

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2009.02.008

蛋白酶体抑制剂 MG-132 逆转人结肠癌细胞获得性 TRAIL 耐药

胡静姿¹, 朱洪波^{2*}, 何超², 劳伟峰², 黄学锋² (1. 南京军区杭州空军疗养院 妇科, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 肛肠外科, 浙江 杭州 310016)

[摘要] 目的: 探讨蛋白酶体抑制剂 MG-132 逆转人结肠癌细胞获得性 TRAIL 耐药的作用及其可能的机制。方法: 在 MG-132 和 TRAIL 蛋白联合处理获得性 TRAIL 耐药的人结肠癌细胞 DLD1-TRAIL/R 后, MTT 法检测细胞的存活率, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blotting 检测细胞中各种凋亡相关蛋白的表达和 JNK 激酶的磷酸化水平。结果: MG-132 联合 TRAIL 蛋白处理 DLD1-TRAIL/R 细胞后, 其细胞存活率明显下降 ($P < 0.01$), 而细胞凋亡率则明显增加 ($P < 0.01$)。Western blotting 检测显示, 联合处理后 DLD1-TRAIL/R 细胞中各种凋亡信号分子包括 caspase-8、caspase-9、caspase-3、Bid 和 PARP 蛋白均明显活化, 线粒体中细胞色素 C 和 Smac 蛋白大量释放; 进一步的 Western blotting 检测显示, 死亡受体 DR5 和凋亡诱导蛋白 Bik 的表达水平明显增高, 而其他凋亡信号分子包括 DR4、Bax、Bak、Bcl-XL、XIAP 和 Survivin 等则无明显改变; 检测结果还显示, MG-132 能诱导 JNK 激酶发生磷酸化, 使用 JNK 激酶抑制剂 SP600125 能够阻断 MG-132 诱导的 DR5 表达, 但不影响 Bik 的表达, 并且不能减弱 MG-132 和 TRAIL 蛋白联合处理对 DLD1-TRAIL/R 细胞的致凋亡效应 ($P < 0.05$)。结论: 蛋白酶体抑制剂 MG-132 能逆转人结肠癌细胞 DLD1-TRAIL/R 的获得性 TRAIL 耐药, 其机制可能与 Bik 蛋白上调后启动线粒体凋亡途径有关, 与 JNK 通路激活无关。

[关键词] 蛋白酶体抑制剂; MG-132; 结肠肿瘤细胞; TRAIL; 耐药; Bik

[中图分类号] R735.3+5; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2009)02-0140-05

Proteasome inhibitor MG-132 reverses acquired resistance to TRAIL in human colon cancer cells

HU Jing-zi¹, ZHU Hong-bo^{2*}, HE Chao², LAO Wei-feng², HUANG Xue-feng² (1. Department of Gynecology, Hangzhou Military Sanitarium of Airforce, PLA Nanjing Military Area Command, Hangzhou 310013, Zhejiang, China; 2. Department Colorectal Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the role of proteasome inhibitor MG-132 in reversing the acquired TRAIL resistance of human colon cancer cell line DLD1-TRAIL/R and the related mechanisms. **Methods:** Colon cancer cell line DLD1-TRAIL/R was treated with MG-132 combined with TRAIL protein. The viability of DLD1-TRAIL/R cells was determined by MTT assay; the apoptotic rate was detected by flow cytometry, and the expression of apoptosis-related proteins was examined by Western blotting analysis. **Results:** The viability of DLD1-TRAIL/R cells was dramatically decreased after combined treatment with MG-132 and TRAIL protein ($P < 0.01$) and the apoptotic rate was significantly increased ($P < 0.01$). Western blotting analysis showed that MG-132 dramatically enhanced the cleavage of apoptotic molecules, including caspases-8, 9, 3, Bid, and PARP in DLD1-TRAIL/R cells after combined treatment and increased the release of cytochrome C and Smac from mitochondria. Further study demonstrated that MG-132 up-regulated DR5 and Bik proteins, but had no detectable effects on DR4, Bax, Bak, Bcl-XL, XIAP or survivin. Moreover, we found MG-132 induced phosphorylation of kinase JNK, and the inhibitor of JNK (SP600125) blocked MG-132-induced expression of DR5, but not the expression of Bik. Furthermore, SP600125 did not attenuate the apoptosis of DLD1-TRAIL/R cells induced by MG132 in the presence of TRAIL protein ($P < 0.05$). **Conclusion:** Proteasome inhibitor MG-132 can reverse the acquired drug resistance to TRAIL and induce up-regulation of DR5 and Bik protein in DLD1-TRAIL/R cells. The underlying mechanism may involve the initiation of mi-

