

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0166-04

嵌合抗 CD20Fab' 抗体片段诱导 Raji 细胞的凋亡机制

范冬梅, 刘银星, 熊冬生, 赖增祖, 许元富, 邵晓枫, 杨 铭, 杨纯正 (中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020)

[摘 要] 目的: 探讨嵌合抗 CD20 抗体 Fab' 片段的抗肿瘤机制。方法: 应用 MTT 法检测 Fab' 片段对 Raji 细胞生长的抑制作用, 用 Annexin V-FITC 和 PI 测定 Fab' 片段对 Raji 细胞凋亡的诱导作用, 用 RT-PCR 和 Western blot 检测 Raji 细胞中 bcl-2 表达的变化。结果: 嵌合抗 CD20Fab' 片段对 Raji 细胞具有明显的抑制作用 IC50 值为 24.2 μg/ml, 并呈剂量依赖性; 嵌合抗 CD20 Fab' 片段能诱导 Raji 细胞的凋亡, 并降低 Raji 细胞中 bcl-2 基因及其蛋白的表达水平。结论: 嵌合抗 CD20 抗体片段 Fab' 能抑制 Raji 细胞生长和诱导细胞凋亡, 其作用机制与 bcl-2 蛋白表达的下降有关。

[关键词] 抗 CD20 抗体; B 淋巴瘤; bcl-2

[中图分类号] R318; R733.4 [文献标识码] A

Anti-Tumor Mechanism of Anti-CD20 Antibody *in vitro*: B Lymphoma Cell Apoptosis Induced by Chimeric Antibody Fragment Fab'

FAN Dong-mei, LIU Yin-xing, XIONG Dong-sheng, LAI Zeng-zu, XU Yuan-fu, SHAO Xiao-feng, YANG Ming, YANG Chun-zheng (The National Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China)

[Abstract] Objective: To study anti-tumor mechanism of chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab' *in vitro*. Methods: The effect of anti-CD20 antibody fragment Fab' on Raji cells growth was observed using MTT; Annexin V-FITC and PI were used to assay Raji cells apoptosis induced by Fab'; bcl-2 gene expression level change in Raji cells induced by Fab' was assayed using RT-PCR and Western blotting. Results: The result of MTT indicated that the growth of Raji cells was inhibited by chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab' (IC50, 24.2 μg/ml); bcl-2 gene expression level in Raji cells was decreased prominently by Fab'. Conclusions: It is relative between growth inhibition of Raji cells and apoptosis induced by chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab', and bcl-2 level decline was involved.

[Key words] anti-CD20 antibody; B cells lymphoma; bcl-2

* CD20 对 B 淋巴细胞的分化增殖具有调节作用^[1]。CD20 是治疗 B 淋巴瘤的理想靶点。CD20 在前 B 细胞及成熟 B 细胞中有表达, 而浆细胞、造血干细胞及 T 细胞则无 CD20 的表达; CD20 比较暴露不为其它表面分子所掩盖, 易与抗体结合; CD20 和抗 CD20 抗体结合后不发生内吞作用, 因而细胞表面 CD20 数量并不因为抗体的结合而减少; 在人体血清中无游离的 CD20 存在; 最重要的是 B 淋巴瘤上的 CD20 少有内吞和脱落的发生^[2-5]。1997 年, 以 CD20 为靶点的嵌合抗 CD20 单克隆抗体 Rituxan 已获准应用于 B 细胞淋巴瘤的治疗^[6]。HI47(IgG3) 是我所于 1990 年研制成功的国内第一个抗 CD20 鼠源性单克隆抗体, 第四

届国际人类白细胞分化抗原会议将 HI47 命名为 CD20 + X^[7]。我们利用噬菌体显示技术从 HI47 杂交瘤细胞中克隆到抗 CD20 抗体 HI47 可变区基因, 将该基因构建成成为嵌合的抗 CD20 抗体 Fab' 片段, 并在大肠杆菌中高效可溶性分泌表达^[8], 本研究的目的在于研究嵌合抗 CD20Fab' 片段的抗肿瘤活性及其作用机制。

[基金项目] 国家高新技术研究发展专项经费资助(中试基金国科生字 2000141 和 20001AA215341); 天津重大基金(003119511) 资助项目

