

. 实验研究 .

氯喹通过抑制自噬促进 TRAIL 诱导的胶质瘤细胞凋亡

冯 驰 郭双毅 程龙海 罗 杰

【摘要】目的 探讨氯喹对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)诱导的胶质瘤细胞凋亡的影响。**方法** 体外培养人脑胶质瘤细胞 U251 和 HeLa 细胞,分为对照组、氯喹组、重组人 TRAIL 蛋白(rhTRAIL)组和联用组(氯喹与 rhTRAIL 联合应用);MTT 法检测细胞活力,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡,共聚焦显微镜检测 GFP-LC3 的分布判断细胞自噬水平,Western Blot 检测 cleaved caspase-8 的表达水平。**结果** 氯喹和 rhTRAIL 均显著增加 U251 细胞和 HeLa 细胞自噬水平,而且联用较单独应用自噬水平更高,HeLa 细胞自噬水平明显高于 U251 细胞。U251 细胞和 HeLa 细胞增殖抑制率和细胞凋亡率:氯喹组与对照组均无统计学差异($P>0.05$),rhTRAIL 和联用组均明显高于氯喹组($P<0.05$),联用组明显高于 rhTRAIL 组($P<0.05$)。氯喹组和对照组 Cleaved caspases-8 水平无统计学差异($P>0.05$),rhTRAIL 和联用组均明显增高($P<0.05$),联用组明显高于 rhTRAIL 组($P<0.05$)。**结论** 氯喹能通过抑制细胞自噬,增强 TRAIL 诱导的 U251 细胞凋亡。

【关键词】 胶质瘤;U251 细胞;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;氯喹;细胞凋亡;细胞自噬

【文章编号】 1009-153X(2016)04-0227-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; R 730.59

Chloroquine promotes TRAIL-induced apoptosis of glioma cells through inhibition of autophagy

FENG Chi¹, GUO Shuang-yi², CHENG Long-hai², LUO Jie^{1,2}. 1. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Department of Neurosurgery, Shiyan Taihe Hospital, Shiyan 442000, China

【Abstract】 Objective To study the mechanism of glioma cells apoptosis induced by Chloroquine (CQ). **Methods** Human glioma U251 cells were treated with recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) and/or CQ. The cells vitality was detected by MTT assay and the U251 cells apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit. The GFP-LC3 distribution was detected by confocal microscope. The expression level of caspases-8 was detected by Western Blot. **Results** The autophagy level of the U251 cells treated with rhTRAIL increased when rhTRAIL induced the U251 cells apoptosis. The growth inhibition rate [(47.11±0.18)%] and the cell apoptosis rate [(34.31±0.97)] of U251 cells treated with rhTRAIL and CQ were significantly higher respectively than those [(23.88±0.48)% and (19.68±0.67)% respectively] of U251 cells treated with rhTRAIL only ($P<0.05$). The level of cleared caspases-8 expression was significantly higher in the U251 cells treated by rhTRAIL and CQ than those in U251 cells treated by rhTRAIL only ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that CQ may enhance rhTRAIL-induced apoptosis through inhibiting the autophagy induced by rhTRAIL.

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

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)可诱导细胞凋亡^[1]。但是,随着研究的深入,TRAIL 抵抗的出现成为 TRAIL 临床应用的障碍。研究发现 TRAIL 抵抗的肿瘤细胞株自噬水平明显高于 TRAIL 敏感的肿瘤细胞株^[2]。凋亡和自噬密不可分,二者相互调控,自噬是克服 TRAIL 抵抗的潜在靶点^[3,4]。氯喹作为一种自噬抑制剂。低浓度氯喹可改变溶酶体的 pH 值,阻止自噬体与溶酶体的结合,抑制自噬^[5]。本研究探讨 TRAIL 在氯喹存在条件下对神经胶质瘤

U251 细胞凋亡的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 HeLa 细胞、GFP-LC3 质粒由本实验室提供,U251 购自于武汉大学保藏中心,rhTRAIL 蛋白购自于美国 PeproTECH 公司,MTT 试剂盒和氯喹购自于美国 Sigma 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒和 cleaved caspases-8 抗体购自于万类公司,DMEM 培养基购自于美国 Gibco 公司,胎牛血清购自于四季青公司。

1.2 细胞培养与传代 含 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 DMEM 培养 HeLa 细胞和 U251 细胞培养。根据细胞生长状态,每 2~3 d 以 1:3 比例传代。

1.3 细胞转染 将对数生长期 HeLa 细胞和 U251 细胞

传代至荧光培养皿中,待细胞贴壁汇合度到30%时,进行GFP-LC3质粒的转染。按照Lipofectamine2000转染试剂盒说明书进行瞬时转染。

1.4 共聚焦显微镜观察GFP-LC3的表达 将转染GFP-LC3质粒的HeLa细胞和U251细胞分为空白对照组、rhTRAIL组和氯喹组。24 h后分别加入胎牛血清、rhTRAIL(100 ng/ml)和氯喹(50 μmol/L);12 h后,进行DAPI染色,共聚焦显微镜下观察GFP-LC3的表达情况。

