

力达霉素联合 TRAIL 对非小细胞肺癌的协同作用及其机制

杨 杰, 陈淑珍*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 研究力达霉素 (LDM) 与肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 (TRAIL) 联合作用对非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞的增效作用及其作用机制。MTT 法观察两药联合对 H460 细胞增殖的抑制作用。Annexin V-FITC/PI 双染、流式细胞术和 Hoechst 33342 荧光染色检测两药联合对细胞凋亡的影响。Western blotting 检测凋亡通路中 PARP、Caspase-3 和 Caspase-8 分子的变化以及 LDM 对 TRAIL 受体 DR4、DR5 表达的影响。MTT 结果显示, LDM 与 TRAIL 的 IC_{50} 值分别为 $4.603 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $915.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在 TRAIL (50 及 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 作用下 LDM 的 IC_{50} 值分别为 3.064×10^{-11} 和 $1.611 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。两药相互作用指数 $CDI < 1$ 。荧光显微镜下观察及流式细胞术检测两药联合细胞凋亡作用增强。联合用药组中 Caspase-3 和 Caspase-8 的激活作用明显增强。LDM 能够增强 TRAIL 受体 DR5 的表达, 不仅具有剂量依赖性, 且作用时间越长表达量越高。研究结果提示, LDM 对人非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞具有生长抑制作用, 可能通过诱导 DR5 表达上调而促进 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 从而增加细胞对 TRAIL 的敏感性。

关键词: 力达霉素; 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体; 细胞凋亡; 死亡受体 5

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 10-1247-07

Synergistic effect and its possible mechanisms of lidamycin in combination with TRAIL in NSCLC

YANG Jie, CHEN Shu-zhen*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: This study is to investigate the effect and its possible mechanisms of lidamycin (LDM) combined with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. MTT assay was used to determine the growth inhibition of the two ingredients on H460 cells. Apoptosis was examined by Annexin V-FITC/PI staining, flow cytometry assay and DNA-specific dye Hoechst 33342 staining. The level of TRAIL receptor and apoptosis-associated protein expression was detected by Western blotting analysis. The results showed that the IC_{50} value of LDM and TRAIL for H460 cells was $4.603 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $915.3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively, but the IC_{50} value of LDM was $3.064 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $1.611 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ when different concentrations of LDM was combined with 50 and $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL respectively. And the CDI value was less than 1. The apoptosis ratios also increased in the combination group relative to the single-agent treatment and the untreated control. Furthermore, the induction of the cleavage of PARP and the activation of Caspase-3 and Caspase-8 by the combination were more effective than LDM or TRAIL alone. At last, the level of death receptor 5 (DR5) expressions increased in a dose-dependent manner and time-related pattern. The data indicate that LDM inhibits the growth of H460 cells *in vitro*. DR5 induction

收稿日期: 2010-05-14.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (“十一五”计划) 资助项目 (2008ZX09101-013, 2009ZX09301-003); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资助项目 (IMBF200807).

*通讯作者 Tel: 86-10-63024341, Fax: 86-10-63017302, E-mail: bjcsz@yahoo.com.cn

contributes to enhancement of TRAIL-induced apoptosis by LDM in human non-small lung cancer cells.

Key words: lidamycin; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; apoptosis; death receptor 5

肺癌是世界上死亡率最高的恶性肿瘤之一, 其中 80% 以上是非小细胞肺癌 (NSCLC); 其早期诊断率比较低, 对常用化疗药物存在固有或继发性耐药, 并具有很高的转移率, 因此容易治疗失败^[1]。临床上迫切需要高效低毒的治疗方法。力达霉素 (lidamycin, LDM) 是从我国湖北省潜江县土壤中分离的一株链霉菌 (*Streptomyces globisporus* C-1027) 代谢产物中筛选得到的一种新的大分子烯二炔类抗肿瘤抗生素, 是迄今已报道的活性最强的大分子蛋白类抗肿瘤抗生素之一^[2]。它由一个辅基蛋白和一个发色团构成, 其分子质量为 11 343 Da^[3]。极低浓度 LDM 即可快速抑制肿瘤细胞 DNA 合成, 造成 DNA 单、双链断裂, 引起的双链断裂有序列特异性, 且形成的 DNA 损伤不易被修复^[4]。LDM 已经在中国进入了 II 期临床研究^[5]。

