

文章编号:1000-582X(2006)08-0132-03

可溶性人 TRAIL 蛋白诱导肝癌细胞的凋亡*

唐 蓓

(重庆师范大学 生命科学学院,重庆 400047)

摘要:为研究可溶性人 TRAIL 蛋白(sTRAIL)对肝癌细胞株 SMMC7721 的生长抑制效应及凋亡诱导作用.采用显微镜、台盼蓝排斥试验、MTT 比色试验、TUNEL 法和 DNA 断裂实验等方法检测细胞增殖和细胞凋亡.通过显微镜观察到核染色质凝集等凋亡的形态学变化,台盼蓝排斥试验、MTT 比色试验结果显示,sTRAIL 蛋白可显著抑制 SMMC7721 细胞的生长和增殖,并且 TUNEL 法检测到经 sTRAIL 处理后的细胞凋亡指数与对照比较有显著差异,DNA 断裂实验亦观察到典型的 DNA 梯形条带,这些结果提示 sTRAIL 可诱导肝癌细胞株 SMMC7721 发生凋亡,具有抗肝癌的作用.

关键词:TRAIL;癌;肝细胞;凋亡

中图分类号:Q78

文献标识码:A

凋亡是细胞死亡的方式之一,肿瘤细胞的发生和发展不仅同肿瘤细胞的增殖和分化异常有关,而且同细胞凋亡基因的变化有关.诱导肿瘤细胞凋亡已成为近年来肿瘤治疗的重点. TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)是近年来发现的凋亡激活因子,属 TNF 超家族成员,为典型的 II 型跨膜蛋白,TRAIL 能迅速诱导多种肿瘤细胞和转化细胞发生凋亡,而对正常组织和细胞没有显著毒性效应,是一极具潜力的抗肿瘤分子^[1-5].

文中利用大肠杆菌系统制备的可溶性人 TRAIL(sTRAIL)蛋白,对肝癌细胞株 SMMC7721 细胞进行了凋亡诱导研究

1 材料

sTRAIL 通过大肠杆菌系统制备^[6];SMMC7721 肝癌细胞株来自中国科学院上海生物化学细胞研究所;RPMI-1640 培养基购自 GIBCO BRL 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 BIOMOL 公司;台盼蓝、蛋白酶 K 来自华美公司;原位细胞凋亡检测试剂盒为德国 Boehringer Mannheim 公司产品;DMSO 购自 Sigma 公司.

2 方法

2.1 细胞培养

SMMC7721 细胞的培养选用 RPMI-1640 培养基,

并添加 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素,培养条件为 37 °C、5% CO₂.

2.2 形态学特征观察

取对数生长期的 SMMC7721 细胞,加入 0.5、1.0、5.0 μg/mL 的 sTRAIL 蛋白,以未加者为对照组,分别培养 12 h、24 h、36 h、48 h 后于倒置显微镜下观察.

2.3 对肝癌细胞存活力的测定

取对数生长期的 SMMC7721 细胞,加入 1 μg/mL 和 5 μg/mL 的 sTRAIL 蛋白,对照组加等体积的培养液,分别处理 0、12、24、36、48、60 h 后收集细胞,用 0.4% 台盼蓝染色并计数活细胞数,实验重复 3 次,计算 $\bar{x} \pm S$ 后绘制生长曲线.

2.4 MTT 试验

取对数生长期的 SMMC7721 细胞 10⁶ 个/mL 接种于 96 孔培养板中,200 μL/孔,再加入不同浓度的 sTRAIL 蛋白(0.3、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/mL),设空白对照,每组重复 3 孔,培养 24 h 后,加入 MTT 溶液(5 mg/mL),20 μL/孔,孵育 4 h,加 150 μL DMSO,溶解后用酶联免疫检测仪于 570 nm 处检测 A 值并计算生长抑制率,生长抑制率 = (1 - 实验孔 OD 值/对照孔 OD 值) × 100%.

2.5 细胞凋亡的检测

2.5.1 原位末端脱氧核苷酸转移标记法(TUNEL 法)

将盖玻片置于 24 孔培养板中,取对数生长期的

* 收稿日期:2006-04-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170034)

作者简介:唐蓓(1970-),女,重庆人,重庆师范大学博士,副教授,主要从事基因工程与生物制药研究

SMMC7721 细胞(细胞数为 10^5 / mL), 铺于盖玻片上, 待细胞贴壁生长, 并布满盖玻片后, 加入 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 和 $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 浓度的 sTRAIL 蛋白, 以不加者为对照. 培养 24 h 后, 用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 缓冲液洗涤, 然后按试剂盒说明操作, 阳性细胞为细胞核染成棕色. 随机选取光镜下 10 个视野, 计算凋亡指数, 凋亡指数 = (凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100\%$.

