

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.17.011

凋亡素 2 配体对放射线诱导 95-D 细胞凋亡的影响的研究 *

韩蕃颖¹ 张红军^{1△} 刘希光¹ 宋浩¹ 冯龄鑫¹ 王相²

(1 青岛大学附属医院肿瘤科 山东 青岛 266003; 2 青岛大学附属医院放疗中心 山东 青岛 266003)

摘要 目的:探讨凋亡素 2 配体(Apo-2L)对放射线诱导肺癌 95-D 细胞凋亡的影响。**方法:**MTT 法检测不同浓度凋亡素 2 配体在体外对肺癌 95-D 细胞的抑制率,将细胞分为 4 组,对照组、凋亡素 2 配体组、单纯照射组、凋亡素 2 配体 + 放射照射组,流式细胞仪检测各组凋亡率及细胞周期。**结果:**凋亡素 2 配体对 95-D 细胞的体外抑制作用明显,随着药物浓度的增大及时间的延长,抑制率明显增高($P < 0.05$)。流式细胞术显示凋亡素 2 配体与放射线联用能够使 95-D 细胞的凋亡率提高,与单用凋亡素 2 配体组及单纯放疗组相比,凋亡率差异显著($P < 0.05$)。**结论:**凋亡素 2 配体在体外具有抑制 95-D 细胞增殖的作用并能够促进细胞的凋亡,同时凋亡素 2 配体联合放射线可以明显提高肺癌 95-D 细胞的凋亡率。

关键词:凋亡素 2 配体;细胞凋亡;细胞增殖;放射线疗法

中图分类号:R734.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)17-3244-04

Study on the Effects of Opoposis-2 Ligand on Apoptosis of 95-D Lung Cancer Cells that Radiation Induced*

HAN Fan-jie¹, ZHANG Hong-jun^{1△}, LIU Xi-guang¹, SONG Hao¹, FENG Ling-xin¹, WANG Xiang²

(1 Department of Oncology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China;

2 Department of Radiation therapy, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong, 266003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of opoptosis-2 ligand on apoptosis of 95-D cells that radiation induced. **Methods:** The effect of the different concentration of the apoptosis-2 ligand on cellular proliferation inhibition rate of 95-D cells was detected by MTT method; The effect of combined apoptosis-2 ligand with radiation on the cell apoptosis and the cell cycle was detected by flow cytometry. **Results:** The cellular proliferation inhibition rate of apoptosis-2 ligand on 95-D cells was related with the drug concentration and action time ($P < 0.05$). The combined application of apoptosis-2 ligand and radiation could raise the cellular proliferation inhibition rate of 95-D cells, compared with that in the control group and apoptosis-2 ligand or radiation alone($P < 0.05$). **Conclusions:** Apoptosis-2 ligand can inhibit the proliferation of 95-D cells *in vitro* culture and combined with apoptosis-2 ligand and radiation can raise the cellular proliferation inhibition rate of 95-D cells.

Key words: Apoptosis-2 ligand; Cell apoptosis; Cell proliferation; Radiation

Chinese Library Classification(CLC): R734.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)17-3244-04

前言

凋亡素 2 配体是肿瘤坏死因子超家族的一员,它可以与肿瘤细胞的特定受体结合,并触发肿瘤细胞内的凋亡信号,最终引起肿瘤细胞程序性死亡,但与其他肿瘤坏死因子超家族成员不同的是,由于细胞表面受体表达的差异,其无法在正常细胞中表现出这种细胞毒性,是一种特异性的选择性诱导肿瘤细胞凋亡的凋亡诱导分子^[1]。放射治疗在大多数恶性肿瘤的治疗中起着很关键的作用,但在临床治疗中,不同部位甚至是相同部位不同类型的肿瘤对放射线的敏感性并不相同,甚至有许多肿瘤表现出抵抗性,在照射野内复发的情况也时常出现,因此寻找一种能够增加放射治疗疗效并无明显毒害反应的干预手段已经成为一种研究热点。国外已有研究报道,凋亡素 2 配体与

放射线联合应用能够提高肿瘤细胞对两者的敏感性^[2]。因此从理论上讲,凋亡素 2 配体与放射线联合应用可以提高了肿瘤细胞的凋亡率。本实验主要对细胞进行体外培养并做药物及放射线处理,观察凋亡素 2 配体对放射线照射诱导的人肺癌 95-D 细胞凋亡作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料和细胞株

