

TRAIL 真核表达载体联合顺铂对胃癌细胞 MDR1/P-gp 的影响

崔喻芳 张开光 喻龙姗 朱邢超

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 联合应用顺铂对胃癌多药耐药 (MDR) 细胞 SGC7901/VCR 的杀伤作用及作用机制。方法 采用人可溶性 TRAIL (sTRAIL) 重组表达质粒 pAVV-sTRAIL 转染 SGC7901/VCR 细胞, 利用其自身分泌表达的 sTRAIL 蛋白联合亚毒性剂量 (0.535 g/L) 顺铂 联合作用于 SGC7901/VCR 细胞。采用 MTT 和流式细胞术分别检测细胞存活率及凋亡率, RT-PCR 及 ELISA 分别检测细胞内 MDR1 基因和 P-糖蛋白 (P-gp) 的表达。结果 MTT 结果显示: 联合组的细胞存活率较对照组、TRAIL 组及顺铂组明显减低 ($P < 0.01$) ; 流式细胞术结果表明: 对照组、TRAIL 组、顺铂组及联合组的细胞晚期凋亡率分别为 0.74%、7.68%、18.52% 和 24.41% , 与其他 3 组相比, 联合组细胞凋亡率明显升高; RT-PCR 及 ELISA 结果表明: 联合组 MDR1/P-gp 的表达也较对照组、

2013-08-26 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1308085MH167)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院消化内科, 合肥 230001

作者简介: 崔喻芳, 女, 硕士研究生;

张开光, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zkg@medmail.com.cn

TRAIL 组及顺铂组明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 sTRAIL 与顺铂联合可协同杀伤 SGC7901/VCR 细胞, 可逆转胃癌细胞的 MDR, 其机制可能是通过下调 MDR 基因 MDR1/P-gp 的表达有关。

关键词 胃肿瘤; 多药耐药; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; MDR1; P-糖蛋白

中图分类号 R 735.2; R 573.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0140-05

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 并占癌症相关死因的第 2 位^[1-2]。在东亚地区尤其是中国, 胃癌的发病率和病死率占首位^[3]。目前, 胃癌治疗仍以术后化疗为主, 但肿瘤细胞在化疗过程中对药物产生的多药耐药 (mutidrug resistance, MDR) 往往导致治疗失败。MDR 是指对一种药物具有耐药性的同时, 对其他结构不同、作用靶点不同的抗肿瘤药物也具有耐药性, 包括原发性耐药和继发性耐药。经典的 MDR 主要与细胞内药物蓄积减少和泵出药物增加有关, 主要由 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 介

Mechanism of N-(4-hydroxyphenyl) retinoide in inhibiting the migration of human lung adenocarcinoma of A549 cells

Zhang Ling¹, Huang Daobin², Lv Jun¹, et al

(¹Dept of Biochemistry, ²Dept of Computer, Wannan Medical College, Wuhu 241002)

Abstract Objective To investigate the influences of N-(4-hydroxyphenyl) retinoide (4-HPR) on the migration of human lung adenocarcinoma cells and its mechanism. **Methods** Cell scarification test was performed to measure the migration of A549 cells treated with 1 μ mol/L 4-HPR. The expression level of osteopontin (OPN), myosin light chain kinase (MLCK) and phosphorylation of myosin light chain (MLC) in A549 cells treated by 4-HPR was detected by Western blot, respectively. The effect of ML-7, a selective inhibitor of MLCK, on the migration of A549 cells was analyzed by cell scarification test. **Results** Compared with cell and solvent control group, the migration distance of A549 cells treated with 1 μ mol/L 4-HPR was obviously decreased ($P < 0.05$) . The Western blot analysis showed that 1 μ mol/L 4-HPR could significantly reduce the expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein ($P < 0.05$), while had no influence on the expression of OPN. ML-7 could decrease the distances of migration of A549 cells notably ($P < 0.05$) . **Conclusion** 4-HPR may inhibit the migration of A549 cells through decreasing the expression of MLCK and phosphorylation of MLC protein.

