

TRAIL 联合顺铂体外杀伤前列腺癌 PC-3 细胞株的实验研究

曾四平 肖亚军 章小平 李炎生

摘要 **目的** 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 联合化疗药物顺铂 (DDP) 对前列腺癌 PC-3 细胞株的体外杀伤作用。**方法** 分别采用不同浓度的 DDP (1.0 μg/ml、5.0 μg/ml、10.0 μg/ml、20.0 μg/ml、50.0 μg/ml、100.0 μg/ml) 与 TRAIL (10.0 ng/ml、20.0 ng/ml、50.0 ng/ml、100.0 ng/ml、200.0 ng/ml) 作用 PC-3 细胞株, 24h 后 MTT 法检测细胞的吸光度; DDP (5.0 ng/ml) 与 TRAIL (50.0 ng/ml) 联合作用 PC-3 细胞 4h、8h、12h、16h、20h、24h 后, MTT 法检测检测细胞的吸光度; 并按细胞的抑制率 (100%) = (1 - 实验组吸光度/阳性对照组吸光度) × 100% 计算 DDP 组、TRAIL 组及两者联合应用对细胞的抑制率, 比较组间细胞抑制率的差异。**结果** 单独应用 DDP 或者 TRAIL 对 PC-3 细胞体外杀伤作用有浓度依赖性, 浓度增高一定程度时对 PC-3 细胞的抑制作用会处于一个相对平台期; 联合应用 DDP + TRAIL 组与单独应用同浓度的 DDP 及 TRAIL 组相比, 其对 PC-3 细胞的体外杀伤作用明显增强, $P < 0.05$, 差异具有显著性意义; 联合应用 DDP 与 TRAIL 对 PC-3 细胞的体外杀伤作用具有明显的时间依赖性。**结论** DDP 能明显提高 TRAIL 对前列腺癌 PC-3 细胞株的杀伤作用, 其机制与死亡受体 DR5 的表达上调有关。

关键词 TRAIL 顺铂 DR5 PC-3

Experiment of Killing Human Prostate Cancer Cell Line (PC-3) with Combination of TRAIL and DDP *in vitro*. Zeng Siping, Xiao Yajun, Zhang Xiaoping, Li Yansheng. Department of Urology, Liuzhou Worker's Hospital, The Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi 545005, China

Abstract **Objective** To study the killing human prostate cancer cell line PC-3 with combination of TRAIL and DDP *in vitro*. **Methods** The PC-3 cell line was separately treated with different concentrations of DDP (1.0 μg/ml, 5.0 μg/ml, 10.0 μg/ml, 20.0 μg/ml, 50.0 μg/ml, 100.0 μg/ml) and TRAIL (10.0 μg/ml, 20.0 μg/ml, 50.0 μg/ml, 100.0 μg/ml, 200.0 μg/ml) and 24 hours later, cell absorbance was detected by MTT assay. The PC-3 cell line was treated with combination of DDP (5.0 μg/ml) and TRAIL (50.0 μg/ml) at different time (4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h) and cell absorbance was detected. The inhibitory rate of cells was calculated as the following: inhibitory rate of cells (100%) = (1 - absorbance of experimental group / absorbance of positive control group), and the rates were compared between different groups. **Results** DDP or TRAIL killing PC-3 cells had a dose-dependent manner. When the concentration increased to some extent, the inhibition would be at a relative plateau. As compared with the group of DDP or TRAIL, the killing effect *in vitro* of DDP and TRAIL in combination increased more ($P < 0.05$), and it had significantly difference. The killing effect of DDP and TRAIL *in vitro* had an obviously time-dependent manner. **Conclusion** DDP can significantly enhance TRAIL on prostate cancer PC-3 cell line *in vitro*. The mechanism is relevant to upregulation of the death receptor DR5.

Key words TRAIL; DDP; Death receptor5 (DR5); PC-3

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 (TNF) 超家族中的一员, TRAIL 已经被证实体内外对正常细胞没有毒性作用的情况下, 而对各种实体肿瘤能起到有效的杀伤作用^[1]。TRAIL 与

相应的受体结合后, 能诱导肿瘤细胞凋亡。化疗在肿瘤的治疗方面占据非常重要的地位, 但在前列腺癌的临床治疗过程中化疗并不能达到有效的治疗目的。我们通过化疗药物 DDP 诱导 TRAIL 相应受体的增加, 明显提高了 TRAIL 对 PC-3 细胞的体外杀伤作用。现将相关的研究结果报告如下:

材料与方法

1. 主要试剂: TRAIL (美国 R&D 公司), 顺铂 (山东齐鲁制药厂), MTT (美国 Gibco 公司), RPMI1640 培养液 (赛默飞世尔生物化学试剂有限公司), 胎牛血清 (天津灏洋生物制品科技责任公司), 0.25% 胰酶及青-链霉素 (吉诺生物医药技术

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572139)

作者单位: 545005 广西医科大学第四附属医院柳州市工人医院泌尿外科 (曾四平); 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院泌尿外科 (肖亚军、章小平、李炎生)

通讯作者: 曾四平, 电子邮箱: 471793934@qq.com

有限公司)。

2. 细胞培养:人前列腺癌 PC-3 细胞株由本实验室保存,细胞在含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 RPMI1640 培养液,37℃,5% CO₂,湿度 99% 培养箱内培养。

3. MTT 法测定细胞生长抑制率:采用四氮唑蓝快速比色法(MTT)测定细胞的生长抑制率,将处于对数生长期的 PC-3 细胞胰酶消化,制成单细胞悬液,细胞接种于 96 孔板内,每孔接种 10⁴ 个细胞。细胞贴壁后,DDP 单独用药组分别加入 1.0μg/ml、2.0μg/ml、5.0μg/ml、10.0μg/ml、20.0μg/ml DDP, TRAIL 单独用药组分别加入 1.0ng/ml、5.0ng/ml、10.0ng/ml、100.0ng/ml TRAIL, DDP 与 TRAIL 联合应用组根据 DDP 与 TRAIL 单独用药情况选择合适的浓度处理 PC-3 细胞。每组 6 个复孔,置于 37℃,5% CO₂,湿度 99% 培养箱内培养 24h, DDP 与 TRAIL 联合应用组分别培养 4h、8h、12h、16h、20h、24h,每孔加入 5mg/ml MTT 溶液 20μl,继续培养 4h 后终止培养,小心吸尽孔内培养液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150μl,震荡 10min,酶标仪波长 570nm 处测定各孔的吸光度(A 值)。各用药组细胞抑制率 IR(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值),以未加药物处理的 PC-3 细胞作为阴性对照组。

4. 统计学方法:组间比较采用配对 t 检验进行比较,结果以均数 $\bar{x} \pm s$ 标准差来表示,所有的资料均采用 SPSS11.0 软件包进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差别具有显著性意义。

结 果

1. DDP 单独用药组对 PC-3 细胞体外杀伤效应:用一系列浓度的 DDP:0.0μg/ml、1.0μg/ml、2.0μg/ml、5.0μg/ml、10.0μg/ml、20.0μg/ml、50.0μg/ml 处理 PC-3 细胞 24h 后,MTT 检测细胞的吸光度,并根据公式计算不同浓度 DDP 的细胞抑制率。DDP 对 PC-3 细胞的体外杀伤效应具有浓度依赖性,DDP 的浓度越高,其对 PC-3 的杀伤效应越明显;但 DDP 的浓度增高一定程度时(10.0~100.0μg/ml),其对 PC-3 细胞的杀伤效应处于一个相对的平台期,细胞抑制率 IR 在 45.8%~82.3% 之间(表 1)。

2. TRAIL 单独用药组对 PC-3 细胞体外杀伤效应:用一系列浓度的 TRAIL:0.0μg/ml、10.0μg/ml、20.0μg/ml、50.0μg/ml、100.0μg/ml、200.0μg/ml 处理 PC-3 细胞 24h 后,MTT 检测细胞的吸光度,并根据公式计算不同浓度 TRAIL 的细胞抑制率。TRAIL 对 PC-3 细胞的体外杀伤效应具有浓度依赖性,TRAIL 的浓度越高,其对 PC-3 的杀伤效应越明显;但 TRAIL 的浓度增高一定程度时(100.0~200.0ng/ml),其对 PC-3 细胞的杀伤效应处于一个相对的平台期,细胞抑制率 IR 在 50.4%~70.2% 之间(表 1)。

3. 联合应用 DDP 与 TRAIL 组对 PC-3 体外杀伤效应:5.0μg/ml DDP 单独作用 PC-3 细胞 24h

后,其对 PC-3 细胞的抑制率 IR 为 15.7%;50.0ng/ml TRAIL 联合作用 PC-3 细胞 24h 后,其对 PC-3 细胞的抑制率 IR 为 28.4%;5.0μg/ml DDP 与 50.0ng/ml TRAIL 联合作用 PC-3 细胞 24h 后,其对 PC-3 细胞的抑制率 IR 则增加到 79.9%。联合应用组与单独应用同浓度的 DDP 及 TRAIL 组相比,其对 PC-3 细胞的体外杀伤效应明显增强,经统计学软件 SPSS11.0 分析, $P < 0.05$,差异具有显著性意义(表 1)。