肺癌 95-D 细胞购买自上海细胞库,凋亡素 2 配体购买自上海江莱试剂有限公司,MTT 试剂盒、二甲亚砜(DMSO)为美国 Sigma 产品,RPMI-1640 培养液、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶($1 \times$)溶液、冻存液为 Hyclone 公司产品,青链霉素混合液($100 \times$)为 Solarbio 公司产品,凋亡检测试剂盒为嘉美生物技

* 基金项目:卫生部科研课题(W2012FZ078)

作者简介:韩蕃颖(1988-),男,硕士研究生,主要从事肿瘤化学治疗和放射治疗, E-mail: hfj6277@126.com

△ 通讯作者:张红军,女,电话:0532-82919651, E-mail: zhangredjun@163.com

(收稿日期:2014-01-11 接受日期:2014-02-18)

术有限公司产品,实验平台为青岛大学医学院微生物教研室细胞实验室。

1.2 细胞培养

肺癌 95-D 细胞株为贴壁生长的细胞,用含 10%胎牛血清、青链霉素 100 mg/g 的 RPMI-1640 培养液,放置在 37℃、含 5% 二氧化碳的培养箱中培养。

1.3 MTT 法检测凋亡素 2 配体对 95-D 细胞的增殖抑制率

将 95-D 细胞培养至对数生长期后,接种于 96 孔板,再培养至对数生长期,加入凋亡素 2 配体,使其终浓度分别达到 0、10、50、100、200、400、800 ng·mL⁻¹,同时设置空白对照组(加相同体积的培养液),每组设置 5 复孔,分别作用 24、48 h 后,加入 MTT 溶液,震荡 10 分钟,待晶体完全溶解后,用酶联免疫分析仪于 490 nm 处测吸光度(A)值,并计算增殖抑制率(IR),其中 IR=((对照组平均 A 值 - 空白组平均 A 值)-(实验组平均 A 值 - 空白组平均 A 值))/(对照组平均 A 值 - 空白组平均 A 值)×100%。

1.4 流式细胞仪检测检测细胞凋亡及周期

取对数生长期细胞,接种于 12.5 mm² 培养瓶中,待细胞生长到对数期后,随机分为对照组(A组)、凋亡素 2 配体组(B组)、放射线照射组(C组)、放射线联合凋亡素 2 配体组(D

组),A组与C组加入新鲜培养液,B组与D组加入等量含凋亡素 2 配体的培养液,使药物终浓度为 100 ng·mL⁻¹],培养 12h 后,C组与D组用 2 Gy 的 6 MV 的 X 线照射,A组及B组只摆位不照射,继续培养 12 h 后,收集细胞,按照凋亡试剂盒、周期试剂盒步骤处理细胞,并于流式细胞仪上检测细胞凋亡率及周期。

1.5 数据处理

计量资料结果用($\bar{x} \pm s$)的形式表示,用单因素方差分析进行统计处理,若方差不齐,用 Tamhane's 方法进行比较,若方差齐性,用 LDS 方法进行比较。采用 SPSS19.0 统计软件分析,设定 P<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的凋亡素 2 配体对 95-D 细胞的增殖抑制率

凋亡素 2 配体作用于 95-D 细胞 24、48 小时后,用 MTT 法测出不同浓度及不同作用时间下 95-D 细胞的吸光度 A 值(表 1),计算不同浓度凋亡素 2 配体的增殖抑制率(IR)(图 1),结果显示,在体外,凋亡素 2 配体对 95-D 细胞有增殖抑制作用,并且随着药物浓度的增大,抑制率明显增高,P<0.05。

表 1 不同浓度的凋亡素 2 配体作用下 95-D 细胞株的吸光度值

Table 1 The Optical Density of 95-D cells under the action of different concentration of Apo-2L

Apo-2L concentration (ng·mL ⁻¹)	24 h	48 h
0	0.308± 0.020	0.541± 0.023
10	0.306± 0.008	0.527± 0.021
50	0.300± 0.015	0.485± 0.015
100	0.297± 0.013	0.482± 0.011
200	0.292± 0.006	0.468± 0.032
400	0.286± 0.012	0.465± 0.034
800	0.273± 0.022	0.446± 0.017
F	3.382	11.622
P	<0.05	<0.05

