

[文章编号] 1007-385X(2002)04-0265-04

## 基因转移 FasL 诱导人黑色素瘤细胞凋亡的体外研究

马文雄<sup>1</sup>, 王文宏<sup>2</sup>, 陈桂林<sup>1</sup>, 惠国桢<sup>2</sup>, 吴杰<sup>1</sup>, 张世明<sup>2</sup>, 周岱<sup>2</sup>, 杜子威<sup>1</sup>(1. 苏州大学附属第一医院神经研究室; 2. 苏州大学附属第一医院神经外科, 江苏苏州 215006)

[摘要] 目的: 探讨体外基因转移 Fas 配体(Fas-Ligand, FasL)对恶性人黑色素瘤细胞凋亡的影响。方法: 用携带人 FasL cDNA 的缺陷型重组腺病毒载体(Ad-FL), 在体外转导 2 株黑色素瘤细胞, 并使其表达; 通过流式细胞仪、RT-PCR 法进行 Fas/FasL 表达检测, TUNEL 法及荧光显微镜检测细胞凋亡状况。结果: 流式细胞仪和 RT-PCR 检测两株黑色素瘤细胞表面均表达 Fas, 不表达 FasL, 而 Ad-FL 转导的两株黑色素瘤细胞均能表达 FasL; Ad-FL 能显著诱导两株黑色素瘤细胞在体外凋亡或抑制其生长。结论: 重组腺病毒 FasL 在体外诱导人黑色素瘤细胞凋亡效果显著。

[关键词] Fas Ligand; 凋亡; 黑色素瘤; 基因转移; 重组腺病毒

[中图分类号] R730.2 [文献标识码] A

## Induction of Apoptosis in Melanoma by FasL Gene Transfer *in vitro*

MA Weng-xiong<sup>1</sup>, WANG Weng-hong<sup>2</sup>, CHENG Gui-ling<sup>1</sup>, HUI Guo-zheng<sup>2</sup>, WU Gie<sup>1</sup>, ZHANG Shi-ming<sup>2</sup>, ZHOU Dai<sup>2</sup>, DU Zi-wei<sup>1</sup>(1. Brain and Research Laboratory, 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate effects of Fas ligand (FasL) gene transfer *in vitro* for apoptosis of malignant melanoma. **Methods:** We constructed recombinant adenoviral vector containing human FasL cDNA(Ad-FL) under the control of a cytomegalovirus (CMV) promoter, which encodes human Fas ligand and transfected into two melanoma cells. Flow cytometric analysis, RT-PCR identify the expression of Fas/FasL. TUNEL, fluorescence microscope were used to analyse apoptosis. **Results:** Two melanoma cells surface express Fas, whereas not express FasL detected by RT-PCR and flow cytometric analysis; while tumor cells transduced by Ad-FL can express high level of FasL. Ad-FL can induce two melanoma cells apoptosis or suppress their growth *in vitro*. **Conclusion:** Recombinant adenovirus FasL had great effect on inducing the apoptosis of human melanoma *in vitro*.

[Key words] fas ligand; apoptosis; melanoma; gene transfer; recombinant adenovirus

\* 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 是通过穿孔素 (Perforin) 或 Fas/FasL 凋亡系统杀伤靶细胞<sup>[1]</sup>。目前 Fas/FasL 系统介导的凋亡过程在黑色素瘤的研究中日益受关注。Fas 是 I 型转膜蛋白属于肿瘤坏死因子/神经生长因子受体超家族, 其与抗 Fas 单抗或 Fas 配体结合时能诱导凋亡<sup>[1]</sup>。本实验研究了人黑色素瘤 Fas, FasL 的表达, 探讨其作用机理以及重组 FasL 对诱导黑色素瘤凋亡的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 细胞株、质粒及引物

