

TRAIL所引起細胞凋亡作用在人類腫瘤細胞株之研究

1

高中組：第一名
縣 市：台北市
校 名：北一女中
作 者：趙悅伶
指導教師：許秉寧
薛如娟



我是個開朗的女孩，總是把笑容掛在臉上，對於喜歡的領域我往往積極地去接觸、學習，從鋼琴、長笛、舞蹈、戲劇以至於打球、游泳等，都是我生活中不可或缺的，而醫學一直是我嚮往的領域，從小學開始，每當我翻開醫學的書籍，便會興奮的睡不著覺，捧著書看了又看，無論有多少艱深的詞彙，無論我究竟看懂了多少，那打從心裡的喜悅無以言喻。

自從上了北一女中，那自由而富挑戰性的環境再度促使我積極地去挖掘自己的興趣能力所在，感謝上天賜與我這麼好的機會，能進入台大醫學院的實驗室做實驗，這一年來的學習，使我充分的感受到做研究的生活，除了勤奮努力外，還須有運氣的配合及百折不撓的精神，任何一點成就的背後都有不為人知的艱辛與歷程。在此特別感謝許秉寧教授用心的指導，實驗室中學長姊的幫助，學校師長與家人背後的支持與關愛，使我在研究的路上成長茁壯。

整個做科展的過程是一種挑戰，一種動力，我發現我已深深的愛上人體的奧妙，那造物主的傑作令人嘖嘖稱奇，早在大獎的喜悅臨到我之前，我已默默的許下心願，願能奉獻一生的心力在醫學研究上，成為人類進步的一個踏腳石。

關鍵詞：TRAIL、細胞凋亡(apoptosis)、腫瘤

一、研究動機

新世紀的疾病「癌症」在國內外十大死因中居高不下，而目前的治療方法效果不顯著且常造成人體其它組織的傷害，這是個棘手問題，人們往往聞之色變；若是能找到一種方法，能有效殺死癌細胞而不對正常細胞造成傷害，將十分有益於癌症的治療。

有鑑於此，我們希望藉由計畫性細胞死亡的方式，結合免疫的知識，達到上述的目的。記得在雜誌上看過，近年來發現了一個TRAIL〔TNF (Tumor Necrosis Factor) Related Apoptosis Inducing Ligand〕分子，可以導致細胞的「計畫性死亡(apoptosis，或稱作細胞凋亡)」，且對於腫瘤細胞特別敏感；而「計畫性死亡」的特徵乃(1)核皺縮(2)DNA斷裂(3)細胞萎縮而不破裂，相較於另一種死亡(Necrosis，壞死)的死亡方式來說，Apoptosis不會造成人體過度的發炎反應，十分符合我們的條件。

基於這些原因，我們便想培養不同的人類腫瘤細胞株，測試TRAIL對其造成計畫性細胞死亡的敏感度，以作為日後癌症治療研究發展的基礎；並進一步以RT-PCR方式定性分析各種腫瘤細胞株中TRAIL及TRAIL受體的表現情形，並和人類正常細胞作一個比較，以了解人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度和其TRAIL及TRAIL受體的表現之間的關係。

二、研究摘要

腫瘤壞死因子及其受體(TNF/TNFR)分子族群蛋白成員在許多生物系統中的細胞凋亡(apoptosis)，或稱做設定性死亡反應上，扮演著非常重要的角色。TRAIL(又被稱做Apo-2 ligand)是這群蛋白分子中屬於TNF配體(ligand)的新成員，它具有引發多種轉型細胞株進行細胞凋亡的能力。在1997年有幾種人類TRAIL分子的受體(receptor)被發現，且都屬於TNF受體分子族群中的新成員，其中TRAIL-R1/DR4、TRAIL-R2/DR5分子具有死亡小區(Death domain)，可傳遞TRAIL分子引起的細胞凋亡訊息；而TRAIL-R3/DcR1不具有死亡區域其及TRAIL-R4/DcR2只具有不完整的死亡區域，得這兩個分子可以在生體外抑制TRAIL分子所引發的細胞凋亡作用。

由於TRAIL具有引發廣泛的細胞株凋亡的能力，但又不會引起正常的細胞凋亡，而TRAIL受體在腫瘤組織上的表現與TRAIL在腫瘤清除中的角色並不是相當清楚，所以在此研究中我們培養不同的人類腫瘤細胞株，測試其對於TRAIL的敏感度，並且以RT-PCR的方式進一步探討TRAIL受體的表現與其敏感度之間的關係。

我們將各種人類腫瘤細胞株取出後計算細胞數，將大約 $10^4/10$ 米l濃度的細胞養在96孔培養盤上，培養隔夜後，將培養基移

除，置換為含有經序列稀釋(series dilution)的重組蛋白質的培養基，實驗中包含加入濃度自1500、750、375、187.5到93.75ng/ml序列稀釋的重組蛋白質，以及沒有加重組蛋白質的控制組，將細胞再培養24小時後，以結晶紫染色法分析細胞凋亡的情形。分析的結果中，其中Hela、HA22T及Mahlavu細胞株對TRAIL比較敏感，加入重組蛋白濃度達到1500ng/ml時，Hela可以見到約有50.3%的細胞凋亡、HA22T有高達約80~82%的細胞凋亡、Mahlavu可以見到有55.3%的細胞凋亡；而細胞株Sk-Hep-1的凋亡比率低於20%，人類B淋巴瘤細胞株DG75對於TRAIL幾乎沒有反應，且隨著TRAIL濃度的提高並不會引起較多的細胞凋亡，顯示這些細胞株對TRAIL是具有抗性的。

