

## 亚毒性剂量阿霉素提高抗人 DR4、DR5 抗体诱导的神经胶质瘤细胞凋亡的研究

庄国洪<sup>2</sup>, 宋玉国<sup>3</sup>, 毕胜利<sup>3</sup>, 杜柏榕<sup>1</sup>, 朱 迅<sup>1\*</sup> (吉林大学基础医学院免疫学教研室, 吉林 长春 130021; <sup>2</sup>厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005; <sup>3</sup>北华大学医学院临床免疫研究室, 吉林 吉林 132011)

### Enhancement of glioma cell apoptosis induced by anti-human DR5/DR4 monoclonal antibodies by sub-toxic dose of doxorubicin in human

ZHUANG Guo-hong<sup>2</sup>, SONG Yu-guo<sup>3</sup>, B I Sheng-li<sup>3</sup>, DU Bai-rong<sup>1</sup>, ZHU Xun<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology, School of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021; <sup>2</sup>Cancer Research Center, Xiamen University Medical College, Xiamen 361005; <sup>3</sup>Department of Clinical Immunology, Beihua University Medical College, Jilin 132011, China

**[ Abstract ]** **AM:** To study the cytotoxic effects of doxorubicin on apoptosis in glioma cell lines U343, U138, U373 induced by anti-human DR4/DR5 monoclonal antibodies (FMU1.4/FMU1.5) and the underlying mechanism. **METHODS:** Expression of DR4/DR5 was quantitated by flow cytometry. Cytotoxicity exerted by FMU1.4/FMU1.5 on three cell lines was measured by MTT colorimetry and the induced apoptosis was determined by agarose gel electrophoresis. The expression of cytochrome C, FLIP and Ca<sup>2+</sup> concentration were also measured. **RESULTS:** Following the treatment of doxorubicin DR4 and DR5 were highly expressed on the cell surface; The apoptosis of U138 and U373 induced by FMU1.4 and FMU1.5 was stronger expression of cytochrome C and Ca<sup>2+</sup> concentration were enhanced, whereas the expression of FLIP was downregulated. **CONCLUSION:** Subtoxic doxorubicin applied with antibodies caused higher cell death rate of glioma cells, which may be relevant to DR4/DR5, the release of cytochrome C and FLIP and Ca<sup>2+</sup> concentration.

**[ Keywords ]** TRAIL; death receptor; apoptosis; doxorubicin

收稿日期: 2006 - 02 - 27; 接受日期: 2006 - 05 - 08

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才培养计划资助项目 (2000年)

作者简介: 庄国洪 (1969 - ), 女, 吉林省吉林市人, 讲师, 博士

Te: 0592-2186980; E-mail: zhuanguohong@yahoo.com.cn

\* Corresponding author, E-mail: zhuxun@sohu.com

**[摘要]** 目的: 探讨亚毒性剂量的阿霉素影响抗 DR4、DR5 单克隆抗体 (mAb) FMU1.4 和 FMU1.5 诱导 3 株神经胶质瘤细胞株 U343 (TRAIL 敏感株)、U138 (TRAIL 部分敏感株) 及 U373 (TRAIL 耐受株) 凋亡的作用及可能的机制。方法: 采用流式细胞术检测 DR4、DR5 的表达及神经胶质瘤细胞中 DNA 倍增。用 MTT 比色法检测 mAb FMU1.4 和 FMU1.5 对 3 株神经胶质瘤细胞增殖的抑制作用。用共聚焦显微镜观察 3 株细胞中 Ca<sup>2+</sup> 的浓度。以 Western blot 检测细胞内色素 C、FLIP [FLICE-inhibitory protein, 为一组含有死亡效应结构域 (DED) 的胞浆蛋白] 的表达。结果: 亚毒性剂量的阿霉素作用后, DR5、DR4 在 3 株细胞中的表达提高; 而 mAb FMU1.4、FMU1.5 诱导 U138 和 U373 细胞凋亡的作用增强, 细胞内细胞色素 C 的表达提高, FLIP 的表达降低, Ca<sup>2+</sup> 浓度增加。结论: 亚毒性剂量的阿霉素与抗 DR4、DR5 mAb 联合应用后, 可提高 mAb 诱导靶细胞凋亡的效应, 其作用机制与 DR4、DR5、细胞色素 C、FLIP 的表达及 Ca<sup>2+</sup> 的含量有关。