Key words 4-HPR; human lung adenocarcinoma A549 cell; migration; myosin light-chain kinase; scarification test

导。研究^[4-6]表明 MDR1/P-gp 的过表达与肿瘤细胞对化疗药产生耐药密切相关,下调肿瘤细胞中 MDR1/P-gp 的表达可增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子家族中的成员之一,能选择性诱导肿瘤细胞的凋亡而对正常细胞无明显的杀伤作用^[7]还能增加化疗药物对肿瘤的杀伤作用,但机制尚不明确。该研究以 pAVV-sTRAIL 质粒转染胃癌细胞株 SGC7901/VCR,并观察其与顺铂联合应用对胃癌细胞凋亡的影响以及对细胞内 MDR1/P-gp 表达的影响,旨在探讨两者协同逆转细胞耐药、增加化疗药物疗效的可能性和作用机制,为胃癌临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞株 质粒 pAVV-sTRAIL、pAVV-EGFP 由本实验室保存; 胃癌耐药细胞株 SGC-7901/VCR 由第四军医大学西京医院全军消化病研究所樊代明教授惠赠。

1.2 主要试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司设计合成; MTT 购于 Sigma 公司; 细胞凋亡检测试剂盒购自 Beyotime 公司; RT-PCR 试剂盒购自 Thermo Scientific 公司; ELISA 试剂盒购自 R&D 公司; 长春新碱(vincristine, VCR) 购自深圳万乐药业有限公司; 顺铂注射液购自南京制药厂有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 SGC-7901/VCR 培养于含 10% 胎牛血清、青/链霉素浓度为 100 U/ml 的 RPMI 1640 完全培养基中 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下恒温培养箱内培养。上述培养体系基础上常规加入终浓度为 1.0 mg/L VCR 维持其耐药性,试验前撤药培养 2 周。

1.3.2 实验分组 分别设空载体 pAVV-EGFP 为对照组, pAVV-sTRAIL(TRAIL 组)、亚毒性剂量的顺铂(顺铂组)、pAVV-sTRAIL + 亚毒性剂量顺铂(联合组)为实验组。

1.3.3 质粒转染 将 SGC7901/VCR 以 2×10^6 个细胞接种于 6 孔培养板,用无抗生素完全培养基培养至次日对数期,细胞融合度为 90% 时,按试剂盒操作说明,分别以空载体 pAVV-EGFP 及 pAVV-sTRAIL 转染 SGC7901/VCR,用无血清培养基,

37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱内培养 4~6 h 后,换含 10% 胎牛血清的完全培养基培养 48 h 后收集细胞进行检测。

1.3.4 MTT 检测细胞存活率 检测对照组、顺铂组、TRAIL 组及联合组的细胞存活率。消化转染后 24 h 的细胞,调整为 $(5 \sim 10) \times 10^4$ 个/ml, 以 100 μl/孔接种到 96 孔板中, 待贴壁 6~8 h 后加入顺铂(0.535 g/L) 24 h 后加入 MTT(5 mg/ml) 20 μl/孔, 培养 4 h 后弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μl, 置于摇床上震荡 10 min 后, 用酶标仪(490 nm) 测每孔吸光度(A) 值。细胞存活率(%) = (实验组 A 值 / 对照组 A 值) × 100%。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞转染后 24 h, 在细胞培养液中加入顺铂(0.535 g/L), 继续培养 24 h 后收集细胞, 用 4 °C 预冷 PBS 洗涤 2 次, 加 100 μl Binding Buffer 液重悬后加入 1 μl 的 PI 和 5 μl 的 Annexin-V-FITC, 轻轻混匀并避光孵育 15 min, 加入 400 μl Binding Buffer 重悬细胞, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 数据采用 Win MDI 软件进行分析。