為了要進一步研究各種人類腫瘤細胞株對於TRAIL敏感性是否由於它們表現TRAIL受體的不同所影響，我們以RT-PCR的方式測試各細胞株中TRAIL及TRAIL-R的表現。我們將各種人類腫瘤細胞株培養於medium中，在其生長旺盛時取細胞至少1x10⁶個以TRIzol抽取細胞的RNA，取5µg的RNA以superscript II將RNA反轉錄成cDNA後進行PCR的分析。我們發現TRAIL mRNA以及TRAIL受體DR4、DR5和DcR2在人腫瘤細胞株中幾乎都有表現，除了人類B cell lymphoma-DG75沒有表現TRAIL、Jurkat細胞株未表現DcR2，而DcR1只在Jurkat細胞株以及人類正常PBMC的表現稍明顯，Hela、HA22T、Sk-Hep-1及DG75的表現都很不明顯，Mahlavu則未偵測到DcR1的表現。

在國外發表的文獻中表示DcR1只表現在正常組織上，而腫瘤細胞則幾乎沒有表現，然而在此結果中，我們發現幾乎所有細胞皆有表現DcR1，只是量的不同而已，而各種細胞株對於TRAIL導致細胞凋亡的敏感度和其DcR1表現的量並無明顯關係，就如Jurkat腫瘤細胞株對於TRAIL有超過40%的死亡率，但卻較為明顯的表現出DcR1，可見細胞對於TRAIL敏感度的不同應有更複雜的分子在調控著，而不僅僅是其受體表現的差異而已。

因此由我們結果看來，顯示著許多人類腫瘤細胞株的確對於TRAIL所引起的細胞凋亡作用有著不同程度的敏感性。這些對於TRAIL敏感性的瞭解，將有助於應用在日後對於癌症的治療及研究。不同的人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度和其TRAIL及TRAIL受體的表現並無明顯相關，可見決定細胞凋亡的原因仍有待進一步研究。

三、背景介紹

(一)背景及目的

細胞計劃性死亡(programmed cell death)也稱為細胞凋亡(apoptosis)在複雜的生物系統中維持發育及細胞間的恆定具有絕對的重要性。而細胞凋亡在免疫調節及腫瘤發生中的角色是目前極受到重視的。其中腫瘤壞死因子及其受體〔TNF (Tumor Necrosis Factor)/TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)〕家族蛋白，在如此分歧的生物系統中媒介著細胞凋亡的作用上扮演了極重要的角色。而且在這個家族中有數個成員表現出具有調節細胞凋亡訊息且影響著免疫系統的能力。

(二)腫瘤壞死因子配體及受體超級家族之特色

腫瘤壞死因子配體家族(ligand family)中特定的細胞激素和它們共軛的受體家族(receptor family)之間的結合可以引起相當多不同的生理功能，包含proliferation、costimulation、differentiation和apoptosis，而其中又以細胞凋亡(apoptosis)的功能最受到重視。TNFR-1和Fas(或稱Apo-1或CD95)，是這類分子中啟動細胞自殺反應的典型。配體家族為第二型的膜蛋白，其胺端在細胞內、羧端在細胞外，由序列及結晶學上的研究知道配體的胞外小區(extracellular domain)具有相當高的相似性，除了TNF及LT之間會有異三聚體(heterotrimer)形成(結合不同的受體)，一般配體之間(可溶性或膜蛋白)是以同三具體(homotrimer)的形式存在。TNF和FasL(也叫Apo-1L或CD95L)經由和它們具有死亡區域的受體TNFR-1、Fas結合可引起細胞凋亡作用。至今為止，共有五個屬TNF受體超級家族分子中的成員據了解有死亡區域且能傳遞死亡訊息，這些成員包含TNFR-1、Fas、和三個最近選殖出來的死亡受體：DR3、DR4及DR5。DR3的配體已知為Apo3L，而DR4和DR5是TRAIL的死亡受體。這些死亡受體的細胞外區域蛋白序列上具有相當的同源性：具有高度保守性的假重複(pseudorepeats)部分，為第一型膜蛋白(N端在細胞外C端在內)。另外，這些死亡受體也以在C端帶有一段約80個胺基酸組成具有保守性的死亡小區(Death Domain)為特色，而此死亡小區的功能顧名思義就是用以傳遞死亡訊息。這些死亡小區是蛋白質和蛋白質之間作用的motif，藉由受體上的死亡小區與細胞內具有死亡小區的adapter protein結合，造成訊息複體的連結，致最終招攬pro-apoptotic protease caspases(類似於Caenorhabditis elegans死亡基因CED-3)的加入，帶領細胞走向凋亡。

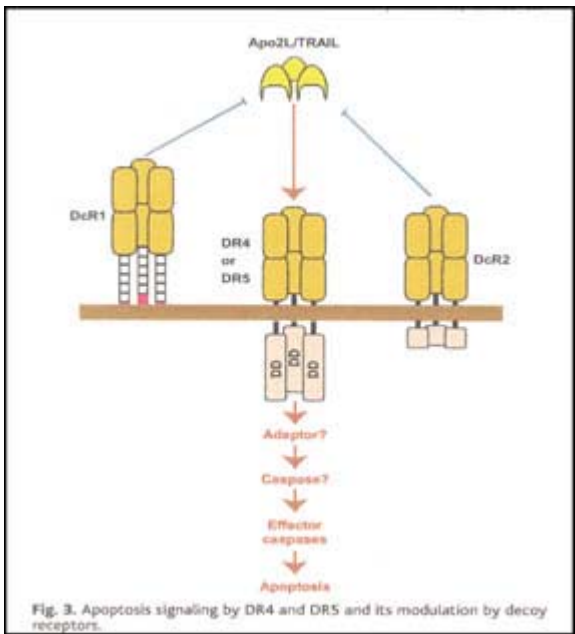
(三)TRAIL及TRAIL受體：

一個新的TNF配體家族成員-TRAIL(TNF related apoptosis inducing ligand或Apo-2L)在1995年被發現。TRAIL在蛋白質序列上與FasL具有高度相似性(以胞外受體結合區最為相似)，並且也像FasL一樣，可以引起相當多不同起源的轉型細胞株快速地進行細胞凋亡。但不同的是，它的表現不局限在刺激過的T細胞或是免疫特權部位如睪丸和眼睛的前腔室，而是廣泛分佈在相當多正常的人類組織上，這暗示了TRAIL在生物體內可能對大部份組織沒有細胞毒性，也意指在調節TRAIL的功能上可能是發生在其受體表現程度上的差異。

