

· 基础研究 ·

三氧化二砷逆转 A549 细胞对 TRAIL 耐药的研究*

王绩英, 赵雪强[△], 王昌明, 莫碧文, 蒋明, 陈峰

(桂林医学院附属医院呼吸内科, 广西桂林 541001)

摘要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)逆转人非小细胞肺癌 A549 细胞对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)耐药的机制。方法 将处于对数生长期的 A549 细胞分为对照组(仅加入 DMEM)及实验组,实验组又分为 As_2O_3 组(1 μ mol/L As_2O_3 处理)、TRAIL 组(100 μ g/L TRAIL 处理)及联合组(1 μ mol/L As_2O_3 、100 μ g/L TRAIL 联合处理)。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖;流式细胞仪检测细胞凋亡;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 A549 细胞核因子 kappa B(NF- κ B)、caspase-3、survivin mRNA 的表达。结果 作用 24、48、72 h 后,联合组 A549 细胞的增殖抑制明显增强($P < 0.05$),且呈时间依赖性。 As_2O_3 、TRAIL 联合作用 48 h 可明显下调 NF- κ B、survivin mRNA,上调 caspase-3 mRNA 的表达。结论 As_2O_3 通过 NF- κ B 通路下调 survivin,上调 caspase-3,从而增强 TRAIL 诱导 A549 细胞的凋亡。

关键词:砷剂;肿瘤坏死因子受体相关肽和相关蛋白质类;肺肿瘤;细胞增殖;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.07.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)07-0676-03

A study of arsenic trioxide reversal of A549 cells resistant to TRAIL[†]Wang Jiyong, Zhao Xueqiang[△], Wang Changming, Mo Biwen, Jiang Ming, Chen Feng

(Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of arsenic trioxide(As_2O_3) reversal of non-small cell lung cancer A549 cells resistant to tumor related apoptosis inducing ligand(TRAIL). **Methods** A549 cells in logarithmic growth phase were divided into control group(only adding DMEM) and experimental group which subdivided into As_2O_3 group(treated with 1 μ mol/L As_2O_3), TRAIL group(treated with 100 μ g/L TRAIL) and combination group(treated with 1 μ mol/L As_2O_3 and 100 μ g/L TRAIL). Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay was used to detect the cellular proliferation and flow cytometry was employed to measure cellular apoptosis. Expression of nuclear factor kappa B (NF- κ B), caspase-3, survivin mRNA were assayed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** After 24, 48, 72 h treatment, proliferation inhibition of A549 cells in combination group was significantly increased($P < 0.05$) in time-dependent manner, when compared with those in As_2O_3 group and TRAIL group. 48 h treatment of combination of As_2O_3 and TRAIL markedly down-regulated the expression of NF- κ B, survivin mRNA and up-regulated that of caspase-3 mRNA. **Conclusion** As_2O_3 down-regulates survivin and up-regulates caspase-3 via NF- κ B pathway, thereby it enhances TRAIL-induced A549 cells apoptosis.

Key words: arsenicals; tumor necrosis factor receptor-associated peptides and proteins; lung neoplasms; cell proliferation; apoptosis

在各种常见肿瘤中男性肺癌的发病率和死亡率最高,女性肺癌的发病率位居第 4,死亡率位居第 2。在中国,肺癌的发病率逐年上升^[1]。由于大多数肺癌患者确诊时已属晚期,失去了手术机会,使放、化疗成为肺癌综合治疗的主要手段,但大多数肺癌患者对目前的常规化疗药物不敏感,因此,迫切需要寻求新的、更有效的化疗药物。肿瘤靶向治疗是以肿瘤细胞的某些关键蛋白作为靶点,特异性杀伤肿瘤细胞,而对正常细胞没有不良反应。在本研究中,将人非小细胞肺癌 A549 细胞用肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)、三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)处理,观察 A549 细胞的增殖与凋亡,以及 TRAIL 和 As_2O_3 对 A549 细胞核因子 kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate specific protease, caspase)-3、survivin mRNA 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 细胞及主要试剂 人非小细胞肺癌 A549 细胞为实验室自行传代保存。重组人 TRAIL 为以色列 PROSPEC 公司产品, As_2O_3 注射液为哈尔滨伊达药业公司产品, Dulbecco's 改良 Eagle 培养(Dulbecco's modified Eagle' medium, DMEM)、Trizol、AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) System 购自 TAKARA 公司。引物序列见表 1,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 细胞培养及分组 将 A549 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养,待细胞处于对数生长期时将其分为对照组(仅加入 DMEM)及实验组,实验组又分为 As_2O_3 (1 μ mol/L 组 As_2O_3)

