

· 基础研究 ·

白藜芦醇促进膀胱癌细胞对 TRAIL 凋亡诱导作用的研究

张 栋, 杨小杰, 雒启东, 付德来, 李洪亮, 张 鹏, 种 铁

(西安交通大学第二附属医院泌尿外科, 陕西西安 710004)

Resveratrol sensitizes bladder cancer cells to TRAIL-induced apoptosis

ZHANG Dong, YANG Xiao-jie, LUO Qi-dong, FU De-lai, LI Hong-liang, ZHANG Peng, CHONG Tie

(Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effects of resveratrol on bladder cancer cells, the interactive role with TRAIL on the apoptosis of bladder cancer cells, and the possible mechanisms. Methods The effects of resveratrol or/and TRAIL on the growth of 5637 and T24 cells were detected with MTT. The apoptosis and mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) after treatment of resveratrol or/and TRAIL were determined with flow cytometry. Death receptor (DR) 4 and 5, and apoptosis associated proteins were detected with Western blot. Results Resveratrol inhibited cell viability in a dose and time-dependent manner. TRAIL alone failed to inhibit cell viability in 5637 and T24 cells, whereas it could inhibit cell proliferation in the presence of resveratrol. Resveratrol alone was able to induce apoptosis in both cells, whereas TRAIL failed to induce apoptosis. Notably, combination of resveratrol and TRAIL resulted in significant apoptosis in tumor cells. Furthermore, a significant loss of $\Delta\Psi_m$ was obtained in resveratrol alone and combination of resveratrol and TRAIL treated cells, and TRAIL alone failed to trigger $\Delta\Psi_m$ collapse. Resveratrol upregulated the expressions of DR4 and DR5 while downregulated the expressions of Bcl-2 and survivin. Conclusion Resveratrol inhibits the proliferation of 5637 and T24 cells in a time and dose-dependent manner and induces cell apoptosis. In addition, resveratrol can sensitize bladder cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. The capability of resveratrol to inhibit tumor growth and enhance the therapeutic potential of TRAIL suggests that resveratrol alone or in combination with TRAIL can be used for the management of bladder cancer.

KEY WORDS: resveratrol; TRAIL; bladder cancer; apoptosis

摘要:目的 探讨白藜芦醇对膀胱癌细胞的作用及其与 TRAIL 联合对膀胱癌细胞的凋亡诱导作用及其可能的机制。方法 MTT 法检测白藜芦醇或/和 TRAIL 对膀胱癌细胞 5637 和 T24 体外生长能力的影响。流式细胞术测定白藜芦醇和/或 TRAIL 对细胞凋亡和线粒体跨膜电位的影响。Western blot 检测白藜芦醇对死亡受体(DR)4、5 与细胞凋亡相关蛋白表达水平的变化。结果 MTT 证实白藜芦醇可抑制膀胱癌细胞体外生长能力,且呈剂量与时间依赖性。单独应用 TRAIL 未能抑制膀胱癌细胞的生长,但与白藜芦醇联合应用时可显著抑制细胞的增殖速度。白藜芦醇能够诱导膀胱癌细胞发生凋亡,而 TRAIL 则不能诱导细胞凋亡,但联合应用白藜芦醇和 TRAIL 可诱导膀胱癌细胞发生显著的凋亡。此外,在白藜芦醇或联合应用白藜芦醇与 TRAIL 可诱导肿瘤细胞丢失线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$),而单独应用 TRAIL 则未能诱导线粒体膜电位的丢失。Western blot 结果表明,白藜芦醇可上调 DR4 和 DR5 的表达,并下调 Bcl-2 与 survivin 的表达。结论 白藜芦醇可抑制膀胱癌 5637 和 T24 细胞增殖并诱导细胞凋亡。此外,白藜芦醇可以提高膀胱癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡作用。单独应用白藜芦醇或与 TRAIL 联合应用可能成为临床膀胱癌治疗的新策略。

关键词:白藜芦醇;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL);膀胱癌;凋亡

中图分类号:R737.14

文献标志码:A

DOI:10.3969/j.issn.1009-8291.2019.02.013

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族的新成员,通过与死亡受体(death receptor, DR)-4 与-5 结合选择性诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无细胞毒作用,受到学者的广泛重视^[1-2]。

