

sTRAIL 及受体 TRAIL-R1 在 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞中的作用及意义

赵 跃 陈 炯 杨仁保 陈龙江 胡立威 马小磊 徐 弘

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)与其受体 TRAIL-R1 在 DNT 细胞杀伤胰腺癌细胞中的作用及意义。方法 采用抗体吸附法培养外周血中分离的 DNT 细胞,ELISA 法检测其细胞培养上清液中的 sTRAIL 水平。采用 qPCR、Western blot 法检测 TRAIL-R1 在 5 株胰腺癌细胞株中的表达,免疫组织化学法检测 48 例胰腺癌组织标本中 TRAIL-R1 的表达情况,分析其与病理参数之间的关系。结果 DNT 细胞数目逐渐增多,其培养液中 sTRAIL 与对照组相比浓度明显升高($t = 17.24$, $P < 0.05$)。qPCR 检测受体 TRAIL-R1 在 5 株胰腺癌细胞中均有表达,

Western blot 法检测 TRAIL-R1 受体表达发现在胰腺癌细胞系 CFPAC-1 中表达高,在 MIA PaCa-2 和 panc-1 中表达较高,BXPC-3 中表达较低,在 Capan-1 细胞系中不表达。TRAIL-R1 在胰腺癌组的阳性表达率及染色强度低于相应的癌旁组织($\chi^2 = 7.43$, 12.48 , $P < 0.05$);TRAIL-R1 的表达与染色强度有关($\chi^2 = 12.48$, $P < 0.05$)。结论 外周血来源的 DNT 细胞可分泌 sTRAIL,sTRAIL 与胰腺癌细胞和组织所表达的受体 TRAIL-R1 结合诱导细胞凋亡,可能是 DNT 细胞抑制胰腺癌细胞增殖的机制之一。

关键词 胰腺癌;DNT 细胞;TRAIL-R1

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1613-05

2014-08-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81071985);安徽省国际科技合作项目(编号:10080703038)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院普通外科,合肥 230001

作者简介:赵 跃,男,硕士研究生;

陈 炯,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:ch_jiong@126.com

胰腺癌是一种高度恶性且预后极差的肿瘤,患者的 5 年生存率不足 5%^[1],早期即可转移,目前没有有效的治疗方法,因此亟需寻找更为有效的胰腺癌治疗方法。近来,一类具有独特免疫调节功能的双阴性 T (double negative T,DNT) 细胞在多种疾病

Effects of acute hypobaric hypoxia on learning memory behaviors and the level of acetylcholine, expression of phosphorylated tau protein in hippocampus of mice

Zhong Ling, Song Yongbin, Xu Jianchun, et al

(Dept of Neurology, Urumqi General Hospital of Lanzhou Command, PLA, Urumqi 830000)

Abstract Objective To examine the effects of acute hypobaric hypoxia on the capabilities of learning and memory, the level of acetylcholine and the expression of P-tau in hippocampus of mice. **Methods** The acute hypobaric hypoxia environment were imitated by putting the mice in a hypobaric chamber at altitude of 6 000 meters for 8 hours. Morris water maze test to detect the capabilities of learning and memory of mice. The level of ACh and the activity of ChAT in hippocampus were examined by colorimetric method and the expression P-tau and T-tau were examined by immunohistochemistry. **Results** The mean escape latency of mice in the hypobaric hypoxia group were longer than the normobaric normoxia group ($P < 0.01$), and the target quadrant residence time were decreased ($P < 0.05$). Compared with the normobaric normoxia group, level of ACh and the activity of ChAT in hippocampus of mice in the hypobaric hypoxia group were all reduced ($P < 0.05$ & $P < 0.01$), otherwise, the expression of P-tau in hippocampus of mice were increased. **Conclusion** Acute hypobaric hypoxia environment can decrease the abilities of learning and memory of mice, and these changes might be related with the reduction of the level of ACh and the expression of P-tau in hippocampus of mice.