1.3.6 RT-PCR 检测基因表达 收集转染 48 h 的细胞, 按照 TRIzol 说明书, 提取细胞总 RNA, 取 1 μg 总 RNA 进行逆转录。逆转录反应条件: 42 °C 1 h, 70 °C 5 min, 4 °C 10 min, 合成 cDNA 后, 取 1 μl cDNA 进行 PCR 扩增。以 β-actin 作为内参照。PCR 反应条件为 sTRAIL: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 54 °C 50 s, 72 °C 30 s, 扩增 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min; MDR1: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 50 s, 58 °C 50 s, 72 °C 30 s, 扩增 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。分别检测带有目的基因的质粒在细胞内的表达情况及各组细胞中 MDR1 mRNA 的表达情况。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 以目的基因与 β-actin 的比值对 mRNA 表达水平进行半定量分析。引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列及扩增片段大小

目的基因	引物序列(5'-3')	产物大小 (bp)
sTRAIL	上游: CACGAATTCTTAGCCAACAAAAA GGCCCC 下游: CACGTGGGATCCACCATGTACAG GATGCAGCTGCTGTC	601
MDR1	上游: TGACTTACCAAGGCTGCCAATGAT 下游: TGTGCCACCAAGTAGGCTCCAAA	457
β-actin	上游: GCCGATCCACACGGACTACTT 下游: TTGCCGACAGGATGCAGAA	101

1.3.7 ELISA 检测 P-gp 蛋白的表达 收集细胞加入蛋白裂解液,冰上裂解 30 min 后 12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清液,吸取上清液 500 μ l 加入已包被抗体的 96 孔板中,用酶标仪 (450 nm) 检测各孔 A 值,根据试剂盒提供的标准蛋白绘制标准曲线,计算细胞中 P-gp 的浓度。每组设 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均值比较采用 *t* 检验,多组均数比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞转染 转染后 48 h,荧光显微镜下可观察到荧光表达,初步认为质粒已成功转入细胞内,并进一步进行 RT-PCR 检测细胞内 sTRAIL 基因的表达,发现 pAVV-sTRAIL 转染组细胞中 TRAIL 的表达明显增加,未转染组及 pAVV-EGFP 组细胞均无表达。见图 1、2。

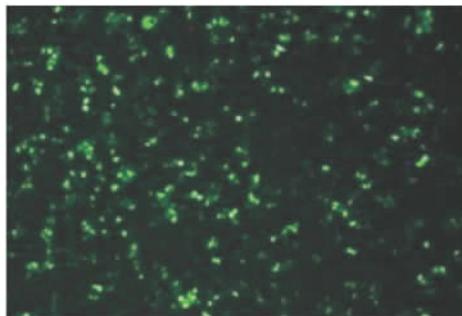


图 1 转染 pAVV-EGFP 48 h 后的荧光照片 $\times 10$

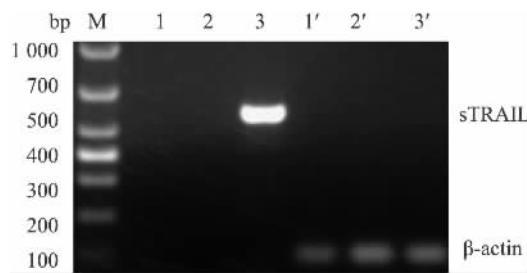


图 2 RT-PCR 检测转染后细胞基因的表达

M: Marker; 1: 未转染组; 2: pAVV-EGFP 组; 3: TRAIL 组; 1'~3': 1~3 相对应的内参

2.2 各组细胞存活率比较 MTT 检测各处理组细胞活性表明:与对照组、顺铂组及 TRAIL 组比较,联合组细胞生存率显著下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 3。