人黑色素瘤细胞株 MM96L, A375 由中科院上海生物细胞研究所提供, 各种限制性内切酶、T4-DNA 连

接酶、Taq 酶等为美国 New England Biolabs 公司产品; pJM17 质粒和人胚肾细胞系 293 细胞由刘国卿博士 (University of British Columbia, Canada) 赠送, AdBgl II、PIC19R/FasL 质粒、AdCMVLacZ 质粒由上海复旦大学遗传所基因治疗组协组制备、提供, 将上述质粒进行酶切、回收、连接构建腺病毒载体 AdHCMVFasL。Fas 及 FasL 引物为上海中科院植物研究所合成。其余见文中所注。

#### 1.2 细胞培养

\* [基金项目] 江苏省卫生厅基金(H9804)资助

[作者简介] 马文雄(1950-), 男, 江苏苏州人, 副主任医师, 主要从事肿瘤基础及治疗方面的研究。

人黑色素瘤细胞株 MM96L, A375 细胞以及 293 细胞用高糖 DMEM 培养液, 上述培养液均加入 10% FCS、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 半封闭培养。

### 1.3 重组腺病毒的制备

将 pHCMVspIc 质粒(图 1-A), 分别用 XhoI I, BamH I 酶切, 回收大片段; 将含有 FasL cDNA 质粒 PIC19R / FasL 用 BamH I, XhoI I 酶切, 回收小片段; T4-DNA 连接酶连接 2 片段, 获得 pAdCMVFasL (图 1-B)。将 pAdCMVFasL 与 pJM17 采用磷酸钙沉淀法共转移 293 细胞, 挑取噬斑, 得到重组腺病毒(Ad-FasL)。重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定按文献[2]进行。PCR 检测重组腺病毒内所含的目的基因。

图 1 酶切鉴定

Fig. 1 Enzyme-cutting assay

A: pHCMVspIc; 1: XhoI I; 2: Hind III;  
3: BamH I; 4: Sac I; M: λBstE II

B: pAdMVFasL; 1: BamH I; 2: Sac I; 3: BamH I + Sac I

### 1.4 流式细胞仪检测 Fas, FasL 的表达

靶细胞经 0.5 mmol/L EDTA-胰酶消化、10 mmol/L PBS 洗涤 1~2 次, 将 10<sup>6</sup> 细胞与 0.25 μg FITC 标记的鼠抗人 CD95 抗体 (DX2, PharMingen) 4°C 共育 20 min; 洗 2 次, 复悬于 5% FCS PBS 中, 上 FACScan (EPICS, CLRCONT) 检测 Fas 表达; 同型匹配对照抗体作为阴性对照染色。

肿瘤细胞处理同上, 将 10<sup>6</sup> 细胞与 20 μl Biotin 标记的鼠抗人 CD95L 抗体 (NOK-1, PharMingen) 或对照抗体 Biotin-鼠 IgG (负染色) 共育 20 min 4°C, 洗 2 次; 加 0.5 μg / 10 μl SA<sub>v</sub>-PE (PharMinger), 共育 20 min 4°C, 洗 2 次, 复悬于 5% FCS 的 PBS 中, 上 FACScan 检测 FasL 的表达。每次测定 10 000 个细胞。SFI 为特殊抗体与同型匹配对照抗体的平均荧光值。

### 1.5 RT-PCR 检测 Fas, FasL

总 RNA 抽提根据 Trizol 液 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 的使用说明书进行。人 FasL 引物: 正义 5' CTGGGATGTTTCAGCTCTTC3', 反义 5' CT-CTACTCCAGAAAGCAGGAC; β-微球蛋白 (MG) 引物: Sense Primer: 5' CTCGCGCTACTCTCTTTTC3', Anti-sense Primer: 5' CATGTCTCGATCCCACTTAAC3' 扩增产

