

# TRAIL 对人肺腺癌细胞株 Calu-3 增殖和凋亡的影响

王 晗<sup>1</sup>, 吴异兰<sup>2</sup>, 解方为<sup>1</sup>, 欧阳学农<sup>1</sup>

(1. 南京军区福州总医院, 福建 福州 350025; 2. 福建中医药大学, 福建 福州 350025)

**摘 要:** [目的] 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 对人肺腺癌细胞株 Calu-3 增殖和凋亡的影响。[方法] 用不同浓度 TRAIL 分不同时间段干预 Calu-3 细胞, MTT 法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。[结果] Calu-3 细胞生长被 TRAIL 抑制, 具有浓度和时间依赖性。TRAIL 能诱导 Calu-3 细胞凋亡。[结论] TRAIL 在体外具有抑制 Calu-3 细胞增殖, 促使 Calu-3 细胞凋亡的作用。

**关键词:** 肺肿瘤; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)05-0369-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.05.B004

## Effect of TRAIL on the Proliferation and Apoptosis of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line Calu-3

WANG Han<sup>1</sup>, WU Yi-lan<sup>2</sup>, XIE Fang-wei<sup>1</sup>, et al.

(1. Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effect of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) on the proliferation and apoptosis of the human lung adenocarcinoma cell line Calu-3. [Methods] Calu cells were treated with different concentrations of TRAIL at different times. Inhibition of proliferation and apoptosis of Calu-3 cells were detected by MTT assay and flow cytometry. [Results] The proliferation of Calu-3 cells were inhibited by TRAIL in a dose-time dependent manner. Apoptosis of Calu-3 cells was induced by TRAIL. [Conclusion] TRAIL could inhibit Calu-3 cells proliferation and induce cell apoptosis *in vitro*.

**Subject words:** lung neoplasms; TRAIL; cell proliferation; cell apoptosis

肺癌恶性程度很高,《2012 中国肿瘤登记年报》数据显示,中国肿瘤登记地区肺癌发病率为 53.57/10 万,死亡率 45.57/10 万<sup>[1]</sup>,居恶性肿瘤之首,严重威胁我国居民的健康。非小细胞肺癌(NSCLC)约占全部肺癌的 70%~80%<sup>[2]</sup>。多数患者确诊时已发生转移,晚期病例达 75%左右。晚期不能手术的患者多采用常规化疗或放疗,不良反应大,疗效不理想。随着新药的出现和新的治疗模式不断涌现,基于分子靶点的生物靶向药物在临床选择中扮演着越来越

重要的角色。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是近年来发现的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员,最早由 Wiley 等<sup>[3]</sup>筛选克隆得来,TRAIL 与死亡受体结合后可特异性地诱导肿瘤细胞和恶性转化细胞凋亡,近年来研究发现 TRAIL 对于多种恶性肿瘤细胞有抑制生长和细胞毒效应,而人体的正常细胞对 TRAIL 诱导的凋亡能较好地耐受<sup>[4]</sup>。这一特点使其成为近几年来肿瘤治疗的研究热点。本研究将用 TRAIL 处理人肺腺癌细胞株 Calu-3,观察 TRAIL 对细胞增殖和凋亡的影响,期为肺癌治疗探索新的途径。

**基金项目:** 国家自然科学基金(81274002);福建省自然科学基金(2012J01383);福建省自然科学基金面上项目(2010J01222)

**通讯作者:** 欧阳学农,主任,主任医师,硕士生导师,博士;南京军区福州总医院肿瘤科,福建省福州市西二环北路 156 号(350025); E-mail: oyxnong@163.com

**收稿日期:** 2014-01-12; **修回日期:** 2014-03-31

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

Calu-3 人肺腺癌细胞株购自中科院上海细胞库。培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司, ED-TA-胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。细胞培养瓶、培养板购自美国 Corning 公司。MTT 购自美国 Sigma 公司。AnnexinV-FITC/PI 凋亡试剂盒购自南京凯基生物公司。TRAIL 冻干粉剂(1mg/支)购自上海歌佰德生物技术有限公司-20℃保存, 使用时用超纯水溶解。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

Calu-3 细胞培养于含 10%胎牛血清的 MEM 培养基, 置于 37℃含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱。细胞生长达 70%~80%时, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 1:3~1:6 传代; 每周 2~3 次传代。

