

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.001  
文章编号: 1005-8982(2017)30-0001-07

基础研究·论著

## DcR3 基因对胰腺癌裸鼠移植瘤化疗敏感性的影响\*

肖华平<sup>1</sup>, 谢辉<sup>1</sup>, 罗春阳<sup>1</sup>, 李庆<sup>1</sup>, 方玉江<sup>2</sup>

(1. 湘南学院附属医院肿瘤防治中心, 湖南 郴州 423000; 2. 美国密苏里大学医学院  
Ellis Fischel 肿瘤中心, 密苏里州 哥伦比亚 65212)

**摘要:目的** 探讨 RNA 干扰沉默诱骗受体-3(DcR3)对人胰腺癌细胞裸鼠移植瘤化疗敏感性的影响及其可能机制。**方法** 取对数生长期的 AsPC-1 细胞  $1 \times 10^6$  个/ml, 接种于 5 周龄裸鼠右后肢腹股沟, 当皮下肿瘤直径为 8 mm 左右, 随机分为 4 组( $n=10$ ): 对照组、化疗组、阴性质粒 + 化疗组、DcR3 siRNA + 化疗组。观察 DcR3 siRNA 联合化疗药物对人胰腺癌 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤的治疗效果。应用 ELISA 和 Western blot 检测 DcR3 蛋白的变化; TUNEL 分析肿瘤细胞凋亡; Western blot 和 RT-PCR 检测 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 等凋亡因子的表达。**结果** 化疗组、阴性质粒 + 化疗及 DcR3 siRNA + 化疗组均可抑制移植瘤的生长, 与对照组比较, 3 组抑瘤率平均值分别为  $(35.87 \pm 4.58)\%$ 、 $(40.68 \pm 4.16)\%$  和  $(90.25 \pm 2.53)\%$ , 4 组间差异有统计学意义( $F=47.736, P=0.000$ ), DcR3 siRNA + 化疗组抑瘤率较化疗组增加; 对照组、化疗组、阴性质粒 + 化疗以及 DcR3 siRNA + 化疗组移植瘤重量平均值分别为  $(0.95 \pm 0.03)$ 、 $(0.63 \pm 0.04)$ 、 $(0.67 \pm 0.02)$  和  $(0.17 \pm 0.06)$  g, 4 组间差异有统计学意义( $F=85.531, P=0.000$ ), DcR3 siRNA + 化疗组瘤重较化疗组减轻; 对照组、化疗组、阴性质粒 + 化疗组、DcR3 siRNA + 化疗组凋亡率平均值分别为  $(6.3 \pm 2.21)\%$ 、 $(14.8 \pm 2.65)\%$ 、 $(14.5 \pm 3.06)\%$  和  $(54.6 \pm 3.23)\%$ , 4 组间差异有统计学意义( $F=104.225, P=0.000$ ), DcR3 siRNA + 化疗组凋亡率较化疗组增加; DcR3 siRNA + 化疗组的 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达较其他各组上升( $P=0.000$ )。**结论** 沉默 DcR3 可激活 FasL/Caspase 凋亡途径, 促进细胞凋亡, 增加胰腺癌细胞移植瘤对化疗的敏感性。

**关键词:** 胰腺癌; 诱骗受体-3; RNA 干扰; 凋亡; 化疗敏感性

**中图分类号:** R735.9

**文献标识码:** A

## Effect of Decoy receptor 3 on chemosensitivity in nude mice model of pancreatic cancer\*

Hua-ping Xiao<sup>1</sup>, Hui Xie<sup>1</sup>, Chun-yang Luo<sup>1</sup>, Qing Li<sup>1</sup>, Yu-jiang Fang<sup>2</sup>

(1. Cancer Center, the Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2. Ellis Fischel Cancer Center, University of Missouri School of Medicine, Columbia, Missouri 65212, USA)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Decoy receptor 3 (DcR3) on chemosensitivity of human pancreatic cancer cells and potential mechanisms. **Methods** Pancreatic cancer AsPC-1 cells in log-growth phase ( $1 \times 10^6$  cells) were subcutaneously injected in nude mice. Expression of DcR3 was blocked through small interfering ribonucleic acid (siRNA). Seven days post injection, tumor-bearing mice were then randomly divided into 4 groups ( $n=10$  group): control group, chemotherapy group, sham siRNA + chemotherapy group and DcR3 siRNA + chemotherapy. Xenograft of human pancreatic cancer AsPC-1 cells was measured among the groups. Expression level of DcR3 was determined by ELISA and Western blot. Apoptosis rate was detected by TUNEL analysis. Expression levels of FasL protein, Caspase-8, and Caspase-3 were measured by

