

GSK-3 抑制剂增强携带 TRAIL 的溶瘤腺病毒 对肝癌细胞的杀伤作用

谢国良, 肖连立, 李 新, 何国清, 陈 磊, 席 璐, 章康健, 王毅刚

(浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘 要: 研究携带 TRAIL 基因的溶瘤腺病毒联合化疗药物 GSK-3 抑制剂(氯化锂和 SB-415286)对人肝癌细胞的体外杀伤作用。采用 MTT 法检测病毒 ZD55-TRAIL 联合化疗药物氯化锂和 SB-415286 对肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 以及正常细胞株 L02、QSG-7701 增殖的抑制作用, 并通过结晶紫实验检测进一步证明联合用药的杀伤作用 and 安全性; 利用 Hoechst33342 染色对肝癌细胞株 BEL-7404 的细胞凋亡进行形态学观察; 通过 Western blot 检测肝癌细胞 HepG-2 细胞凋亡信号通路的变化。结果表明: 低剂量的氯化锂和 SB-415286 能显著提高 ZD55-TRAIL 对肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 的杀伤作用, 对人体肝正常细胞株 L02、QSG-7701 无明显的抑制作用。说明 GSK-3 抑制剂能够解除肝癌细胞对 TRAIL 的抗性, 增强携带 TRAIL 基因的溶瘤腺病毒对肝癌细胞的杀伤。

关键词: 溶瘤腺病毒; TRAIL; 氯化锂; SB-415286; 联合抑癌

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

0 引 言

原发性肝癌是世界范围内普遍存在的致死率极高的癌症之一, 素有“癌中之王”的称号, 极大威胁着人类生命和健康。目前肿瘤的传统治疗手段已经出现了严重的瓶颈效应, 而以溶瘤腺病毒为代表的生物治疗成为肿瘤治疗研究的热点。刘新垣院士等^[1]结合基因治疗和病毒治疗的优势提出了一种新型的肿瘤治疗策略, 即癌症的靶向基因—病毒治疗策略, 这种策略能达到溶瘤病毒和治疗基因协同杀伤肿瘤的目的, 为肿瘤治疗开辟了新的途径。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)是 TNF 家族的成员之一, 能通过线粒体途径和细胞表面受体途径触发多种诱导肿瘤细胞发生快速、高效的凋亡反应, 而对正常细胞无明显毒性^[2], 成为近年来肿瘤治疗的研究热点。但并不是所有的肿瘤细胞都对 TRAIL 敏感, 研究证实由于肝癌中含有较高抑制凋亡的蛋白质, 故 TRAIL 较难启动肝癌细胞的凋亡。

糖原合成酶激酶-3(GSK-3)是一种多功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是细胞内多种信号转导通路中的重要成分, 不仅参与细胞内糖代谢过程而且还参与细胞增殖、细胞分化和细胞凋亡等多种重要生理过程^[3-4]。近期的研究证实 GSK-3 在肝癌细胞的 TNF- α 信号通路中作为一种负调控因子。GSK-3 抑制剂氯化锂可以增强肝癌细胞对 TNF- α 诱导的凋亡的敏感性。更值得关注的是, 在前列腺癌和结肠癌中, GSK-3 抑制剂可以促进 TRAIL 诱导的细胞凋亡^[5-7]。

基于靶向基因—病毒治疗策略, 本课题组已经构建了溶瘤腺病毒 ZD55-TRAIL。因此, 本文旨在将化学治疗与靶向基因病毒治疗联合起来, 将 ZD55-TRAIL 分别联合两种 GSK-3 抑制剂氯化锂和 SB-415286

展开实验,观察它们对肿瘤细胞的协同杀伤作用,以期为肝癌的治疗寻找新的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

