

## · 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.006

**AntiMRP3( scFv )-sTRAIL 靶向诱导多形性成胶质细胞瘤的凋亡**

倪长伟<sup>1</sup>, 郎悦<sup>2</sup>, 赵辰阳<sup>2</sup>, 苏静<sup>2</sup>, 乐媛<sup>3</sup>, 王梁华<sup>3▲</sup>, 尹剑<sup>2</sup>( 1. 大连医科大学 附属第二医院 神经内科, 辽宁 大连 116027; 2. 大连医科大学 附属第二医院 神经外科, 辽宁 大连 116027; 3. 第二军医大学 基础医学部 生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433 )

**[摘要]** **目的:** 观察抗人类多药耐药相关蛋白 3( multidrug resistance protein 3, MRP3 )的单链抗体与可溶性坏死因子相关凋亡诱导配体( soluble TNF-related apoptosis inducing ligand, sTRAIL )的融合蛋白 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 对多形性成胶质细胞瘤( glioblastoma multiforme, GBM )U251 细胞凋亡的影响, 并探讨其机制。 **方法:** MTT 法检测不同浓度 antiMRP3( scFv )-sTRAIL ( 3.9063 ~ 250 nmol/L )作用后 U251 细胞的存活率。给予亲代 antiMRP3( scFv )或 TRAIL 活性中和抗体 mAb 2E5 预孵育, 应用 IC<sub>50</sub> 剂量的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 作用 U251 细胞, 流式细胞仪检测 U251 细胞的凋亡率, Western blotting 检测 U251 细胞中 caspase-3 的激活及其关键底物 DNA 裂解因子( DNA fragmentation factor, DFF )的降解。 **结果:** 随着 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 浓度的增加, U251 细胞的存活率逐渐降低[ ( 84.84 ± 0.2 )% ~ ( 19.93 ± 1.8 )% ]; IC<sub>50</sub> 剂量( 62.5 nmol/L )的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 单独或给予 antiMRP3( scFv )、mAb 2E5 预孵育后处理, 致 U251 细胞的凋亡率分别为( 58.0 ± 1.3 )%、( 14.9 ± 1.7 )% 和( 17.4 ± 3.0 )%; antiMRP3( scFv )或 mAb 2E5 预孵育均可阻断 U251 细胞中 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 诱导的 caspase-3 的激活及 DFF 的裂解。 **结论:** AntiMRP3( scFv )-sTRAIL 促进 sTRAIL 靶向识别并诱导 GBM 细胞凋亡, 为开发靶向性抗肿瘤药物奠定了基础。

**[关键词]** 多形性成胶质细胞瘤; 单链抗体; 多药耐药相关蛋白 3; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

**[中图分类号]** R734.2; R730.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2012)03-0261-06

**Targeted apoptosis induction of antiMRP3( scFv )-sTRAIL toward glioblastoma multiforme**

NI Chang-wei<sup>1</sup>, LANG Yue<sup>2</sup>, ZHAO Chen-yang<sup>2</sup>, SU Jing<sup>2</sup>, LE Yuan<sup>3</sup>, WANG Liang-hua<sup>3▲</sup>, YIN Jian<sup>2</sup>( 1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning, China; 2. Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical Department, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China )

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of antiMRP3( scFv )-sTRAIL on apoptosis in glioblastoma multiforme ( GBM ) U251 cells and to study its mechanism. **Methods:** Different concentration of antiMRP3( scFv )-sTRAIL ( 3.9063 nmol/L - 250 nmol/L ) was added into U251 cells, and then the viability was examined by MTT assay. IC<sub>50</sub> dose of antiMRP3( scFv )-sTRAIL was added into U251 cells, in the presence or absence of parental antiMRP3( scFv ) and the TRAIL-neutralizing mAb 2E5. The apoptotic percentage of U251 cells was examined by flow cytometry, and Western blotting was used to detect caspase-3 activation and DNA fragmentation factor ( DFF ) degradation in U251 cells. **Results:** When the concentration of antiMRP3( scFv )-sTRAIL increased ( 3.9063 nmol/L - 250 nmol/L ), the viability of U251 cells became lower synchronously ( [ 84.84 ± 0.2 ]% - [ 19.93 ± 1.8 ]% ); The apoptotic rates of U251 cells induced by

