

## • 基础研究 •

## TRAIL 联合化疗药物对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响

张佳冰 张银刚

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体 (TRAIL) 对人宫颈癌 HeLa 细胞的作用, 以及与化疗药物的协同作用。方法 将 HeLa 细胞接种至 96 孔培养板后分别加入浓度为 1.0、10.0、100.0  $\mu\text{g/L}$  的 TRAIL、0.1、1.0、10.0  $\text{mg/L}$  的阿霉素 (ADM) 和丝裂霉素 (MMC), 及不同匹配的 TRAIL + MMC 和 TRAIL + ADM, 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法分别检测肿瘤细胞的生存率; 将 HeLa 细胞接种至 12 孔板, 培育 24 h 后加入不同浓度的 TRAIL、ADM、MMC、TRAIL + ADM、TRAIL + MMC, 用流式细胞术检测不同处理组肿瘤细胞的凋亡率和死亡率。结果 100  $\mu\text{g/L}$  TRAIL 引起细胞的凋亡率为 20.1%, 与无药物组 1.1% 的凋亡率有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 单独采用 10  $\text{mg/L}$  MMC、ADM 对细胞的抑制率为 36.0% 和 44.1%, 而 100  $\mu\text{g/L}$  TRAIL 与 10  $\text{mg/L}$  MMC、ADM 联合后对细胞的抑制率分别达到 58.4% 和 73.7%, 两者有协同作用 ( $P < 0.05$ )。结论 在体外实验中, TRAIL 可通过诱导宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡而产生抗肿瘤作用; TRAIL 与化疗药物 ADM、MMC 有协同抗肿瘤作用。

[关键词] 宫颈癌; 化疗; 肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体

Effect of TRAIL and its combination with chemotherapeutic agents on the proliferation and apoptosis of cervical cancer ZHANG Jia-bing, ZHANG Yin-gang. Chemical Department, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan, China

[Abstract] **Objective** To explore the role of tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its combination with chemotherapeutic agents in treatment of cervical cancer. **Methods** 100  $\mu\text{L}$  of cervical cancer cells suspension were added to each well of 96-well plates. Cells were incubated for 24 hours with TRAIL, Adriamycin (ADM), Mitomycin C (MMC) and TRAIL combined with chemotherapeutic agents at different concentration. Rates of apoptosis and death of cells were detected by flow cytometry. **Results** Rates of apoptosis of cells were 20.1% by treated with 100  $\mu\text{g/L}$  TRAIL singly, which was significantly different compared with groups without agents ( $P < 0.01$ ). Inhibitory rates were 36.0% by treated with 10.0  $\text{mg/L}$  MMC, 44.1% by ADM. However inhibitory rates reached 58.4% or 73.7% by 100.0  $\mu\text{g/L}$  TRAIL + 10.0  $\text{mg/L}$  MMC or ADM. Combined of TRAIL and MMC, TRAIL and ADM resulted in a synergistic cytotoxic effect ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** In vitro, TRAIL is an agent for anti-cervical cancer by inducing the apoptosis of tumor cell; TRAIL can enhance the effect of ADM and MMC.

[Key words] cervical cancer; chemotherapy; tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2004)12-0754-02

[本文著录格式] 张佳冰, 张银刚. TRAIL 联合化疗药物对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10(12): 754-755.

近年来的研究表明, 细胞凋亡与肿瘤的发生、发展及消退有密切关系。因此, 细胞凋亡成为抗肿瘤药物的新靶点, 选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 同时赦免正常细胞是研究者追求的最终目的。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis-induced ligand, TRAIL), 又称 AP02L, 是肿瘤坏死因子家族成员中继 TNF、Fas-L 之后发现的第 3 个凋亡分子。TRAIL 具有选择性杀伤肿瘤细胞的作用, 其抗肿瘤的优点已受到研究者的广泛关注<sup>[1,2]</sup>。本实验旨在探讨 TRAIL 对宫颈癌 HeLa 细胞的作用, 以及与化疗药物阿霉素 (Adriamycin, ADM)、丝裂霉素 (Mitomycin C, MMC) 的协同作用。