溶瘤腺病毒 ZD55-TRAIL 由本课题组构建。氯化锂(LiCl)购自国药集团化学试剂有限公司,SB-415286(SB)购自 Sigma 公司。人肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 和人肝正常细胞株 L02、QSG-7701 均系本研究所保存。所有细胞培养在 37℃,5%CO₂ 培养条件下培养,培养液为含 10%FBS 的 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;Hoechst33342 购自 KeyGen 公司,β-actin、PARP、荧光二抗等抗体分别购自碧云天、Santa Cruz Biotechnology、LI-COR 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测肿瘤细胞体外增殖抑制效率

收集对数期肝癌细胞 HepG-2、BEL-7404 以及肝正常细胞 L02、QSG-7701,按 1×10^4 /孔的密度植入 96 孔板中,每孔加入 100 μL 细胞培养液培养过夜。分别用 10 mM LiCl、12.5 μM SB、10 MOI ZD55-TRAIL 以及 10 mM LiCl、12.5 μM SB 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理细胞,其中每个处理均设 6 个复孔。分别于 24、48、72、96 h 后,倒置显微镜下观察;同时每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μL,继续培养 4 h 后,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD_{595 nm} 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔、对照孔,将测得的 OD 值代入公式(1),进而计算细胞生存率。

$$\text{细胞生存率} = [(\text{OD}_{\text{病毒感染孔}} - \text{OD}_{\text{调零孔}}) / (\text{OD}_{\text{对照孔}} - \text{OD}_{\text{调零孔}})] \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 结晶紫实验验证杀伤作用及安全性分析

收集对数期肝癌细胞 HepG-2、BEL-7404 以及肝正常细胞 L02、QSG-7701,按 5×10^4 /孔的密度植入 24 孔板中,每孔加入 500 μL 细胞培养液培养过夜。分别用 10 mM LiCl、12.5 μM SB、10 MOI ZD55-TRAIL 以及 10 mM LiCl、12.5 μM SB 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理细胞。5 d 后,吸干培养液,每孔加入 500 μL 结晶紫染色液(2%结晶紫溶于 20%甲醇溶液)染色 15 min,在净水中将多余的染色液洗净,显微镜下观察并拍照。

1.2.3 Hoechst 33342 染色检测凋亡

收集对数期肝癌细胞 BEL-7404 按 1×10^4 /孔的密度植入 96 孔板中,每孔加入 100 μL 细胞培养液培养过夜。分别用 10 mM LiCl、12.5 μM SB、10 MOI ZD55-TRAIL 以及 10 mM LiCl、12.5 μM SB 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理细胞。2 d 后,将 Hoechst33342 加入 96 孔培养板的培养基中(终浓度 1 μg/mL),继续在 37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 30 min,置于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Western blot 检测 PARP 的剪切水平

收集对数期肿瘤细胞肝癌细胞 HepG-2,按 5×10^5 接种至 60 mm 细胞培养皿,每孔加入 2 mL 细胞培养液培养过夜。分别用 10 mM LiCl、10 MOI ZD55-TRAIL 以及 10 mM LiCl 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理细胞。5% CO₂,37℃培养箱培养 48 h 后,用蛋白裂解液处理细胞,收集蛋白样品。将蛋白样品用 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,每孔加入等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后按湿转法将电泳产物转印到 NC 膜上。5% BSA 室温封闭 3 h,加一抗(1:1 000 稀释),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 10 min×3 次后,加荧光二抗(1:15 000 稀释),室温 1 h,TBST 洗膜 10 min×3 次后,红外扫描仪(odyssey infrared imaging system)扫描目的蛋白的表达。

1.2.5 统计学处理

统计学软件采用 Excel2003,所有定量实验均重复 3 次,各组数据以“均值±标准差”表示。组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 代表差别显著。

