

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.01.006

· 基础研究 ·

c-FLIP-L 影响乳腺癌 MDA-MB-231 细胞对 TRAIL 致凋亡作用的敏感性

孙大鹏, 贺成业, 张凤香, 韩冠英 (辽宁医学院附属第一医院 药学部, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的: 观察 *c-FLIP-L* 对 TRAIL 诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响及其具体机制。方法: 构建靶向 *c-FLIP-L* 的 siRNA 质粒, 转染乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, RT-PCR、Weston blotting 验证基因抑制效果。实验分空白对照组、TRAIL 组、*c-FLIP-L* siRNA 组和 *c-FLIP-L* siRNA + TRAIL 组共 4 组, MTT 法检测各组 MDA-MB-231 细胞的增殖情况, 流式细胞术检测 MDA-MB-231 细胞凋亡率, Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞侵袭能力, RT-PCR、Western blotting 检测 MDA-MB-231 细胞中 *c-FLIP-L*、caspase-3、caspase-8、MMP-2、MMP-9 的表达。结果: 靶向 *c-FLIP-L* 的 siRNA 质粒转染至乳腺癌细胞株可有效抑制 *c-FLIP-L* mRNA [(37.12 ± 3.02) vs (183.21 ± 8.31), (174.65 ± 10.06); $P < 0.05$] 及其蛋白的水平。*c-FLIP-L* siRNA 和 TRAIL 联合处理 MDA-MB-231 细胞, 与两者单独处理相比, 细胞增殖抑制率显著升高[72 h 时, (75.51 ± 2.01)% vs (33.75 ± 1.60)%, (34.31 ± 2.01)%; 均 $P < 0.05$], 凋亡率显著升高[72 h 时, (76.30 ± 4.11)% vs (38.95 ± 2.14)%, (29.28 ± 1.66)%; 均 $P < 0.05$], 对细胞侵袭能力的抑制也显著增强。*c-FLIP-L* siRNA 和 TRAIL 联合处理后, 与两者单独处理相比, 乳腺癌细胞中 caspase-3、caspase-8 的表达显著增强, 而 MMP-2、MMP-9 的表达明显减弱。结论: 抑制 *c-FLIP-L* 表达能够增强 MDA-MB-231 细胞对 TRAIL 的敏感性, 从而提高诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 其机制可能与 caspase-3、caspase-8 的表达上调和 MMP-2、MMP-9 的表达下调有关。

[关键词] 乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; TRAIL; *c-FLIP-L*; 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)01-0031-07

Effect of *c-FLIP-L* on the sensitivity of breast cancer MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis

Sun Dapeng, He Chengye, Zhang Fengxiang, Han Guanying (Department of Pharmacy, The First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *c-FLIP-L* on TRAIL-induced breast cancer apoptosis. **Methods:** *c-FLIP-L* was silenced in breast cancer MDA-MB-231 cells by siRNA. After *c-FLIP-L* silencing, cell proliferation was assessed by MTT assay, cell apoptosis by Annexin-V FITC/PI double staining flow cytometry, invasive potential by matrigel invasion assay, and protein and mRNA levels of *c-FLIP-L*, caspase-3, caspase-8, MMP-2, MMP-9 in transfected cells by Western blotting and RT-PCR respectively. **Results:** The sequence-specific siRNA significantly decreased *c-FLIP-L* mRNA (37.12 ± 3.02 vs 183.21 ± 8.31, 174.65 ± 10.06; $P < 0.05$) and protein levels as compared with the control. At 72 h after treatment, *c-FLIP-L* siRNA and TRAIL, either in combination or each alone, significantly inhibited proliferation ([75.51 ± 2.01]% vs [33.75 ± 1.60]%, [34.31 ± 2.01]%; $P < 0.01$), induced apoptosis ([76.30 ± 4.11]% vs [38.95 ± 2.14]%, [29.28 ± 1.66]%; $P < 0.05$), decreased the invasive capacity. Enhanced caspase-3 and caspase-8 expression, and inhibited MMP-2 and MMP-9 expression in MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** Inhibition of *c-FLIP-L* expression may increase the sensitivity of breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis, possibly through enhancing the expression of caspase-3, caspase-8 and inhibiting the expression of MMP-2 and MMP-9.