作者单位: 1. 571101 海南海口市, 海南医学院药系化学教研室 (张佳冰); 2. 710061 陕西西安市, 西安交通大学医学院地方病研究所 (张银刚)。作者简介: 张佳冰 (1951-), 男, 山西榆次市人, 副教授, 主要研究方向: 药物开发。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人宫颈癌 HeLa 细胞株为本室保存, 人类重组 TRAIL 蛋白、二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、MMC、ADM 购自美国 Sigma 公司; 二甲基亚砜 (DMSO) 为江苏洪声化工厂生产; Annexin V 试剂盒购自 Laboratories 公司; z960 型酶标仪为美国 Sigma 公司产品; 流式细胞仪为美国 Beckman 公司生产的 Coulter EP-ICS-xL 型。

## 1.2 方法

1.2.1 MTT 细胞毒实验 将生长良好的人宫颈癌 HeLa 细胞调至  $1 \times 10^5/\text{ml}$  浓度, 每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 后换成含不同浓度 MMC (0.1、1.0、10.0  $\text{mg/L}$ )、ADM (0.1、1.0、10.0  $\text{mg/L}$ )、TRAIL (1.0、10.0、100.0  $\mu\text{g/L}$ ), 以及不同浓度 TRAIL 分别与 MMC 或 ADM 联合的培养液 100  $\mu\text{L}$ , 每个浓度 3 个复孔, 并设置无药物对照孔和空白对照孔。作用 24 h 后, 加入 5  $\text{g/L}$  的 MTT 溶液 20  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,

培养 4 h 后,每孔加 150  $\mu$ l DMSO,酶标仪测其吸光度(A 值),波长 570 nm,参考波长 630 nm。肿瘤细胞抑制率=(1 - 检测孔 A 值/对照孔 A 值)  $\times$  100 %。实验重复 3 次。

1.2.2 流式细胞术检测 将宫颈癌细胞每孔 1 ml 接种于 12 孔培养板,孵育 24 h。吸弃培养液后分别加入含 10.0 mg/L MMC、10.0 mg/L ADM、100.0  $\mu$ g/L TRAIL、TRAIL + MMC、TRAIL + ADM 的培养液 1 ml,每种浓度设 3 个重复孔。作用 12 h 后弃上清,磷酸盐缓冲液洗 2 次后加 1 ml Binding Buffer。加入 Annexin V 和碘化丙锭,室温下避光染色 15 min。流式细胞仪检测凋亡率和死亡率。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 MTT 细胞毒实验 1.0、10.0、100.0  $\mu$ g/L TRAIL 对 HeLa 细胞的抑制率与无药物组比较有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ );10.0 mg/L 的 MMC 与 1.0、10.0、100.0  $\mu$ g/L 的 TRAIL 均有协同作用 ( $P < 0.05$ );10.0  $\mu$ g/L 的 TRAIL 与 3 种浓度 MMC 均有协同作用 ( $P < 0.05$ );1.0  $\mu$ g/L 的 TRAIL 与 3 种不同浓度的 ADM 均无协同作用,而 10.0、100.0  $\mu$ g/L 的 TRAIL 与 3 种不同浓度的 ADM 均有协同作用 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 不同浓度 TRAIL 联合 MMC、ADM 对肿瘤细胞的抑制率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

药物 (mg/L)	TRAIL			
	0 $\mu$ g/L	1.0 $\mu$ g/L	10.0 $\mu$ g/L	100.0 $\mu$ g/L
0	0	26.4 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	29.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	37.7 $\pm$ 9.8 <sup>a</sup>
MMC	0.1	20.6 $\pm$ 3.9	27.1 $\pm$ 3.0	34.1 $\pm$ 2.0 <sup>b</sup>
	1.0	27.9 $\pm$ 5.7	32.3 $\pm$ 3.3	36.8 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>
	10.0	36.0 $\pm$ 7.5	46.3 $\pm$ 8.2 <sup>b</sup>	48.7 $\pm$ 5.1
ADM	0.1	25.4 $\pm$ 7.3	33.1 $\pm$ 5.8	43.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>
	1.0	36.1 $\pm$ 5.9	39.1 $\pm$ 5.5	47.1 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>
	10.0	44.1 $\pm$ 6.3	50.5 $\pm$ 3.7	58.4 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup>