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目( No. 30571906 ); 国家新药创制科技重大专项课题资助项目( No. 2009ZX09102-234; No. 2009ZX09103-689 )。Project supported by the National Natural Science Foundation of China ( No. 30571906 ), and the Major Science and Technology Special Project for "Significant New Drug Creation" of China ( No. 2009ZX09102-234; No. 2009ZX09103-689 )

**[作者简介]** 倪长伟( 1981 - ), 男, 辽宁省大连市人, 博士, 主要从事肿瘤治疗的临床与基础的研究。E-mail: nichangwei040420@163.com

**[通信作者]** 尹剑( YIN Jian, corresponding author ): E-mail: dr.yin@139.com; 王梁华( WANG Liang-hua, corresponding author ): E-mail: wsh928@hotmail.com。▲为共同通信作者

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20120529.1528.003.html>

IC<sub>50</sub> dose (62.5 nmol/L) of antiMRP3(scFv)-sTRAIL or antiMRP3(scFv)-sTRAIL with parental antiMRP3(scFv) and mAb 2E5 were (58.0 ± 1.3)%, (14.9 ± 1.7)% and (17.4 ± 3.0)%, respectively; antiMRP3(scFv) and the mAb 2E5 significantly inhibited the activation of caspase-3 and the degradation of DFF in U251 cells induced by antiMRP3(scFv)-sTRAIL. **Conclusion:** Targeted binding of antiMRP3(scFv)-sTRAIL to GBM increases the apoptosis induction activity of sTRAIL, which lays a foundation for further study on tumor-targeting drugs.

[ **Key words** ] glioblastoma multiforme; single-chain antibody; multidrug resistance protein 3; tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

[ Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 261-266 ]

长久以来,多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme, GBM)的发病机制和治疗是神经外科基础与临床研究面临的难题之一。数十年来,GBM的临床疗效没有取得根本性突破。传统的放疗由于缺乏特异性,疗效有限,同时也给患者带来较大毒性作用。近年提出了针对肿瘤抗原的“抗体导向”治疗新理念,是肿瘤免疫治疗的新的发展方向<sup>[1]</sup>。“抗体导向”治疗以肿瘤细胞所具有的特异性抗原或受体作为分子靶点,通过能与这些靶分子特异结合的抗体特异性识别肿瘤,进行靶向治疗,相对于传统治疗更能选择性杀伤肿瘤细胞,减少对正常组织的损伤。人类多药耐药相关蛋白3(multidrug resistance protein 3, MRP3)是一种多药物和有机阴离子转运体,是MRP家族主要成员之一。在人类肿瘤中,MRP3可降低肿瘤细胞内药物浓度而使肿瘤发生耐药,导致治疗失败<sup>[2]</sup>。MRP3在人类GBM实体瘤和细胞系中均呈高水平表达,相反,MRP3在正常脑组织中不表达。因此,作为GBM靶向治疗的理想分子靶点,MRP3具有高度的肿瘤特异性<sup>[3,4]</sup>。在此前的研究中,利用基因重组技术,将抗MRP3的单链抗体(single-chain antibody fragment, scFv)基因与可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(soluble TNF-related apoptosis inducing ligand, sTRAIL)基因通过柔性氨基酸连接臂(Gly4-Ser3)相连,并通过pMAL原核表达系统成功表达和纯化了抗MRP3的单链抗体与sTRAIL的融合蛋白antiMRP3(scFv)-sTRAIL。本研究以MRP3阳性人GBM细胞U251为模型<sup>[4]</sup>,体外研究antiMRP3(scFv)-sTRAIL对GBM细胞凋亡的影响,并探讨其相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

人GBM细胞株U251购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,细胞采用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基培养,在5% CO<sub>2</sub>饱和湿度、37℃培养箱中培养至对数生长期。DMEM高糖