Key words hypobaric hypoxia; learning and memory; hippocampus; acetylcholine; phosphorylated tau protein

中发挥重要作用,特别是其抗肿瘤效应已成为人们研究的热点。本课题组前期研究^[2]显示 DNT 细胞在体外及裸鼠模型中均可以杀伤胰腺癌细胞,但其杀伤机制尚不清楚。有研究^[3-4]报道一些髓系细胞可分泌可溶性的肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, sTRAIL),选择性诱导肿瘤细胞凋亡。该研究主要通过检测 DNT 细胞是否分泌 sTRAIL 并且观察其受体 TRAIL-R1 在胰腺癌细胞株及组织中的表达,为验证 TRAIL 是否参与 DNT 细胞杀伤胰腺癌细胞的过程提供依据,从而初步阐明 DNT 细胞的杀伤机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株和标本 人胰腺癌细胞 MIA PaCa-2、panc-1、CFPAC-1、BXPc-3(上海细胞库),Capan-1 细胞(上海基凯公司)。胰腺癌组织及相应距离癌组织 >1 cm 的癌旁石蜡标本各 48 例,取自 2009 年 2 月~2012 年 3 月安徽医科大学附属医院普通外科收治手术后经病理证实为胰腺癌的标本。其中男 29 例,女 19 例,年龄 23~80(59.24±15.72)岁,所有患者术前均未经过放化疗治疗。人体外周血标本取自近期无感染、未服用药物、无免疫性疾病的健康人群(本实验的 48 例病例的病理参数均按照 UICC(2002)标准^[5]进行分级)。

1.2 主要试剂 10% 胎牛血清(美国 Hyclone 公司)。抗人 T 淋巴细胞表面 CD3 (OKT3)抗体(美国 eBioscience 公司);人外周血 CD4⁺、CD8⁺ 去除液(加拿大 Stemcell Technologies 公司)。sTRAIL ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司);兔抗人 TRAIL-R1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)。蛋白提取试剂盒(中国 Keygen 公司)。逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司);实时定量 PCR 试剂盒(日本 Takara 公司),TRIzol(美国 Invitrogen 公司),引物由上海基凯公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 DNT 细胞的分离与培养:采用国际最新应用的抗体吸附法^[6-7]分离外周血中的 DNT 细胞进行体外培养。将 CD4⁺、CD8⁺ 去除液加入肝素化的健康人 10 ml 外周血中,室温孵育 20 min 后离心,吸取梯度中薄雾层细胞洗涤后分装到 OKT3 抗体包被的 24 孔培养板中,用 2 ml 含人重组细胞因子白介素-2(interleukin-2, IL-2)、白介素-4(interleukin-4, IL-4)的 10% 胎牛血清的 RPMI 1640

培养液,37℃、5% CO₂ 恒温培养。3 d 后换液,7 d 移至 6 孔板培养,12~14 d 收获细胞。胰腺癌细胞培养:5 株细胞培养于 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 恒温箱中培养 2~3 d 胰酶消化传代。

1.3.2 ELISA 法检测 DNT 细胞培养上清液中 sTRAIL 水平 取过夜培养 DNT 细胞的培养液为实验组,取过夜未培养 DNT 细胞的培养液为对照组,分别离心后取上清液各 100 μl 进行检测。按照 ELISA 试剂盒说明书依次进行操作,于波长 450 nm 处检测各孔的吸光度(OD 值),计算实验组与对照组 sTRAIL 的浓度。

1.3.3 qPCR 筛查 TRAIL-R1 mRNA 在细胞株中的表达 收集对数生长期的 5 株胰腺癌细胞。按照 TRIzol 说明书提取细胞总 RNA,使用逆转录试剂盒合成 cDNA。根据 qPCR 试剂盒说明书进行操作。反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 45 个循环最终延伸 72℃10 min。实验重复 3 次。利用 2^{-ΔΔCt}法对其进行计算分析(2^{-ΔΔCt}法以管家基因 GAPDH 为参照基因^[8],以 BXPc-3 样本数据为校准样本,其他细胞株 Ct 值与之相比较,相对分析 mRNA 表达水平),其中 TRAIL-R1 上游引物:5'-CTGTGCTGATTGTCTGTTGTTGC-3',下游引物:5'-CAGACACCTGGCGGATTGA-3',长度为 132 bp;GAPDH 上游引物:5'-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3',下游引物:5'-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3',长度为 121 bp。