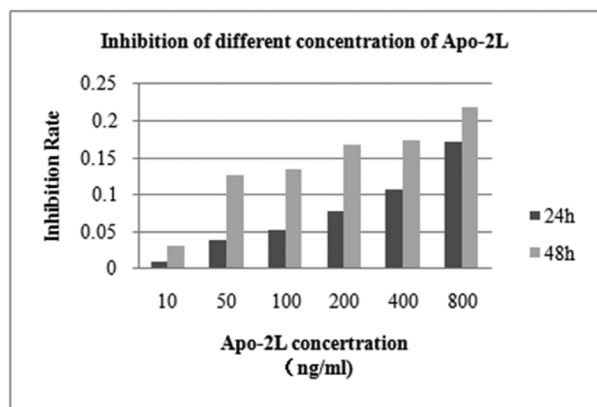


图 1 不同浓度凋亡素 2 配体对肺癌 95-D 细胞的抑制率

Fig.1 The inhibition rate of different concentration of Apo-2L to 95-D cells

2.2 放射线联合凋亡素 2 配体对细胞凋亡及周期的影响

流式细胞仪检测结果显示 B、C、D 组与 A 组比较,凋亡率提高,P≤0.05;D 组与 B、C 组比较,凋亡率提高,P≤0.05(表 2、图 2)。周期检测显示大部分细胞分布在 G1 期和 S 期,但 4 组细胞各个周期的分布比例无明显差异(表 2)。

3 讨论

凋亡素 2 配体,又被称为肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体,是肿瘤坏死因子超家族成员之一,它可以与肿瘤细胞的特定受体结合,并触发肿瘤细胞内的凋亡信号,最终引起肿瘤细胞程序性死亡,但这种细胞毒性无法在正常细胞中表现,是一种特异性的选择性诱导肿瘤细胞凋亡的凋亡诱导分子^[1]。目前发现的凋亡素 2 配体的受体有 5 种:诱捕受体 1(DcR1)、诱捕受体 2(DcR2)、骨保护素(OPG)、死亡受体 4(DR4)和死亡受体

表 2 流式细胞仪检测凋亡率及周期分布

Table 2 The apoptosis rate and the cycle distribution by the flow cytometry

Group	The apoptosis rate	The cycle distribution		
		G1	S	G2
A group	3.24± 0.26	59.42± 2.82	19.76± 0.48	11.98± 0.82
Bgroup	5.83± 0.34	49.48± 0.86	21.12± 2.77	15.14± 2.68
C group	7.43± 0.38	46.49± 2.56	28.41± 1.99	15.64± 1.64
D group	12.13± 0.56	59.03± 0.16	24.42± 2.25	10.55± 2.81

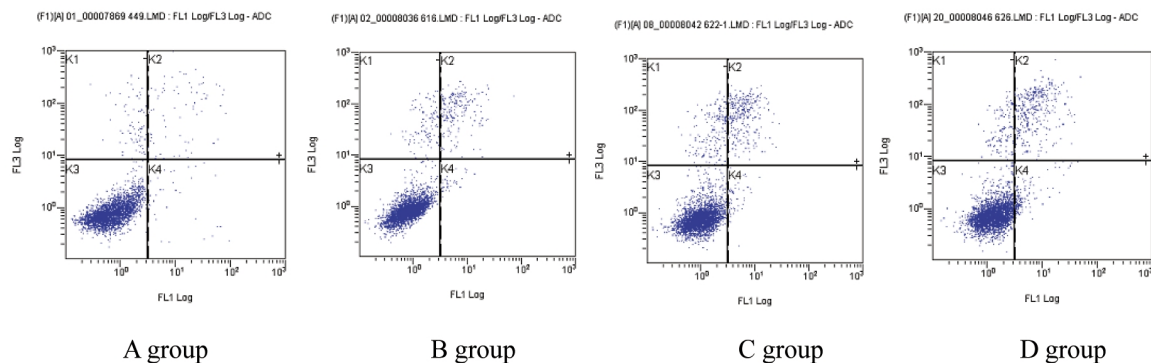


图 2 细胞仪检测细胞凋亡

Fig.2 The apoptosis rate by the flow cytometry

5(DR5)^[4]。死亡受体 4 与死亡受体 5 是凋亡素 2 配体诱导凋亡的相关受体,这两种受体内包含死亡结构域(death domain, DD),能够激活细胞死亡通路;而前三种受体中,由于不存在死亡结构域或者是死亡结构域不完整,无法完成介导凋亡的功能,但能够与 DR4、DR5 竞争性的结合凋亡素 2 配体,从而抑制其促凋亡作用^[5-7]。一般情况下,在正常细胞中高表达的诱捕受体,很少在肿瘤细胞中表达甚至是不表达,而这种表达的差异性保护了正常细胞免于凋亡素 2 配体诱导的凋亡^[8,9]。凋亡素 2 配体诱导细胞凋亡的途径有两种,分别是线粒体依赖途径及非线粒体依赖途径来,两种途径都没有 P53 的参与,其中非线粒体依赖途径是主要的诱导细胞凋亡方式,两条途径最终都是通过激活一系列半胱-天冬氨酸蛋白酶来引起细胞凋亡。