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体) 是由 Wiley 等^[6]于 1995 年检索 EST 时首次发现并克隆成功的, 为 TNF 超家族成员之一, 是一种 II 型糖蛋白。TRAIL 的胞外部分可降解形成可溶性 sTRAIL, 无跨膜区和胞浆区, 3 个 sTRAIL 可形成钟形同源三聚体, 与相应受体结合后产生一定的生物学作用。3 个 sTRAIL 单体的 230 位半胱氨酸共同构成 TRAIL 三聚体界面, 该界面中含有的一个锌离子和半胱氨酸残基是维持 TRAIL 的结构和功能所必需的^[7]。到目前为止, 已经发现了 5 种 TRAIL 受体, 分别是死亡受体 (DR4 和 DR5)、诱骗受体 (DcR1 和 DcR2) 和可溶性受体 OPG^[8]。死亡受体的表达与肿瘤进展相关, 这种相关具有肿瘤组织特异性。在非小细胞肺癌中, 低分化肿瘤的 DR4、DR5、TRAIL 的表达是增加的^[9]。但是, TRAIL 受体在肿瘤中的表达和分布还不十分明确, 仍然有很多问题亟待解决。TRAIL 能够选择性地诱导肿瘤细胞凋亡, 而正常组织细胞对其并不敏感, 因此与 TRAIL 相关的肿瘤治疗已经成为国内外研究的热点^[10]。目前 TRAIL 与其他药物联合作用于肿瘤细胞的研究已经取得了一定的进展。

已有多篇文献报道 TRAIL 与很多 DNA 损伤类化疗药物联合应用治疗肿瘤, 其中许多研究已经表明, 损伤 DNA 的化疗药物能够调节死亡受体的表达, 从而使细胞对死亡受体诱导的凋亡更为敏感。顺铂、丝

裂霉素、甲氨蝶呤、多柔比星、博来霉素、米托蒽醌等 DNA 损伤类化疗药物主要通过 p53 途径诱导人类肿瘤细胞的 Fas 的表达, 从而促进人类肿瘤细胞对 TRAIL 诱导的细胞凋亡的敏感性^[11-13]。作为强效抗肿瘤抗生素, LDM 与 TRAIL 联合作用于肿瘤细胞是否具有协同作用及其相关机制值得探究。本研究选用人非小细胞肺癌 H460 细胞株, 观察 LDM 在体外与 TRAIL 的协同作用及其可能的增效机制。

材料与方法

试剂及抗体 LDM 粉末 (纯度大于 99%) 由本所金莲舫教授提供; RPMI-1640、新生胎牛血清及胰酶均购自 Gibco 公司; MTT、Hoechst 33342 购自 Sigma 公司; 兔抗 PARP 抗体、鼠抗 Caspase-8 抗体、兔抗 Caspase-3 抗体、兔抗 Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶偶联的抗鼠二抗和辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗均购自 Cell Signaling Technology 公司; TRAIL 购自 PeproTech Asia 公司; 兔抗 DR5 抗体购自 ProSci 公司; 鼠抗 DR4 抗体购自 Diaclone 公司; 兔抗 Actin 抗体购自 Santa Cruz 公司; 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司; BCA™ Protein Assay Kit 购自 Pierce 公司; 显影液购自 Millipore 公司; 其余试剂均为市售分析纯。

细胞培养 人非小细胞肺癌 H460 细胞株由本实验室传代保存, 细胞在含有 10% 新生胎牛血清、100 μmL^{-1} 青霉素、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱常规传代培养。实验细胞处于对数生长期, 每 2~3 天传代 1 次。

MTT 检测药物对细胞增殖的影响 将对数生长期的 H460 细胞按细胞数 3×10^3 /孔接种到 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的 LDM 和 (或) TRAIL; 作用 48 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h; 弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL , 于 570 nm 处检测吸收度值, 计算细胞存活率和 IC_{50} 值, 并得到两药相互作用指数 CDI 值。

