

CD40 配体对汉黄芩素抗肿瘤作用的影响及其机理探讨*

周玉琼^{1,2}, 李道霞^{1,2}, 郑雪莲³, 颜有仪¹, 林勇³, 王霞³, 廖林川^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院(成都 610041); 2. 四川大学华西药学院(成都 610041);
3. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院分子与转化医学实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨重组可溶性 CD40 配体(recombinant soluble CD40 ligand, rsCD40L)对汉黄芩素诱导的抗肿瘤作用的影响及其作用机理。**方法** 采用乳酸脱氢酶(LDH)释放实验检测 rsCD40L 与汉黄芩素共处理对卵巢癌细胞株 SKOV3 的细胞毒作用;吖啶橙/溴化乙锭双重染色后荧光显微镜下观察处理后细胞形态学改变;采用 Western blot 检测细胞凋亡相关分子 caspase-8、caspase-3、多聚 ADP 核糖聚合酶的变化,在此基础上,加入 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)中和抗体,采用 LDH 释放实验,进一步检测阻断这些信号通路对肿瘤细胞死亡的影响。**结果** rsCD40L 可增强汉黄芩素对 SKOV3 细胞的杀伤作用($P<0.05$)。随着汉黄芩素剂量的增加,对肿瘤细胞的杀伤作用也随之增强($P<0.05$)。经 rsCD40L 与汉黄芩素共处理的 SKOV3 细胞呈现典型的凋亡形态学改变;caspase 信号通路被显著活化,且 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 可抑制增强的细胞毒作用。TNF- α 中和抗体也可抑制这一增强的细胞毒作用。**结论** rsCD40L 可增强汉黄芩素诱导的肿瘤细胞死亡,其机理与增强肿瘤细胞凋亡及诱导 TNF- α 的自分泌有关,提示将 rsCD40L 和汉黄芩素合用具有潜在的抗肿瘤作用价值。

【关键词】 重组可溶性 CD40 配体(rsCD40L) 汉黄芩素 细胞凋亡 增强的细胞毒作用

Recombinant Soluble CD40 Ligand Enhances Wogonin-induced Antitumor Activity ZHOU Yu-qiong^{1,2}, LI Dao-xia^{1,2}, ZHENG Xue-lian³, YAN You-yi¹, LIN Yong³, WANG Xia³, LIAO Lin-chuan^{1△}. 1. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Laboratory of Molecular and Translational Medicine, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of recombinant soluble CD40 ligand (rsCD40L) on Wogonin mediated antitumor activity in cancer cells and the underlying molecular mechanisms. **Methods** Cell death was detected based on the release of lactate dehydrogenase (LDH) using a cytotoxicity detection kit. For morphological study of cell death, cells were stained with 50 $\mu\text{g/mL}$ of acridine orange and 50 $\mu\text{g/mL}$ of ethidium bromide and observed and photographed under a fluorescence microscope. Activation of apoptosis pathway was evaluated by Western blot. The effects of pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and tumor necrosis factor α (TNF- α) neutralizing antibody on cell death induced by rsCD40L and Wogonin co-treatment were also investigated. **Results** rsCD40L significantly enhanced Wogonin-induced cell death of ovarian cancer cells SKOV3. A dose-dependent synergism was found with a fixed rsCD40L dose (1 $\mu\text{g/mL}$) and increased concentrations of Wogonin (5 $\mu\text{mol/L}$ -15 $\mu\text{mol/L}$). rsCD40L and Wogonin co-treated cells showed typical apoptotic morphologies and enhanced activation of caspases pathway. As expected, the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK inhibited synergistic cell death of rsCD40L and Wogonin co-treated SKOV3 cells. Interestingly, the TNF- α neutralizing antibody that blocks TNF- α binding to its receptor also significantly suppressed the cell death enhancing effect, indicating that autocrine TNF- α played a role of sensitization. **Conclusion** rscd40L sensitizes cancer cells to wogonin-mediated apoptosis, which may involve autocrine of TNF- α , and the combination of rsCD40L and Wogonin may have a potential for cancer therapy.