2.5.2 DNA Ladder 的测定

以不同浓度 sTRAIL 蛋白(0.3 、 0.5 、 1.0 、 5.0 、 $10.0 \mu\text{g} / \text{mL}$)处理 SMMC7721 细胞 24 h, 收集细胞用 PBS 洗涤, 然后加细胞裂解液($10 \text{ mmol} / \text{L}$ Tris. cl、 $10 \text{ mmol} / \text{L}$ NaCl、 $10 \text{ mmol} / \text{L}$ EDTA、 1% SDS 和 $1 \text{ g} / \text{L}$ 蛋白酶 K、 $\text{pH}8.0$)消化, 再用等体积的苯酚/氯仿(1:1)抽提, 1/10 体积 $3 \text{ mol} / \text{L}$ 醋酸钠和 2 倍体积冷乙醇沉淀, 将 DNA 沉淀溶于 TE 缓冲液中, 行 15% 琼脂糖凝胶电泳, 电压为 $2 \sim 4 \text{ V} / \text{cm}$.

2.6 统计学分析

数据用 SPSS 软件处理, 以 $\bar{x} \pm S$ 表示, 采用 t 检验.

3 结果

3.1 细胞凋亡的形态学特征

sTRAIL 蛋白作用 SMMC7721 细胞 12 h 后, 细胞开始出现凋亡的形态学改变, 细胞体积缩小, 胞浆浓缩, 密度增加, 核染色质凝集, 胞膜完整, 与对照相比区别明显. 同时具有上述形态特征的细胞随处理时间的延长和处理浓度的增加而增多.

3.2 对肝癌细胞存活力的测定

结果如图 1, $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 和 $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 浓度的 sTRAIL 蛋白均能抑制 SMMC7721 细胞的生长, 随着时间延长浓度增加, 抑制细胞生长越明显, 呈剂量依赖和时间依赖关系, 并且各浓度与对照之间差异显著($p < 0.05$).

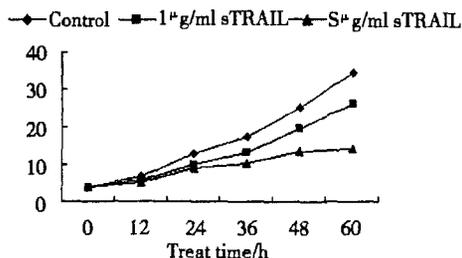


图 1 sTRAIL 作用下 SMMC7721 细胞的生长曲线

3.3 MTT 试验结果

从 $0.3 \mu\text{g} / \text{mL}$ 到 $10.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 的处理浓度, sTRAIL 蛋白对 SMMC7721 细胞的生长抑制率明显上升, 细胞毒性作用显著增强, 说明随着剂量的增大,

sTRAIL 对细胞的生长抑制效应更加明显(见表 1).

表 1 sTRAIL 对 SMMC7721 细胞的抑制作用

sTRAIL 浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	生长抑制率/%	P 值
0.3	10.2	>0.05
0.5	18.5	<0.05
1.0	32.4	<0.01
5.0	57.1	<0.01
10.0	65.8	<0.01

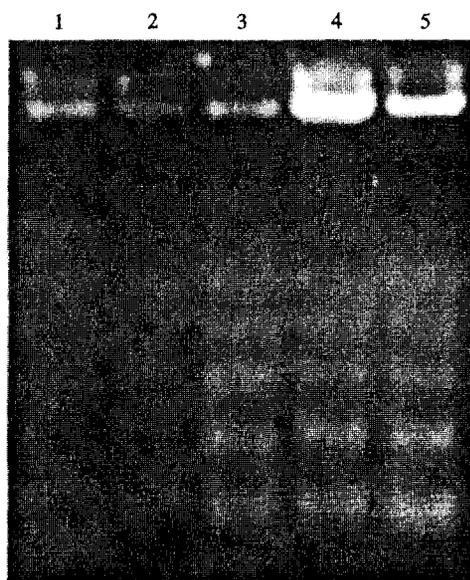
3.4 细胞凋亡检测结果

3.4.1 TUNEL 法检测结果

对照组的凋亡指数为($7.39 + 1.82$)%, 当 sTRAIL 浓度为 $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 和 $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ 时, 凋亡指数分别为($17.48 + 3.51$)%、($29.66 + 2.23$)% 和 ($45.19 + 3.46$)%, 与浓度呈正相关, 并与对照组相比较差异显著($p < 0.05$).

