

# TRAIL 受体在子宫内膜癌细胞株的表达

王才智<sup>1</sup>, 吕合作<sup>2</sup>, 席玉玲<sup>1</sup>, 晋茂生<sup>1</sup>, 何玉<sup>1</sup>, 郭才<sup>1</sup>, 凌斌<sup>3</sup>

[摘要] 目的: 研究肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)受体在正常子宫内膜组织、子宫内膜癌组织和癌旁组织的表达特征。方法: 采用 RT-PCR 技术, 检测 20 例正常子宫内膜、20 例子宫内膜癌及癌旁组织中 TRAIL 受体 DR4、DR5 和假受体 DcR1、DcR2 阳性表达情况。结果: TRAIL 受体 DR4、DR5 的 mRNA 在人正常子宫内膜组织、子宫内膜癌组织和癌旁组织中均表达, 诱骗受体 DcR1 的 mRNA 在子宫内膜各组织中的表达率不同, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 而诱骗受体 DcR2 的 mRNA 在子宫内膜癌组织中的表达率明显低于正常子宫内膜组织和癌旁组织, 差异具有统计学意义( $P < 0.005$ ), 癌旁组织细胞中 DcR2 表达和正常子宫内膜组织相近( $P > 0.05$ )。结论: TRAIL 诱骗受体 DcR1、DcR2 在子宫内膜癌中的低表达可能与其发病机制有关, 可能对防止子宫内膜癌变具有一定作用。

[关键词] 子宫肿瘤; Ishikawa 细胞株; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; TRAIL 受体

[中国图书资料分类号] R 737.33; R 329.24 [文献标识码] A

## Expression of TRAIL receptors in human endometrial carcinoma cell line

WANG Cai-zhi<sup>1</sup>, LÜ He-zuo<sup>2</sup>, XI Yu-ling<sup>1</sup>, JIN Mao-sheng<sup>1</sup>, HE Yu<sup>1</sup>, GUO Cai<sup>1</sup>, LING Bin<sup>3</sup>

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Immunology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

3. Department of Gynecology and Obstetrics, Anhui Provincial Hospital, Hefei Anhui 230001, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of death receptors (DR4, DR5) and decoy receptors (DcR1, DcR2) of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in normal endometrium tissues, carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. Methods: Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect mRNA positive expressions of the receptors of TRAIL in 20 cases of normal endometrium tissues, 20 cases of carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. Results: DR4 and DR5 were expressed in normal endometrium tissues, carcinoma endometrium tissues and the adjacent tissues. DcR1 expressed differently in the tissues of endometrium, but with no statistical significance ( $P > 0.05$ ); the expression of DcR2 was much lower in the carcinoma endometrium tissues than in normal or tumor adjacent tissues ( $P < 0.005$ ); the expression of DcR2 was similar in normal and tumor adjacent tissues ( $P > 0.05$ ). Conclusions: The low expression of DcR2 in the carcinoma of endometrium may be concerned with its pathogenesis, which might play a role in preventing endometrium from carcinomatous change.

[Key words] uterine neoplasms; Ishikawa cell line; tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; TRAIL receptors

### 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related

apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 1995 年发现的 TNF 超家族中的凋亡分子, 它的结构、功能及作用机制, 近年来引起基础与临床多学科的关注, 尤其 TRAIL 能有选择性地诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常细胞无细胞毒性作用<sup>[1]</sup>, 这为肿瘤的生物治疗提供新的思路。有关 TRAIL、TRAIL 受体及其信号传导途径与肿瘤的关系早有研究, 但它们在子宫内膜癌

[收稿日期] 2007-07-10

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2003kj69)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 第一附属医院 妇产科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030; 3. 安徽省立医院 妇产科, 安徽 合肥 230001

[作者简介] 王才智(1968-), 男, 副主任医师, 副教授。

[7] Takizawa Y, Taneike I, Nakagawa S, et al. A Pantone-Valentine leucocidin (PVL)-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain, another such strain carrying a multiple-drug resistance plasmid, and other more-typical PVL-negative MRSA strains found in Japan [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3356-3363.

[8] Salliot C, Zeller V, Puechal X, et al. Pantone-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* infections: Report of 4 French cases [J]. *Scand J Infect Dis*, 2006, 38(3): 192-195.