培养基、FBS购自Biowest公司,二甲基亚砜(DMSO)购自IDT Biologika公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物公司,caspase-3、DFF多克隆抗体、羊抗兔IgG第二抗体购自美国Protein Tech Group公司,人源TRAIL活性中和抗体mAb 2E5购自Enzo Life Science公司。麦芽糖结合蛋白(maltose binding protein, MBP)及附带MBP标签肽的单链抗体antiMRP3(scFv)和antiMRP3(scFv)-sTRAIL由本室构建。

### 1.2 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL对U251细胞的杀伤实验

收集传代培养状态良好的人U251胶质瘤细胞,以 $1 \times 10^5$ /ml密度接种于96孔培养板,每孔 $1 \times 10^4$ 个细胞,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱过夜培养。24 h后弃去培养液,每孔单独加100 μl经培养液(DMEM + 10% FBS)倍比稀释的纯化antiMRP3(scFv)-sTRAIL,或分别加亲代antiMRP3(scFv)和TRAIL活性中和抗体mAb 2E5,预孵育45 min,以MBP为阴性对照,每组平行5复孔。培养48 h后,倒置显微镜下观察U251细胞形态。行MTT还原实验,每孔加入5 mg/ml MTT溶液20 μl,继续在37℃、5% CO<sub>2</sub>环境下孵育4 h后终止培养,小心弃掉培养板孔内培养液,每孔加100 μl DMSO,振荡10 min至紫色结晶完全溶解,在酶联检测仪上检测96孔的D<sub>595</sub>值,计算不同浓度融合蛋白(3.9063 ~ 250 nmol/L)单独或与等摩尔浓度的antiMRP3(scFv)及mAb 2E5(1 μg/ml)联合作用于U251细胞后的存活率。细胞存活率(%) = (实验组D<sub>595</sub> - 空白组D<sub>595</sub>) / (对照组D<sub>595</sub> - 空白组D<sub>595</sub>) × 100%。

### 1.3 流式细胞仪检测U251细胞凋亡

用Annexin V-FITC和PI双标记法检测U251细胞凋亡率。将对数生长期U251细胞用胰酶和EDTA联合消化以后,制成 $1 \times 10^5$ /ml的细胞悬液,接种于6孔培养板,每孔接种 $2 \times 10^5$ 个细胞,置37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h。取以上MTT实验结果中antiMRP3(scFv)-sTRAIL作用的IC<sub>50</sub>剂量为

实验剂量,分4组给药:即空白对照组, antiMRP3(scFv)-sTRAIL组, antiMRP3(scFv)预孵育加 antiMRP3(scFv)-sTRAIL组, mAb 2E5 预孵育加 antiMRP3(scFv)-sTRAIL组。于37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养条件下预孵育45 min。各药物组作用24 h以后, 800 × g 离心5 min 收集细胞。用PBS洗涤细胞2次,加入500 μl 的结合缓冲液悬浮细胞,用 Annexin V-FITC 和 PI 于4℃下避光孵育15 min 后,在1 h 内用流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)检测。

#### 1.4 Western blotting 法检测 U251 细胞中 caspase-3 的激活及 DFF 的裂解

将人 U251 胶质瘤细胞置于含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解缓冲液(150 mmol/L NaCl、1 mmol/L NP-40、0.5 mmol/L 去氧胆酸及 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)中,置室温1 h,12 000 × g 离心10 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。将同一蛋白浓度的各药物组蛋白样品煮沸3~5 min,分别加入4%~15% 十二烷基硫酸钠的聚丙烯酰胺凝胶,200 V 下电泳45~60 min。将带有蛋白条带的凝胶转移至硝酸纤维膜(美国 PALL 公司),在90 V 下转膜1 h,将其置于3% 无脂牛奶中1 h 去除非特异性染色后取出,加第一抗体(抗体稀释液使用1% 小牛血清、Tris-HCl、Tween20)于硝酸纤维膜,室温下摇床孵育1 h,漂洗3次后加 HRP 标记的第二抗体,继续室温摇床孵育1 h,漂洗3次,用放射自显影法检测目的蛋白条带,Kodak X 胶片摄影。印迹条带必要时经灰度扫描后以 Quantity one 4.4.0 软件分析。

#### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件,单独给药组与联合给药组细胞凋亡率的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL 对 U251 细胞的杀伤