收稿日期: 2017-05-04

\* 基金项目: 湖南省自然科学基金(No: 14JJ3136); 郴州市科技局科研基金(No: CZ2013096)

[通信作者] 李庆, E-mail: liqing0685@163.com

Western blot and RT-PCR. **Results** Tumor weight (gram) in chemotherapy group, sham siRNA + chemotherapy group and DcR3 siRNA + chemotherapy group was significantly decreased when compared with control group ( $0.63 \pm 0.04$  vs  $0.95 \pm 0.03$ ,  $P = 0.000$ ,  $0.67 \pm 0.02$  vs  $0.95 \pm 0.03$ ,  $P = 0.000$ ,  $0.17 \pm 0.06$  vs  $0.95 \pm 0.03$ ,  $P = 0.000$ ), respectively. Silencing of DcR3 expression dramatically reduced weight of tumor when compared with sham siRNA + chemotherapy group ( $0.17 \pm 0.06$  vs  $0.67 \pm 0.02$  vs  $0.95 \pm 0.03$ ,  $P = 0.000$ ). Inhibitory rate of tumor growth in chemotherapy group, sham siRNA + chemotherapy group and DcR3 siRNA + chemotherapy group increased when compared with control group [(35.87 ± 4.58) % vs (0.00 ± 0.00) %,  $P = 0.000$ , (40.68 ± 4.16) % vs (0.00 ± 0.00) %,  $P = 0.000$ , (90.25 ± 2.53) % vs (0.00 ± 0.00) %,  $P = 0.000$ ], respectively. Silencing of DcR3 expression dramatically increased inhibitory rate of tumor growth when compared with sham siRNA + chemotherapy group [(90.25 ± 2.53) % vs (0.67 ± 0.02) % vs (40.68 ± 4.16) %,  $P = 0.000$ ]. Apoptosis rate in chemotherapy group, sham siRNA + chemotherapy group and DcR3 siRNA + chemotherapy group were significantly increased when compared with control group [(14.8 ± 2.65) % vs (6.3 ± 2.21) %,  $P = 0.000$ , (14.5 ± 3.06) % vs (6.3 ± 2.21) %,  $P = 0.000$ , (54.6 ± 3.23) % vs (6.3 ± 2.21) %,  $P = 0.000$ ], respectively. Silencing of DcR3 expression dramatically reduced weight of tumor when compared with sham siRNA + chemotherapy group [(54.6 ± 3.23) % vs (14.5 ± 3.06) %,  $P = 0.000$ ]. The expression levels of FasL, Caspase-8, and Caspase-3 in DcR3 siRNA + chemotherapy group were downregulated when compared with the remaining 3 groups ( $P = 0.000$ ). **Conclusion** Silencing of DcR3 gene can increase the chemosensitivity of human pancreatic cancer by promoting FasL/Caspase-mediated cells apoptosis.

**Keywords:** pancreatic cancer; DcR3; small interfering ribonucleic acid; apoptosis; chemosensitivity

胰腺癌(pancreatic cancer, PC)由于具有症状隐匿、侵袭性强等特点,因此明确诊断较晚,手术切除率低及术后存活率低,化疗是其重要的治疗方法,然而至今单纯的化疗也不能延长患者的存活率。更为遗憾的是,至今还未找到在胰腺癌对化疗药物耐受机制中起重要作用的耐受基因。因此,研究如何增强胰腺癌对化疗的敏感性以及提高胰腺癌治疗效果有重要的临床意义。

本实验运用 RNA 干扰沉默诱骗受体-3(decoy receptor 3, DcR3), 观察 DcR3siRNA 对人胰腺癌 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤化疗增敏的效果,并探讨其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 细胞系及培养** 人胰腺癌细胞株 AsPC-1(美国密苏里大学 Ellis Fischel cancer center Dr.Fang 惠赠)培养条件为:含 10%小牛血清 PRMI 1640 培养基,恒温 37℃,5%二氧化碳 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.1.2 DcR3 siRNA 质粒的构建** 应用筛选 siRNA 的软件,选取 DcR3 靶序列:5'-CGCUGCAGCCUCUUGAUGGAGAUGUCC-3', 由上海生物工程股份有限公司合成 DcR3 特异性 siRNA 序列:正向:5'-ACACCCACCUACCCUGGCDTDT-3';反向:5'-GCCAGGGUAGGUGGGUGUDTDT-3'。同时将上述寡核苷酸序列打乱重新组合,设计 5'-GACACACCACUCCC

