

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0096-04

## 抗人 DR5 单克隆抗体诱导 U343 细胞凋亡研究

庄国洪, 孙红光, 杜柏榕, 朱 迅(吉林大学基础医学院免疫教研室, 长春 130021)

**[摘要]** 目的: 探讨抗肿瘤坏死因子相关凋亡配体的死亡受体 DR5 单克隆抗体对神经胶质瘤细胞株 U343 的杀伤作用及机制。方法: 采用流式细胞仪从蛋白质水平定量地检测 DR5 在 U343 的表达; 用 RT-PCR 从 mRNA 水平检测 DR5 的表达; 免疫细胞化学法明确 DR5 在 U343 的分布情况。通过 MTT 法、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪 DNA 倍体分析, 观察抗人 DR5 单克隆抗体对 U343 细胞增殖的抑制活性及其诱导凋亡效应。结果: 神经胶质瘤细胞株 U343 表达死亡受体 DR5, DR5 分布于细胞内细胞核的周围。抗人 DR5 单克隆抗体 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 4 h 可明显杀伤 U343 细胞, 其机制与诱导凋亡有关。结论: 抗人 DR5 单克隆抗体可以诱导神经胶质瘤细胞株 U343 凋亡, 以死亡受体为靶点的抗体制剂为肿瘤治疗提供新的途径。

**[关键词]** 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 死亡受体; 凋亡

**[中图分类号]** R392.1 **[文献标识码]** A

## Induction of Apoptosis in U343 Cell Line by a Novel Anti-Human DR5 Monoclonal Antibody

ZHUANG Guo-hong, SUN Hong-guang, DU Bai-rong, ZHU Xun (Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effects and mechanism of a novel anti-human DR5 (death receptor 5 of TRAIL) monoclonal antibody to glioma cell lines U343. **Methods:** DR5 protein was tested quantitative through FCM; DR5 mRNA was observed through RT-PCR and distribution was tested by immunocytochemistry. Inhibitory effects and inducing apoptosis of anti-human DR5 monoclonal antibody to U343 were analysed by MTT, DNA Ladder, FCM. **Results:** The expression of death receptor 5 (DR5) was certificated in U343, DR5 appeared to be located in intracellular perinuclear compartment. Inhibitory effects of anti-human DR5 monoclonal antibody on U343 were achieved by 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  at 4 hours and the mechanism was associated with apoptosis. **Conclusion:** Apoptosis of glioma cell lines U343 can be induced by anti-human DR5 monoclonal antibody, and targeted on DR will provide new way to treating cancer.

**[Key words]** TRAIL; death receptor; apoptosis

\* TNF 相关的凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 是 Wiley<sup>[1]</sup> 新近发现的肿瘤坏死因子超家族成员。目前已确认了 TRAIL 的 5 种不同受体<sup>[2]</sup>, 其中死亡受体 TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) 均含死亡结构域并能向细胞内传递死亡信号, 当 TRAIL 与 DR 结合时可以诱导细胞死亡。其它 3 种受体 (TRAIL-R3, TRAIL-R4 和 OPG) 作为“诱骗受体”可以逃避 TRAIL 诱导的凋亡作用。以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗是目前该领域的热点, 人们已经构建了许多 TRAIL 重组体, 并作了大量功能实验。现有的研究证实, TRAIL 对于大多数来自骨髓、前列腺、乳腺、肺、肾、脑和皮肤的恶性肿瘤有抑制细胞生长和细胞毒

效应, 但 TRAIL 的肝毒性严重限制了其临床应用, 因此寻找高效低毒的死亡受体激活剂成为研究目标。Ichikawa 等<sup>[3]</sup> 用包含人 DR5 的外源序列和人 DR5-Ig Fc 段的融合蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备了 DR5 的特异单克隆抗体 TRA-8, 并发现 TRA-8 对正常肝细胞没有凋亡作用, 而原发性及转移性肝细胞癌对 TRA-8 敏感。目前利用抗 DR5 的特异单克隆抗体作用于神经胶质瘤细胞, 诱导其凋亡的研究未见报道。本实验旨

**[基金项目]** 教育部《跨世纪优秀人才培养计划》资助项目

**[作者简介]** 庄国洪 (1969-), 女, 吉林人, 博士研究生, 主要从事抗体基因工程研究

**[通讯作者]** 朱 迅, E-mail: zhuxun@sohu.com

在探讨抗 DR5 的特异单克隆抗体对神经胶质瘤细胞 U343 的作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