MTT 法检测 antiMRP3(scFv)-sTRAIL 作用后 U251 细胞的存活率,结果(图1)表明, antiMRP3(scFv)-sTRAIL 呈现较强的杀伤作用,在24 h 内,随融合蛋白浓度增加,U251 细胞存活率逐渐降低[(84.84 ± 0.20)% ~ (19.93 ± 1.80)%]。预先给予等浓度 antiMRP3(scFv)或 TRAIL 活性中和抗体 mAb 2E5(1 μg/ml)预孵育45 min,融合蛋白对 U251 细胞的杀伤作用被显著抑制,各浓度梯度下均无明显的杀伤活性。MBP 对 U251 细胞的存活率没有明显影响。antiMRP3(scFv)-sTRAIL 对 U251 细胞的杀伤作用与其余各组比较差异有统计学意义

( $P < 0.01$ )。

### 2.2 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL 作用后 U251 细胞的形态改变

倒置显微镜下观察 U251 细胞形态发现, antiMRP3(scFv)-sTRAIL 组(图2A)U251 细胞形态学上发生明显改变,可见细胞突起缩短或消失,胞体皱缩、变圆、折光率增强,漂浮细胞随作用时间延长逐渐增多,贴壁细胞减少,胞质中颗粒增多; antiMRP3(scFv)或 mAb 2E5 联合 antiMRP3(scFv)-sTRAIL 组(图2B、2C)细胞生长较好,突起密集,胞体透亮,形态饱满,与未加药物的空白对照组(图2D)镜下细胞形态无明显差异。

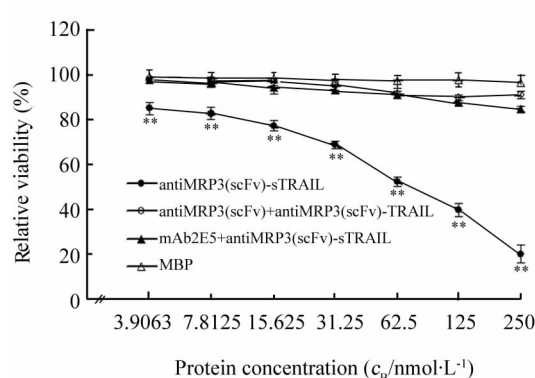


图1 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL 对 U251 细胞的杀伤  
Fig. 1 Cytotoxic effect of antiMRP3(scFv)-sTRAIL against U251 cells

\*\*  $P < 0.01$  vs MBP

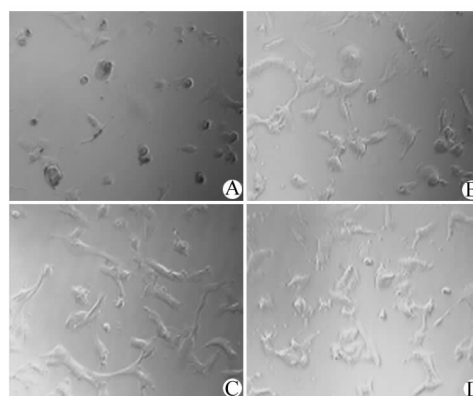


图2 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL 作用后 U251 细胞的形态改变(×250)

Fig. 2 Morphological change of U251 cells treated with antiMRP3(scFv)-sTRAIL(×250)

A: AntiMRP3(scFv)-sTRAIL; B: AntiMRP3(scFv) + AntiMRP3(scFv)-sTRAIL; C: mAb 2E5 + AntiMRP3(scFv)-sTRAIL; D: Control

2.3 AntiMRP3(scFv)-sTRAIL 诱导 U251 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果表明: IC<sub>50</sub> 剂量( 62. 5 nmol/L)的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 作用于 U251 细胞 24 h 后,细胞凋亡率为( 58. 0 ± 1. 3 )%( 图 3 B ); 给予等浓度的 antiMRP3( scFv )或 mAb 2E5( 1 μg/ml)预孵育 45 min、IC<sub>50</sub> 剂量的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 作用 24 h, U251 细胞的凋亡率分别为( 14. 9 ± 1. 7 )%( 图 3 C )和( 17. 4 ± 3. 0 )%( 图 3 D );未加药物的空白对照组细胞凋亡率为( 8. 7 ± 0. 8 )%( 图 3 A )。结果表明,与其他各组比较, antiMRP3( scFv )-sTRAIL 可显著诱导 U251 细胞凋亡( P < 0. 01 ), 而 antiMRP3( scFv )联合 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 组、mAb 2E5 联合 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 组、空白对照组 3 组间细胞凋亡率差异均无统计学意义( P > 0. 05 )。

