

FasL、抗人 DR5 单克隆抗体诱导肿瘤细胞凋亡的研究

宋玉国 李文珠 李迎 陈彩霞 庄国洪 (北华大学,吉林 132013)

中国图书分类号 R392.1 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2007)01-0038-04

[摘要] 目的:探讨 FasL、Anti-DR5 mAb对肿瘤细胞 HeLa、BGC823、MCF-7、L342、H9101、D6的杀伤作用及机制。方法:采用 RT-PCR、MTT比色法、电泳、DNA倍体分析、Western blot等方法。结果:H9101、HeLa细胞株 DR5 mRNA水平有表达,D6细胞无表达;H9101、L342细胞株 Fas mRNA水平有表达,D6细胞无表达。H9101、L342细胞株对 FasL、Anti-DR5 mAb敏感并呈剂量依赖性;MCF-7、BGC823细胞株对 FasL敏感,对 Anti-DR5 mAb相对敏感。HeLa对 FasL相对敏感,对 Anti-DR5 mAb敏感;D6对两种凋亡诱导剂耐受。结论:FasL、Anti-DR5 mAb能不同程度地诱导肿瘤细胞凋亡,其机制与 Fas、DR5、Caspase-8、Bcl-2的表达有关。

[关键词] FasL;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;死亡受体;凋亡

Fas ligand and Anti-human DR5 monoclonal antibody induce tumor cell lines apoptosis

SONG Yu-Guo, LI Wen-Zhu, LI Ying, CHEN Cai-Xia, ZHUANG Guo-Hong. BeiHua University, Jilin 132013, China

[Abstract] **Objective:** To study the cytotoxic effects on tumor cell lines HeLa, BGC823, MCF-7, L342, H9101, D6 induced by Fas ligand and anti-human DR5 monoclonal antibodies (Anti-DR5 mAb) and the underlying mechanism. **Methods:** Fas/DR5 mRNA were detected by RT-PCR. Cytotoxicity exerted by FasL/Anti-DR5 mAb on tumor cell lines was measured by MTT colorimetry and the induced apoptosis was determined by agarose gel electrophoresis. **Results:** The expression of DR5 on BGC823 and HeLa cells were higher and DR5 didn't express in D6. The expression of Fas on H9101 and L342 were higher and Fas didn't express in D6. Cell line H9101 and L342 were sensitive to Anti-DR5 mAb and FasL in a dose dependent manner; Cell line MCF-7 and BGC823 were sensitive to FasL but were partially sensitive to Anti-DR5 mAb; Cell line HeLa was partially sensitive to FasL but was sensitive to Anti-DR5 mAb; Cell line D6 was insensitive to two apoptosis inductions. **Conclusion:** Apoptosis induced by Fas ligand and Anti-DR5 mAb vary among tumor cell lines. The underlying mechanism may be relevant to Fas/DR5 mRNA expression, the release of Caspase-8 and Bcl-2.

[Key words] FasL; TRAIL; Death receptor; Apoptosis

细胞凋亡是细胞启动自杀程序后的一种死亡形式,在维持细胞正常死亡与分裂的平衡中起重要作用。已证实诱导细胞凋亡的信号传递受体配体对有三组,分别为 TNF/TNFR1、Fas (CD95)/FasL 和 TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) (Apo2L)/DR4、DR5^[1]。人类许多疾病如肿瘤,自身免疫疾病及变性疾病均与细胞凋亡有关。

细胞表面的凋亡受体 Fas 蛋白,在与其配基 FasL 结合后,可启动细胞内凋亡信号通路,通过一系列的分子事件,使细胞发生凋亡^[2]。

TRAIL 能通过其死亡受体 (DR4, DR5) 选择性地诱导多数肿瘤细胞凋亡。死亡受体 DR5 在传递 TRAIL 的死亡信号,诱导肿瘤细胞凋亡中起重要作用。

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^[3]制备了抗 DR5 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。目前以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗是该领域的研究热点。

该实验利用 FasL、抗 DR5 单克隆抗体 (Anti-DR5 mAb) 研究其对肿瘤细胞株 HeLa、BGC823、MCF-7、L342、H9101、D6 的杀伤作用及其机制,为临床肿瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验所用 FasL 蛋白、Anti-DR5 mAb 由本实验室制备。所用肿瘤细胞株 HeLa (宫颈癌)、BGC823 (胃癌)、MCF-7 (乳腺癌)、L342 (肺腺癌)、