* 基金项目:广西自然科学基金课题(桂科自 0832269);广西卫生厅立项课题(Z2007225)。 [△] 通讯作者, Tel: 13457351627; E-mail: myzhaoxueqiang@126.com。

表 1 PCR 引物序列

NF-κB 引物	上游 5'-ACT GCC AAC AGA TGG CCC ATA CC-3'
	下游 5'-CAG GTT TGC GAA GCC GAC CA-3'
survivin 引物	上游 5'-CCC TTT CTC AAG GAC CAC CGC ATC-3'
	下游 5'-GCC AAG TCT GGC TCG TTC TCA GTG-3'
caspase-3 引物	上游 5'-TTG GAA CAA ATG GAC CTG TTG ACC TG -3'
	下游 5'-GGA CTC AAA TTC TGT TGC CAC CTT TC-3'
β-actin 引物	上游 5'-AGT GTG ACG TGG ACA TCC GCA -3'
	下游 5'-ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG GAC-3'

处理)、TRAIL 组(100 μg/L TRAIL 处理)及联合组(1 μmol/L As₂O₃ 与 100 μg/L TRAIL 联合处理)。

1.3 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测 将对数生长期的细胞以每孔 200 μL, 2 000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板,待细胞贴壁后按上述分组处理细胞,每组设 3 个复孔,同时设空白对照(仅加培养基)。培养 24、48、72 h 后终止实验,每孔加 5 mg/mL MTT 20 μL,继续培养 4 h,弃掉培养基,每孔加二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)200 μL,震荡 5 min,使沉淀充分溶解。用酶标仪测 490 nm 吸光度(absorbance, A)值。按公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=[(对照组 A 值-实验组 A 值)/对照组 A 值]×100%。

1.4 流式细胞仪检测 取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,每孔 4×10⁴ 个细胞,培养 12 h 后,用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 24 h,使细胞周期同步化。按上述分组处理细胞,每组设 3 个复孔,培养 48 h 后收集细胞,制成单细胞,70%冷乙醇固定,4℃过夜,检测前用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤,加入 20 μL 核糖核酸酶 A (RNaseA),37℃孵育 30 min,避光加碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,冰浴 30 min,以 300 目筛网过滤。调整细胞密度为 1.0×10⁶/mL 后以流式细胞仪检测,激发光源为氩离子,激发波长 488 nm,用 Multicycle DNA 分析软件行细胞凋亡率测定。

1.5 逆转录-PCR(reverse transcriptase-PCR, RT-PCR)检测 各组细胞于药物干预 48 h 后提取总 RNA。总 RNA 提取按 TAKARA 公司提供的试剂操作步骤操作。AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒反转录为 cDNA,再经 PCR 扩增。NF-κB 扩增条件如下:94℃预变性 3 min 后,94℃变性 15 s,61℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。survivin 扩增条件如下:94℃预变性 3 min 后,94℃变性 15 s,61℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。caspase-3 扩增条件如下:94℃预变性 3 min 后,94℃变性 15 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃延伸 5 min。PCR 产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统分析,计算相对表达量(与 β-actin 的比值)。

1.6 统计学处理 应用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 As₂O₃、TRAIL 对 A549 细胞增殖的影响 As₂O₃ 组、

TRAIL 组 A549 细胞与对照组比较,细胞增殖的差异没有统计学意义。联合组 A549 细胞增殖作用明显强于 As₂O₃ 组及 TRAIL 组,且具有时间依赖性($P < 0.05$),见表 2。

表 2 As₂O₃ 及 TRAIL 对 A549 细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, \%, n=3$)

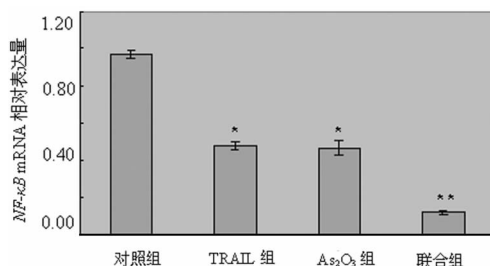
组别	细胞增殖抑制率		
	24 h	48 h	72 h
As ₂ O ₃ 组	4.3±1.4	15.7±2.7	18.1±4.2
TRAIL 组	3.8±1.7	12.8±2.0	15.2±4.2
联合组	12.7±1.3*△	27.3±2.5*△	42.7±3.5*△

