

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2011.03.011

TRAIL 联合吉西他滨对肺癌 NCI-H460 细胞增殖和凋亡的影响

孙非凡¹, 孙铭娟², 王梁华², 焦炳华² (1. 第二军医大学 研究生管理大队, 上海 200433; 2. 第二军医大学 基础部 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的: 观察吉西他滨(gemcitabine)联合 TNF 相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)对人肺癌细胞 NCI-H460 增殖和凋亡的影响。方法: MTT 法检测 NCI-H460 细胞的增殖, 流式细胞术检测 NCI-H460 细胞的凋亡。结果: 吉西他滨和 TRAIL 单用或联用均可浓度(0.001 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和时间(24, 48, 72 h)依赖性抑制 NCI-H460 细胞的增殖, 两药联用比单用时抑制率更高, 3 组药物作用 72 h 时对肿瘤的抑制率分别为 14.9% ~ 77.5%、23.4% ~ 74.8%、22.3% ~ 80.5%; 作用 72 h 时两药单用和联用对细胞增殖抑制的 IC_{50} 分别为 0.085 3、0.098 2、0.043 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。两药联用对 NCI-H460 细胞增殖的抑制效果还与用药顺序以及两药比例有关, 吉西他滨作用 24 h 后再加 TRAIL 比 TRAIL 作用 24 h 后再加吉西他滨对 NCI-H460 的抑制效果更好, 吉西他滨与 TRAIL 联用的比例为 1:0.3 时对 NCI-H460 细胞增殖的抑制率最大。吉西他滨和 TRAIL 联用时 NCI-H460 细胞的凋亡率显著高于两药单用的凋亡率(49.04% vs 29.33%、25.69%, $P < 0.01$)。结论: 吉西他滨与 TRAIL 联用可协同抑制肺癌细胞 NCI-H460 的增殖、促进细胞凋亡。

[关键词] 吉西他滨; TNF 相关凋亡诱导配体; 人肺癌细胞; NCI-H460; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.5 [文献标志码] A [文章编号] 1007-385X(2011)02-0296-05

Effect of gemcitabine combined with TRAIL on proliferation and apoptosis of lung cancer NCI-H460 cells

SUN Fei-fan¹, SUN Ming-juan², WANG Liang-hua², JIAO Bing-hua² (1. Graduates Administration Brigade, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of gemcitabine combined with TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) on proliferation and apoptosis of human lung cancer NCI-H460 cells. **Methods:** MTT assay was used to analyze the proliferation of NCI-H460 cells, and flow cytometry was used to examine the apoptosis of NCI-H460 cells. **Results:** Gemcitabine or TRAIL alone or in combination inhibited the proliferation of NCI-H460 cells in a time-(24, 48, 72 h) and concentration-dependent (0.001 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) manner. Gemcitabine combined with TRAIL had a stronger inhibitory effect than they were used alone, with the inhibitory ratios being 14.9% - 77.5%, 23.4% - 74.8%, and 22.3% - 80.5% after 72 h in combination, gemcitabine, and TRAIL groups, and the IC_{50} being 0.0853, 0.0982, and 0.0435 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively. The inhibitory effect of gemcitabine combined with TRAIL on proliferation of NCI-H460 cells was related to the administration order and the ratio of gemcitabine and TRAIL; gemcitabine treatment for 24 h and then giving TRAIL had a stronger inhibitory effect than TRAIL treatment for 24 h and then giving gemcitabine; when the ratio of gemcitabine and TRAIL was 1:0.3, the combination showed the strongest inhibitory effect. The apoptosis rate of NCI-H460 cells in the combination treatment group was significantly higher than in the other two groups (49.04% vs 29.33%, 25.69%, $P < 0.01$). **Conclusion:** Gemcitabine and TRAIL have synergistic effects in inhibiting proliferation and promoting apoptosis of lung cancer NCI-H460 cells.