表 1 不同浓度的 DDP、TRAIL、DDP + TRAIL 对 PC-3 细胞抑制效应

药物	浓度	吸光度(A 值) $\bar{x} \pm s$	抑制率 IR(%)
DDP(μg/ml)	1.0	0.597 ± 0.012	10.9 ± 1.8
	5.0	0.565 ± 0.086	15.7 ± 12.8
	10.0	0.363 ± 0.043	45.8 ± 6.4
	20.0l	0.238 ± 0.054	64.5 ± 8.1
	50.0	0.141 ± 0.069	79.0 ± 10.2
	100.0	0.119 ± 0.058	82.3 ± 8.7
TRAIL(ng/ml)	10.0	0.643 ± 0.024	4.0 ± 3.5
	20.0	0.512 ± 0.065	23.6 ± 9.7
	50.0	0.480 ± 0.084	28.4 ± 12.5
	100.0	0.333 ± 0.104	50.4 ± 15.5
	200.0	0.200 ± 0.076	70.2 ± 11.3
DDP ± TRAIL	5.0μg/ml ± 50.0ng/ml	0.135 ± 0.062	79.9 ± 9.3
	阴性对照	0.670 ± 0.034	0.0 ± 5.1

联合应用组与单独应用同浓度的 DDP 及 TRAIL 组相比,其对 PC-3 细胞的体外杀伤作用明显增强,经统计学软件 SPSS11.0 分析, $P < 0.05$,差异具有显著性意义

DDP 与 TRAIL 联合作用 PC-3 细胞 0h、4h、8h、12h、16h、20h、24h,MTT 法测定吸光度并计算细胞的抑制率 IR;DDP 与 TRAIL 联合作用的时间越长,其对 PC-3 细胞的抑制率越高,DDP 与 TRAIL 对 PC-3 细胞的体外杀伤效应具有明显的时间依赖性(表 2)。

表 2 DDP + TRAIL 在不同时间点对 PC-3 细胞的抑制效应

药物作用时间(h)	吸光度(A 值) $\bar{x} \pm s$	抑制率 IR(%)
0	0.670 ± 0.034	0.0 ± 5.1
4	0.575 ± 0.064	14.2 ± 9.6
8	0.468 ± 0.079	30.1 ± 11.8
12	0.382 ± 0.114	43.0 ± 17.0
16	0.276 ± 0.069	58.5 ± 10.2
20	0.157 ± 0.085	76.6 ± 12.7
24	0.135 ± 0.062	79.9 ± 9.3

讨 论

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体是一类能诱导肿瘤细胞发生凋亡的配体,TRAIL 由 Pitti 等于 1996 年首先分离了 TRAIL 并研究了其诱导的凋亡,TRAIL 胞外区结构与 FasI 及 TNF-α 具有高度的同源性^[2]。TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡是通过与靶细胞膜上相应

受体结合完成的,目前证实有 5 种 TRAIL 受体,其中死亡受体包括 TRAIL - R1/R4 与 TRAIL - R2/R5,诱骗受体包括 TRAIL - R3/DcR1 与 TRAIL - R2/DcR2,另外一种为骨保护素 TRAIL - R5^[1]。TRAIL 在胞外区与死亡受体 DR4 或者 DR5 结合后形成死亡诱导信号复合体 (death inducing signal complex, DISC), DISC 能导致 caspase8 活化,随后能通过线粒体依赖途径与线粒体非依赖途径激活一系列酶级联反应而引起靶细胞的凋亡^[3]。DR4 与 DR5 受体机体内分布很广,但是一般来说,大多数肿瘤组织死亡受体 DR4 和 DR5 高表达,而诱骗受体 TRAIL - R3/DcR1 与 TRAIL - R2/DcR2 低表达或不表达,因此 TRAIL 能与死亡受体 DR4 或和 DR5 结合,激活酶级联反应引起肿瘤细胞的凋亡,起到抗肿瘤的作用;而大多正常组织中以诱骗受体 TRAIL - R3/DcR1 与 TRAIL - R2/DcR2 高表达为主,此两种受体能与 TRAIL 竞争性结合,从而使 TRAIL 不致影响到正常细胞代谢^[4,5]。TRAIL 能诱导肿瘤细胞发生凋亡,但不影响正常细胞。TRAIL 对肿瘤细胞的杀伤效应主要通过凋亡途径来实现,我们研究中发现单独应用 TRAIL 对 PC - 3 细胞体外杀伤效应具有明显的浓度依赖性,其浓度越高对 PC - 3 细胞杀伤效应越明显,浓度达到一定程度对 PC - 3 细胞杀伤效应会处于一个相对平台期。

