

. 实验研究 .

外源性 TRAIL 基因转染联合氯喹诱导胶质瘤 U251 细胞凋亡

冯 驰 郭双毅 程龙海 罗 杰

【摘要】目的 探讨外源性肿瘤坏死因子凋亡相关诱导配体 (TRAIL) 联合氯喹对 U251 细胞凋亡的作用。**方法** 构建稳定表达 TRAIL 的质粒 pEGFP-TRAIL, 然后转染到胶质瘤细胞系 U251 细胞中 (TRAIL 组), 以 pEGFP-C1 质粒为阴性对照, 以不转染质粒为空白对照; 将氯喹 (50 μmol/L) 加入到转染 pEGFP-TRAIL 质粒 U251 细胞培养基中, 作为联合组。共聚焦显微镜检测 GFP-TRAIL 蛋白表达, MTT 法检测细胞抑制率, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, 免疫印迹法检测 GFP-TRAIL 和 Cleaved caspases-8 蛋白表达。**结果** 质粒转染后, 共聚焦荧光显微镜检测结果显示, pEGFP-C1 在细胞质中成弥散分布; 而 GFP-TRAIL 在细胞质中成聚点分布, 且荧光表达可以持续 48 h 以上; 免疫印迹法分析结果显示 TRAIL 组 TRAIL 蛋白表达水平明显高于空白对照组和阴性对照组 ($P<0.05$)。联合组细胞增殖抑制率 $[(47.22\pm0.15)\%]$ 明显高于阴性对照组 $[(3.21\pm0.04)\%, P<0.05]$ 和 TRAIL 组 $[(23.88\pm0.22)\%, P<0.05]$ 。联合组细胞凋亡率 $[(41.62\pm0.44)\%]$ 明显高于空白对照组 $[(2.14\pm0.09)\%, P<0.05]$ 、阴性对照组 $[(3.46\pm0.17)\%, P<0.05]$ 和 TRAIL 组 $[(22.48\pm0.43)\%, P<0.05]$ 。联合组 Cleaved caspases-8 蛋白表达水平明显高于阴性对照组、TRAIL 组 ($P<0.05$)。**结论** 外源性 TRAIL 基因转染后可以在细胞中稳定表达并诱导细胞凋亡, 与氯喹联合应用可以增强 TRAIL 诱导的细胞凋亡, 其机制可能是氯喹抑制细胞自噬。

【关键词】 胶质瘤; U251 细胞; 肿瘤坏死因子凋亡相关诱导配体; 氯喹; 细胞凋亡; 细胞自噬

【文章编号】 1009-153X(2017)08-0563-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41

Effect of exogenous TRAIL gene transfection combined with chloroquine on glioma U251 cells apoptosis

FENG Chi, GUO Shuang-yi, CHENG Long-hai, LUO Jie. Department of Neurosurgery, Taihe Hospital, Shiyan 44200, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of the exogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and chloroquine (CQ) on the apoptosis of glioma U251 cells. **Methods** Human glioma U251 cells were treated with exogenous green fluorescent protein (GFP)-TRAIL and/or CQ. The expression level of GFP-TRAIL in U251 cells was detected by confocal microscope. The cells vitality was detected by MTT assay and U251 cells apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit. The expression levels of proteins related to apoptosis were detected by Western blot. **Results** GFP-TRAIL was stably expressed in U251 cells and induced the U251 cells apoptosis after the transfection of exogenous TRAIL into U251 cells. The rate of inhibition of U251 cells proliferation $(47.22\pm0.15)\%$ and the U251 cell apoptosis rate $(41.62\pm0.44)\%$ were significantly higher in the glioma U251 cells treated with GFP-TRAIL combined with CQ respectively than those $[(23.88\pm0.22)\%$ and $(22.48\pm0.43)\%$ respectively] in the glioma U251 cells only treated with GFP-TRAIL or CQ and control group ($P<0.05$). **Conclusion** The GFP-TRAIL protein can be stably expressed in U251 cells transfected with TRAIL gene and induce the apoptosis of U251 cells. GFP-TRAIL combined with CQ can enhance the apoptosis of U251 cells.

【Key words】 Glioma; U251 cells; Apoptosis; Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; Chloroquine;

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis-induced ligand, TRAIL) 是肿瘤坏死因子家族成员^[1,2], 能够诱导大多数人类肿瘤细胞凋亡而对正常细胞没有明显毒性作用^[3-7]。因此, TRAIL 被认为是一种很有希望和有效的抗肿瘤药物^[8]。TRAIL 作为一种新型的分子靶向

药物, 在临床前期实验中表现出治疗肿瘤的强大优势, 但同时也出现了一些阻碍其进入临床治疗的问题, 如 TRAIL 蛋白半衰期很短^[9]、TRAIL 抵抗的出现等^[10]。本实验构建 TRAIL 的真核稳定表达载体, 通过基因转染使 TRAIL 蛋白能够在细胞中稳定表达, 同时联合应用氯喹, 探讨两者联合应用对胶质瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 pEGFP-C1 质粒由本实验室保存, HeLa 细胞基因组 cDNA 由本实验室保存, U251 细胞购自于