1.3.4 Western blot 法检测 TRAIL-R1 蛋白表达 分别取上述对数生长期的 5 株胰腺癌细胞至裂解液中提取总蛋白及测定其浓度。将各样品充分变性后,经 SDS-PAGE 电泳,聚偏乙烯膜转膜、脱脂奶粉封闭后加入稀释的目的蛋白和内参蛋白的一抗(1:500),室温孵育 2 h,充分洗涤;加入 1:10 000 的二抗,室温孵育 1.5 h;洗涤、显色、曝光、显影、定影后观察。

1.3.5 免疫组化 5 μm 厚连续切片,脱蜡,微波修复抗原后滴加 3% H₂O₂ 和山羊血清,封闭非特异性蛋白,滴加 1:50 一抗 4℃过夜,随后加入二抗,光学显微镜下滴加适量的 DAB 溶液,后苏木精复染;酒精脱水、甲醛透明并封片。采用半定量法评估结果。在低倍镜下,组织染色强度未着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分;在高倍镜下随机选 5 个区域计算阳性细胞百分比,0 分:无;1 分:10%;2 分:11%~50%;3 分:>50%,最后的得

分为每张切片两项乘积, >4 分即定为阳性表达, >6 分定为强阳性表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间比较采用 t 检验, 定性资料选用 χ^2 检验、Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 观察 DNT 细胞形态 外周血来源的 DNT 细胞经过 CD3⁺ 抗体吸附后贴壁生长, 随着培养时间的延长及反复换液, 细胞间杂质逐渐减少, 悬浮细胞明显增多; 12 d 细胞基本可以长满 6 孔板。见图 1。

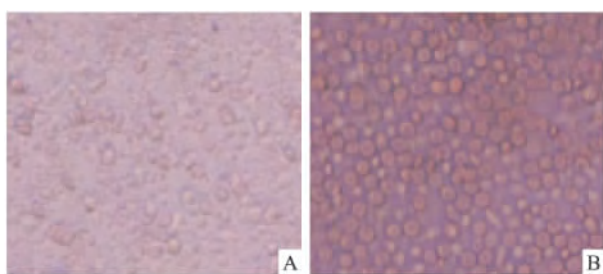


图1 DNT 细胞镜下形态学 $\times 200$

A: 细胞培养第 3 天 24 孔板内 DNT 细胞; B: 细胞培养第 12 天, 6 孔板内 DNT 细胞

2.2 sTRAIL 在 DNT 细胞培养上清液中的表达 ELISA 法检测分别来自 6 例健康人外周来源的 12 组 DNT 细胞培养液及相应未培养细胞的培养液, 结果显示 sTRAIL 在实验组含量为 (56.37 ± 9.63) pg/ml, 对照组中的含量为 (6.44 ± 2.81) pg/ml, 实验组中 sTRAIL 浓度明显高于对照组 ($t = 17.24$, $P < 0.05$)。

2.3 TRAIL-R1 mRNA 在胰腺癌细胞株中的表达差异 qPCR 检测发现, TRAIL-R1 mRNA 在 5 株胰腺癌细胞中丰度均高, 由高到低依次为 CFPAC-1、Capan-1、panc-1、BXPC-3、MIA PaCa-2, 以 BXPC-3 样本数据为校准样本, 其余 4 株分别与其比较, MIA PaCa-2 表达量低于 BXPC-3 ($t = 23.53$, $P < 0.01$), CFPAC-1、Capan-1 高于 BXPC-3 ($t = -7.25$ 、 -3.65 , $P < 0.05$), 而 panc-1 与 BXPC-3 比较, 差异无统计学意义 ($t = -2.22$, $P > 0.05$)。见图 2。

2.4 5 种胰腺癌细胞株中受体 TRAIL-R1 表达差异 Western blot 法检测 TRAIL-R1 蛋白在胰腺癌细胞株中的表达, TRAIL-R1 蛋白表达在来源于肝转移的胰腺癌细胞系 CFPAC-1 中表达最高, 在低分化胰腺癌细胞株 MIA PaCa-2 和 panc-1 中表达较高, 在 BXPC-3 中低表达, 而在 Capan-1 细胞系中不表达。见图 3。