【Key words】 Recombinant soluble CD40 ligand (rsCD40L) Wogonin Apoptosis Enhanced cytotoxicity

* 国家自然科学基金(No. 81172111)和教育部“新世纪人才支持计划”(No. NCET-11-0349)资助

△ 通讯作者, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

CD40属于肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)超家族,主要表达于不同分化阶段的B细胞、造血前体细胞、T细胞、单核/巨

嗜细胞、树突状细胞以及多种不同组织来源的肿瘤细胞。CD40 配体(CD40L)属于 TNF 超家族。CD40 与其配体 CD40L 结合,为 T 细胞和 B 细胞活化提供必需的第二信号,广泛地参与了细胞免疫、体液免疫和炎症反应的调节^[1,2]。而肿瘤细胞表面的 CD40 与 CD40L 结合后,对不同类型的肿瘤细胞发挥不同的调控作用,在许多肿瘤细胞可阻止细胞的生长,诱导肿瘤细胞的凋亡,因而 CD40L 具有潜在的抗肿瘤应用前景^[3,4]。

汉黄芩素(5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮,Wogonin)是传统中草药黄芩中提取出来的一种活性成分。大量研究表明,汉黄芩素具有广泛的生物活性,包括抗氧化作用、抗病毒、抗血栓和抗炎症等作用^[5-7]。近年来,汉黄芩素的抗肿瘤作用引起关注,体内外研究表明,其对肿瘤的生长具有抑制作用,并能有效杀伤肿瘤细胞^[8-10]。

基于 CD40L 和汉黄芩素在肿瘤治疗上均具有潜在应用前景,本研究采用重组可溶性 CD40L(rsCD40L)激活 CD40,以卵巢癌细胞株 SKOV3 为研究对象,通过比较 rsCD40L、汉黄芩素单用和两者合用对 SKOV3 细胞杀伤作用的不同,探讨 rsCD40L 对汉黄芩素抗肿瘤作用的影响,并通过荧光染色观察细胞凋亡、酶联免疫吸附(ELISA)检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和免疫蛋白印记技术(Western blot)检测凋亡信号通路相关蛋白的表达等考察其作用机理。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

人卵巢癌细胞株 SKOV3 购自美国 American Type Culture Collection 公司;高糖 DMEM(Gibco 公司);胎牛血清(Hyclone);汉黄芩素(中国药品生物制品检定所);吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)购于美国 Sigma 公司;pan-caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK(Calbiochem 公司);CytoTox 96®非放射性细胞毒性检测试剂盒(Promega 公司);抗 caspase-3 抗体(Epitomics 公司);抗 caspase-8 抗体及抗多聚 ADP 核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase,PARP)抗体购于 BD Bioscience 公司;TNF- α 中和抗体、rsCD40L、抗 β -actin 抗体(Protein Tech 公司);化学发光底物液(Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3 培养于高糖 DMEM 培养基(含 10%的胎牛血清)中,在 5% CO₂、37℃、饱

和湿度下培养,细胞长满 80%时(3~4 d),用 0.25%胰蛋白酶液消化后进行传代。

1.2.2 实验分组 生长良好的 SKOV3 细胞过夜培养后,分为加入 rsCD40L 1 μ g/mL(细胞死亡率测定 rsCD40L 为加入 0.5、1.0、2.0 μ g/mL),或者汉黄芩素 10 μ mol/L(细胞死亡率测定汉黄芩素为加入 5、10、15 μ mol/L)单药组,以及加入这两种药物的联合用药组,同时设立对照组,每个药物浓度均设 4 复孔。