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.08.014
作者单位: 442000 湖北, 十堰市太和医院神经外科 (冯 驰、郭双毅、程龙海、罗 杰)
通讯作者: 罗 杰, E-mail: luojie-001@163.com

武汉大学保藏中心,TA克隆试剂盒购自于北京全式金生物技术有限公司,3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)和氯喹购自于美国Sigma公司,Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒、兔抗人cleaved caspases-8抗体购自于沈阳万类生物科技有限公司,兔抗人GAPDH抗体和兔抗人TRAIL蛋白购自武汉三鹰生物技术有限公司,DMEM培养基、胰蛋白酶购自于美国Gibco公司,胎牛血清购自于杭州四季青生物工程材料有限公司,Lipofectamine2000 Reagent转染试剂盒购自于美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和传代 U251细胞培养于含10%胎牛血清、1%青-链霉素DMEM中,37℃、5%CO₂恒温培养箱培养。根据细胞生长状态,隔天换液,每2~3 d用0.25%胰酶消化成细胞悬液,以1:3比例传代。

1.2.2 pEGFP-TRAIL真核表达载体的构建 根据pEGFP-C1质粒多克隆位点序列和TRAIL基因CDS序列设计合适PCR引物,上游引物为5'-ACG CTC GAG ATG GCT ATG ATG GAG GTC-3',5'端含有XhoI酶切位点,下游引物为5'-AGC GAA TTC TTA GCC AAC TAA AAA GGC CCC GA-3',5'端含EcoRI酶切位点。从HeLa细胞基因组cDNA上运用PCR技术得到含有XhoI和EcoRI两个酶切位点的TRAIL的CDS序列;然后,通过TA克隆、酶切酶连及转化构建出pEGFP-TRAIL质粒。最后通过基因测序验证质粒的正确性。

1.2.3 检测GFP-TRAIL蛋白的表达 按照Lipo2000转染说明书将pEGFP-C1和pEGFP-TRAIL质粒转染到U251中,24 h后,在共聚焦显微镜下观察GFP-TRAIL蛋白的表达。观察结束后,胰酶消化细胞,细胞悬液转移至1.5 mL Ep管中,10 000 g离心5 min,弃上清,留取底部蛋白沉淀。同时收集没有任何处理的U251细胞。采用免疫印迹法检测TRAIL及GFP-TRAIL蛋白的表达。

1.2.4 MTT法检测细胞增殖抑制率 pEGFP-C1、pEGFP-TRAIL质粒转染24 h后,胰酶消化成细胞悬液,以每孔5 000个细胞转移到96孔培养板中,细胞分为空白对照组、阴性对照组、TRAIL组和联合组,每组5个复孔,37℃培养箱培养过夜。次日清晨,联合组加入氯喹(50 μmol/L)。孵育6 h后行MTT实验,测定490 nm波长吸光度(optic density, OD)值,计算细胞生长抑制率(%)=(1-实验组OD值/对照组OD值)×100%。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡 取对数生长期U251细胞,按照Lipo2000转染说明书转染pEGFP-C1和pEGFP-TRAIL质粒,分为空白对照组、阴性对照组、TRAIL组和联合组。转染24 h后,联合组加入氯喹终浓度为(50 μmol/L)。24 h后,根据Annexin V-FITC凋亡试剂盒说明书运用共聚焦显微镜进行凋亡检测,其中被FITC染成绿色的细胞为凋亡细胞,未染色的为正常细胞。统计Confocal图像中细胞总数和凋亡细胞数,计算凋亡率。

1.2.6 免疫印迹法检测Cleaved caspases-8蛋白表达水平 取对数生长期U251细胞,按照Lipo2000转染说明书转染pEGFP-C1和pEGFP-TRAIL质粒,分为阴性对照组、TRAIL组和联合组。转染24 h后,联合组加入氯喹终浓度为(50 μmol/L)。6 h后收取细胞,采用免疫印迹法检测蛋白表达水平。

1.2.7 统计学方法 运用SPSS 16.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GFP-TRAIL蛋白表达水平 质粒转染后,共聚焦荧光显微镜检测结果显示,pEGFP-C1在细胞质中成弥散分布;而GFP-TRAIL在细胞质中成聚点分布,且荧光表达可以持续48 h以上(图1)。免疫印迹法分析结果显示TRAIL组TRAIL蛋白表达水平明显高于空白对照组和阴性对照组(图2)。

2.2 细胞增殖抑制率比较 阴性对照组U251细胞抑制率为(3.21±0.04)%,TRAIL组为(23.88±0.22)%,联合组为(47.22±0.15)%,两两比较均有统计学差异($P < 0.05$)。