本研究受厦门大学科研启动基金 (No. Z03103) 资助

厦门大学医学院生命科学院,厦门 361005

同等贡献作者

作者简介:宋玉国 (1962年-),男,副教授,医学硕士,硕士生导师,主要从事临床免疫学研究;

通讯作者:庄国洪 (1969年-),女,博士,硕士生导师,主要从事肿瘤生物治疗研究, E-mail: zhuanguohong@yahoo.com.cn

D6(肺腺癌)、H9101(肝癌)由本中心保存。抗 Caspase-8、Bcl-2 单克隆抗体为 Sigma 公司产品, HRP 羊抗兔 IgG 购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 分析 Fas、DR5 mRNA 的表达 参照文献 [4]。

1.2.2 MTT 法检测 Fa β 、Anti-DR5 mAb 对 HeLa、BGC823、MCF-7、L342、H9101、D6 细胞增殖的抑制作用 计数细胞, 5×10^5 孔接种培养板, 按 50.0、25.0、12.5、6.25、3.125 及 1.562 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加入 Fa β 及 Anti-DR5 mAb, 培养 4 小时。加入 20 μl MTT (7.5 g/L) 继续培养 4 小时, 加 100 μl 异丙醇, 于波长 570 nm 测定吸光度 (A) 值, 并计算抑制率 (%)。实验重复 3 次, 取其平均值。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{实验组的 } \Delta \text{值}}{\text{对照组的 } \Delta \text{值}} \right) \times 100\%$$

1.2.3 琼脂糖凝胶电泳 细胞处理同前, 收集细胞, 调细胞浓度为 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, 然后参照文献 [4] 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4 Western blot 检测细胞内 Caspase-8、Bcl-2 的蛋白表达 SDS-PAGE: 收集细胞提取蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 分离蛋白质。转膜: 把分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜。Ag-Ab 反应: 加入一抗, 反应 1 小时, 洗涤液洗涤 3 次; 加入 HRP 标记的二抗, 反应 1 小时, 洗涤。显色: DAB 显色。

1.3 统计学分析 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每种实验重复 3 次, 计算其平均值。

2 结果

2.1 Fas、DR5 在肿瘤细胞的 mRNA 水平表达 通过 RT-PCR 检测 Fas、DR5 mRNA 在 6 株肿瘤细胞的表达情况。结果提示 Fas、DR5 mRNA 在不同肿瘤细胞的表达情况不同, 其中 Fas mRNA 在 L342、H9101 中有表达, D6 中无表达; DR5 mRNA 在 HeLa、H9101 中有表达, D6 中无表达。Fas 表达在 240 bp, DR5 表达在 502 bp, 电泳结果与理论计算值相符, 见图 1。

2.2 Fa β 、Anti-DR5 mAb 对肿瘤细胞株杀伤的研究

2.2.1 Fa β 、Anti-DR5 mAb 对细胞生长的影响

经 MTT 法分析发现, 肿瘤细胞株 HeLa、BGC823、MCF-7、L342、H9101、D6 对 Fa β /Anti-DR5 mAb 敏感性不同, 组间差异显著。H9101、L342 对 Anti-DR5 mAb 敏感, 表现为细胞死亡率与浓度升高成比例; MCF-7 对 Fa β 敏感, 对 Anti-DR5 mAb 相对敏感。BGC823 对 Fa β 敏感, 对 Anti-DR5 mAb 相对敏

感, 表现为细胞死亡率与浓度升高不成比例。HeLa 对 Fa β 相对敏感, 对 Anti-DR5 mAb 敏感, 表现为细胞死亡率与浓度升高成比例。肿瘤细胞株 D6 对 Fa β 、Anti-DR5 mAb 耐受, 见表 1。

2.2.2 Fa β 、Anti-DR5 mAb 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 细胞死亡率分别为 $71.78\% \pm 3.01\%$ 和 $54.95\% \pm 1.51\%$; 1.562 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fa β 、Anti-DR5 mAb 对细胞杀伤率分别为 $0.99\% \pm 0.51\%$ 和 $9.41\% \pm 3.01\%$ 比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。同剂量的 Fa β 、Anti-DR5 mAb 分别应用时组间差异明显 ($P < 0.01$), 只有在 Fa β 、Anti-DR5 mAb 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 组间无差异 ($P > 0.05$, 图 2A)。