DR4是最近發現具有死亡區域的受體，且其配體就是TRAIL。目前的研究結果顯示著經由DR4傳遞的死亡訊息與其它含有死亡區域受體不同，它以一個獨特的方式，不經過FADD的路徑而活化Caspase。而在研究此受體同時，另一個新的含死亡區域的受體DR5被選殖出來，他和DR4有著極相似的構造，同樣的在訊息傳遞方面，也不使用FADD作為訊息傳遞的媒介，與大家所熟悉的TNFR1、Fas及DR3的訊息傳遞有所不同。雖然有研究指出，DR4和DR5兩者引發細胞凋亡的能力可以被dominant-negative FADD阻斷，且兩個受體都活化NF-KB，並依賴TRADD傳遞訊息，但經由最近以FADD基因剔除(knockout)的小鼠所作的研究中已經將DR4和DR5使用FADD做為adapter protein的可能性加以排除了。

(四)Decoy Receptor假說：

由最近選殖TRAIL受體的資料，似乎顯現出一個更複雜的景象：一個TRAIL配體可藉由不同的受體傳遞不同的訊息。TRAIL的兩個受體，DR4和DR5有能力引導細胞凋亡；相反的，另兩個才剛剛被選殖出來的受體，就沒有辦法傳遞細胞凋亡的訊息。其中DcR1缺乏細胞內死亡區域；而DcR2雖然有細胞內死亡區域，但是細胞內死亡區域卻是不完整的，無法傳遞死亡訊息，但仍會活化NF-KB。事實上，也有學者認為這兩個受體的角色就像是個引誘者(Decoy)，用來抑制TRAIL的死亡訊息。而在生體外的實驗中使細胞中過量表現DcR1或DcR2後，可以將細胞由會被TRAIL殺死變成可以抵禦TRAIL的毒殺，又由於腫瘤細胞株中DcR1的表現較少被偵測到，只有在大部分的正常組織中有表現，因此有些學者便推測DcR1和DcR2的表現可能決定了不同的細胞或組織對TRAIL毒殺的敏感度。然而至今為止，這些不同的TRAIL的受體的生物功能，甚至是TRAIL本身媒介的細胞凋亡所扮演的角色仍然不完全瞭解，因為對這些新的分子的功能性研究報告仍相當有限，新的研究結果也陸續被發表於期刊上。



【圖一】TRAIL的四個受體DR4、DR5、DcR1、DcR2

(資料來源：SCIENCE VOL 281 28 AUGUST 1998)

(五)TRAIL受體在腫瘤與正常組織的表現

由於許多生體外的研究中都顯示著TRAIL受體中的TRAIL-R3/DcR1/TRID似乎只選擇性的表現於正常細胞中而相對的在許多轉形的腫瘤細胞株中僅有非常少量或甚至不表現。這意味著TRAIL受體表現型式的不同可能是造成正常與腫瘤細胞對於TRAIL所引起細胞死亡敏感度不同的主要原因。並且暗示著TRAIL在生物體內的功能很可能與腫瘤的清除有關。然而目前對於此種非常具有吸引力的假說還沒有任何生體實驗結果加以證實，同時也尚無任何人體腫瘤組織中有關這些TRAIL受體表現的研究報告發表。爲了要進一步瞭解TRAIL受體在人體腫瘤組織中的表現情形並進而釐清TRAIL在腫瘤清除上的角色，我們嘗試著探討TRAIL在各種人類腫瘤細胞株之間所引起細胞死亡的敏感性，以進一步應用於人類腫瘤的研究。

四、研究目的

- (一)建立TRAIL induced apoptosis的測試系統。
- (二)利用這個測試系統測試多種不同的人類腫瘤細胞株對於TRAIL所引起細胞死亡作用之敏感性。
- (三)以RT-PCR方式定性分析各種腫瘤細胞株中TRAIL及TRAIL受體的表現情形。

五、研究設備器材

ELISA Reader、96 well plate、incubator、flask、pipet-aid、eppendorf、DMEM、RPMI-1640 medium、Hank's balanced salt solution (HBSS,10X stock)、Trypsin-EDTA(Ethylenediaminetetra-acetic acid)、Dulbecco's PBS(10X stock)、Crystal Violet、10% glutaraldehyde、Crystal Violet staining buffer (Glacial acetic acid)、heat block、TRizolTM、Chloroform($CHCl_3$)、Isopropanol、75%ethanol、DEPC-ddH₂O、Spectrophotometer、Vortex-2 Genie、Random hexamer primer、Magnesium chloride (MgCl₂ 25mM)、10X PCR buffer、DTT、dNTP(10mM)、Superscript II RT、RNaseH、dNTP(2.5mM)、primer、Invi Tag、ddH₂O、DNA thermal cycler 480、100 bp DNA ladder、6×DNAloading dye、TE burffer、Agarose、Ethidium Bromide(EtBr)、ficoll paque、無煞車離心機、玻璃滴管、10ml注射針筒

六、研究過程或方式

(一)腫瘤細胞株之細胞凋亡分析方式

1.培養細胞以供實驗使用

(1)解凍細胞

準備30~40mlHBSS buffer於離心管中，將冷凍小管放在37 水中均勻解凍，至剩下一小塊冰，用酒精綿消毒瓶外，打開後加入離心管後離心1400r.p.m.10分鐘，倒掉上清液，加5ml medium再懸浮，轉放入25T flask。