[基金项目] 科技部“重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09103-689); 第二军医大学大学生创新能力培养研究课题资助项目(No. MS2009033)。Project supported by Key Science and Technology Foundation of “Major New Drug Research” of China(No. 2009ZX09103-689), and the Science Foundation for Cultivating Undergraduate Innovative Ability of Second Military Medical University (No. MS2009033)

[作者简介] 孙非凡(1989 -), 男, 四川省资中县人, 硕士生。E-mail: sun_fei_Fan@163.com

[通信作者] 焦炳华(JIAO Bing-hua, corresponding author), E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

[**Key words**] gemcitabine; TNF-related apoptosis inducing ligand(TRAIL); human lung cancer cell; NCI-H460; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2011, 18(3): 296-300]

肺癌在全球的发病率和病死率均较高,已成为威胁人类健康的主要致死性疾病之一。在肺癌患者中,有 80% 为非小细胞肺癌^[1]。由于缺乏早期诊断的手段,大部分非小细胞肺癌患者就诊时已失去了手术机会,只能接受以化疗为主的内科治疗。然而化疗的有效率和化疗后患者的生存期却难以令人满意,即使是吉西他滨(gemcitabine, GEM)为代表的第三代药物与铂类联合化疗,其有效率也仅为 30% ~ 40%,患者的中位生存期仅为 8 个月左右^[2]。近年来,一些研究^[3]尝试将传统的化疗药物与其他不同机制的抗肿瘤药物联合使用,希望能够产生协同作用,从而达到增强疗效、延长患者生存期的目的。TNF 相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)对一些肿瘤细胞有一定的特异抑制作用,而对正常组织和细胞无明显的毒性效应,这为肿瘤的生物治疗提供了一个新策略^[4]。本研究检测联合应用 TRAIL 和吉西他滨对非小细胞肺癌的抑制作用,探讨了两药联合应用对肿瘤细胞凋亡的影响,旨在为临床用药提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人非小细胞肺癌细胞 NCI-H460 为本室保存。细胞培养条件为:含 10% 小牛血清、100 IU/ml 青霉素及 100 IU/ml 链霉素, pH 值为 7.2 ~ 7.4 的 RPMI 1640 培养液中,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中常规培养。1 ~ 2 d 传代 1 次。胰酶和胎牛血清购自 Gibco 公司,吉西他滨购自法国礼来公司,TRAIL 购自上海怡尔生物技术有限公司。酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司,恒温 CO₂ 培养箱购自 Kendro 公司。

1.2 MTT 法检测吉西他滨和 TRAIL 对 NCI-H460 细胞的抑制

取对数生长期的 NCI-H460 细胞制备细胞悬液,调细胞密度至 1×10^5 个/ml。按每孔 100 μ l 接种于 96 孔板,待细胞贴壁 6 h 后,轻轻吸去上清,分别加入所需浓度的吉西他滨、TRAIL 以及两者混合物 200 μ l,分别设吉西他滨(G)组、TRAIL(T)组以及吉西他滨 + TRAIL 联合用药(G + T)组,各组分别设 0.001、0.01、0.1、1、10 μ g/ml 5 种药物质量浓度。同时设不含药物的阴性对照孔。每浓度每时间点设

6 孔,继续培养。在每一个时间点取样前 4 h 加入 MTT(浓度为 5 μ g/ml,用 0.1 mol/L PBS 配制)20 μ l,继续培养 4 h,轻轻弃去上清,每孔加入 150 μ l DMSO,微量振荡器振荡 10 min,结晶物充分溶解后,酶标仪上测每孔的 570 nm 的 D 值(D_{570})。通过下列公式计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率(%) = (实验组 D_{570} 值 - 对照组 D_{570} 值) / 对照组 D_{570} 值 \times 100%。同时计算 IC₅₀。

1.3 流式细胞术检测 NCI-H460 细胞的凋亡

贴壁细胞用不含 EDTA 的胰酶消化收集。用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 $\times g$ 离心 5 min)收集($1 \sim 5$) $\times 10^5$ 细胞,加入 500 μ l 的结合缓冲液悬浮细胞。加入 5 μ l Annexin V-EGFP 混匀后,加入 5 μ l PI,混匀。室温、避光、反应 5 ~ 15 min。在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理

实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 统计软件,组间比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 吉西他滨和 TRAIL 单独或联合用药时间和浓度依赖性抑制 NCI-H460 细胞的增殖