物为 330 bp; cDNA 合成通过无 Rnase 的 Dnase I (2 U/μg, RNA) 消化总 RNA 2 μg, 37°C 30 min; cDNA 在终体积 50 μl 中进行, 含 4 种 dNTPs (每一个 200 μmol/L), 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 U Taq 酶和每个引物 0.4 U<sub>m</sub>; 在 PCR 仪中按以下条件扩增: 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min; 35 个循环后 PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分离 (231 bp 人 FasL 片段) 或 30 个循环后 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行分离 (838 bp β-actin 片断), β-actin 作为内对照。人 Fas: 正义 5' GAC-CCAGAATACCAAGTGCAGATGTA3', 反义 5' CTGTTTCA GGATTTAAGGTTGGAGATT3' 扩增转膜蛋白区: cDNA 合成条件同 FasL, 两对引物均进行 20 个热循环, 其产物分别在 1.5%, 4% 琼脂糖凝胶电泳进行分离 (296 bp)。

### 1.6 细胞凋亡的检测

荧光显微镜检测凋亡细胞形态: 细胞涂片用 0.1% 多聚甲醛固定、PBS 洗, 将玻片浸入碘化丙啶 (PI, Sigma Co.) 或吖啶橙 (AO, Sigma Co.) 染液的染色缸中, 避光染色 30 min, 然后在荧光显微镜下观察。

TUNEL 法检测细胞凋亡: 按 In Situ Cell Apoptosis Detection Kit, POD (上海华美公司) 说明书进行检测凋亡细胞, 上 FACScan 检测凋亡率。

## 2 结果

### 2.1 AdCMVFasL 的构建、扩增、纯化、滴度测定以及 AdCMVLacZ 感染率的测定

本研究构建了由人巨细胞病毒早期蛋白的启动子 (CMV) 控制的 FasL 基因转录的重组腺病毒载体质粒, pAdCMVFasL 应用同源重组制备重组腺病毒, pAdCMV-FasL 与 pJM17 磷酸钙共转染 293 细胞后, 通过挑取噬斑、PCR 鉴定阳性细胞再感染, 再挑取噬斑、PCR 鉴定等一系列操作, 得到可表达 FasL 基因的 1 ml 病毒克隆株 AdCMVFL。收集扩增的粗提液, 2 次氯化铯梯度离心纯化后, 用噬斑法测定其滴度是 7.05 × 10<sup>10</sup> pfu/ml。采用带有报告基因的 AdCMV-LacZ 重组病毒感染 MM96L 细胞, MOI 为 100 时细胞可被 X-Gal 染成蓝色, 证明重组腺病毒可以介导基因的高效转移 (图 2)。

### 2.2 黑色素瘤细胞株 Fas, FasL 表达情况

流式细胞仪分析显示, 黑色素瘤细胞株 Fas 为高表达 (图 3A); RT-PCR 检测到黑色素瘤细胞株表达 Fas 转膜 mRNA (图 4), 流式细胞仪和 RT-PCR 对黑色素瘤细胞株 Fas 配体的检测, 均未见其表达, 显示这两株黑色素瘤细胞株 FasL 蛋白和 mRNA 表达呈低水平。分别感染 Ad-FL (100 mol) 后, 流式细胞仪均检测到

Fas 配体表达(图 3B)。说明 Ad-FL 转染黑色素瘤细胞是成功的。

色质呈新月形聚集于核膜一边;晚期凋亡细胞呈现核碎裂、大小不等的圆形小体,并被细胞膜所包绕,即凋亡小体(图 5)。2~3 d 后,用 TUNEL 法检测到被 Ad-FL 感染的黑色素瘤细胞 44%~57% 出现凋亡现象,而被 AdLacZ 感染无此现象,细胞生长正常(见表 1)。

图 2 Ad-LacZ 感染 MM96L X-gal 照片(×400)

Fig. 2 Ad-LacZ infected with MM96L X-gal photogram(×400)

Shwing almost 100% cells stained blue in MOI = 100; 100% efficiency of recombinant adenovirus transferring in MOI over 100

图 4 RT-PCR 检测黑色素瘤细胞 Fas mRNA 表达

Fig. 4 Expression of Fas mRNA in identifying melanoma cells by RT-PCR

A:  $\beta 3$  microglobulin (330 bp) as an inner control;  
B: Two melanome cells expressed as Fas converted membrane zone mRNA (296 bp)