(2)冷凍細胞

吸掉flask中的medium，用DPBS(約5ml)wash後吸掉，加Trypsin-EDTA 5ml(不超過1min.視情況而定)使附著性細胞懸浮，加HBSS約5ml(有鈣及鎂離子，可終止Trypsin作用)，將cell沖下來放入離心管中，離心1200r.p.m.5分鐘；倒掉上清液，加入3mlHBSS再懸浮，算細胞數目，調整至一管有1ml、細胞數目3x10⁶個，離心1200r.p.m.5分鐘，倒掉上清液，再懸浮，加入抗凍劑(視要凍幾管而定量)，轉加入冷凍用管中，一管加1ml。

(3)分裝附著性細胞

吸掉medium(DMEM)，加入5ml(25T flask)或10ml(75T flask)的1×DPBS(用以洗掉medium)，吸掉DPBS後加入3ml(25T falsk) or 5ml(75T flask)的1×Trypsin-EDTA使附著性細胞懸浮，加入medium或HBSS約6ml終止Trypsin作用，將細胞沖下來裝入離心管中離心1500r.p.m. 5分鐘後倒掉上清液，再懸浮，加入5ml(25T flask)或15ml(75T flask)medium(DMEM)，轉裝入flask中。

(4)分裝懸浮性細胞

從flask中吸出medium(RPMI-1640)，置於15ml離心管中離心1200rpm 5分鐘，倒掉上清液，以medium(RPMI-1640)再懸浮，轉裝入新的flask中。

(5)Human PBMC（Peripheral Blood Mononuclear Cell）的製備

抽血約100ml，存放於加有抗凝劑(heparin)的管子中，加入與血液等量的HBSS將血液稀釋，再利用玻璃滴管小心地將ficoll paque加在血液下層，以無煞車離心機在適溫下離心1800rpm、20分鐘，小心取出以免破壞界面，以玻璃吸管將白色混濁的薄層吸起(PBMC所在)，置於15ml離心管中離心10分鐘、1500rpm，以HBSS wash後離心1400rpm、5分鐘，若pellet有呈紅色的，以ACK將紅血球處理掉，再用HBSS wash一次，最後以RPMI-1640再懸浮。

2.附著性細胞之細胞凋亡分析方式

(1)取出細胞調整至適當濃度，培養於96well plate中24小時

吸掉Flask中的medium，加入約5ml的1×DPBS用以洗掉medium，吸掉DPBS後加入3ml(25T)或5ml(75T)的1×Trypsin-EDTA使附著性細胞懸浮，加入medium或HBSS約6ml，裝入離心管中離心1500r.p.m. 5分鐘後倒掉上清液，加入約3ml medium再懸浮，取10米l細胞和10米l Trypan Blue混合均勻後加於特殊載玻片上計算細胞濃度，調整至適當濃度(不同細胞的適合濃度不同，理想濃度為培養48小時後control組剛好長滿整個well)，seeding細胞於96well plate，100米l/well，培養細胞於37 incubator 24小時。

(2)加入TRAIL放置反應24小時

準備5個1.5ml的小離心管，於第一個離心管加入999米l medium (DMEM)其餘四個各加入500米l medium (DMEM)，加1米l TRAIL於第一個離心管，混合均勻後取500米l至第二個離心管，再次混合均勻並取500米l至第三個離心管，以此類推。用微量滴管小心的吸出96well內的medium，分別加入五個離心管中的medium，使每一列的濃度分別為1500ng/ml、750ng/ml、375ng/ml、187.5ng/ml、93.75ng/ml。Culture24小時於37 incubator。

(3)利用結晶紫染色的方式紀錄細胞凋亡情形

seeding適當數量的cell於96well plate並加入TRAIL放置隔夜，以200 米l PBS wash cell三次，用以洗掉死細胞，加200米l 10% Glutaraldehyde放置於適溫10~20分鐘以固定細胞，以200米l PBS洗細胞三次來洗去固定液，加入50米l的1%結晶紫染液(crystal violet)染色，放置適溫10~20分鐘，以200米l ddH2O洗細胞四次，將染劑洗去。放在適溫下或oven裡使plate乾燥，加入200米l 33% acetic acid並混合均勻，以OD(Optical Density)562~605測其濃度。 $\%Cytotoxicity=100\times(A_{control}-A_{sample})/A_{control}$

(4)備註

我們採取結晶紫染色法(specific lysis assay by crystal violet staining)分析黏著性細胞之細胞凋亡情形，原理是黏著性細胞凋亡後會浮起，而留下的細胞數目多寡則經由其吸收的染劑決定，因為先將細胞固定後，細胞越多則吸收的染劑越多，經測量染劑之特殊吸光值就可以知道細胞存活情形。我們將預備分析的細胞株先以Trypsin-EDTA處理，計算細胞數目並取約 10^4 個細胞懸浮於200米l的適當培養基(complete DMEM加上1×nonessential amino acid)中，種到96孔平底培養盤(96 well culture plate)中過夜培養，以形成均勻的單層細胞。將培養基以8爪微量吸管吸出，加入經過序列稀釋的His-TRAIL重組蛋白(濃度從1400ng/ml至87.5ng/ml)於100米l的培養基中，培養24小時，將培養基以微量滴管小心吸出，以200米l的PBS或1×DPBS清洗96孔培養盤3次，加入200米l的10% glutaraldehyde於室溫中將細胞固定10分鐘，吸掉反應溶液，以200米l的PBS清洗3次，加入50米l的1%結晶紫溶液，於室溫中反應10~20分鐘，吸掉結晶紫溶液，以200米l/well二次水清洗培養盤四次，以微量滴管吸去剩餘的二次水，讓培養盤置於空氣中乾燥或是放置於烘箱中乾燥完全後，加入200米l的Crystal violet lysis buffer (33% acetic acid / water)溶解結晶紫，以光譜儀讀取OD550 (Optical Density)吸收值。特異性毒殺百分比(%)= $100\times(控制組OD550讀值-實驗組OD550讀值)/控制組OD550讀值$ 。