在 0.001 ~ 10 μ g/ml 的浓度范围内,作用 24 h 后,吉西他滨、TRAIL 以及两者合用的抑制率分别是 5.4% ~ 42.7%、1.3% ~ 43.2%、14.1% ~ 48.2%; 48 h 后的抑制率分别是 14.7% ~ 55.7%、7.1% ~ 56.3%、15.9% ~ 60.6%; 用药 72 h 后的抑制率分别增加到 14.9% ~ 77.5%、23.4% ~ 74.8%、22.3% ~ 80.5%; 随着时间的延长和浓度的增加,抑制率明显增加(图 1)。

联合应用吉西他滨和 TRAIL 24、48 h 和 72 h 时对细胞增殖抑制的 IC₅₀ 为 5.720 μ g/ml、0.504 μ g/ml 和 0.043 5 μ g/ml,显著低于吉西他滨和 TRAIL 单用的 IC₅₀ (7.943、2.980、0.085 μ g/ml, 7.692、2.692、0.098 μ g/ml),表明合用吉西他滨和 TRAIL 对 NCI-H460 细胞的抑制效果远比单用吉西他滨或 TRAIL 明显(图 2)。

2.2 吉西他滨和 TRAIL 联用时加药顺序对 NCI-H460 增殖的影响

联合应用吉西他滨和 TRAIL 后,在 0.001 ~ 10

μg/ml 的药物浓度范围内, 先加吉西他滨再加 TRAIL, 用药 24 h 后 IC₅₀ 是 0.017 6 μg/ml, 抑制率是 6.1% ~ 92.1%, 随着浓度的增加, 抑制率明显增加。先加 TRAIL 再加吉西他滨, 用药 24 h 后 IC₅₀ 是

0.046 5 μg/ml, 抑制率是 20.3% ~ 78.9%, 随着浓度的增加, 抑制率明显增加。结果显示, 吉西他滨作用 24 h 后再加 TRAIL 比 TRAIL 作用 24 h 后再加吉西他滨对 NCI-H460 的抑制效果更好(图 3)。

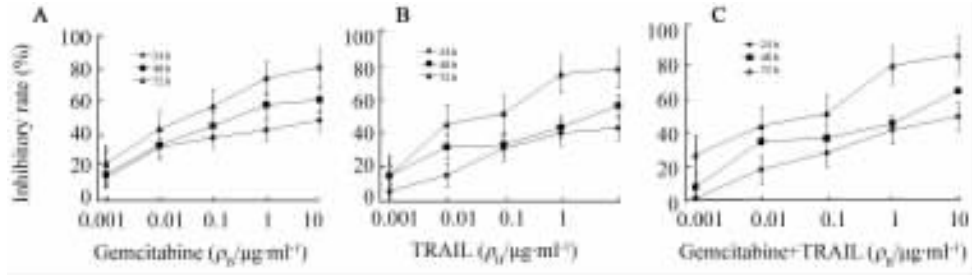


图 1 吉西他滨(A)和 TRAIL(B)单独或联合(C)用药时间、浓度依赖性抑制 NCI-H460 细胞的增殖
 Fig.1 Gemcitabine and TRAIL alone or in combination dose- and time-dependently inhibited growth of NCI-H460 cells
 * P < 0.5 vs 24 h

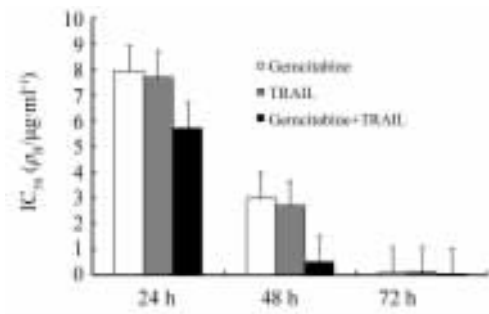


图 2 吉西他滨和 TRAIL 单独和联合作用时对 NCI-H460 细胞增殖的半数抑制浓度
 Fig.2 Half maximal (50%) inhibitory concentration (IC₅₀) of gemcitabine and TRAIL used alone or in combination