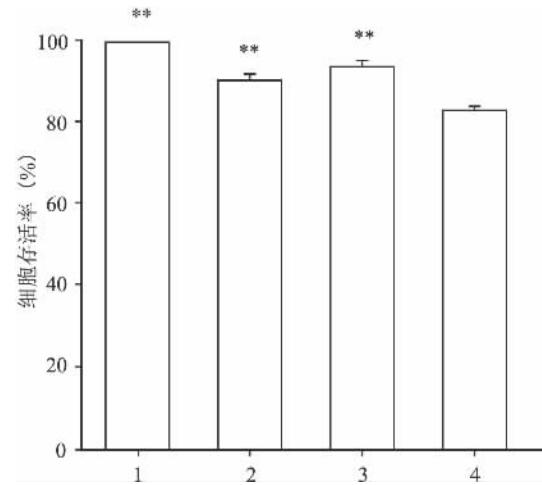


图 3 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞存活率的影响

1: 对照组; 2: 顺铂组; 3: TRAIL 组; 4: 联合组; 与联合组比较:
** $P < 0.01$

2.3 各组细胞凋亡率比较 Annexin V/PI 双染流式细胞术结果表明:对照组、顺铂组、TRAIL 组及联合组细胞早期凋亡率分别为 0.60%、1.49%、1.79% 及 4.47%;晚期凋亡率分别为 0.74%、7.68%、18.52% 及 24.41%。联合组细胞凋亡率明显高于其他 3 组。见图 4。

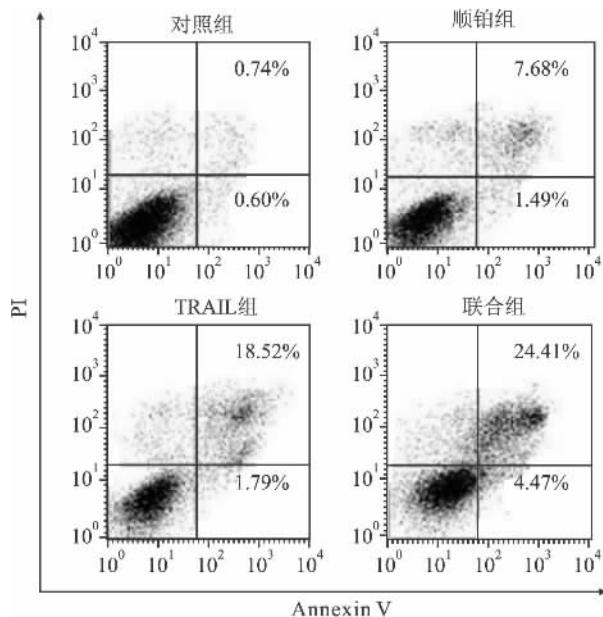


图 4 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞凋亡率的影响

2.4 各组细胞 MDR1 mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示:与对照组、顺铂组及 TRAIL 组比较,

联合组 MDR1 mRNA 表达显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 5。

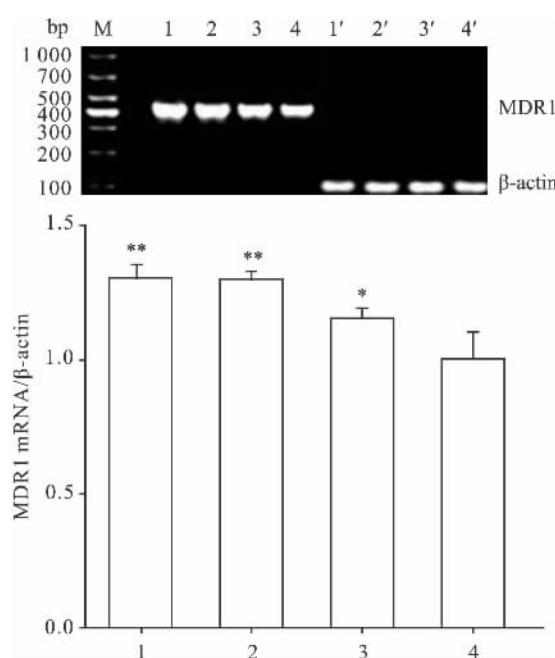


图 5 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞 MDR1 mRNA 表达的影响

M: Marker; 1: 对照组; 2: 顺铂组; 3: TRAIL 组; 4: 联合组; 1'~4': 1~4 相对应的内参; 与联合组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 各组细胞 P-gp 表达 ELISA 法结果显示: 与对照组、顺铂组及 TRAIL 组比较, 联合组 P-gp 表达明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 6。