[9] Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in *Staphylococcal* isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(10): 3411-3414.

[10] El-Huneidi W, Bdour S, Mahasneh A. Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and of a novel aroA genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus* [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006, 56(2): 127-132.

[11] 赵建, 丁水军, 陆扁, 等. 48 株金黄色葡萄球菌的肠毒素分布及其耐药性研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(7): 841-842.

[12] Ladhani S. Recent developments in *Staphylococcal* scalded skin syndrome [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(6): 301-307.

[13] Amagai M, Matsuyoshi N, Wang ZH, et al. Toxin in bullous impetigo and *Staphylococcal* scalded-skin syndrome targets desmoglein 1 [J]. *Nat Med*, 2000, 6(11): 1275-1277.

的发病机制和治疗尝试鲜有报道。本研究通过 RT-PCR 方法检测 TRAIL 的 4 个受体 (DR4、DR5、DcR1 和 DcR2) 在子宫内膜癌中的阳性表达情况,为通过 TRAIL 生物治疗途径治疗子宫内膜癌提供一个可能有效的策略。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 选择 2003 年 1 月~2005 年 1 月在我院妇产科、妇瘤科活检及手术标本 (经常规病理检查;并证实为子宫内膜腺癌),取出标本后,立即取癌组织和癌旁组织 (癌组织边缘 1~2 cm),经过液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱待用。切除子宫肌瘤患者之子宫内膜视为正常子宫内膜。人外周血淋巴细胞 (PBMC) 均来自蚌埠医学院健康教工和学生,静脉采血后,淋巴细胞分离液常规分离 PBMC;Ishikawa 细胞株为人子宫内膜癌细胞株,贴壁生长,由北京医科大学第一医院妇产科魏丽惠教授惠赠;Jurkat 细胞株为人 T 淋巴瘤细胞株,由蚌埠医学院免疫学教研室保存。

**1.2 RNA 的提取** 将所有离心管、研钵及其他金属器械严格处理以彻底去除 RNA 酶污染。按 Trizol 试剂盒 (GIBCO 公司产品) 说明书提取总 mRNA,分光光度计测定 OD260 与 OD280 值定量;取 5  $\mu$ l 于 1% 琼脂糖电泳分析总 RNA 完整性, -20 °C 保存。

**1.2.1 cDNA 制备** 应用第一链合成试剂盒制备 cDNA,取 10  $\mu$ l 总 RNA 溶液于 0.5 ml PCR 反应管,加 1  $\mu$ l 随机引物,轻轻混匀,低速离心 5 s,70 °C 温浴 5 min,冰上冷却后依次加入以下成分,5  $\times$  buffer 4  $\mu$ l, Ribon 核酸抑制剂 1  $\mu$ l, 10 mmol/L dNTP 2  $\mu$ l, 轻轻混匀,低速离心 5 s 后 25 °C 孵育 5 min,加入 Mmulv 逆转录酶 1  $\mu$ l,混匀后 25 °C 孵育 10 min,37 °C 60 min 进行逆转录反应,70 °C 10 min 灭活逆转录酶终止反应, -20 °C 保存。

**1.2.2 引物合成** 参照 GeneBank 中 DR4、DR5、DcR1、DcR2 及  $\beta$ -actin 的全长序列,计算机辅助设计长度分别为 307 bp,402 bp,507 bp,600 bp 及 219 bp 的引物,所有反应引物均由 Sangon 公司合成。DR4 R: 5' CAG AGG GAT GGT CAA GGT CAA G 3', F: 5' TTC CTG CTC AGA GAC GAA AGT G 3'; DR5 R: 5' GCC TCA TCG ACA ATG AGA TAA AGG TGG CT 3', F: 5' CCA AAT CTC AAA GTA CGC ACA AAC GG 3'; DcR1 R: 5' CAA CGC TTC CAA CAA TGA AC 3', F: 5' ATG GTG CAT GAG AGG TAA TGA G 3'; DcR2 R: 5' TTT GCC TTC TTG CCT GCT ATG 3', F: 5' GCT CCT CTG GCG ACT CTA CAG T 3';  $\beta$ -actin

