

· 实验研究 ·

Caspase-8 和 DR5 在 TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞凋亡中的作用

佟海侠¹, 张继红¹, 马力², 陆春伟³, 张锦华¹

(中国医科大学盛京医院 1. 检验科; 2. 感染科, 辽宁 沈阳 110004;
3. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)能诱导多种肿瘤细胞凋亡而对正常细胞无诱导凋亡作用。大多数神经母细胞瘤细胞株对 TRAIL 的诱导凋亡作用耐受与其 Caspase-8 表达缺失有关,也与细胞表面 TRAIL 受体的表达和分布有关。该文主要探讨 Caspase-8 及 TRAIL 受体 DR5 的表达在 TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞株 SKNDZ 凋亡中的作用及其发生机制。方法 应用 RT-PCR 方法检测 IFN- γ 作用前后 SKNDZ 细胞 Caspase-8 的表达;应用 Western-Blot 方法检测化疗药作用前后 SKNDZ 细胞 DR5 的表达;应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法及流式细胞仪(FCM)检测 TRAIL、IFN- γ + TRAIL、化疗药 + TRAIL 及化疗药 + IFN- γ + TRAIL 对 SKNDZ 细胞生长及凋亡的影响。结果 SKNDZ 细胞不表达 Caspase-8, IFN- γ 作用后的 SKNDZ 细胞 Caspase-8 表达明显增加。对照组未检测到 DR5 蛋白表达,而阿霉素和依托泊苷处理后检测到 DR5 蛋白表达。表达 Caspase-8 的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用仍不敏感,而同时表达 Caspase-8 和 DR5 的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 的诱导凋亡作用敏感。阿霉素/依托泊苷 + IFN- γ + TRAIL 组早期凋亡率为: $(17.9 \pm 3.6)\%$ 、 $(14.8 \pm 3.3)\%$, 与 IFN- γ + TRAIL 组 $(3.9 \pm 1.2)\%$ 比较,差异有显著性($F = 26.233, P < 0.01$)。结论 同时表达 Caspase-8 和 DR5 的 SKNDZ 细胞恢复了对 TRAIL 的敏感性, Caspase-8 和 DR5 在 TRAIL 诱导 SKNDZ 细胞凋亡中起着十分关键的作用。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 327-330]

[关键词] 神经母细胞瘤; 凋亡; TRAIL; Caspase-8; DR5

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)04-0327-04

Role of caspase-8 and DR5 in TRAIL-induced apoptosis of neuroblastoma cells

TONG Hai-Xia, ZHANG Ji-Hong, MA Li, LU Chun-Wei, ZHANG Jin-Hua. Department of Clinical Laboratory, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Zhang J-H, Email: zhangjinhua@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces cell death in a variety of tumors but not in normal cells. TRAIL-resistance of most neuroblastoma (NB) cell lines is related to the loss of caspase-8 expression and the expression and distribution of membrane TRAIL-receptors. This study investigated the role of caspase-8 and DR5 in TRAIL-induced apoptosis of NB cell line SKNDZ. **Methods** The expression of caspase-8 mRNA was detected by RT-PCR. The expression of DR5 protein was detected by Western Blot analysis. The effects of TRAIL, IFN- γ + TRAIL, chemotherapeutic agent (adriamycin or etoposide) + TRAIL, and chemotherapeutic agent + TRAIL + IFN- γ on the growth and apoptosis of SKNDZ cells were detected by MTT assay and flow cytometry. **Results** caspase-8 was not expressed in SKNDZ cells but IFN- γ treatment resulted in an increase of caspase-8 expression. Expression of DR5 protein was not detected in SKNDZ cells but an increased DR5 protein expression was found after treatment with adriamycin or etoposide. The SKNDZ cells expressing caspase-8 were not sensitive to TRAIL but those SKNDZ cells expressing both caspase-8 and DR5 were sensitive. The early apoptosis rates of the adriamycin/etoposide + IFN- γ + TRAIL groups [$(17.9 \pm 3.6)\%$, $(14.8 \pm 3.3)\%$] were higher than that of the IFN- γ + TRAIL group [$(3.9 \pm 1.2)\%$] ($F = 26.233, P < 0.01$). **Conclusions** SKNDZ cells expressing both caspase-8 and DR5 restored the TRAIL sensitivity. caspase-8 and DR5 play a key role in TRAIL-induced apoptosis of NB cells. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(4): 327-330]