药物联合作用评价 两药相互作用系数 (coefficient of drug interaction, CDI) = $AB/(A\times B)$ 。AB 为两药联合作用组的 T/C 比值, A 和 B 是药物单独作用组的 T/C 比值 (T : 治疗组的存活率; C : 对照组的存活率)。理论上当 $\text{CDI} < 1$ 时两药有协同作用, $\text{CDI} <$

0.7 时协同作用非常显著。

Hoechst 33342 荧光染色检测细胞凋亡 将对数生长期的 H460 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h 待细胞贴壁稳定后药物处理 12 h; PBS 洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 遍, 加入 $5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Hoechst 33342 工作液 ($E_x = 346 \text{ nm}$, $E_m = 460 \text{ nm}$), 置 37°C 染色 15~30 min; PBS 洗 3 遍, 60% 甘油 PBS 封片, 荧光显微镜下观察染色质凝集并照相。

Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞仪检测细胞凋亡 将对数生长期的 H460 细胞接种于培养瓶中, 待培养 24 h 细胞贴壁稳定后药物处理, 12 h 后收集细胞, PBS 洗 2~3 次。1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min (4°C) 弃上清液, 细胞重悬于 Binding Buffer 150 μL 中。加入 Annexin V-FITC 10 μL 反应 1 h 后加入 PI 5 μL , 轻轻混匀。避光室温反应 15 min 或 4°C 反应 30 min。再加入 Binding Buffer 150 μL , 进行流式细胞仪测定。

Western blotting 分析死亡受体以及凋亡相关蛋白的表达 将对数生长期 H460 细胞接种于培养皿中, 待培养 24 h 细胞贴壁稳定后药物处理 12 h, 用细胞铲将细胞刮下, 用预冷的 PBS 冲洗 1 次, 加入新鲜配制的细胞裂解液 (RIPA 裂解液: 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.5; 1% NP-40; 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl; 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ aprotinin; 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ leupeptin; 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_3VO_4 ; 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaF) 150 μL , 充分混匀, 4°C 反应 1 h 后 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min (4°C)。收集上清液用 BCATM Protein Assay Kit 测量蛋白浓度。将各标本总蛋白 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳并转至 PVDF 膜上, 1% BSA 封闭 2 h, 一抗 4°C 孵育过夜, 洗膜后二抗室温孵育 2 h, 洗膜。将化学发光剂和增强剂按 1:1 混合后, 滴加到 PVDF 膜上, 通过化学发光成像系统 ChemiImager 5500 (Alpha Innotech) 捕获图像。

统计学处理 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\alpha = 0.05$ 。IC₅₀ 由 STAT 软件包 (Version 4) 的 Quantal Dose-Response: Probits 程序计算。IC₅₀ 值均为 3 次实验结果的平均值。组间差异显著性分析采用 *t* 检验。

结果

1 TRAIL 对人非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法测定了 TRAIL 对人非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞增殖的抑制作用, H460 的生长抑制曲线见图 1。结果显示, TRAIL 能有效抑制非小细胞肺癌 H460 细胞的增殖, 其 IC₅₀ 值为 (915.3 ± 351.1)

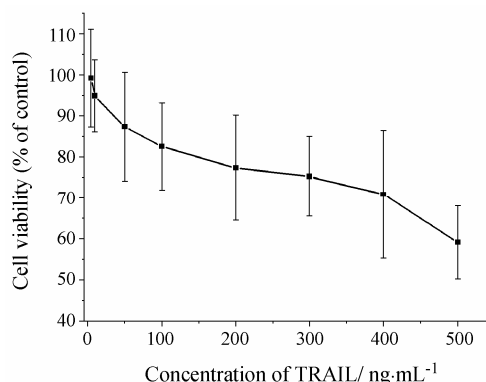


Figure 1 Dose-response curves of H460 cells to TRAIL. Cells were exposed to the drugs for 48 h and cell viability was determined by MTT assay. Results were derived from three independent experiments