然而,近年的研究发现多数肿瘤细胞可耐受 TRAIL 的凋亡诱导作用,DR 的表达变化、细胞内凋亡因子与抗凋亡因子可能参与了这一过程^[3-4]。白藜芦醇(resveratrol, Res)是广泛存在于葡萄、花生和多种药用植物中的一种多酚类化合物,其具有抗炎、抗氧化、保护心血管及抗肿瘤等多种生物学作用^[5],但其在膀胱癌中的作用鲜见报道。本研究通过观察单独应用 Res 或 Res 联合 TRAIL 对膀胱癌细胞 5637 与 T24 的增殖与凋亡诱导作用,探讨 Res 对 TRAIL 诱导膀胱

收稿日期:2018-03-18

修回日期:2018-10-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81101937)

通信作者:张鹏,副主任医师. E-mail:zpbill@aliyun.com

作者简介:张栋(1980-),男(汉族),博士学位,主治医师。研究方向:泌尿系肿瘤. E-mail:timbercham@126.com

膀胱癌细胞凋亡的影响及其机制,为膀胱癌的治疗提供新的思路与治疗策略。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株 5637 与 T24 细胞株购自上海中科院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 主要试剂 Res、噻唑蓝 (MTT)、Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒均购于美国 Sigma-Aldrich 公司, RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, DR4、DR5、Bcl-2 与 survivin 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司, ECL 试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37.5℃、5% CO₂ 的培养箱内培养以 1.25 g/L 胰酶和 0.2 g/L EDTA 的混合液消化传代。

1.2.2 细胞活力测定 取对数生长期膀胱癌 5637 与 T24 细胞,以 10、20、40、80 μmol/L Res,加/不加 TRAIL(20 ng/mL) 分别作用 24 h,每组设 3 个复孔。加入 5 mg/mL MTT 20 μL,继续培养 4 h 后小心吸去上清, DMSO 溶解结晶物,490 nm 处用酶标仪检测吸光度值(A),计算细胞活力抑制率,计算公式:抑

制率=(A 对照组-A 药物组)/A 对照组×100%。

1.2.3 流式细胞术 取对数期细胞,40 μmol/L Res,加/不加 TRAIL(20 ng/mL)作用 24 h 后,常规消化、离心收获细胞并用 PBS 清洗。按照凋亡试剂盒说明用含 Annexin V-FITC 和 PI 染色、线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)测定用 JC-1 染色后采用流式细胞仪分析,测定细胞凋亡与 $\Delta\Psi_m$ 变化。

1.2.4 Western blot 5637 与 T24 细胞按 1×10^6 /孔接种至 6 孔板。30 μmol/L Res 培养 24 h 后,冰 PBS 小心洗涤后,蛋白提取液提取总蛋白。12.5% SDS-PAGE 电泳分离,电转法转至 PVDF 膜,用 DR4、DR5、Bcl-2、survivin 抗体 4℃ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 0.5 h,蛋白条带 ECL 试剂盒显色发光。

1.3 统计学方法 实验数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 14.0 分析软件处理,t 检验分析组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Res 单独应用或联合 TRAIL 可抑制膀胱癌细胞体外增殖能力 单独应用 Res 处理 24 h 后,膀胱癌细胞 5637 与 T24 的体外增殖能力受到抑制,且呈剂量依赖性。联合应用 TRAIL 后,膀胱癌细胞体外增殖能力抑制更加显著(图 1)。