[基金资助] 国家自然科学基金资助项目(No. 30700970); 浙江省自然科学基金资助项目(No. Y205093)。Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30700970); the Natural Science Foundation of Zhejiang Province(No. Y205093)

[作者简介] 胡静姿(1976-), 女, 浙江省杭州市人, 硕士生, 主要从事肿瘤分子病理与基因治疗方面的研究

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: ykzhh@163.com

tochondrion-related apoptosis caused by Bik protein expression, not by activation of JNK pathway.

[**Key words**] proteasome inhibitor; MG-132; colonic neoplasms cell; TRAIL; resistance; Bik

[Chin J Cancer Biother, 2009, 16(2): 140-144]

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing- ligand, TRAIL)对许多肿瘤细胞具有选择性诱导凋亡的作用^[1],为肿瘤基因治疗提供了新的方向,但是耐药情况的出现妨碍了它在临床上的进一步应用^[2]。蛋白酶体抑制剂通过对泛素化通路的阻断可诱导多种肿瘤细胞凋亡,被认为是一种很有前途的抗肿瘤药物。近期已有不少研究发现蛋白酶体抑制剂可以逆转肿瘤细胞对 TRAIL 的耐药,但其具体机制仍不清楚^[3-4]。由于 MG-132 (Z-leu-leu-leu-CHO, 三肽基醛)作为一种肽醛类蛋白酶体抑制剂,在抗肿瘤研究中得到了广泛应用,因此本研究拟用 MG-132 联合重组人 TRAIL 蛋白作用于获得性 TRAIL 耐药的结肠癌细胞(DLD1-TRAIL/R 细胞),评估 MG-132 在逆转结肠癌细胞获得性 TRAIL 耐药中的作用,并探讨其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与主要试剂

获得性 TRAIL 耐药人结肠癌细胞株 DLD1-TRAIL/R 细胞为本实验室反复使用 TRAIL 重组腺病毒处理 DLD1 细胞后得到^[5-6]。ECL 试剂盒购自 Amersham Bioscience 公司,兔抗人 caspase-9、caspase-3、Bax、Bik/NBK、Bcl-XL 抗体和羊抗人 Bak 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,兔抗人 caspase-8 抗体和鼠抗人 PARP、XIAP、细胞色素 C、COX4 抗体购自 BD Bioscience 公司,重组人 TRAIL 蛋白和兔抗人 DR5 抗体购自 R&D Systems 公司,鼠抗人 DR4 抗体购自 Alexis 公司。兔抗人生存素抗体购自 Cell Signaling Technology 公司,鼠抗人 β -actin 购自 Sigma 公司,蛋白酶体抑制剂 MG-132 购自 Calbiochem 公司。

1.2 细胞培养

DLD1-TRAIL/R 细胞用 RPMI 1640 培养液(含 5% 灭活胎牛血清、1% 谷胺酰氨、100 U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 中培养。

1.3 细胞质和线粒体提取

收集细胞,经胰酶消化,用冷 PBS 液洗 1 次,加入 100 μ l 地高辛缓冲液(内含 0.02% 地高辛,5 mmol/L EDTA,1 mmol/L PMSF,75 mmol/L 蔗糖,25 mmol/L 氯化钠,2.5 mmol/L Pipes,0.75 mmol/L 六水氯化镁),冰浴 10 min 后离心,收集上清液,即为