2.3 细胞凋亡水平比较 空白对照组U251细胞凋亡率为(2.14±0.09)%,阴性对照组为(3.46±0.17)%,TRAIL组为(22.48±0.43)%,联合组为(41.62±0.44)%,两两比较均有统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 Cleaved caspases-8蛋白表达水平比较 阴性对照组、TRAIL组和联合组U251 Cleaved caspases-8表达水平见图3,联合组Cleaved caspases-8表达水平明显上升。

3 讨论

氯喹最初以抗疟药应用于临床,后来研究发现其可以抑制细胞自噬。研究表明,细胞自噬与肿瘤细胞TRAIL抵抗有着密切关系^[9,11]。有研究发现联合应用氯喹与人重组TRAIL蛋白处理肿瘤细胞后,

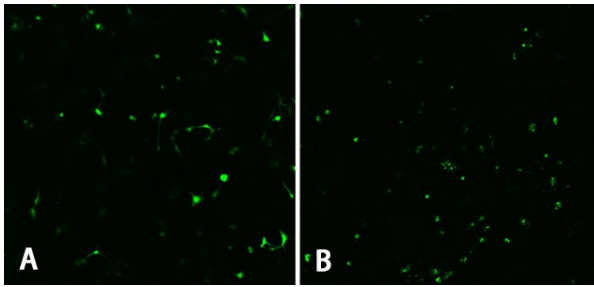


图 1 U251 细胞转染含 GFP 的 TRAIL 质粒后聚焦荧光显微镜下观察(×200)
A. pEGFP-C1 质粒; B. pEGFP-TRAIL 质粒; GFP: 绿色荧光蛋白;
TRAIL: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

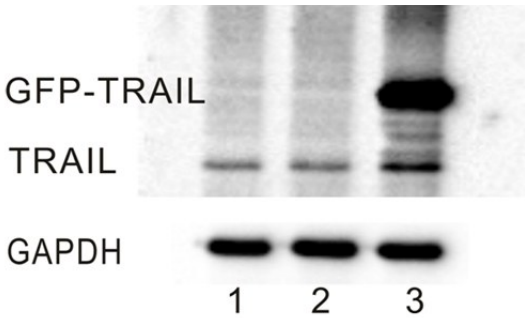


图 2 U251 细胞转染 TRAIL 质粒后电泳图
1. 空白对照组; 2. pEGFP-C1 质粒; 3. pEGFP-TRAIL 质粒;
GFP: 绿色荧光蛋白; TRAIL: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导
配体; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

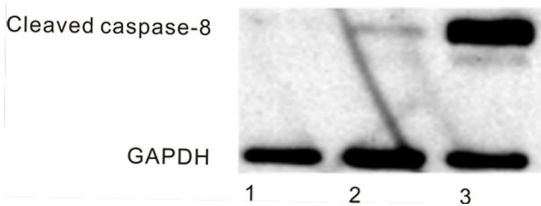


图 3 U251 细胞转染 TRAIL 质粒后电泳图
1. pEGFP-C1 质粒; 2. pEGFP-TRAIL 质粒; 3.
pEGFP-TRAIL+氯喹; TRAIL: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导
配体; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

氯喹可通过增加 TRAIL 蛋白和 mRNA 的稳定性, 增强 TRAIL 诱导的细胞凋亡^[12]。我们成功构建出 TRAIL 基因的稳定表达载体, 运用基因转染技术, 发现 GFP-TRAIL 可以稳定持续的表达, 并能诱导 U251 细胞凋亡; 同时, 我们联合应用 GFP-TRAIL 基因转染和氯喹处理 U251 细胞, 发现联合处理后肿瘤细胞的凋亡明显增强。

本研究通过 GFP-TRAIL 基因转染技术和自噬

抑制剂氯喹的使用, 实现 TRAIL 蛋白在细胞内稳定持续表达, 并能显著诱导肿瘤细胞凋亡的目的, 为增加 TRAIL 稳定性和增强 TRAIL 诱导的凋亡效应提供了一种新方法。

【参考文献】

[1] 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: 673-682.

[2] Wu M, Das A, Tan Y, Induction of apoptosis in glioma cell lines by TRAIL/Apo-2l [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(4): 464-470.

[3] Allen JE, El-Deiry WS. Regulation of the human TRAIL gene [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13: 1143-1151.

[4] Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, *et al.* Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(2): 155-162.

[5] Griffith TS. Induction of tumor cell apoptosis by TRAIL gene therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 542(542): 315-334.

[6] Merino D, Lalaoui N, Morizot A, *et al.* TRAIL in cancer therapy: present and future challenges [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(10): 1299-314.

[7] Walczak H, Miller RE, Ariail K, *et al.* Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo [J]. *Nat Med*, 1999, 5(2): 157-163.

[8] Fulda S. Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 818(8):167.

[9] Stuckey DW, Shah K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19: 685-694.

[10] Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 69.

[11] Gump JM, Staskiewicz L, Morgan MJ, *et al.* Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16 (1): 47-54.

[12] Park EJ, Min KJ, Choi KS, *et al.* Chloroquine enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of DR5 by stabilization of mRNA and protein in cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22921.

(2017-02-28 收稿, 2017-05-02 修回)