Key words: Neuroblastoma; Apoptosis; TRAIL; Caspase-8; DR5

[收稿日期] 2005-11-29; [修回日期] 2006-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(39470739), 卫生部科学研究基金(20122167), 辽宁省博士启动、自然科学基金(20041047), 辽宁省教育厅科研基金资助(202013121)

[作者简介] 佟海侠, 女, 博士, 讲师。主攻方向: 小儿血液肿瘤。

[通讯作者] 张锦华, 教授, 中国医科大学盛京医院检验科。邮编: 110004。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子超家族中的一员,由于 TRAIL 能诱导多种肿瘤细胞与转化细胞发生凋亡而对正常细胞无凋亡诱导作用^[1],因而成为肿瘤研究领域的热门课题之一。有研究发现,大多数神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)细胞株对 TRAIL 的诱导凋亡作用耐受,并认为这种耐药与其半胱-天冬氨酸蛋白酶 8(Caspase-8)表达缺失有关,也与细胞表面 TRAIL 受体的表达和分布有关^[2]。TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡是通过粘附于死亡受体 DR5/DR4 完成的,正常生理条件下 DR5 与 TRAIL 的亲合力明显大于 DR4^[3];Karacay^[4]以腺病毒为载体对 NB 细胞转染 TRAIL 基因导致细胞凋亡,经 RT-PCR 和流式细胞仪证实 TRAIL 的效应主要是通过死亡受体 DR5 实现的。因此 DR5 在传递 TRAIL 的死亡信号、诱导肿瘤细胞凋亡方面的作用尤为重要。为探讨 TRAIL 诱导 NB 细胞凋亡与 Caspase-8 及 DR5 表达之间的关系,我们用 IFN γ 、TRAIL 和化疗药物联合作用于 NB 细胞株 SKNDZ,探讨 NB 细胞对 TRAIL 抵抗的分子机制,以及 IFN γ 、化疗药物与 TRAIL 联用是否可以克服肿瘤耐药性,为 TRAIL 的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

人神经母细胞瘤细胞株 SKNDZ 由美国国立卫生研究院 Carol J. Thiele 教授提供。重组人可溶性 TRAIL、IFN γ 均购自 Pepro Tech 公司,抗 DR5 抗体购自 Abcam 公司,阿霉素、依托泊苷购自 Sigma 公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂为 Sigma 公司产品,Annexin-V-FITC 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 RT-PCR 检测 Caspase-8 mRNA 的表达

收获 100 μ g/L IFN γ 处理 12, 24, 48 h 的 SKNDZ 细胞,按 TRIZOL 试剂盒说明书抽提细胞总 RNA, RT-PCR 按照 TaKaRa 逆转录试剂盒说明书进行操作。Caspase-8 引物设计参照文献^[6]。PCR 产物电泳后,用 TanonGIS-2020 型凝胶扫描成像分析系统扫描 PCR 产物强度,以 Caspase-8 密度/ β -actin 密度比值表示 Caspase-8 mRNA 的相对含量。

1.3 Western-Blot 检测 DR5 蛋白的表达

收获 0.5 mg/L 阿霉素、5 mg/L 依托泊苷处理

24 h 后的 SKNDZ 细胞,提取蛋白质后,各取样品 50 μ L 蛋白定量,以浓度最低管为基准调节蛋白浓度后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。每孔加入样品 40 μ L,恒压 100 V 电泳至分离胶底部,转印到硝酸纤维素(NC)膜上;NC 膜在一抗(1:400 稀释的兔抗人 DR5 抗体)溶液中 4 $^{\circ}$ C 浸泡过夜,然后转到 1:1 000 稀释的羊抗兔碱性磷酸酶标记的二抗溶液中室温浸泡 2 h;加入碱性磷酸酶的底物反应,染色至条带呈现,终止染色。用 TanonGIS-2020 型凝胶图像分析系统扫描后进行灰度值分析,重复 3 次。

1.4 MTT 细胞毒实验

经阿霉素(0.5 mg/L)、依托泊苷(5 mg/L)处理 24 h 后存活的 SKNDZ 细胞,以 1×10^5 /mL 的细胞浓度接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后实验分组如下:对照组(未用化疗药处理),阿霉素组,依托泊苷组。各组均用 TRAIL(200 μ g/L)、IFN γ (100 μ g/L)、IFN γ (100 μ g/L) + TRAIL(50, 200 μ g/L)处理 48 h。同时设空白对照组(不加细胞,只加 DMSO)。按实验步骤结束加药后,每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后,吸去上清,每孔加 150 μ L DMSO,震荡 15 min 后于 1 h 内在酶标仪测其波长 570 nm 吸光度(A 值),每组设 4 个复孔,取 4 次实验的平均值。各组细胞抑制率(%)为:

$[1 - (\text{实验组吸光度} - \text{空白组吸光度} / \text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度})] \times 100\%$

1.5 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞,以 1×10^5 /mL 的细胞浓度接种于培养瓶中,每瓶 5 mL,培养 24 h 后分 3 组: IFN γ + TRAIL 组(100 μ g/L IFN γ + 200 μ g/L TRAIL 处理 48 h)、阿霉素/依托泊苷 + IFN γ + TRAIL 组(0.5 mg/L 阿霉素或 5 mg/L 依托泊苷处理 24 h,再加 100 μ g/L IFN γ 和 200 μ g/L TRAIL 处理 48 h)。加药处理结束后收获细胞, PBS 洗两遍后,用 250 μ L 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节细胞浓度为 10^6 /mL;取 100 μ L 细胞悬液于流式管中,加 5 μ L Annexin-V 和 10 μ L PI,室温下闭光染色 15 min 后,再加 400 μ L PBS,流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。每组实验重复 3 次,取 3 次实验的平均值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IFN γ 对 SKNDZ 细胞 Caspase-8 表达的影响

IFN γ 作用不同时间后 Caspase-8 mRNA 的表达见图1。对照组未检测到 Caspase-8 mRNA 的表达,而 IFN γ 处理组在 386 bp 片段处出现不同亮度的泳带,处理 12, 24, 48 h Caspase-8/ β -actin 平均 A 值之比分别为 0.658, 1.608, 2.167, 各组间差异均有显著性 ($F = 50.104$, 均 $P < 0.01$), 说明 Caspase-8 mRNA 表达随 IFN γ 作用时间延长而逐渐升高。

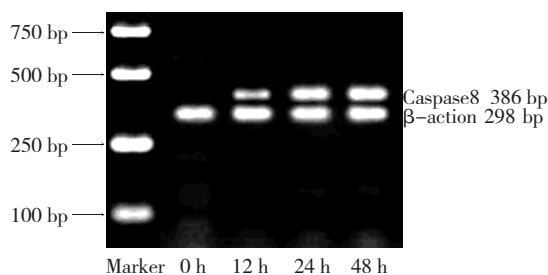


图1 RT-PCR 检测 IFN γ 对 Caspase-8 表达的调节作用。对照组未检测到 Caspase-8 mRNA 的表达, IFN γ 处理 12, 24, 48 h 后检测到 Caspase-8 mRNA 的表达, 且表达水平随 IFN γ 作用时间延长而逐渐升高。

2.2 Western-Blot 检测 DR5 蛋白的表达

对照组未检测到 DR5 蛋白表达, 而阿霉素、依托泊苷处理 24 h 后检测到 Caspase-8 蛋白表达(图2)。

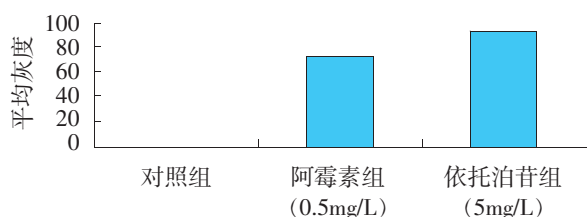


图2 化疗药处理后 DR5 蛋白的表达。对照组未检测到 DR5 蛋白表达, 而阿霉素、依托泊苷处理 24 h 后检测到了 DR5 蛋白表达。

2.3 MTT 比色法结果

TRAIL 组和 IFN γ + TRAIL (200 μ g/L) 组细胞抑制率分别为 (6.5 $\pm$ 1.3)% 和 (8.9 $\pm$ 1.8)%, 说明 SKNDZ 细胞对 TRAIL 及 IFN γ + TRAIL 均不敏感。化疗药预选后的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 虽不敏感, 但对 IFN γ + TRAIL 的联合作用敏感, 联合用药组与单用 TRAIL 组相比差异显著 ($F = 54.758$, 均 $P < 0.01$); 化疗药预选后的 SKNDZ 细胞 IFN γ + TRAIL 组细胞抑制率明显高于对照组 ($F = 65.771$, 均 $P < 0.01$) (图3)。

