

TRAIL-Mu3蛋白的体内外抗肿瘤活性及其机制研究*

杨 婷¹, 朱艾晶², 汪靖松³, 金 钊^{4△}

1. 成都中医药大学 肿瘤研究所(成都 610037); 2. 四川大学华西医院 急诊科(成都 610041);
3. 川北医学院 妇产科(成都 637100); 4. 成都中医药大学 基础医学院(成都 610037)

【摘要】目的 TRAIL-Mu3是通过将野生型肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)的N端突变为8个连续的精氨酸(第114~122位氨基酸)得到的可溶性蛋白突变体。本研究在前期药物构建和制备已经完成的基础上进一步对TRAIL-Mu3蛋白的体内外药效和机理进行初步探索。**方法** 采用CCK-8法检测TRAIL-Mu3对肺癌细胞株NCI-H460、A549、NCI-H1299、calu-1的增殖抑制作用,通过流式细胞术(FCM)检测TRAIL-Mu3对A549和NCI-H460细胞凋亡诱导作用,并通过Western blot法检测体外凋亡相关蛋白死亡受体4(death receptor 4, DR4)、死亡受体5(death receptor 5, DR5)、Caspase-3、Caspase-8、X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)的表达情况。建立肺癌细胞株NCI-H460荷瘤小鼠移植瘤模型,TRAIL-Mu3给药方式为尾静脉注射,给药频率分为每日注射1次、隔日注射1次、每周注射3次,观察不同给药频率对移植瘤模型的治疗效果,并进行免疫组织化学法检测肿瘤组织凋亡相关蛋白DR4、DR5、Caspase-3、Caspase-8、XIAP的体内表达情况。**结果** 通过细胞增殖及凋亡检测等体外实验证实TRAIL-Mu3较野生型TRAIL表现出更强的体外肿瘤细胞毒性和凋亡诱导能力,并可在体外上调DR4、Caspase-3、Caspase-8的表达或活化($P<0.05$)。动物实验结果显示,TRAIL-Mu3隔日给药与每周3次给药抑制作用相近,优于每日给药($P<0.05$),但3种给药方案均可显著抑制荷瘤小鼠移植瘤的生长。免疫组化结果表明其可在体内上调DR4、Caspase-3的表达或活化,下调XIAP的活化($P<0.05$)。**结论** 突变体TRAIL-Mu3通过上调死亡受体DR4的表达、增加凋亡相关蛋白Caspase-3/-8的活化、减少XIAP的活化而展现出良好的体内外抑瘤效果。

【关键词】 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL) 突变体 精氨酸 肺癌 细胞凋亡

Antitumor Activity of TRAIL-Mu3 Protein *in vitro* and *in vivo* and the Mechanisms YANG Ting¹, ZHU Ai-jing², WANG Jing-song³, JIN Zhao^{4△}. 1. Cancer Research Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610037, China; 2. Department of Emergency, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Gynaecology and Obstetrics, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China; 4. School of Basic Medical Science, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610037, China

△ Corresponding author, E-mail: dr.jinzhao@163.com

【Abstract】 Objective TRAIL-Mu3 was obtained by mutating the N-terminus of human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene to an eight continuous arginine sequence. The present study was designed to explore the antitumor effect of this soluble mutant protein and the underlying mechanisms. **Methods** The inhibitory effect of TRAIL-Mu3 on the proliferation of lung cancer cell lines NCI-H460, A549, NCI-H1299 and calu-1 was tested by CCK8 assay. The apoptotic rates of A549 and NCI-H460 treated by TRAIL-Mu3 were detected by flow cytometer (FCM). The expressions of apoptosis related proteins death receptor (DR) 4, DR5, Caspase-3, Caspase-8 and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) were detected by Western blot. Moreover, a subcutaneous xenograft tumor mouse model of NCI-H460 was established and treated with TRAIL-Mu3 daily or every other day or three times a week. The expressions of DR4, DR5, Caspase-3, Caspase-8 and XIAP were detected by immunohistochemical staining. **Results** The *in vitro* study demonstrated that as compared to the TRAIL, the TRAIL-Mu3 was more toxic and pro-apoptotic by up-regulation of the expression and activity of DR4, Caspase-3 and Caspase-8. Also, the animal study showed a similar antitumor effect between treatment with TRAIL-Mu3 every other day and three time a week, which was better than daily use. All treatments significantly suppressed the growth of xenograft tumor, increased the expression or activity of DR4 and Caspase-3, and down-regulated the expression of XIAP ($P<0.05$). **Conclusion** TRAIL-Mu3 could improve antitumor activity *in vivo* and *in vitro* through elevating DR4 expression, activating Caspase-3/-8, and inhibiting XIAP activation.

【Key words】 TRAIL Mutant Arginine Lung cancer Apoptosis

* 国家自然科学基金(No.81372444)和四川省科技厅重点研发项目(No.2018SZ0089)资助

△ 通信作者, E-mail: dr.jinzhao@163.com

20世纪90年代中期, WILEY等和PITTI等先后发现一种对肿瘤具有良好靶向性杀伤作用的内源性细胞因子和

免疫因子,分别命名为肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)^[1]和凋亡素2配体(apoptosis ligand 2, Apo2L)^[2],后发现为同一种蛋白因子,其特点为可诱导多种肿瘤细胞凋亡的同时对正常细胞毒性较小。该发现迅速掀起了相关作用机理、药物联用、生物工程等方面的研究热潮,TRAIL作为潜在的抗肿瘤药物被认为具有巨大的开发前景^[3]。