细胞质成分。线粒体提取方法参照文献^[7]。细胞质和线粒体用于细胞色素 C 和 Smac 的检测。

1.4 MTT 法检测 MG-132 联合 TRAIL 蛋白处理后 DLD1-TRAIL/R 细胞的存活率

DLD1-TRAIL/R 细胞以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板过夜,以不同浓度的 MG-132(5 ~ 20 μ mol/L)和 TRAIL 蛋白单独或联合处理,在检测时间点前 4 h 每孔加 20 μ l MTT 溶液继续培养 4 h,吸去上清,每孔加入 150 μ l DMSO,测定 D_{570} ,计算细胞存活率。

1.5 流式细胞术检测 MG-132 联合 TRAIL 蛋白处理后 DLD1-TRAIL/R 细胞的凋亡

收集相应处理后的 DLD1-TRAIL/R 细胞,PBS 液洗涤 2 次,再用预冷的 70% 乙醇固定,4 $^{\circ}$ C 过夜。在细胞测定前 30 min 用碘化丙啶染色,最后以流式细胞仪检测凋亡细胞(Sub-G₁)的百分率。

1.6 Western blotting 检测耐药细胞中凋亡信号分子表达和 JNK 激酶的磷酸化

收集相应处理后的细胞,加入 Laemmli 裂解液,超声匀浆后取总量 80 μ g 的蛋白,经 10% 或 12% 的 SDS-PAGE 分离后,转移到 PVDF 膜上,室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,PBST 液冲洗 3 次,加入所要检测的凋亡信号分子、JNK 激酶或 β -actin 的一抗,室温下孵育 1 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜,再洗膜 3 次后加入辣根过氧化物酶标记的相应的二抗,室温下共同孵育 1 h,采用 ECL 试剂盒进行检测。

1.7 统计学处理

结果采用 SPSS11.5 统计软件处理,各组间的差异采用 ANOVA 和非配对的 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 蛋白酶体抑制剂 MG-132 联合 TRAIL 逆转结肠癌细胞的获得性 TRAIL 耐药

DLD1-TRAIL/R 细胞用 5 ~ 20 μ mol/L 的 MG-132 预处理 2 h,再用 TRAIL 蛋白(20 ng/ml)处理 4 h,MTT 法检测细胞存活率,结果显示联合处理组的细胞存活率较单用 MG-132 组明显下降($P < 0.01$,图 1A)。处理 24 h 后,联合处理组的细胞存活率较单用 MG-132 组下降更明显($P < 0.05$,图 1B)。

上述联合处理 4 h 后,流式细胞术检测结果显示,即便是 5 μ mol/L 的 MG-132 和 TRAIL 联合处

理, 细胞的凋亡率可达 25% 以上, 比单药组明显增加 ($P < 0.01$, 图 2)。随着 MG-132 剂量的增加, 其与 TRAIL 的联合致凋亡作用并没有明显增强(图 2)。

2.2 MG-132 联合 TRAIL 蛋白活化耐药细胞的凋亡信号通路

Western blotting 结果显示, MG-132 ($5 \mu\text{mol/L}$) 联合 TRAIL 蛋白 (20 ng/ml) 处理后, DLD1-TRAIL/R 细胞中各种凋亡信号分子包括 caspase-8、caspase-9、caspase-3、Bid 以及 PARP 均明显活化, 其裂解形式明显增多; 而单用 MG-132 或 TRAIL 蛋白处理则仅有轻微改变(图 3A)。联合处理组中大量的细胞色素 C 和 Smac 从线粒体内释放到细胞质中(图 3B)。另外, 联合处理 24 h 后也获得了类似的结果, 不同的是单用 MG-132 组中 caspase-9、caspase-3 和 PARP 蛋白也有活化, 但 caspase-8 未见改变(图 3C)。实验结果提示 MG-132 通过线粒体凋亡途径发挥作用。