### 1.2.2 MTT 法检测细胞增殖

收集对数生长期的细胞, 调整细胞密度为 (3~5)×10<sup>4</sup>/ml, 每孔 100μl 接种于 96 孔培养板。待细胞充分贴壁后加入处理药物。药物分为 5 个浓度组 (200、100、50、25、12.5μg/ml), 同时设置调零孔 (不接种细胞, 仅加入相应的细胞培养液)、阴性对照组。每组设 6 个复孔。在 5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养。达到干预时间点后每孔加入 10μl MTT 溶液, 4h 后吸去孔内培养液, 每孔加入 100μl DMSO, 低速振荡 10min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔、对照孔。细胞增殖抑制率计算采用公式: 抑制率=[(对照孔 OD 值-调零孔 OD 值)-(加药孔 OD 值-调零孔 OD 值)]/(对照孔 OD 值-调零孔 OD 值)×100%。

### 1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

分成 24h、48h 处理组及其相应对照组。细胞处理后收集全部贴壁和漂浮的细胞, 1 000r/min 离心 5min, PBS 洗涤细胞 2 次并计数。用缓冲液重悬细胞, 调节细胞浓度至 1×10<sup>6</sup> 个/ml, 取 100μl 细胞悬液移入 5ml 流式管中, 加入 Annexin V 5μl 和 PI 10μl, 轻轻混匀, 室温避光放置 10min。立即进行检测并分析结果。

## 1.3 统计学处理

实验重复 3 次。所得数据使用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。不同时间点细胞增殖抑制率的比较使用独立样本 *t* 检验; 不同 TRAIL 浓度实验组之间

抑制率比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。所有结果均以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。不符合正态性和方差齐性的资料使用非参数分析方法。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 取  $\alpha=0.05$  水平。

# 2 结果

## 2.1 TRAIL 对 Calu-3 细胞增殖抑制率的影响

MTT 检测结果表明不同浓度组的细胞增殖抑制率变化有统计学意义, 根据 MTT 检测结果计算出 24h TRAIL 的 IC<sub>50</sub> 约为 69.6μg/ml, 48h TRAIL 的 IC<sub>50</sub> 约为 40.7μg/ml; 在同一 TRAIL 浓度组, 24h 和 48h 组增殖抑制率差异具有统计学意义 (Table 1, *P*<0.01)。

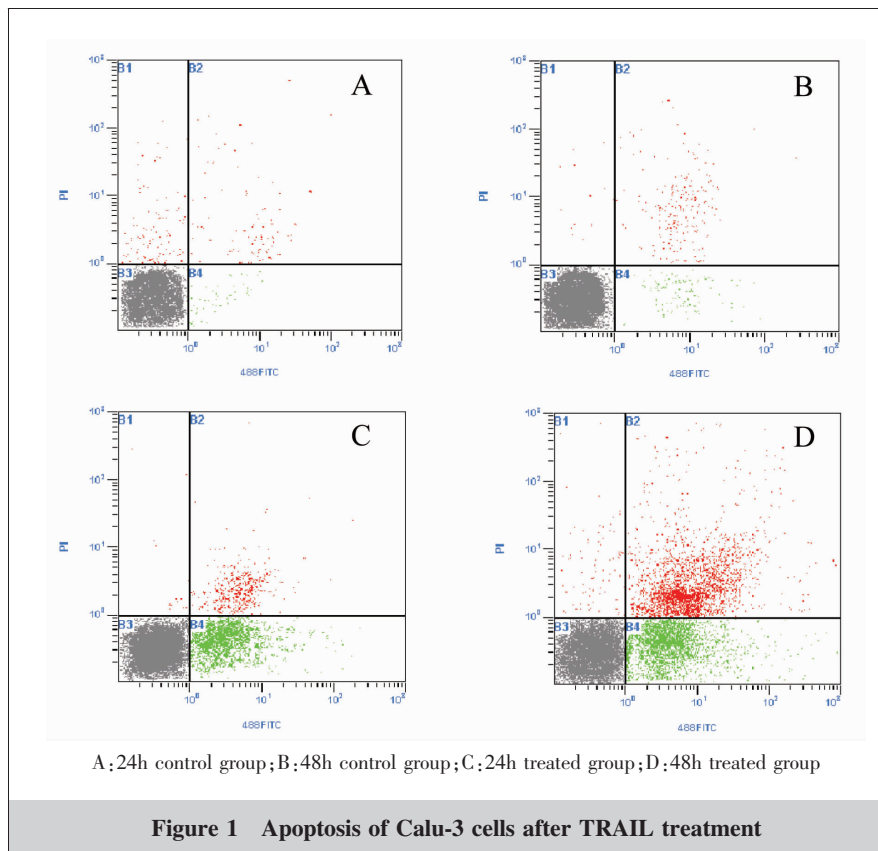
在 24h 时间点, 除了 200μg/ml 和 100μg/ml 组间比较 *P*=0.02 外, 其余各组间比较 *P* 值均<0.01, 差异具有统计学意义; 在 48h 时间点, 除了 200μg/ml 和 100μg/ml 组间比较 *P*=0.08 外, 其余各组间比较 *P* 值均<0.01, 差异具有统计学意义 (Table 1, *P*<0.05)。