同剂量的 Fa β 、Anti-DR5 mAb 单独应用于 MCF-7、BGC823、HeLa 在高剂量时三组组间差异明显 ($P < 0.01$), 而 3.125、6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fa β /Anti-DR5 mAb 组间差异不明显 ($P < 0.05$); Fa β 、Anti-DR5 mAb 单独应用时各组间均有差异 ($P < 0.01$, 图 2B、D、F)。

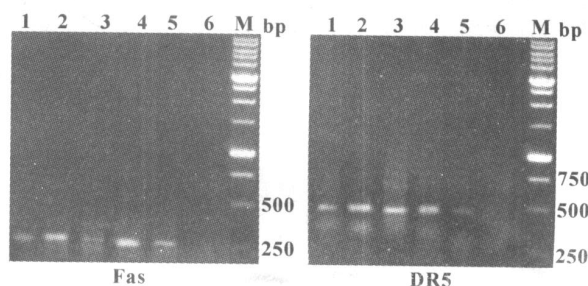


图 1 RT-PCR 检测 Fas、DR5 mRNA 的表达

Fig. 1 mRNA expression of Fas, DR5 was measured by RT-PCR

Note: Fas located in 240 bp; DR5 located in 502 bp. 1. BGC823; 2. L342; 3. HeLa; 4. H9101; 5. MCF-7; 6. D6; M. DNA marker

表 1 MTT 法分析 Fa β 、Anti-DR5 mAb (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 对细胞生长的影响

Tab. 1 MTT analysis of apoptotic cell DNA multiplication after 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fa β /anti-DR5 mAb

Cell lines	Cell death (%)	
	Fa β	Anti-DR5 mAb
H9101	71.78 \pm 3.01	54.95 \pm 1.51
MCF-7	60.21 \pm 1.43	21.32 \pm 3.45
L342	62.01 \pm 3.05	48.78 \pm 0.91
BGC823	59.92 \pm 1.49	26.07 \pm 2.95
HeLa	25.49 \pm 0.90	48.90 \pm 3.15
D6	8.22 \pm 0.89	5.88 \pm 0.51

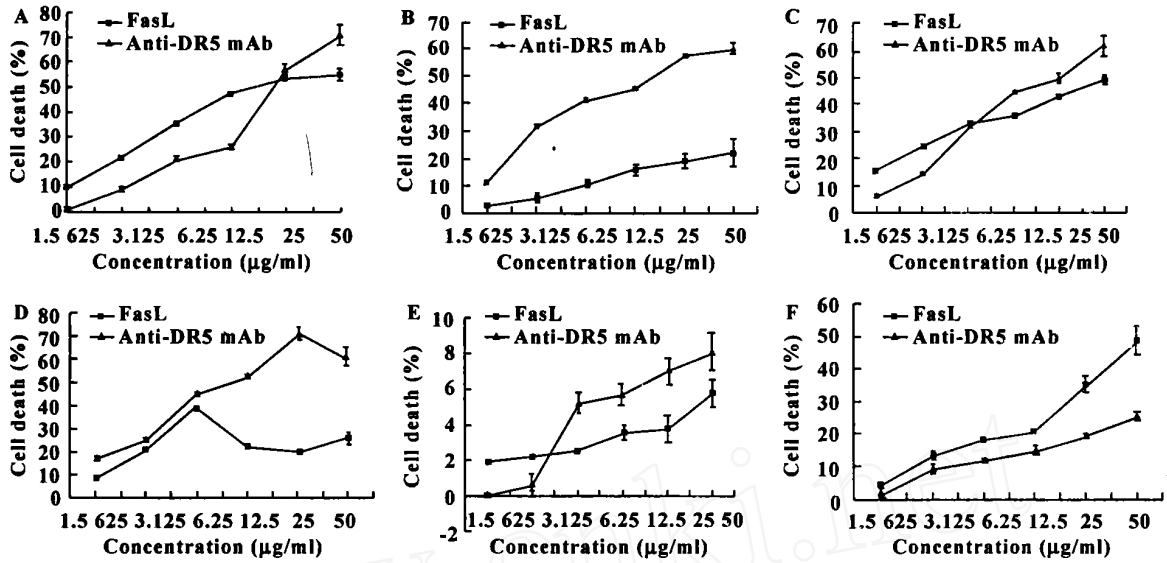


图 2 FasL /AntiDR5 mAb对 H9101、MCF-7、Hela、BGC823、L342、D6的细胞毒效应

Fig. 2 Cytotoxic effects of FasL and antiDR5 mAb on H9101, MCF-7, Hela, BGC823, L342, D6