CUGCDTDT-3' 和 5'-GGCGACGGGUGUGAGGUGUDDTDT-3' 作为阴性对照组。

**1.1.3 实验试剂** ELISA 检测试剂盒(购自美国 Bio-Techne 公司), FasL、Caspase-8、Caspase-3、 $\beta$ -action 和 DcR3 抗体(购自美国 Cell Signaling Technology 公司), Alkaline phosphatase 结合抗-兔/鼠 IgG 二抗(购自美国 Sigma 公司),核蛋白提取试剂盒(购自美国 Pierce 公司), Trizol(购自美国 Gibco 公司), 逆转录 RCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品), TUNEL 凋亡检测试剂盒(购自美国 Promega 公司)。

**1.1.4 实验动物** 4~6 周龄 BALB/c nu/nu 雄性裸小鼠,体重 18~22 g,共 40 只,均购自中南大学动物学部[动物合格证号:SCXK(湘)2015-0006]。

### 1.2 方法

**1.2.1 人胰腺癌裸鼠移植瘤动物模型的复制及动物实验** 将 AsPC-1 细胞按  $1 \times 10^6$  个/ml 每只分别接种于 5 周龄裸鼠右后肢腹股沟,以瘤体直径 4 mm 为成瘤标准,当裸鼠皮下肿瘤平均长径为 8~10 mm。将移植瘤裸鼠随机分为 4 组( $n=10$ )。第 1 组对照组,第 8 天后裸鼠皮下瘤内多点注射剂量 100  $\mu$ l 的生理盐水,1 次/2 d,共 7 次;第 2 组化疗组,8 d 后腹腔注射吉西他滨 100 mg/kg,1 次/2 d,共 7 次;第 3 组阴性对照 + 化疗组,8 d 后腹腔注射吉西他滨 100 mg/kg,同时裸鼠皮下瘤内多点注射 0.5 ml 按 10  $\mu$ g/kg 的阴性质粒和脂质体配成的复合物,1 次/2 d,共 7 次;

第 4 组 DcR3 siRNA+ 化疗组,即 8 d 后裸鼠皮下瘤内多点注射 0.5 ml 按 10  $\mu$ g/kg 的重组质粒 DcR3 siRNA 和脂质体配成的复合物,并予腹腔注射吉西他滨 100 mg/kg,1 次/2 d,共 7 次。开始治疗后,每间隔 4 天测量并计算肿瘤体积,以每次肿瘤体积的均数绘制生长曲线,肿瘤体积的计算公式为  $VT(mm^3)=ab^2/2$ , a 和 b 分别为长径和短径。荷瘤 28 d 后脱颈处死裸鼠,剥离肿瘤,称重。并计算抑瘤率(inhibitory rate, IR),抑瘤率(IR)(%)=[(VA-VB)/VA]  $\times$  100%, A 和 B 分别为对照组和实验组。

### 1.2.2 ELISA 法检测实验各组移植瘤中 DcR3 的蛋白量

应用 Pierce 公司试剂盒提取细胞蛋白,进行 ELISA 实验。首先用浓度 100  $\mu$ l/孔的抗 DcR3 mAb 包被 ELISA 板,置 37 $^{\circ}$ C,4 h;再用 5%小牛血清置 37 $^{\circ}$ C 封闭 40 min,封闭时将封闭液加满各反应孔,封闭结束后用洗涤液满孔洗涤 3 遍,每遍 3 min;将稀释好 DcR3 纯标品和待测样品加入酶标反应孔中,每样品至少加双孔,每孔 100  $\mu$ l,置于 37 $^{\circ}$ C,40~60 min,用洗涤液满孔洗涤 3 遍,每遍 3 min;最后将生物素标记的抗 DcR3 抗体加入板中,室温孵育 1 h,每孔加入底物 TMB 100  $\mu$ l 的置 37 $^{\circ}$ C 避光放置 10 min,加入终止液显色,A492 下读数。

### 1.2.3 TUNEL 检测实验各组肿瘤细胞的凋亡

将肿瘤组织连续切片,置 45~50 $^{\circ}$ C 孵育箱内 48 h,用 4%多聚甲醛固定细胞 40 min 后 PBS 冲洗 1 次。加入含 0.1% Triton X-100 的 PBS,冰浴孵育 3 min,PBS 冲洗 1 次。然后用 100  $\mu$ l 20  $\mu$ g/ml Proteinase K 溶液在室温下处理 20 min,增加细胞膜的通透性后,用 PBS 冲洗 3 次;制备 50  $\mu$ l 的 TUNEL 反应混合液:用 2  $\mu$ l TdT 酶 +48  $\mu$ l 生物素标记的 Biotin-dUPT。加 50  $\mu$ l TUNEL 反应混合液于玻片上,在暗湿盒中反应 37 $^{\circ}$ C  $\times$  1 h。PBS 冲洗 3 次,用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。使用的激光波长范围为 450 nm,发射波长范围为 515 nm(绿色荧光)。阳性细胞的细胞核发绿光,观察 10 个 200 倍镜下视野,每个视野计数 200 个细胞,计数其中阳性细胞数,取其平均数为凋亡指数。