**[关键词]** TNF 相关凋亡诱导配体; 死亡受体; 凋亡; 阿霉素  
**[中图分类号]** R392.12 **[文献标识码]** A

死亡受体 4、5 (death receptor4、5, DR4、DR5) 是肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 的特异性、高亲和力受体, 与 TRAIL 结合后可有效地激活细胞内信号转导途径, 诱导细胞发生凋亡反应。DR4、DR5 在许多肿瘤细胞上呈高表达, 而在正常细胞上很少表达。现有的研究证实, 抗 DR4、DR5 单克隆抗体 (mAb) 可通过与 DR4、DR5 的特异性结合诱导表达 DR4、DR5 的肿瘤细胞凋亡。以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗, 是目前该领域研究的热点之一。我们曾报道了抗 DR5 mAb 可诱导胶质瘤细胞 U343 凋亡, 凋亡率达 80%<sup>[1]</sup>。Kang 等<sup>[2]</sup> 研究证实, 亚毒性剂量的阿霉素可提高 TRAIL 诱导的人前列腺癌细胞株 LNCaP 凋亡。我们报道了亚毒性剂量的阿霉素对抗 DR4、DR5 mAb FMU1.4 及 FMU1.5 诱导的 3 株神经胶质瘤细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 mAb FMU1.4和 FMU1.5由第四军医大学金伯泉教授提供。人神经胶质瘤细胞株 U343、U138、U373由加拿大阿尔博塔大学郝春海博士提供。放线菌素 D (actinomycin D)、阿霉素 (doxorubicin, doxo)及 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu)均为 Amresco公司产品。FITC羊抗鼠 IgG购自 Promega公司。流式细胞仪 (EPICS XL型), 为美国 Coulter公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DR4、DR5在胶质瘤细胞株上表达的检测 胰酶消化细胞并调整细胞的密度为  $1 \times 10^{10}$  /L, 离心洗涤 3 min后, 弃去上清, 加入抗 DR4、DR5 mAb FMU1.4及 FMU1.5在冰上反应 30 min, 洗涤 3次。然后加 100 FITC羊抗鼠 IgG, 洗 3次后, 用流式细胞术检测, 每个标本计数 10 000个细胞。每组样品均设非特异性对照组。

1.2.2 mAb FMU1.4及 FMU1.5对胶质瘤细胞增殖的抑制作用 细胞处理同前, 按 20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 mg/L 加入 mAb FMU1.4及 FMU1.5培养 4 h, 每孔再加入 6.25 g/L doxo共培养 24 h。加入 20  $\mu$ L MTT(7.5 g/L)继续培养 4 h, 加 100  $\mu$ L 异丙醇, 于波长 570 nm测定吸光度 (A)值, 并计算抑制率 (%)。抑制率 = (1 - 实验组的 A 值 / 对照组的 A 值)  $\times 100\%$ 。实验重复 3次, 取其平均值。

1.2.3 胶质瘤细胞 DNA倍增的 FCM分析 U343、U138、U373细胞的处理同前。收集细胞, 并调整细胞的密度为  $2 \times 10^7$  /L, 按参考文献 [1]的方法进行分析。

1.2.4 统计学分析 实验数据均用  $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较采用 t检验。

2 结果

2.1 DR4、DR5在胶质瘤细胞株上表达的检测 以亚毒性剂量 (6.25 g/L)的 doxo分别处理 3株细胞 24 h后, 用 FCM检测细胞上 DR4/DR5的表达。结果显示, 亚毒性剂量的 doxo可上调 DR5、DR4在胶质瘤细胞上的表达, 但 DR5的表达明显高于 DR4(表 1)。

表 1 胶质瘤细胞上 DR5/DR4的表达

Cell line	DR4 expression (%)		DR5 expression (%)	
	Doxo (-)	Doxo (+)	Doxo (-)	Doxo (+)
U343	5.53	15.2	86.5	96.2
U138	2.08	6.23	22.0	49.9
U373	0.11	2.86	2.61	9.74