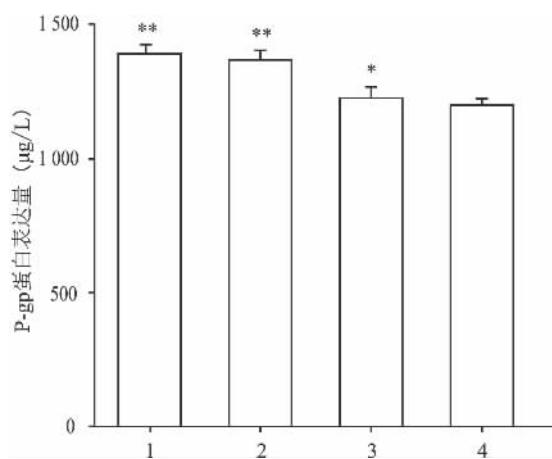


图 6 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞中 P-gp 表达的影响

1: 对照组; 2: 顺铂组; 3: TRAIL 组; 4: 联合组; 与联合组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

MDR 是导致胃癌治疗失败的重要原因之一, 其中 MDR1/P-gp 所介导的途径最为经典^[8], 其过表达与肿瘤细胞的获得性多药耐药密切相关^[9]。TRAIL 是肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员之一, 又称 Apo-2L 编码基因位于 3q26, 由 281 位氨基酸组成, 为典型的 II 型跨膜蛋白, 具有膜结合型(全长 TRAIL)和可溶型(sTRAIL)两种形式, 二者都可与细胞膜上的特异性受体结合, 通过胞内受体转导, 诱导细胞发生凋亡^[10]。研究^[11~12]表明, TRAIL 能选择性杀伤肿瘤细胞及转化细胞, 并且能逆转耐药细胞株为敏感细胞株, 增加化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用, 可明显增强以 P-gp 为底物的化疗药物的细胞毒作用。有研究^[13]认为 TRAIL 与化疗药物联合应用可增强抗肿瘤作用, 提示 TRAIL 可逆转肿瘤细胞的 MDR 表型。关于 TRAIL 是否可通过下调耐药基因及耐药蛋白的表达而逆转肿瘤细胞的 MDR, 目前相关研究较少。本研究利用人 sTRAIL 重组表达载体 pAVV-sTRAIL 瞬时转染胃癌细胞 SGC7901/VCR, 通过观察对照组荧光表达及 RT-PCR 检测 sTRAIL 基因表达, 确证转染的 SGC7901/VCR 高效表达人 sTRAIL。MTT 及流式细胞术结果表明, 与顺铂组和 TRAIL 组相比, 联合组细胞存活率显著下降, 凋亡率明显增高, 可起到协同杀伤胃癌细胞的作用。RT-PCR 和 ELISA 检测表明: 该协同杀伤作用可能通过下调胃癌细胞中 MDR1/P-gp 的表达完成的, 从而逆转胃癌细胞的 MDR。

此外, 该实验采用基因转染的方法将 sTRAIL 基因导入细胞内, 使肿瘤细胞自身分泌表达 sTRAIL 蛋白, 避免了人重组 TRAIL 蛋白治疗时遇到的缺点和不足, 为临床胃癌的基因治疗提供了理论基础。而与顺铂联合应用减低了药物的剂量, 一方面可降低药物毒副作用, 提高患者的依从性; 另一方面对于克服肿瘤细胞的 MDR 有一定意义, 为胃癌的治疗提供新的思路和方法。总之, 该研究表明 TRAIL 的基因治疗与化疗药物联合策略有望成为克服胃癌 MDR 的新手段, 但关于下调胃癌细胞内 MDR1/P-gp 的表达的具体机制, 有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1): 17~20.

