

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.005

TRAIL 联合多西紫杉醇诱导喉鳞癌 Hep-2 细胞凋亡的实验研究 *

姚鸿超 李秋影 李茗华 冯佳鹏 王婧婷 肖 辉[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院耳鼻咽喉 - 头颈外科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的:观察肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 联合多西紫杉醇应用于人喉鳞癌 Hep-2 细胞生长的抑制增殖和诱导凋亡作用。**方法:**实验分四组,1 组对照组,2 组为应用 TRAIL 组,3 组单独应用多西紫杉醇,4 组联合应用 TRAIL 及多西紫杉醇。分别应用 MTT、流式细胞仪检测细胞凋亡率,倒置显微镜观察细胞的形态学改变。**结果:**TRAIL 与多西紫杉醇联合作用于 Hep-2 细胞,能显著增强对 Hep-2 细胞的杀伤、抑制增殖及诱导凋亡作用,其联合应用的凋亡抑制率明显高于单独应用 TRAIL 组和多西紫杉醇组 ($P<0.05$)。**结论:**TRAIL 与多西紫杉醇联用能显著提高对喉鳞癌 Hep-2 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用。

关键词:肿瘤坏死因子相关诱导凋亡配体;多西紫杉醇;Hep-2 细胞;凋亡

中图分类号:R739.65 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3619-03

Effects of TRAIL and Docetaxel on Cellular Apoptosis of Human Laryngeal Squamous Carcinoma Cells*

YAO Hong-chao, LI Qiu-ying, LI Ming-hua, FENG Jia-peng, WANG Jing-ting, XIAO Hu[△]

(Department of Otolaryngology Head&Neck Surgery, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the apoptosis inducing effect by tumor necrosis factor related apoptosis-ligand (TRAIL) and docetaxel on human laryngeal squamous carcinoma Hep-2 cells. **Methods:** Four groups were divided to conduct the experiment: Group 1 as control group, TRAIL applied to Group 2, docetaxel applied to Group 3, and TRAIL combined with docetaxel for Group 4. Apoptosis rate was detected by using MTT and FCM, and morphological changes were observed with inverted microscope. **Results:** TRAIL and docetaxel combination in Hep 2 cells, can significantly enhance the Hep-2 cells of destruction, inhibit proliferation and induce apoptosis, apoptosis inhibition rate of the joint application was obviously higher than that of single application of TRAIL and docetaxel group ($P<0.05$). **Conclusion:** The combination of TRAIL and docetaxel could significantly increase apoptosis effects on human laryngeal squamous carcinoma cells.

Key words: TRAIL; Docetaxel; Hep-2; Apoptosis

Chinese Library Classification: R739.65 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3619-03

前言

随着恶性肿瘤发病率的逐年升高,每年因恶性肿瘤而导致的死亡人数也不断增加。喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,其发病率逐年增高。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (Tumor necrosis factor related apoptosis-ligand, TRAIL) 是新近发现的肿瘤坏死因子家族成员^[1-3]。可以诱导肿瘤细胞发生凋亡,而对正常组织细胞无明显毒副作用,使其成为了肿瘤治疗研究的新热点^[4-6]。研究发现,多种肿瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡存在抵抗,而某些化疗药物能够在一定程度上克服肿瘤细胞对 TRAIL 的耐受^[7,8]。为此,我们将多西紫杉醇与 TRAIL 联合及单独作用于喉鳞癌 Hep-2 细胞,观察两者是否存在协同作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 喉鳞癌 Hep-2 细胞来源于中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.1.2 试剂 多西紫杉醇由法国罗纳普朗克制药公司生产,人重组 TRAIL 蛋白购自 Sigma 公司,1640 培养液由 Gibco 公司购得;胎牛血清,胰酶,青链霉素等,PBS,MTT,Rnase,DMSO,碘化丙啶,二甲基亚砷等购自上海生工生物有限公司。

1.1.3 仪器 CO₂ 恒温培养箱、净化工作台、酶联免疫检测仪, FACSCalibur 型流式细胞仪、TMS-F 型倒置显微镜等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将 Hep-2 细胞培养于含 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI-1640 中,培养箱温度为 37℃,其中 CO₂ 饱和度为 5%,细胞生长达到对数期后用于以下实验中。

1.2.2 MTT 法检测细胞抑制率 将 Hep-2 细胞消化制悬,调细

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11541177)

作者简介:姚鸿超(1977-),女,博士,副教授,主要研究方向:喉肿瘤的治疗

△ 通讯作者:肖辉,电话:0451-86605832, E-mail: ybbxuz2001@163.com

(收稿日期:2014-01-16 接受日期:2014-02-15)