[基金项目] 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 2013022051)。Project supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No. 2013022051)

[作者简介] 孙大鹏(1978-),男,辽宁省锦州市人,博士,主要从事肿瘤生物治疗方面的研究。E-mail: sundapeng1978@126.com

[通信作者] 韩冠英(Han Guanying, corresponding author), E-mail: canghaiguanri@126.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20140218.1108.006.html>

[**Key words**] breast cancer; MDA-MB-231 cell; TRAIL; *c-FLIP-L*; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(1): 31-37]

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是 TNF 超家族的成员之一^[1], 对大多数肿瘤细胞具有良好的抗肿瘤活性, 但是有些肿瘤耐药细胞对 TRAIL 诱导凋亡作用存在天然或获得性耐药性, 制约了 TRAIL 在临床治疗中的广泛应用。研究^[2]证实, 在肿瘤耐药细胞株中, 某些凋亡抑制基因的过表达是导致凋亡信号终止的重要因素^[2]。

细胞型 Fas 相关死亡区域蛋白样白介素-1 β 转换酶抑制蛋白 [cellular Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme(FLICE) inhibitory protein, *c-FLIP*] 亦称 caspase-8 抑制蛋白, 是 Irmeler 等^[3]在病毒型 FLIP 的基础上从激活的人外周血白细胞中克隆的, 它的高表达可以抑制肿瘤细胞凋亡。*c-FLIP* 在结构上与 caspase-8 相似, 但无 caspase-8 所具有的蛋白水解酶活性。*c-FLIP* 包括长 FLIP (*c-FLIP-L*) 和短 FLIP (*c-FLIP-S*) 两种形式, *c-FLIP-L* 在很多组织中广泛表达, 在心肌、骨骼肌、淋巴组织和肾脏中含量最丰富, 已被证实是影响肿瘤细胞耐药性的重要因素^[4,5]。*c-FLIP-S* 表达谱较窄, 主要在淋巴组织中高表达^[4,5]。*c-FLIP-L* 通过与 caspase-8 竞争性结合来阻断凋亡通路的转导^[6,7]。顺铂通过下调 *c-FLIP-L* 的表达来增强骨肉瘤细胞对 Fas 介导的细胞凋亡的敏感性^[8]。5-氟尿嘧啶可通过降低 *c-FLIP-L* 表达来促进大肠癌细胞的凋亡^[9]。高表达 *c-FLIP-L* 可抑制化疗药物对某些肿瘤细胞的杀伤^[10], 抑制 *c-FLIP-L* 基因的表达可以提高耐药宫颈癌细胞株对顺铂的敏感性^[11]。

乳腺癌是危害我国妇女健康最主要的恶性肿瘤之一。研究^[12]证实, 乳腺癌细胞对 TRAIL 存在耐药性, 但该耐药性是否与 *c-FLIP-L* 高表达有关尚不得而知。本研究以乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为研究对象, 选用 *c-FLIP-L* 基因特异性 siRNA 沉默 *c-FLIP-L*, 探讨抑制 *c-FLIP-L* 是否能增强 TRAIL 杀伤乳腺癌细胞 MDA-M B-231 的能力。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。Leibovitz's L-15 培养基购自 Gibco 公司, 重组人可溶性 TRAIL 购自 Peprotech 公司, DMSO 购自

Sigma 公司, DMEM、RPMI1640 购于 Hyclone 公司, 胎牛血清、胰酶购于 Hyclone 公司, DAPI 购自 Sigma 公司, MTT 购自 Biosharp 公司, Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司, 鼠抗人 *c-FLIP-L* 单克隆抗体、兔抗人 caspase-3 和 caspase-8 单克隆抗体、兔抗人 MMP-和 MMP-9 多克隆抗体均购自 Abcam 公司, 山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG 购自中杉金桥公司, *c-FLIP-L* 特异性 siRNA 购自 Santa Cruz 公司。

1.2 *c-FLIP-L* siRNA 重组质粒转染 MDA-MB-231 细胞

c-FLIP-L siRNA 序列为: sense 5'-UCGGGGACU-UGGCUGAACUUU-3'、anti-sense 5'-AGUUCAGCC AAGUCCCCGACA-3'。利用哺乳动物的表达载体 pRNAT-U6/Neo 质粒与目的 siRNA 序列构建重组质粒, 待处于对数生长期的乳腺癌细胞生长至 60% ~ 80% 融合成片后, 去掉培养液, 加入含质粒 DNA 脂质体复合物的转染培养基, 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养 8 h, 换新鲜培养液, 继续培养 48 h, 收获细胞。空载体 pRNAT-U6/Neo 转染作为预试验的阴性对照。转染 48 h 后, RT-PCR 和 Western blotting 检测细胞中 *c-FLIP-L* 的表达情况, 以确定转染效果。

