

抗人 DR4、DR5单克隆抗体诱导神经胶质瘤细胞凋亡的实验研究

庄国洪 张长弓 陶惠然 杜柏榕 朱 迅 (厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.1 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2006)12-1110-06

[摘要] 目的:探讨抗死亡受体 DR4、DR5单克隆抗体(mAb) FMU1.4、FMU1.5对3株神经胶质瘤细胞株 U343(敏感株)、U138(部分敏感株)、U373(耐受株)的杀伤作用及机制。方法:采用流式细胞术、RT-PCR、免疫细胞化学法、MTT比色法、电泳、DNA倍体分析和 Western blot等方法。结果:DR5在 U343高表达;DR4在 U373低表达,U343对 FMU1.5敏感并呈剂量依赖性、对 FMU1.4部分敏感;U138对 FMU1.5部分敏感,对 FMU1.4耐受;U373对两种抗体耐受。结论:FMU1.4、FMU1.5能不同程度地诱导三株细胞凋亡,其机制与 DR4、DR5、细胞色素 C和 FLIP的表达有关。

[关键词] 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体;死亡受体;凋亡

Anti-human DR5/DR4 monoclonal antibody induce glioma cell lines apoptosis

ZHUANG Guo-Hong, ZHANG Chang-Gong, TAO Hui-Ran, DU Bai-Rong, ZHU Xun Anti-Cancer Research Center Xiamen University Medical College, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective:** To study the cytotoxic effects on three glioma cell lines U343, U138, U373 induced by anti-human DR5/DR4 monoclonal antibodies(FMU1.5/FMU1.4) and the underlying mechanism. **Methods:** Expression of DR4/DR5 was quantitated by flow cytometry and DR/DR5 mRNA detected by RT-PCR. 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. DNA ploidy analysis was studied by flow cytometry. **Results:** The expression of DR5 on U343 cells was higher and the expression of DR4 on U373 cells was lower. Cell line U343 was sensitive to FMU1.5 and in a dose dependent manner, but it was partially sensitive to FMU1.4; Cell line U138 was partially sensitive to FMU1.5 and resistant to FMU1.4; Cell line U373 was insensitive to two antibodies. **Conclusion:** Apoptosis induced by monoclonal antibodies FMU1.4/FMU1.5 vary among three cell lines. The underlying mechanism may be relevant to DR4/DR5 expression, the release of cytochrome C and FLIP.

[Key words] TRAIL; Death receptor; Apoptosis

TNF相关的凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)通过与死亡受体 TRAIL-R1(DR4)、TRAIL-R2(DR5)结合并诱导 DR4/DR5形成同源或异源二聚体,通过其死亡结构域向细胞内传递死亡信号并引发下游级联反应而导致细胞凋亡^[1]。以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗是目前该领域的热点。Ichikawa等^[2]制备了 Anti-DR5 mAb 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。Takeda等^[3]通过体内实验证实 Anti-DR5 mAb对 TRAIL敏感肿瘤细胞具有明显的抗瘤效应而没有系统毒性,并且应用 Anti-DR5可大大抑制实验及自发肿瘤转移。此前我们曾报道 Anti-DR5 mAb FMU1.5

可以诱导神经胶质瘤细胞 U343 凋亡^[4],现拟对 FMU1.5及 Anti-DR4 mAb FMU1.4作用于3株神经胶质瘤细胞(TRAIL敏感株 U343、部分敏感株 U138、耐受株 U373),诱导其凋亡的研究作一详尽报道。该实验利用 FMU1.5、FMU1.4研究其对 U343、U138、U373的杀伤作用及其机制。通过对细胞 DR4/DR5表达的检测,明确不同细胞对 FMU1.5、FMU1.4敏感性与其受体表达关系,通过检测细胞色素 C、FLIP的表达,研究其与细胞对抗体敏感性的相关性,为临床肿瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源^[4] 实验所用 FMU1.5、FMU1.4由第四军医大学金伯泉教授提供。所用胶质瘤细胞株 U343、U138、U373由加拿大阿尔博塔大学郝春海博士提供。Actinomycin D、Doxorubicin、5-Fu为 Amresco产品, FITC羊抗鼠 IgG购自 Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 FCM分析死亡受体蛋白的表达 胰酶消化

吉林大学基础医学院免疫教研室, 长春 130021

作者简介:庄国洪(1969年-),女,博士,主要从事肿瘤生物治疗研究;

通讯作者及指导教师:朱 迅(1958年-),男,教授,博士生导师,主要从事肿瘤疫苗和基因工程抗体研究, E-mail: zhuxun@sohu.com.