1.2.3 细胞死亡率的测定 将 SKOV3 细胞接种在 96 孔板,按 1.2.2 分组加入不同药物后,继续培养 72 h,按照 CytoTox 96®试剂盒说明书检测培养上清中乳酸脱氢酶(LDH)活性,测定细胞死亡率。分别检测细胞培养上清吸光度(A)值和细胞最大释放 A 值。按下列公式计算细胞死亡率:

$$\text{细胞死亡率(\%)} = \frac{\text{细胞培养上清 A 值}}{\text{细胞最大释放 A 值}} \times 100\%$$

1.2.4 AO/EB 染色检测细胞凋亡 将 SKOV3 细胞接种于 48 孔板中过夜培养,按 1.2.2 分组加入不同药物后,继续培养 24 h,移去上清,用 PBS 液轻柔清洗并移去后,加入终浓度均为 50 μ g/mL 的 AO/EB 染液,5 min 后弃去,加入少量 PBS,置于荧光显微镜下观察并拍照。早期凋亡细胞的核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状,晚期凋亡细胞的核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状。

1.2.5 Western blot 检测凋亡信号通路相关蛋白的表达 将 SKOV3 细胞接种于 48 孔板中过夜培养,按 1.2.2 分组加入不同药物后,分别于加药后 14 h 和 24 h 用 PBS 洗涤后收集细胞,加入 M2 裂解液裂解细胞,冰上孵育 30 min,4℃离心,收集上清即获细胞裂解液。用 BIO-RAD protein assay 试剂测定蛋白浓度后,取等量(大约 50 μ g)细胞裂解液加入上样缓冲液,煮沸 4 min,然后采用 120 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳后进行 PVDF 膜转印。将转印后的膜放入含 5%脱脂奶粉的 PBS-T 中(含 0.1% Tween20 的 PBS 溶液)室温封闭 1 h 后,与相应一抗(caspase-3 抗体 1:500; caspase-8 抗体 1:500; PARP 抗体 1:1 000; β -actin 抗体 1:2 000)抗体的 PBS 室温振摇 2 h 或 4℃过夜孵育,用 PBS-T 洗膜后,加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 40 min, PBS-T 洗膜后,加入化学发光底物液,凝胶成像系统检测特异性蛋白条带。

1.2.6 ELISA 检测 TNF- α 水平 将 SKOV3 细胞

接种于 48 孔板中过夜培养,按 1. 2. 2 分组加入不同药物,于 12 h 后收集上清液,通过 Human TNF- α precoated ELISA kit 试剂盒检测细胞培养上清中的 TNF- α 水平。

1. 2. 7 Z-VAD-FMK、TNF- α 中和抗体对 rsCD40L 和汉黄芩素联用引起的肿瘤细胞死亡率的影响 本课题组在前期研究中发现,rsCD40L 可诱导 SKOV3 细胞自分泌 TNF- α ^[11],而另一项研究发现汉黄芩素与 TNF- α 合用可协同杀伤肿瘤细胞^[12],为了研究肿瘤细胞自分泌的 TNF- α 在联合用药组所导致的细胞死亡中的作用,我们用 TNF- α 中和抗体(1 μ g/mL)预处理 SKOV3 细胞 1 h 后,再加入 1 μ g/mL rsCD40L + 10 μ mol/L 汉黄芩素(rsCD40L+Wogonin+anti-TNF 组),并以加入非特异抗体为对照(rsCD40L+Wogonin+anti-control 组),以不加任何药物为阴性对照,以加入 rsCD40L (1 μ g/mL)与 10 μ mol/L 汉黄芩素为 rsCD40L+Wogonin 组。此外,用 20 μ mol/L Z-VAD-FMK 预先处理细胞 30 min,再用 rsCD40L (1 μ g/mL) + 10 μ mol/L 汉黄芩素处理细胞(rsCD40L+Wogonin+Z-VAD-FMK 组),加药后 72 h 后按 1. 2. 3 方法,测定细胞死亡率。