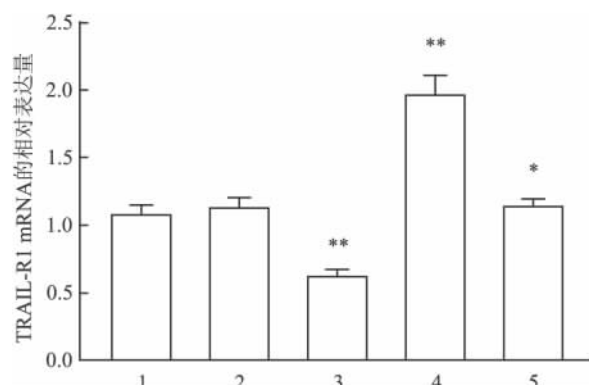


图2 5 株胰腺癌细胞中 TRAIL-R1 mRNA 的相对表达量

1: BXPC-3; 2: panc-1; 3: MIA PaCa-2; 4: CFPAC-1; 5: Capan-1 以 BXPC-3 样本数据为校准样本; 与 BXPC-3 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

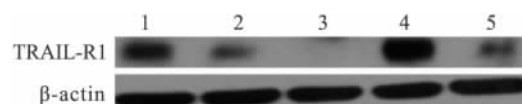


图3 5 株胰腺癌细胞中 TRAIL-R1 蛋白的表达水平

1: BXPC-3; 2: panc-1; 3: MIA PaCa-2; 4: CFPAC-1; 5: Capan-1

2.5 胰腺癌组织及癌旁组织中 TRAIL-R1 的表达

48 例配对的组织中 TRAIL-R1 表达的部位主要在胞质, 从整体的阳性表达方面分析, 发现其在胰腺癌组的阳性表达率为 48% (23/48), 在相应的癌旁组织中的阳性表达率为 75% (36/48), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.43$, $P < 0.05$); 从染色的强度方面分析, 胰腺癌组织中阳性表达率为 23% (11/48), 而相应的癌旁组织中的阳性表达率为 58% (28/48), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 12.48$, $P < 0.05$)。见图 4。

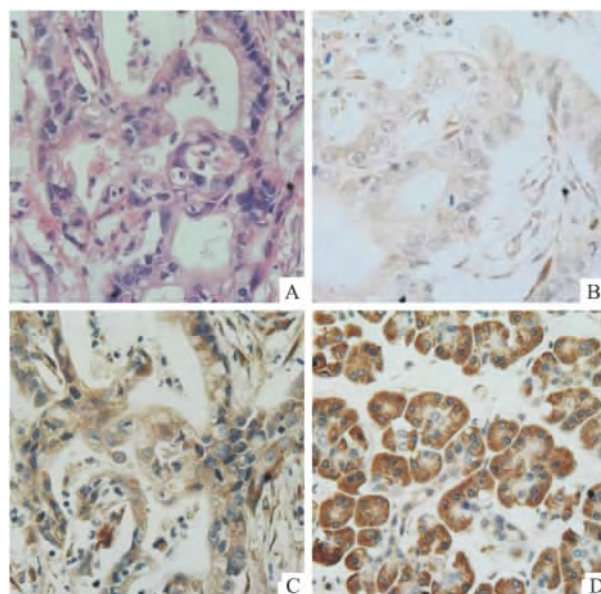


图4 TRAIL-R1 胰腺癌及其癌旁组织中病理变化

A: 胰腺癌 HE 染色; B: TRAIL-R1 在胰腺癌中阴性表达; C: TRAIL-R1 在胰腺癌中阳性表达; D: TRAIL-R1 在癌旁组织中阳性表达

2.6 TRAIL-R1 的表达与胰腺癌临床病理参数的关系 TRAIL-R1 在胰腺癌标本中有 23 例阳性表达,其中强阳性的为 11 例。48 例病例按照 UICC (2002) 标准进行分级,TRAIL-R1 蛋白的表达与临床病理参数的关系见表 1,其表达与胰腺癌的分化程度($\chi^2=8.60$, $P=0.003$)及 T 分级之间差异有统计学意义($\chi^2=7.26$, $P=0.007$)。而与患者其他临床因素差异无统计学意义。

表 1 TRAIL-R1 与胰腺癌临床病理参数的关系(n)