细胞,调细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$,离心洗涤 3 分钟后,弃去上清,加入抗 DR4、DR5 mAb FMU1.4 及 FMU1.5 在冰上反应 30 分钟,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。

1.2.2 RT-PCR 分析死亡受体 mRNA 的表达 参照文献 [4]。

1.2.3 免疫细胞化学法检测死亡受体在细胞的分布 参照文献 [4]。

1.2.4 MTT 法检测抗 DR4、DR5 mAb FMU1.4 及 FMU1.5 对 U343、U138、U373 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 及 0.625 mg/L 加入 FMU1.4 及 FMU1.5,培养 4 小时。加入 20 μM 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。

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

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳 细胞处理同前,收集细胞,调细胞浓度为 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,然后参照文献 [4] 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6 FCM 进行 DNA 倍体分析 细胞处理同前,收集细胞,调细胞浓度为 $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,参照文献 [4] 进行分析。

1.2.7 Western blot 检测细胞内细胞色素 C、FLIP 的蛋白表达 收集细胞提取蛋白,然后进行 SDS-PAGE 分离蛋白质。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。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 死亡受体 DR4、DR5 在胶质瘤细胞株的表达及分布

2.1.1 蛋白质水平表达 通过流式细胞分析仪检测三株胶质瘤细胞 DR4、DR5 的蛋白质表达(数值见表 1)。结果提示 DR4/DR5 在三株胶质瘤细胞的表达存在差异($P < 0.01$),DR5 在 U343 高表达;DR4 在 U373 低表达。

2.1.2 mRNA 水平表达 通过 RT-PCR 检测 DR4 mRNA、DR5 mRNA 在 3 株细胞的表达情况。结果提示两种死亡受体在 3 株细胞的表达情况不同,其

中 DR5 mRNA 在 3 株细胞均有表达,电泳显示于 502 bp 处出现亮带;DR4 mRNA 在 U343、U138 有表达,于 506 bp 处有亮带,而 U373 未见明显条带出现。RT-PCR 检测结果与蛋白质水平的检测结果基本相符,即 DR5 在 3 株细胞均有表达,其表达量高于 DR4(图 1)。

2.1.3 死亡受体在细胞内的分布 DR4/DR5 除在 3 株细胞膜上有表达,通过免疫细胞化学法,经共聚焦显微镜观察发现 DR5 在细胞也表达;DR4 在 U343、U138 有表达而在 U373 也偶见表达,这与蛋白质水平的检测结果基本相符,而与 U373 中未检测到 DR4 mRNA 的表达不同。DR5 分布在细胞内胞质中,靠近细胞核的位置,DR4 分布在细胞核的周围,这与文献 [5] 报道相符(图 2)。

2.2 FMU1.4、FMU1.5 对胶质瘤细胞株杀伤的研究

2.2.1 FMU1.4、FMU1.5 对细胞生长的影响 经 MTT 法、FACS 分析发现,胶质瘤细胞株 U343、U138、U373 对 FMU1.5/FMU1.4 敏感性不同,组间差异显著。U343 对 FMU1.5 敏感,表现为细胞死亡率与抗体浓度升高成比例;U343 对 FMU1.4 部分敏感。U138 对 FMU1.5 相对敏感,U138 对 FMU1.4 耐受,表现为细胞死亡率与抗体浓度升高不成比例。胶质瘤细胞株 U373 对 FMU1.4、FMU1.5 耐受(表 2)。