### 1.2.4 Western blot 检测实验各组 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 的蛋白表达

肿瘤组织加入细胞裂解 RIPA 缓冲液裂解细胞,提取总蛋白。测定浓度后各取 100  $\mu$ g 蛋白样本进行电泳,通过电转印法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶上转移至硝酸纤维素滤膜(PVDF)上,5%脱脂奶常温封闭 1 h,加入一抗(FasL、

$\beta$ -action :1 : 1 000;Caspase-8 和 Caspase-3 :1 : 500),于 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜后加入相应的二抗(1 : 1 000)常温孵育 1 h,最后 NBT/BCIP 显色,相对蛋白的表达量 = 目的蛋白灰度值 /  $\beta$ -action 灰度值。

### 1.2.5 RT-PCR 检测实验各组 DcR3、FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 的基因表达

将液氮冻存的肿瘤组织放入 EP 管中,用 Trizol 提取各组细胞的总 RNA,各取 1  $\mu$ g RNA 逆转录为 cDNA,取 2  $\mu$ l cDNA 以 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 的引物(FasL 引物:正向 5'-GGTTGCCTTGGTAGGATTGG-3',反向 5'-CCTTGAGTTGGACTTGCCTGTT-3',产物长度 196 bp;Caspase-8 引物:正向 5'-TACTACCGAAACTTGGACC-3',反向 5'-GTGAAAGTAGGTTGTGGC-3',产物长度为 515 bp;Caspase-3 引物:正向 5'-ATGGAGAACAATAAACCT-3',反向 5'-CTAGTGATAAAAAGTAGAGTTC-3'产物长度为 834 bp)以及 GAPDH 的引物(正向 5'-TGACTTCAACAGCGACACCCAC-3',反向 5'-AACTGTGAGGAGGGGAGATTC-3',产物长度为 277 bp)进行 PCR 扩增,分别检测各组中的 FasL、Caspase-8、Caspase-3 和内参 GAPDH 的 mRNA 表达水平。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 45 s;60 $^{\circ}$ C (FasL)、50.6 $^{\circ}$ C (Caspase-8)、50 $^{\circ}$ C (Caspase-3) 退火 60 s,进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。最后取扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,产物条带用凝胶成像系统照相并进行灰度分析,目的片段的相对表达量 = 目的基因的灰度值 / GAPDH 的灰度值。

### 1.3 统计学方法

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验,两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

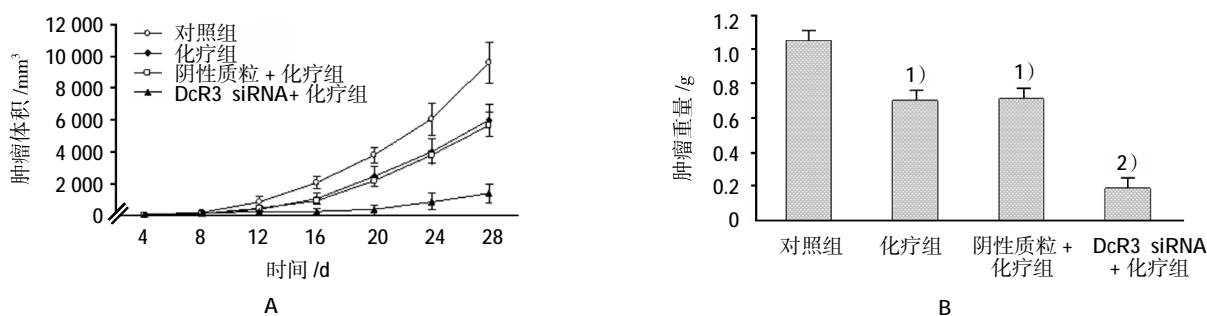
### 2.1 胰腺癌 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤的生长以及抑制率

根据所测得的移植瘤长短径,计算出移植瘤的体积,从而得到 4 组移植瘤生长曲线,结果显示,与对照组比较,化疗组、阴性质粒 + 化疗组、DcR3 siRNA+ 化疗组都能够抑制肿瘤生长,3 种治疗方法的抑瘤率平均值分别为 (35.87  $\pm$  4.58)%、(40.68  $\pm$  4.16)%和 (90.25  $\pm$  2.53)%,4 组间差异有统计学意义( $F = 47.736, P = 0.000$ ),DcR3 siRNA+ 化疗组抑瘤

率较化疗组增加(见图 1A)。

DcR3 siRNA+ 化疗组与化疗组治疗后第 4、8、12、16 及 20 天的移植瘤体积比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间的肿瘤体积有差异( $F=64.631, P=0.000$ );②DcR3 siRNA+ 化疗组与化