1.3 MTT 法检测乳腺癌细胞的增殖

取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 在培养液中制成单细胞悬液 5×10^4 /ml。将细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。实验分为 100 ng/ml TRAIL 组、100 ng/ml TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 组、*c-FLIP-L* siRNA 组和对照组。每个浓度设 4 个平行孔, 每孔体积为 200 μ l。药物作用 24、48 和 72 h 后, 每孔加入质量浓度为 5 mg/ml MTT 20 μ l, 相同培养条件下继续培养 4 h。吸去培养液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 避光, 恒温振荡器上振 10 min, 室温培养 20 min。放入酶标仪, 以 490 nm 波长检测光密度 (*D*) 值。

1.4 流式细胞术检测乳腺癌细胞凋亡率

以 5×10^5 /ml MDA-MB-231 细胞接种于培养瓶中, 每瓶 2 ml, 加入适量 Leibovitz's L-15 培养液培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸去培养液。按上述分组药物作用 24、48 和 72 h 后收集细胞, $1\ 500 \times g$ 离心 10 min, 弃上清, 用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 用结合缓冲液重新悬浮细胞, 使达 1×10^6 /ml。取 195

μl 细胞悬液于 5 ml 流式管中,加入 5 μl Annexin V-FITC,轻轻混匀后间隔 3 min,再加入 10 μl 或 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PI 溶液,混匀后于室温避光培养 10 min,加入 300 μl 结合缓冲液,轻轻混匀,用流式细胞术测定细胞凋亡率。每个样本收集 1×10^4 个细胞的荧光信号,结果以 WinMDI 2.9 软件处理。

1.5 Transwell 法检测 MDA-MB-231 细胞侵袭能力

将 matrigel 与 L-15 培养基按 1:4 稀释,在 Transwell 上室中加入 40 μl 的 matrigel 稀释液,37 $^{\circ}\text{C}$ 中培养 12 h,使胶凝固。各组 MDA-MB-231 细胞用含 0.1% BSA 的无血清培养基重新悬浮,调整细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 。取 100 μl 细胞悬液加入上室,500 μl 含血清培养基加入下室,每组设 3 个复孔,于 CO_2 培养箱培养 48 h。取出小室,用棉签沾取 PBS 轻轻擦掉上膜细胞,小室以甲醇固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;结晶紫染色 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。每个滤膜于镜下随机取 5 个视野($\times 100$)计数细胞。

1.6 Western blotting 检测相关蛋白的含量

各组处理 48 h 后收集细胞,以冷 PBS 清洗 2 次,以裂解缓冲液提取总蛋白,蛋白浓度采用 BCA 试剂盒测定。煮沸变性的蛋白以每孔 40 μg 的含量加样,经浓缩胶为 6%、分离胶为 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离。通过电转仪将凝胶上的蛋白样品移至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h。分别与 1:300 兔抗人 *c-FLIP-L* 抗体、1:400 兔抗人 caspase-3、caspase-8 抗体;1:1 000 兔抗人 MMP-2、MMP-9 抗体作用,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠 IgG(1:200)、山羊抗兔 IgG(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h,洗膜 3 次后用化学发光底物显影成像。

1.7 RT-PCR 检测相关基因的表达

收集并计数各组细胞,按 5×10^6 个细胞加 1 ml RNAiso Plus 提取细胞总 RNA,经紫外分光光度计检测 RNA 浓度,参照反转录试剂盒说明书进行反转录反应,反转录用引物见表 1。

反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,进入 PCR 循环,循环参数为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环 45 次,60 $^{\circ}\text{C}$ 收集荧光 5 s,然后 99 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,以 0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 的速度升温到 99 $^{\circ}\text{C}$ 。扩增后,计算目的基因条带与内参 β -actin 条带灰度的比值。

1.8 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *F* 检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 *c-FLIP-L* siRNA 有效抑制 MDA-MB-231 细胞中 *c-FLIP-L* 表达

RT-PCR 结果显示,*c-FLIP-L* mRNA(465 bp)在空白组和阴性对照组均有表达,而在 *c-FLIP-L* mRNA 组 *c-FLIP-L* siRNA 水平明显下调[(37.12 \pm 3.02) vs (183.21 \pm 8.31)、(174.65 \pm 10.06), $P < 0.05$,图 1A]。Western blotting 检测结果显示,与其他组相比,*c-FLIP-L*(相对分子质量为 55 000)蛋白表达在 *c-FLIP-L* siRNA 组明显降低(图 1B)。