2 结果

2.1 联合使用 GSK-3 抑制剂与 ZD55-TRAIL 在肝癌杀伤中具有协同作用

从实验结果(图 1c,d)可以看出,低剂量的 LiCl、SB 以及 ZD55-TRAIL 对肝正常细胞 L02、QSG-7701,

细胞存活率均在 85% 以上。对肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404, 尽管低剂量的 LiCl 和 SB 杀伤很弱, 但 ZD55-TRAIL 联合 LiCl 和 SB 明显比单独使用 ZD55-TRAIL 具有更强的杀伤作用(图 1a,b)。数据显示: 对肝癌细胞株 HepG-2, 96 h 时联合使用 LiCl 和 SB 比单独使用 ZD55-TRAIL 杀伤效果分别提高了 18% 和 28%; 对肝癌细胞株 BEL-7404, 联合使用 LiCl 和 SB 比单独使用 ZD55-TRAIL 分别提高了 6% 和 26%。说明 GSK-3 抑制剂与 ZD55-TRAIL 在肝癌杀伤中具有显著的协同作用。

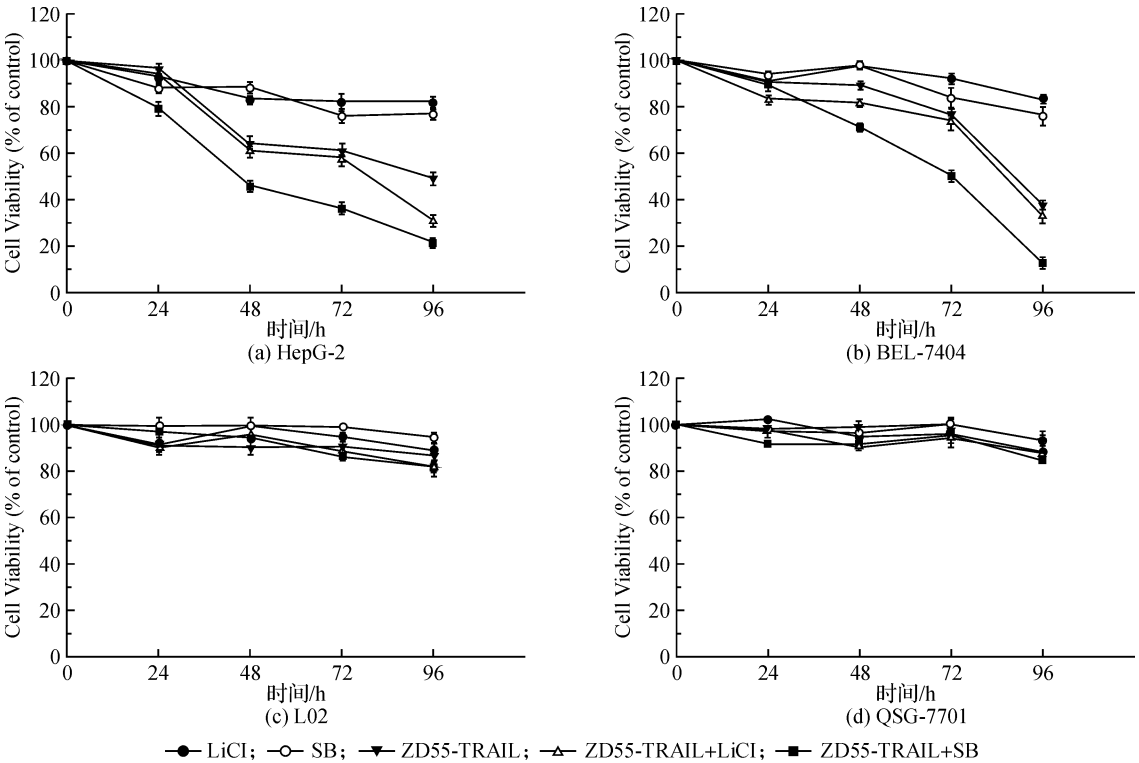


图 1 MTT 检测不同处理对细胞体外增殖抑制效率的影响

注: 10 mM LiCl, 12.5 μ M SB 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 以及肝正常细胞株 L02、QSG-7701