**Table 1 Inhibition rates of TRAIL on the proliferation of Calu-3 cells (%)**

| TRAIL (μg/ml) | 24h        | 48h        | <i>t</i> | <i>P</i> |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| 200           | 67.64±2.73 | 80.41±4.53 | 2.8      | 0.011    |
| 100           | 59.56±2.51 | 72.58±4.13 | 4.6      | 0.017    |
| 50            | 46.72±1.09 | 55.48±2.33 | 3.9      | 0.007    |
| 25            | 29.46±1.21 | 38.63±2.96 | 5.5      | 0.033    |
| 12.5          | 16.74±1.35 | 23.63±1.09 | 3.1      | 0.049    |
| <i>F</i>      | 105.3      | 120.1      |          |          |
| <i>P</i>      | <0.001     | <0.001     |          |          |

## 2.2 TRAIL 对 Calu-3 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示 TRAIL 可诱导 Calu-3 细胞凋亡。用 25μg/ml 的 TRAIL 对 Calu-3 细胞干预 24、48h 后, 细胞出现凋亡。绿色荧光部分代表 FITC 染色的早期凋亡细胞, 红色荧光部分代表 PI 染色的晚期凋亡细胞或坏死细胞。无染色细胞代表正常细胞群。24h 处理组与相应对照组凋亡率均数差异比较 *t*=13.5, *P*<0.001。48h 处理组与相应对照组凋亡率比较 *t*=6.07, *P*=0.004, 24h 处理组与 48h 处理组凋亡率比较 *t*=1.07, *P*=0.039。TRAIL 处理 24h 组与 48h 组比较, 早期凋亡率、晚期凋亡/坏死率均有明显上升 (Figure 1, Table 2)。



**Table 2 Apoptosis rates of Calu-3 cells treated with TRAIL(%)**

| Groups            | Early apoptosis | Late apoptosis or dead cell | Survival cell |
|-------------------|-----------------|-----------------------------|---------------|
| 24h control group | 0.59±0.31       | 1.48±0.38                   | 96.94±2.79    |
| 48h control group | 1.17±0.28       | 2.41±0.48                   | 95.65±3.51    |
| 24h treated group | 17.49±3.87      | 5.39±1.03                   | 77.93±5.28    |
| 48h treated group | 21.08±4.43      | 16.39±3.21                  | 62.68±5.31    |

### 3 讨论

多数 NSCLC 患者确诊时已晚期<sup>[5]</sup>,目前的晚期 NSCLC 治疗仍是以放化疗为基础,但相当一部分晚期患者无法耐受足量放化疗的不良反应,因此开展各种新型生物制剂研究对于无法耐受常规放化疗的晚期 NSCLC 患者具有重要的临床价值,TRAIL 因较小的不良反应和较好的预期抗肿瘤作用而具有较好的潜在临床应用前景。

目前发现的 TRAIL 受体有 5 种:其中 2 个死亡受体(death receptor, DR)DR4 和 DR5 含有胞内的死亡结构域,可激活 Caspase 蛋白,向细胞内传递

TRAIL 诱导的凋亡信号。在正常组织和肿瘤组织都表达 TRAIL 和死亡受体,但比起正常组织,肿瘤组织相对表达更高水平的 TRAIL 和死亡受体,更易受 TRAIL 诱导凋亡<sup>[6-8]</sup>,这就为 TRAIL 用于治疗 NSCLC 提供了依据。研究发现肺癌细胞系 A549 会受 TRAIL 调控,诱导细胞凋亡<sup>[9]</sup>,但不同肺癌细胞系对 TRAIL 的敏感性有差异。例如 Luster 等<sup>[10]</sup>用流式细胞术检测 TRAIL 诱导 6 种肺癌细胞系凋亡情况,发现 TRAIL 可诱导肺癌细胞凋亡,并呈时间和浓度依赖性。其研究使用的细胞株包括了腺癌、大细胞癌等数个 NSCLC 细胞株,这些细胞株的 p53 基因状态有突变型也有野生型(其中 NCI-H441 为突变型, A549、H460 为野生

型),TRAIL 均可诱导其凋亡。本研究使用的人肺腺癌细胞 Calu-3 细胞是国外学者从 1 例曾接受过化疗治疗的肺腺癌患者的胸水中分离建立的,该细胞接种至裸鼠可成瘤,可作转染宿主,被广泛用于药物研究<sup>[11]</sup>,尤其是药物递送,经肺给药和侵袭性等方面的研究<sup>[12,13]</sup>。本研究发现 TRAIL 可抑制 Calu-3 细胞增殖,并诱导肺癌 Calu-3 细胞凋亡,呈时间和浓度依赖性,和国内外学者对其他肺癌细胞株的研究结论相符。