TRAIL通过与凋亡受体相结合,激活细胞内凋亡通路,诱导肿瘤细胞凋亡。目前发现的TRAIL受体有TRAIL-R1/死亡受体4(death receptor 4, DR4)、TRAIL-R2/死亡受体5(death receptor 5, DR5)和竞争性抑制DR4、DR5的诱骗受体DcR1、DcR2、OPG。TRAIL与凋亡受体DR4和DR5结合后,死亡受体胞内段的Fas相关死亡结构域(Fas-associated death domain, FADD)募集,形成由DR4、DR5和Caspase前体组成的死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC),Caspase-8前体自身激活,引发级联反应,然后既可作用于Caspase-3前体,经外源性凋亡通路诱导细胞凋亡,也可作用于Bid(BH3-interacting domain death agonist),通过内源性凋亡通路诱导凋亡^[4]。

但经过20余年的研究和开发现,TRAIL制备成本高^[5-6]、体内的半衰期短^[7]、耐药率高(约达50%)、单用疗效有限^[3]。TRAIL-Mu3是为解决以上问题而设计的TRAIL突变体之一,它在野生型TRAIL可溶性片段的基础上将N端突变为8个连续的精氨酸(第114~122位氨基酸),优点是发酵的目的蛋白产量增多,且主要以可溶性蛋白的形式表达,提高了纯化效率,有利于提高成药质量,在降低成本的同时也降低临床用药发生毒副作用的风险,更重要的是具备更强的抗肿瘤活性^[8-9]。

本实验在前期药物制备已经完成的基础上,分别在体内和体外对TRAIL-Mu3的抗肿瘤活性及作用机理进行研究,并对体内给药方案进行初步的摸索,为将来临床试验提供一定支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂和仪器

野生型TRAIL和TRAIL-Mu3由本实验室前期构建。紫杉醇购自百时美施贵宝。人大细胞肺癌细胞NCI-H460、人非小细胞肺癌细胞A549和NCI-H1299、人肺癌细胞calu-1均购自中科院细胞生物研究所。RPMI1640、DMEM、McCoy's 5A、FBS均购自GIBCO(美国)。Balb/c小鼠购自成都达硕实验动物有限公司。Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit购自日本同仁化学研究所。BCA蛋白检测试剂盒、苏木素染液、伊红染液、山

羊抗鼠IgG(H+L)二抗-HRP、山羊抗兔IgG(H+L)二抗-HRP、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate购自Thermo-Fisher(美国)。TRAIL(H-257)兔抗人多克隆抗体、TRAIL-R2鼠来源单克隆抗体、Caspase-8兔来源多克隆抗体、Caspase-3兔来源多克隆抗体、肿瘤坏死因子受体超家族成员10A(TNFRSF10A)鼠来源单克隆抗体、人/小鼠/大鼠XIAP抗体、驴抗羊IgG-HRP、PV-9003山羊超敏二步法兔免疫组化试剂盒均购自Abcam(美国)。

1.2 TRAIL-Mu3蛋白的增殖抑制作用

取对数生长期的4株肺癌细胞株(NCI-H460 5×10^3 /孔、A549 8×10^3 /孔、NCI-H1299 5×10^3 /孔、calu-1 5×10^3 /孔),接种于96孔板,每孔依次加入梯度质量浓度的TRAIL-Mu3和野生型TRAIL的培养液100 μ L,每种质量浓度设3复孔。48 h后,利用CCK8法检测TRAIL-Mu3对细胞增殖的抑制作用,用酶标仪测定450 nm处吸光度值。按 $(Ac - As)/(Ac - Ab) \times 100\%$ 计算药物对肿瘤细胞生长的抑制率(%)。As为样品(细胞+CCK8+待测化合物)的吸光度,Ac为阴性对照(细胞+CCK8)的吸光度,Ab为阳性对照(各细胞对应培养基+CCK8)的吸光度。

运用软件Originpro9.0公式Growth/Sigmoidal Logistic进行半数致死量(50% inhibition concentration, IC_{50})曲线拟合并计算出 IC_{50} 值。

1.3 TRAIL-Mu3对A549和NCI-H460肺癌细胞株的凋亡诱导作用

取对数生长期的A549(7.5×10^4 mL⁻¹)和NCI-H460(12×10^4 mL⁻¹)细胞接种至6孔板,每孔加2 mL细胞悬液,培养24 h。根据增殖抑制实验所得 IC_{50} 值,用细胞相对应的培养基将TRAIL-Mu3稀释至上药质量浓度(A549取0.1、0.02 μ g/mL,NCI-H460取0.01、0.025、0.005 μ g/mL),以对应同体积培养基作为对照,加入对应的细胞孔中,继续培养5 h。胰酶消化细胞,PBS洗两遍,分别进行Annexin V和PI染色后,利用流式细胞仪进行检测,计算早期凋亡(Annexin V⁺PI⁻)+晚期凋亡(Annexin V⁺PI⁺)所占百分比,即得到凋亡率。实验重复3次。

1.4 Western blot检测凋亡相关蛋白的表达

将肺癌细胞株NCI-H460接种至90 mm培养瓶皿,待达到80%密度时上药,上药质量浓度为0.001、0.005 μ g/mL,或加入相同体积培养基作为对照。药物作用24 h后,收集提取总蛋白,利用BCA蛋白定量法对其进行定量。然后进行配胶、电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜、显色等步骤后,利用Tanon凝胶成像系统进行图像采集,并通过image J软件检测各条带灰度值,以内参 β -actin灰度值为1,计算其它条带的相对灰度值进行半定量分析。