放射治疗是恶性肿瘤综合治疗的重要手段之一,大多数的恶性肿瘤患者在治疗过程中都需要经过放射治疗,但在临床上经过放射治疗后放射野内复发的情况仍然存在,因此寻找一种能够增加放射治疗疗效并无明显毒害反应的干预手段已经成为一种研究热点。凋亡素 2 配体作为一种特异性的选择性诱导肿瘤细胞凋亡的凋亡诱导分子,有望与其他传统抗肿瘤途径联合应用,相互增强抗肿瘤活性和逆转或克服耐药^[10]。国外已有文献报道,凋亡素 2 配体与放射线联合在体外能够提高多种肿瘤细胞的凋亡率,DR4 和或 DR5 的表达增加;在体内则能够减缓或抑制肿瘤生长^[11-13]。但同时也有文献报道,不同的肿瘤细胞对凋亡素 2 配体的敏感性不同,甚至有许多肿瘤细胞表现出抵抗性^[14-17]。

本研究结果表明,凋亡素 2 配体在体外对人肺癌 95-D 细胞具有增殖抑制作用,并且与药物浓度和作用时间有关;放射线与凋亡素 2 配体联合应用,能够提高细胞的凋亡率,与对照组、单用凋亡素 2 配体组及单用放射线组比较,差异均具有统

计学意义;然而周期检测结果显示,4 组细胞周期分布未见明显差别。Patrizia 报道对凋亡素 2 配体敏感的肿瘤细胞,其 24 小时的 $IC_{50} \leq 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[3],而本实验结果的 24 小时 $IC_{50} = 3.09 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,与上述报道有一定的差距,但是从实验结果来看凋亡素 2 配体对 95-D 细胞的增殖抑制作用是肯定的,其差别的原因可能是不同细胞表面的凋亡素 2 配体的死亡受体表达存在差异,导致诱导凋亡作用不同,也验证了不同肿瘤细胞对凋亡素 2 配体敏感性不同这一点。流式细胞仪检测细胞凋亡及周期的结果显示凋亡素 2 配体与放射线联合应用能明显的提高 95-D 细胞的凋亡率,但在各分组中,处于 G1 期及 S 期的细胞占多数,且相互之间的差异无统计学意义,根据放射线对 G2-M 期的细胞杀伤作用最强,且凋亡素 2 配体可以将细胞阻滞在 G2-M 期^[18],因此可以得出结论凋亡素 2 配体联合放射线提高 95-D 细胞的凋亡率并不是通过改变 95-D 细胞周期来发挥其作用的,其作用机制可能是两者的联合应用增强了 95-D 细胞对彼此的敏感性以及降低了放射损伤后细胞的修复能力。另外有资料显示,传统抗肿瘤方法与凋亡素 2 配体联合应用的作用机制可能在于诱导了 P53 促凋亡途径和或抑制抗凋亡途径^[19],但同时也有资料显示,凋亡素 2 配体引起的凋亡过程不需要 P53 的参与^[20],这其中的具体机制尚需要进一步的研究。

目前,肿瘤放射治疗技术已取得了巨大的进步,但在临床应用上仍有其不足之处,凋亡素 2 配体作为一种新生物,其与放射治疗联合应用增加对肿瘤的杀伤作用已经逐渐引起人们的注意,有望成为肿瘤治疗的新方案。

参考文献(References)

- [1] Bouralexis S, Findlay DM, Evdokiou A. Death to the bad guys: Targeting cancer via Apo2L/TRAIL [J]. Apoptosis, 2005, 10(1):35-51
- [2] Wendt J, von Haefen C, Hemmai P, et al. TRAIL sensitizes for ionizing