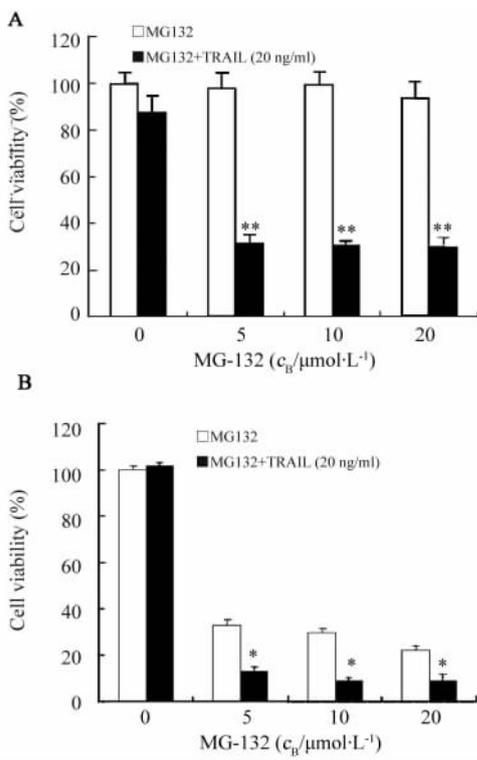


图 1 MTT 检测 MG-132 联合 TRAIL 处理后 DLD1-TRAIL/R 细胞的存活率

Fig. 1 Cell viability of DLD1-TRAIL/R cells after treated with MG-132 in presence of TRAIL protein determined by MTT assay

A: Cell viability 4 h after combined treatment of MG-132 and TRAIL protein was determined by MTT assay; B: Cell viability 24 h after combined treatment

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MG132

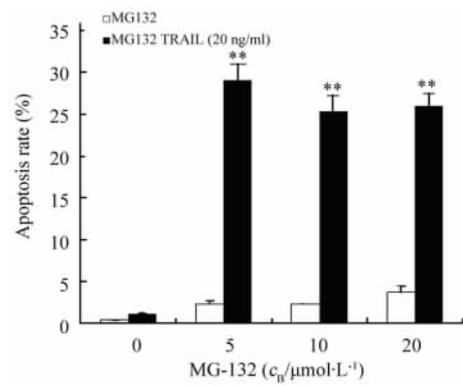


图 2 流式细胞术检测 MG-132 联合 TRAIL 处理后 DLD1-TRAIL/R 细胞的凋亡率

Fig. 2 Proportion of apoptotic DLD1-TRAIL/R cells after combined treatment of MG-132 and TRAIL protein as detected by FCM

** $P < 0.01$ vs MG132

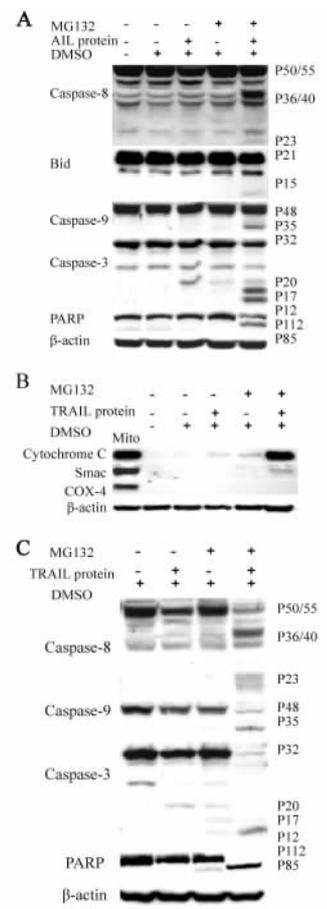


图 3 MG-132 联合 TRAIL 蛋白对 DLD1-TRAIL/R 细胞凋亡信号通路的活化

Fig. 3 Apoptosis profiles of DLD1-TRAIL/R cells after treated with MG-132 and TRAIL