注:a:与同一浓度单独使用 TRAIL 组、单独使用 MMC 或 ADM 组比较,  $P < 0.05$ ;b:与无药物组比较,  $P < 0.01$ 。

2.2 流式细胞术检测 100.0  $\mu$ g/L TRAIL 能诱导人宫颈癌细胞凋亡,凋亡率 20.1 %;10.0 mg/L MMC、ADM 与 100.0  $\mu$ g/L TRAIL 均有协同抗肿瘤细胞作用 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

3 讨论

TRAIL 由 Wiley 等于 1995 年首次发现并克隆成功。人的 TRAIL 基因定位于染色体 3q26,编码 281 个氨基酸。TRAIL 又称为凋亡素 2 配体 (APO-2L),是一类 II 型膜糖蛋白,其 C 末端延伸至胞外并与 TNF 家族的其他成员有高度的同源性,N 末端则位于胞内。在金属蛋白酶的作用下,TRAIL 的胞外结构域可被裂

解下来而成为可溶性细胞因子。TRAIL 通过与靶细胞表面的受体特异性结合而发挥作用。本研究结果显示,TRAIL 蛋白主要通过诱导凋亡的方式发挥对宫颈癌细胞的抑制作用;流式细胞术检测到 100.0  $\mu$ g/L TRAIL 与 10.0 mg/L ADM 共同作用 12 h 后,HeLa 细胞以死亡为主,其原因可能是 TRAIL 与 ADM 的浓度均较高,12 h 的作用时间使肿瘤细胞处于晚期凋亡状态,而 Annexin V 流式细胞术无法区分晚期凋亡和死亡细胞,将晚期凋亡细胞也计入死亡细胞数。

表 2 TRAIL 联合化疗药物对宫颈癌细胞的凋亡率及死亡率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

药物	凋亡率	死亡率	总计
无药物组	1.1 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2
MMC	11.1 $\pm$ 3.1	2.1 $\pm$ 0.8	13.1 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>
ADM	14.0 $\pm$ 4.2	22.6 $\pm$ 4.4	36.6 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
TRAIL	20.1 $\pm$ 5.6	1.4 $\pm$ 0.4	20.0 $\pm$ 4.7 <sup>a</sup>
TRAIL + MMC	35.3 $\pm$ 8.5	6.2 $\pm$ 5.6	41.5 $\pm$ 13.8 <sup>b</sup>
TRAIL + ADM	1.9 $\pm$ 0.7	89.1 $\pm$ 0.4	90.0 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup>

注:a:与同浓度单独使用 TRAIL 组、单独使用 MMC 或 ADM 组比较,  $P < 0.01$ ;b:与无药物组细胞凋亡率和死亡率总和比较,  $P < 0.01$ 。

近年来,有不少将 TRAIL 与化疗药物联合应用治疗肿瘤的实验研究。Gliniak 等的研究显示,化疗药物喜树碱能增强 TRAIL 引起的结肠肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞生长,延长裸鼠的生存期<sup>[3]</sup>。

本实验结果表明,浓度为 10.0 mg/L 的化疗药物 MMC、ADM 与 100.0  $\mu$ g/L TRAIL 能协同杀伤人宫颈癌细胞。这与 Mizutani 等报道的 MMC 与 TRAIL 无明显协同作用的实验结果不同<sup>[4]</sup>。本实验结果还显示,协同作用的发挥与 MMC 及 TRAIL 的浓度有关,如果 MMC 浓度  $> 1.0$  mg/L,TRAIL  $> 10.0$   $\mu$ g/L,两者的协同作用比较明显。但化疗药物 MMC、ADM 与 TRAIL 协同作用的确切机制尚需进一步研究。

宫颈癌是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤。对于无法手术的患者,TRAIL 与化疗药物的联合使用有望提高宫颈癌细胞对化疗药物的敏感性,为降低宫颈癌的复发率和提高治愈率提供新的方法。

[参考文献]

[1] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors [J]. Science, 1997, 277: 818.

[2] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. Science, 1997, 276: 111.

[3] Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11 [J]. Cancer Res, 1999, 59: 6153—6158.

[4] Hassen W, Droller MJ. Current concepts in assessment and treatment of bladder cancer [J]. Curr Opin Urol, 2000, 10: 291—299.

(收稿日期:2004-03-15)