胞浓度至 1×10^5 个/L, 分别接种培养于 96 孔板内, 每孔为 100 μL , 使细胞孵育过夜, 至贴壁, 然后于每孔内分别滴加不同浓度 TRAIL (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 ng/mL) 培养液, 每种浓度设 10 个复孔, 同时设定调零孔、对照孔, 24 小时后, 加入 MTT 液, 继续板内培养 4 个小时, 去除孔内残液, 每孔加 DMSO 150 μL , 震荡, 酶标仪检测吸光度 A 值, 绘制生长曲线。细胞抑制率 $= (1 - \text{加药孔细胞 A 值} / \text{对照孔细胞 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 倒置显微镜观察 将培养细胞分四组: 对照组 (1 组) 加入正常无药物的培养液、应用 TRAIL 组 (2 组)、应用多西紫杉醇组 (3 组) 以及二者联合组 (4 组), 依照 MTT 结果选择 TRAIL 浓度为 60 ng/mL, 多西紫杉醇浓度 10 $\mu\text{g/mL}$, 继续培养 24 小时, 镜下观察正常 Hep-2 细胞与应用药物后细胞的微观形态学改变。

1.2.4 流式细胞仪检测 将细胞按浓度 1×10^7 个/瓶接种到培养瓶中, 细胞贴壁后, 吸除培养液, PBS 洗, 分别加正常培养液 (1 组)、TRAIL 培养液 (2 组)、多西紫杉醇培养液 (3 组)、以及二者联合的培养液 (4 组), 其中 TRAIL 选择浓度为 60 ng/mL, 多西紫杉醇浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 再培养 24 小时, 收集细胞, PBS 洗, 冰乙醇固定, 加 RNase, 机检前加 PI 遮光染色 30 分钟, 过 100 目网, 调细胞浓度达到 1×10^6 个/L, 上机检测细胞的凋亡发生率。

1.3 统计分析

结果采用 SPSS12.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间均数的比较采用 t 检验, 三组以上样本间采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测

通过实验观察发现 TRAIL 对 Hep-2 细胞生长的抑制具有一定的浓度依赖, TRAIL 浓度增加, 细胞的生长受抑制也越明显。TRAIL 作用 24 小时后, 细胞生长抑制率可达到 $62.75 \pm 1.00\%$ (如表 1)。

表 1 MTT 结果显示 TRAIL 对喉鳞癌 Hep-2 细胞抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The inhibition ratio of Hep-2 cells determined by MTT colorimetric assay

TRAIL 浓度 (ng/mL)	Hep-2 细胞生长抑制率 (%)
The concentration of TRAIL (ng/mL)	The inhibition ratio of Hep-2 cells (%)
0	0
10	2.01 ± 1.19
20	6.46 ± 3.69
40	16.15 ± 2.16
60	29.23 ± 1.41
80	37.34 ± 1.64
100	62.75 ± 1.00

2.2 倒置显微镜观察

1 组 Hep-2 细胞生长旺盛, 胞间连接紧密, 密度明显增加, 细胞形态好: 胞核大, 膜清晰, 胞质分布均匀 (如图 1)。2 组细胞密度发生一定的改变, 细胞大小基本一致, 少部分细胞染色质

分布不均: 细胞变圆、皱缩、核发生浓缩, 与周围细胞联系消失而悬浮于培养液中 (如图 2); 实验第 3 组细胞密度降低, 细胞大小有差异, 一部分染色质浓缩, 细胞浆浓淡不均 (如图 3); 4 组的细胞, 密度明显降低, 细胞形态不规则, 多数细胞发生凋亡改变: 核染色质浓缩边集, 部分胞膜不完整, 细胞皱缩 (如图 4)。