1.5 MTT法检测细胞抑制率 将对数生长期HeLa细胞和U251细胞接种于96孔板中,每孔100 μl,细胞密度为5×10⁴。将普通HeLa细胞和U251细胞分为对照组、rhTRAIL组、氯喹组和rhTRAIL与氯喹联用组,每组5个复孔。细胞贴壁后,弃去原培养基,分别加入含胎牛血清、TRAIL(100 ng/ml)、氯喹(50 μmol/L)及两者联用的新培养基。孵育24 h后行MTT试验。测定490 nm波长光密度(optical density, OD)值,计算细胞生长抑制率(%)=(1-实验组OD值/对照组OD值)×100%。

1.6 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡 对数生长期普通U251细胞接种于6孔板,分为对照组、胎牛血清组、rhTRAIL组、氯喹组和rhTRAIL与氯喹联用组。细胞汇合度达80%后,分别加入含胎牛血清、TRAIL(100 ng/ml)、氯喹(50 μmol/L)及两者联用的新培养基培养。作用24 h后,用Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒检测U251细胞凋亡,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图中细胞总数和凋亡细胞数,计算凋亡率。

1.7 Western Blot检测Cleaved caspases-8表达水平 对数生长期U251细胞接种于6孔板,分为胎牛血清组、rhTRAIL组和rhTRAIL与氯喹联用组。细胞汇合度达80%后,分别加入胎牛血清、TRAIL(100 ng/ml)、氯喹并更换新的培养基培养。24 h后收取细胞煮样后按试剂盒说明书进行检测。

1.8 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, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞自噬水平变化 对照组GFP-LC3绿色荧光呈均匀弥散分布,很少有聚点出现;TRAIL组和氯喹组出现大量绿色聚点。HeLa细胞GFP-LC3绿色荧光强度高于U251细胞。见图1。

2.2 细胞活力变化 U251细胞增殖抑制率:对照组为(2.22±0.14)%,氯喹组为(3.04±0.46)%,rhTRAIL组为(23.88±0.48)%,rhTRAIL与氯喹联用组为(47.11±0.18)%;对照组和氯喹组无统计学差异($P > 0.05$),rhTRAIL组明显高于氯喹组($P < 0.05$),rhTRAIL与氯喹联用组明显高于rhTRAIL组($P < 0.05$)。HeLa细胞增殖抑制率:对照组(2.22±0.11)%,氯喹组(3.09±0.46)%,rhTRAIL组(15.83±0.39)%,rhTRAIL与氯喹联用组(46.03±0.56)%;对照组和氯喹组无统计学差异($P > 0.05$),rhTRAIL组明显高于氯喹组($P < 0.05$),rhTRAIL与氯喹联用组明显高于rhTRAIL组($P < 0.05$)。

2.3 U251细胞凋亡率变化 对照组U251细胞凋亡率(2.10±0.12)%,胎牛血清组为(2.19±0.03)%,氯喹组为(3.4 ± 0.07)%,rhTRAIL组为(19.68 ± 0.67)%,rhTRAIL与氯喹联用组为(34.31±0.97)%。对照组、氯喹组和胎牛血清组均无统计学差异($P > 0.05$),rhTRAIL组明显高于氯喹组($P < 0.05$),rhTRAIL与氯喹联用组明显高于rhTRAIL组($P < 0.05$)。

2.4 Cleaved caspases-8表达水平改变 rhTRAIL组Cleaved caspases-8表达水平明显高于胎牛血清组($P < 0.05$),rhTRAIL与氯喹联用组明显高于rhTRAIL组($P < 0.05$)。见图2。