2.2 抗 DR4、DR5 mAb和 doxo对细胞增殖的抑制作用

MTT比色法检测显示, 胶质瘤细胞株对抗 DR4和 DR5 mAb诱导的凋亡的敏感性不同, mAb FMU1.5诱导 U343细胞凋亡的作用较强, 且呈剂量依赖性, mAb FMU1.4诱导 U343细胞凋亡的作用较弱; mAb FMU1.5和 FMU1.4诱导 U138和 U373细胞凋亡的作用均较弱。doxo对 U343细胞有强的杀伤

效应, 对 U138、U373细胞也有一定的杀伤作用。125 mg/L的 doxo对 U343、U138、U373 3株细胞的杀伤率 (%), 分别是 (51  $\pm$  0.24) %、(13.82  $\pm$  0.86) %、(11.54  $\pm$  0.24) %。以 20 mg/L的 mAb FMU1.4和 FMU1.5与 62.5 mg/L doxo联合或单独作用 24 h, 对 U343细胞株的杀伤率分别为 (58.0  $\pm$  1.82) %和 (87.43  $\pm$  0.81) %; 对 U138细胞株的杀伤率分别为 (26.23  $\pm$  1.86) %和 (48.12  $\pm$  1.24) %; 对 U373细胞株的杀伤率分别为 (13.19  $\pm$  0.23) %和 (20.65  $\pm$  1.64) %。以上说明, 低剂量的 mAb与亚毒性剂量的 doxo联合应用, 可提高 mAb对 3株细胞的杀伤率并与高剂量的 mAb的杀伤率相同, 其中对 U343细胞的杀伤作用更明显。mAb与 doxo联合应用与单独应用 doxo的杀伤率相比较差异显著 ( $P < 0.01$ , 图 1)。U343和 U373细胞对放线菌素 D和 5-氟尿嘧啶敏感, U343细胞的杀伤率 (%)分别为 (46.7  $\pm$  0.85) %和 (49.8  $\pm$  0.13) %; 对 U373细胞的杀伤率 (%)分别为 (28.6  $\pm$  0.56) %和 (37.1  $\pm$  0.11) %。

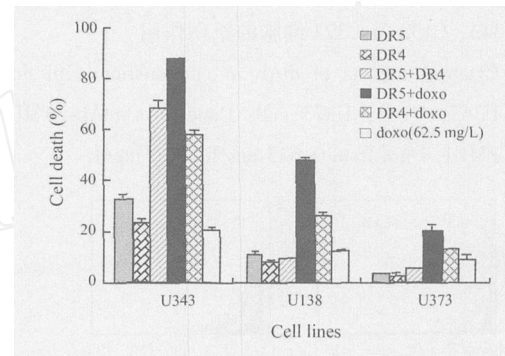


图 1 20 mg/L的 mAb FMU1.5/FMU1.4与 62.5 mg/L doxo联合作用对 U343、U138及 U373细胞的杀伤作用

Fig 1 Cytotoxic effects of mAbs FMU1.5/FMU1.4 (20 mg/L) in combination with doxo (62.5 mg/L) on U343, U138 and U373 cell lines

2.3 凋亡细胞 DNA倍增的 FCM分析<sup>[3]</sup> FCM分析的细胞

凋亡的百分率, 与 MTT比色法检测的结果相符(表 2), 即低剂量的 mAb与亚毒性剂量的 doxo联合应用, 可协同提高对胶质瘤细胞的杀伤作用(图 2)。以 20 mg/L的 mAb FMU1.4/FMU1.5与 62.5 g/L的 doxo联合作用后, 收集细胞, 用 FCM检测凋亡细胞的 DNA倍体发现有典型的细胞凋亡峰(图 3)。

表 2 40 mg/L的 mAb FMU1.4和 FMU1.5与 doxo联合作用后凋亡细胞 DNA倍增的 FCM分析

Cell line	FMU1.5	FMU1.5 + doxo	FMU1.4	FMU1.4 + doxo
U343	77.32 $\pm$ 4.57	82.1	35.33 $\pm$ 1.86	34.6
U138	20.75 $\pm$ 1.43	23.2	9.22 $\pm$ 0.48	8.67
U373	8.90 $\pm$ 0.26	7.85	2.33 $\pm$ 0.45	2.10