临床病理参数	n	TRAIL-R1		χ^2 值	P 值
		阳性	阴性		
性别					
男	29	12	17	1.255	0.263
女	19	11	8		
年龄(岁)					
<60	22	12	10	0.307	0.580
≥60	26	11	15		
肿瘤最大径(mm)					
<20	7	2	5	0.419	0.419
≥20	41	21	20		
肿瘤部位					
胰头	36	16	20	0.696	0.404
胰体尾	12	7	5		
分化程度					
高	17	13	4	8.600	0.003
中-低	31	10	21		
T 分级					
T1-T2	29	18	11	7.263	0.007
T3-T4	19	5	14		
N 分级					
N0	32	15	7	0.042	0.838
N1	16	8	8		
M 分级					
M0	45	22	20	1.000	1.000
M1	3	1	2		

3 讨论

胰腺癌是一种预后极差,早期即可转移的恶性肿瘤,手术切除虽是较为有效的治疗手段,但由于胰腺癌起病隐匿、恶性程度高,手术切除预后依然很差。DNT 细胞可特异性地杀伤多种肿瘤细胞的特性^[5-7]开始受到越来越多学者的关注,有文献^[3-4]报道一些骨髓来源的细胞亚群可通过分泌 sTRAIL 杀伤肿瘤细胞,但 Todaro et al^[9]报道 V γ 9V δ 2 T 细胞与唑来膦酸治疗结肠癌干细胞共培养后分泌的 sTRAIL 并没有参与杀伤靶细胞。最近, Dokouhaki et al^[10]研究报道 $\gamma\delta$ 细胞可以分泌 sTRAIL 从而杀

伤肺癌 H460 细胞,他们提出 sTRAIL 参与 DNT 细胞杀伤肺癌细胞过程并受 NKG2D 调节。本研究通过检测 DNT 细胞培养液也发现了 DNT 细胞可分泌 sTRAIL,因此,综合之前的研究,笔者推测 DNT 细胞可通过分泌 sTRAIL 与胰腺癌细胞表面的受体结合诱导癌细胞凋亡。

TRAIL 是属于 TNF 家族的一种 II 型跨膜蛋白, TRAIL 基因分子量为 32.5 ku,位于染色体 3q26,共编码 281 个氨基酸,可分为膜表达型(mTRAIL)和分泌型(sTRAIL)两种形式^[11-13]。TRAIL 可以独特地通过结合细胞表面 TRAIL 受体选择性诱导肿瘤或转化细胞凋亡,但不杀伤正常的细胞^[14]。细胞表面与 TRAIL 功能相关的有 4 种受体:TRAIL-R1、TRAIL-R2、DcR1 和 DcR2。TRAIL-R1、TRAIL-R2 包含一个保守的死亡结构域(DD),TRAIL 结合受体中的 DD,从而诱导靶细胞凋亡,然而 DcR1 和 DcR2 缺少相应的 DD,因此又被称为欺骗受体。TRAIL 结合 TRAIL-R1 或 TRAIL-R2 时,受体转化形成死亡诱导信号复合物(DISC),然后招募接头蛋白 Fas 相关死亡结构域(FADD)和 caspase-8 或 caspase-10,从而实现细胞凋亡^[11-12]。TRAIL 与其受体结合是其诱导细胞凋亡的始发步骤,故检测细胞表面 TRAIL 受体的表达情况对研究 TRAIL 是否参与细胞凋亡具有重要意义。

TRAIL-R1 是最先被发现的 TRAIL 受体,研究^[15]表明在胰腺癌中 TRAIL 主要通过 DR4 诱导细胞的凋亡。本研究通过多种方法检测 TRAIL-R1 在胰腺癌细胞株和组织中的表达情况,结果显示:qPCR 检测 TRAIL-R1 在 5 株胰腺癌细胞中均有表达但存在一定的差异,同样的 Western blot 法检测 TRAIL-R1 受体表达大致与 qPCR 一致。在确定了 TRAIL-R1 可在细胞株上表达,本课题组接着通过免疫组化方法观察到 TRAIL-R1 在胰腺癌癌旁组织中高表达,胰腺癌组织中表达相对较少;并且在高分化胰腺癌组织中表达较高于低分化组织。另外,从阳性强度来看,胰腺癌组织中的表达强阳性要低于相应的癌旁组织,这从某种意义上说明受体 TRAIL-R1 表达的下调导致其同 TRAIL 结合减少,导致胰腺癌细胞凋亡的减少,从而促进了胰腺癌的发生发展。