1. 2. 8 Z-VAD-FMK 对 rsCD40L 和汉黄芩素联用引起的肿瘤细胞凋亡及凋亡信号通路活化的影响 按 1. 2. 4 和 1. 2. 5 方法检测 1. 2. 7 中阴性对照组、

rsCD40L+Wogonin 组、rsCD40L+Wogonin+Z-VAD-FMK 组细胞凋亡变化和凋亡信号通路活化的变化。

1. 2. 9 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较采用 one-way ANOVA 分析,两组之间的比较采用 *t* 检验, $P < 0. 05$ 为差异有统计学意义。并根据两药联用时的 Zhou-Talalay 公式计算协同指数(CI)。

2 结果

2. 1 rsCD40L 对汉黄芩素诱导的细胞毒作用的影响

由表 1 可见,SKOV3 细胞经过 rsCD40L 处理 72 h 后,即使最高浓度 rsCD40L(2 μ g/mL)也只导致少量细胞(14. 4% $\pm$ 0. 7%)死亡(rsCD40L 单药组组间比较 $P > 0. 05$),浓度为 15 μ mol/L 的汉黄芩素可导致大约 24. 8% $\pm$ 2. 6% 的细胞死亡(汉黄芩素单药组组间比较 $P < 0. 05$),而 rsCD40L 和汉黄芩素联合用药组的细胞死亡率较单药组增加,差异有统计学意义(与相同剂量汉黄芩素单药组比较 $P < 0. 05$,与相同剂量 rsCD40L 单药组比较 $P < 0. 01$)。当固定 rsCD40L 浓度(1 μ g/mL),加入不同浓度的汉黄芩素,SKOV3 细胞的死亡率随着汉黄芩素浓度的增加而增加(合药组组间比较 $P < 0. 05$,差异有统计学意义)。CI 分析,CI 值均小于 1,即 rsCD40L 增强汉黄芩素诱导的抗肿瘤作用属

表 1 不同浓度 rsCD40L 与 15 μ mol/L 汉黄芩素及不同浓度汉黄芩素与 1 μ g/mL rsCD40L 作用于 SKOV3 细胞诱导的细胞死亡率(% , $n = 3$)
Table 1 SKOV3 cell death induced by different concentrations of rsCD40L and 15 μ mol/L Wogonin, and different concentrations of Wogonin and 1 μ g/mL rsCD40L (% , $n = 3$)

Group	Cell death (%)	Group	Cell death (%)
Control	0	Control	
Wogonin (15 μ mol/L)	24. 8 $\pm$ 2. 6	rs40CD40L (1. 0 μ g/mL)	13. 5 $\pm$ 0. 4
rsCD40L (0. 5 μ g/mL)	7. 8 $\pm$ 1. 2	Wogonin (5 μ mol/L)	6. 4 $\pm$ 0. 2
rsCD40L (0. 5 μ g/mL)+Wogonin	46. 8 $\pm$ 3. 3 * $\cdot$ Δ	rsCD40L+Wogonin (5 μ mol/L)	21. 2 $\pm$ 3. 1 # $\cdot$ $\blacktriangle$
rsCD40L (1. 0 μ g/mL)	13. 5 $\pm$ 0. 4	Wogonin (10 μ mol/L)	12. 4 $\pm$ 2. 9 $\star$
rsCD40L (1. 0 μ g/mL)+Wogonin	53. 2 $\pm$ 1. 7 * $\cdot$ Δ	rsCD40L+Wogonin (10 μ mol/L)	31. 5 $\pm$ 5. 8 # $\cdot$ $\blacktriangle$
rsCD40L (2. 0 μ g/mL)	14. 4 $\pm$ 0. 7	Wogonin (15 μ mol/L)	24. 8 $\pm$ 2. 6 $\star$ $\cdot$ $\blackstar$
rsCD40L (2. 0 μ g/mL)+Wogonin	54. 9 $\pm$ 3. 1 * $\cdot$ Δ	rsCD40L+Wogonin (15 μ mol/L)	53. 2 $\pm$ 1. 7 # $\cdot$ $\blacktriangle$