$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2 LDM 和 (或) TRAIL 对人非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞增殖的抑制作用

采用 MTT 法测定了 LDM 和 (或) TRAIL 联合用药对人非小细胞肺癌细胞株 H460 细胞增殖的抑制作用, 3 种给药方案中 H460 的生长抑制曲线见图 2。结果显示, LDM 能有效抑制非小细胞肺癌 H460 细胞的增殖, IC₅₀ 值为 $(4.603 \times 10^{-10} \pm 3.714 \times 10^{-10}) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 TRAIL (50 和 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用下, LDM 的 IC₅₀ 值分别下降为 $(3.064 \times 10^{-11} \pm 2.668 \times 10^{-11})$ 和 $(1.611 \times 10^{-11} \pm 1.179 \times 10^{-11}) \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对于 H460 细胞, LDM 与 TRAIL 多数剂量的联合均有一定的协同增殖抑制作用 ($\text{CDI} < 1$), 其中 50 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ LDM 与 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TRAIL 联合应用时, 能够显著抑制细胞增殖, 其 $\text{CDI} < 0.7$, 具有显著协同抗肿瘤作用, 联合指数结果如图 3 所示。以上研究结果提示, 在合适的剂量下 LDM 与 TRAIL 联合应用比单独用药具有更好的疗效。

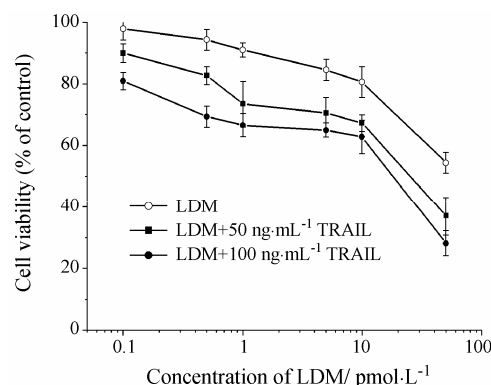


Figure 2 Dose-response curves of H460 cells to LDM and TRAIL. Cells were exposed to the drugs for 48 h and cell viability was determined by MTT assay. Results were derived from three independent experiments

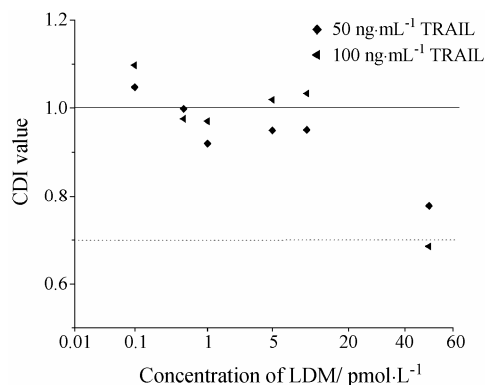


Figure 3 Cell viability assay of H460 cells in response to the combination of LDM and TRAIL. Cells were treated with LDM and TRAIL for 48 h. CDI value is a quantitative measure of the degree of interaction between different drugs. When CDI values between 1 and 0.7 indicate slight to moderate synergism; CDI values of 0.7 to 0.3, strong synergism. CDI: Coefficient of drug interaction

3 Hoechst 33342 染色法检测 LDM 和 (或) TRAIL 诱导 H460 细胞凋亡的作用

经 LDM 和 (或) TRAIL 作用 12 h 后, 细胞用 DNA 特异性荧光染料 Hoechst 33342 染色, 固定后在荧光显微镜下观察, 可以看到对照组的细胞核均匀着色, 无异常核; 而 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM 或 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL 作用后的细胞少量出现典型的凋亡细胞形态学变化, 联合组作用后则大量出现典型的凋亡细胞形态学变化, 镜下明显可见染色质凝集、细胞核固

缩、形成凋亡小体等多种形态学改变 (图 4)。表明 LDM 与 TRAIL 联用可促进 H460 细胞凋亡, 明显提高凋亡细胞的比率。

4 Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞仪检测 LDM 和 (或) TRAIL 诱导 H460 细胞凋亡的作用