2.2 联合用药的安全性和杀伤作用

为了进一步检测联合使用 GSK-3 抑制剂与 ZD55-TRAIL 对肝癌细胞的杀伤作用和对正常细胞的安全性, 笔者分别及联合用药物和病毒处理细胞, 5 d 后进行结晶紫染色拍照。低剂量的 LiCl 和 SB 对肝正常细胞株 L02、QSG-7701 无明显的杀伤作用, 同时 ZD55-TRAIL 对肝正常细胞株也无明显影响(图 2c,d)。尽管 LiCl 和 SB 对肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 杀伤很弱, 但是联合使用后, 显著的提高了 ZD55-TRAIL 对肝癌细胞的杀伤, 其中 ZD55-TRAIL 联合 SB 几乎可以完全杀死肝癌细胞(图 2a,b)。

2.3 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

利用 Hoechst 33342 染色处理细胞后, 荧光倒置显微镜下的观察结果见图 3: 对比对照组(图 3a), 低剂量的 LiCl 和 SB 使肝癌细胞株 BEL-7404 几乎无明显的细胞凋亡(图 3b,c); 单独使用 ZD55-TRAIL 能够引起肝癌细胞部分凋亡(图 3d); 分别联合使用 LiCl、SB 和 ZD55-TRAIL, 细胞凋亡现象严重(图 3e,f)。说明低剂量的 LiCl 和 SB 几乎不能引起细胞凋亡, 却能促进 ZD55-TRAIL 诱导的细胞凋亡。

2.4 Western blot 初步探讨联合用药引起凋亡的分子机制

多聚(ADP-核糖)聚合酶 PARP 是细胞凋亡核心成员胱天蛋白酶(caspase)最主要的底物, PARP 的剪切被认为是细胞凋亡的一个早期分子标志。用 10 mM LiCl 联合 10 MOI ZD55-TRAIL 处理肝癌细胞 HepG-2, 48 h 后用 Western blot 检测 PARP 表达情况。结果显示, 单独使用 LiCl 进行处理不引起 PARP 的剪切, 联合用药较之单独使用 ZD55-TRAIL, PARP 的剪切水平明显提高(图 4)。这说明 GSK-3 抑制剂氯化锂能够增强 ZD55-TRAIL 引起的 Caspase 依赖性细胞凋亡。

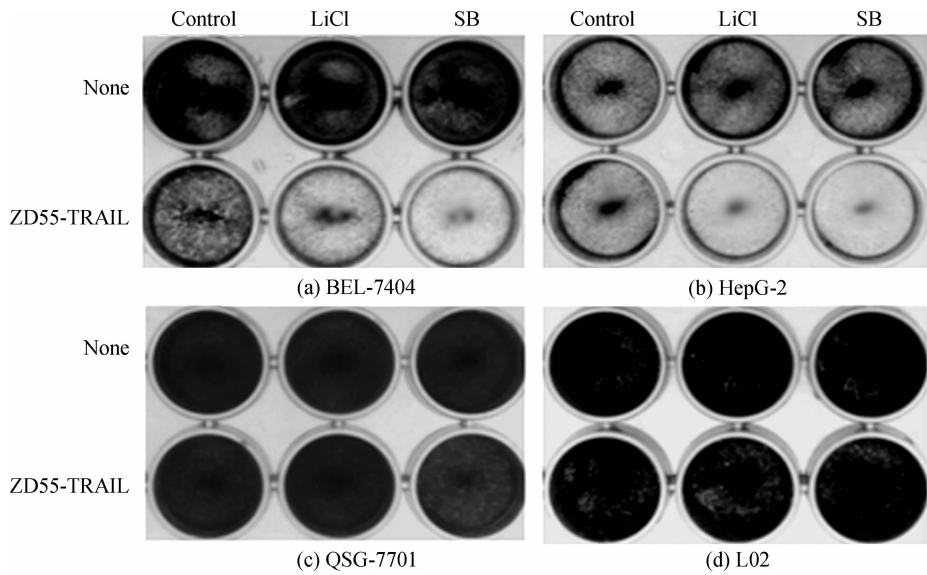


图2 结晶紫实验显示联合用药对细胞的体外杀伤情况

注:10 mM LiCl,12.5 μ M SB联合10 MOI ZD55-TRAIL处理肝癌细胞株 HepG-2、BEL-7404 以及肝正常细胞株 L02、QSG-7701,其中 None 为不加病毒处理。5 d 后结晶紫染色后白光下拍照