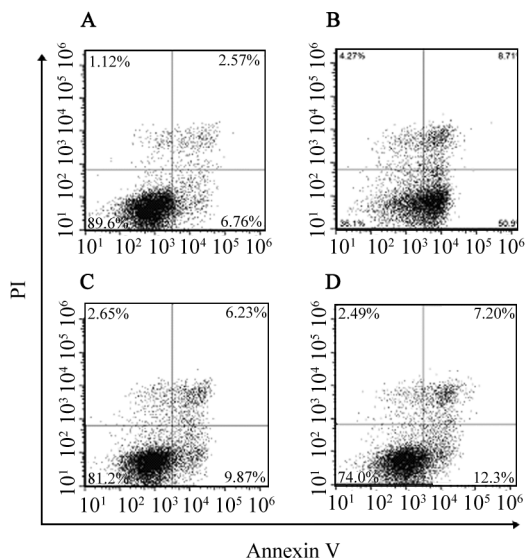


图 3 AntiMRP3( scFv )-sTRAIL 诱导 U251 细胞凋亡

Fig. 3 Apoptosis of U251 cells induced by antiMRP3( scFv )-sTRAIL

- A: Control; B: AntiMRP3( scFv )-sTRAIL;
- C: AntiMRP3( scFv ) + AntiMRP3( scFv )-sTRAIL;
- D: mAb 2E5 + AntiMRP3( scFv )-sTRAIL

2.4 U251 细胞中 caspase-3 的激活及 DFF 的裂解

IC<sub>50</sub> 剂量的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 作用 U251 细胞 24 h 后,检测 U251 细胞中 caspase-3 的激活及其关键底物 DFF 的裂解,结果( 图 4 )显示,与未处理组相比,融合蛋白处理组细胞的 caspase-3 激活水平明显升高,相应的底物蛋白 DFF 被裂解。而同样浓度的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 作用于经 antiMRP3( scFv )或 mAb 2E5 预处理过的 U251 细胞后,未检

测到激活的 caspase-3 蛋白条带及 DFF 裂解条带。因此, antiMRP3( scFv )-sTRAIL 可显著诱导 caspase-3 的激活,并导致 caspase-3 底物 DFF 发生裂解, antiMRP3( scFv )或 mAb 2E5 预处理均可阻断 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 的凋亡诱导作用,因此无激活 caspase-3 条带的产生及对应底物 DFF 的裂解。