参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

- [2] 杨仁保, 陈炯, 卢寅. DNT 细胞的扩增及其对胰腺癌 Panc-1 细胞的影响[J]. 安徽医科大学学报 2013 48(3):228–32.
- [3] Jablonska E, Jablonski J, Marcinczyk M, et al. The release of soluble forms of TRAIL and DR5 by neutrophils of oral cavity cancer patients [J]. *Folia Histochem Cytobiol* 2008 46(2):177–83.
- [4] Tanaka H, Ito T, Kyo T, et al. Treatment with IFN α *in vivo* up-regulates serum-soluble TNF-related apoptosis inducing ligand (sTRAIL) levels and TRAIL mRNA expressions in neutrophils in chronic myelogenous leukemia patients [J]. *Eur J Haematol*, 2007 78(5):389–98.
- [5] Sobin L H, Wittekind C. UICC-TNM classification of malignant tumours[M]. 6th ed. New York: Wiley-Lissm 2002.
- [6] Merims S, Li X, Joe B, et al. Anti-leukemia effect of *ex vivo* expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy [J]. *Leukemia*, 2011 25(9):1415–22.
- [7] Dokouhaki P, Han M, Joe B, et al. Adoptive immunotherapy of cancer using *ex vivo* expanded human gammadelta T cells: A new approach [J]. *Cancer Lett* 2010 297(1):126–36.
- [8] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods* 2001 25(4):402–8.
- [9] Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, et al. Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes [J]. *J Immunol* 2009 182(11):7287–96.
- [10] Dokouhaki P, Schuh N W, Joe B, et al. NKG2D regulates production of soluble TRAIL by *ex vivo* expanded human $\gamma\delta$ T cells [J]. *Eur J Immunol*, 2013 43(12):3175–82.
- [11] Spierings D C, de Vries E G, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors [J]. *J Histochem Cytochem* 2004 52(6):821–31.
- [12] Kim Y, Seol D W. TRAIL, a mighty apoptosis inducer [J]. *Mol Cells* 2003 15(3):283–93.
- [13] Mariani S M, Krammer P H. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage [J]. *Eur J Immunol* 1998 28(3):973–82.
- [14] Linderth E, Pilia G, Mahajan N P, et al. Activated Cdc42-associated kinase 1 (Ack1) is required for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor recruitment to lipid rafts and induction of cell death [J]. *J Biol Chem* 2013 288(46):32922–31.
- [15] Lemke J, Noack A, Adam D, et al. TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5 [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2010 88(7):729–40.

Expression and significance of sTRAIL and TRAIL-R1 in inhibitory on pancreatic cancer cells by DNT cells

Zhao Yue, Chen Jiong, Yang Renbao, et al

(Dept of General Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the role and significance of the soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL) binding to its receptor TRAIL-R1 in DNT cell suppressing. **Methods** DNT cells could be cultured according a novel of effective protocol of antibody adsorption, ELISA methods were used to measure the levels of sTRAIL in the culture supernatants. Real time RT-PCR, Western blot were employed to compare the expression of TRAIL-R1 in 5 pancreatic cancer cell lines and the expression of TRAIL-R1 in 48 cases of pancreatic ductal adenocarcinoma tissues could be observed by immunohistochemistry. we evaluated the association of TRAIL-R1 with clinical pathological parameters. **Results** The number of cells gradually was improved and serum sTRAIL were higher in supernatants group than that in control group ($t = 17.24$, $P < 0.05$). High level of TRAIL-R1 was detected in 5 pancreatic cancer cell lines from transcript. We found that the expression of TRAIL-R1 was highest in human pancreatic carcinoma CFPAC-1 cell line, higher in MIA PaCa-2 and panc-1 while low in BXPc-3 while do not express in Capan-1. Immunohistochemistry results indicated that the expression and staining intensity of TRAIL-R1 were lower than carcinoma tissues ($\chi^2 = 7.43$, $P < 0.05$) and expression positively correlated with histological grade and T status ($\chi^2 = 12.48$, $P < 0.05$). **Conclusion** DNT cells could secrete sTRAIL and it may be one of the mechanisms of DNT cells inhibiting the proliferation of human pancreatic cancer cells by sTRAIL bind to TRAIL-R1, which is expressed by pancreatic cancer cell lines and tissues, to induced cell apoptosis.

Key words pancreatic cancer; DNT cell; TRAIL-R1