A: Cleavage of caspases in DLD1-TRAIL/R cells treated for 4 h; B: Release of cytochrome C and Smac in DLD1-TRAIL/R cells treated for 4 h. The mitochondrial fraction (Mito) was used as a positive control; C: Caspases activation 24 h after addition of TRAIL protein

2.3 MG-132 上调耐药细胞中 DR5 和 Bik 的表达

Western blotting 检测了一些可能成为蛋白酶体抑制剂作用靶点的凋亡信号分子,包括 DR4、DR5、Bcl-2 家族成员以及 XIAP、Survivin 等蛋白分子,结果发现死亡受体 DR5 和凋亡诱导蛋白 Bik 的表达水平明显增高,尤其是 Bik,而其他分子却无明显变化(图 4)。

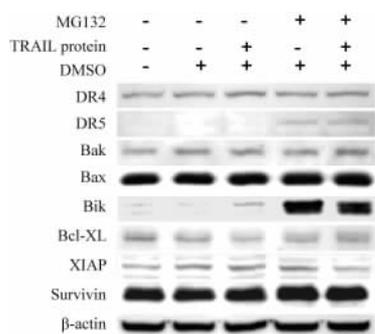


图 4 MG-132 上调 DLD1-TRAIL/R 细胞中 DR5 和 Bik 蛋白的表达

Fig. 4 Up-regulation of DR5 and Bik in TRAIL-resistant DLD1-TRAIL/R cells by MG-132(5 μmol/L)

2.4 JNK 激酶抑制剂 SP600125 对 MG-132 诱导的 JNK 活化和 DR5 表达的抑制

有文献^[8]报道蛋白酶体抑制剂能通过激活 JNK 途径来诱导肿瘤细胞发生凋亡。为验证 MG-132 逆转获得性 TRAIL 耐药是否涉及 JNK 途径,本研究检测了 JNK 的活化情况。结果发现, MG-132 处理后能诱导 JNK 发生磷酸化,这提示它激活了 JNK 途径(图 5A)。使用 JNK 激酶的抑制剂 SP600125,发现 SP600125 部分阻断了 JNK 的磷酸化,并削减了 MG-132 诱导的 DR5 表达增高,但是它不影响 Bik 蛋白的表达水平(图 5B)。

另外,流式细胞术检测结果提示, SP600125 不能削减 MG-132 和 TRAIL 对耐药细胞的联合致凋亡作用,细胞的凋亡率并没有降低($P > 0.05$, 图 6)。这些结果提示, MG-132 诱导的 JNK 途径激活和 DR5 表达增高并不是 MG-132 逆转结肠癌细胞获得性 TRAIL 耐药的主要机制。

3 讨论

TRAIL 是 TNF 超家族的新成员,它与包膜特异性受体 DR4 和 DR5 结合激活死亡受体通路,继而通过多种信号传导通路诱导肿瘤细胞发生快速凋亡,对正常细胞却无明显毒性,有望成为一种新的肿瘤治疗手段。但研究表明很多肿瘤细胞对 TRAIL

致凋亡敏感性较低甚至完全耐受,尤其是在治疗过程中形成的获得性耐药大大妨碍了临床上应用^[2]。如何有效地克服或逆转肿瘤细胞对 TRAIL 的耐药成为亟待解决的问题。