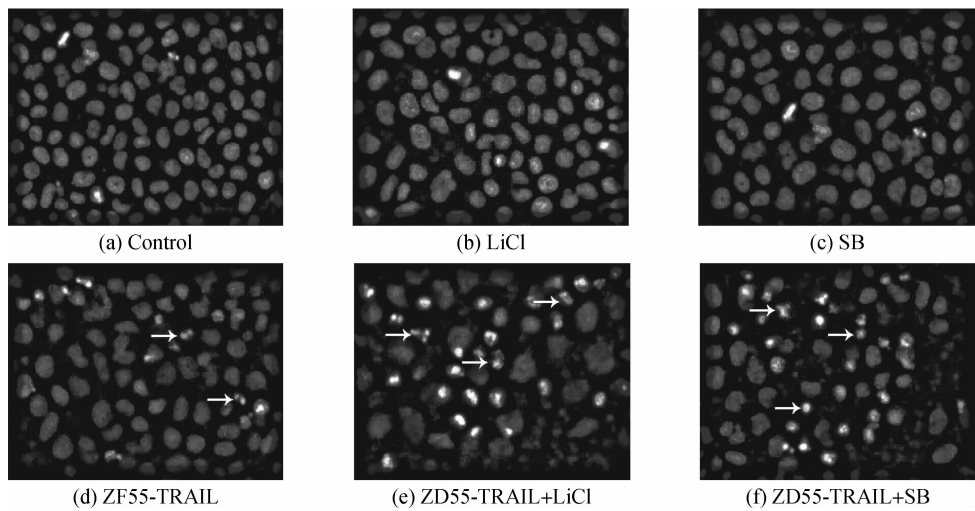


图3 Hoechst 染色检测细胞凋亡

注:10 mM LiCl,12.5 μ M SB联合10 MOI ZD55-TRAIL处理肝癌细胞株 BEL-7404,48 h 后 Hoechst 33342 染色,荧光倒置显微镜拍照(400 \times),箭头所指为凋亡细胞

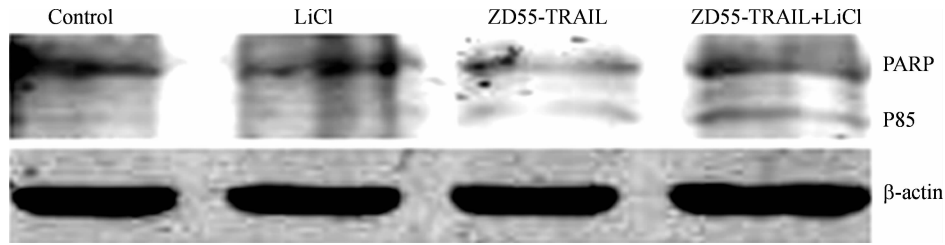


图4 Western blot 检测 PARP 的剪切水平

3 讨论

传统的肿瘤治疗方法如手术、放疗、化疗等对很多中晚期恶性肿瘤患者收效甚微,而以溶瘤腺病毒(肿瘤特异性增殖腺病毒)为代表的生物疗法成为肿瘤治疗研究的热点。癌症的靶向基因一病毒治疗策略利用溶瘤病毒在肿瘤细胞内特异性裂解、增殖和抗癌基因对癌细胞的强烈杀伤作用或抑制作用的协同作用,且病毒