* $P < 0. 05$, vs. Wogonin group; $\Delta P < 0. 01$, vs. rsCD40L alone in the same concentration group; # $P < 0. 05$, vs. rsCD40L group; $\blacktriangle P < 0. 05$, vs. Wogonin alone in the same concentration group; $\star P < 0. 05$, vs. Wogonin 5 μ mol/L; $\blackstar P < 0. 05$, vs. Wogonin 10 μ mol/L

于协同作用。

2. 2 rsCD40L 和汉黄芩素单独及联合作用对 SKOV3 细胞凋亡的影响

由图 1 可见,对照组细胞未见凋亡细胞,单药组可见少量早期凋亡和晚期凋亡细胞,rsCD40L 和汉黄芩素共同处理组可见大量的凋亡细胞。

2. 3 rsCD40L 和汉黄芩素单独及联合用药对 SKOV3 细胞胞内凋亡信号通路蛋白活化的影响

见图 2。rsCD40L 和汉黄芩素联合用药促进了细胞凋亡因子 caspase-8(相对分子质量为 55×10^3) 的活化及降解为不同的片段(40×10^3 , 36×10^3 , 23×10^3),并且促进了 caspase-3(相对分子质量为

32×10^3)的活化(降解为相对分子质量 17×10^3), 以及其底物 PARP 蛋白(相对分子质量为 113×10^3) 切割为小片段(相对分子质量为 89×10^3), 较对照组和单药组均有明显区别。

2.4 rsCD40L 和 汉黄芩素 合用对 SKOV3 细胞

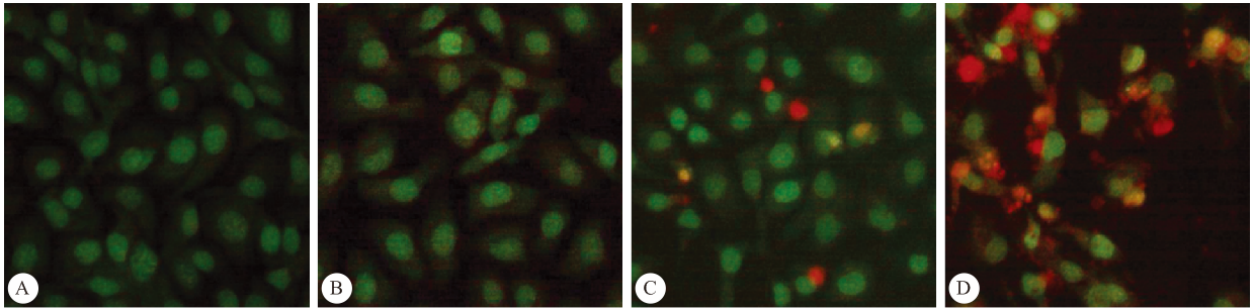


图 1 AO/EB 双重染色后荧光显微镜下观察 SKOV3 细胞凋亡。×100

Fig 1 AO/EB staining of SKOV3 cells after treatment with rsCD40L or Wogonin or a combination of rsCD40L and Wogonin. ×100

A: Control; B: 1 $\mu\text{g/mL}$ rsCD40L alone; C: 10 $\mu\text{mol/mL}$ Wogonin alone; D: a combination of 1 $\mu\text{g/mL}$ rsCD40L and 10 $\mu\text{g/mL}$ Wogonin

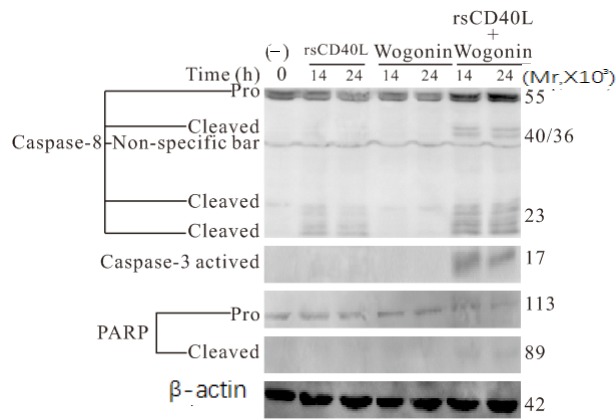


图 2 Western blot 检测用药后 SKOV3 细胞中 caspase-8、caspase-3 和 PARP 的表达

Fig 2 The expression of apoptotic proteins caspase-8, caspase-3, and PARP in SKOV3 cells after treatment detected by Western blot