1.5 TRAIL-Mu3对人肺癌细胞株NCI-H460裸鼠异种移植瘤的生长抑制作用

30只雌性4~6周龄Balb/c裸鼠, 每只裸鼠于右侧背部皮下接种0.1 mL 3×10^6 个NCI-H460细胞。在肿瘤体积达

到200 mm³时, 按随机区组法进行随机分组(生理盐水组、紫杉醇组、TRAIL-Mu3每日给药组、TRAIL-Mu3隔日给药组和TRAIL-Mu3每周3次给药组)并开始尾静脉给药, 每次给药体积0.1 mL。具体情况见表1。

表 1 TRAIL-Mu3体内抗肿瘤研究的实验设计
Table 1 Experimental design for the antitumor effect of TRAIL-Mu3 *in vivo*

Group	Number of mice	Test substances	Dose/(mg/kg)	Dosing frequency
Control	6	Saline	Not available (0.1 mL)	Day 0, 1, 2, 3, 4
Paclitaxel	6	Paclitaxel	20	Day 0, 2, 4
TRAIL-Mu3 (every day)	6	TRAIL-Mu3	60	Day 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11
TRAIL-Mu3 (every other day)	6	TRAIL-Mu3	60	Day 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
TRAIL-Mu3 (3 times/week)	6	TRAIL-Mu3	60	Day 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18

实验期间每周测定两次动物体质量并用游标卡尺测量肿瘤长径和短径。肿瘤体积(V)= $(X^2\times Y)/2$, 其中 X 为短径(单位mm), Y 为长径(单位mm)。每日观察记录临床症状。给药后第21天采用颈椎脱臼法处死动物, 剥取肿瘤并称重, 肿瘤组织经甲醛固定, 用于免疫组化检测。

1.6 免疫组化检测肿瘤组织中的蛋白

标本经脱蜡、水化、抗原修复、染色、一抗孵育、二抗孵育、复染等步骤进行免疫组化EnVision二步法染色或XIAP山羊超敏二步法染色, 其中, 各抗体的滴度分别为: Caspase-8(1:200)、Cleaved Caspase-3(1:100)、DR4(1:50)、DR5(1:50)、XIAP(1:50)。染色后在光镜下观察, 采图。每张异种移植瘤组织切片于光镜下随机选取5个高倍视野, 免疫组化评分包括阳性细胞百分率和细胞染色强度两方面。阳性细胞百分率(A): 阳性细胞计数<5%为0分, 5%~25%为1分, 26%~50%为2分, 51%~75%为3分, >75%为4分。细胞染色强度(B): 无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。免疫组化评分值= $A\times B$ 。

1.7 统计学方法

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间比较采用非配对 t 检验; 多组间均数比较采用单因素方差分析ANOVA, 组间两两比较采用LSD检验或Tamhane's T2检验。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TRAIL-Mu3蛋白对肿瘤细胞的体外增殖抑制作用

结果见图1、表2。TRAIL-Mu3对NCI-H460、A549和NCI-H1299肺癌细胞株的增殖抑制作用明显强于野生型TRAIL, 但对calu-1而言无明显差异。根据药物体外疗效的判定方法, NCI-H460、A549、NCI-H1299为TRAIL-Mu3敏感株, calu-1为TRAIL-Mu3耐药株。

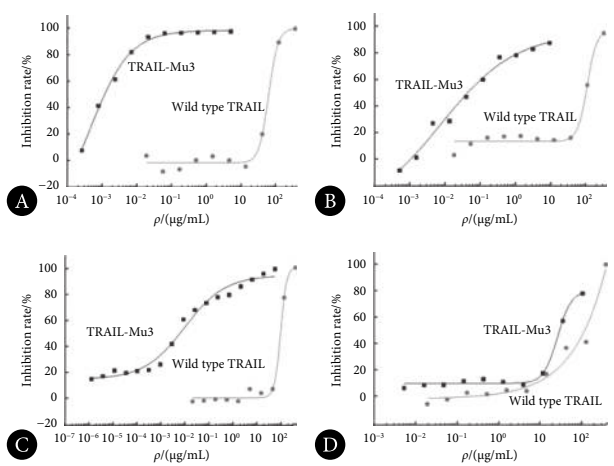


图 1 TRAIL-Mu3及野生型TRAIL作用于肺癌细胞株NCI-H460 (A)、A549 (B)、NCI-H1299 (C)、calu-1 (D) 的抑制作用曲线 ($n=3$)

Fig 1 The inhibition curve of TRAIL-Mu3 and wild type TRAIL on NCI-H460 (A), A549 (B), NCI-H1299 (C), and calu-1 (D) ($n=3$)

表 2 TRAIL-Mu3及野生型TRAIL作用于4株肺癌细胞株的半数抑制浓度 (IC_{50})

Table 2 50% inhibition concentration (IC_{50}) values of TRAIL-Mu3 and wild type TRAIL in different lung cancer cells

Lung cancer cell	$IC_{50}/(\mu\text{g/mL})$	
	TRAIL-Mu3	Wild type TRAIL
NCI-H460	0.000 475±0.000 390*	61.399 000±2.559 939
A549	0.007 780±0.029 133*	121.300 000±0.098 217
NCI-H1299	0.008 890±0.000 169*	86.710 000±1.716 572
calu-1	25.070 000±3.038 763*	>122