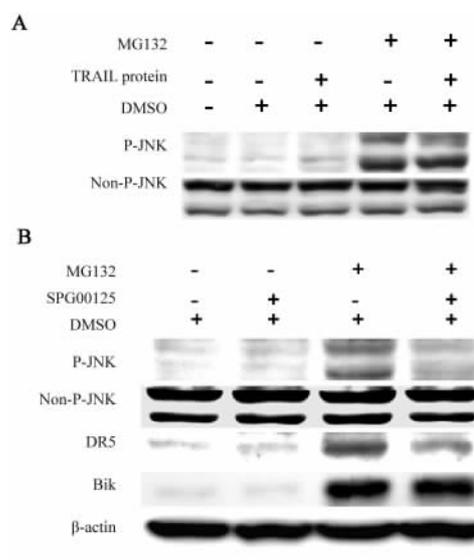


图 5 SP600125 对 MG-132 诱导的 DLD1-TRAIL/R 细胞 JNK 激酶活化和 DR5 表达的抑制

Fig. 5 Inhibitory effect of SP600125 on activation of JNK kinase and DR5 expression in DLD1-TRAIL/R cells induced by MG-132

A: JNK activation detected in TRAIL-resistant DLD1-TRAIL/R cells; B: Effect of JNK inhibitor SP600125

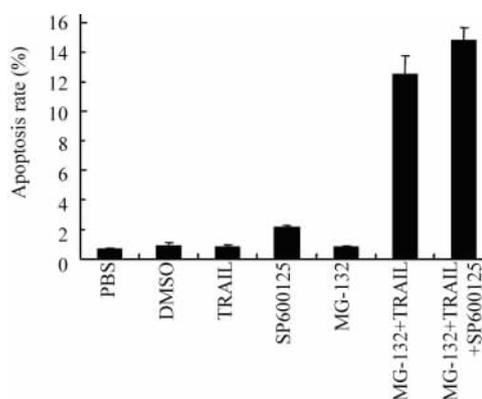


图 6 SP600125 没能抑制由 MG-132 和 TRAIL 联合诱导的 DLD1-TRAIL/R 细胞的凋亡

Fig. 6 SP600125 did not inhibit apoptosis of DLD1-TRAIL/R cells induced by MG-132 and TRAIL

本研究用 MG-132 联合 TRAIL 蛋白来处理对 TRAIL 获得性耐药的人结肠癌细胞株 DLD1,发现细胞存活率较单药处理组显著下降,而细胞凋亡百分率则明显增加,且各种凋亡信号分子明显活化,说

明 MG-132 可使对 TRAIL 获得性耐药的 DLD1 细胞对 TRAIL 治疗重新敏感。这一现象与当前许多研究结果是一致的:蛋白酶体抑制剂可以解决多种肿瘤细胞的 TRAIL 耐药问题^[3-4]。由于蛋白酶体参与了细胞内大部分蛋白的降解,包括细胞周期调节因子、信号分子、肿瘤抑制因子、转录因子、调控蛋白等,因此蛋白酶体抑制剂逆转肿瘤 TRAIL 耐药可能涉及多个环节,具体机制目前尚无定论。Sayers 等^[4]认为联合应用蛋白酶体抑制剂后能够减少凋亡抑制蛋白 c-FLIP 的表达,从而提高肿瘤细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性。Lashinger 等^[9]认为蛋白酶体抑制剂与 TRAIL 联合使用后, caspase-8 活化剪切 Bcl-2 家族促凋亡蛋白 Bid,引起 Bax 和 Bak 与线粒体膜上的电压依赖型阴离子通道蛋白结合,诱发细胞色素 C 的释放,从而促进细胞凋亡。也有研究^[3,10]发现死亡受体 DR4 和 DR5 在逆转耐药过程中起到重要作用。与之相似的是,本研究也发现蛋白酶体抑制剂 MG-132 可以上调死亡受体 DR5 的表达。但是, DR5 作为 TRAIL 的特异性受体,仅仅是启动细胞凋亡的死亡受体途径的第一步,进一步研究发现其与 MG-132 逆转获得性 TRAIL 耐药无明显关系,这提示可能在细胞凋亡通路中有更关键的作用点存在。