所携带的抗癌基因的拷贝数也随病毒的复制递增,从而极大地提高抗癌基因的表达量。它融合了基因治疗和病毒治疗的双重优势,已经在荷瘤裸鼠实验中证实有明显的肿瘤杀伤效果。本课题组广泛使用的基因病毒 ZD55-gene 系统,该系统对基因的选择也必须具备两个条件:一是其基因表达产物能有效杀伤肿瘤;二是避免使用能削弱病毒溶瘤作用的基因。

TRAIL 靶向性杀伤肿瘤细胞的特性使其在肿瘤治疗上有着较大的潜力,其在作用机制和治疗效果方面的研究也已有着很大进展。但是,对 TRAIL 耐受及敏感度低的肿瘤细胞类型的存在,极大地限制了 TRAIL 抗肿瘤的应用范围。研究表明,约 60% 肿瘤细胞株对 TRAIL 不敏感。因此,增强 TRAIL 诱导细胞凋亡的敏感性才是解决 TRAIL 抗肿瘤的关键。近年来研究证实,TRAIL 与化疗药物联用后具有显著的协同效应^[8],本实验室的先期研究也证实一些化疗药物,如顺铂,5-FU^[9]等能够明显地促进 TRAIL 诱导凋亡的作用。但是由于化疗药物毒性的非特异性和耐药性的存在依然困扰着临床应用。

不同于许多其他化疗药物,低剂量的 GSK-3 抑制剂氯化锂和 SB-415286 对正常肝细胞几乎没有损伤,却能克服肝癌中 TRAIL 诱导的凋亡的固有抗性^[10]。笔者的研究已经证实 ZD55-TRAIL 与 GSK-3 抑制剂联合使用具有协同效应,不仅增强了 ZD55-TRAIL 在肝癌中 TRAIL 诱导的凋亡,也解决了化疗药物毒副作用强的难题。

TRAIL 通过两条不同的信号通路诱导凋亡:一条是不依赖线粒体的,通过细胞表面死亡受体直接激活 Caspase-3 的路线;另一条是依赖线粒体的,形成线粒体蛋白(apoptosome),从而激活 Caspase-9。这两条路线最后都激活 Caspase-3,导致细胞凋亡。Caspase-3 最主要的底物是多聚(ADP-核糖)聚合酶 PARP,该酶与 DNA 修复、基因完整性监护有关。在细胞凋亡启动时,116 kD 的 PARP 被 Caspase-3 剪切成 31 kD 和 85 kD 两个片段,使 PARP 中与 DNA 结合的两个锌指结构与羧基端的催化区域分离,导致核小体间的 DNA 裂解,引起细胞凋亡。GSK-3 可使糖原合成酶磷酸化而使糖原合成受阻,而 GSK-3 抑制剂则可起到促进糖原合成、降低血浆葡萄糖浓度的作用^[11]。GSK-3 现在也被认为是多种信号传导途径的关键调控酶^[12],它的分解和抑制与许多难以应付的疾病有着密切的联系,如肿瘤^[13]、神经变性疾病、阿尔茨海默病、双相性精神障碍等,GSK-3 抑制剂可一定程度上应用于这些疾病的治疗,但是它与癌症发生的关系并不明确。本研究发现 ZD55-TRAIL 可以导致 PARP 发生剪切,诱导 Caspase-3 依赖性的细胞凋亡,GSK-3 抑制剂可以使这种凋亡增强。但是 GSK-3 抑制剂与 TRAIL 协同促进肿瘤细胞凋亡的相互作用机制尚不完全清楚,有待进一步探讨。

总之,利用携带 TRAIL 基因溶瘤腺病毒联合 GSK-3 抑制剂进行肝癌治疗,既可以介导 TRAIL 只在肿瘤细胞内高效表达,又可以克服肝癌中 TRAIL 诱导的凋亡的固有抗性,从而显著提高病毒和基因双重杀伤肿瘤细胞的功效,这为靶向基因-病毒联合化疗药物治疗肝癌开辟了新的途径。

参考文献:

- [1] Liu X Y, Gu J F, Shi W F. Targeting gene-virotherapy for cancer[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2005, 37(9): 581-587.
- [2] Fulda S, Kufer M U, Meyer E, et al. Sensitization for death receptor-or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer[J]. Oncogene, 2001, 20(41): 5865-5877.
- [3] Cross D A, Culbert A A, Chalmers K A, et al. Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death[J]. Journal of Neurochemistry, 2001, 77(1): 94-102.
- [4] Beurel E, Blivet-Van Eggelpoel M J, Kornprobst M, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors augment TRAIL-induced apoptotic death in human hepatoma cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 77: 54-65.
- [5] Liao X, Zhang L, Thrasher J B, et al. Glycogen synthase kinase-3beta suppression eliminates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in prostate cancer[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2003, 2(11): 1215-1222.
- [6] Rottmann S, Wang Y, Nasoff M, et al. A TRAIL receptor-dependent synthetic lethal relationship between MYC activation and GSK3beta/FBW7 loss of function[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(42): 15195-15200.
- [7] Song L, Zhou T, Jope R S. Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing

- receptor[J]. BMC Neuroscience, 2004, 5: 1-7.
- [8] Hamasu T, Inanami O, Asanuma T, et al. Enhanced induction of apoptosis by combined treatment of human carcinoma cells with X rays and death receptor agonists[J]. Journal of Radiation, 2005, 46(1): 103-110.
- [9] Qiu S, Ruan H, Pei Z, et al. Combination of targeting gene-viro therapy with 5-FU enhances antitumor efficacy in malignant colorectal carcinoma[J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(4): 219-230.
- [10] Beurel E, Blivet-Van Eggelpoe M J, Kornprobst M, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors augment TRAIL-induced apoptotic death in human hepatoma cells[J]. Biochemical Pharmacology, 2009, 77(1): 54-65.
- [11] Richard J. Inhibition of glycogen synthase kinase-3: a potential therapeutic target of lithium[J]. Clin Neurosci Res, 2004, 4: 171-179.
- [12] Grimes C A, Jope R S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling[J]. Pro Neurobiol, 2001, 65(4): 391-426.
- [13] Manoukian A S, Woodgett J R. Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways[J]. Adv Cancer Res, 2002, 84: 203-229.

Enhanced Killing Effects on Hepatoma Cells by TRAIL Armed Oncolytic Adenovirus and Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitors

XIE Guo-liang, XIAO Lian-li, LI Xin, HE Guo-qing, CHEN Lei, XI Lu, ZHANG Kang-jian, WANG Yi-gang
(Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The study explores the combinational killing effects of oncolytic adenovirus-mediated TRAIL and chemotherapeutic agent GSK-3 inhibitors(LiCl and SB-415286)against human hepatoma cells in vitro. First of all, MTT assay tests the growth inhibition effects of combinational therapy with LiCl/SB-415286 and ZD55-TRAIL on hepatocellular cell lines HepG-2, BEL-7404 and normal cell lines L02, QSG-7701; Further, the cytopathic effect assay demonstrates the efficacy and the safety of the combination therapy and the apoptosis of BEL-7404 induced by the viro-chemotherapy is observed through Hoechst 33342 staining under fluorescent microscope. Finally, western blot analysis detects the changes in apoptosis signaling pathway of hepatocellular cell line HepG-2. The results show that the killing effects of ZD55-TRAIL on hepatocellular cell lines HepG-2, BEL-7404 are significantly improved when in combination with low dose of LiCl and SB-415286, while the toxicity against normal cell lines L02, QSG-7701 is not apparent. In conclusion, the data demonstrated that the resistance to TRAIL on hepatoma cells can be greatly alleviated by GSK-3 inhibitors, and the killing effects of oncolytic adenovirus-mediated TRAIL are obviously enhanced.

Key words: oncolytic adenovirus; TRAIL; LiCl; SB-415286; combined therapy

(责任编辑: 许惠儿)