疗组的肿瘤体积有差异( $F=81.632, P=0.000$ ),与化疗组比较,DcR3 siRNA+ 化疗组肿瘤体积较小,相对抑制肿瘤效果较好;③DcR3 siRNA+ 化疗组与化疗组的肿瘤体积变化趋势有差异( $F=23.585, P=0.016$ )。见附表和图 1A。



A: 移植瘤体积变化图;B: 移植瘤重量变化图。1)与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与化疗组或对照组比较,  $P < 0.05$

图 1 DcR3 siRNA 联合化疗对 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用

附表 治疗后各组荷瘤小鼠的平均肿瘤体积的比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 4 天	第 8 天	第 12 天	第 16 天	第 20 天
对照组	926.5 ± 285.3	2 256.5 ± 358.4	4 031.5 ± 506.8	6 174.5 ± 912.6	9 593.8 ± 986.9
化疗组	508.4 ± 146.2	1 305.7 ± 279.5	2 570.5 ± 612.3	4 185.3 ± 835.6	5 894.5 ± 715.2
阴性质粒 + 化疗组	485.5 ± 137.8	980.4 ± 215.3	2 265.8 ± 346.1	3 859.4 ± 868.2	5 269.7 ± 654.4
DcR3 siRNA+ 化疗组	243.7 ± 48.3	316.4 ± 115.2	425.8 ± 215.5	935.7 ± 479.5	1 375.8 ± 132.1

处死裸鼠后对照组、化疗组、阴性质粒 + 化疗组以及 DcR3 siRNA+ 化疗组肿瘤重量分别为 ( $0.95 \pm 0.03$ )、( $0.63 \pm 0.04$ )、( $0.67 \pm 0.02$ )和 ( $0.17 \pm 0.06$ )g, 4 组间差异有统计学意义 ( $F=85.531, P=0.000$ ), DcR3 siRNA+ 化疗组瘤重较化疗组减轻(见图 1B)。

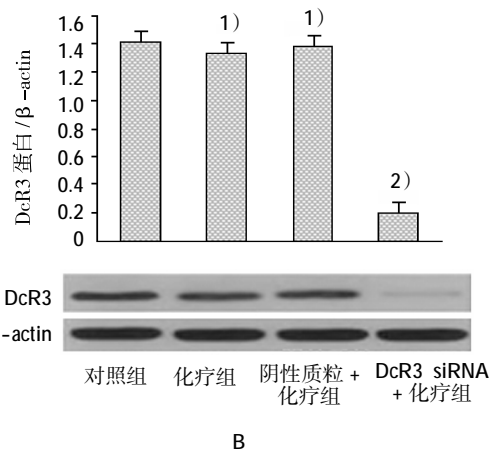
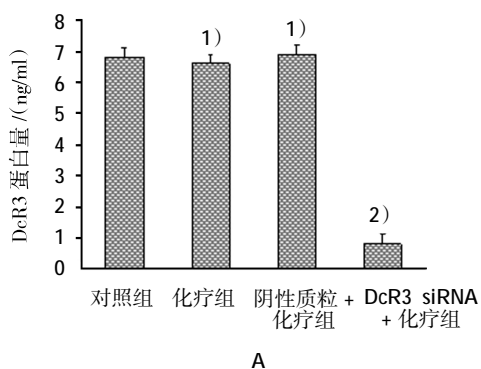
## 2.2 DcR3 在胰腺癌 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤中的表达

DcR3 siRNA+ 化疗组 DcR3 蛋白量少于其他各组,与单独化疗组比较,两者间 DcR3 的蛋白量差异有统计学意义( $F=96.478, P=0.000$ )(见图 2A);Western blot 检测各组 DcR3 蛋白的表达进一步证实,在 AsPC-1 细胞裸鼠移植瘤中注射 DcR3 siRNA 能降低