3.懸浮性細胞之細胞凋亡分析方式

(1)取出懸浮性細胞調整至適當濃度，加入TRAIL後培養於6 well plate中24小時

將flask中的medium吸出，轉放入15ml離心管中，離心1200rpm、5分鐘，以3ml medium(RPMI-1640)再懸浮，取10米l細胞和10米l Trypan Blue混合均勻後加於特殊載玻片上計算細胞濃度，調整至 1×10^5 個/ml，seeding於6well flask中，每well加1ml。並依序加入不同量的重組蛋白TRAIL，使各well的TRAIL濃度分別為100、300、500、1000、1500ng/ml，設有一組控制組不加入TRAIL，Culture24小時於37 incubator。

(2)PI(propidium iodide)staining

預冷4 無煞車離心機，準備tube於冰上，將PI和Rnase稀釋十倍，配置6ml Hypotonic DNA staining solution加2米l PI加18米l Rnase的混合液，將6well平底培養盤中的細胞和培養液分別轉放入tube中，4 離心5分鐘、1200rpm，倒掉上清液，拍散pellet，邊震動(或vortex)邊緩慢加入Hypotonic DNA staining solution、PI和RNase的 mixture，每管1ml，避光30分鐘，其間不時vortex，經過濾後以FACscan分析細胞凋亡的比率。

(二)反轉錄與聚合 鏈鎖反應

1.細胞株RNA之萃取

細胞株之RNA以TRizol™萃取，步驟簡述如下，將 5×10^6 細胞以1 ml TRizol™均勻懸浮後，置於室溫約5分鐘，加入200米l 氯仿(CHCl3)劇烈搖晃15秒後靜置於室溫3分鐘，12000g於4 離心15分鐘，取上清液至新離心管中加入0.5ml Isopropanol混合均勻後靜置於室溫10分鐘，再等速離心10分鐘於4 ，倒去上清液，以75%酒精清洗，7500g離心5分鐘，風乾10分鐘，溶解於50米lDEPC-ddH2O中，可加熱至60 作用10分鐘幫助RNA完全溶解。

2.RNA定量

將2.5米l的RNA以DEPC-ddH2O稀釋至500米l，利用Spectrophotometer測量260nm與280nm波長之吸光值，分別代表溶液中RNA以及蛋白的含量，同時260/280的比值應該要大於1.6，而當260nm的吸光值O.D.=1時，代表RNA的濃度為40米g/ml。

3.反轉錄(reverse transcription, RT)：

取一定量的RNA(1-5米g)當模板，加入1-5米l Random hexamer(50ng/ml)補DEPC水至12米l，於70 反應10分鐘，快速於冰上冷卻3分鐘，再加入有2米l MgCl2(25mM)、2米l 10 × PCR buffer、2米l DTT(10mM)以及1米l dNTP(10mM)的混合液，置於室溫中5分鐘後加入1米l Superscript IITM (50U/米l)，於室溫反應10分鐘後移至42 反應50分鐘，再移至70 反應15分鐘後，快速冷卻於冰上以終止反應，RNA反轉錄成cDNA完成後可保存於-20 。

4.聚合酵素鏈鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

於0.5ml薄壁離心管中，每管加有1米l的cDNA當作PCR的模板，4米l 10×KCl buffer、3.6 米l dNTP(2.5 mM)、特異性引子正股(sense)和反股(antisense)各4米l(3米M)、以及0.2米l的Klen Taq DNA聚合酵素(5 U/米l)，並以ddH2O將體積補成40米l，混合並快速離心5秒鐘，於反應溶液上方滴入兩滴礦物油。置於預熱置95 之DNA thermal cycler 480進行聚合酵素鏈鎖反應。反應條件為95 /5分鐘一個循環；95 /1分鐘、55 /1分鐘、72 /1分鐘，30個循環；72 /10分鐘，1個循環，4 保存。

七、研究結果

(一)TRAIL引起各種人類腫瘤細胞株死亡的敏感性

我們將附著性細胞株seeding於96孔滴定盤(96well plate)，10⁴個細胞/well，分別加入五種不同濃度的TRAIL及一個對照組，重複四組。放置24小時後以1×PBS洗去未附著的細胞〔附著性的細胞於死亡後會失去其附著能力而懸浮〕，然後以1% glutaraldehyde固定，並以結晶紫〔Crystal Violet〕染色後，以ddH2O洗去多餘未被細胞吸附的染劑並陰乾，再以33%

acetic acid溶出結晶紫讀取OD550分析。懸浮性細胞以1呔⁵個/ml的濃度seeding 於6well flask中，每well加1ml。並依序加入不同量的重組蛋白TRAIL，設有一組控制組不加TRAIL，培養24小時後以PI染色，並以FACscan記錄細胞凋亡的比率：

人類子宮頸癌細胞株Hela對於重組蛋白TRAIL有明顯的敏感性，在濃度93.75ng/ml時便有42.6%的死亡率，而隨著濃度等比增加，其死亡率稍稍上升，但差異並不大，顯示93.75ng/ml的濃度已能造成相當的死亡比率，TRAIL濃度的增加沒有顯著的效果。

肝癌腫瘤細胞株HA22T，其對於TRAIL的敏感度頗高，於濃度93.75ng/ml時效果不甚明顯，而濃度增加至187.5ng/ml時，細胞凋亡比率高達81%，再以等比級數增加TRAIL濃度則未有明顯差異。可見只要重組蛋白TRAIL達到187.5ng/ml就可對於HA22T產生很好的效果。

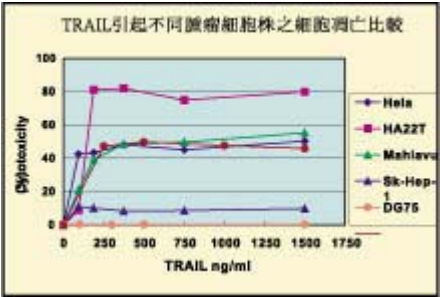
肝癌腫瘤細胞株Mahlavu，其對TRAIL的敏感度很高，且隨著重組蛋白TRAIL濃度的增加，細胞的死亡比率也跟著提高，在濃度到達1500ng/ml時可有55.3%的死亡率。