(-):Control group

SKOV3 细胞 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌(与对照组比较, P 均 < 0.01), 汉黄芩素单用未增加 $\text{TNF-}\alpha$ 的分泌(与对照组比较, $P>0.05$)。

2.5 Z-VAD-FMK、 $\text{TNF-}\alpha$ 中和抗体对 rsCD40L 和 汉黄芩素 联用引起的肿瘤细胞死亡率的影响

如表 3 所示, Z-VAD-FMK 预处理后可抑制 rsCD40L 和汉黄芩素合用所导致的细胞死亡 ($P<0.01$)。 $\text{TNF-}\alpha$ 中和抗体预处理 SKOV3 细胞后, 可抑制 rsCD40L 和汉黄芩素合用药的抗肿瘤作用。

2.6 Z-VAD-FMK 对 rsCD40L 和 汉黄芩素 联用引起的肿瘤细胞凋亡及凋亡信号通路活化的影响

由图 3 可见, rsCD40L 和汉黄芩素联合处理组

$\text{TNF-}\alpha$ 分泌表达的影响

对照组、rsCD40L 组、汉黄芩素组、rsCD40L+ 汉黄芩素组上清液中 $\text{TNF-}\alpha$ 水平 (pg/mL) 分别为 6.47 ± 0.6 、 61.91 ± 2.4 、 5.37 ± 0.4 、 59.00 ± 1.6 , rsCD40L 单用及 rsCD40L 和汉黄芩素合用增加

细胞可见大量的凋亡细胞, 即核染色质着绿色或橘 表 3 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 和 $\text{TNF-}\alpha$ 中和抗体对 rsCD40L 和汉黄芩素合用所导致的肿瘤细胞死亡的影响 (%)

Table 3 The effect of pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK and $\text{TNF-}\alpha$ neutralizing antibody on cell death induced by rsCD40L and Wogonin cotreatment (%)

Group	<i>n</i>	Cell death (%)
Negative control	4	0
rsCD40L+Wogonin	4	45.3 ± 0.2
rsCD40L+Wogonin+Z-VAD-FMK	4	$11.1\pm0.9^*$
rsCD40L+Wogonin+anti-control	4	43.2 ± 1.8
rsCD40L+Wogonin+anti-TNF	4	$28.9\pm1.2^{*\blacktriangle}$

* $P<0.01$, vs. rsCD40L+Wogonin group; $\blacktriangle P<0.05$, vs. rsCD40L+Wogonin+anti-control group

红色, 呈固缩状或圆珠状, 而用 Z-VAD-FMK 预处理细胞后可抑制 rsCD40L 和汉黄芩素联合作用所诱导的细胞凋亡, 视野下未见大量凋亡细胞。

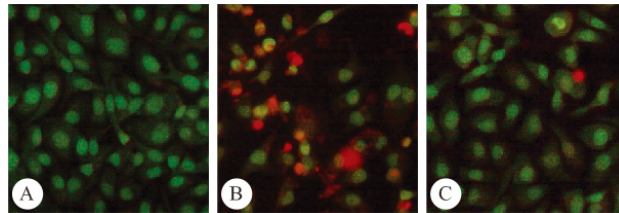


图 3 AO/EB 染色后荧光显微镜下 SKOV3 细胞的凋亡。×100

Fig 3 AO/EB staining of SKOV3 cells. ×100

A: Negative control; B: rsCD40L+Wogonin; C: rsCD40L+Wogonin+Z-VAD-FMK

由图 4 可见, rsCD40L 和汉黄芩素合用促进了细胞凋亡因子 caspase-8 的活化及降解为不同的片段, 并且促进了 caspase-3 的活化, 以及其底物 PARP 蛋白切割为小片段, 这与图 2 所示结果相符,