DcR3 蛋白表达(见图 2B)。

## 2.3 肿瘤细胞凋亡情况

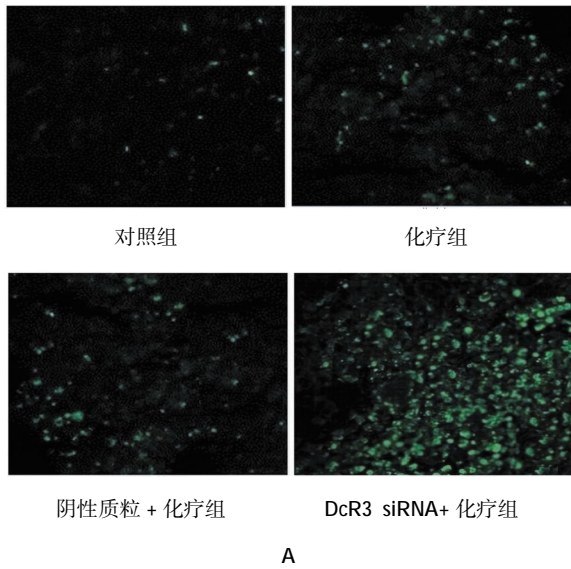
对照组、化疗组、阴性质粒 + 化疗组、DcR3 siRNA+ 化疗组凋亡率平均值分别为( $6.3 \pm 2.21$ )%、( $14.8 \pm 2.65$ )%、( $14.5 \pm 3.06$ )%和 ( $54.6 \pm 3.23$ )%, 4 组间差异有统计学意义( $F=104.225, P=0.000$ ),DcR3 siRNA+ 化疗组凋亡率较化疗组增加(见图 3)。



A: 各组 DcR3 蛋白量的变化;B: 各组 DcR3 蛋白相对表达的变化。1)与对照组比较,  $P > 0.05$ ; 2)与化疗组或对照组比较,  $P < 0.05$

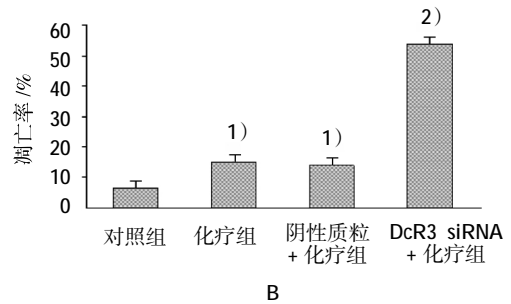
图 2 DcR3 蛋白在 AsPC-1 细胞裸鼠皮下移植瘤中的表达





### 2.4 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 凋亡因子的表达

Western blot 显示,DcR3 siRNA+ 化疗组的 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平平均值均高于其他各组,4 组间差异有统计学意义 ( $F_{FasL}=61.652, P=0.000; F_{Caspase-8}=79.378, P=0.000; F_{Caspase-3}=68.849,$

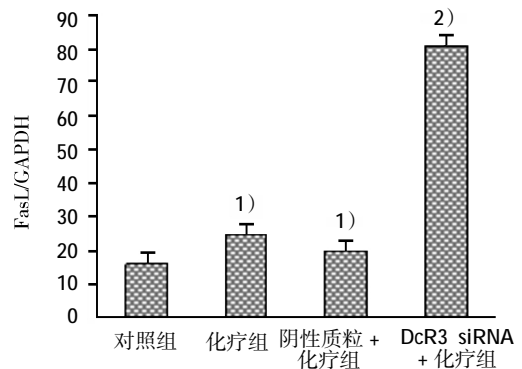
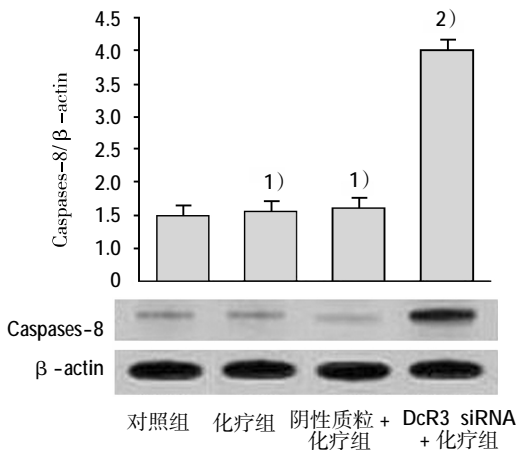
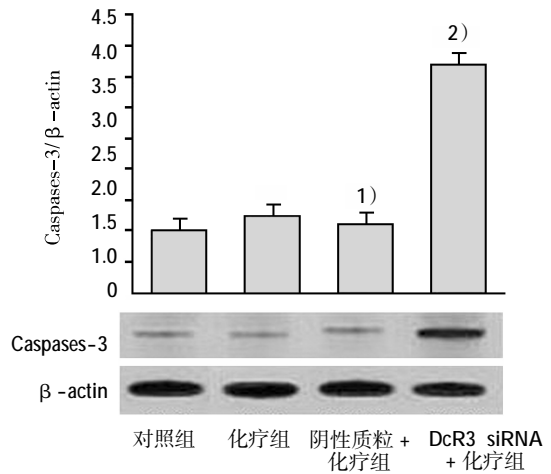
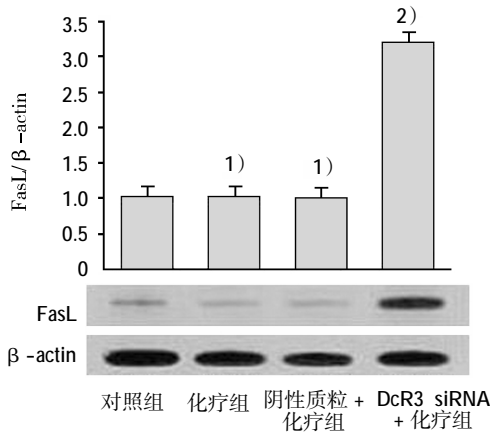