表 1 反转录引物

Tab.1 Primers of reverse transcription

Gene	Primer sequence
<i>c-FLIP-L</i>	Forward 5'-UCGGGGACUUGGCUGAACUUU-3' Reverse 5'-AGUUCAGCCAAGUCCCCGACA-3'
<i>Caspase-3</i>	Forward 5'-AGCTAAGTCCCTGCACCACGA-3' Reverse 5'-TGTACAATCACCGACCTTGACCA 3'
<i>Caspase-8</i>	Forward 5'-CCAAATGCAAACTGGATGATGAC-3' Reverse 5'-CTCTTGTGATTTGGGCACAGAC -3'
<i>MMP-2</i>	Forward 5'-CAACAACCATGCTGGGCATC-3' Reverse 5'-TGATGTCAGTCACTTGGGCATTAAC-3'
<i>MMP-9</i>	Forward 5'-CAACAACCATGCTGGGCATC-3' Reverse 5'-TGATGTCAGTCACTTGGGCATTAAC-3'
β -actin	Forward 5'-GAAGGTGAAGTCTGGGAGTC-3' Reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTT-3'

2.2 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

与空白对照组比较,TRAIL(100 ng/ml)作用细胞 24、48 和 72 h 后,MDA-MB-231 细胞增殖抑制率升高[(18.15 \pm 1.12)% vs (3.67 \pm 0.43)%、(34.31 \pm 2.01)% vs (4.26 \pm 0.45)%、(37.02 \pm 0.41)% vs (6.11 \pm 1.03)%, $P < 0.05$],但在 72 h 以后,其抑制细胞增殖的作用不再增强。

与空白对照组比较,*c-FLIP-L* siRNA 作用细胞 24、48 和 72 h 后,MDA-MB-231 细胞增殖的抑制率升高[(21.01 \pm 2.31)% vs (3.67 \pm 0.43)%、(33.75 \pm 1.60)% vs (4.26 \pm 0.45)%、(43.22 \pm 1.53)% vs (6.11 \pm 1.03)%;均 $P < 0.05$]。

100 ng/ml TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 作用细胞

24、48 和 72 h 后, 细胞增殖的抑制率分别为 (45.67 ± 1.29)%、(61.02 ± 2.43)%、(75.51 ± 2.01)% , 明显高于空白对照组、TRAIL 组、*c-FLIP-L* siRNA 组(均 $P < 0.05$)。结果说明, 抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以明显增强 TRAIL 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的作用(图 2)。

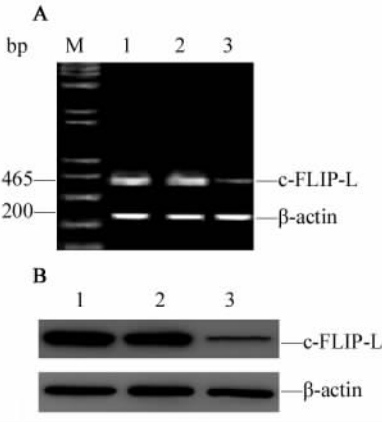


图 1 *c-FLIP-L* siRNA 抑制 MDA-MB-231 细胞中 *c-FLIP-L* 的表达

Fig. 1 *c-FLIP-L* siRNA inhibited the expression of *c-FLIP-L* in MDA-MB-231 cells

A: RT-PCR analysis of the expression of *c-FLIP-L*;
B: Western blotting analysis of the expression of *c-FLIP-L*
1: Control; 2: Negative control; 3: *c-FLIP-L* siRNA

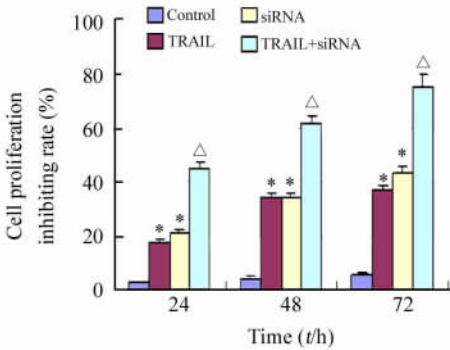


图 2 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL on proliferation of MDA-MB-231 cells

* $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs TRAIL or siRNA

2.3 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

与空白对照组比较, TRAIL 组作用 24、48 和 72 h 后, MDA-MB-231 细胞的凋亡率不断升高

[(15.94 ± 0.78)% vs (2.97 ± 0.12)% , (27.29 ± 1.87)% vs (4.26 ± 0.45)% , (29.28 ± 1.66)% vs (6.11 ± 1.03)% ; 均 $P < 0.05$], 但作用 48 h 以后, 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡率不再增高。