Note: A. H9101; B. MCF-7; C. L342; D. BGC823; E. D6; F. Hela concentration from 1.562 5-50 µg/ml

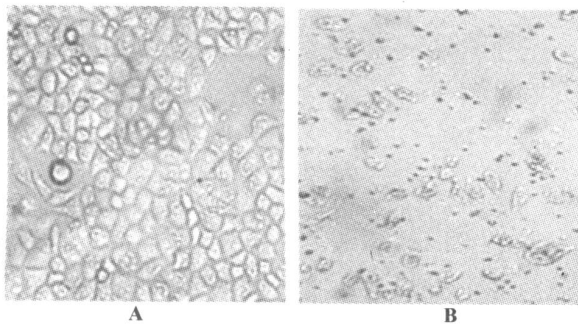


图 3 FasL /AntiDR5 mAb作用 MCF-7细胞后显微镜观察细胞形态改变

Fig. 3 MCF-7 cell was observed under optical microscope

Note: A. Normal cell; B. MCF-7 cell was cultured with 50 µg/ml FasL / Anti-DR5 mAb for 4 h

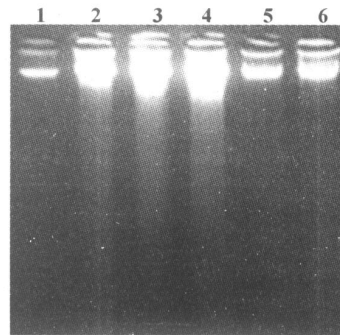


图 4 凝胶电泳检测 FasL /AntiDR5 mAb作用 4小时后细胞的 DNA 片段

Fig. 4 Cells were cultured with 50 µg/ml FasL /AntiDR5 mAb for 4 h, the DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis

Note: 1. L342 + Anti-DR5 mAb; 2. L342 + FasL; 3. H9101 + Anti-DR5 mAb; 4. H9101 + FasL; 5. BGC823 + Anti-DR5 mAb; 6. BGC823 + FasL

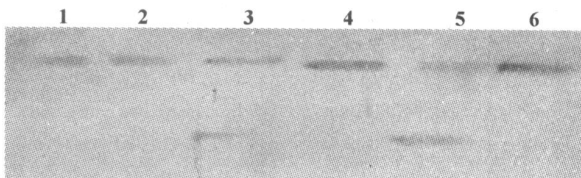


图 5 Western blot检测细胞内 Caspase-8、Bcl-2的表达

Fig. 5 Caspase-8, Bcl-2 expression was analyzed by Western blot

Note: 1. D6; 2. Hela; 3. BGC823; 4. L342; 5. MCF-7; 6. H9101; Upper. Caspase-8; Lower. Bcl-2

FasL、Anti-DR5 mAb单独应用于 L342组间差异显著 ($P < 0.05$), 6.25 µg/ml FasL /Anti-DR5 mAb组间无差异 ($P > 0.05$,图 2C)。

FasL、Anti-DR5 mAb单独应用于 D6组间无差异 ($P > 0.05$,图 2E)。

2.3 抗体杀伤肿瘤细胞的可能机制

2.3.1 FasL、Anti-DR5 mAb诱导肿瘤细胞凋亡的形态学改变 高剂量 FasL、Anti-DR5 mAb作用

MCF-7细胞 4小时后,显微镜观察细胞形态改变,细胞由正常的梭形、贴壁状态变为圆形、皱缩,并呈悬浮状态,见图 3。

2.3.2 FasL、Anti-DR5 mAb诱导细胞凋亡 DNA断裂的定性检测 凋亡细胞 DNA电泳时也出现特征性的“梯状”带。高剂量 Anti-DR5 mAb、FasL处理 H9101组,细胞 DNA可见明显的梯状带;高剂量 FasL处理 L342、BGC823组可见梯状带,而高剂量 Anti-DR5 mAb处理 BGC823、L342组无明显梯状带,见图 4。

2.4 影响细胞凋亡的可能因素 通过 Western blot检测肿瘤细胞内 Caspase-8、Bcl-2的表达,结果 6株肿瘤细胞在 Caspase-8的 55 kD区域可见明显的表达条带,其中 L342、H9101条带明显,D6、BGC823、Hela、MCF-7次之;Bcl-2的 26 kD区域只有 MCF-7、BGC823细胞出现表达条带,见图 5。