R: 5' GAA ACT ACC TTC AAC TCC ATC 3', F: 5' CGA GGC CAG GAT GGA GCC GCC 3'。

**1.2.3 PCR 反应体系** 按参考文献的方法,逆转录前,先取 RNA 样品以  $\beta$ -actin 引物进行 PCR 扩增,以确认 RNA 中无 DNA 污染,然后于 0.5 ml PCR 管中加入下列试剂 (反应总体积 50  $\mu$ l); 并取正常人外周血淋巴细胞 PBMC 和人 T 淋巴瘤细胞株 Jurkat 细胞为阳性对照。10  $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ l, DNTTP 混合物 1  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 溶液 (25 mmol/L) 6  $\mu$ l, 上游引物 1  $\mu$ l, 下游引物 1  $\mu$ l, CDNA 模板 3  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ l, 无核酸酶水 28.5  $\mu$ l。

PCR 反应循环条件 (DR4、DcR1 条件相同): 95 °C 预变性 5 min, 一个循环; 95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后; 72 °C 延伸 10 min, 1 个循环。DR5: 95 °C 预变性 5 min, 一个循环; 95 °C 变性 30 s, 54.9 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后; 72 °C 延伸 10 min, 1 个循环。DcR2: 95 °C 预变性 5 min, 一个循环; 95 °C 变性 30 s, 55.4 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后; 72 °C 延伸 10 min, 1 个循环。 $\beta$ -actin: 95 °C 预变性 5 min, 一个循环; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后; 72 °C 延伸 10 min, 1 个循环。

**1.2.4 扩增产物电泳及摄像** 取 PCR 产物 5  $\mu$ l 于 115 V 电压、53 mA 电流条件下,在 1% 琼脂糖凝胶 (含 EB 0.5 mg/ml) 上电泳分离,将内参照  $\beta$ -actin 及 TRAIL 受体 DR4、DR5、DcR1、DcR2 从正常内膜组织、Ishikawa 子宫内膜癌细胞、癌组织和癌旁组织及与 Jurkat 细胞、PBMC 中扩增的产物,进行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统摄像记录。

**1.3 统计学方法** 采用  $\chi^2$  检验和秩和检验。

## 2 结果

TRAIL 受体 DR4、DR5 的 mRNA 在人正常子宫内膜组织、子宫内膜癌组织和癌旁组织中均表达, DcR1 的 mRNA 在子宫内膜各组织中的表达率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但 DcR2 的 mRNA 在子宫内膜癌组织中的表达率均明显低于正常子宫内膜组织和癌旁组织 ( $P < 0.005$ ), 而癌旁组织细胞中 DcR2 表达率和正常子宫内膜组织相近 ( $P > 0.05$ ) (见表 1)。

## 3 讨论

随着药物治疗研究的进展,药物疗法 (化疗) 已成为子宫内膜癌的综合治疗措施之一,对晚期癌、复发癌以及具有高危因素的患者尤为重要;大多数学

表1 正常内膜组织、癌旁组织和内膜癌组织 TRAIL 受体的阳性率(%)比较

分组	n	DR4	DR5	DcR1	DcR2
正常组	20	20(100)	20(100)	19(95)	18(90)
癌旁组	20	20(100)	20(100)	18(90)	16(80)
肿瘤组	20	20(100)	20(100)	15(75)	7(35)
合计	60	60(100)	60(100)	52(86.7)	41(68.3)
Hc	—	0.00	0.00	2.44	15.86 <sup>A</sup>
P	—	>0.05	>0.05	>0.05	<0.005

△示 $\chi^2$ 值

者认为,化疗对子宫内膜癌有一定疗效,但总的有效率不高,单一用药的客观有效率为20%左右,联合用药的有效率不超过40%<sup>[2-5]</sup>。近年来有关细胞凋亡的研究为寻求新的化疗药物、提高化疗疗效提供了新的思路;研究显示,不同药理作用的化疗药物最终均通过共同的通路诱导细胞凋亡。TRAIL广泛表达于人体正常组织,在体外能诱导多种肿瘤细胞凋亡,而正常细胞则对TRAIL诱导不敏感,使之可能成为一种新的抗肿瘤生物制剂。