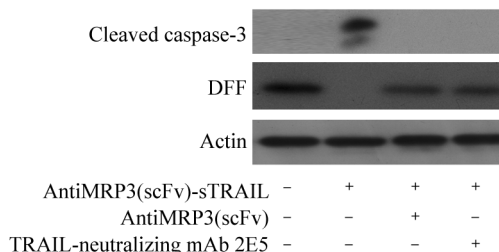


图 4 U251 细胞中 caspase-3 的激活及 DFF 的裂解

Fig. 4 Caspase-3 activation and DFF degradation in U251 cells

3 讨论

TRAIL 又称凋亡素-2 配体( apoptosis-2 ligand, APO-2L ),是 TNF 超家族成员<sup>[5]</sup>。天然 TRAIL 为 II 型跨膜蛋白,主要表达于 NK 细胞等免疫效应细胞,以同源三聚体的活性形式存在。TRAIL 胞外区含有蛋白酶作用位点,可以从细胞膜上被剪切下来,形成可溶性 sTRAIL。sTRAIL 有寡聚化倾向而形成同源三聚体,仍然保留天然 TRAIL 的生物活性<sup>[5]</sup>。目前,已研发多种形式的人类重组 sTRAIL,包括 FLAG、HIS 以及不含标签的重组 sTRAIL,对一系列人类肿瘤细胞均呈现出显著的凋亡诱导效应。sTRAIL 可能是目前最理想的抗肿瘤药物之一,其理想应用前景是基于对肿瘤细胞的选择性凋亡诱导作用,而对正常细胞无毒性<sup>[5-6]</sup>。现阶段, sTRAIL 已进入 I 期临床试验并取得较大进展。初步数据表明,人体对 sTRAIL 耐受性较好,未发现毒性作用<sup>[7-11]</sup>。一项小规模临床试验显示,4 例慢性 B 淋巴细胞白血病患者在联合应用 sTRAIL 和利妥昔单抗( rituximab )后,其中 2 例患者对药物完全反应,1 例部分反应<sup>[9]</sup>。近期一项大规模临床试验报道<sup>[11]</sup>, 71 例晚期癌患者在给予重组 sTRAIL 治疗 6 个月后,46% 患者病情得到稳定控制或改善,且未观察到毒性反应。然而, sTRAIL 用于治疗肿瘤也存在诸多问题: 首先,在人体正常组织器官广泛分布的 TRAIL 受体会起到分子筛的作用,降低到达肿瘤部位的 sTRAIL 药物浓度;其次,与天然 TRAIL 相比, sTRAIL 并不

能有效激活 TRAIL-R2,而包括 GBM 在内的绝大多数人类肿瘤中,TRAIL-R2 的表达水平高于 TRAIL-R1,因而在介导 TRAIL 凋亡信号中处于主导地位<sup>[12]</sup>;此外,sTRAIL 在体内半衰期不足 30 min,影响肿瘤部位药物富集,这些均限制了 sTRAIL 的临床疗效<sup>[7]</sup>。

近年,将人类重组 sTRAIL 与 scFv 融合,构建 scFv-sTRAIL 融合蛋白,有效克服了 sTRAIL 应用于肿瘤治疗上的诸多问题。首先,scFv-sTRAIL 相对分子质量约为 150 000,从肾脏排泄时间显著延长,因而克服 sTRAIL 在体内作用时间上的不足<sup>[13]</sup>;其次,通过 scFv 与肿瘤细胞所特有的表面抗原的特异性结合,将 sTRAIL 靶向递送至肿瘤细胞膜表面,以“自分泌”或“旁分泌”的形式富集于肿瘤病灶,增加肿瘤部位的 sTRAIL 浓度,从而有效减少 sTRAIL 的给药剂量<sup>[14-15]</sup>;不仅如此,对于靶点分子阴性表达的肿瘤细胞,仍然可以通过“旁观者”效应诱导其凋亡。这对于细胞间存在高度异质性的恶性肿瘤,如 GBM 显得尤为重要<sup>[15]</sup>;最为关键的是,scFv-sTRAIL 将 sTRAIL 由可溶性形式转变为天然 TRAIL 的膜结合形式,不仅能够激活 TRAIL-R1,而且恢复了对 TRAIL-R2 的激活作用,从而增强凋亡诱导活性,高效杀伤肿瘤细胞<sup>[16-17]</sup>。

迄今为止,国外相继报道了多种 scFv-sTRAIL 形式的融合蛋白,分别针对不同肿瘤细胞特异性表面抗原或受体分子,如肿瘤间质标志成纤维激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)、表皮细胞黏附分子(epithelial cell adhesion molecule, EAM)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、肿瘤特异性电压门控性钾离子通道 KV10.1,以及多种白血病细胞表面抗原 CD7、CD19、CD33,对人类肿瘤细胞发挥靶向凋亡诱导作用,疗效均显著优于单一 sTRAIL<sup>[14-20]</sup>。此外,scFv-sTRAIL 仅当单链抗体部分结合至肿瘤细胞靶抗原之后才获得凋亡诱导活性,而非靶向结合的 scFv-sTRAIL 并不表现出凋亡诱导作用。因此,scFv-sTRAIL 作为免疫毒素类药物,应用于肿瘤治疗具有更高的安全性<sup>[13]</sup>。