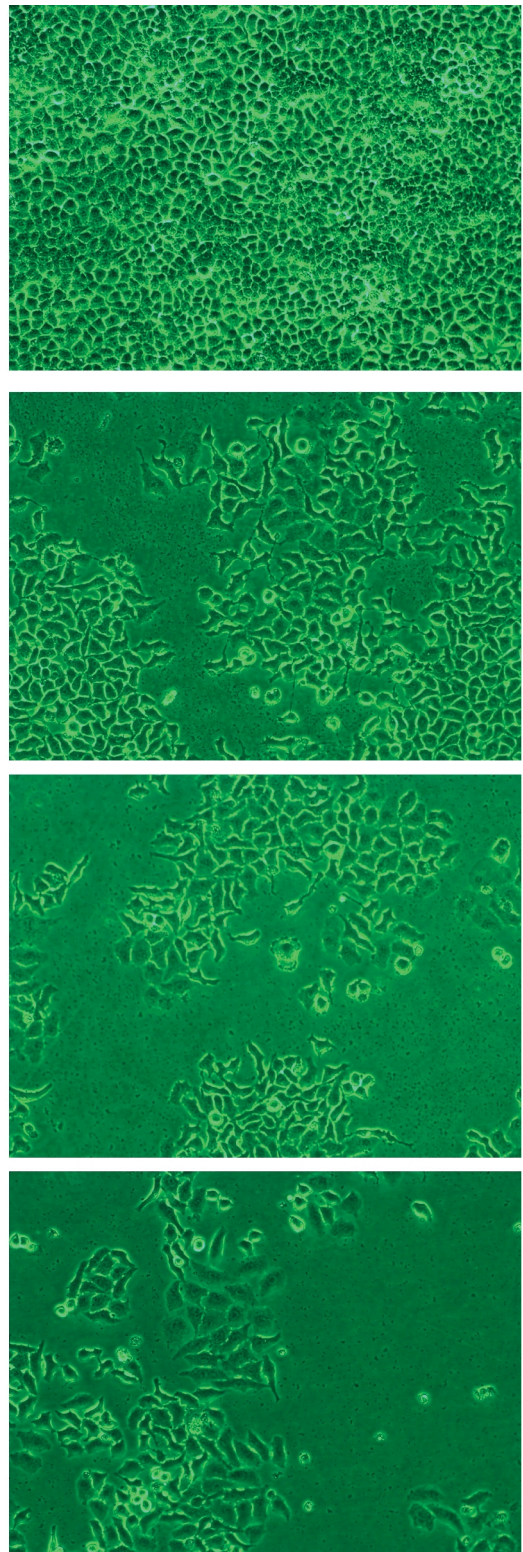


图 1 对照组细胞, 2. 应用 TRAIL 的喉癌细胞 3. 应用 TXT 的喉癌细胞 4. 联合应用组的喉癌细胞 ($\times 400$)

Fig. 1 Control group. 2. The Hep-2 cells was treated with TRAIL. 3. The Hep-2 cells was treated with TXT. 4. The Hep-2 cells was treated with TRAIL and TXT ($\times 400$)

2.3 流式细胞仪检测

实验结果显示,单独应用 TRAIL 时,Hep-2 细胞凋亡率为 $34.18 \pm 0.31\%$,单独应用多西紫杉醇,细胞凋亡率为 $46.17 \pm 1.06\%$ 。TRAIL 与多西紫杉醇联用,细胞凋亡率可以达到 71.43 ± 1.15 。与 2、3 组直接比较,有统计学意义($P < 0.01$) (见表 2)。

表 2 流式细胞仪检测 TRAIL 单独及联合多西紫杉醇作用后细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The apoptosis ratio of Hep-2 cells determined by flow cytometry method

分组 Group	细胞凋亡发生率(%) The apoptosis ratio of Hep-2(%)
1 Control group	3.13 ± 0.12
2 TRAIL group	34.18 ± 0.31
3 TXT group	46.17 ± 1.06
4 T+T group	71.43 ± 1.15

*注:其中 4 组与 2、3 组对比, $P < 0.01$

*Note: $P < 0.01$, 4 T+T group compared with TRAIL group; 4 T+T group compared with TXT group

3 讨论

TRAIL 是新发现的 TNF 家族新成员之一,其抗癌谱广。目前的研究表明,其对于肝、肺、肾、卵巢、乳腺、骨髓、结肠、前列腺、皮肤等恶性肿瘤细胞有抑制生长和诱导凋亡的作用,对其中正常细胞无明显的抑制作用,使其应用于临床抗肿瘤治疗成为可能^[1-4,9,10]。TRAIL 并不能诱导所有肿瘤细胞发生凋亡,单独使用其抑瘤率仍然受肿瘤细胞自身性质的限制,同一肿瘤细胞系的细胞对 TRAIL 的敏感性也会有不同。因此有必要通过进一步的研究改变 TRAIL 的耐药现象,提高其对药物的敏感性。而怎样提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性成为近来研究较多的课题,药物干预是实验首选。当肿瘤细胞对 TRAIL 不敏感时,其药物可增强其敏感性,临床常用化疗药物成为与 TRAIL 联合应用的选择。研究发现 TRAIL 与某些化疗药物存在协同,联合应用既可增强 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡,又可减轻肿瘤细胞对化疗药物的耐药性,从而减少化疗药的剂量,降低毒副作用。