TRAIL 敏感及耐受神经胶质瘤细胞株 U343, U373 由加拿大阿尔伯塔大学郝春海教授惠赠, DMEM 培养基、Trizol 为美国 Gibco 公司产品; 抗人 DR5 McAb 由第四军医大学金伯泉教授惠赠, FITC-羊抗鼠 IgG, DNA Marker 购于北京鼎国生物技术发展中心; RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司; TRAILR2 引物由上海生工合成, 引物设计参照文献[4] P1 5'-GCC TCA GGA CAA TGA GAT AAA GGT GGC T-3', P2 5'-CCA AAT CTC AAA GTA CGC ACA AAC GG-3'。

### 1.2 FCM 分析死亡受体蛋白的表达

胰酶消化细胞, 调细胞浓度为  $1 \times 10^7$ /ml, 离心洗涤 3 min 后, 弃去上清, 加入抗人 DR5 McAb 在冰上反应 30 min, 洗涤 3 次, 然后加 FITC-羊抗鼠 IgG(1:100 稀释), 洗 3 次后, 用 Coulter Epics XL 型(美国产)流式细胞仪检测, 每个标本计数 10 000 个细胞。每组样品均设非特异性对照组。

### 1.3 RT-PCR 分析死亡受体 mRNA 的表达

参照文献[4]进行 RT-PCR 反应。

### 1.4 免疫细胞化学法检测死亡受体在细胞的分布

在细胞最佳生长状态时, 制片、固定、洗涤, 加入特异性一抗反应 30 min, PBS 洗涤 3 次, 加 FITC-羊抗鼠 IgG, 反应 30 min, PBS 洗涤 3 次, 10% 甘油封片。设非特异性对照组, 用共聚焦显微镜观察。

### 1.5 MTT 法检测抗人 DR5 McAb 对 U343 细胞增殖的抑制活性

细胞处理同前, 按 10.0, 3.0, 1.0, 0.3 及 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  加入抗人 DR5 McAb, 培养 4 h 后加 20  $\mu\text{l}$  MTT(7.5 mg/ml) 继续培养 4 h, 加 100  $\mu\text{l}$  异丙醇, OD<sub>570nm</sub> 测吸收值。本实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.6 琼脂糖凝胶电泳

细胞处理同前, 收集细胞, 调细胞浓度为  $5 \times 10^4$ /ml, 离心后沉淀加裂解液(100 mmol/L NaCl; 50 mmol/L Tris-HCl; 10 mmol/L EDTA; 0.5% SDS) 和蛋白酶 K(终浓度 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) 56 $^{\circ}\text{C}$  3 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 酚、氯仿/异丙醇抽提, 乙醇沉淀, 10 000 r/min, 离心 15 min, 50  $\mu\text{l}$  TE 溶解沉淀, 加 RNaseA 使其终浓度为 1 mg/ml, 然后进行琼脂糖凝胶电泳。

### 1.7 FCM 进行 DNA 倍体分析

细胞处理同前, 收集细胞, 调细胞浓度为  $2 \times 10^4$ /ml, 按参考文献[5]进行分析。

## 2 结果

### 2.1 DR5 的表达分析

经流式细胞仪对 U343 细胞 DR5 蛋白的表达进行分析, 证实 U343 细胞表面有 DR5 表达, 并且其平均表达量为 9.30%, 而 TRAIL 耐受株 U373 其平均表达量为 1.05%; 经 RT-PCR, 琼脂糖凝胶电泳, 检测到 DR5 mRNA 的表达, 即在 502 bp 处有一明显亮带, 结果与文献报道一致(图 1)。

图 1 RT-PCR 分析 DR5 mRNA 的表达

Fig. 1 DR5 mRNA expression

1: 100 ~ 1 200 bp mark; 2: Control; 3: 502 bp DR5

### 2.2 DR5 的分布分析

通过免疫细胞化学法, 经共聚焦显微镜观察发现, U343 细胞上有 DR5 表达, DR5 存在于细胞内细胞核的周围, 与文献报道相同<sup>[6]</sup>(图 2)。

图 2 免疫细胞化学法观察 DR5 在 V343 的分布

Fig. 2 Distribution of DR5 in V343 is observed by immunocytochemistry

### 2.3 抗人 DR5 McAb 对 U343 的作用

抗人 DR5 McAb 作用神经胶质瘤细胞株 U343 后, 细胞形态变化明显, 许多细胞变圆, 漂浮(图 3)。抗人 DR5 McAb 对 U343 杀伤的量效关系: 不同剂量的抗人 DR5 McAb 与神经胶质瘤细胞株 U343 共同孵育 4 h 后, 其对细胞生长的抑制率不同, 从 0.1 μg/ml 的 1.22% 上升至 10 μg/ml 的 17.64%(图 4)。