* $P<0.05$, vs. wild type TRAIL

2.2 TRAIL-Mu3对A549和NCI-H460肺癌细胞株的凋亡诱导作用

如图2、图3所示, 无论是A549细胞, 还是NCI-H460细

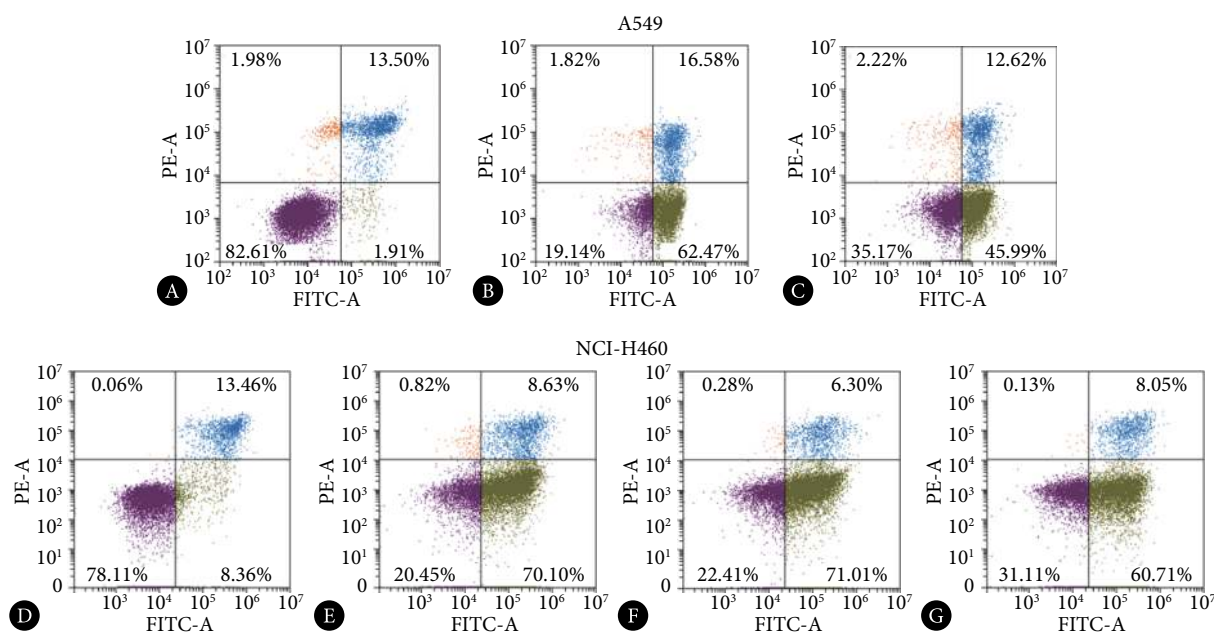


图2 TRAIL-Mu3促进A549和NCI-H460细胞凋亡的流式细胞检测图

Fig 2 FCM analysis of apoptosis of A549 and NCI-H460 after treatment with TRAIL-Mu3

A, D: Control; B, C: TRAIL-Mu3 0.1 µg/mL, 0.02 µg/mL, respectively; E-G: TRAIL-Mu3 0.01 µg/mL, 0.025 µg/mL, 0.005 µg/mL, respectively

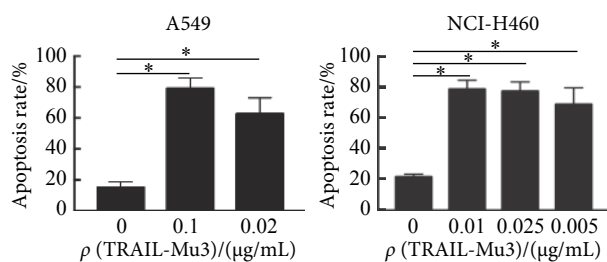


图3 TRAIL-Mu3作用于A549和NCI-H460细胞的凋亡率 (n=3)

Fig 3 The apoptotic rates of A549 and NCI-H460 after treatment with TRAIL-Mu3 (n=3)

* $P < 0.05$, vs. control (0 µg/mL)

胞, TRAIL-Mu3不同质量浓度间细胞凋亡率差异均无统计学意义($P > 0.05$),但均高于各自的对照组($P < 0.05$)。结果表明, TRAIL-Mu3对于肺癌细胞株A549和NCI-H460具有明显促凋亡作用。

2.3 TRAIL-Mu3对NCI-H460细胞凋亡相关蛋白表达的影响

结果如图4所示,与对照组相比, TRAIL-Mu3低剂量(0.001 µg/mL)组与高剂量(0.005 µg/mL)组DR4表达量均上调($P < 0.05$), Caspase-3和Caspase-8的活化水平增加($P < 0.05$), DR5、XIAP的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 TRAIL-Mu3对NCI-H460裸鼠异种移植瘤的生长抑制作用

结果见图5。除紫杉醇组外,其余各组小鼠体质量均

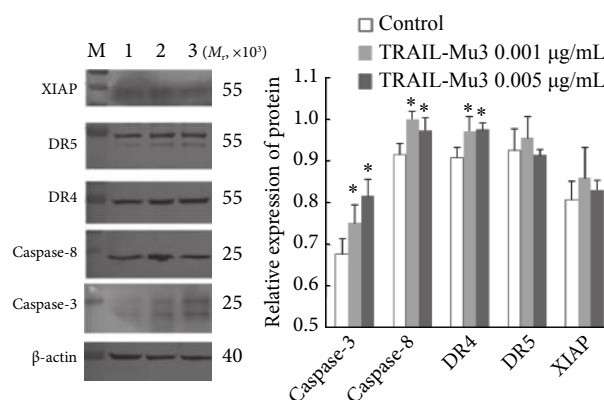


图4 Western blot检测TRAIL-Mu3作用后NCI-H460细胞凋亡相关蛋白的表达 (n=3)