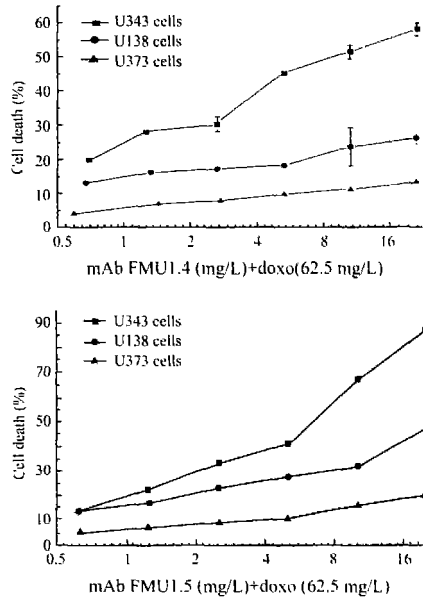


图 2 mAb FMU1. 5/FMU1. 4与 62.5 mg/L doxo联合作用对 U343、U138及 U373细胞的杀伤作用

Fig 2 Cytotoxic effects of mAb in combination with doxo on U343, U138, U373 cells. Conc'n of mAbs FMU1. 5/ FMU1. 4 are from 0.625 mg/L to 20 mg/L

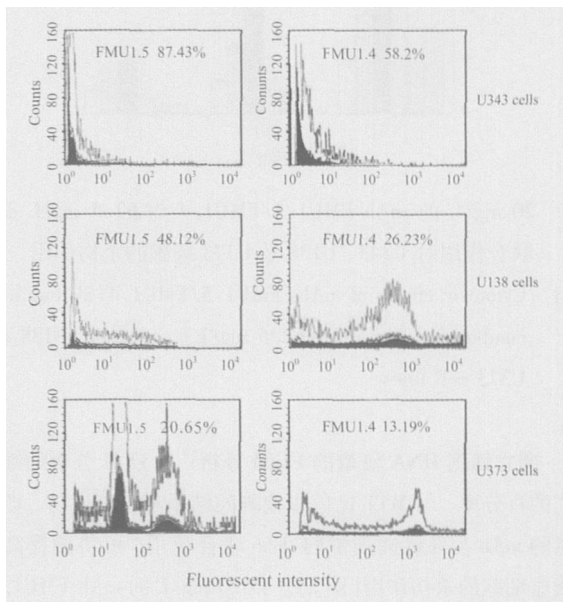


图 3 分别与 62.5 mg/L doxo和 20 mg/L FMU1. 5/FMU1. 4共培养 24 h及 4 h的 3株胶质瘤细胞中 DNA 断裂的百分率

Fig 3 DNA fragmentation (%) in glioma cells cocultured with doxo (62.5 mg/L) and mAb FMU1. 5/FMU1. 4 (20 mg/L) for 24 and 4 hours, respectively

2.4 抗 DR4和 DR5 mAb诱导胶质瘤细胞凋亡的形态变化

应用透射电镜观察发现, 以高剂量的 mAb FMU1. 5和 125 mg/L doxo分别作用 U343细胞 4 h、24 h后, 用透射电子显微镜观察。发现凋亡细胞呈不规则形, 出现核固缩、核分裂, 染色质边缘化并浓缩或断裂成团块状; 细胞质内可见完

整的细胞器, 线粒体呈空泡状, 高尔基体肥大 (图 4)。

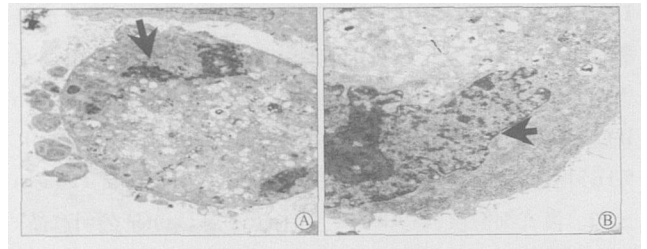


图 4 20 mg/L mAb FMU1. 5与 62.5 mg/L doxo共培养 24 h的 U343细胞超微结构变化的透射电镜观察

Fig 4 Observation of ultrastructural change of U343 cells cocultured with 20 mg/L mAb FMU1. 5 plus 62.5 mg/L doxo for 24 h under transmission electron microscope (x7500)

