电泳至分离胶底部,转印到硝酸纤维素(NC)膜上;NC膜在一抗含Caspase 8(1:400)、DR4(1:400)、DR5(1:200)、 β -actin(1:400)溶液中4 $^{\circ}$ C浸泡过夜,然后转到1:1 000稀释的羊抗兔碱性磷酸酶标记的二抗溶液中室温浸泡2 h;加入碱性磷酸酶的底物反应,染色至条带呈现,终止染色。用Tanon-GIS-2020型凝胶图像分析系统扫描后进行灰度值分析,重复3次。

1.2.3 MTT细胞毒实验 SY5Y和SKNDZ细胞分组如下:1)TRAIL组:用正常培养液培养48 h后,再用0、50、200 μ g/L TRAIL处理24 h;2)IFN- γ +TRAIL组:用100 μ g/L IFN- γ 处理48 h后,再用0、50、200 μ g/L TRAIL处理24 h;3)IFN- γ +zIETD+TRAIL组:用100 μ g/L IFN- γ 处理48 h后,先加Caspase 8抑制剂zIETD-FMK(5 μ mol/L)预处理1 h再加不同浓度TRAIL继续培养24 h;4)IFN- γ +阿霉素或依托泊苷+TRAIL组:用100 μ g/L IFN- γ 处理48 h后,加0.5 mg/L阿霉素或5 mg/L依托泊苷处理24 h,再加0、50、200 μ g/L TRAIL处理24 h。各实验均设空白对照组(不加细胞,只加DMSO)和对照组。按实验步骤结束加药后,每孔加入5 g/L的MTT溶液20 μ L,37 $^{\circ}$ C培养4 h后,吸去上清,每孔加150 μ L DMSO,震荡15 min后于1 h内在酶标仪测其波长570 nm吸光度(A值)。各组细胞存活率(%)为:[(实验组吸光度-空白组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度)] \times 100%。

1.2.4 细胞凋亡检测 SY5Y和SKNDZ细胞分组如下:对照组,TRAIL(200 μ g/L)组,IFN- γ (100 μ g/L)+TRAIL组及IFN- γ +化疗药(0.5 mg/L阿霉素或5 mg/L依托泊苷)+TRAIL组。加药处理结束后收获细胞,PBS洗2遍后,用250 μ L结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL;取100 μ L细胞悬液于流式管中,加5 μ L Annexin-V和10 μ L PI,室温下闭光染色15 min后,再加400 μ L PBS,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。每组实验重复3次,取3次实验的

平均值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN- γ 对 NB 细胞 Caspase 8 表达的影响

曾报道 CHP212 细胞表达 Caspase 8 mRNA 和蛋白, SY5Y 细胞不表达 Caspase 8, 而 IFN- γ 处理后 CHP212 和 SY5Y 细胞 Caspase 8 表达均增加^[4]。本研究发现, SKNDZ 细胞不表达 Caspase 8 mRNA 和蛋白, 100 μ g/L IFN- γ 作用 12 h 开始检测到 Caspase 8 mRNA 和蛋白的表达, 并且随 IFN- γ 作用时间的延长而增强, 见图 1、2。

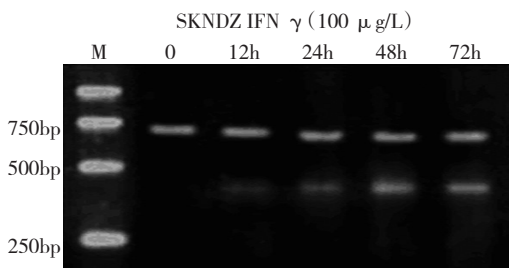


图1 100 μ g/L IFN- γ 对 SKNDZ 细胞 Caspase 8 mRNA 表达的调节作用
Figure 1 Caspase 8 mRNA expression regulated by 100 μ g/L IFN γ in SKNDZ cells

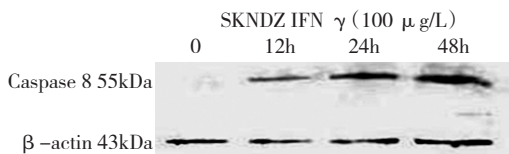


图2 100 μ g/L IFN- γ 对 SKNDZ 细胞 Caspase 8 蛋白表达的调节作用
Figure 2 Caspase 8 protein expression regulated by 100 μ g/L IFN γ in SKNDZ cells