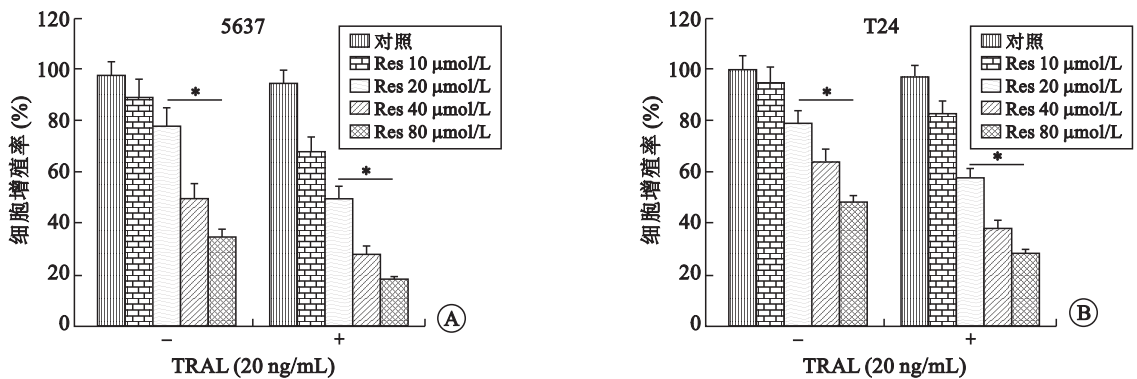


图 1 白藜芦醇加/不加 TRAIL 对膀胱癌细胞增殖能力的影响(* $P < 0.05$)

2.2 Res 单独应用或联合 TRAIL 可诱导膀胱癌细胞发生凋亡 应用流式细胞术检测单独应用 Res 或联合 TRAIL 对膀胱癌细胞的凋亡诱导作用。结果表明,40 μmol/L Res 即可诱导膀胱癌细胞 5637 与 T24 发生凋亡,但单独应用 TRAIL 并不能诱导膀胱癌细胞凋亡,Res 联合 TRAIL 应用后膀胱癌细胞凋亡显著增加(图 2),提示 Res 可恢复 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的能力。

2.3 Res 单独应用或联合 TRAIL 可诱导膀胱癌细胞发生 $\Delta\Psi_m$ 丢失 我们进而用流式细胞术检测单

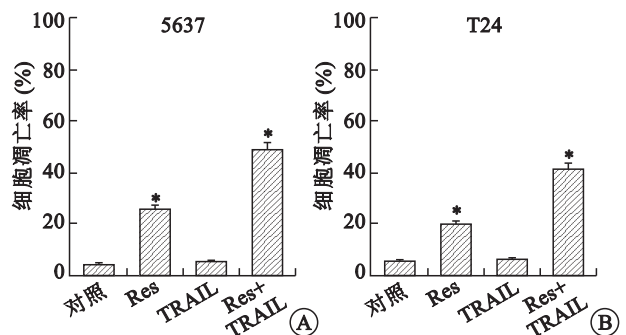


图 2 白藜芦醇对膀胱癌细胞凋亡的影响(* $P < 0.05$)

独应用 Res 或联合 TRAIL 对膀胱癌细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响。结果发现,40 $\mu\text{mol/L}$ Res 即可诱导有效膀胱癌细胞 5637 与 T24 发生 $\Delta\Psi_m$ 的丢失,但单独应用 TRAIL 并不能诱导膀胱癌细胞发生 $\Delta\Psi_m$ 的丢失,Res 联合 TRAIL 应用后膀胱癌细胞 $\Delta\Psi_m$ 的丢失显著增加(图 3)。

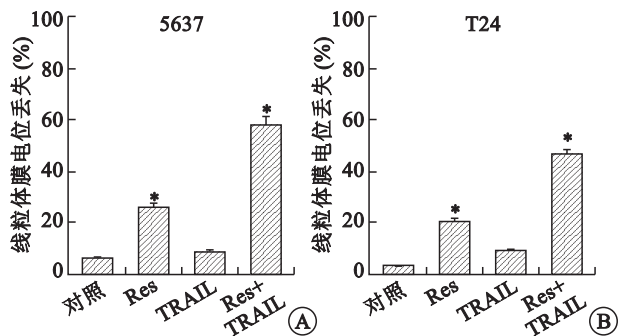


图 3 白藜芦醇对膀胱癌细胞线粒体膜电位的影响(* $P < 0.05$)

2.4 Res 可上调膀胱癌细胞 DR4、DR5、Bcl-2 与 survivin 的表达 20 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 24 h 后,膀胱癌细胞中的 DR4 与 DR5 的表达显著上调,而 Bcl-2 与 survivin 的表达显著降低(图 4)。