TRAIL(Apo-2L)于1995年由Wiley等<sup>[6]</sup>首次发现并克隆成功的一种凋亡因子,它能够诱导多种肿瘤细胞的凋亡,且对正常的组织细胞毒性较小。TRAIL对肿瘤细胞的选择性杀伤作用,最初认为可能依赖诱骗受体DcR1、DcR2,这些受体结构上不含死亡受体所具有的完整的细胞内死亡域,不能诱导细胞的凋亡,但DcR1、DcR2在体外与TRAIL有很强的亲和力,可竞争性抑制TRAIL与DR4、DR5的结合而阻止细胞凋亡的发生,即DcR1、DcR2是正常细胞的保护受体而防止对正常细胞的杀伤作用。据文献报道,TRAIL可以在许多组织中表达,如胎盘、胎儿肺、肝、肾及成人的脾、前列腺、肺、肾、卵巢、小肠、结肠、心肌、骨骼肌和外周血淋巴细胞等人体组织<sup>[1,6,7]</sup>,4种膜受体中,DR4、DR5广泛表达于各种细胞表面,包括肿瘤细胞与正常细胞,而DcR1、DcR2在大多数肿瘤细胞表面不表达,只选择性地表达于正常细胞表面,这是TRAIL选择性地诱导肿瘤细胞凋亡的原因之一<sup>[8,9]</sup>。细胞表面死亡受体和诱骗受体表达水平的差别,是影响TRAIL对靶细胞杀伤力的一个重要因素;细胞表面死亡受体和诱骗受体的表达水平,可从一定程度上反映靶细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感度。马远方等<sup>[10]</sup>研究发现,DR5在TRAIL诱导Jurkat细胞凋亡中起着十分关键的作用,并占有绝对的功能比重。李新国等<sup>[11]</sup>研究卵巢肿瘤中TRAIL受体DcR2的表达可能参与了

卵巢肿瘤发生过程中细胞凋亡的调控。子宫内膜组织中是否存在TRAIL受体,李榕等<sup>[12]</sup>用免疫组化方法检测发现DcR1、DcR2主要分布在子宫内腺体上皮和癌细胞的细胞质、细胞膜上,且DcR1、DcR2在正常子宫内膜组织中表达较强,而在子宫内膜癌组织中DcR1、DcR2的表达均较弱。

本研究在基因水平进一步表明,在正常人子宫内膜组织细胞中,TRAIL受体DcR1、DcR2、DR4、DR5均表达,而人子宫内膜癌组织中有DR4、DR5表达,而DcR1、DcR2仅部分表达,且DcR1表达率要高于DcR2,和李榕等<sup>[12]</sup>报道相似;从而为TRAIL可能诱导子宫内膜癌的凋亡提供理论依据;本研究同时取癌旁组织进行对照发现,癌旁组织中的DcR1、DcR2的表达率和正常子宫内膜相似,而与肿瘤中的DcR2具有不同,这种差异推测可能与癌旁组织的细胞特性尚未发生改变有关。

#### [参考文献]

- [1] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 12 687 - 12 690.
- [2] 曹泽毅主编. 中华妇产科学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2005; 2 285 - 2 332.
- [3] 乐杰主编. 妇产科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004; 298 - 303.
- [4] 中华医学会妇产科学会, 中华妇产科杂志编辑委员会. 妇科常见恶性肿瘤诊断与治疗规范草案[J]. *中华妇产科杂志*, 1998, 33(11): 694 - 704.
- [5] Hirai M, Hirono M, Oosaki T, et al. Adjuvant chemotherapy in stage I uterine endometrial carcinoma[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002, 78(1): 37 - 44.
- [6] 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(6): 673 - 682.
- [7] Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family[J]. *J Exp Med*, 1997, 186(7): 1 165 - 1 170.
- [8] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. *Science*, 1997, 276(5 309): 111 - 113.
- [9] Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells[J]. *J Immunol*, 1998, 161(6): 2 833 - 2 840.
- [10] 马远方, 杨东亮, 陆士新, 等. DR5在TRAIL诱导Jurkat细胞凋亡中的作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(5): 332 - 334.
- [11] 李新国, 张瑜, 谌兵来. 凋亡诱导基因TRAIL的受体在卵巢肿瘤中的表达[J]. *湖南医科大学学报*, 2000, 25(5): 471 - 473.
- [12] 李榕, 姬秋和, 刘雪松, 等. 子宫内膜癌中TRAIL诱骗受体的表达研究[J]. *医学研究生学报*, 2003, 16(7): 489 - 490.