2.2 阿霉素和依托泊苷诱导 NB 细胞株 DR5 蛋白的表达

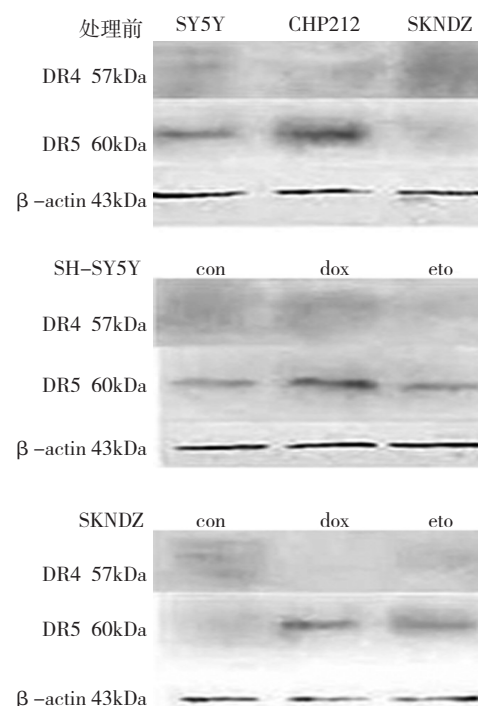
3 种细胞株均未检测到 DR4 蛋白表达, SY5Y 和 SKNDZ 细胞在阿霉素或依托泊苷处理 24 h 后仍未检测到 DR4 蛋白表达。CHP212 和 SY5Y 细胞中可以检测到 DR5 蛋白表达; SKNDZ 细胞不表达 DR5, 但在阿霉素、依托泊苷处理 24h 后检测到 DR5 蛋白表达。SY5Y 细胞经依托泊苷处理 24h 后 DR5 蛋白表达水平未见明显增加; 但阿霉素增强了 SY5Y 细胞 DR5 蛋白表达, 见图 3。

2.3 IFN- γ 、TRAIL 及阿霉素或依托泊苷协同作用诱导 NB 细胞凋亡

本研究发现 SY5Y 细胞对 TRAIL 抵抗, 表现为不同浓度 TRAIL 组细胞存活率之间比较无显著性差

异; 而 IFN- γ +TRAIL 组的 SY5Y 细胞存活率与单独用 IFN- γ 或 TRAIL 组比较, 显著降低 ($P < 0.01$)。Caspase 8 抑制剂组细胞存活率高于 IFN- γ +TRAIL 组 ($P < 0.01$), 表明 Caspase 8 抑制剂 zIETD-FMK 可明显抑制 TRAIL 对表达 Caspase 8 的 NB 细胞的杀伤作用。此外, 与 IFN- γ +TRAIL 及 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷组比较, 联合应用 IFN- γ 、TRAIL 和阿霉素或依托泊苷进一步增强了对 SY5Y 细胞的杀伤效应 ($P < 0.01$, 图 4)。IFN- γ +TRAIL 组 SY5Y 细胞早期凋亡率 (23.09 ± 2.35)% 高于 TRAIL 组 (6.15 ± 0.54)% ($P < 0.01$), 但低于 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 组 [$(43.41 \pm 6.46)\%$ / $(38.86 \pm 7.29)\%$, $P < 0.01$]。

SKNDZ 细胞不表达 Caspase 8 和 DR5, 因此对 TRAIL 的诱导凋亡作用不敏感, 并且观察到经 IFN- γ 处理恢复 Caspase 8 表达的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 仍不敏感。但是在 DR5 和 Caspase 8 表达均恢复后, SKNDZ 对 TRAIL 的诱导凋亡作用相对敏感 (图 4); 表现在 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 组和 IFN- γ +TRAIL 组细胞存活率之间比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$)。IFN- γ +TRAIL 组与 TRAIL 组 SKNDZ 细胞早期凋亡率比较, 无显著性差异 [$(4.27 \pm 1.95)\%$ vs $(5.06 \pm 0.56)\%$, $P > 0.05$]; 但 IFN- γ +阿霉素/依托泊苷+TRAIL 组 SKNDZ 细胞早期凋亡率 [$(11.54 \pm 2.49)\%$ / $(13.38 \pm 1.65)\%$] 高于 IFN- γ +TRAIL 组 ($P < 0.01$)。



con: 对照组; dox: 阿霉素处理组; eto: 依托泊苷处理组
图3 化疗药处理前后 NB 细胞 DR4 和 DR5 蛋白表达

Figure 3 DR4 and DR5 protein expression in NB cells before and after treatment with chemotherapeutic agents

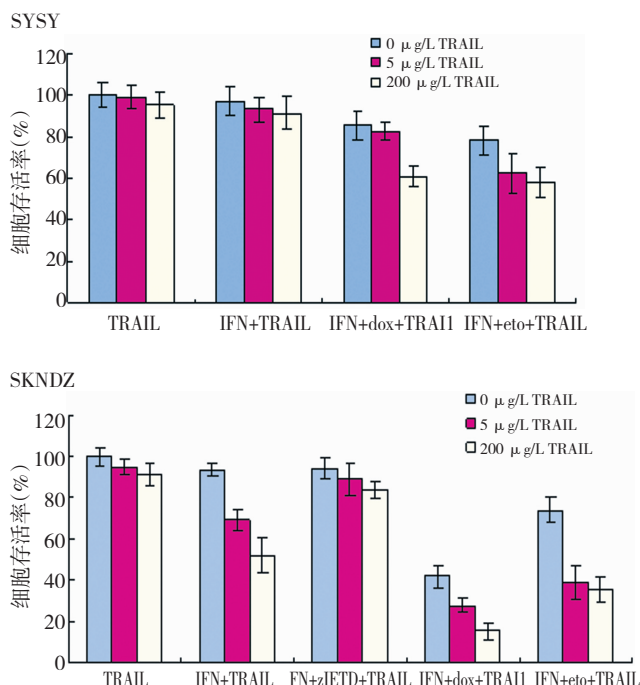


图4 TRAIL、IFN- γ 与化疗药联用对SY5Y和SKNDZ细胞的生长抑制作用

Figure 4 Killing effects of TRAIL combined with IFN γ and chemotherapeutic agents on SY5Y cells and SKNDZ cells