- [2] Anderson W F ,Camargo M C ,Fraumeni J F Jr ,et al. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults [J]. *JAMA* 2010, 303(17):1723-8.
- [3] Jemal A ,Bray F ,Center M M ,et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin* ,2011, 61(2):69-90.
- [4] Sheng X ,Zhang L ,Tong N ,et al. MDR1 C3435T polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies [J]. *Mol Biol Rep* 2012, 39(7): 7237-49.
- [5] Lee S W ,Lee Y L ,Lee Y J ,et al. Enhanced antitumor effects by combination gene therapy using MDR1 gene shRNA and HSV1-tk in a xenograft mouse model [J]. *Cancer Lett* 2010, 291(1):83-9.
- [6] Lin X ,Zhang X ,Wang Q ,et al. Perifosine downregulates MDR1 gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in a human breast cancer cell line [J]. *Neoplasma* 2012, 59(3):248-56.
- [7] Wu G S. TRAIL as a target in anti-cancer therapy [J]. *Cancer Lett* 2009, 285(1):1-5.
- [8] Li X ,Li J P ,Yuan H Y ,et al. Recent advances in P-glycoprotein-mediated multidrug resistance reversal mechanisms [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007, 29(9):607-17.
- [9] Takakuwa O ,Oguri T ,Ozasa H ,et al. Over-expression of MDR1 in amrubicinol-resistant lung cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011, 68(3):669-76.
- [10] Schaefer U ,Voloshanenko O ,Willen D ,et al. TRAIL: a multifunctional cytokine [J]. *Front Biosci* 2007, 12(1):3813-24.
- [11] Jacquemin G ,Shirley S ,Micheau O. Combining naturally occurring polyphenols with TNF-related apoptosis-inducing ligand: A promising approach to kill resistant cancer cells? [J]. *Cell Mol Life Sci* 2010, 67(18):3115-30.
- [12] Younes A ,Kadin M E. Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy [J]. *J Clin Oncol* 2003, 21(18):3526-34.
- [13] Yu R ,Deedigan L ,Albareque S M ,et al. Delivery of sTRAIL variants by MSCs in combination with cytotoxic drug treatment leads to p53-independent enhanced antitumor effects [J]. *Cell Death Dis* 2013, 4(1):503-14.

协同作用于肿瘤坏死因子-相关的凋亡诱导配体和 cis-铂对胃癌细胞 MDR1/P-gp 表达的表达

Cui Yufang ,Zhang Kaiguang ,Yu Longshan ,et al

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

Abstract Objective To explore the synergistic killing effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and cis-platinum (DDP) on gastric cancer cell line SGC7901/VCR and involved mechanisms.

Methods The pAVV-sTRAIL plasmids were transfected into SGC7901/VCR cells; the SGC7901/VCR cells were treated with the combination of soluble TRAIL (sTRAIL) and sub-toxic dose of DDP (0.535 g/L). The survival rate and apoptosis rate were analysed with MTT and flow cytometry, respectively. The expression of MDR mRNA and P-gp were analysed by RT-PCR and ELISA, respectively. **Results** The survival rate of the combination group decreased significantly when compared with control, TRAIL, and combination group; the apoptosis rates of the control, TRAIL DDP and combination group were 0.74%, 7.68%, 18.52% and 24.41%, respectively. The apoptosis rate of the combination group was higher than that of the other groups. And the expression of MDR1/P-gp in the combination group decreased significantly when compared with control, TRAIL and DDP group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** The combination of sTRAIL with DDP has synergistic killing effect on SGC7901/VCR cells, and can reverse MDR of gastric cancer cells. The mechanism involved may be related with the decrease of the expression of MDR1/P-gp.

Key words gastric carcinoma; MDR; TRAIL; MDR1; P-glycoprotein

* * * * *

欢迎投稿! 欢迎订阅!