A: TUNEL 法检测各组移植瘤组织的凋亡细胞;B: 各组移植瘤组织的凋亡指数的变化;1)与对照组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与化疗组或对照组比较,  $P < 0.05$

图 3 各组移植瘤组织中肿瘤细胞凋亡变化

$P=0.000$ ), DcR3 siRNA+ 化疗组 FasL、Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平较化疗组增加(见图 4A-C)。RT-PCR 进一步证实沉默 DcR3 后可以上调 FasL、

Caspase-8 和 Caspase-3 的表达, 其上调的效应与 Western blot 结果一致(见图 4D-F)。

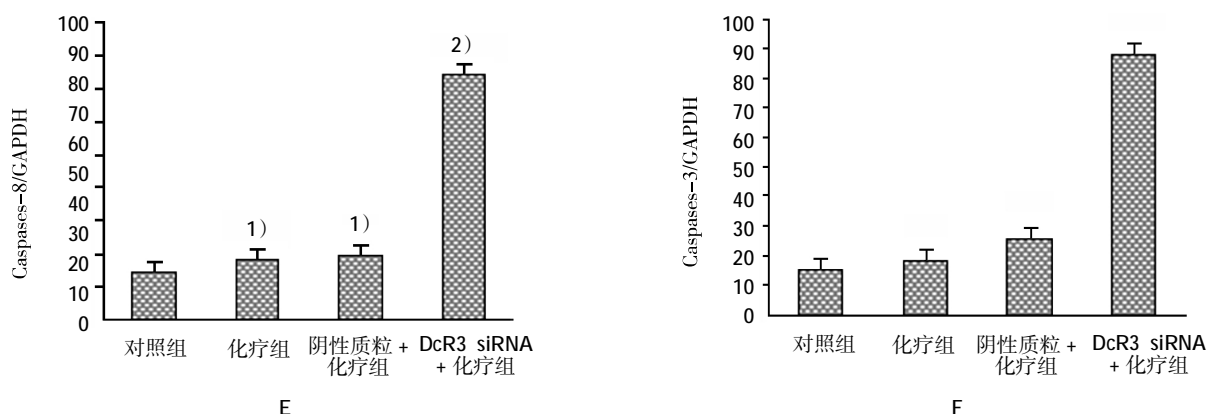


A

C

B

D



A: 各组 FasL 蛋白表达的变化; B: 各组 Caspase-8 蛋白表达的变化; C: 各组 Caspase-3 蛋白表达的变化; D、E、F: 各组移植瘤组织中 FasL、Caspase-8 及 Caspase-3 的 mRNA 表达的变化。1) 与对照组比较,  $P>0.05$ ; 2) 与化疗组或对照组比较,  $P<0.05$

图 4 FasL、Caspase-8 及 Caspase-3 在 AsPC-1 细胞裸鼠皮下移植瘤中的表达

### 3 讨论

DcR3 是 PITTI 等<sup>[1]</sup>在 1998 年发现的肿瘤坏死因子受体 (tumor necrosis factor receptor, TNFR) 超家族成员, 是一种分泌型的可溶性的蛋白分子, 在它的氨基酸序列中缺少明显的跨膜结构, 其配体包括 FasL、LIGHT 和 LT $\beta$ R。研究发现, DcR3 通过竞争性抑制 Fas 和 FasL 的结合, 以及阻断 LIGHT 和 LT $\beta$ R 及 HVEM/TR2 的相互作用, 从而阻断 FasL 和 LIGHT 介导产生的细胞凋亡, 被认为与肿瘤的发生、发展以及免疫逃逸密切相关<sup>[2-4]</sup>。ZHOU 等<sup>[5]</sup>报道 DcR3 在胰腺癌中呈高表达, 并通过竞争 FasL 与 Fas 的结合在胰腺癌耐受化疗的特性中扮演着重要的角色; CHEN 等<sup>[6]</sup>报道, DcR3 能够阻挡 FasL 诱导的抑制胰腺癌细胞生长的作用, 也提示胰腺癌细胞的 DcR3 表达高并且远高于结肠癌中 DcR3 的表达。提示胰腺癌对化疗药物耐受是否与其的 DcR3 蛋白过度表达存在着联系。因此, 大家也许能够运用基因敲除的方法减少胰腺癌细胞上 DcR3 的表达从而增加 FasL 与 Fas 的结合, 使死亡信号顺利传递以达到提高化疗药物对胰腺治疗效果的目的。