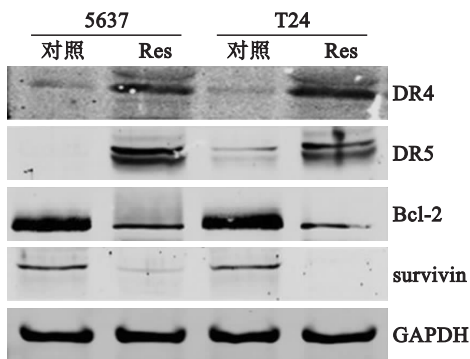


图 4 Western blot 检测白藜芦醇对膀胱癌细胞 DR4、DR5、Bcl-2 与 survivin 表达的影响

3 讨论

TRAIL 是 II 型跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子超家族。TRAIL 通过与其受体 DR4 与 DR5 结合形成死亡受体复合物,激活 caspase 8,导致线粒体中细胞色素 c 释放,诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。TRAIL 还可以与死亡相关抑制性受体 DcR1 与 DcR2 结合,但其缺乏完整的胞内段,阻止了促凋亡信号的传导,故可拮抗其凋亡诱导作用^[7]。多数肿瘤细胞表达 DR4、DR5,TRAIL 可诱导其发生凋亡;正常细胞除表达 DR4 与 DR5 外还表达 DcR1 与 DcR2,从而免受 TRAIL 诱导的凋亡。因此 TRAIL 可特异性诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无细胞毒作用,受到广大学者的关注。但越来越多的研究表明,包括膀胱肿瘤在

内的多数肿瘤可耐受 TRAIL 诱导的凋亡,其机制目前尚不清楚。

Res 是一种多酚类化合物,广泛存在于蓼科植物虎杖的根茎与根,豆科植物花生的种子,葡萄科植物葡萄果实的皮与籽等。Res 早在 1924 年便被发现,直到近年才被重视并广泛研究。目前的研究表明 Res 具有抗炎、抗氧化、降低血小板凝集、抑制动脉粥样硬化和血栓形成及抗肿瘤等多种生物学功能,其中抗肿瘤作用最为引人关注^[5,8]。Res 对肝癌、乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞具有显著的抑制作用,且其作用表现为对肿瘤的发生、增殖与进展均有抑制作用^[9-11]。本研究发现,单独应用 Res 即可抑制膀胱癌细胞 5637 与 T24 的体外增殖能力,且增殖抑制呈浓度依赖性。值得注意的是,单独应用 40 $\mu\text{mol/L}$ Res 即可有效的诱导膀胱癌细胞发生凋亡,而单独应用 TRAIL 并不能诱导膀胱癌细胞发生凋亡,而 Res 与 TRAIL 联合应用可有效诱导膀胱癌细胞凋亡,且较单独应用 Res 其凋亡诱导作用显著增强。提示 Res 不仅可有效的抑制膀胱癌细胞体外增殖能力,还可以恢复 TRAIL 对膀胱癌细胞的凋亡诱导作用。

尽管目前对肿瘤细胞耐受 TRAIL 凋亡诱导作用的机制仍不是十分清楚,但有证据表明,DR 的表达下调、抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的表达变化参与了这一过程^[3-4,12]。LI 等^[13]通过对膀胱癌标本的检测,发现高表达 DR4 和/或 DR5 的患者术后复发率明显降低,DR4 与 DR5 可作为膀胱癌预后的独立指标。而我们的研究则发现,40 $\mu\text{mol/L}$ Res 诱导 24 h 后即可上调膀胱癌细胞中 DR4 与 DR5 的表达水平。同时,我们的结果还表明 Res 还可以抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 与 survivin 的表达。因此我们推测,Res 不仅可以通过上调 DR4 与 DR5 的表达恢复膀胱癌细胞对 TRAIL 的凋亡诱导作用,还可以下调抗凋亡蛋白直接促进膀胱癌细胞的凋亡。

综上,我们的结果证实 Res 可抑制膀胱癌 5637 和 T24 细胞增殖并诱导细胞凋亡。此外,Res 可以恢复膀胱癌细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡作用。单独应用白藜芦醇或与 TRAIL 联合应用可能成为临床膀胱癌治疗的新策略。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] STUCKEY DW, SHAH K. TRAIL on trial: preclinical advances