而 Z-VAD-FMK 预处理组则抑制了上述信号通路的活化。

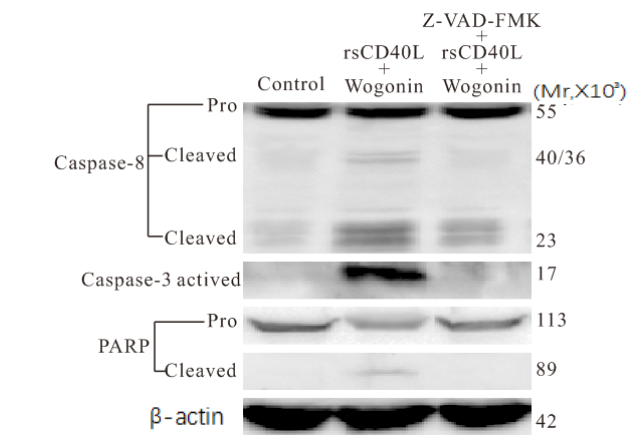


图 4 Western blot 检测用药后 SKOV3 细胞中凋亡蛋白 caspase-8、caspase-3 和 PARP 的表达

Fig 4 The expression of apoptotic proteins caspase-8, caspase-3, and PARP in SKOV3 cells detected by Western blot

3 讨论

化疗目前仍是临床上治疗许多恶性肿瘤的主要手段,虽然已有种类繁多的化疗药物在临床上广泛使用,但是仍存在患者对药物耐受或者药物毒副作用大等问题,寻找新的高效低毒的抗肿瘤新药物和新策略已成为国内外肿瘤研究的重点。

近年来,许多研究表明,活化 CD40/CD40L 信号通路可发挥抗肿瘤作用。一方面,由于 CD40/CD40L 信号通路在获得性免疫应答的调控中发挥重要作用,通过活化这一信号通路,可增强机体的特异性抗肿瘤免疫应答^[13];另一方面,由于 CD40 分子也在许多肿瘤细胞表面表达,与 CD40L 结合活化后,可向细胞传递促凋亡信号,导致许多肿瘤细胞凋亡。还有研究表明,同时活化肿瘤细胞表面的 CD40,可增强肿瘤细胞对肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL)、Fas 配体以及许多化疗药物的敏感性^[14, 15]。汉黄芩素作为一种具有抗肿瘤作用的天然化合物,在对肿瘤细胞发挥杀伤作用的同时,对正常细胞的毒性相对较小,因而具有诱人的应用前景^[8, 9]。本研究结果显示,将 rsCD40L 与汉黄芩素合用,可增强对肿瘤细胞的杀伤,肿瘤细胞死亡率增加,形态上表现为典型的凋亡特征,且机制主要是增强了细胞内凋亡信号通路的活化(caspase-8 和 caspase-3 的活化和 PARP 的切割均显著增加)。而 caspase 抑制剂 Z-VAD-FMK 可显著抑制

联合用药组细胞的死亡,这一结果进一步支持 rsCD40L 和汉黄芩素合用主要通过增强肿瘤细胞凋亡而促进细胞死亡。rsCD40L 与汉黄芩素协同分析显示,CI 值均小于 1,即 rsCD40L 增强汉黄芩素诱导的抗肿瘤作用,属于协同作用。