A: U343 + FMU1. 5 + doxo; B: Normal U343 cells. The arrows indicate to be site of nuclear membrane

3 讨论

如何降低化疗药物的剂量, 减少对全身的毒副作用, 以及提高药物的疗效, 已成为临床治疗的重要课题。化疗药物与抗死亡受体的抗体具有相似的细胞毒机制。抗死亡受体抗体的作用是诱导肿瘤细胞凋亡; 而化疗药物也是部分通过诱导凋亡来发挥细胞毒作用。文献 [4, 5]已报道, 化疗药物可通过上调肿瘤细胞表面 DR4/ DR5的表达, 增强 TRAIL对肿瘤细胞杀伤的敏感性。

我们前期已报道<sup>[1]</sup>, mAb FMU1. 5不需要交联即可诱导 U343神经胶质瘤细胞发生凋亡。mAb FMU1. 4和 FMU1. 5能不同程度地诱导 3株胶质瘤细胞凋亡 (另报道)。U343细胞对 mAb FMU1. 5诱导的凋亡较敏感, 其次是 U138细胞; 而 U373细胞则对 mAb FMU1. 5的处理表现为耐受。U343细胞对 mAb FMU1. 4部分敏感, U138细胞对 mAb FMU1. 4不敏感; U373细胞对 mAb FMU1. 4耐受。3株神经胶质瘤细胞株上 DR4/DR5的表达量从高到低, 依次是 TRAIL敏感株 U343、部分敏感株 U138和耐受株 U373。实验表明, DR4的表达较 DR5明显低, 而其 mAb FMU1. 4诱导细胞凋亡的作用也较抗 DR5 mAb FMU1. 5低。实验结果显示, mAb诱导细胞凋亡的作用与细胞表面 DR4、DR5的表达水平有一定的关系。

本研究证实, 胶质瘤细胞株 U138和 U373细胞对 mAb FMU1. 4、FMU1. 5有抵抗, U343细胞对 mAb FMU1. 4有抵抗, 3株胶质瘤细胞对 doxo均敏感。亚毒性剂量的 doxo和 5-Fu可使对 mAb FMU1. 5不敏感的 U138细胞转变为敏感株, 从而提高 mAb FMU1. 4/FMU1. 5诱导 U138、U373细胞凋亡的效应。mAb FMU1. 5可增强 doxo、5-Fu对细胞的杀伤效应, 表现为亚适剂量的 FMU1. 5与亚毒性剂量的 doxo和

5-Fu可协同诱导肿瘤细胞凋亡。这种协同杀伤效应是通过诱导细胞凋亡而实现的,其机制可能是由于凋亡链中的正反馈而使凋亡级联放大,亦可能是亚毒性剂量的 doxo、5-Fu可高效阻断凋亡抑制蛋白或诱骗受体的生成,而使 TRAIL 诱导的凋亡呈现高效。

在未经任何处理的情况下, U343细胞中细胞色素 C 的表达量较高, U138细胞其次, U373细胞最低,提示不同胶质瘤细胞系中细胞色素 C 的表达水平可能与细胞对 TRAIL 及 mAb FMU1.4/FMU1.5的敏感性有关。doxo作用后,细胞色素 C 在 3株细胞中的表达水平均增强,表明 doxo 与 mAb FMU1.4/FMU1.5的协同作用,可能与提高细胞色素 C 的表达水平有关。Guo 等<sup>[6]</sup>报道,抗 DR5 mAb 可通过非 Caspase 途径诱导肿瘤细胞凋亡。耐受株 U373 有 FLIP 的表达,敏感株 U343 和部分敏感株 U138 均没有 FLIP 的表达。doxo 作用后,在 3 株细胞中都没有检测到 FLIP 的表达(资料未显示)。从另一方面证实,FLIP 与胶质瘤细胞对药物诱导凋亡的敏感性有关。这与 Mori 等<sup>[7]</sup>报道的 doxo 与 TRAIL 可通过下调 FLIP 的表达而协同诱导胶质瘤细胞其凋亡的结果相吻合。