肝癌腫瘤細胞株Sk-Hep-1，TRAIL對於此細胞所導致的細胞凋亡低於20%，隨著濃度的增加並沒有增高其死亡比率，此種腫瘤細胞株對於TRAIL並沒有敏感性。

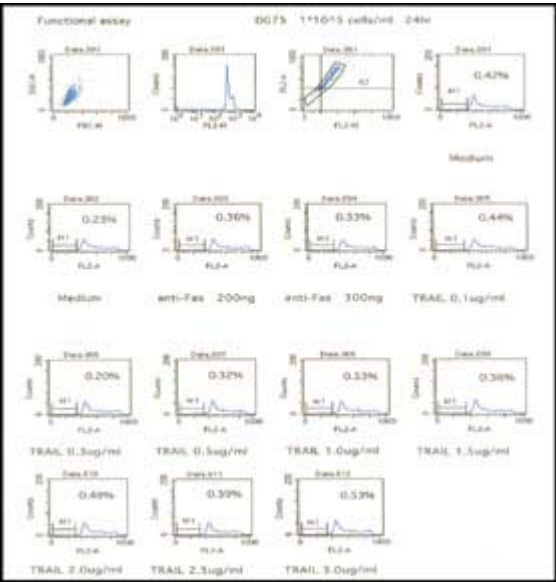
人類B淋巴瘤細胞株DG75對於TRAIL幾乎沒有反應，無論TRAIL濃度多少，其細胞凋亡比率始終低於1%，可見DG75對於TRAIL具有抗性。(見圖三)

人類T淋巴瘤細胞株Jurkat對於TRAIL有不錯的敏感性，因此在重組蛋白TRAIL的生物功能測定中是作為標準細胞。當TRAIL達到250ng/ml時，便可導致47.43%的死亡率，而隨著TRAIL濃度的增加，其死亡比率始終在45%~50%之間，並無明顯變化。(見圖四)

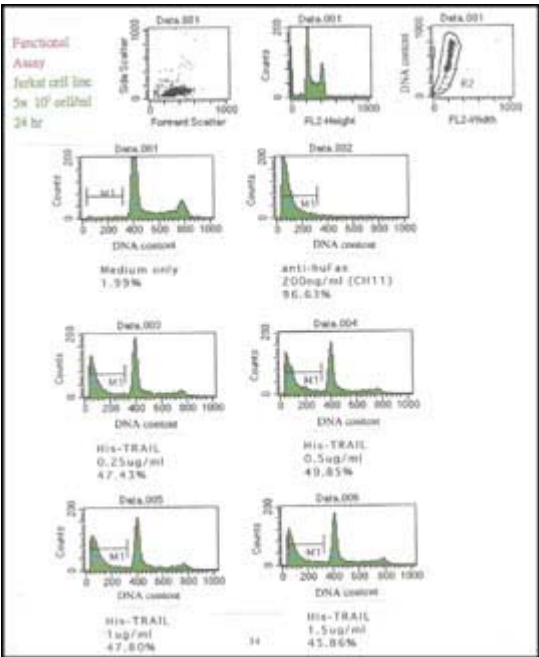
TRAIL對於各種腫瘤細胞株所造成的細胞凋亡比較，列在【圖二】之中，可見到各種不同人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度也有很大差異。而同樣是肝癌細胞株的HA22T、Mahlavu及Sk-Hep-1對於TRAIL分別表現出非常敏感、中度敏感及不敏感的情形。



【圖二】TRAIL引起不同人類腫瘤細胞株之細胞凋亡比較



【圖三】由流式細胞儀測試人類B淋巴瘤細胞株DG75之凋亡比率
(flow cytometric analysis of DNA content)

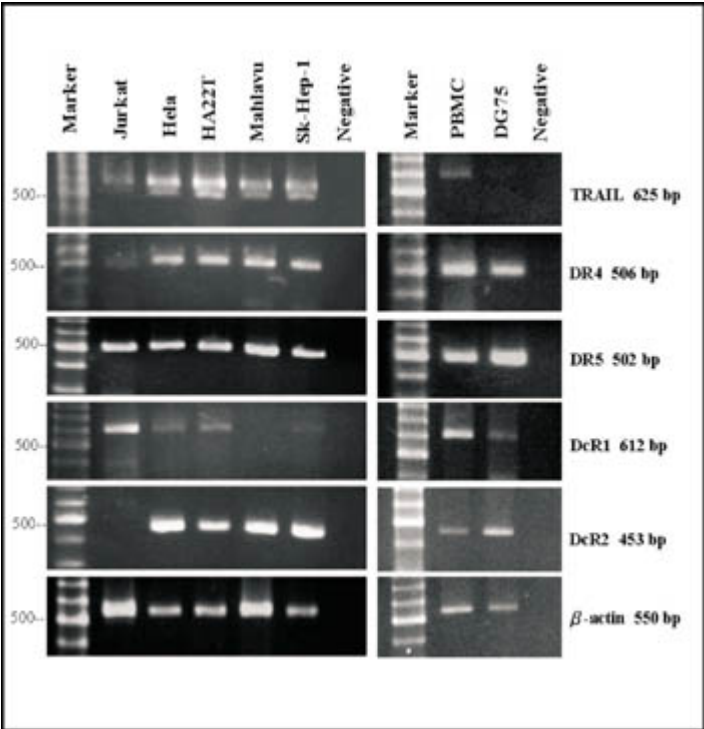


【圖四】由流式細胞儀測試人類T淋巴瘤細胞株Jurkat之凋亡比率
(flow cytometric analysis of DNA content)