表 1 流式细胞仪检测细胞凋亡率(TUNBL 法)结果

Tab. 1 Results of the cell apoptosis rate with flow cytometric analysis(TUNEL method)

Cells	Contral	Ad-LacZ	CH-11	Ad-FL
MM96L	13 ± 5	19 ± 6	27 ± 4 <sup>△</sup>	57 ± 8 <sup>▲</sup>
A375	11 ± 7	20 ± 3	29 ± 3 <sup>△</sup>	44 ± 3 <sup>▲</sup>

The cell treated with Fas antibody(CH-11, 100 ng/ml), Ad-LacZ and Ad-FL(MOI 200) for 48 hours. The data showed the average apoptosis rate ± SD in the three independent tests.  $\Delta P < 0.05$ (compared with the control or Ad-LacZ);  $\blacktriangle P < 0.01$ (compared with the control or AdLacZ);  $P < 0.05$ (compared with Fas antibody). (SPSS 8.0 software; ANOVA analysis)

图 3 黑色素瘤流式细胞仪分析

Fig. 3 Flow cytometric analysis of melanoma

A: Fas expression in flow cytometric analysis.

SFI: MM96L4.0 with high expresse-ssion of A-375,3.7

B: Fas expression in flow cytometric analysis of transfected melanoma cells from AdvEL

The values in the Fig are the logarithm of peak fluore-scene index after staining with homotypic matched antibody for control (shadow part) or with antibody against Fas, FasL (blank part)

### 2.3 检测转染黑色素瘤细胞的凋亡结果

黑色素瘤细胞株被 Ad-FL(不同的 MOI)感染后,在荧光显微镜下,PI 染色呈红色荧光,AO 染色呈黄绿色荧光,早期凋亡细胞呈现核浓缩,染色加深,或核染

### 3 讨论

Fas 抗原是细胞膜表面受体,在许多组织中均有表达,大多数恶性肿瘤包括黑色素瘤表达 Fas;Fas 天然配体 FasL,是 II 型膜蛋白,虽然在某些恶性肿瘤中如人淋巴瘤、脑胶质瘤、肝癌、结肠癌等能陆续检测到,但大多数人黑色素瘤却不表达 FasL<sup>[3]</sup>。因此,我们通过重组腺病毒将 FasL 转染至自身并不表达 FasL 的人黑色素瘤细胞中,使其表达 FasL,并与原已表达的 Fas 结合,诱导该细胞“自杀性”凋亡,取得了明显的实验效果。

尽管以前研究显示使用抗 Fas 抗体对黑色素瘤有

一定的效果,但某些黑色素瘤细胞株对抗 Fas 抗体介导的凋亡不敏感,其 Fas 水平表达较高。再者,其对正常组织的损害限制了免疫治疗作用<sup>[4-5]</sup>;腺病毒载体宿主广泛,滴度高、感染效率高且易纯化,可直接活体注射,更适合于临床应用。本研究应用重组腺病毒携带 FasL 治疗黑色素瘤与其他肿瘤相比具有一定的独特性。本研究结果证实,大多数人黑色素瘤细胞表面均表达 Fas,而不表达 FasL。