*: $P < 0.05$, 与 As₂O₃ 组比较;△: $P < 0.05$, 与 TRAIL 组比较。

2.2 As₂O₃、TRAIL 对 A549 细胞凋亡的影响 凋亡的细胞通透性增加,细胞膜上会出现小漏洞,在洗涤和染色的过程中小片段 DNA 从细胞内丢失,使凋亡细胞的 DNA 含量低于正常细胞,在流式细胞仪 DNA 直方图上出现典型的亚二倍体凋亡峰。联合组 A549 细胞的凋亡率为(28.73±1.55)%,而 As₂O₃ 组和 TRAIL 组细胞凋亡率分别为(13.23±1.99)%和(5.92±2.48)%。联合组分别与 As₂O₃ 组和 TRAIL 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 As₂O₃、TRAIL 对 A549 细胞 NF-κB、survivin 及 caspase-3 mRNA 表达的影响

2.3.1 As₂O₃、TRAIL 对 A549 细胞 NF-κB mRNA 表达的影响 与对照组比较,经 As₂O₃、TRAIL 处理 48 h 后,各实验组 A549 细胞 NF-κB mRNA 的表达下降,联合组细胞 NF-κB mRNA 表达下降尤为明显($P < 0.01$),见图 1。

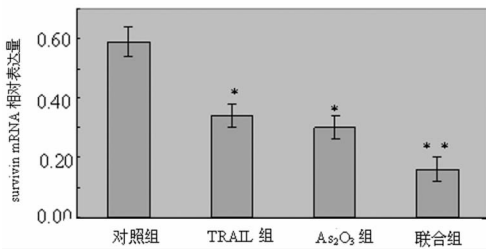


*: $P < 0.05$, 与对照组比较; **: $P < 0.01$, 与 As₂O₃ 组、TRAIL 组比较。

图 1 对照组、TRAIL 组、As₂O₃ 组及联合组 A549 细胞 NF-κB mRNA 的表达

2.3.2 As₂O₃、TRAIL 对 A549 细胞 survivin mRNA 表达的

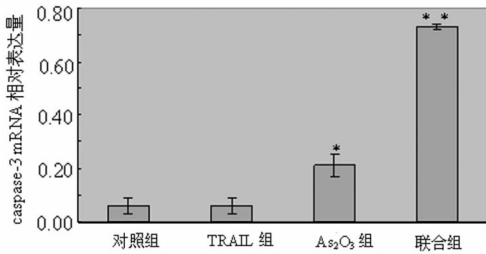
影响 与对照组比较,经 As_2O_3 、TRAIL 处理 48 h 后,各实验组 A549 细胞 survivin mRNA 的表达下降,联合组细胞 survivin mRNA 表达下降尤为明显($P < 0.01$),见图 2。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; **: $P < 0.01$, 与 As_2O_3 组、TRAIL 组比较。

图 2 对照组、TRAIL 组、 As_2O_3 组及联合组 A549 细胞 survivin mRNA 的表达

2.3.3 As_2O_3 、TRAIL 对 A549 细胞 caspase-3 mRNA 表达的影响 各实验组 A549 细胞经 As_2O_3 、TRAIL 处理 48 h 后,与对照组比较, As_2O_3 组 A549 细胞 caspase-3 mRNA 的表达增强,TRAIL 组 A549 细胞 caspase-3 mRNA 的表达没有明显变化;与 As_2O_3 组和 TRAIL 组比较,联合组 A549 细胞 caspase-3 mRNA 的表达明显增强($P < 0.01$),见图 3。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较; **: $P < 0.01$, 与 As_2O_3 组、TRAIL 组比较。