[作者简介] 范冬梅(1969-), 女, 天津人, 主管技师, 主要从事基因工程抗体方面的研究

1 材料与方法

1.1 试剂、抗体、引物

MTT 购自 Sigma 公司; Annexin-V 为宝灵曼公司试剂盒; TRIZOL RNA 提取试剂盒为美国 Gibco 公司产品; 兔抗人 bcl-2 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为北京中山生物技术有限公司产品, 嵌合抗 CD20Fab' 片段为我室表达并纯化。β-actin 引物(上游: 5'-TCATGTTTGAGACCTTCAA-3', 下游: 5'-GTCTTTGCCGATGTCCACG-3')和 bcl-2 引物(上游: 5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3', 下游: 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTT CC-3')均由上海生工公司合成。

1.2 细胞培养及实验分组

人 B 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞为我室所存, 细胞生长于 RPMI-1640 培养基中, 含 15% 灭活小牛血清, 37℃, 5%, CO₂ 潮湿环境中培养。将处于对数生长期的 Raji 细胞稀释成 5×10^2 /L, 加入嵌合抗 CD20Fab' 片段至一定浓度, 继续培养一定时间后, 进行各种指标测定。

1.3 MTT 法测定肿瘤细胞生长抑制作用

将处于对数生长期的 Raji 细胞稀释并按每孔 2×10^4 个细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 然后加入不同浓度的 Fab' 片段溶液, 每组 3 个孔, 置 37℃, 5% CO₂ 环境中培养 72 h。实验终止前 4 h 每孔加入新鲜配置的 MTT 磷酸缓冲液 20 μl, 继续培养 4 h 后将 96 孔板离心, 弃掉上清, 每孔加入 DMSO 200 μl, 然后振荡摇匀, 于酶标仪测定各孔吸光度值。

1.4 Annexin-V 染色试剂盒检测细胞凋亡

采用宝灵曼试剂盒, 按照说明书操作进行。

1.5 RT-PCR 分析 bcl-2 基因的表达

按照 TRIZOL RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, RT-PCR 试剂盒进行逆转录和 PCR 扩增反应。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下观察并拍照, β-actin 为内参照。

1.6 Western blots 测定细胞 bcl-2 蛋白的表达

Raji 细胞经细胞裂解液裂解后, 经 Folin-酚法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度至等量上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 室温下与兔抗人 bcl-2 单克隆抗体反应 1.5 h, 辣根过氧化物酶标记的二抗反应 1.5 h, 充分洗膜, 用发光试剂盒显色并拍照。

2 结果

2.1 MTT 法测定结果

为了检验嵌合抗 CD20Fab' 片段对 Raji 细胞的生

长抑制作用, 以 PBS 为阴性对照, 用 MTT 法测定 Fab' 片段对 Raji 细胞生长的影响, 其结果显示, Fab' 片段对 Raji 细胞具有抑制作用, 其抑制作用具有明显的剂量依赖性, 其半数抑制量为 (24.2 ± 7.8) mg/L。

表 1 嵌合抗体 CD20 Fab' 片段对 Raji 细胞的生长抑制率
Tab 1 The inhibition rate of Raji cells by the anti-CD20 chimeric fragment Fab'

Fab'(mg/L)	Inhibition rate(%)
6.25	31.0 ± 5.6
12.5	37.0 ± 5.3
25	42.7 ± 8.0
50	57.7 ± 8.5
100	71.2 ± 10.8

Data shown are mean ± SD of triplicate determination.
Control is PBS.

2.2 AnnexinV-FITC 染色流式细胞术分析

在流式分析图上, 左下区细胞簇为活细胞, 表现为 FITC 及 PI 均低染(FITC⁻ PI⁻); 右下区细胞簇为凋亡细胞, 表现为 FITC 高染而 PI 低染(FITC⁺ PI⁻); 右上区细胞簇为坏死细胞, 表现为 FITC 和 PI 均高染(FITC⁺ PI⁺)。我们以非相关抗体 HIT3a (CD3) 为阴性对照(9%), 结果表明, 嵌合抗体 Fab' 与 Raji 细胞作用 24 h 和 48 h 后, 其细胞凋亡率分别为 16% 和 21% (图 1)。

2.3 嵌合抗 CD20Fab' 片段对 bcl-2 表达的影响

为了进一步探讨细胞凋亡过程中所发生的分子机制, 用 RT-PCR 和 Western blot 分析嵌合抗 CD20Fab' 片段对 Raji 细胞中 bcl-2 表达的影响。结果显示, Raji 细胞经过 Fab' 片段 24, 48, 72 h 不同时间的孵育后, bcl-2 在 mRNA 和蛋白水平均明显降低(图 2)。