图 3 抗体作用 V343 后细胞形态的改变

Fig. 3 Changes of V343 cell morphology after anti-DR5 McAb treatment

A: Normal U343; B: Anti-DR5 McAb + U343

### 2.4 抗人 DR5 McAb 的作用机制

为探讨细胞形态的改变及细胞的死亡是否由凋亡所致, 本实验对死亡细胞进行了 DNA 抽提, 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示抗人 DR5 McAb 能诱导 U343 DNA 发生变化, 出现明显的 DNA 断裂形成的梯形条带现象, DNA 区带图谱( DNA ladder ), 说明抗人 DR5 McAb 对 U343 的生长抑制是通过诱导 U343 凋亡所致; 通过流式细胞仪进行 DNA 倍体分析发现抗人 DR5 McAb 3 μg/ml 作用 U343 后出现明显的凋亡峰, 其峰值为 16.76%, 而未加抗体的对照组为 2.32%, 进一步说明抗人 DR5 McAb 对 U343 的杀伤是由凋亡引起(图 5)。

图 4 不同浓度的抗体对 V343 细胞的杀伤

Fig. 4 Killing effects of anti-DR5 McAb with different concentration on V343

## 3 讨论

TRAIL 死亡受体的胞内区有一段 70 个氨基酸的死亡结构域, DR5 的过表达能引起 MCF7 和 HeLa 细胞凋亡。其机制可能是过表达的受体在细胞膜上自动形成三聚体而引起细胞凋亡信号传导。本实验证实 U343 细胞表面有 DR5 蛋白表达, 其平均表达量为 9.30%, 这一表达量虽不是很高, 但相对于 TRAIL 耐受株 U373 1.03% 的表达量还是相对较高, 差异较明显。U343 细胞 DR5 mRNA 的表达与蛋白表达一致, 并且通过免疫细胞化学法明确 DR5 分布于 U343 细胞内细胞核的周围, 这与文献报道相同。

图 5 U343 细胞凋亡片断凝胶电泳图

Fig. 5 DNA fragmentation of U343 cell

1: Normal U343; 2: Anti-DR5 McAb + U343

抗人 DR5 McAb 作用 U343 细胞 4 h 后, 细胞形态即有明显改变, 细胞变圆、漂浮。通过 MTT 法发现抗人 DR5 McAb 3 μg/ml 对 U343 细胞即有较强的杀伤作用。并且通过琼脂糖凝胶电泳可见明显的“梯状带”, FCM 检测可见典型的凋亡峰, 这说明抗人 DR5 McAb 不需要交联即可以直接诱导肿瘤细胞凋亡。进而证实 DR5 是诱导凋亡的重要受体, DR5 单独发挥作用足以引起肿瘤细胞凋亡。其它受体是否参与死亡信号的传递以及受体结合后的下游途径尚有待于进一步探讨。根据死亡受体诱导凋亡的机制, 如果把抗 DR5 McAb 交联以后再作用于 U343 细胞, 其诱导凋亡能力可能会更强。

抗人 DR5 McAb 可以直接诱导表达 DR5 的肿瘤细胞凋亡, 这一结果可以为肿瘤治疗提供一些新思路, 如

利用细胞因子、化疗药物、激素、离子射线等提高 DR 在肿瘤细胞的表达,再通过 DR 途径使肿瘤细胞凋亡,这样可以提高肿瘤细胞对化疗、放疗及 TRAIL 治疗的敏感性。

## 【参考文献】

- [1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, *et al.* Identification and characterization of new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1995, 3(6): 673-682.
- [2] Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family [J]. *Biol Chem*, 1996, 271(22): 12687-12690.
- [3] Ichikawa K, Liu W, Zhao L, *et al.* Tumoricidal activity of a novel

anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity [J]. *Nat Med*, 2001, 7(8): 954-960.

- [4] Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, *et al.* Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells [J]. *Immunol*, 1998, 161(6): 2833-2840.
- [5] Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry [J]. *Immunol*, 1991, 139(2): 271-279.
- [6] Zhang XD, AV Franco, T Nguyen, *et al.* Different localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cell [J]. *Immunol*, 2000, 164(8): 3961-3970.