Fig 4 The expression of apoptotic related proteins in NCI-H460 after treatment with TRAIL-Mu3 (n=3)

M: Marker; 1: Control; 2: TRAIL-Mu3 0.001 µg/mL; 3: TRAIL-Mu3 0.005 µg/mL. * $P < 0.05$, vs. control

保持稳定。紫杉醇组荷瘤鼠体质量在用药7 d内有明显下降,后期略有所恢复。TRAIL-Mu3各组对NCI-H460裸鼠异种移植瘤的生长抑制作用优于紫杉醇组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且在总剂量基本相同的情况下, TRAIL-Mu3隔日给药组和每周3次给药组差异无统计学意义($P > 0.05$),但均优于每日给药组($P < 0.05$)。TRAIL-Mu3各组荷瘤鼠的肿瘤质量均低于紫杉醇组($P < 0.05$),抑瘤率均高于紫杉醇组($P < 0.05$);且TRAIL-Mu3隔日给药组和每周3次给药组的抑瘤效果优于每日给药组,差异有

统计学意义($P<0.05$)。

2.5 TRAIL-Mu3对DR4、DR5、Caspase-3、Caspase-8和XIAP体内表达的影响

免疫组化结果显示(图6~图10): DR4和DR5阳性表

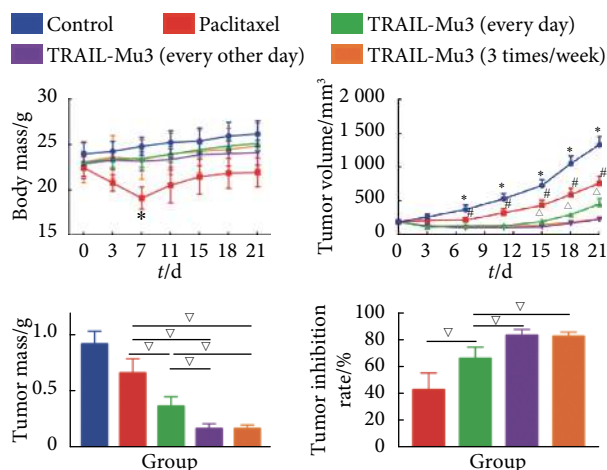


图 5 各受试物对人肺癌NCI-H460裸鼠移植瘤的抗肿瘤作用 ($n=6$)

Fig 5 The antitumor effect on NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model ($n=6$)

* $P<0.05$, vs. other groups; # $P<0.05$, vs. the three TRAIL-Mu3 groups; $\Delta P<0.05$, vs. TRAIL-Mu3 (every other day) and TRAIL-Mu3 (3 times/week) groups; $\nabla P<0.05$

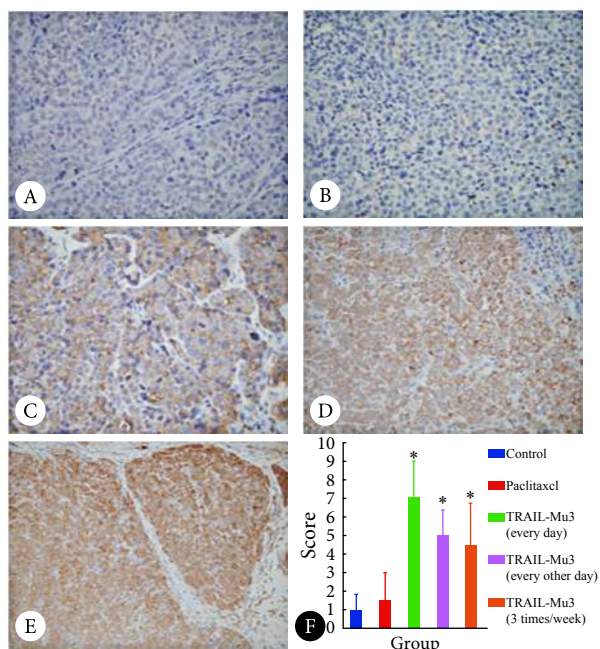


图 6 免疫组化染色观察NCI-H460裸鼠异种移植瘤组织中DR4的表达

Fig 6 The expression of DR4 in tumor tissues of NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model by IHC

A: Control group; B: Paclitaxel group; C: TRAIL-Mu3 (every day) group; D: TRAIL-Mu3 (every other day) group; E: TRAIL-Mu3 (3 times/week) group; F: IHC scores of different groups ($n=6$). A-E: SP $\times 40$. * $P<0.05$, vs. control and paclitaxel groups

达(黄褐色)定位于胞膜或胞浆, Caspase-3、Caspase-8和XIAP阳性表达(黄褐色)定位于胞浆。相较于生理盐水组与紫杉醇组, TRAIL-Mu3各组DR4表达增加, XIAP蛋白

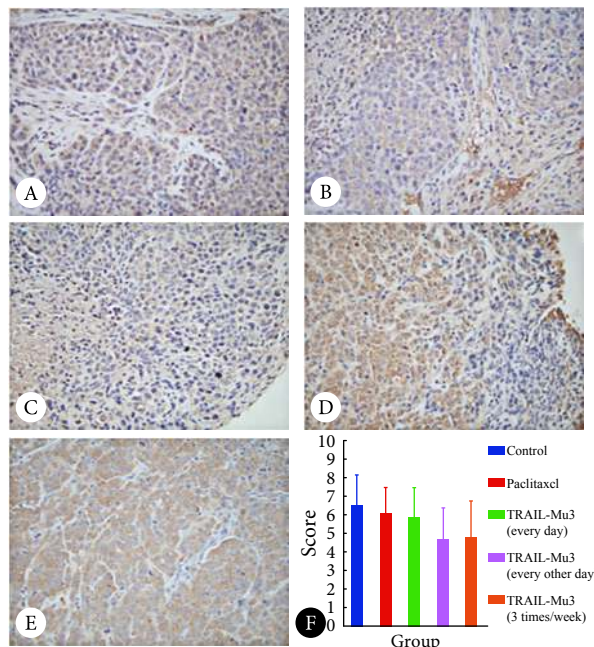


图 7 免疫组化染色观察NCI-H460裸鼠异种移植瘤组织中DR5的表达

Fig 7 The expression of DR5 in tumor tissues of NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model by IHC