3 讨论

抗体抗肿瘤的机制主要有抗体依赖的细胞毒作用(ADCC), 补体依赖的细胞毒作用(CDCC), 诱导肿瘤细胞凋亡, 此外有的抗体还能阻碍肿瘤细胞中配体与受体的相互作用, 抑制肿瘤细胞关键蛋白的表达及其活性, 提高肿瘤细胞的药敏性, 诱导抗独特型抗体系统以及抗体与其连接的毒素、同位素或化疗药的杀伤作用相联合等机制。抗 CD20 抗体作为单独的治疗剂治疗 B 淋巴瘤细胞瘤, 主要是通过 ADCC, CDCC 及诱导肿瘤细胞凋亡等作用机制来杀伤肿瘤细胞的。不同的抗 CD20 抗体由于结合的抗原表位不同, 可引起不同的生

物效应,例如,IF5 可激活 B 淋巴细胞, C2B8 却对 B 淋巴细胞的生长具有抑制作用^[9-10]。和完整抗体相比,嵌合抗 CD20 抗体 HI47Fab' 由于没有 Fc 段,不能产生

ADCC 和 CDCC,但是 Fab' 分子量较小,肿瘤穿透力极强,且能在大肠杆菌中表达,在肿瘤治疗中具有潜在的应用前景。

图 1 嵌合抗 CD20 抗体 Fab' 诱导 Raji 细胞的凋亡

Fig. 1 Apoptosis of Raji cells introduced by the chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab'

A: Control (HIT3a); B: Fab', 24 h; C: Fab', 48 h; Data shown are mean of double determination. Control is HIT3a.

图 2 嵌合抗 CD20Fab' 片段对 bcl-2 表达的影响

Fig. 2 The effect of CD20Fab' on bcl-2 expression in Raji cells at different time

细胞增殖和细胞凋亡之间失去平衡,导致过多细胞增殖而较少细胞凋亡,则发生肿瘤。细胞凋亡的研究为肿瘤防治提供了新靶点和新思路,不少化疗药物都是通过诱导和增强肿瘤细胞凋亡,从而发挥治疗肿瘤的作用。试验研究表明,嵌合抗 CD20 抗体 Fab' 片段能够直接抑制肿瘤细胞的生长,并可诱导 B 淋巴细胞的凋亡,这说明单价抗体不仅有抗原的结合能力,应用于显像或偶联,还具有直接抗肿瘤作用。抗 CD20 Fab' 片段与细胞作用后可明显观察到细胞凋亡时所发生的形态学特征和生化标志,如核染色质密度增高并凝聚在核膜周边,细胞器完整且有胞膜包裹的凋亡小体,以及在琼脂糖凝胶电泳中呈现特征性的 180 ~ 200 bp 大小整数倍的 DNA 梯形条带(另文发表)。

在凋亡早期,细胞膜的改变之一是磷脂酰丝氨酸从胞膜内层转移到胞膜外层,Annexin V 是一种 Ca²⁺ 依赖性的磷脂结合蛋白,它与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,因此,该蛋白可以作为一种敏感探针,用于检测早期凋亡细胞。由于坏死细胞失去膜的完整性磷脂酰丝氨酸也会暴露,故必须加入另一种染料(如碘化丙啶),以便从 Annexin V-FITC 染色阳性细胞群中区别出坏死细胞。bcl-2 基因是从人 B 淋巴瘤中分离出来的一种抑癌基因,bcl-2 基因及其蛋白可以抑制多种组织的细胞凋亡,延长细胞的生存期,许多癌细胞由于 bcl-2 的高表达而对射线或多种化疗药物耐受。许多因素可调节 bcl-2 mRNA 或 bcl-2 蛋白的水平,如某些抗癌药物在诱导细胞凋亡的同时伴有 bcl-2 基因表达的下降,本文的结果证实了嵌合抗 CD20Fab' 片段在诱导 Raji 细胞凋亡的同时也伴有 bcl-2 基因表达的下降,初步证明了嵌合抗 CD20 抗体 Fab' 片段对 Raji 细胞作用机制可能是通过直接或间接地影响到该细胞的 bcl-2 的表达或功能,进而抑制细胞生长,诱导细胞凋亡,最终得以有效地挟制和杀灭肿瘤,这为抗体可用于联合化疗或降低病人耐药的临床治疗提供了有力的证据。