多西紫杉醇是近年应用较多的广谱抗肿瘤药物,其从红豆杉的针叶中提取经过化学修饰而得到的抗肿瘤药物^[11,12]。其作用机制主要通过促微管聚合形成稳的微管聚合物,抑制解聚,减少游离的微管数量,抑制纺锤体分离,阻滞细胞 G2 和 M 期,从而抑制肿瘤细胞增殖^[13]。其独特的药理作用日益引起临床重视,成为了治疗多种肿瘤的热点药物。

本实验研究发现,多西紫杉醇与 TRAIL 联合,呈现出高效诱导 Hep-2 细胞凋亡的作用,其联合作用效果明显。MTT 实验显示,TRAIL 对喉癌细胞有一定的凋亡诱导作用,并且存在着浓度依赖。当 TRAIL 浓度为 100 ng/mL 时细胞抑制率可达到 $62.75 \pm 1.00\%$,表明喉癌细胞对 TRAIL 作用敏感。但也存在浓度达到了 60 ng/mL 后,其抑瘤效果增强幅度不显著,说明单独

应用 TRAIL,抑制喉癌细胞的生长存在局限性。目前的研究中表明,肿瘤细胞对 TRAIL 产生抵抗的机制还不完全清楚,但可能是与其受体 DcR2 高表达或者 DR4 的低表达有关^[14,15]。流式细胞仪检测显示,在联合多西紫杉醇后抑瘤率显著增强,肿瘤细胞抑制率达到了 $71.43 \pm 1.15\%$,与单独应用组相比差异具有显著性意义,这表明二者联合应用具有协同抑制喉癌的作用^[16-18]。

以往的研究中,不同的实验尝试了 TRAIL 与多种化疗药物对恶性肿瘤联合的作用^[9],但对于喉癌的应该研究目前仍较少。而单独应用 TRAIL 作用于喉癌,其抑瘤效果仍较局限。本研究应用了多西紫杉醇与 TRAIL 联合,增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性的同时还可减少化疗药物的使用剂量,使化疗中药物的不良反应及耐药性都得到控制,为二者能成功应用于临床肿瘤治疗提供了可能^[20-22]。

以上实验初步表明,TXT 与 TRAIL 联合应用具有诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡的作用。而 TRAIL 对肿瘤细胞选择性杀伤而对正常组织没有明显毒性作用这一特征,为 TRAIL 与化疗药物联用于喉癌的临床治疗提供了一定的实验参考。

参考文献(References)

- [1] Lawrence D, Shahrokhi Z, Marsters S, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions [J]. Nat Med, 2001, 7(4): 383-385
- [2] Hwang MK, M in YK, Kim SH. Calmodulin inhibition contributes to sensitize TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer H 1299 cells[J]. Biochem Cell Biol, 2009, 87(6): 919-926
- [3] Zhuang L, Lee CS, Scolyer RA, et al. Progression in melanoma is associated with decreased expression of death receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand [J]. Hum Pathol, 2006, 37(10): 1286-1294
- [4] Frank B, Shanmugam KS, Beckmann L, et al. Death receptor 4 variants and colorectal cancer risk [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15(10): 2002-2005
- [5] Duiker EW, Mom CH, de Jong S, et al. The clinical trial of TRAIL[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(14): 2233-2240
- [6] Teng MS, Brandwein-Gensler MS, Teixeira MS, et al. A study of TRAIL receptors in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2005, 131(5): 407-412
- [7] Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K, et al. Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Hepatology, 2000, 32(3): 482-490
- [8] Ramalingam S S, Dahlberg S E, Langer C J. Outcomes for elderly, advanced stage on small cell lung cancer patients treated with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel analysis of Eastern Cooperative Oncology Group Trial4599[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(1): 60-65
- [9] 姚鸿超, 肖辉, 李茗华, 等. TRAIL 联合多西紫杉醇对人鼻咽癌 CNE2 细胞的体外作用研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1058-1059
- Yao Hong-chao, Xiao Hui, Li Ming-hua, et al. Synergistic Interactions of TRAIL and Docetaxel on the Nasopharyngeal Carcinoma Cell line in vitro [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(6): 1058-1059

(下转第 3630 页)