A-F: Denote the same as those in fig 6. A-E: SP $\times 40$

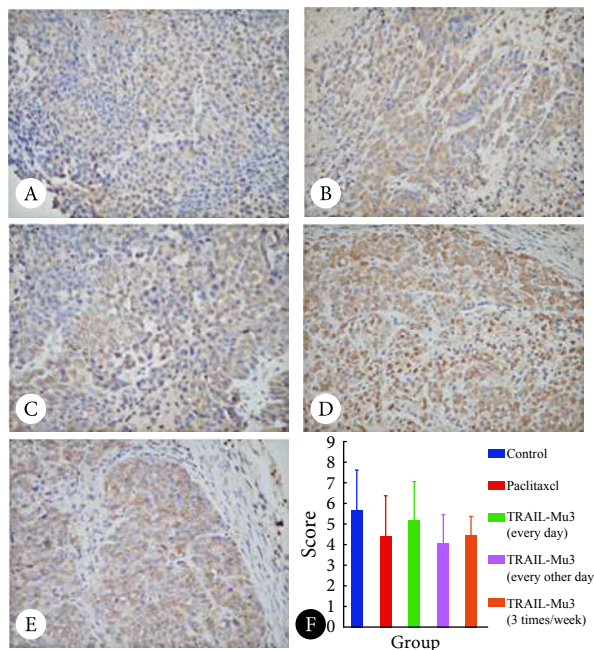


图 8 免疫组化染色观察NCI-H460裸鼠异种移植瘤组织中Caspase-8的表达

Fig 8 The expression of Caspase-8 in tumor tissues of NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model by IHC

A-F: Denote the same as those in fig 6. A-E: SP $\times 40$

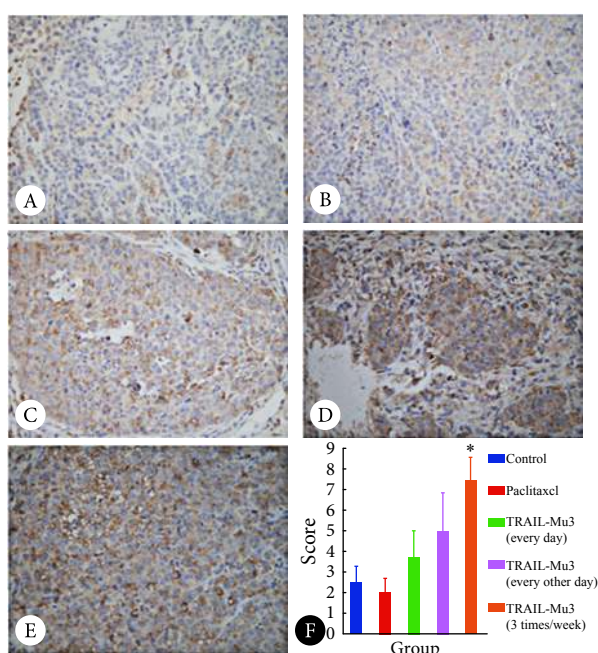


图9 免疫组化染色观察NCI-H460裸鼠异种移植瘤组织中Caspase-3的表达

Fig 9 The expression of Caspase-3 in tumor tissues of NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model by IHC

A-F: Denote the same as those in fig 6. A-E: SP $\times 40$. * $P < 0.05$, vs. control and paclitaxel groups

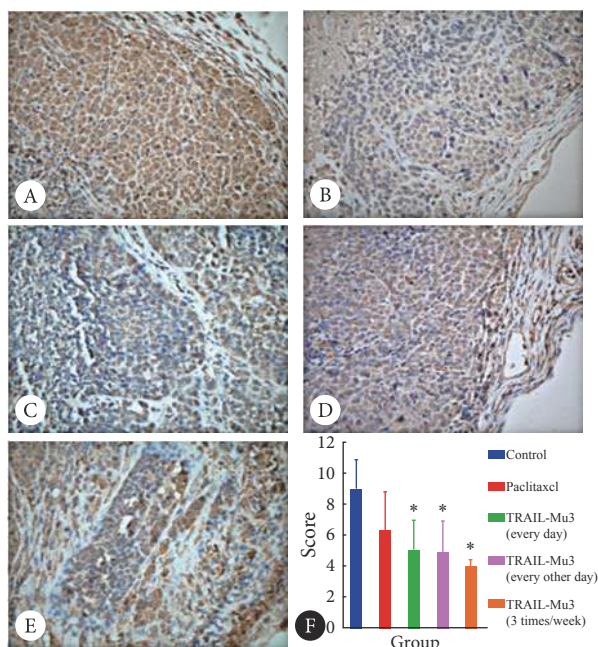


图10 免疫组化染色观察NCI-H460裸鼠异种移植瘤组织中XIAP的表达

Fig 10 The expression of XIAP in tumor tissues of NCI-H460 subcutaneous xenograft mouse model by IHC