[参考文献]

[1] Golay JT, Clark EA, Beverley PC, et al. The CD20 (BP35) antigen is involved in activation of B cell from the G0 to the G1 phase of the cell cycle[J]. J Immunol, 1985, 135: 3795-3801.
[2] Einfeld DA, Brown JP, Valentine MA, et al. Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein

- with multiple transmembrane domains[J]. *EMBO J*, 1988, 7: 711-717.
- [3] Liu AY, Robinson RJ, Murvay ED, *et al.* Production of a mouse-human chimeric monoclonal antibody to CD20 with potent Fc-dependent biologic activity[J]. *J Immunol*, 1987, 139: 3521-3526.
- [4] Press OW, Farr AG, Borroz KI, *et al.* Endocytosis and degradation of monoclonal antibodies targeting human B-cell malignancies [J]. *Cancer Res*, 1989, 49: 4906-4912.
- [5] Preess OW, Howell-Clark J, Andereson S, *et al.* Retention of B-cell-specific monoclonal antibodies by human lymphoma cell[J]. *Blood*, 1994, 83: 1390-1397.
- [6] Leget GA, Czuczman MS. Use of rituximab, the new FDA-approved antibody[J]. *Curr Opin Oncol*, 1998, 10: 548-551.
- [7] 杨希峰, 沈德诚, 金宇光, 等. HI47: 一种抗成熟 B 细胞单克隆抗体制备、鉴定及其生物学特性研究[J]. *上海免疫学杂志*, 1990, 10(2): 65-68.
- [8] 赖增祖, 熊冬生, 杨纯正, 等. 抗 CD20 嵌合抗体 Fab' 片段在大肠杆菌中高效表达[J]. *高技术通讯*, 2000, 112(10): 9-12.
- [9] Beiske H, Clark EA, Holte H, *et al.* Triggering of neoplastic B cells via surface IgM and the cell surface antigen CD20 and CD40. Responses differ from normal blood B cells and are restricted to certain morphotogic subsets[J]. *Int J Cancer*, 1988, 42: 521-528.
- [10] Reff ME, Carner K, Chambers KS, *et al.* Depletion of B cell *in vivo* by a chimeric mouse human monolona antibody to CD20[J]. *Blood*, 1994, 83: 435-445.
- [收稿日期] 2003 - 02 - 20 [修回日期] 2003 - 05 - 10

欢迎订阅《癌变·畸变·突变》杂志

《癌变·畸变·突变》是中国科学技术协会主管、中国环境诱变剂学会(国家一级学会)主办的学术期刊,1989年创刊。本刊为《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国科学引文数据库》统计源期刊,《中国科技期刊引证报告》及《中国学术期刊文摘》收录期刊,由《中国期刊网》和《中国期刊全文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中文科技期刊数据库》、《中国生物医学文献数据库》、《中文生物医学期刊文献数据库》、《万方数据——数字化期刊群》全文收录。

本刊主要刊载医药品、化学物质、食品添加剂、化妆品、营养保健品、放射线,以及水体、空气、土壤等环境污染物与肿瘤发生、胎儿发育畸形和遗传基因突变的关系,以及癌变机制、抗癌物的开发利用、抗突变物的任用及其与抗癌物的关系、环境因子风险评价等方面的论著和检测研究。主要栏目有:论著、肿瘤防治、短篇报道、检测研究、技术与方法、综述等。

本刊读者对象为从事遗传学、毒理学、药理学、肿瘤学研究及环境保护、卫生防疫、计划生育、肿瘤防治、药品与生物制品研制等工作的科技人员和相关领域的大专院校师生。

本刊从今年起,封面纸张采用200克铜版纸(单面覆膜),内页采用105克进口哑粉纸,增加彩色图版。在排版、印刷、装订等方面已有明显提高,订价保持不变:每期6元,全年24元。

刊号:44-1063/R,ISSN 1004-616X,国内邮发代号:4-548,国际代号:6364Q。欢迎读者在当地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部邮购,免费邮寄。

编辑部地址:广东省汕头市新陵路22号(汕头大学医学院内)

邮编:515041

电话及传真:(0754)8900267

E-mail: cemsctm@stu.edu.cn