与空白对照组比较, *c-FLIP-L* siRNA 作用细胞 24、48 和 72 h 后, 可以促进 MDA-MB-231 细胞凋亡 [(16.00 ± 1.79)% vs (2.97 ± 0.12)% , (28.80 ± 3.47)% vs (4.26 ± 0.45)% , (38.95 ± 2.14)% vs (6.11 ± 1.03)% ; 均 $P < 0.05$]。

TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 作用细胞 24、48 和 72 h 后, 细胞的凋亡率分别为 (29.85 ± 2.13)%、(60.41 ± 3.51)%、(76.30 ± 4.11)% , 与空白对照组、TRAIL 组、*c-FLIP-L* siRNA 组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$) , 说明抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以明显增强 TRAIL 促进 MDA-MB-231 细胞凋亡的作用 (图 3)。

2.4 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

作用 48 h 后, Transwell 实验检测各组 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力, 结果(图 4)显示, 与空白对照组相比, TRAIL 组、*c-FLIP-L* siRNA 组、TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 组细胞的侵袭能力均下降 [(170 ± 9) vs (267 ± 13) 个, (185 ± 9) vs (267 ± 13) 个, (98 ± 7) vs (267 ± 13) 个; 均 $P < 0.05$], 而 TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 组与 TRAIL 组、*c-FLIP-L* siRNA 组相比, 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的抑制作用均明显加强, 说明抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以增强 TRAIL 抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

2.5 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞中 *c-FLIP-L* 表达的影响

作用 48 h 后, RT-PCR 和 Western blotting 检测 *c-FLIP-L* 的表达情况, 结果(图 5)显示, 与空白对照组比较, TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 组和 *c-FLIP-L* siRNA 组 *c-FLIP-L* 表达均明显被抑制, 而 TRAIL 组 *c-FLIP-L* 的表达无明显变化, 该结果说明 TRAIL 不能抑制 *c-FLIP-L* 的表达。

2.6 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞中 caspase-3、caspase-8 含量的影响

作用 48 h 后, RT-PCR 和 Western blotting 检测结果(图 6)显示, 与空白对照组比较, *c-FLIP-L* siRNA 组 caspase-3、caspase-8 表达均增强, TRAIL 组 caspase-3、-8 的表达无明显变化, 而 TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA 组与 TRAIL 组或 *c-FLIP-L* siRNA 组比较 caspase-3、caspase-8 的表达均明显增强。

2.7 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231

细胞中 MMP-2、MMP-9 含量的影响

RT-PCR 和 Western blotting 检测 TRAIL 和/或 *c-FLIP-L* siRNA 对乳腺癌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响,结果(图 7)显示,作用 48 h 后,与空白对照组比较,TRAIL 组对 MMP-2 和 MMP-9 的表达

抑制作用不明显 ($P > 0.05$); 与空白对照组和 TRAIL 组比较,*c-FLIP-L* siRNA 组明显抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达 ($P < 0.05$); *c-FLIP-L* siRNA + TRAIL 组与其他组比较,抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达的作用明显增强 ($P < 0.05$)。