近年来 TRAIL 研究较多集中于其抗肿瘤机制和临床应用开发。本研究提示 TRAIL 的使用可能提高肺癌的治疗效果,促进患者生命的延续。但是,如何进一步提高 NSCLC 细胞系对 TRAIL 的敏感性,更好地将 TRAIL 应用于 NSCLC 的治疗中是亟待解决的问题。一些研究提示肺癌细胞系的遗传背景差异可能影响细胞株对 TRAIL 的敏感程度,例如 Blanco 等<sup>[14]</sup>测试了 88 种肺癌细胞系后发现几乎所有受测试的细胞系均存在 tp53、CDKN2A、Rb1 的功能失活,而 BRAF、MET、ErbB2 和 N-ras 改变则很少见。本研究使用的 Calu-3 细胞为 p53 基因突变型,

能被 TRAIL 诱导凋亡,和其他研究者的结果一致<sup>[10]</sup>。由于 TRAIL 诱导的凋亡不依赖于 p53 状态<sup>[15]</sup>,不同于放疗和化疗诱导凋亡的机制,和放、化疗联合可促进 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[16,17]</sup>,因此 TRAIL 联合放、化疗等治疗手段,很可能突破各自原有的治疗瓶颈,达到新的高度,是未来的研究方向。由于 TRAIL 诱导的凋亡效应受到诸多因素的调控,要将 TRAIL 真正应用到 NSCLC 临床治疗中,使患者从中获益,还需要更多的研究和探索。

## 参考文献:

- [1] He J, Chen WQ. Annual cancer registration in China [M]. Beijing: Military Science Press, 2012. [赫捷, 陈万青. 2012 中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军事科学出版社, 2012.]
- [2] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 533–543.
- [3] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. [J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673–682.
- [4] Kim Y, Seol DW. TRAIL, a mighty apoptosis inducer [J]. *Mol Cells*, 2003, 15(3): 283–293.
- [5] Reinmuth N, Payer N, Muley T, et al. Treatment and outcome of patients with metastatic NSCLC: a retrospective institution analysis of 493 patients [J]. *Respir Res*, 2013, 14 (1): 139.
- [6] Jalving M, Heijink DM, Koornstra JJ, et al. Regulation of TRAIL receptor expression by beta-catenin in colorectal tumours [J]. *Carcinogenesis*, 2014 Jan 20. [Epub ahead of print]
- [7] Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis [J]. *Biofactors*, 2013, 39(4): 343–354.
- [8] Cooper WA, Kohonen-Corish MR, Zhuang L, et al. Role and prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptor DR5 in non-small-cell lung cancer and precursor lesions [J]. *Cancer*, 2008, 113(1): 135–142.
- [9] Zhang X, Zhao J, Zhu W, et al. Synergistic effect of subtoxic-dose cisplatin and TRAIL to mediate apoptosis by down-regulating decoy receptor 2 and up-regulating Caspase-8, Caspase-9 and Bax expression on NCI-H460 and A549 cells [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2013, 16(5): 710–718.
- [10] Luster TA, Carrell JA, McCormick K, et al. Mapatumumab and lexatumumab induce apoptosis in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 antibody-resistant NSCLC cell lines when treated in combination with bortezomib [J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(2): 292–302.
- [11] Ong HX, Benaouda F, Traini D, et al. In vitro and ex vivo methods predict the enhanced lung residence time of liposomal ciprofloxacin formulations for nebulisation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 86(1): 83–89.
- [12] Chu H, Chen X, Wang H, et al. MiR-495 regulates proliferation and migration in NSCLC by targeting MTA3 [J]. *Tumour Biol*, 2013. [Epub ahead of print]
- [13] Yu XW, Wu Q, Lv W, et al. Metabonomics study of lung cancer cells based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2013, 31 (7): 691–696. [余欣尉, 吴谦, 吕望, 等. 基于液相色谱-质谱联用技术的肺癌细胞代谢组学分析 [J]. 色谱, 2013, 31 (7): 691–696.]
- [14] Blanco R, Iwakawa R, Tang M, et al. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines [J]. *Hum Mutat*, 2009, 30 (8): 1199–1206.
- [15] Meijer A, Kruijff FA, van der Zee AG, et al. Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective TRAIL over rhTRAIL [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(10): 2685–2695.
- [16] Oliver PG, LoBuglio AF, Zhou T, et al. Effect of anti-DR5 and chemotherapy on basal-like breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 133(2): 417–426.
- [17] Su L, Liu G, Hao X, et al. Death receptor 5 and cellular FLICE-inhibitory protein regulate pemetrexed-induced apoptosis in human lung cancer cells [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(16): 2471–2478.