3 讨论

Anti-DR5 mAb、FasL能不同程度地诱导 6株肿瘤细胞凋亡,H9101、L342对 FasL、Anti-DR5 mAb敏感;MCF-7、BGC823对 FasL敏感,对 Anti-DR5 mAb相对敏感;Hela对 FasL相对敏感,对 Anti-DR5 mAb敏感;肿瘤细胞株 D6对 FasL、Anti-DR5 mAb耐受。通过 RT-PCR检测 Fas/DR5 mRNA水平的表达,发现 6株肿瘤细胞中只有 D6没有 Fas、DR5的表达,FasL、Anti-DR5 mAb诱导细胞凋亡的能力与细胞表面 Fas、DR5的表达有相关性,也说明了 Fas、DR5的表达差异是 FasL、TRA L选择性诱导凋亡的关键点^[5]。

对于细胞株 H9101、L342,同剂量的 Anti-DR5 mAb、FasL诱导其凋亡能力也存在显著差异($P < 0.01$)。对于同种细胞由受体引发的下游凋亡通路是相同的并且参与此通路的凋亡因子及抗凋亡因子相同,区别应在于细胞膜表面 DR5、Fas的表达量存在差异,因而引发的下游级联反应强度不同。因此,可以认为 Anti-DR5 mAb、FasL诱导同种细胞凋亡的活性与其受体表达有相关性。

狄冬梅等^[6]将 FasL基因通过腺病毒载体转染高表达 Fas、低水平表达 FasL的肺腺癌细胞 A549中,证实了 FasL基因对 A549肺腺癌细胞的生长抑制率可达 84%,并且能显著地抑制其集落形成能力。Shiraishi等^[7]报道 Tunicamycin通过上调 DR5的表达提高 TRA L诱导人前列腺癌细胞 PC-3凋亡能力,这种增强作用可以被 DR5/Fc嵌合蛋白所阻断。Horinaka等^[8]通过实验首次揭示了 Luteolin通过 DR5上调机制诱导人恶性肿瘤细胞凋亡,人重组

DR5/Fc抑制其凋亡作用,用 siRNA干扰抑制 DR5的表达能有效地减少 Luteolin的凋亡作用。

实验通过 Western blot检测肿瘤细胞 Caspase-8的表达时发现,正常状态下 L342、H9101细胞中 Caspase-8表达量较高,而 MCF-7、Hela、D6、BGC823的表达量较低,6株细胞的敏感性也是这种趋势,这说明 Caspase-8的表达与细胞对 Anti-DR5 mAb/FasL敏感性相关。

通过 Western blot技术检测发现 6个细胞系 Bcl-2的表达情况不同,肿瘤细胞 MCF-7、BGC823有 Bcl-2的表达,其他没有 Bcl-2的表达。故认为 Bcl-2在 TRA L诱导的细胞凋亡中发挥抗凋亡作用。实验从另一方面证实 Bcl-2与肿瘤细胞凋亡相关,与肿瘤细胞的敏感性相关。

综上所述,本文实验结果对 6株肿瘤细胞对 Anti-DR5 mAb/FasL敏感性与其死亡受体的表达、Caspase-8、Bcl-2的相关性提供了较有力的实验证据,对深入探索肿瘤细胞的耐药性的分子机制提供了新的信息与启示,并为凋亡诱导剂的改进提供研究基础。

4 参考文献

- 1 Duiker E W, Mom C H, De Jongs *et al* The clinical trail of TRA L [J]. *Eur J Cancer*, 2006; 42 (14): 2233-2240.
- 2 Liu Y Q, Mu Z Q, You S *et al* Fas/FasL signaling allows extracellular signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells [J]. *Bio Pharm Bull*, 2006; 29 (9): 1873-1879.
- 3 Khikawa K, Liu W, Zhao L *et al* Tumorcidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity [J]. *Nat Med*, 2001; 7 (8): 954-960.
- 4 庄国洪,孙红光,杜柏榕 *et al* 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.
- 5 Zhang J, Ma Y F, Liu G C *et al* Effect of anti-human DR5 monoclonal antibody on the apoptosis of human hepatocyte HL7702 cell lines [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2006; 22 (5): 641-643.
- 6 狄冬梅,张晓膺,蒋南青 *et al* 腺病毒介导的 FasL基因诱导肺癌细胞凋亡 [J]. *江苏医药*, 2005; 31 (3): 200-202.
- 7 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.
- 8 Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T *et al* Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 up-regulation in human malignant tumor cells [J]. *Oncogene*, 2005; 138 (1): 71-77.

[收稿 2006-09-26 修回 2006-10-07]

(编辑 徐杰 张晓舟)