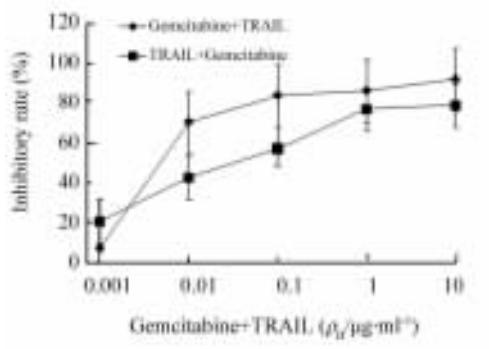


图 3 吉西他滨和 TRAIL 联用时加药顺序对 NCI-H460 增殖抑制的影响
 Fig.3 Effect of the different administration sequences of gemcitabine and TRAIL on proliferation of NCI-H460 cells

2.3 吉西他滨和 TRAIL 联用时不同药物浓度比对 NCI-H460 细胞的抑制作用

检测结果发现, 两药给药浓度比例不同会影响两药的联用效果。其中, 当吉西他滨和 TRAIL 联用的比例为 1:0.3 (即 G:T = 1:0.3) 时对 NCI-H460 细胞的抑制率最大, 能达到最好的联用效果(图 4)。

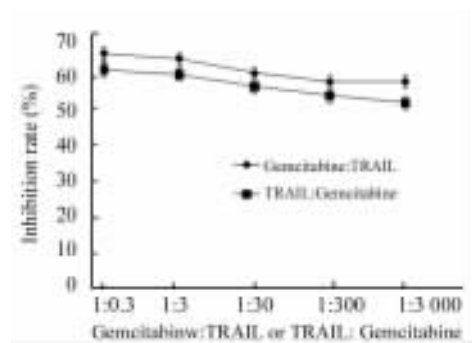


图 4 吉西他滨与 TRAIL 不同比例时对 NCI-H460 细胞增殖的抑制效果
 Fig.4 Effect of different ratios of gemcitabine and TRAIL on proliferation of NCI-H460 cells

2.4 吉西他滨和 TRAIL 单用及联用对 NCI-H460 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测 NCI-H460 细胞周期分布和凋亡率, 结果显示, 单独应用吉西他滨(2.980 μg/ml) 和 TRAIL(2.692 μg/ml) 分别诱导了 29.33% 和 25.69% 的 NCI-H460 细胞发生凋亡。联合用药后, 诱导了 49.04% 的 NCI-H460 细胞凋亡。TRAIL 联合吉西他滨与两药单独使用相比, 细胞的凋亡率均

显著增加($P < 0.01$, 图 5)。

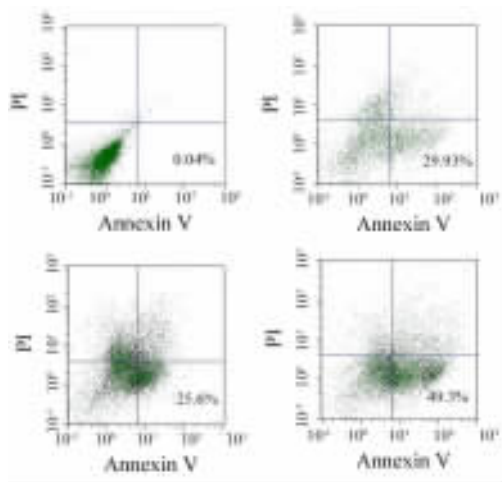


图 5 吉西他滨和 TRAIL 单用和联用时诱导 NCI-H460 细胞的凋亡

Fig. 5 Gemcitabine and TRAIL alone or in combination induced apoptosis of NCI-H460 cells

A: Control; B: Gemcitabine 2.980 $\mu\text{g/ml}$;
C: TRAIL 2.692 $\mu\text{g/ml}$; D: Gemcitabine
0.252 $\mu\text{g/ml}$ + TRAIL 0.252 $\mu\text{g/ml}$