A-F: Denote the same as those in fig 6. A-E: SP $\times 40$. * $P < 0.05$, vs. control and paclitaxel groups

还明显观察到Caspase-3活化的增加,与其余组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

肺癌的发病率和死亡率均居全球恶性肿瘤的首位,预后不佳,5年生存率约为16.6%^[7],寻找更加安全有效的治疗药物和治疗手段是当今面临的重要问题。TRAIL自1995年被发现以来,一直作为潜在的抗肿瘤药物来开发^[3, 10-12]。内源性TRAIL在生理状态下起着免疫调控和对肿瘤发生起免疫监视的作用^[13-14]。TRAIL-Mu3是一种TRAIL突变体,成功实现了TRAIL的工艺放大,并且初步显示出优于野生型TRAIL的抗肿瘤活性, IC_{50} 值在纳克级别^[8-9],值得进一步研究和开发。

根据相关文献报道,TRAIL重组蛋白或突变体通常在N端进行改变,且在噬菌体展示技术(构建随机肽库)^[15-16]或自动设计算法FOLD-X模拟设计能够与DR4、DR5特异性结合的TRAIL的相关研究^[17-25]中,从未出现TRAIL N端前10位氨基酸密码子对受体配体结合起决定性作用的预测。这均符合在不改变其关键抗原决定簇的基础上建立TRAIL-Mu3的设想,并在前期实验中得到了证实^[8-9]。

实验室前期实验还显示,野生型TRAIL体外对9大系统29株传代肿瘤细胞中的15株较为敏感,生物敏感率51.72%,而对于其中的14株表现为耐药,耐药率为48.28%^[10-11]。该比例与DI PIETRO等^[26](110株细胞株,敏感率62.73%)、WAGNER等^[27](119株细胞株,敏感率50%)报道的数据相近。本实验就TRAIL-Mu3对于肺癌细胞株NCI-H460、A549、NCI-H1299、calu-1的抗肿瘤活性进行了测定,证明其体外药效明显优于野生型TRAIL,可高效地诱导A549和NCI-H460细胞的凋亡。

基于其良好的体外抗肿瘤效果,本研究又探讨了TRAIL-Mu3不同给药方案对移植瘤治疗的效果。结果表明,隔日给药和每周3次给药优于每日给药方案。对此我们猜想TRAIL-Mu3诱导的凋亡信号可能在胞内持续作用一定时间,该现象类似于抗生素类药物的后遗效应,即使TRAIL-Mu3血药浓度低于最低有效血药浓度,肿瘤抑制作用仍然持续发挥。因此虽然TRAIL-Mu3在小鼠体内半衰期仅短短数分钟,但仍然可以在隔日给药或每周3次给药的间隔期间持续发挥诱导凋亡、抑制肿瘤增长的作用。模拟此条件在体外用细胞株进行实验,上药5 min后洗脱药物,48 h后测 IC_{50} 值,凋亡作用显著,可以作为支持此假设的初步证据之一(尚未发表)。

从凋亡通路来看,TRAIL与DR4和DR5结合后,通过DISC将凋亡信号传入胞内启动Caspase的级联放大反

应^[1-2, 4]。此过程中涉及多种促凋亡因子和抗凋亡因子的参与,如XIAP通过抑制Caspase-3、-7、-9的激活起抑制凋亡的作用,而第二个线粒体来源的胱冬肽酶激活剂(second mitochondria-derived activator of caspases, SMAC)可抑制XIAP,通过二次调节促凋亡^[25];细胞型死亡结构域样白介素1 β 转化酶抑制蛋白(cellular Fas-associated death domain-like interleukin 1 β -converting enzyme inhibitory protein, cFLIP)通过抑制Caspase-8的激活抑制细胞凋亡^[4, 10];核转录因子kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)的激活可抑制细胞凋亡^[4, 10, 25]。由此可见,两种因子的相互作用结果决定了细胞的凋亡与存活,通过对凋亡相关蛋白的调控可在一定程度上逆转肿瘤细胞对TRAIL的耐药性。

而本研究中,体外实验Western blot结果显示,TRAIL-Mu3可诱导DR4、Caspase-3、Caspase-8表达上调;体内实验中免疫组化结果显示,相比生理盐水组,TRAIL-Mu3诱导DR4、Caspase-3表达上调,XIAP表达下调。虽然二者结果不完全相符(Caspase-8、XIAP),但考虑体内外环境差异以及实验误差,或是导致此结果的原因之一,可通过重复实验或扩大样本量来解决。本实验仅就有限的凋亡通路进行了检验,而其是否还通过引发其他凋亡通路影响细胞凋亡,尚需要进一步探索。