经过 Annexin V-FITC/PI 染色后, 利用流式细胞仪检测可得到早期凋亡、中晚期凋亡、坏死和活细胞百分率。左下象限代表活细胞, 右下象限代表早期凋亡细胞, 右上象限代表中晚期凋亡细胞, 左上象限代表坏死细胞 (图 5)。 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM 作用于 H460 细胞的凋亡诱导率为 $(26.1 \pm 2.54)\%$, $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL 的凋亡诱导率可达到 $(62.3 \pm 1.66)\%$, 联合用药组的凋亡诱导率则高达 $(74.7 \pm 7.36)\%$, 与对照组 $(11.3 \pm 0.19)\%$ 比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。提示 LDM 可以显著增强 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的作用 (图 6)。

5 LDM 和 (或) TRAIL 对 TRAIL 诱导的细胞凋亡信号通路相关蛋白表达的影响

为了进一步确定联合用药对于人非小细胞肺癌 H460 细胞凋亡的增强作用, 应用 Western blotting 测定了单药及联合用药对 PARP 的切割和对 Caspase-3 及 Caspase-8 的激活作用。对 PARP 而言, 单独 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM 和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL 可以诱导 PARP 出现有活性的 Cleaved-PARP, 而两者合用时, Cleaved-PARP 的密度较单药明显增大, 因而切割活性明显增

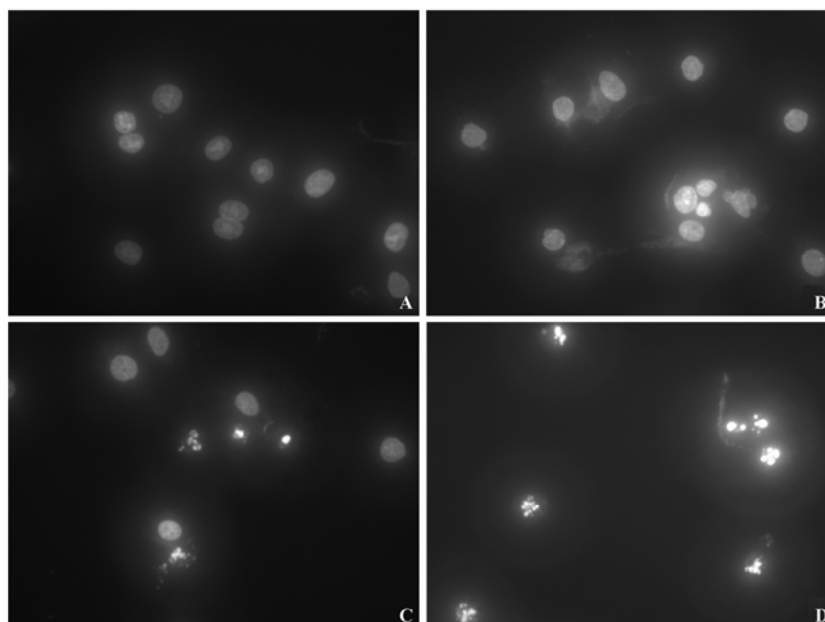


Figure 4 LDM enhances TRAIL's effects on inducing apoptosis detected by Hoechst 33342 staining. H460 cells were treated with LDM or/and TRAIL for 12 h, and then stained with the DNA-binding dye Hoechst 33342. The magnification was 400×. A: Control cells; B: Cells treated with $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM; C: Cells treated with $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL; D: Cells treated with $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM and $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL

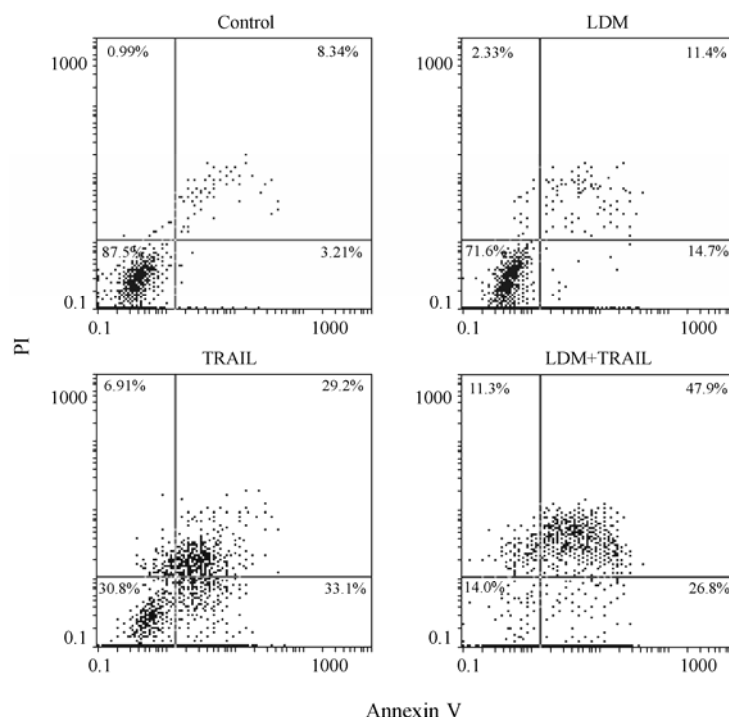


Figure 5 Apoptosis induced by LDM and/or TRAIL. H460 cells were treated with LDM ($1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and/or TRAIL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 12 h and then were harvested and labeled with a combination of Annexin V-FITC and propidium iodide (PI)

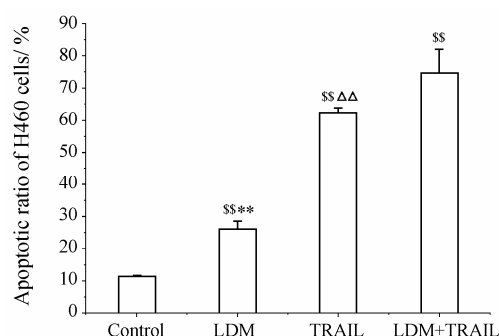


Figure 6 The percentage of apoptosis of H460 cells induced by LDM, TRAIL and the combination. The cells were treated with LDM ($1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), TRAIL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and the combination for 12 h. Results were derived from three independent experiments. The data were represented as $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs LDM + TRAIL; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs LDM + TRAIL; $SS P < 0.01$ vs control

加。同时, $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM 并不激活 Caspase-8 和 Caspase-3, 单独 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL 能诱导 Caspase-8 和 Caspase-3 活化, 两者联用, Caspase-8 和 Caspase-3 条带的密度明显减小, 而活性 Caspase 即 Cleaved-Caspase 8 和 Cleaved-Caspase 3 的密度较单药明显增大, 提示两者合用时 Caspase-8 和 Caspase-3 的活性明显增加。因此结果显示, 两药联合可使 PARP 的切割和 Caspase-3 及 Caspase-8 的激活显著增强, 从而增强了单药的诱导凋亡作用 (图 7)。

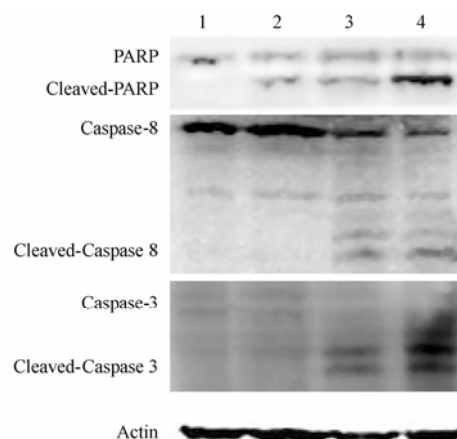


Figure 7 LDM enhances TRAIL's effects on activating Caspases in human NSCLC cells. H460 cells were exposed to LDM ($1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) and/or TRAIL ($50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 12 h. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and probed with the antibodies as indicated. Each lane loaded with 50 ng total protein. Actin level was used as loading control. 1: Control cells; 2: Cells treated with $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM; 3: Cells treated with $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL; 4: Cells treated with $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM and $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TRAIL