本研究首次以 GBM 细胞膜表面抗原 MRP3 为分子靶点,克隆表达抗 MRP3 的 scFv 与 sTRAIL 的融合蛋白 antiMRP3( scFv )-sTRAIL,通过 antiMRP3( scFv )与 MRP3 的特异结合,加强 sTRAIL 在 GBM 细胞上的富集,达到靶向诱导 GBM 凋亡的目的,同时获得更高的药物安全性。体外研究显示,antiMRP3( scFv )-sTRAIL 具有较强诱导 GBM 细胞 U251 凋亡的作用。通过亲代 antiMRP3( scFv )预孵

育,竞争性阻断 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 与 MRP3 的靶向结合;或通过 TRAIL 中和抗体 mAb 2E5 中和 TRAIL 的生物学活性,antiMRP3( scFv )-sTRAIL 对肿瘤细胞的杀伤效应被完全阻断。由此证明,antiMRP3( scFv )-sTRAIL 通过单链抗体 antiMRP3( scFv )与 MRP3 的特异性结合,靶向诱导 GBM 细胞凋亡,诱导凋亡活性是由 sTRAIL 部分介导的,其凋亡诱导作用具有肿瘤特异性。

AntiMRP3( scFv )-sTRAIL 相对较大的分子质量使其不易通过血脑屏障,因此,血脑屏障是这一类大分子药物全身用药的主要障碍。由于药物的扩散速度与分子质量呈反比,即使采取局部直接注射,这类药物也只能扩散至注射点周围数毫米处<sup>[21]</sup>。颅内正压导管给药是解决这一问题的理想给药方式。临床前研究和 I 期临床试验证明,通过颅内正压导管给药可增强大分子免疫毒素在 GBM 的空间分布,而且这种给药方式对 GBM 是安全有效的<sup>[22]</sup>。因此,antiMRP3( scFv )-sTRAIL 可能更适用于 GBM 患者术后颅内正压导管给药,作为传统治疗的辅助治疗,用于防止肿瘤复发。总之,单链抗体导向的 antiMRP3( scFv )-sTRAIL 以其优越的靶向性和可靠的安全性有望成为治疗 GBM 的新型候选药物。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Kaur S, Venktaraman G, Jain M, et al. Recent trends in antibody-based oncologic imaging [ J ]. *Cancer Lett*, 2012, 315 ( 2 ): 97-111.
- [ 2 ] Haga S, Hinoshita E, Ikezaki K, et al. Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human glioma [ J ]. *Jpn J Cancer Res*, 2001, 92 ( 2 ): 211-219.
- [ 3 ] Kuan CT, Srivastava N, McLendon RE, et al. Recombinant single-chain variable fragment antibodies against extracellular epitopes of human multidrug resistance protein MRP3 for targeting malignant gliomas [ J ]. *Int J Cancer*, 2010, 127( 3 ): 598-611.
- [ 4 ] Kuan CT, Wakiya K, Herndon JE 2nd, et al. MRP3: A molecular target for human glioblastoma multiforme immunotherapy [ J ]. *BMC Cancer*, 2010, 10( 1 ): 468-483.
- [ 5 ] Mohr A, Albarenque SM, Deedigan L, et al. Targeting of XIAP combined with systemic mesenchymal stem cell-mediated delivery of sTRAIL ligand inhibits metastatic growth of pancreatic carcinoma cells [ J ]. *Stem Cells*, 2010, 28 ( 11 ): 2109-2120.
- [ 6 ] Gonzalez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL [ J ]. *Oncogene ( Epub )*, 2010, 29 ( 34 ): 4752-4765.
- [ 7 ] Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: The potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand ( rhApo2L/TRAIL ) [ J ]. *J Clin Oncol*, 2008, 26 ( 21 ): 3621-3630.