[收稿日期] 2003-09-05

[修回日期] 2003-12-26

## · 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0099-01

# IFN- $\gamma$ 转基因治疗与重组 IFN- $\gamma$ 注射对肝转移癌小鼠的治疗作用

吴文溪<sup>1</sup>, 严鹏霄<sup>2</sup>, 丁强<sup>1</sup>, 沈历中<sup>1</sup>, 范萍<sup>3</sup>(1. 南京医科大学第一附属医院胃肠外科, 南京 210029; 2. 江苏省无锡卫生学校, 无锡 214028; 3. 南京医科大学第一附属医院外科研究室, 南京 210029)

转基因表达的 IFN- $\gamma$  可提高肿瘤细胞表面抗原的表达和激发宿主抗肿瘤免疫应答反应,这在肿瘤的基因免疫治疗中已得到人们的重视,但是对结肠癌肝转移模型的治疗作用鲜见报道。为了探讨转基因表达的 IFN- $\gamma$  和外源重组 IFN- $\gamma$  对结肠癌肝转移模型的作用,我们利用阳离子脂质体 Lipofectamine 将含 huIFN- $\gamma$  全长基因的真核表达质粒 pcDNA3-huIFN- $\gamma$  转染到小鼠结肠癌等细胞内,通过表达出的 huIFN- $\gamma$  发挥治疗作用并与外源重组的 huIFN- $\gamma$  作用进行比较。

本研究选用 BALB/c 小鼠 48 只,手术显露脾脏后,经脾注入  $1 \times 10^7$ /ml 浓度的小鼠结肠癌细胞 CT26 单细胞悬液 0.1 ml,建立小鼠结肠癌肝转移模型。将接种后小鼠随机分成 4 组(每组 12 只):A 组为转基因治疗组;B 组为重组 IFN- $\gamma$  持续给药组;C 组为空载质粒组;D 组为生理盐水对照组。术后第 2 日起分别进行不同的干预。A 组腹腔注射阳离子脂质体 Lipofectamine 和含 huIFN- $\gamma$  全长基因的真核表达质粒 pcDNA3-huIFN- $\gamma$  的混合液,1 周后重复 1 次;B 组:腹腔内注射重组 huIFN- $\gamma$ ,每日 1 次,连续 4 周;C 组:腹腔内注射空载质粒 pcDNA3 与 Lipofectamine 的混合液,1 周后重复 1 次;D 组:腹腔内注射生理盐水,每日 1 次,连续 4 周。实验数据以“均数  $\pm$  标准差”表示,并进行方差分析、Kruskal-Wallis 法统计分析等,经 SPSS10.0 软件进行统计。

本研究结果显示,经腹腔注入和阳离子脂质体 Lipofectamine 的介导,真核表达质粒 pcDNA3-huIFN- $\gamma$  能够成功转染并表达出一定浓度的血清 huIFN- $\gamma$  水平。与对照组 C,

D 比较,转基因治疗组和外源 IFN- $\gamma$  持续给药组血清 huIFN- $\gamma$  水平明显高于生理盐水对照组 ( $P < 0.01$ ) 和空载质粒组 ( $P < 0.01$ )。A 组和 B 组一半以上的小鼠未发生肝转移,发生肝转移的小鼠转移结节数目也较对照组明显少 ( $P < 0.05$ );A、B 组荷瘤小鼠平均自然生存期分别为 ( $39.5 \pm 5.6$ ) d, ( $40.8 \pm 4.7$ ) d,明显长于 C 组 ( $31.1 \pm 4.7$ ) d ( $P < 0.05$ ) 和 D 组 ( $29.0 \pm 3.5$ ) d ( $P < 0.01$ )。

文献报道经质粒转染的自分泌细胞因子比外源性细胞因子有着更好的局部亲和力,这与细胞因子自分泌或旁分泌抗肿瘤的免疫保护作用的生理模式是十分接近的;我们前期工作已报道,导入的细胞因子基因能在局部较长时间表达。这也避免了全身性应用可能引发的严重毒副作用。尽管 IFN- $\gamma$  生物效能较高,但生物半衰期短,相比之下,IFN- $\gamma$  的转基因治疗比重组 IFN- $\gamma$  反复地注射方式更具有优越性。

通过质粒转染与重组 IFN- $\gamma$  比较性研究,初步显示 IFN- $\gamma$  能减缓结肠癌的早期肝转移,转基因组能够达到重组 IFN- $\gamma$  持续给药组相似的作用。这为最终临床应用 IFN- $\gamma$  转基因治疗提供一定的依据。

[关键词] IFN- $\gamma$ ; 质粒; 基因治疗; 结肠癌; 肝转移

[中国分类号] R735.3+5; Q785 [文献标识码] D

[收稿日期] 2003-08-27

[修回日期] 2003-12-20

[基金项目] 江苏省教育厅重点学科基金资助项目(H200212)