

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、

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 (multidrug 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

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

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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 4-HPR was obviously decreased ($P < 0.05$). The Western blot analysis showed that 1 $\mu\text{mol/L}$ 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 ℃、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 ℃、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 μ l/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 μ l/孔,培养 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ l,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) $\times 100\%$ 。

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 ℃ 预冷 PBS 洗涤 2 次,加 100 μ l Binding Buffer 液重悬后加入 1 μ l 的 PI 和 5 μ l 的 Annexin-V-FITC,轻轻混匀并避光孵育 15 min,加入 400 μ l 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 μ g 总 RNA 进行逆转录。逆转录反应条件:42 ℃ 1 h,70 ℃ 5 min,4 ℃ 10 min,合成 cDNA 后,取 1 μ l cDNA 进行 PCR 扩增。以 β -actin 作为内参照。PCR 反应条件为 sTRAIL:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 50 s,54 ℃ 50 s,72 ℃ 30 s,扩增 30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min;MDR1:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 50 s,58 ℃ 50 s,72 ℃ 30 s,扩增 30 个循环,72 ℃ 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: CACGAATTCTTAGCCAACTAAAAA GGCCCC 下游: CACGTGGGGATCCACCATGTACAG GATGCAGCTGCTGTC	601
MDR1	上游: TGA CTACCA GGTCCGCCAATGAT 下游: TGTGCCACCAAGTAGGCTCCAAA	457
β -actin	上游: GCCGATCCACACGGAGTACTT 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。

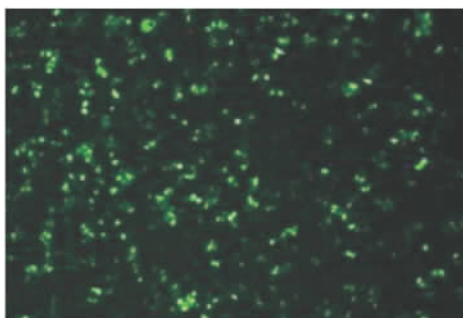


图 1 转染 pAVV-EGFP 48 h 后的荧光照片 $\times 10$



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。

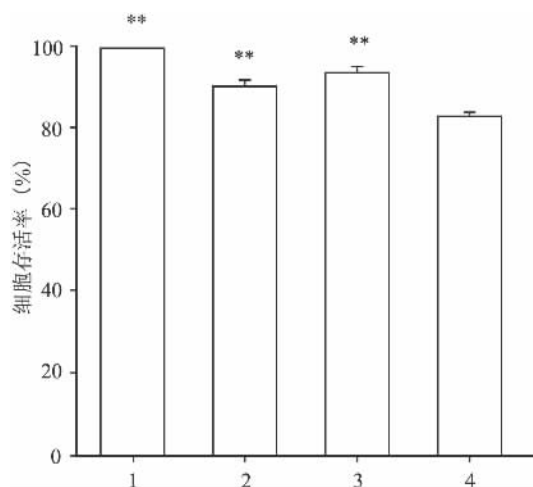


图 3 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞存活率的影响

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 AnnexinV/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。

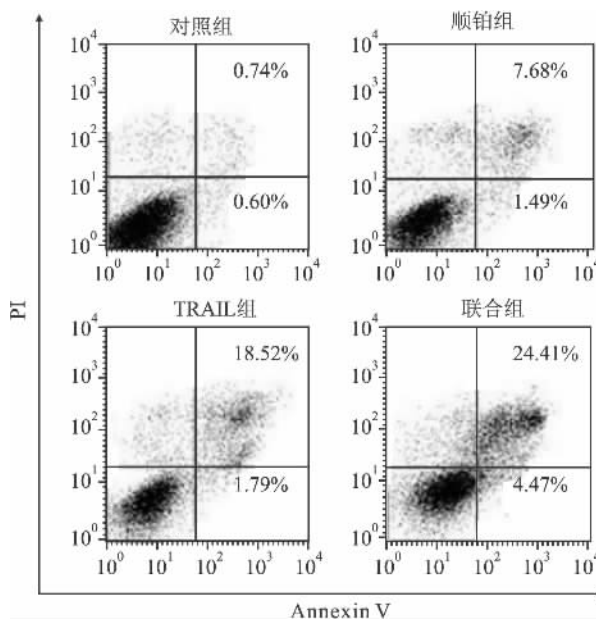


图 4 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞凋亡率的影响

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。

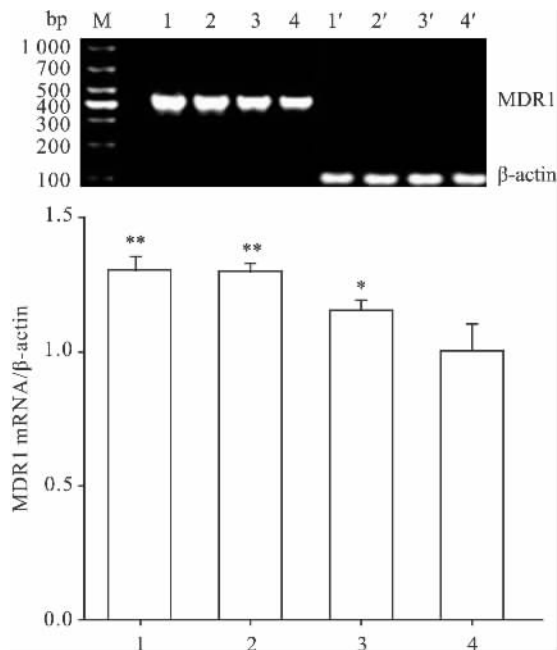


图5 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞 MDR1 mRNA 表达的影响

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。

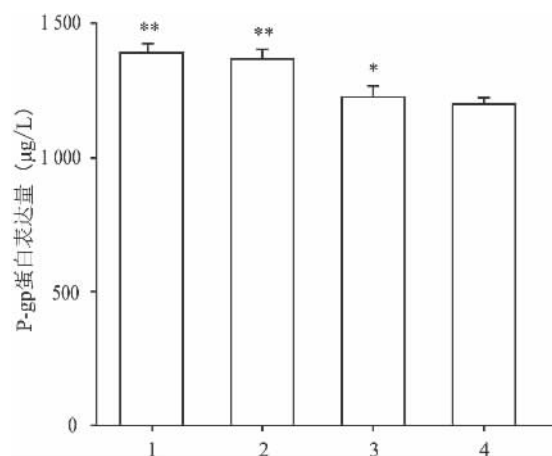


图6 pAVV-sTRAIL 转染及与顺铂联合应用对胃癌细胞中 P-gp 表达的影响

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 amrubicin-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 ,Albarenque 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.

Synergistic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and cis-platinum on the expression of MDR1/P-gp in gastric cancer cells

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!