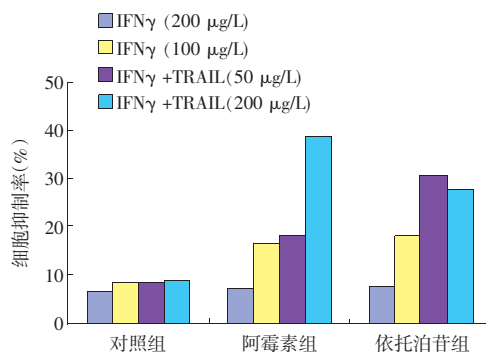


图3 各组细胞抑制率。化疗药预处理后的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 虽不敏感, 但对 IFN γ + TRAIL 的联合作用敏感, 联合用药组与单用 TRAIL 组相比差异显著; 化疗药预选后的 SKNDZ 细胞 IFN γ + TRAIL 组细胞抑制率明显高于对照组。

2.4 细胞凋亡检测结果

IFN γ + TRAIL 组、阿霉素/依托泊苷 + IFN γ + TRAIL 组早期凋亡率依次为: (3.9 $\pm$ 1.2)%、(17.9 $\pm$ 3.6)%、(14.8 $\pm$ 3.3)%。经化疗药预选后的 SKNDZ 细胞对 IFN γ + TRAIL 联合作用的敏感性增强, 后者凋亡率显著高于前者 ($F = 26.233$, $P < 0.01$)。

3 讨论

NB 是发病率和死亡率较高的儿童实体肿瘤, 高危生物学因素及临床特征包括 N- myc 扩增及肿瘤晚期等^[5]。近年来尽管低危 NB 患儿的预后明显改善, 但高危患儿的预后仍然较差, 其中对传统化疗耐药和肿瘤转移扩散是临床面临的主要难题。因此采用联合用药法已被公认为是克服化疗耐药的好办法。TRAIL 的选择性诱导肿瘤细胞凋亡的特性使其具有良好的临床应用前景, 而且已有研究报道^[6] TRAIL 与 IFN γ 或细胞毒药物联用可明显提高各种耐药的肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。

目前已发现的 TRAIL 受体主要有两大类, 一类是死亡受体 (death receptor) DR4 和 DR5, 另一类是诱捕受体 (decoy receptor) DcR1 和 DcR2。DR4 和 DR5 包含细胞内死亡区域, 它对 TRAIL 及其受体诱导的凋亡是必需的。诱捕受体与死亡受体结构上相似, 但缺乏功能性的细胞内死亡区域, DcR1 完全缺乏细胞内死亡区, DcR2 包含一个非功能性死亡区, 二者可粘附于 TRAIL, 但不引起凋亡的级联反应。死亡受体 DR4、DR5 的活化导致 Caspase-8 的激活, 通过细胞内一种叫做 FAS 相关蛋白的细胞内媒介

蛋白,活化的 Caspase-8 直接激活效应 caspase-3,引起 NB 细胞凋亡^[7]。TRAIL 受体胞内信号传递过程尚不完全清楚,但认为死亡受体和 Caspase-8 起关键的作用。

本研究证实 NB 细胞株 SKNDZ 细胞对 TRAIL 抵抗。NB 细胞对 TRAIL 抵抗的主要原因是 Caspase-8 表达的缺失,也可能是细胞内存在死亡受体缺陷或凋亡抑制蛋白如 FLIP 阻断凋亡级联反应^[8]。Kontny^[9]等在研究 Ewing's 瘤中发现,对 TRAIL 抵抗的细胞其 Caspase-8 mRNA 和蛋白表达水平都很低。Mitsiades^[10]等在研究多发性骨髓瘤细胞时也发现了类似的情况,因此认为 TRAIL 凋亡信号通路中 Caspase-8 是上游 caspase 分子。有研究报道^[11,12]用 IFN γ 诱导 NB 细胞 Caspase-8 表达可使一些不表达或低表达 Caspase-8 的 NB 细胞对 TRAIL、TNF 或化疗药的诱导凋亡敏感,并且证明 IFN γ 在转录水平调节 Caspase-8 表达。Yang^[2]等发现 IFN γ 处理 NB 细胞诱导 Caspase-8 表达后仅有一种细胞株对 TRAIL 的诱导凋亡敏感,进一步研究发现这些耐药的细胞株低表达或不表达死亡受体 DR4、DR5。