3 讨论

吉西他滨属抗代谢类药物,被细胞摄入后,在细胞内转变为活性代谢物吉西他滨二磷酸酯或三磷酸酯,具有较高的抗肿瘤活性。它是细胞周期特异性药物,主要作用于 DNA 合成期,即 S 期细胞^[5]。研究^[6]表明,吉西他滨可促使多种肿瘤细胞株细胞周期阻滞在 S 期。Jones 等^[7]研究发现,吉西他滨可促使线粒体膜通透性增加,细胞色素 C 释放,更多的 caspases 3 和 9 激活, NF- κ B 活化增加,从而使非小细胞肺癌(non-small cell lungcarcinoma, NSCLC)细胞凋亡更加明显;同时吉西他滨诱导肿瘤细胞凋亡与 Smase、Bax 有关^[8-9]。

TRAIL 作为肿瘤坏死因子的家族成员之一,与其相应受体结合后可启动细胞内信号转导,在体内迅速诱导多种肿瘤细胞和转染细胞凋亡,但对正常细胞无毒性反应,此种选择性作用已使其成为目前肿瘤生物学治疗研究的热点。研究^[10]表明,TRAIL 主要通过两条不同的信号通路调控细胞凋亡:(1) 通过半胱氨酸蛋白酶(caspase)通路转导细胞凋亡信号。TRAIL 与 DR4 或 DR5 结合后形成配体-受体三聚体复合物,诱导 DRs 胞质段死亡结构域(death

domain, DD)与 Fas 相关蛋白死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)结合^[11]。FADD 以其 N 端死亡效应结构域(death-effector domain, DED)与 procaspase-8 结合,形成 DR4/DR5-FADD-procaspase-8 死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC),促使其中 procaspase-8 自身催化成有活性的 caspase-8,进而通过线粒体非依赖途径及线粒体依赖途径传递凋亡信号,最终导致细胞凋亡^[12]。(2) 激活 Akt 途径、核因子 κ B(NF- κ B)、蛋白激酶 C(PKC)、促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)家族成员等。被活化的途径或因子能调节 TRAIL 的凋亡诱导活性,使细胞对 TRAIL 出现不同程度的抗性。此外,肿瘤细胞诱骗型受体 DcR1、DcR2 表达水平高低及 caspase-8 在细胞内含量也影响细胞对 TRAIL 的敏感性^[13-16]。

本实验发现,吉西他滨和 TRAIL 单用或联用,均可浓度和时间依赖性抑制 NCI-H460 细胞的增殖。联用吉西他滨和 TRAIL 时 IC_{50} 远比单用吉西他滨或 TRAIL 时 IC_{50} 低,表明联用吉西他滨和 TRAIL 对 NCI-H460 细胞的抑制效果远比单用吉西他滨或 TRAIL 明显,且抑制效果呈时间依赖性。因此联合应用吉西他滨和 TRAIL 可明显提高对于肺癌的治疗疗效。其作用可能是通过:(1) 吉西他滨和 TRAIL 联用上调了死亡受体 DR4、DR5 的水平;(2) 抑制细胞凋亡抑制分子或 TRAIL 诱骗型受体 DcR1、DcR2 的表达;(3) 高效激活凋亡链中的 caspase-8 活性而促进 TRAIL 的凋亡诱导作用,从而使对单一化疗药物耐受的肿瘤细胞对联用药诱导的凋亡敏感。从实验结果中不难看出,联合应用吉西他滨和 TRAIL 后,在 0.001 ~ 10 $\mu\text{g/ml}$ 的药物浓度范围内,吉西他滨作用 24 h 后再加 TRAIL 比 TRAIL 作用 24 h 后再加吉西他滨对 NCI-H460 的抑制效果更好,这说明联用药时加药顺序会影响对于 NCI-H460 细胞的抑制效果。这可能是由于先用吉西他滨将 NCI-H460 细胞的细胞周期阻滞在 S 期,阻断了 DNA 的合成,从而抑制了肿瘤细胞的增殖,更加有利于后加 TRAIL 诱导 NCI-H460 细胞的凋亡作用。

实验结果还表明,当吉西他滨和 TRAIL 联用的比例为 1:0.3(即 G:T = 1:0.3)时对 NCI-H460 细胞的抑制率最大。这可能与 TRAIL 对于 NCI-H460 细胞的抑制效果比吉西他滨更强有关。总之,吉西他滨和 TRAIL 联用比单用对 NCI-H460 细胞抑制率更高,使 NCI-H460 细胞凋亡率明显提高,且两药联用对 NCI-H460 细胞的抑制效果还与用药的先后顺序