晚期前列腺癌的治疗以内分泌方法为主,其治疗失败后可选用单药或联合化疗,不管是内分泌方法还是化疗都只是一种姑息性治疗手段,只能改善患者的症状而不能治愈。而顺铂 (DDP) 是多种化疗药物方案的核心药物,以 DNA 为作用靶点,DDP 含铂部分与 DNA 同一条链的碱基或两条链的碱基交叉连接形成铂化 DNA,抑制细胞 DNA 合成与修复。研究中我们发现 DDP 对 PC - 3 细胞的体外杀伤效应也具有明显的浓度依赖性,DDP 的浓度越高,对 PC - 3 细胞的杀伤作用越明显,浓度增高到一定程度时其对 PC - 3 细胞的杀伤作用会处于一个相对平台期。TRAIL 诱导的肿瘤凋亡疗法,是近几年肿瘤治疗及研究的热点,TRAIL 有望成为治疗前列腺癌的一种新方法。但是目前发现单独使用 TRAIL 并不能导致肿瘤细胞的毒性作用,小剂量的化疗药物与 TRAIL 联合应用能显著地增强 TRAIL 对肿瘤细胞的杀伤效应。我们发现小剂量的 DDP (5.0 $\mu\text{g/ml}$) 与 TRAIL (50.0 ng/ml) 联合应用后,小剂量的 DDP 能明显增加 TRAIL 对 PC

- 3 细胞的体外杀伤效应。DDP 与 TRAIL 联合应用对 PC - 3 细胞的体外杀伤效应具有明显的时间依赖性,作用的时间越长,其杀伤效应越明显。TRAIL 与化疗药物对肿瘤细胞的协同杀伤作用主要通过诱导细胞的凋亡实现的,具体机制可能与以下几个方面有关:①化疗药物与 TRAIL 联合用后能导致细胞死亡受体 DR4 和 (或) DR5 高表达,诱骗受体 TRAIL - R3/DcR1 与 TRAIL - R2/DcR2 的形成受阻,而其中死亡受体 DR5 是决定 PC - 3 对 TRAIL 敏感性的重要因素;②化疗药物也可以激活凋亡链 caspase8 酶活性从而增强 TRAIL 凋亡诱导效果;③另外小剂量的化疗药物可以阻断凋亡抑制性蛋白质,从而使 TRAIL 诱导的凋亡更加高效^[6,7]。

我们的研究证实 DDP 与 TRAIL 联合应用组单独使用 DDP 或 TRAIL 组比较,对前列腺癌 PC - 3 细胞的杀伤效应明显增强,经统计学处理, $P < 0.05$, 差异具有统计学意义。由此可见小剂量的 DDP 能明显增强 TRAIL 杀伤效应,联合使用 DDP 与 TRAIL 所需剂量小于单独使用 DDP 或 TRAIL 时剂量,因此 DDP 与 TRAIL 联合用药在保证治疗效果的同时又降低了 DDP 与 TRAIL 单独使用时所造成的毒性不良反应,对前列腺癌的临床治疗有一定的意义,有可能成为一种治疗晚期前列腺癌的新途径。

参考文献

- 1 Pan G, OcRourke K, Chinnaiyan AM, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 1997, 276(4): 111 - 113
- 2 Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, *et al.* Induction of apoptosis by Apo - ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *Biol Chem*, 1996, 271(20): 12687 - 12690
- 3 Denis Lane, Marceline Cote, Roxanne Grondin, *et al.* Acquired resistance to TRAIL - induced apoptosis in human ovarian cancer cells is conferred by increased turnover of mature caspase - 3. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(3): 509 - 521
- 4 陈朝辉, 肖亚军, 陈晓春. TRAIL 受体在前列腺癌组织中的表达和意义. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 24(2): 142
- 5 朱迅, 刘彦信, 马正宇. sTRAIL 在大肠杆菌中的表达及其诱导细胞凋亡活性的研究. *科学通讯*, 1999, 44: 972 - 975
- 6 Hesry V, Piquet - Pellorce C, Travert M, *et al.* Sensitivity of prostate cells to TRAIL - induced apoptosis increases with tumor progression: DR5 and caspase8 are key players. *Prostate*, 2006, 66(9): 987 - 995
- 7 Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL - inducing apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(3): 228 - 237

(收稿: 2009 - 12 - 10)

(修回: 2010 - 01 - 08)