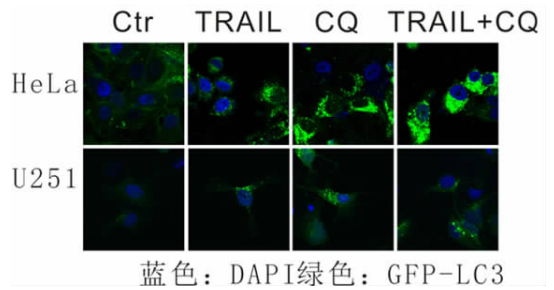


图1 共聚焦显微镜观察细胞自噬水平

Ctr: 对照组;TRAIL: rhTRAIL组;CQ: 氯喹组;TRAIL+CQ: rhTRAIL+氯喹组

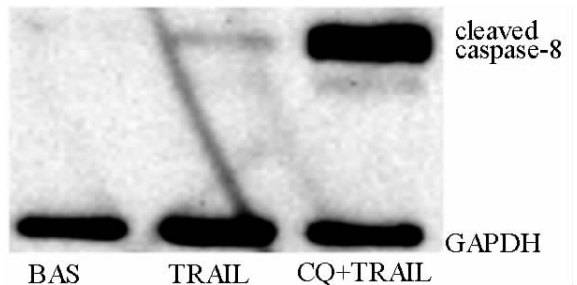


图2 Cleaved caspases-8表达电泳图

BSA: 胎牛血清组;TRAIL: rhTRAIL组;CQ+TRAIL: rhTRAIL与氯喹联用组;GAPDH是内参蛋白

3 讨论

TRAIL 能够在诱导肿瘤细胞凋亡的同时对正常细胞几乎无毒性,被引起广泛关注^[6,7]。但是随着研究的深入,很多研究发现 TRAIL 在诱导细胞凋亡的同时,也可以诱导细胞自噬;而且,TRAIL 抵抗的肿瘤细胞株细胞自噬水平明显高于敏感细胞株^[8]。有学者认为自噬可能是肿瘤细胞对 TRAIL 产生抵抗的原因之一,并且将自噬作为克服肿瘤细胞对 TRAIL 抵抗的新靶点。GFP-LC3 是广泛用于自噬水平检测的荧光质粒,当细胞自噬水平增高时,细胞内 GFP-LC3 的绿色荧光聚点就会显著增加^[9]。我们发现 rhTRAIL 处理后的 HeLa 细胞和 U251 细胞与对照组相比,GFP-LC3 绿色荧光聚点都显著增加;同时,我们观察到 rhTRAIL 处理前后 HeLa 细胞内 GFP-LC3 的绿色聚点都高于 U251 细胞。与 U251 细胞相比,HeLa 细胞属于高自噬肿瘤细胞,而 U251 细胞属于低自噬肿瘤细胞。由此,我们猜测 U251 细胞应该比 HeLa 细胞对 TRAIL 诱导的凋亡更加敏感。本实验 MTT 结果发现,TRAIL 对 U251 细胞的抑制率 $[23.88 \pm 0.48]\%$ 明显高于对 HeLa 细胞的抑制率 $9 [15.83 \pm 0.39]\%$; $P < 0.05$ 。因为自噬可降低肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感程度,因此抑制细胞自噬,可增加肿瘤对 TRAIL 敏感度。氯喹是一种溶酶体自噬抑制剂,可以破坏溶酶体的酸碱环境,阻止自噬体与溶酶体的结合,导致 LC3 在细胞质中蓄积,在共聚焦显微镜下就可以观测到细胞质中出现大量的 GFP-LC3 绿色荧光聚点^[10]。当我们联合应用 TRAIL 和氯喹后,HeLa 细胞和 U251 细胞的抑制率都比单药显著增加 ($P < 0.05$),并且两种细胞株的抑制率基本相同 ($P > 0.05$),说明氯喹处理后,二者对 TRAIL 的反应无差别,两种细胞对 TRAIL 的反应不同很大程度上是自噬水平不同造成的。为了进一步证明这个结论,我们用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测 U251 细胞凋亡,发现联合应用 TRAIL 和氯喹组细胞凋亡率明显高于单用 TRAIL 组细胞 ($P < 0.05$)。caspases-8 是 TRAIL 诱导的凋亡通路中的关键蛋白,当 TRAIL 诱导的凋亡通路被激活时,caspases-8 就会被剪切成活化的 cleaved caspases-8 形式,细胞质 cleaved caspases-8 就会显著增加^[11]。我们发现,联合应用 TRAIL 和氯喹组细胞 Cleaved caspases-8 表达水平明显高于单用 TRAIL 组细胞。这些结果说明氯喹确实可以增强 TRAIL 诱导的细胞凋亡。

综上所述,氯喹作为一种自噬抑制剂通过抑制细胞自噬而增强肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感程度,增加 TRAIL 诱导的细胞凋亡。

【参考文献】

- [1] Stuckey DW, Shah K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy [J]. Trends Mol Med, 2013, 19(11): 685-694.
- [2] Trivedi R, Mishra DP. Trailing TRAIL resistance: novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells [J]. Front Oncol, 2015, 5: 69.
- [3] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 3448-3459.
- [4] Lorin S, Hamai A, Mehrpour M, et al. Autophagy regulation and its role in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2013, 23(5): 361-379.
- [5] 喻琴琴,杨俊,张馨欣,等. 自噬及其抑制剂的研究进展 [M]. 实用医学杂志, 2013, 29(17): 2908-2910.
- [6] Dou Y, Wang Y, Xu J, et al. Experiment research on inhibition of glioma with sTRAIL in vitro [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2014, 42(3): 186-191.
- [7] Bellail AC, Qi L, Mulligan P, et al. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges [J]. Rev Recent Clin Trials, 2009, 4(1): 34-41.
- [8] Singh K, Sharma A, Mir MC, et al. Autophagic flux determines cell death and survival in response to Apo2L/TRAIL (dulanermin) [J]. Mol Cancer, 2014, 13: 70.
- [9] Monma H1, Harashima N, Inao T, et al. The HSP70 and autophagy inhibitor pifithrin- μ enhances the antitumor effects of TRAIL on human pancreatic cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(4): 341-351.
- [10] Di X1, Zhang G, Zhang Y, et al. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5 [J]. Oncotarget, 2013, 4(9): 1349-1364.
- [11] You M, Savaraj N, Kuo MT, et al. TRAIL induces autophagic protein cleavage through caspase activation in melanoma cell lines under arginine deprivation [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 374(1-2): 181-190.

(2015-10-09 收稿, 2016-02-05 修回)