以及两药给药浓度比例有关^[17-20]。但由于本研究仅限于体外实验,与体内具体情况又有很大的差异,而且不同病理类型的肺癌细胞对药物的敏感性不同。因此,进一步开展体内、体外实验,明确药物作用机制等有待进行,而这些工作的逐渐深入必将推动肿瘤治疗基础研究和临床试验。

[参 考 文 献]

- [1] Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2002, 52(1): 23-47.
- [2] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non - small cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(1): 92-98.
- [3] Ramalingam SS, Dahlberg SE, Langer CJ. Outcomes for elderly, advanced-stage non small-cell lung cancer patients treated with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel: analysis of Eastern Cooperative Oncology Group Trial 4599 [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(1): 60-65.
- [4] Hwang MK, Min YK, Kim SH. Calmodulin inhibition contributes to sensitize TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer H1299 cells [J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(6): 919-926.
- [5] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 286-287.
- [6] Serrano MJ, Sanchez RP, Algarra I, et al. Evaluation of a Gemcitabine-doxorubicin-Paclitaxel combination schedule through flow cytometry assessment of apoptosis extent induced in human breast cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(5): 559-566.
- [7] Jones DR, Broad RM, Comeau LD, et al. Inhibition of nuclear Factor kappaB chemosensitizes non-small cell lung cancer through cytochrome c release and caspase activation [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, 123(2): 310-317.
- [8] Modrak DE, Cardillo TM, Newsome GA, et al. Synergistic interaction between sphingomyelin and gemcitabine potentiates ceramide-mediated apoptosis in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22): 8405-8410.
- [9] Xu ZW, Friess H, Buchler MW, et al. Overexpression of Bax sensitizes human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 49(6): 504-510.
- [10] Lin J, Zhang Z, Zeng S, et al. TRAIL-induced apoptosis proceeding from caspase-3-dependent and -independent pathways in dis-
- tinct HeLa cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 346(4): 1136-1141.
- [11] Sun XM, Cohen GM, Manjeri GR. Phenylarsine oxide interferes with the death inducing signaling complex and inhibits tumor necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(14): 2453-2462.
- [12] Min Y, Shi J, Zhang Y, et al. Death receptor 5-recruited raft components contributes to the sensitivity of Jurkat leukemia cell lines to TRAIL-induced cell death [J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(3): 261-267.
- [13] Zhang LD, Fang BL. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12(1): 22-28.
- [14] Kim KM, Lee JL. Amiloride augments TRAIL-induced apoptotic death by inhibiting phosphorylation of kinases and phosphatases associated with the PI3K-Akt pathway [J]. *Oncogene*, 2005, 24(22): 355-366.
- [15] Tang W, Wang W, Zhang Y. TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF-kappaB-dependent manner [J]. *Cell Res*, 2009, 19(6): 758-767.
- [16] Lin FL, Hsu JL, Chou CH. Activation of p38 MAPK by damnacanthal mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- α and p53 pathways [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1): 120-129.
- [17] Mom CH, Verweij J, Oldenhuis CN. Mapatumumab, a Fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(17): 5584-5590.
- [18] Wack S, Rejiba S, Parmentier C. Telomerase transcriptional targeting of inducible Bax/TRAIL gene therapy improves gemcitabine treatment of pancreatic cancer [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(2): 252-260.
- [19] Seol JW, Chaudhari AA, Lee YJ. Regulation of DR-5 protein and mitochondrial transmembrane potential by gemcitabine, a possible mechanism of gemcitabine-enhanced TRAIL-induced apoptosis [J]. *Oncol-Rep*, 2007, 18(3): 523-529.
- [20] Yano K, Horinaka M, Yoshida T. Chetomin induces degradation of XIAP and enhances TRAIL sensitivity in urogenital cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2): 365-374.

[收稿日期] 2011 - 04 - 20

[修回日期] 2011 - 05 - 15

[本文编辑] 韩 丹