本实验观察到 SKNDZ 细胞不表达 Caspase-8 和 DR5,因此对 TRAIL 的诱导凋亡作用不敏感,并且观察到经 IFN γ 处理恢复 Caspase-8 表达的 SKNDZ 细胞对 TRAIL 仍不敏感。考虑到无论凋亡信号在细胞内如何传递,TRAIL 要发挥诱导细胞凋亡作用必须首先与死亡受体结合,即细胞表面 TRAIL 受体表达水平及功能对 TRAIL 的介导凋亡至关重要。因此我们进一步研究恢复 DR5 的表达是否可以增强 NB 细胞对 TRAIL 的敏感性。结果发现缺乏 DR5 表达的 SKNDZ 细胞经化疗药处理后表达 DR5 蛋白,并且对 IFN γ + TRAIL 的共同处理敏感。说明在 DR5 和 Caspase-8 表达均恢复后,SKNDZ 对 TRAIL 的诱导凋亡作用敏感。DR5 表达受肿瘤抑制蛋白 p53 调节,目前应用的抗癌药大多是能激活 p53 的 DNA 损伤因子,应用激活 p53 的药物与 TRAIL 联用被认为可引起肿瘤有效退化。然而目前在患者中应用 DR5 基因治疗仍不可行,故必须采用其他方法恢复 DR5 表达。化疗作为一种较佳的替代方案出于两种原因:首先某些化疗药可通过上调 p53 来诱导 DR5 的表达;其次目前化疗在高危患者中仍为最主要的治疗手段。

尽管 IFN γ 可诱导 Caspase-8 表达,却不能使大多数 NB 细胞对 TRAIL 敏感,进一步研究提示 TRAIL 受体缺陷导致 NB 细胞对 TRAIL 耐药。我们

发现通过 IFN γ 诱导 Caspase-8 表达,化疗药诱导 DR5 表达可增强 TRAIL 对 SKNDZ 的诱导凋亡作用。TRAIL 通路中存在着多种反应因子提示该途径在肿瘤发生和逃逸治疗方面起着重要作用,而且此通路的研究提示在 NB 中 TRAIL 的临床应用需要采用联合用药的方式。

[参 考 文 献]

- [1] Griffith TS, Anderson RD, Davidson BL, Williams R, Ratliff TL. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis[J]. J Immunol, 2000, 165(5): 2886-2894.
- [2] Yang X, Merchant MS, Romero ME, Tsokos M, Wexler LH, Kontny U, et al. Induction of Caspase-8 by interferon gamma renders some neuroblastoma cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/ TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB [J]. Cancer Res, 2003, 63(5): 1122-1129.
- [3] Truneh A, Sharma S, Silverman C, Khandekar S, Reddy MP, Deen K, et al. Temperature sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors DR5 is the highest affinity receptor[J]. J Biol Chem, 2000, 275(30): 23319-23325.
- [4] Karacay B, Sanlioglu S, Griffith TS, Sandler A, Bonthius DJ. Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells[J]. Cancer Gene Ther, 2004, 11(10): 681-690.
- [5] Goldsmith KC, Hogarty MD. Targeting programmed cell death pathways with experimental therapeutics: opportunities in high-risk neuroblastoma[J]. Cancer Lett, 2005, 228(1-2): 133-141.
- [6] Johnsen J, Pettersen I, Ponthan F, Sveinbjornsson B, Flaegstad T, Kogner P. Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon- γ and TRAIL[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1849-1857.
- [7] Nosel MM, Pieters R, Voute PA, Versteeg R. The N-myc paradox: N-myc overexpression in neuroblastoma is associated with sensitivity as well as resistance to apoptosis [J]. Cancer Lett, 2003, 197(1-2): 165-172.
- [8] Kim Y, Suh N, Sporn M, Reed JC. An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. J Biol Chem, 2002, 277(25): 22320-22329.
- [9] Kontny HU, Hammerle K, Klein R, Shayan P, Mackall CL, Niemeyer CM. Sensitivity of Ewing's sarcoma to TRAIL-induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(5): 506-514.
- [10] Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Anderson KC, Treon SP. Intracellular regulation of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand- induced apoptosis in human multiple myeloma cells [J]. Blood, 2002, 99(6): 2162-2171.
- [11] Fulda S, Debatin KM. IFN gamma sensitizes for apoptosis by up-regulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway [J]. Oncogene, 2002, 21(15): 2295-2308.
- [12] Kim S, Kang J, Evers BM, Chung DH. Interferon-gamma induces caspase-8 in neuroblastoma without affecting methylation of caspase-8 promoter[J]. J Pediatr Surg, 2004, 39(4): 509-515.

(本文编辑:吉耕中)