图 3 对照组、TRAIL 组、 As_2O_3 组及联合组 A549 细胞 caspase-3 mRNA 的表达

3 讨论

TRAIL 是新发现的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员,TRAIL 通过与其受体[死亡受体(death receptor, DR)4、DR5]结合而启动死亡途径,激活 Caspase 级联反应,最终激活 caspase-3 发生生物效应,从而引发对 TRAIL 敏感的细胞大量、快速凋亡,而对机体正常组织不具有明显的毒性作用^[2]。因此,TRAIL 可能是一种很好的肿瘤靶向治疗药物。但近年来的研究发现,尽管 TRAIL 具有良好的特异性,仍面临抗肿瘤药普遍存在的耐药性问题,人们发现大部分肺癌细胞对 TRAIL 耐药,TRAIL 的耐药机制目前仍不十分清楚^[3-4]。作者推测化疗药物与 TRAIL 联用也许可逆转 TRAIL 的耐药性。 As_2O_3 是传统中药砒石的主要成分,是一种剧毒化合物。目前研究发现 As_2O_3 对急性早幼粒细胞性白血病具有诱导细胞凋亡的作用,并已在临床应用,同时, As_2O_3 可逆转部分肿瘤细胞的耐药性。本实验通过流式细胞术检测发现 TRAIL 组的凋亡率仅有 $(5.92 \pm 2.48)\%$,而联合组的凋亡率为 $(28.73 \pm 1.55)\%$ 。

多药耐药(multidrug resistance, MDR)是影响肿瘤化疗效果的重要原因。目前 MDR 的机制仍不完全清楚,人们认为由

于 MDR1 基因编码的跨膜 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、MRP1 基因编码的跨膜糖蛋白使细胞内的药物排出或分布异常,使药物不能在细胞内达到有效浓度^[5-6]。但这一机制还不能完全阐明 MDR。研究表明,MDR 与细胞凋亡有关。Survivin 是目前发现的较强的凋亡抑制蛋白,具有调控细胞增殖和凋亡作用,Survivin 和肺癌的耐药性与疾病预后有关^[7-9]。RT-PCR 检测显示联合组 A549 细胞 survivin mRNA 的表达明显下降,而 caspase-3 mRNA 的表达明显增强。

NF- κ B 具有显著抑制肿瘤细胞凋亡的功能,它与肿瘤的发生、生长和转移等多个环节密切相关。NF- κ B 的持续激活刺激细胞生长,导致细胞增殖失控^[10]。但 NF- κ B 的作用却有争议,Ehrhardt 等^[11]认为 NF- κ B 在 TRAIL 凋亡信号转导过程中发挥负向调节作用,阻止细胞发生凋亡。Shetty 等^[12]则得出相反的结论,认为 NF- κ B 促进 TRAIL 凋亡信号的发生,并认为 NF- κ B 亚单位的种类及数量是这一作用的关键。有研究证实 Survivin 参与了 NF- κ B 介导的抗细胞凋亡全过程,存在 NF- κ B-Survivin 途径^[13-15]。

TRAIL 与 As_2O_3 联用对 A549 细胞的增殖抑制作用及诱导凋亡作用明显强于 As_2O_3 或 TRAIL 单独应用的作用。在联合组中可观察到细胞 NF- κ B mRNA 的表达明显下降,这说明 As_2O_3 可能是通过 NF- κ B 通路下调 survivin mRNA,上调 caspase-3 mRNA 的表达,从而解除 survivin 对 caspase-3 的抑制而逆转 A549 细胞对 TRAIL 的耐药性。 As_2O_3 能否在体内增强 TRAIL 的凋亡诱导作用,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Aggarwal BB, Bhardwaj U, Takada Y. Regulation of TRAIL-induced apoptosis by ectopic expression of anti-apoptotic factors[J]. Vitam Horm, 2004, 67: 453-483.
- [3] Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, et al. Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(3): 356-364.
- [4] Stegehuis JH, de Wilt LH, de Vries EG, et al. TRAIL receptor targeting therapies for non-small cell lung cancer: current status and perspectives[J]. Drug Resist Updat, 2010, 13(1/2): 2-15.
- [5] O'Connor R. The pharmacology of cancer resistance[J]. Anticancer Res, 2007, 27(3A): 1267-1272.
- [6] 靳胜, 陈书恩, 张曼, 等. 姜黄素逆转 h160/Adr 及 mcf-7/Adr 的多药耐药研究[J]. 重庆医学, 2010, 40(1): 21-23.
- [7] Yang H, Fu JH, Hu Y, et al. Influence of siRNA targeting survivin on chemosensitivity of H460/cDDP lung cancer cells[J]. J Int Med Res, 2008, 36(4): 734-747.
- [8] Yang CT, Li JM, Weng HH, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin enhances the radiosensitivity of human non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(2): 120-130.
- [9] Derin D, Soyduñç HO, Guney N, et al. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha(下转第 682 页)