- in cancer therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(11):685-694.
- [3] LEAHOMSMCHI S, MOLINSKY J, KLANOVA M, et al. Multi-level disruption of the extrinsic apoptotic pathway mediates resistance of leukemia cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)[J]. *Neoplasma*, 2013, 60(2):223-231.
- [4] GUIHO R, BITEAU K, HEYMAN D, et al. TRAIL-based therapy in pediatric bone tumors: how to overcome resistance[J]. *Future Oncol*, 2015, 11(3):535-542.
- [5] HSIEH TC, WU JM. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule[J]. *Biofactors*, 2010, 36(5):360-369.
- [6] OIKONOMOU E, PINTZAS A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis[J]. *Biofactors*, 2013, 39(4):343-354.
- [7] ZHUANG H, JIANG W, ZHANG X, et al. Suppression of HSP70 expression sensitizes NSCLC cell lines to TRAIL-induced apoptosis by upregulating DR4 and DR5 and downregulating c-FLIP-L expressions[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(2):219-235.
- [8] SINGH CK, NDIAYE MA, AHMAD N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(6):1178-1185.
- [9] XU Q, ZONG L, CHEN X, et al. Resveratrol in the treatment of pancreatic cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2015, 1348(1):10-19.
- [10] SPROUSE AA, HERBERT BS. Resveratrol augments paclitaxel treatment in MDA-MB-231 and paclitaxel-resistant MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(10):5363-5374.
- [11] LIU YZ, WU K, HUANG J, et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1):104-112.
- [12] WANG F, LIN J, XU R. The molecular mechanisms of TRAIL resistance in cancer cells: help in designing new drugs[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(42):6714-6722.
- [13] LI Y, JIN X, LI J, et al. Expression of TRAIL, DR4, and DR5 in bladder cancer: correlation with response to adjuvant therapy and implications of prognosis[J]. *Urology*, 2012, 79(4):968. e7-e15.

(编辑 何宏灵)

(上接第 131 页)

- [5] 阿布力孜·司马义, 艾尼瓦尔·玉苏甫, 王晨玉, 等. B超引导下超微通道经皮肾镜取石术治疗小儿肾结石[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2016, 37(4):262-264.
- [6] WOODSIDE JR, STEVENSGF, STARK GL, et al. Percutaneous stone removal in children[J]. *J Urol*, 1985, 134(6):1166-1167.
- [7] DAĞGÜLLI M, UTANĞAÇ MM, DEDE O, et al. Micro-percutaneous nephrolithotomy in the treatment of pediatric nephrolithiasis: A single-center experience[J]. *J Pediatr Surg*, 2016, 51(4):626-629.
- [8] BHAGERIA A, NAYAK B, SETH A, et al. Paediatric percutaneous nephrolithotomy: Single-centre 10-year experience[J]. *J Pediatr Urol*, 2013, 9(4):472-475.
- [9] KARATAG T, TEPELER A, SILAY MS, et al. A Comparison of 2 percutaneous nephrolithotomy techniques for the treatment of pediatric kidney stones of sizes 10~20 mm: microperc vs mini-perc[J]. *Urology*, 2015, 85(5):1016-1018.
- [10] SONG G, GUO X, NIU G, et al. Advantages of tubeless minipercutaneous nephrolithotomy in the treatment of preschool children under 3 years old[J]. *J Pediatr Surg*, 2015, 50(4):655-658.
- [11] HOLMAN E, SALAH MA, TOTH C. Comparison of 150 simultaneous bilateral and 300 unilateral percutaneous nephrolithotomies[J]. *J Endourol*, 2002, 16(1):33-36.
- [12] SALAH MA, TÁLLAI B, HOLMAN E, et al. Simultaneous bilateral percutaneous nephrolithotomy in children[J]. *BJU Int*, 2005, 95(1):137-139.
- [13] 李建兴, 肖博. 儿童肾结石的腔内微创治疗策略(附光盘)[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2015, 20(12):841-843.
- [14] 王录文, 何士军, 朱清波, 等. B超引导微造瘘经皮肾镜碎石术治疗婴幼儿肾结石的临床观察[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2014, 19(7):433-435.

(编辑 王 玮)