- irradiation- induced apoptosis through an entirely Bax-dependent mitochondrial cell death pathway [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (25): 4052-4064
- [3] Patrizia M, Verana J, Elise D, et al. Molecular requirements for the combined effects of TRAIL and ionising radiation [J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2003, 68(2):189-198
- [4] Abdulghani J, Allen JE, Dicker DT, et al. Sorafenib Sensitizes Solid Tumors to Apo2L/TRAIL and Apo2L/TRAIL Receptor Agonist Antibodies by the Jak2-Stat3-Mcl1 Axis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9):e75414
- [5] Inoue H, Waiwut P, Saiki L, et al. Gomisin N enhances TRAIL-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptors 4 and 5[J]. *Int J Oncol*, 2012,40(4):1058-1065
- [6] Szliszka E, Ksek M, Czuba ZP, et al. Targeting Death Receptor TRAIL-R2 by Chalones for TRAIL-induced Apoptosis in Cancer Cells[J]. *Int J Sci*, 2012, 13(11):15343-15359
- [7] Engesaeter B, Engebraaten O, Florenes VA, et al. Dacarbazine and the agonistic TRAIL receptor-2 antibody lexatimumab induce synergistic anticancer effects in melanoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45492
- [8] Venza M, Visalli M, Catalano T, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4):743-750
- [9] Bouis D, Kusumanto Y, Meijer C, et al. A review on pro-and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention [J]. *Pharmacological Research*, 2006, 53(2):89-103
- [10] Almasan A, Ashkenazi A. Apo-2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(3):337-348
- [11] Srdjan V, Andrew DC, Michelle AL, et al. Targeting tumour-initiating cells with TRAIL based combination therapy ensures complete and lasting eradication of multiple myeloma tumours in vivo [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(5):1-12
- [12] Momoko T, Hironobu Y, Aki O, et al. X irradiation combined with TNF α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) reduces hypoxic of human gastric adenocarcinoma xenografts in SCID mice [J]. *J Radiat Res*, 2008, 49(2):153-161
- [13] Patrizia M, Angelika S, Verena J, et al. Irradiation specifically sensitises solid tumour cell lines to TRAIL mediated apoptosis [J]. *BMC Cancer*, 2005, 5(5):1471-1482
- [14] Jin CY, Park C, Hong SH, et al. Synergistic induction of TRAIL-mediated apoptosis by anisomycin in human hepatoma cells via the BH3-only protein Bid and c-Jun/AP-1 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2013. 67(4): 321-328
- [15] Venza M, Visalli M, Catalano T, et al. Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4):743-750
- [16] Murai M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, et al. Diallyl trisulfide sensitizes human melanoma cells to TRAIL-induced cell death by promoting endoplasmic reticulum-mediated apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41 (6): 2029-2037
- [17] Szliszka E, Bronikowska J, Jaworska D, et al. Synthetic flavanones augment the anticancer effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. *Molecules*, 2012, 17(10): 11693-11711
- [18] Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, et al. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53 [J]. *Genes Dev*, 2004,18(16):1952-1957
- [19] Kelley K and Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004,4(4):333-339
- [20] Esther HJW, Inge V, Stefan R, et al. TRAIL enhances efficacy of radiotherapy in a p53 mutant, Bcl-2 overexpressing lymphoid malignancy [J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2006, 80(2):214-222

(上接第 3219 页)

- [19] 戴梅, 黄烨, 黄永坤, 等. 支气管肺炎患儿的肠粘膜屏障测定及临床意义[J]. *昆明医科大学学报*, 2013, (6):71-74
- Dai Mei, Huang Ye, Huang Yong-kun, et al. Determination of intestinal mucosal barrier and its clinical significance for children with bronchopneumonia[J]. *Journal of Kunming Medical University*, 2013, (6):71-74
- [20] 贾百灵, 杜兰霞, 褚燕君. 肝硬化患者血清二胺氧化酶和内毒素检测及临床意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(4):344-346
- Jia Bai-ling, Du Lan-xia, Chu Yan-jun. Determination of serum diamine oxidase and endotoxin in cirrhosis patients and its clinical significance[J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2011, 25(4):344-346
- [21] 杨连祥, 张国志, 李曙光, 等. 梗阻性黄疸大鼠血浆二胺氧化酶、D-乳酸与内毒素血症的相关性研究[J]. *华北煤炭医学院学报*, 2011, 13 (1):27-28
- Yang Lian-xiang, Zhang Guo-zhi, Li Shu-guang, et al. The correlation study between the levels of DAO, D-lactic acid in serum and endotoxemia in rats with obstructive jaundice [J]. *J North China Coal Medicine University*, 2011, 13(1):27-28