研究证明, 凋亡与肿瘤细胞的化疗敏感性有关, 诱导肿瘤细胞凋亡是放疗和化疗的主要目的之一, 凋亡指数低的细胞对化疗药物耐受性高、化疗效果差, 因此诱导肿瘤凋亡已作为提高恶性肿瘤化疗敏感性的重要方面。DcR3 是 TNFR 超家族成员, DcR3 通过与不同的凋亡配体相互作用调节细胞凋亡。LIANG 等<sup>[7]</sup>对肝癌细胞研究发现, 当沉默 DcR3 后, 可以增加 TRAIL 诱导的肿瘤细胞凋亡, 从而增加肝癌细胞的化疗敏感性; ZHANG 等<sup>[8]</sup>研究提示, 采用

siRNA 沉默胶质瘤中 DcR3 高表达, 可以抑制胶质瘤细胞的生长和增加胶质瘤细胞的凋亡。在本实验中 DcR3 siRNA+ 化疗组 FasL 的蛋白表达较其他各组上升。说明沉默 DcR3 表达后能增加 FasL 表达。TUNEL 分析结果显示, DcR3siRNA+ 化疗组的肿瘤细胞凋亡数目高于其他组。以上结果说明, 沉默 DcR3 表达后可以通过增加 FasL 与 Fas 的结合, 使死亡信号顺利传递来提高胰腺癌的化疗敏感性。

DcR3 调节细胞的凋亡是通过与 FasL 竞争性的结合而阻断凋亡信息传导来实现的<sup>[9]</sup>。FasL 凋亡信号传导与 Caspase 的激活密切相关, 本实验发现, DcR3 siRNA+ 化疗组中的 Caspases-8 和 Caspases-3 都存在上调现象。Caspases-8 是 FasL 途径凋亡通路的启动基因, 其下游就是 Caspases-3, Caspases-3 被认为是线粒体凋亡途径的最终执行者<sup>[10]</sup>。本实验结果提示, 沉默 DcR3 增加化疗诱导的细胞凋亡可能是通过激活 FasL/Caspase 途径来实现。

总之, 在体内沉默 DcR3 基因的表达能提高人胰腺癌细胞的化疗药物治疗效果。其机制可能为沉默 DcR3 基因可激活 FasL/Caspase 凋亡途径, 促进细胞凋亡所致。提示 DcR3 $\rightarrow$ FasL $\rightarrow$ Caspases 通路在人胰腺癌细胞对化疗敏感性起着至关重要的作用, 有望成为人胰腺癌细胞基因治疗新的靶点之一。

#### 参 考 文 献:

- [1] PITTI R M, MARSTERS S A, LAWRENCE D A, et al. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer[J]. Nature, 1998, 396(6712): 699-703.
- [2] XIU Z, SHEN H, TIAN Y, et al. Serum and synovial fluid lev-

- els of tumor necrosis factor-like ligand 1A and decoy receptor 3 in rheumatoid arthritis[J]. *Cytokine*, 2015, 72(2): 185-189.
- [3] LIU W, ZHAN C, CHENG H, et al. Mechanistic basis for functional promiscuity in the TNF and TNF receptor superfamilies: structure of the LIGHT: DcR3 assembly[J]. *Structure*, 2014, 22(9): 1252-1262.
- [4] ZHANG Y, LI D, ZHAO X, et al. Decoy receptor 3 suppresses FasL-induced apoptosis via ERK1/2 activation in pancreatic cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(9): 1144-1151.
- [5] ZHOU J, SONG S, LI D, et al. Decoy receptor 3 (DcR3) over-expression predicts the prognosis and pN2 in pancreatic head carcinoma[J]. *World J Surg Oncol*, 2014, 12: 52.
- [6] CHEN J, GUO X Z, LI H Y, et al. Dendritic cells engineered to secrete anti-DcR3 antibody augment cytotoxic T lymphocyte response against pancreatic cancer in vitro[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(5): 817-829.
- [7] LIANG C, XU Y, LI G, et al. Downregulation of DcR3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10(2): 417-428.
- [8] ZHANG Y, HUANG S, LENG Y, et al. Effect of DcR3-specific siRNA on cell growth suppression and apoptosis induction in glioma cells via affecting ERK and AKT [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(10): 5195-5202.
- [9] LIU W, RAMAGOPAL U, CHENG H, et al. Crystal structure of the complex of human FasL and its decoy receptor DcR3 [J]. *Structure*, 2016, 24(11): 2016-2023.
- [10] YUAN J, NAJAFOV A, PY B F. Roles of caspases in necrotic cell death[J]. *Cell*, 2016, 167(7): 1693-1704.

(王荣兵 编辑)