6 LDM 对 TRAIL 受体 DR4 和 DR5 表达的影响

采用 Western blotting, 分析不同浓度 LDM 以及 LDM 不同作用时间对 TRAIL 受体相关蛋白表达的影响。随着 LDM 浓度的增加, DR5 两条带的密度也是逐步增加的, 表明 LDM 诱导 TRAIL 受体 DR5 的表

达升高具有浓度依赖性, 而 DR4 的表达水平基本没有变化 (图 8)。随着 LDM 作用时间的延长, DR5 条带的密度逐步增加, 表明 LDM 诱导 TRAIL 受体 DR5 的表达具有时间依赖性, DR4 的表达水平基本没有改变 (图 9)。因此, LDM 能够增强细胞表面 TRAIL 受体 DR5 的表达, 而对 DR4 的表达几乎没有影响, LDM 对 DR5 表达的升高存在剂量和时间依赖性。

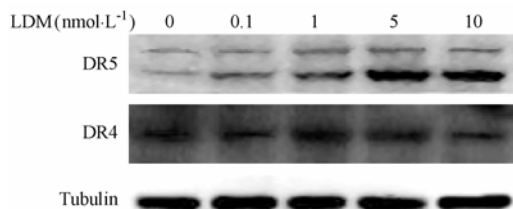


Figure 8 Effects of certain concentrations of LDM on the expression levels of DR4 and DR5. H460 cells were exposed to indicated concentrations of LDM for 12 h and then Western blotting was used to determine the levels. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and probed with the antibodies indicated. Each lane loaded with 50 ng total protein. Tubulin level was used as loading control

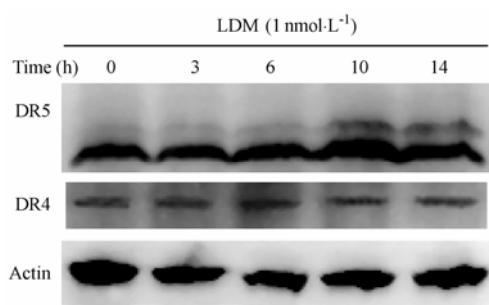


Figure 9 Effects of certain concentrations of LDM on the expression levels of DR4 and DR5. H460 cells were exposed to indicated concentrations of LDM for 12 h and then Western blotting was used to determine the levels. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and probed with the antibodies indicated. Each lane loaded with 50 ng total protein. Actin level was used as loading control

讨论

肿瘤的治疗主要包括 3 种治疗方式, 即化疗、放疗和手术治疗, 而化疗以几种药物联合治疗为主。因此, 人们进行了将 TRAIL 与不同抗肿瘤制剂联合的应用研究。研究表明, 这种联用是有效的, 例如, 由 Amgen 和 Genentech 共同发起的临床研究: TRAIL 与阿瓦斯汀、卡铂、紫杉醇联用治疗非小细胞肺癌已经进入 II 期临床试验阶段。本研究将 LDM 与 TRAIL 联合应用于人类非小细胞肺癌 H460 细胞, 采

用 MTT 检测表明, LDM 与 TRAIL 在体外合用可使 LDM 的 IC_{50} 值明显降低, 结果显示两者具有很好的协同作用。Hoechst 33342 染色法和流式细胞术分析证明 TRAIL 和 LDM 联合用药后, 可使细胞凋亡现象明显增加, 同时细胞毒作用也明显增加。LDM 与 TRAIL 联用后, 凋亡相关蛋白 PARP、Caspase-3、Caspase-8 的剪切都得到了明显的增强, 活性明显增加, 而这 3 种分子都是 TRAIL 诱导的细胞凋亡的信号通路中的重要分子^[14]。Western blotting 检测发现, LDM 能够显著增强 H460 细胞表面 DR5 的表达, 这种增强不仅存在浓度依赖性, 还表现为作用时间越长 DR5 的表达量越高。而 LDM 对于另外一个死亡受体 DR4 却几乎没有影响。结果提示, LDM 可能是通过上调 DR5 而增强 TRAIL 引起的细胞凋亡。