3.4.2 DNA Ladder 试验结果

DNA 电泳分析表明(图 2), 不同浓度 sTRAIL 诱导的细胞 DNA, 均出现不同程度的梯状条带(DNA ladder), 而对照细胞的 DNA 未见明显梯状片断, 这种经琼脂糖凝胶电泳呈现的梯形条带, 是细胞凋亡的特征性变化, 提示 sTRAIL 诱导 SMMC7721 细胞发生了经典的细胞凋亡.



1: 未处理组; 2: $0.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ TRAIL 组; 3: $1.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ TRAIL 组; 4: $5.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ TRAIL 组; 5: $10.0 \mu\text{g} / \text{mL}$ TRAIL 组

图 2 sTRAIL 诱导后的 DNA 梯形电泳图谱

4 讨论

诸多研究表明, TRAIL 可选择性杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞, 而对正常细胞没有显著毒性效应, 这一特点给肝癌细胞的治疗带来了新思路.

有文献报道^[7], TRAIL 只能有限的杀死肝癌细

胞,肝癌细胞对其诱导的凋亡表现出耐药现象,单一的 TRAIL 治疗效果有限,杀伤率较低.但亦有不同的研究指出,TRAIL 可显著杀伤肝癌细胞^[8].笔者检测了由大肠杆菌系统制备的 sTRAIL 分子对肝癌细胞的杀伤效果.结果表明,sTRAIL 能显著抑制 SMMC7721 肝癌细胞的生长和增殖,表现出剂量依赖和时间依赖关系,也能有效诱导其发生凋亡,提示 sTRAIL 对 SMMC7721 细胞的生长抑制作用可能是通过诱导其细胞发生凋亡实现的,这也证实该分子能通过诱导细胞凋亡的方式杀伤肿瘤细胞.并且这种杀伤作用较为强烈,1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 sTRAIL 作用 SMMC7721 细胞 24 h,凋亡指数即可达到(29.66 + 2.23)%,5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的则可达到(45.19 + 3.46)%,可见 sTRAIL 能有效杀伤肝癌细胞,提示其具有良好的临床应用前景.但有关 TRAIL 尚有许多不明之处,还有待进一步深入研究.

参考文献:

- [1] WILEY S R, SCHOOLEY K, SMOLAK P J, et al. Identification and Characterization of a New Member of the TNF Family that Induces Apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, (3): 673 - 682.
- [2] PITTI R M, MARSTERS S A, RUPPERT S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271:12 687 - 12 690.
- [3] GURA T. How Trail kills cancer cells, but not normal cells[J]. *Science*, 1997,277: 768 - 770.
- [4] GRIFFITH T S, Lynch D H. TRAIL: a Molecule with Multiple Receptors and Control Mechanisms[J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, (10): 559 - 563.
- [5] ASHKENAZI A, DIXIT V M. Apoptosis Control by Death and Decoy Receptors [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, (11):255 - 260.
- [6] 唐蓓,何凤田,蔡绍哲.可溶性人 TRAIL 分子的制备及其抗肿瘤活性[J]. *中国生物化学与分子生物学学报*, 2004, 20(3): 418 - 422.
- [7] 何松青,陈彦,陈孝平,等.可溶性肿瘤坏死因子相关诱导配体诱导肝癌细胞凋亡的研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25(2):116 - 119.
- [8] 周惠明,陈智,陈公英,等. TRAIL 联合化疗药物诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. *中华肿瘤杂志*, 2003, 25 (2):152 - 153.

Inducing Apoptosis Effects of Human sTRAIL on Hepatocellular Carcinoma Cells

TANG Bei

(Department of Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 4000047, China)

Abstract: To investigate the effects of human soluble TRAIL (sTRAIL) on cell growth and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line SMMC7721. After treatment of sTRAIL, the cell proliferation and apoptosis are determined by invertible microscope, trypan blue exclusion test, MTT assay, terminal deoxynucleotidyl transferase mediated labeling (TUNEL) and DNA fragmentation assay. Chromatin condensation is observed by invertible microscope, Proliferation of SMMC7721 cell is significantly inhibited after the treatment with sTRAIL, TUNEL results show in comparison with control, the difference of the apoptosis index of cells treated by sTRAIL is significant, and DNA ladder is observed. The results indicate that sTRAIL can induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cell line SMMC7721.

Key words: TRAIL; carcinoma; hepatocellular; apoptosis

(编辑 陈移峰)