(二)以RT-PCR方式定性分析各種腫瘤細胞株中TRAIL及TRAIL受體的表現情形

TRAIL可以引起許多人類腫瘤細胞株的細胞凋亡，而各種不同的人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度各不相同，此種現象可能與decoy receptor假說有關，爲了要進一步研究各種人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感性是否與其受體表現的不同有關，我們將細胞株以RT-PCR的方式測試其TRAIL及各種TRAIL-R的表現。我們將各種人類腫瘤細胞株培養於medium中，在其生長旺盛時取細胞至少1x10⁶個以TRIzol抽取細胞的RNA，取5µg的RNA以superscript II將RNA反轉錄成cDNA後進行PCR的分析（見圖五）。

PBMC（Peripheral Blood Mononuclear Cell）爲人類正常周邊血液單核細胞，在此和腫瘤細胞株作爲比較；Jurkat是人類T淋巴瘤細胞株，對於TRAIL具有頗高的敏感性，因此在重組蛋白TRAIL的生物功能測定中是作爲標準細胞，所以將其加入實驗中以作爲比較； β -actin爲一種細胞骨架的組成蛋白，在此作爲內因性的控制組(internal control)，以確認RT-PCR的結果以及控制所使用cDNA的量爲一致的；Negative control以不加入cDNA的實驗用以確認primer未受到污染。



【圖五】以RT-PCR方式定性分析人類腫瘤細胞株中TRAIL及TRAIL受體的表現

在【圖五】中，我們發現這五種細胞株大部分都有TRAIL mRNA的表現，其中DG75並無表現、Jurkat的表現量較少、而HA22T的表現量較高；在DR4(TRAIL receptor 1)的表現中，Jurkat的表現量很少，而其餘六個細胞株表現量也不是很強；而這五種人腫瘤細胞株都很明顯的表現出DR5(TRAIL receptor 2)；在DcR1(TRAIL receptor 3)方面，唯Jurkat細胞株及人類正常的PBMC表現稍明顯，而HeLa、HA22T、SK-Hep-1及DG75的表現都很不明顯，Mahlavu細胞株則未偵測到；DcR2 (TRAIL receptor 4)除了Jurkat偵測不到，其餘四個細胞株都有明顯的表現。

八、討論及應用

(一)腫瘤細胞株對His-TRAIL有不同的敏感度

各種不同的腫瘤細胞株在基因、型態上都有所不同，對於重組蛋白TRAIL的敏感度亦有所不同，顯示出各種腫瘤細胞之間的差異性，而這些對於TRAIL敏感性不同的差異是否也導致臨床上各種人體腫瘤表現上的差異，則仍需更進一步的探討。若要應用於治療癌症則必須考慮到不同腫瘤之間的差異性。這些差異性可能來自於：1.組織來源之差異。2.細胞特性上之

差異。由同樣來自肝癌細胞株之間可表現出完全不同之敏感性，顯示著細胞特性上之差異可能強烈影響著對於TRAIL引起死亡敏感性的不同，而這些細胞特性上的差異很可能與TRAIL receptor表現的不同有關。

(二)TRAIL及TRAIL-R在腫瘤細胞株中的表現

爲了要瞭解各種腫瘤細胞株對於TRAIL敏感性的不同是否由於TRAIL受體表現量的不同，我們也分別以RT-PCR方法測了TRAIL的四種受體在各種腫瘤細胞株上表現的情形。

實驗中的七種人類腫瘤細胞株在TRAIL及TRAIL-R的表現上十分相似，除了Jurkat沒有表現DcR2以及在DR4的表現量很少、DG75未表現TRAIL以外，其餘細胞株都可看到TRAIL、DR4、DR5以及DcR2的表現；而在DcR1的表現方面，Jurkat細胞株和人類正常PBMC的表現較明顯，而Hela、HA22T、Sk-Hep-1及DG75則有很弱的表現，在實驗過程中發現DcR1的表現在PCR反應條件爲「95 /5分鐘一個循環；95 /30秒、54 /30秒、72 /90秒，35個循環；72 /10分鐘，1個循環」時較容易被偵測出，而原先的反應條件「95 /5分鐘一個循環；95 /1分鐘、55 /1分鐘、72 /1分鐘，30個循環；72 /10分鐘，1個循環」則偵測出DcR1的機會較小，可能是由於DcR1的引子雜交(hybridization of primers)條件在54 時較佳。在國外發表的文獻中，並未偵測出Jurkat細胞株有DcR1的表現，且表示幾乎所有腫瘤細胞株皆不表現DcR1，與前述的實驗結果不一致，可能是因爲細胞株在不同環境下培養過久，導致細胞株與原先的狀況不同，或是反應條件的不同所致，仍待進一步的確認。

我們發現不同腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度和其TRAIL及TRAIL受體的表現並無明顯關聯，因此，TRAIL受體的表現似乎並不能完全解釋它們對於TRAIL敏感性的差異，也就是說，由我們結果看來，似乎無法完全支持原先在生體外細胞株實驗所推測的引誘者受體(decoy receptor)假說。而TRAIL導致細胞凋亡在不同細胞株之間的差異之原因，可能與細胞內其他調控機轉有關，仍有待進一步的研究。

(三)人類正常細胞與腫瘤細胞株之比較

在實驗結果中，我們發現TRAIL對於許多腫瘤細胞株可導致細胞迅速凋亡，而對於人類正常週邊血液淋巴球卻沒有此現象，這就是爲什麼重組蛋白TRAIL在癌症的治療上這麼具有潛力而受人矚目，然而目前仍然無法有力的解釋此種差異的原因，在我們的實驗結果中，人類週邊血液淋巴球PBMC表現了較爲明顯的DcR1，而腫瘤細胞株則大多表現的非常微量，然而在腫瘤細胞株當中，細胞凋亡比率的高低和其DcR1的表現並無明顯的關聯，且同樣爲Decoy receptor的DcR2則廣泛明顯的表現在正常與腫瘤細胞中，實在無法圓滿解釋Decoy receptor假說。