国内外有不少文献报道蛋白酶体抑制剂可以通过抑制转录因子 NF- κ B 的活性逆转肿瘤细胞 TRAIL 耐药。NF- κ B 是普遍存在于真核细胞中的转录调节因子,在很多肿瘤细胞株和某些人类肿瘤中稳定表达,与肿瘤发生、生长、播散和放疗抵抗密切相关。激活 NF- κ B 可诱导细胞生存中相关基因的表达,包括抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-XL 和 FLIP^[11],从而保护细胞不被其他因素诱导凋亡。蛋白酶体抑制剂通过抑制 I κ B α 的降解而阻止 NF- κ B 的释放,从而抑制 NF- κ B 启动的基因转录,促进细胞凋亡。An 等^[12]证实 bortezomib 可以剂量依赖性地诱导高度耐药的肾癌细胞 RCC 凋亡,其诱导凋亡的作用主要通过抑制 NF- κ B 的活性实现。但是,也有研究者得出相反的结论,Zhu 等^[10]研究发现 bortezomib 处理后的 DLD1 细胞中并未出现 I κ B α 水平增高或 NF- κ B 的活化。在本研究中, MG-132 处理后的 DLD1-TRAIL/R 细胞中并未发现 Bcl-XL(图 4)和 I κ B α 蛋白(数据未显示)表达有变化,提示 MG-132 逆转 TRAIL 耐药可能并不依赖 NF- κ B 途径。

本实验还检测了多种可能成为蛋白酶体抑制剂作用靶点的蛋白,发现 MG-132 可引起 Bik 蛋白的显著蓄积。Bik 蛋白是重要的促凋亡蛋白,它的高

表达可以阻断抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL 的作用,从而启动线粒体凋亡通路,导致细胞凋亡^[13]。Zhu 等^[10]已证实蛋白酶体抑制剂可诱导促凋亡蛋白 Bik/NBK 在人结肠癌细胞系 DLD-1、LOVO、SW620 和 HCT116 中快速聚集,促进细胞凋亡。因此, MG-132 诱导的 Bik 蛋白蓄积可能与其耐药逆转有直接关系,其机制还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(10):782-798.
- [2] Thorburn A, Behbakht K, Ford H. TRAIL receptor-targeted therapeutics: resistance mechanisms and strategies to avoid them[J]. *Drug Resist Updat*, 2008, 11(1-2):17-24.
- [3] Johnson TR, Stone K, Nikrad M, et al. The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22(32):4953-4963.
- [4] Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, et al. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP[J]. *Blood*, 2003, 102(1):303-310.
- [5] 朱洪波,陈琳琳,何超,等. 结肠癌获得性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体基因耐药机制[J]. *中华消化杂志*, 2006, 24(6):54-55.
- [6] 朱洪波,黄学锋,胡静姿,等. Bcl-XL 小分子干扰 RNA 逆转人结肠癌获得性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的耐药[J]. *中华肿瘤杂志*, 2008, 30(4):245-249.
- [7] 胡静姿,朱洪波,黄学锋,等. Bcl-XL siRNA 在 TRAIL 杀伤卵巢癌细胞中的增敏作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 14(6):522-526.
- [8] Dai Y, Rahmani M, Grant S. Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process[J]. *Oncogene*, 2003, 22(46):7108-7122.
- [9] Lashinger LM, Zhu K, Williams SA, et al. MG-132 abolishes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via a p21-dependent mechanism in human bladder and prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11):4902-4908.
- [10] Zhu H, Zhang L, Dong F, et al. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by MG-132 (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors[J]. *Oncogene*, 2005, 24(31):4993-4999.
- [11] Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(5):392-401.
- [12] An J, Sun Y, Fisher M, et al. Maximal apoptosis of renal cell carcinoma by the proteasome inhibitor bortezomib is nuclear factor- B dependent[J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, 3(6):727-736.
- [13] Huang DC, Strasser A. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death[J]. *Cell*, 2000, 103(6):839-842.

[收稿日期] 2008-12-24

[修回日期] 2009-02-10

[本文编辑] 韩丹