(上接 119 页)

的抗原<sup>[7]</sup>。基于 MR 可有效介导肿瘤抗原的摄取及内化,我们将 RLD2 蛋白在体外进行甘露糖修饰,使糖基化的目的抗原含有 DC 表面 MR 的特异性配基,通过甘露糖受体介导的内化作用,使糖基化抗原较之未糖基化抗原能更有效地被 DC 摄取及提呈,并调动机体主动特异性抗肿瘤免疫功能,诱导更有效的 T 细胞应答<sup>[8]</sup>。

在实验中我们发现,目的蛋白糖基化修饰后能更有效地诱导 DC 成熟,使其表达更高水平的 CD83、CD86、HLA II 类分子。本研究结果表明,糖基化抗原较之未修饰抗原可促进 DC 的成熟,而 DC 的成熟状态将极大地影响免疫应答的诱导及类型<sup>[9]</sup>。另外,糖基化抗原致敏的 DC 能使效应细胞更好地杀伤高表达 HER-2/neu 的 SKBR-3 细胞,这提示糖基化抗原通过 DC 表面 MR 的介导,提高抗原摄取的效能,促进 DC 成熟及抗原提呈,进而诱导出更多的抗原特异性 CTL,产生更有效的杀伤肿瘤细胞的效应。通过实验我们认为,对肿瘤抗原进行糖基化修饰,很有可能成为提高抗肿瘤免疫治疗效果的有效策略。不过,对于肿瘤抗原靶标的选择,糖基化抗原在促进 DC 成熟以及增强抗原提呈中所涉及的分子机制,以及现有

## 参考文献:

- [1] 庄国洪,孙红光,杜柏榕,等. 抗人 DR5 单克隆抗体诱导 U343 细胞凋亡研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(2): 96 - 99.
- [2] Kang J, Bu J, Hao Y, et al. Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP[J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2005, 8(3): 274 - 279.
- [3] 董兰凤,梅和珊,宋淑霞,等. mL22 与阿霉素长循环热敏脂质体靶向治疗肿瘤的协同作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(3): 296 - 300.
- [4] Shiraishi T, Yoshida T, Nakata S, et al. Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6364 - 6370.
- [5] Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, et al. Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells[J]. *Oncogene*, 2005, 138(1): 71 - 77.
- [6] Guo Y, Chen C, Zheng Y, et al. A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(51): 41940 - 41952.
- [7] Mori T, Doi R, Toyoda E, et al. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis as a new strategy for pancreatic cancer[J]. *Surgery*, 2005, 138(1): 71 - 77.

体外实验结果能否在体内重复等,仍是目前研究的关键。

## 参考文献:

- [1] 徐明,郭宁,胡美茹,等. HER-2/neu 胞外配体结合区 2 在大肠杆菌中可溶性表达及纯化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(2): 171 - 175.
- [2] 徐明,郭宁,王红霞,等. HER-2/neu 配体结合区 2 蛋白的甘露糖化修饰[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(1): 95 - 98.
- [3] Pietrella D, Corbucci C, Perito S, et al. Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(2): 820 - 827.
- [4] Nestle FO, Banchereau J, Hart D, et al. Dendritic cells: On the move from bench to bedside[J]. *Nat Med*, 2001, 7: 761 - 765.
- [5] Walden P. Hybrid cell vaccination for cancer immunotherapy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, 465: 347 - 354.
- [6] Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, et al. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines[J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 1860 - 1864.
- [7] Stahl PD, Ezekowitz RA. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense[J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10: 50 - 55.
- [8] Mansour MK, Latz E, Levitz SM. *Cryptococcus neoformans* glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 3053 - 3061.
- [9] Della M, Danova M, Rigolin GM, et al. Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings[J]. *Oncology*, 2005, 68(2 - 3): 276 - 284.