

[ 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脑神经研究室; 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, CLRCNT) 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)

Showing 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(TUNEL 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 expression 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 fluorescence 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