有研究表明, 肿瘤细胞对 TRAIL 是否敏感, 其中一个重要因素是细胞表面死亡受体表达的强度^[15]。因此, 细胞表面死亡受体的表达状况可以从一定程度上反映靶细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感度。由于许多肿瘤对 TRAIL 具有耐受性, 对 TRAIL 的临床应用产生了一定的影响^[16]。TRAIL 与不同药物或化合物联用, 是克服肿瘤细胞对 TRAIL 耐药性和增加敏感性的有效手段。LDM 能够上调死亡受体的表达, 在一定程度上增强了肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性, 促进肿瘤细胞凋亡。本研究将促进以 TRAIL 死亡受体通路为靶点的抗肿瘤药物研究, 并能推动 TRAIL 的临床应用。

References

- [1] Kotteas EA, Charpidou AG, Syrigos KN. Targeted therapy for nonsmall cell lung cancer: focusing on angiogenesis, the epidermal growth factor receptor and multikinase inhibitors [J]. *Anticancer Drugs*, 2010, 21: 151-168.
- [2] Shao RG, Zhen YS. Eneidyne anticancer antibiotic lidamycin: chemistry, biology and pharmacology [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8: 123-131.
- [3] Otani T, Yasuhara T. Purification and primary structure of C1027 AG, a selective antagonist of antitumor antibiotic C1027 from *Streptomyces globisporus* [J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55: 407-417.
- [4] Zhang SH, Chen J, Jiang M, et al. Lidamycin induces apoptosis of human gastric carcinoma BGC823 cells and inhibits xenograft growth in nude mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 601-604.
- [5] Liu YP, Li QS, Huang YR, et al. Tissue distribution and

- excretion of 125I-lidamycin in mice and rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 3281–3284.
- [6] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1995, 3: 673–682.
- [7] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2002, 7: 449–459.
- [8] LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10: 66–75.
- [9] Spierings DC, de Vries EG, Timens W, et al. Expression of TRAIL and TRAIL death receptors in stage III non-small cell lung cancer tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9: 3397–3405.
- [10] Holloch PA, Griffith TS. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625: 63–72.
- [11] Chen SZ. Progress on targeting TRAIL's receptor as antitumor strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 1336–1342.
- [12] Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, et al. Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126: 2049–2066.
- [13] Gressner O, Schilling T, Lorenz K, et al. TAp63a induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria [J]. *EMBO J*, 2005, 24: 2458–2471.
- [14] Han J, Hou W, Goldstein LA, et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 19665–19677.
- [15] Drosopoulos KG, Roberts ML, Cermak L, et al. Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 22856–22867.
- [16] Shao RG. Small interfering RNA mediated multi-target therapy of cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 219–225.

《中国现代应用药学》征订启事

《中国现代应用药学》创刊于 1984 年, 是由中国药学会主办, 中国科协主管, 国内外公开发行的国家级综合性药学科科技期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》药学科核心期刊 (全国中文核心期刊), 中国科学引文数据库入选期刊, 并被美国《化学文摘》、《剑桥科学文摘 (自然科学)》、《国际药文摘》、《乌利希期刊指南》、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》等国际重要检索系统收录。

《中国现代应用药学》栏目涵盖面广, 设有论著、综述、专栏, 专栏包括药理、中药与天然药、药物化学、药剂、药物分析与检验、医院药学、临床、不良反应、药事管理等。本刊能全方位多角度的反映国内药学领域的最新进展, 是国内广大医药工作者发表科研成果、交流信息、更新知识的重要学术平台, 也是发布药品及相关领域产品广告的重点专业期刊媒体。

本刊为月刊, 每月 28 日出刊, 大 16 开本, 铜版纸精美印刷, 每期订价 15.00 元, 全年 180 元, 国内统一刊号: CN 33-1210/R, 国际标准出版物编号: ISSN 1007-7693, 邮发代号: 32-67, 国外发行: 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱, 100044), 欢迎广大读者通过当地邮局或直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址: 杭州市中河中路 250 号改革月报大楼 10 楼 邮 编: 310003

电 话: 0571-87297398

传 真: 0571-87245809

E-mail: xdyd@chinajournal.net.cn

网 址: <http://www.chinjmap.com>