- [12] Ning H, Huang Y C, Banie L, et al. MicroRNA regulation of neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stem cells [J]. Differentiation, 2009, 78(5): 253-259
- [13] Abdanipour A, Tiraihi T. Induction of adipose-derived stem cell into motoneuron-like cells using selegiline as preinducer [J]. Brain Res, 2012, 1440: 23-33
- [14] Saygili E, Schauerte P, Kuppers F, et al. Electrical stimulation of sympathetic neurons induces autocrine/paracrine effects of NGF mediated by TrkA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 49(1): 79-87
- [15] Ou Y T, Lu M S, Chiao C C. The effects of electrical stimulation on neurite outgrowth of goldfish retinal explants [J]. Brain Res, 2012, 1480: 22-29
- [16] Chang Y J, Hsu C M, Lin C H, et al. Electrical stimulation promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth and signaling [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(8): 4130-4136
- [17] Park J S, Yang H N, Woo D G, et al. Exogenous Nurr1 gene expression in electrically-stimulated human MSCs and the induction of neurogenesis[J]. Biomaterials, 2012, 33(29): 7300-7308
- [18] Yamada M, Tanemura K, Okada S, et al. Electrical stimulation modulates fate determination of differentiating embryonic stem cells [J]. Stem Cells, 2007, 25(3): 562-570
- [19] McCullen S D, Mcquilling J P, Grossfeld R M, et al. Application of low-frequency alternating current electric fields via interdigitated electrodes: effects on cellular viability, cytoplasmic calcium, and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2010, 16(6): 1377-1386
- [20] Huang J, Lu L, Zhang J, et al. Electrical stimulation to conductive scaffold promotes axonal regeneration and remyelination in a rat model of large nerve defect[J]. PLoS One, 2012, 7(6): e39526
- [21] Qi F, Wang Y, Ma T, et al. Electrical regulation of olfactory ensheathing cells using conductive polypyrrole/chitosan polymers[J]. Biomaterials, 2013, 34(7): 1799-1809

(上接第 3621 页)

- [10] Carrington P E, Sandu C, Wei Y, et al. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-2[J]. Mol Cell, 2006, 22(5): 599
- [11] Mhaidat NM, Wang Y, Kiejda KA, et al. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2 [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(2): 752-761
- [12] Bafaloukos D, Aravantinos G, Fountzilias G, et al. Docetaxel in combination with dacarbazine in patients with advanced melanoma [J]. Oncology, 2002, 63(4): 333-337
- [13] Fruehauf JP, Kong KM, Jakowatz JG. Docetaxel and vinorelbine plus GM-CSF in malignant melanoma[J]. Oncology (Williston Park), 2005, 19(42): 19-22
- [14] Sanlioglu AD, Dirice E, Elpek O, et al. High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients [J]. Pancreas, 2009, 38(2): 154-160
- [15] Kurbanov BM, Fecker LF, Geilen CC. Resistance of melanoma cells to TRAIL does not result from upregulation of antiapoptotic proteins by NF-kappaB but is related to downregulation of initiator caspases and DR4[J]. Oncogene, 2007, 26(23): 3364-3377
- [16] Frank B, Hemminki K, Shanmugam KS, et al. Association of death receptor 4 haplotype 626C-683C with an increased breast cancer risk [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(11): 1975-1977
- [17] Wolf S, Mertens D, Pscherer A, et al. Ala228 variant of trail receptor 1 affecting the ligand binding site is associated with chronic lymphocytic leukemia, mantle cell lymphoma, prostate cancer, head and neck squamous cell carcinoma and bladder cancer [J]. Int J Cancer, 2006, 118(7): 1831-1835
- [18] Kuraoka K, Matsumura S, Sanada Y, et al. A single nucleotide polymorphism in the extracellular domain of TRAIL receptor DR4 at nucleotide 626 in gastric cancer patients in Japan [J]. Oncol Rep, 2005, 14(2): 465-470
- [17] Stuckey DW, Shah K, TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy[J]. Trends Mol Med, 2013, 26(13): 154-158
- [18] Lee DH, Lee CS, Kim DW, et al. Digitoxin sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by upregulation of death receptor 5 and downregulation of survivin[J]. Anticancer Drugs, 2013, 16
- [19] 毛淑华, 于水静, 晏菊芳, 等. 5-Fu 与 TRAIL 联用抗结肠癌细胞株 HT-29 效应的实验研究[J]. 华西药理学杂志, 2010, 25(5): 564-566
- Mao Shu-hua, Yu Shui-jing, Yan Ju-fang, et al. Synergistic antitumor effect of TRAIL and 5-Fu on the colon carcinoma cell line HT-29 [J]. West china journal of pharmaceutical sciences, 2010, 5(5): 564-566
- [20] Krut FA. TRAIL and cancer therapy [J]. Can Lett, 2008, 263(1): 14-25
- [21] Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(7): 501-507
- [22] Yoo J, Park SS, Lee YJ. Pretreatment of docetaxel enhances TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells [J]. Cell Biochem, 2008, 104(5): 1636-1646