同樣爲人類淋巴癌的Jurkat與DG75，同樣肝癌細胞株的HA22T、Mahlavu及Sk-Hep-1，無論在細胞凋亡的比率上，或是TRAIL及TRAIL受體的表現，皆無一定規則可循，也無明顯的相關性，因此在癌症治療的應用上仍存在著許許多多的變因，值得進一步研究。

(四)影響細胞對於TRAIL導致細胞凋亡有不同敏感度的可能原因

我們經由RT-PCR得到的結果中，不同腫瘤細胞株對TRAIL的敏感度似乎不符合decoy receptor假說的情形，因此除了decoy receptor的出現以外，仍有其它參與的因子要考慮，如細胞表面上受體或配體的脫離(shedding)可能就是一個相當重要的可能性。在TNF及TNFR超級家族中(以人類爲例)除了一些在生體內原本就是可溶性的分子外(如淋巴毒素LT α ，存在一種細胞膜上的受體或是配體脫離細胞膜由膜蛋白變成可溶性蛋白的現象，這個過程中是由膜上的金屬蛋白酶 metalloproteinase執行，CD40L、TNF或FasL都有類似的情形。在這種現象中受體的脫離可以阻斷配體的生物功能，而配體由膜蛋白變成可溶性蛋白則其生物功能會有所改變。以Fas及FasL爲例，脫離的可溶性Fas可以阻斷FasL引起的細胞凋亡作用，脫離的可溶性FasL則其引起細胞凋亡的能力降低。這些結果可能表示TNF和FasL在生理上是藉由細胞與細胞之間局部的作用而shedding的目的可能是要減弱此過程。有研究指出人類的TRAIL分子也具有可溶性蛋白的存在，而此可溶性蛋白存在的真正意義至今亦尚未明瞭。

另外，由最近的報導已知B型肝炎病毒(hepatitis B virus)帶有的蛋白質HBx是很強的Caspase 3抑制劑(inhibitor)，存在此蛋白的肝癌腫瘤細胞株對多種胞外刺激如缺乏生長激素、TNF α 或anti-Fas皆具有抵抗力(雖然此蛋白質的功能仍有爭論)，所以肝炎病毒中必定存在有某種因子可以調控TRAIL傳遞的死亡訊息。而這些關係仍有待進一步的研究來加以釐清。

除了在受體本身的調節之外，細胞內的訊息分子顯然有參與著對於TRAIL所引起細胞凋亡訊息的調控。有相當多的研究指出，病毒的蛋白質具有調節細胞凋亡作用的進行，如Baculovirus所帶有的p35蛋白質，cowpox病毒帶有的Crm A蛋白質都可以阻斷細胞凋亡的發生。另外疱疹病毒(herpesvirus-8)及molluscipoxvirus所帶有的蛋白質v-FLIP據報導也可以阻斷TRAIL-R媒介的細胞凋亡作用。

TRAIL導致細胞凋亡的途徑仍是個迷，而造成不同細胞有不同敏感度的原因更是個難解之題，這人體偉大的奧妙正抽絲剝繭中，有朝一日必能一窺其神聖而嘆爲觀止的一面。

(五)人類腫瘤細胞株與腫瘤組織之相關性

實驗所用的腫瘤細胞株雖是取自人體，然而經長時間培養成細胞株後，與人體腫瘤細胞之間可能有許多差異。TRAIL能對實驗用的腫瘤細胞株引起細胞凋亡，此種情形是否與人體腫瘤組織的敏感度相一致仍待未來藉由在人體中所得腫瘤組織表現TRAIL情形的研究進一步探討。由於這些實驗的結果可作爲日後探討各種不同人體腫瘤組織對於細胞凋亡敏感度研究的初期工作，也可提供選擇出何種腫瘤組織可能以TRAIL作爲腫瘤治療的參考。

九、結論

重組蛋白TRAIL確實具有造成人類腫瘤細胞株凋亡的能力，而由於不同人類腫瘤細胞株間的差異，TRAIL對於不同細胞株所導致的細胞凋亡比率也各不相同。在進一步以RT-PCR研究其TRAIL及TRAIL受體表現的結果中，發現不同人類腫瘤細胞株對於TRAIL的敏感度和其TRAIL及TRAIL受體的表現並無明顯關聯，似乎無法完全支持原先生體外細胞株實驗所推測的引誘者受體假說。而TRAIL導致細胞凋亡在不同細胞株之間的差異之原因，似乎有更複雜的細胞分子機制來調控，仍有待進一步的研究。

十、參考資料及其它

1.Avi Ashkenazi and Vishva M. Dixit 1998. Death Receptors: Signaling and Modulation. Science 281:1305

2.Douglas R. Green and John C. Reed. 1998. Mitochondria and Apoptosis. Science 281:1309

3.Griffith, T.S., and D.H. Lynch. 1998. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. Curr Opin Immunol 10:559.

4.Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell 88:355.

5.Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. J Biol Chem 271:12687.

6.Pan, G., O.R. K, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V.M. Dixit. 1997. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. Science

7.Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V.M. Dixit. 1997. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. Science 277:815.

8.Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. G-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors [see comments]. Science 277:818.

9.Degli-Esposti, M. 1999. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. J Leukoc Biol 65:535.

10.Griffith, T.S., C.T. Rauch, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, D.H. Lynch, C.A. Smith, R.G. Goodwin, and M.Z. Kubin. 1999. Function

11.Griffith, T.S., W.A. Chin, G.C. Jackson, D.H. Lynch, and M.Z. Kubin. 1998. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. J Immunol 161:2833.

評語

細胞凋亡(Apoptosis)是一個非常複雜的問題，其過程包括細胞外之訊號(如本文探討之TRAIL)以及胞內之訊號傳遞。作者在短短一年多的時間，已完成6種細胞株對TRAIL反應的探討，同時對其反應機制已開始有進一步的探討。在面談的過程中，最難得的是作者對問題瞭解的程度，故是以除予以表揚之外，特別鼓勵作者繼續研究並參加明年國際科展。

回到目錄頁../Index.htm