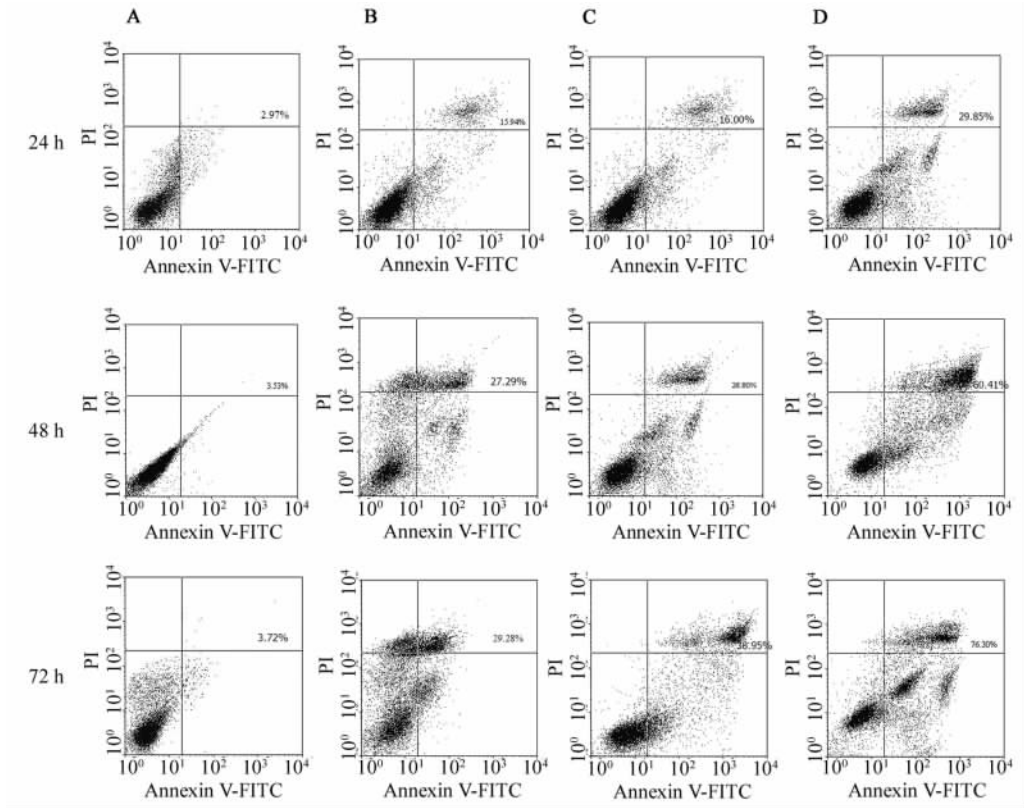


图 3 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL on apoptosis of MDA-MB-231 cells

A: Control; B: TRAIL; C: *c-FLIP-L* siRNA; D: TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA

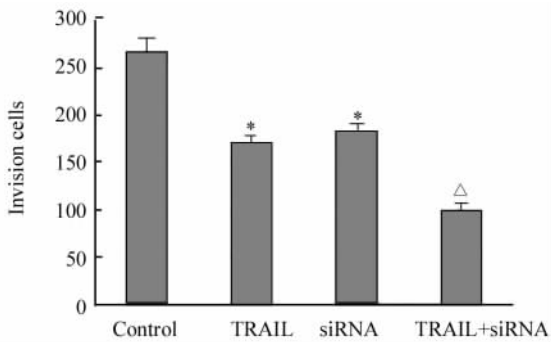


图 4 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响

Fig. 4 Effect of *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL on invasion ability of MDA-MB-231 cells

A: Control; B: TRAIL; C: *c-FLIP-L* siRNA; D: TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA

* $P < 0.05$ vs control; [△] $P < 0.05$ vs *c-FLIP-L* siRNA or TRAIL

3 讨论

c-FLIP 是近年来发现的一类含有死亡效应结构域的凋亡抑制蛋白,能抑制 Fas、DR3、TRAILR 介导的细胞凋亡^[13]。它包括长 *c-FLIP-L* 和短 *c-FLIP-S* 两种形式,其中 *c-FLIP-L* 是影响肿瘤细胞耐药性的重要因素。研究^[14-15]发现 *c-FLIP-L* 在大肠癌中的表达明显高于良性息肉及癌旁组织;非小细胞肺癌中 *c-FLIP-L* 的表达率为 83.33%,也明显高于肺良性病变组织,可见 *c-FLIP-L* 与肿瘤生长密切相关。

本实验针对 *c-FLIP-L* 设计 siRNA,成功构建靶向 *c-FLIP-L* 的真核表达载体,转染到乳腺癌细胞中 48 h 后,RT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示,构建的 *c-FLIP-L* siRNA 能明显抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 *c-FLIP-L* 的表达。MTT 检测和

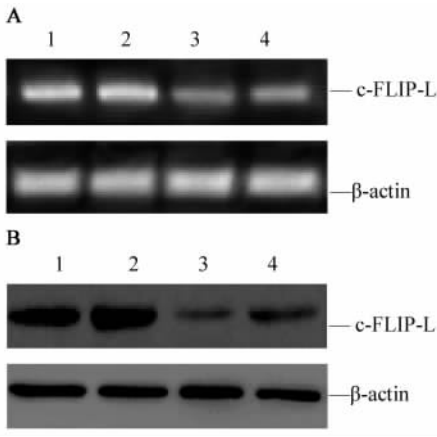


图 5 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 作用后 MDA-MB-231 细胞 *c-FLIP-L* 的表达

Fig. 5 Expression of *c-FLIP-L* in MDA-MB-231 cells treated by *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL

A : RT-PCR analysis of the expression of *c-FLIP-L*;
 B: Western blotting analysis of the expression of *c-FLIP-L*
 1: Control; 2: TRAIL; 3: *c-FLIP-L* siRNA;
 4: TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA

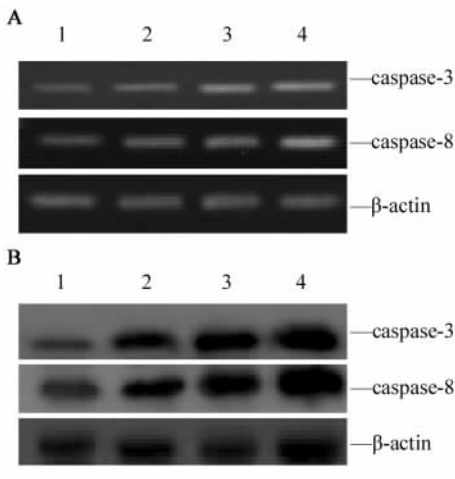


图 6 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 作用后 MDA-MB-231 细胞 caspase-3、caspase-8 的表达

Fig. 6 Expression of caspase-3 and caspase-8 in MDA-MB-231 cells treated by *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL

A: RT-PCR; B: Western blotting
 1: Control ; 2:TRAIL; 3:*c-FLIP-L* siRNA;
 4:TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA

Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测结果显示,当 TRAIL 作用时间在 48 h 以上时,其杀伤乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用不再增强,而当 TRAIL 与 *c-FLIP-L* siRNA 联合使用时则能明显促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡,并抑制其增殖。这些结

果表明,乳腺癌 MDA-MB-231 细胞对 TRAIL 存在耐药性,而抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以明显增强 TRAIL 杀伤乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的作用。

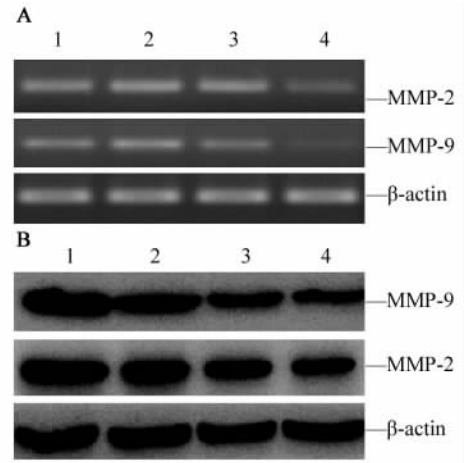


图 7 *c-FLIP-L* siRNA 和/或 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞中 MMP-2、MMP-9 表达的影响

Fig. 7 Expression of MMP-2 and MMP-9 in MDA-MB-231 cells treated by *c-FLIP-L* siRNA and/or TRAIL

A:RT-PCR;B:Western blotting
 1: Control; 2:TRAIL; 3: *c-FLIP-L* siRNA;
 4: TRAIL + *c-FLIP-L* siRNA

研究^[16-17]认为,很多化疗药物是通过增强 caspases 的表达来提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性。Caspases 属于半胱氨酸蛋白酶家族,它是细胞凋亡通路的重要组成部分。而 *c-FLIP* 是 caspase-8 抑制剂,它可以与 caspase-8 竞争,使 caspase-8 不能与 DISC 结合,从而导致 caspase-8 不能被充分活化,而低水平的 caspase-8 蛋白不能促发 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡^[18-19]。本研究发现,单独应用 TRAIL 作用乳腺癌细胞后,caspase-3, caspase-8 均未能被很好地激活,而当 TRAIL 和 *c-FLIP-L* siRNA 联合使用时 caspase-3、caspase-8 的活性明显被增高,说明当 *c-FLIP-L* 的表达被抑制时,可以促进 TRAIL 提高 caspase-3、caspase-8 活性的能力,从而进一步激活乳腺癌细胞的凋亡通路。

肿瘤侵袭和转移过程的影响因素很多,其中 MMPs 在肿瘤的侵袭和转移过程中起到十分重要的作用^[20-22]。当 MMPs 活性发生改变,尤其是 MMP-2 和 MMP-9 表达活性升高,几乎能降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中的各种蛋白成分,进而破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,这在肿瘤细胞的侵袭和转移中起到十分重要的作用。本研究通过 Transwell 实验检测发现,抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以

明显增强 TRAIL 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭能力,同时又通过 RT-PCR 和 Western blotting 检测发现,当 TRAIL 和 *c-FLIP-L* siRNA 联合使用时 MMP-2、MMP-9 的表达明显被抑制。结果说明,抑制 *c-FLIP-L* 的表达可以增强 TRAIL 抑制 MMP-2、MMP-9 表达的能力,进而抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭和转移。