3 讨论

目前TRAIL在肿瘤治疗中的应用主要有基因治疗、重组TRAIL蛋白或与其他药物相结合。已有报道TRAIL与干扰素联合有协同诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[2-3]。本研究进一步探讨了TRAIL诱导NB细胞凋亡与Caspase 8及死亡受体表达之间的关系。曾报道表达Caspase 8的NB细胞株CHP212细胞对TRAIL的诱导凋亡作用敏感,具有时间和剂量依赖性^[4]。本实验证实不表达Caspase 8的SY5Y和SKNDZ细胞对TRAIL耐药。引起NB细胞Caspase 8表达缺失的主要原因是Caspase 8基因启动子区域的超甲基化。去甲基药可以恢复NB细胞Caspase 8表达及对TRAIL的敏感性,但有一定的毒副作用。用相对低浓度的去甲基药和IFN- γ 联合作用于NB细胞,既可恢复Caspase 8表达,使耐药的NB细胞对TRAIL诱导凋亡作用敏感,又降低了去甲基药的毒副作用^[5]。本实验结果发现,加入Caspase 8抑制剂zIEDT-FMK后TRAIL对表达Caspase 8的SY5Y细胞杀伤效应显著降低,证实Caspase 8参与了TRAIL诱导NB细胞凋亡的调控。曾报道IFN- γ 能在NB细胞株中诱导Caspase 8蛋白表达,使其对死亡受体介导的凋亡敏感;同时,IFN- γ 预处理后的NB细胞对阿霉素的诱导凋亡作用更加敏感^[4,6]。

IFN- γ 和TRAIL联合处理对SY5Y细胞有明显的细胞毒作用;然而,当IFN- γ 、TRAIL和阿霉素或依托泊苷联用时对其有进一步增强的协同杀伤作用。经IFN- γ 处理恢复Caspase 8表达的SKNDZ细胞对TRAIL仍不敏感;但在阿霉素或依托泊苷进一步恢复DR5表达后对TRAIL的诱导凋亡作用相对敏感。考虑到无论凋亡信号在细胞内如何传递,TRAIL要发挥诱导细胞凋亡作用必须首先与死亡受体结合,即细胞表面TRAIL受体表达水平及功能对TRAIL的介导凋亡至关重要。经IFN- γ 处理恢复Caspase 8表达的SKNDZ细胞对TRAIL仍不敏感可能是因为死亡受体表达缺失。据报道蛋白酶抑制剂MG132、香胶甾酮及二甲氧基黄酮可以通过上调TRAIL死亡受体的表达水平而增强TRAIL对肿瘤细胞的诱导凋亡作用^[7-9]。Day等^[10]研究发现依托泊苷可以抑制NB细胞的增殖并能促进Caspase依赖性的凋亡。因为CHP212细胞对TRAIL非常敏感,仅用阿霉素和依托泊苷处理SY5Y和SKNDZ细胞,进一步研究诱导TRAIL死亡受体表达是否可以恢复NB细胞对TRAIL的敏感性。本实验观察到死亡受体DR4在3种细胞株中均无表达,并且在阿霉素或依托泊苷处理后仍然未见表达。然而,当阿霉素或依托泊苷恢复DR5表达后,表达Caspase 8的SKNDZ细胞对TRAIL相对敏感。由此可见,IFN- γ 和阿霉素或依托泊苷可以通过上调Caspase 8和DR5的表达而逆转SKNDZ细胞对TRAIL的耐药。据报道,在正常生理条件下,DR5与TRAIL的亲和力高于DR4;因此,DR5在传导死亡信号和诱导肿瘤细胞凋亡方面可能起着更重要的作用。本研究观察到,NB细胞株CHP212和SY5Y表达DR5但不表达DR4,而阿霉素或依托泊苷可以诱导DR5表达,从而恢复SKNDZ细胞对TRAIL的敏感性。目前在患者中应用DR5基因治疗仍不可行,故必须采用其他方法恢复DR5表达。DR5表达受肿瘤抑制蛋白P53调节,目前应用的抗癌药大多是能激活P53的DNA损伤因子。因此,应用激活P53的化疗药物可能增强DR5的表达,使NB细胞对TRAIL与IFN- γ 的联合作用敏感。

TRAIL通路中存在着多种反应因子提示该途径在肿瘤发生和逃逸治疗方面起着重要作用。本研究显示,DR5和Caspase 8在TRAIL诱导NB细胞凋亡中起着关键作用,联合应用IFN- γ 、TRAIL和阿霉素或依托泊苷对化疗耐药的NB的临床治疗有重要意义。

参考文献

- 1 Cohn SL, Pearson AD, London WB, et al. The International Neu-