表 1 胶质瘤细胞 DR5/DR4 的蛋白质表达

Tab.1 Expression of DR5 and DR4 on glioma cells

Cell lines	Protein expression (%)	
	DR4	DR5
U343	5.53	86.5
U138	2.08	22.0
U373	0.11	2.61

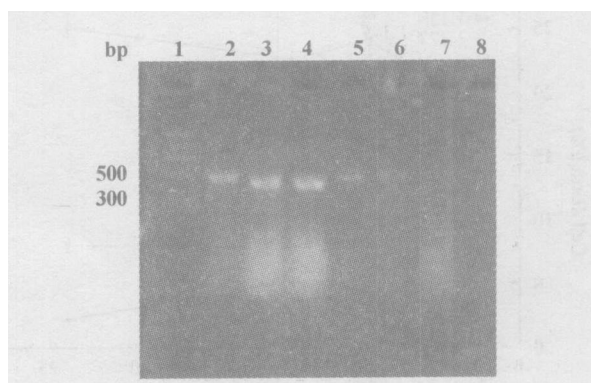


图 1 RT-PCR 检测 DR5/DR4 mRNA 的表达

Fig.1 mRNA expression of DR5/DR4 was measured by RT-PCR

Note: DR5 located in 502 bp; DR4 located in 506 bp. 1. Marker 100-1 200 bp; 2. U343DR5; 3. U138DR5; 4. U373DR5; 5. U343DR4; 6. U138DR4; 7. U373DR4

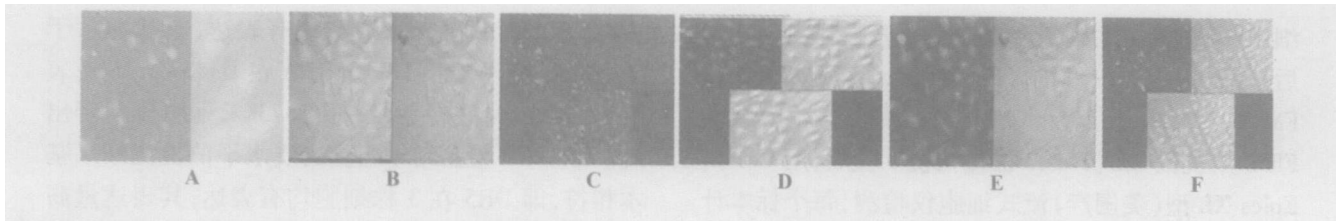


图 2 免疫组织化学法观察 DR5/DR4在胶质瘤细胞的分布

Fig. 2 Distribution of DR5/DR4 in U343, U138 and U373 is observed by immunocytochemistry

Note: A, B, C. DR5 distribution of U343, U138 and U373; D, E, F. DR4 distribution of U343, U138 and U373.