- [ 8 ] Hotte SJ, Hirte HW, Chen EX, et al. A phase I study of mapatumumab ( fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1 ) in patients with advanced solid malignancies [ J ]. Clin Cancer Res, 2008, 14 ( 11 ): 3450-3455.
- [ 9 ] Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer [ J ]. Cytokine Growth Factor Rev, 2008, 19 ( 3/4 ): 325-331.
- [ 10 ] Soria JC, Smit E, Khayat D, et al. Phase I b study of dulanermin ( recombinant human Apo2L/TRAIL ) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer [ J ]. J Clin Oncol, 2010, 28 ( 9 ): 1527-1533.
- [ 11 ] Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer [ J ]. J Clin Oncol, 2010, 28 ( 17 ): 2839-2846.
- [ 12 ] Mühlentbeck F, Schneider P, Bodmer JL, et al. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation [ J ]. J Biol Chem, 2000, 275 ( 41 ): 32208-32213.
- [ 13 ] de Bruyn M, Bremer E, Helfrich W. Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer [ J ]. Cancer Lett, 2011, [ Epub ahead of print ].
- [ 14 ] Bremer E, de Bruyn M, Samplonius DF, et al. Targeted delivery of a designed sTRAIL mutant results in superior apoptotic activity towards EGFR-positive tumor cells [ J ]. J Mol Med, 2008, 86 ( 8 ): 909-924.
- [ 15 ] Bremer E, Samplonius D, Kroesen BJ, et al. Exceptionally potent anti-tumor bystander activity of an scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for EGP2 toward target antigen-negative tumor cells [ J ]. Neoplasia, 2004, 6 ( 5 ): 636-645.
- [ 16 ] Wajant H, Moosmayer D, Wüest T, et al. Differential activation of TRAIL-R1 and -R2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative [ J ]. Oncogene, 2001, 20 ( 30 ): 4101-4106.
- [ 17 ] Bremer E, Kuijlen J, Samplonius D, et al. Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by a scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma associated antigen EGP2 [ J ]. Int J Cancer, 2004, 109 ( 2 ): 281-290.
- [ 18 ] Stieglmaier J, Bremer E, Kellner C, et al. Selective induction of apoptosis in leukemic B-lymphoid cells by a CD19-specific TRAIL fusion protein [ J ]. Cancer Immunol Immunother, 2008, 57 ( 2 ): 233-246.
- [ 19 ] ten Cate B, Bremer E, de Bruyn M, et al. A novel AML-selective TRAIL fusion protein that is superior to gemtuzumab ozogamicin in terms of *in vitro* selectivity, activity and stability [ J ]. Leukemia, 2009, 23 ( 8 ): 1389-1397.
- [ 20 ] Bremer E, Samplonius DF, van Genne L, et al. Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor ( EGFR ) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand ( TRAIL ) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR [ J ]. J Biol Chem, 2005, 280 ( 11 ): 10025-10033.
- [ 21 ] Bigner DD, Brown MT, Friedman AH, et al. Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: Phase I trial results [ J ]. J Clin Oncol, 1998, 16 ( 6 ): 2202-2212.
- [ 22 ] Hall WA, Rustamzadeh E, Asher AL. Convection-enhanced delivery in clinical trials [ J ]. Neurosurg Focus, 2003, 14 ( 2 ): e2.
- [ 收稿日期 ] 2012-03-21 [ 修回日期 ] 2012-04-27  
[ 本文编辑 ] 韩丹

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体、有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关标准和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

(1)生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌 *Escherichia coli*、幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 等。(2)各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性 X 智力低下基因 1 的符号为 *FMR1*、原癌基因 *RAF1* (人)、病毒癌基因 *v-raf-1* (鼠)、抑癌基因 *p53* (鼠)等。(3)限制性内切核酸酶缩写符号中前 3 个字母应斜体,例如 *Hind* III、*Bam* HI、*Sal* I 等。(4)各种统计学符号应斜体,例如样本数 *n*、均数  $\bar{x}$ 、样本差 *s*、*t* 检验、*F* 检验、概率 *P*、相关系数 *r* 等。(5)各种物理量的量符号应斜体(*pH* 用正体除外),例如长度 *L* (*l*)、面积 *A* (或 *S*)、体积 *V*、质量 *m*、时间 *t*、压力 *p*、相对分子质量 *M<sub>r</sub>*、物质的量浓度 *c<sub>B</sub>* 等。(6)化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基等符号应斜体,例如左旋 *L*-、右旋 *D*-、邻位 *o*-、对位 *p*-、反式 *trans*-、顺式 *cis*-等。(7)数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。(8)英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如 *vs*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro* 等。

(本刊编辑部)