CD40 作为 TNFR 家族的成员,与该家族的其他成员不同,在其胞内区没有死亡结构域,因此不能直接活化细胞死亡信号通路,而是通过诱导产生其他具有细胞毒性因子如 Fas 配体、TNF-α 和 TRAIL 而导致细胞死亡^[16]。我们在前期研究^[11]中发现,卵巢癌细胞株 SKOV3 表面表达 CD40 分子,rsCD40L 可通过诱导该细胞自分泌 TNF-α,从而增强 SKOV3 细胞对顺铂的敏感性。而我们在另一项研究中发现,汉黄芩素与 TNF-α 合用可促进肿瘤细胞的凋亡,其机理与汉黄芩素可阻断 TNF-α 诱导的 NF-κB 信号通路活化有关^[11]。在本研究中,我们也发现 rsCD40L 单独处理组以及 rsCD40L 与汉黄芩素共同处理组细胞培养上清中 TNF-α 浓度均显著增加,并且采用 TNF-α 中和抗体可显著抑制 rsCD40L 与汉黄芩素合用诱导的细胞毒作用,提示 rsCD40L 通过自分泌 TNF-α 从而增强汉黄芩素的抗肿瘤作用。

综上所述,本研究结果提示 rsCD40L 与汉黄芩素合用可能成为有效杀伤肿瘤细胞的新策略,但有待动物体内实验的进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol*,1998;16:111-135.
- 2 Kawabe T, Naka T, Yoshida K, *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*,1994;1(3):167-178.
- 3 Vonderheide RH. Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res*,2007;13(4):1083-1088.
- 4 Tong AW, Stone MJ. Prospects for CD40-directed experimental therapy of human cancer. *Cancer Gene Ther*,2003;10(1):1-13.
- 5 Zhao Y, Li H, Gao Z, *et al.* Effects of flavonoids extracted from *Scutellaria baicalensis* Georgi on hemin-nitrite-H₂O₂ induced liver injury. *Eur J Pharmacol*,2006;536(1-2):192-199.
- 6 Ma SC, Du J, But PP, *et al.* Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *J Nat Prod*,2002;79(2):205-211.
- 7 Chi YS, Lim H, Park H, *et al.* Effects of wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation; *in vivo*

- regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem Pharmacol*,2003;66(7):1271-1278.
- 8 Lee DH, Kim C, Zhang L, *et al.* Role of *p53*, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. *Biochem Pharmacol*,2008;75(10):2020-2033.
- 9 Baumann S, Fas SC, Giaisi M, *et al.* Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLCgamma1- and Ca^{2+} -dependent apoptosis. *Blood*,2008;11(4):2354-2363.
- 10 Chung H, Jung YM, Shin DH, *et al.* Anticancer effects of wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines *in vitro* and in nude mice xenografts. *Int J Cancer*,2008;122(4):816-822.
- 11 Sun H, Zhong YJ, Zheng XL, *et al.* Critical role of CD40-mediated autocrine tumor necrosis factor- α in potentiation of cisplatin-induced cytotoxicity in cancer cells. *Cancer Sci*, 2012;103(2):197-202.
- 12 Yang L, Zheng XL, Sun H, *et al.* Catalase suppression-mediated H_2O_2 accumulation in cancer cells by wogonin effectively blocks TNF-induced NF- κ B activation and sensitizes apoptosis. *Cancer Sci*,2011;102(4):870-876
- 13 Hill SC, Youde SJ, Man S, *et al.* Activation of CD40 in cervical carcinoma cells facilitates CTL responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J Immunol*,2005;174(1):41-50.
- 14 Ghamande S, Hylander BL, Oflazoglu E, *et al.* Recombinant CD40 ligand therapy has significant antitumor effects on CD40-positive ovarian tumor xenografts grown in SCID mice and demonstrates an augmented effect with cisplatin. *Cancer Res*, 2001;61(20):7556-7562.
- 15 Dicker F, Kater AP, Fukuda T, *et al.* Fas-ligand (CD178) and TRAIL synergistically induce apoptosis of CD40-activated chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 2005; 105 (8): 3193-3198.
- 16 Eliopoulos AG, Davies C, Knox PG, *et al.* CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Mol Cell Biol*, 2000;20(15):5503-5515.

(2013-04-08 收稿,2013-07-09 修回)

编辑 沈 进

本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四届中国高校精品科技期刊奖。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址:<http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部