综上所述,本研究评价了TRAIL-Mu3重组蛋白对多株肺癌细胞的体内外抑瘤效果,证实其可通过上调肿瘤细胞DR4的表达、增加Caspase-3和Caspase-8的活化来实现更强的凋亡诱导作用,可一定程度逆转肿瘤细胞对野生型TRAIL的耐药性。并初步探讨了其给药方案,证实TRAIL-Mu3隔日给药和每周3次给药抑制作用相近,均优于每日给药方案。本实验为指导TRAIL-Mu3的抗肿瘤研究和临床用药奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] WILEY S R, SCHOOLEY K, SMOLAK P J, *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 1995, 3(6): 673-682.
- [2] PITTI R M, MARSTERS S A, RUPPERT S, *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687-12690.
- [3] STUCKEY D W, SHAH K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy. *Trends Mol Med*, 2013, 19(11): 685-694.
- [4] KANTARI C, WALCZAK H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4): 558-563.
- [5] SANTOS C A, SOUZA A P. Solubilization, folding, and purification of a recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL) expressed in *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2018, 92(1): e53[2020-03-14]. <https://doi.org/10.1002/cpps.53>.
- [6] UPADHYAY V, SINGH A, JHA D, *et al.* Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microb Cell Fact*, 2016, 15: 100[2020-03-14]. <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0504-9>. doi: 10.1186/s12934-016-0504-9.
- [7] WAJANT H. Molecular mode of action of TRAIL receptor agonists-common principles and their translational exploitation. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(7). pii: E954[2020-03-14]. <https://doi.org/10.3390/cancers11070954>.
- [8] ZHU H, YAN J, XU Q, *et al.* TRAIL mutant membrane penetrating peptide alike (TMPPA) TRAIL-MU3 enhances the antitumor effects of TRAIL *in vitro* and *in vivo*. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9607-9612.
- [9] HUANG M, ZHU H, YI C, *et al.* A novel TRAIL mutant-TRAIL-MU3 enhances the antitumor effects by the increased affinity and the up-expression of DR5 in pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82(5): 829-838.
- [10] LOCKSLEY R M, KILLEEN N, LENARDO M J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 2001, 104(4): 487-501.
- [11] GUIMARAES P P G, GAGLIONE S, SEWASTIANIK T, *et al.* Nanoparticles for immune cytokine TRAIL-based cancer therapy. *ACS Nano*, 2018, 12(2): 912-931.
- [12] BERG D, LEHNE M, MEULLER N, *et al.* Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death Differ*, 2007, 14(12): 2021-2034.
- [13] CARDOSO A L, BERGER M D, KOUTSANDREAS T, *et al.* Non-apoptotic TRAIL function modulates NK cell activity during viral infection. *EMBO Rep*, 2020, 21(1): e48789[2020-03-14]. <https://doi.org/10.15252/embr.201948789>.
- [14] VON KARSTEDT S, WALCZAK H. An unexpected turn of fortune: targeting TRAIL-Rs in KRAS-driven cancer. *Cell Death Discov*, 2020, 6: 14[2020-03-14]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7078304/>. doi: 10.1038/s41420-020-0249-4.
- [15] HYMOWITZ S G, O'CONNELL M P, ULTSCH M H, *et al.* A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*, 2000, 39(4): 633-640.
- [16] KELLEY R F, TOTPAL K, LINDSTROM S H, *et al.* Receptor-selective mutants of apoptosis-inducing ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand reveal a greater contribution of death receptor (DR) 5 than DR4 to apoptosis signaling. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2205-2212.
- [17] REIS C R, VAN DER SLOOT A M, NATONI A, *et al.* Rapid and efficient cancer cell killing mediated by high-affinity death receptor homotrimerizing TRAIL variants. *Cell Death Dis*, 2010, 1: e83[2020-03-

- 14]. <https://www.nature.com/articles/cddis201061>. doi: 10.1038/cddis.2010.61.
- [18] YAGOLOVICH A V, ARTYKOV A A, DOLGIKH D A, *et al.* A new efficient method for production of recombinant antitumor cytokine TRAIL and its receptor-selective variant DR5-B. *Biochemistry (Mosc)*, 2019, 86(6): 627–636.
- [19] BOSMAN M C, REIS C R, SCHURINGA J J, *et al.* Decreased affinity of recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) D269H/E195R to osteoprotegerin (OPG) overcomes TRAIL resistance mediated by the bone microenvironment. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 1071–1078.
- [20] YU R, ALBARENQUE S M, COOL R H, *et al.* DR4 specific TRAIL variants are more efficacious than wild-type TRAIL in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(12): 1658–1666.
- [21] MEIJER A, KRUYT F A, VAN DER ZEE A G, *et al.* Nutlin-3 preferentially sensitises wild-type p53-expressing cancer cells to DR5-selective TRAIL over rhTRAIL. *Br J Cancer*, 2013, 109(10): 2685–2695.
- [22] SZEGEZDI E, REIS C R, VAN DER SLOOT A M, *et al.* Targeting AML through DR4 with a novel variant of rhTRAIL. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(10): 2216–2231.
- [23] DUIKER E W, DE VRIES E G, MAHALINGAM D, *et al.* Enhanced antitumor efficacy of a DR5-specific TRAIL variant over recombinant human TRAIL in a bioluminescent ovarian cancer xenograft model. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(6): 2048–2057.
- [24] GAMIE Z, KAPRINIOTIS K, PAPANIKOLAOU D, *et al.* TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for bone sarcoma treatment: preclinical and clinical data. *Cancer Lett*, 2017, 409: 66–80.
- [25] SARA EI R, SOLEIMANI M, MOVASSAGHPOUR A, *et al.* The role of XIAP in resistance to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in leukemia. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 1010–1019.
- [26] DI PIETRO R, ZAULI G. Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol*, 2004, 201(3): 331–340.
- [27] WAGNER K W, PUNNOOSE E A, JANUARIO T, *et al.* Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med*, 2007, 13(9): 1070–1077.
- (2019 – 12 – 10收稿, 2020 – 04 – 02修回)
- 编辑 余琳

本刊征稿启事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖,首届国家期刊奖提名奖,第二、三届全国期刊奖百种重点期刊,四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2016年度中国高校百佳科技期刊,2016中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被中国科学引文数据库(CSCD)、北京大学图书馆中文核心期刊要目总览(北大核心/中文核心)、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)(科技核心)、美国PubMed《医学索引》(IM/MEDLINE)、Scopus等收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。

本刊在线投稿网址: <http://ykxb.scu.edu.cn/>

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮政编码: 610041

电话/传真: (028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部