参考文献:

- [1] Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds; the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing[J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(1): 59-69.
- [2] 童亚林, 缪洪城, 朱金红. 康肤霜促进兔深 II 度烫伤创面愈合的实验研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2003, 19 增刊: S26.
- [3] 缪洪城, 童亚林. 康肤霜修复小型猪深 II 度烫伤创面疗效观察[J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(7): 535-536.
- [4] 龚震宇, 童亚林, 万友华, 等. 康肤霜对大鼠放射性皮肤损伤创面愈合的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(28): 5224-5227.
- [5] 高畅, 楚勤英, 唐志雄, 等. 蜂胶对糖尿病大鼠创面愈合的影响[J]. *感染、炎症、修复*, 2008, 9(1): 25-27.
- [6] 童亚林, 杨润生, 万友华, 等. 调压调温全自动气烫仪的研制与应用[J]. *中华烧伤杂志*, 2010, 26(2): 162-163.
- [7] Tsang MW, Wong WK, Hung CS, et al. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers[J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(6): 1856-1861.
- [8] Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors[J]. *Biotech Histochem*, 1997, 72(2): 78-85.
- [9] 宗守凯, 梁自乾, 欧邦军. 局部应用重组人 EGF 对糖尿病大鼠烫伤创面 EGF 受体及其 mRNA 表达的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2010, 24(2): 150-155.
- [10] Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers[J]. *Ann Plast Surg*, 2006, 56(4): 394-398.
- [11] Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions [J]. *Oncogene*, 1997, 14(6): 629-640.
- [12] Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt 15): 3051-3060.
- [13] Essers J, Theil AF, Baldeyron C, et al. Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(21): 9350-9359.
- [14] Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia[J]. *Oral Oncol*, 2000, 36(2): 145-151.
- [15] Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, et al. Treatment for diabetic foot ulcers [J]. *Lancet*, 2005, 366(9498): 1725-1735.
- [16] 邹京宁, 陈玉林, 葛绳德. 外用维生素 A 促进小鼠烧伤创面愈合[J]. *第二军医大学学报*, 1994, 15(2): 158-160.
- [17] 宋一丁, 薛晓东, 刘宏, 等. 锌对烫伤大鼠表皮生长因子及其受体表达的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(5): 439-442.
- [18] 冯安吉, 海春旭, 蒋宁, 等. 维生素 A 和维生素 E 对梭曼染毒大鼠自由基损伤的预防作用[J]. *中国药理与毒理学杂志*, 2002, 16(1): 53-55.
- [19] 付小兵, 王德文. 创面修复学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999: 245-248.
- [20] 黄华军, 余斌, 林庆荣, 等. 臭氧水对感染性创面抗炎修复的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(3): 515-518.
- [21] 孙晓萍, 欧立娟, 宓穗卿, 等. 冰片抗炎镇痛作用的实验研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 18(5): 353-355.
- (收稿日期: 2011-09-20 修回日期: 2011-10-22)
-
- (上接第 678 页)
- in nonsmall cell lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2008, 59(2): 240-245.
- [10] 马武开, 姚宇红, 黄礼明, 等. 白血病多药耐药与 NF- κ B 调控机制[J]. *广东医学*, 2009, 30(12): 1930-1931.
- [11] Ehrhardt H, Fulda S, Schmid I, et al. TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB[J]. *Oncogene*, 2003, 22(25): 3842-3852.
- [12] Shetty S, Gladden JB, Henson ES, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) up-regulates death receptor 5 (DR5) mediated by NFkappaB activation in epithelial derived cell lines[J]. *Apoptosis*, 2002, 7(5): 413-420.
- [13] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy[J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(2): 92-95.
- [14] Notarbartolo M, Cervello M, Poma P, et al. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(1): 133-136.
- [15] Takada Y, Murakami A, Aggarwal BB. Zerumbone abolishes NF-kappaB and IkappaBalpha kinase activation leading to suppression of antiapoptotic and metastatic gene expression, upregulation of apoptosis, and downregulation of invasion[J]. *Oncogene*, 2005, 24(46): 6957-6969.
- (收稿日期: 2011-10-14 修回日期: 2011-11-29)