改变,FADD 再与 FLICE( FADD 类白细胞介素- $\beta$  转化酶)结合后导致后者的活化并被裂解,从而启动 ICE 相关蛋白酶级联,最终导致细胞的凋亡<sup>[4-6]</sup>;二是对 Fas 的靶细胞,通过 FasL 诱导的炎症反应,而使肿瘤细胞生长受到抑制。Roth 等<sup>[7]</sup>用 Fas 配体对 Fas<sup>+</sup> 的人脑胶质瘤细胞株治疗后,发现所产生的细胞毒作用是凋亡。Kawaguchi 等<sup>[8]</sup>使用重组杆状病毒携带 FasL 感染一昆虫表达细胞株 sf9 而获得大量的 FasL,在体外能诱导 T98G 细胞凋亡。Arai 等<sup>[2]</sup>将 FasL 通过重组腺病毒转染表达 Fas 的小鼠肾上皮瘤细胞株 Renca,在体内外均能诱导该肿瘤细胞凋亡;而对 Fas<sup>-</sup> 的小鼠大肠癌细胞株 CT26,在体外其对 FasL 具有抵抗用,在体内重组 FasL 却能诱导该肿瘤消退,Arai 等<sup>[2]</sup>认为这是 FasL 扮演了诱导潜在的炎症反应角色所致。由此可见,FasL 基因治疗黑色素瘤依赖于诱导肿瘤细胞自身凋亡,激活机体的炎症免疫应答,产生特异性抗肿瘤的免疫反应,也是该治疗方式最令人惊喜的作用机制之一。

虽然有些学者认为 FasL 在某些黑色素瘤细胞株中表达是其逃避免疫监视的手段之一<sup>[3]</sup>,但本研究结果却证实通过携带 FasL cDNA 重组腺病毒感染黑色素瘤细胞株并使其表达,能诱导两株黑色素瘤细胞株凋亡,该结果与 Kondo 和 Shinoura 等<sup>[4,6]</sup>的研究报告一致,提示 Ad-FL 作为黑色素瘤基因治疗手段具有一定的应用前景。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor[ J ]. Science, 1995, 267: 1449-1456.
- [ 2 ] Arai H, Godon D, Nabel EG, *et al.* Gene transfer of Fas ligand induce tumor regression *in vivo*. [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 13862-13867.
- [ 3 ] Griffith TS. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege[ J ]. Science, 1995, 270: 1189-1192.
- [ 4 ] Kondo S, Ishizaka Y, Okada T, *et al.* FADD gene therapy for malignant glioma *in vitro* and *in vivo*. [ J ]. Hum Gene Ther, 1998, 9: 1599-1608.
- [ 5 ] Weller M, Malipiero U, Rensing-Ehl A, *et al.* Fas/Apo-1 gene transfer for human malignant glioma[ J ]. Cancer Res, 1995, 55: 2936-2944.
- [ 6 ] Shinoura N, Yoshida Y, Sadata A, *et al.* Apoptosis by retrovirus- and adenovirus-mediated gene transfer of Fas ligand to gene therapy[ J ]. Hum Gene Ther, 1998, 9: 1983-1993.
- [ 7 ] Roth W, Fontana A, Trepel M, *et al.* Immunotherapy of malignant glioma: Synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 1997, 44: 55-63.
- [ 8 ] Kawaguchi S, Mineta T, Ichinose M, *et al.* Induction of apoptosis in glioma cells by recombinant human Fas ligand[ J ]. Neurosurgery, 2000, 46: 431-439.

[ 收稿日期 ] 2002 - 04 - 03

[ 修回日期 ] 2002 - 07 - 17

#### 图 5 体外实验照片

##### Fig. 5 Experimental photograms *in vitro*.

( A ~ D ): A-375 experimental photograms *in vitro*.  
 A, C: The control of B(  $\times 250$  ) and D( PI staining  $\times 400$  );  
 B, D: A-375 cell apoptosis induced by Ad-FL ( MOI = 100 ),  
 arrows demonstrating cells or corpuscles in apoptosis.  
 ( E ~ H ) MM96L experimental photograms *in vitro*.  
 E, G: The control of (  $\times 250$  ) and H ( PI staining  $\times 400$  );  
 F, H: MM96L cell apoptosis induced by Ad-FL  
 ( MOI = 100 ), arrows showing cells or corpuscles in apoptosis.

FasL 治疗肿瘤的机理目前认为有两种,一是通过诱导 Fas<sup>+</sup> 的靶细胞自身凋亡,即 FasL 与 Fas 的结合导致 Fas 胞内的死亡区形成三聚体的活化形式,随后引起与之结合的 FADD( Fas 相关蛋白死亡域 )构像发生