综上,抑制 *c-FLIP-L* 的表达能够增强 caspase-3、-8 的表达,降低 MMP-2、-9 的表达,增强乳腺癌细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性,进而增强了 TRAIL 抑制乳腺癌细胞增殖和侵袭的能力,促进乳腺癌细胞的凋亡,这为乳腺癌基因治疗提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] Sbaïne W, Holger K, Day TW, et al. Apoptosis: Targets in pancreatic cancer [J]. Mol Cancer, 2003, 2 (1): 6-20.
- [2] Kim YS, Jin HO, Seo SK, et al. Sorafenib induces apoptotic cell death in human non-small cell lung cancer cells by down-regulating mammalian target of rapamycin (mTOR) dependent survivin expression [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(3): 216-226.
- [3] Ivanov VN, Partridge MA, Johnson GE, et al. Resveratrol sensitizes melanomas to TRAIL through modulation of antiapoptotic gene expression [J]. Exp Cell Res, 2008, 10(6): 1163-1176.
- [4] Safa AR, Day TW, Wu CH, et al. Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): A novel target for cancer therapy [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8(1): 37-46.
- [5] Bagnoli M, Canevari S, Mezzaninica D, et al. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: A key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(2): 210-213.
- [6] Kataoka T, Budd RC, Holler N, et al. The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF- κ B and Erk signaling pathways [J]. Curr Biol, 2000, 10(5): 640-648.
- [7] Krueger A, Schmitz I, Baumann S, et al. Cellular FLICE- inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase 8 activation at the CD95 death inducing signaling complex [J]. J Biol Chem, 2001, 276(11): 20633-20640.
- [8] Kinoshita H, Yoshikawa H, Shiiki K, et al. Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating c-FLIP-L expression [J]. Int J Cancer, 2000, 88(6): 986-991.
- [9] Leeona G, Daniel B, Longley, et al. Chemotherapy and TRAIL mediated colon cancer cell death: The roles of p53, TRAIL receptors, and c-FLIP Mol [J]. Cancer Ther, 2005, 39(12): 2026-2036.
- [10] Mischeau O, Solary E, Hammann A, et al. Fas ligand-independent, FADD mediate activation of the Fas death pathway by anticancer drugs [J]. Biol Chem, 1999, 274(12): 7987-7992.
- [11] Kamarajan P, Sun NK, Chao CC, et al. Up-regulation of c-FLIP in cisplatin treated HeLa cells causes cross-resistance to CD95/ Fas death signaling [J]. Biochem, 2003, 376(Pt 1): 253-260.
- [12] Zhang JD, Liu YX, Wang XX, et al. PKC resist tumor necrosis factor-related-apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by re-glating erbin in MCF-7 cell lines [J]. J Chin Biotechnol, 2004, 31(9): 91-92.
- [13] Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, et al. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors [J]. Exp Med, 1999, 190(7): 1025-1031.
- [14] Ryu BK, Chi SG, Lee MG, et al. Increased expression of cFLIP (L) in colonic adenocarcinoma [J]. Pathol, 2001, 194(1): 15-19.
- [15] 曹勇, 李清泉, 钟立厚, 等. FLIP 在非小细胞肺癌中的表达及其与细胞凋亡的关系 [J]. 中国肺癌杂志, 2003, 6(1): 51-54.
- [16] Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, et al. FADD/MO RT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2 [J]. Immunity, 2000, 6 (11): 599-609.
- [17] Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2000, 10(6): 327-337.
- [18] Maryline M, Aadre-patrick A, Miranda McEwan, et al. Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis [J]. Cell Stress Chap, 2008, 13(1): 313- 326.
- [19] Movsesyan VA, Stoica BA, Yakovlev AG, et al. Anandamide-induced cell death in primary neuronal cultures: Role of calpain and caspase pathways [J]. Cell Death Differ, 2004, 11(10): 1121-1132.
- [20] Madsen MA, Deryugina EI, Niessen S, et al. Activity-based protein profiling implicates urokinase activation as a key step in human fibrosarcoma intravasation [J]. Biol Chem, 2009, 28(1): 15997-16005.
- [21] Mehlen P, Puisieux A, Shen WG, et al. Metastasis: A question of life or death [J]. Nat Rev Cancer, 2009, 6(14): 449-458.
- [22] Deryugina EI, Quigley JP, Yoshikawa H, et al. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2011, 25(1): 9-34.

[收稿日期] 2013 - 11 - 18

[修回日期] 2013 - 12 - 22

[本文编辑] 韩丹