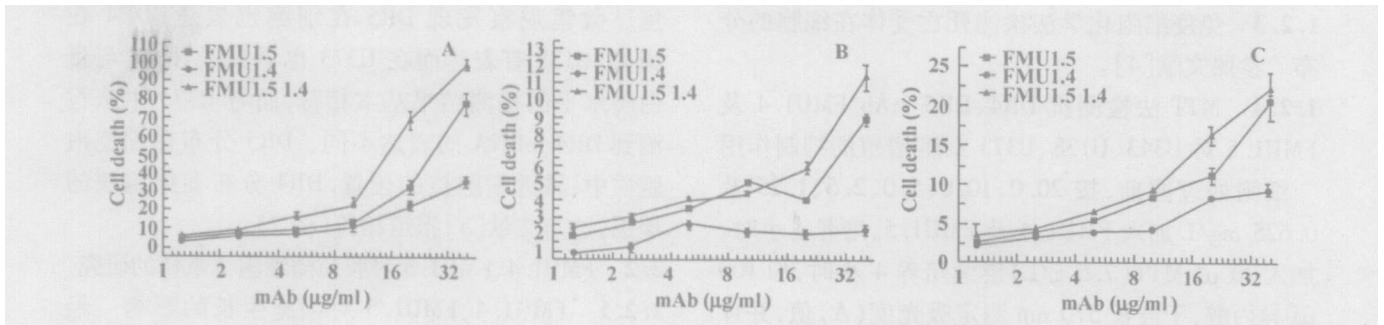


图 3 FMU1.4/FMU1.5对 U343, U373和 U138的细胞毒效应

Fig. 3 Cytotoxic effects of anti-DRM cAb (FMU1.4/FMU1.5) on U343, U373 and U138

Note: A. U343; B. U373; C. U138. McAb concentration from 1.25-40 µg/ml

表 2 MTT法、FACS分析 FMU1.4, FMU1.5 (40 µg/ml) 对细胞生长的影响

Tab. 2 MTT and FCM analysis of apoptotic cell DNA multiplication after 40 µg/ml mAb FMU1.4/FMU1.5

Cell lines	Cell death (%)		DNA fragmentation (%)	
	FMU1.5	FMU1.4	FMU1.5	FMU1.4
U343	77.32 ± 4.57	35.33 ± 1.86	82.1	34.6
U138	20.75 ± 1.43	9.22 ± 0.48	23.2	8.67
U373	8.90 ± 0.26	2.33 ± 0.45	7.85	2.10

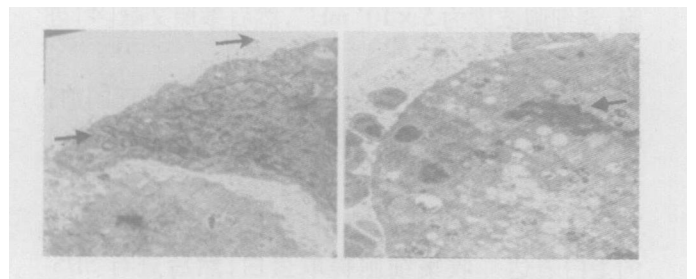


图 5 FMU1.5作用 U343细胞后电镜观察细胞形态改变

Fig. 5 U343 cell was observed under transmission electron microscope

Note: A. Normal cell (7 500 ×) (→ indicates nuclear membrane, ← indicates microvilli); B. U343 cell was cultured with 40 µg/ml FMU1.5 mAb for 4 h (10 000 ×) (← indicates nuclear condensation).

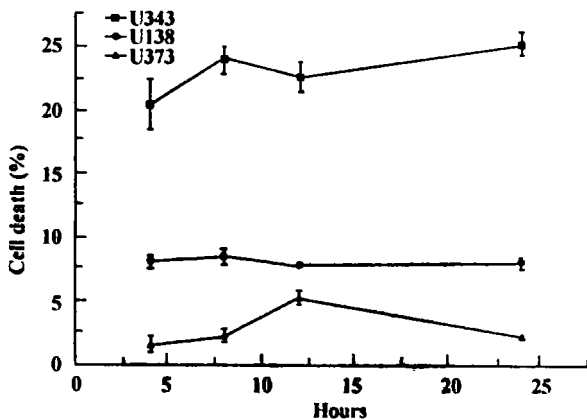


图 4 20 µg/ml FMU1.4/FMU1.5在不同时间点的细胞毒效应

Fig. 4 Cytotoxic effects of 20 µg/ml anti-DRM cAb in 4, 8, 12 and 24 h to U343, U138 and U373

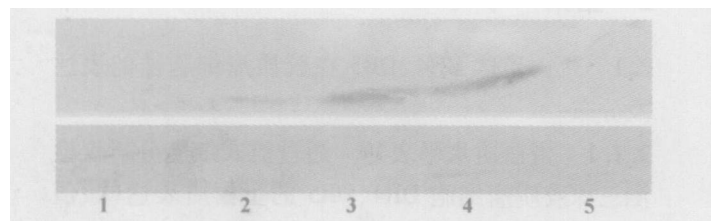


图 7 Western blot检测细胞内细胞色素 C和 FLIP的表达

Fig. 7 Cytochrome C and FLIP expression was analyzed by Western blot

Note: 1. U373; 2. U138; 3. U343; 4. HeLa; 5. Marker, Upper. Cytochrome C; Lower. FLIP.

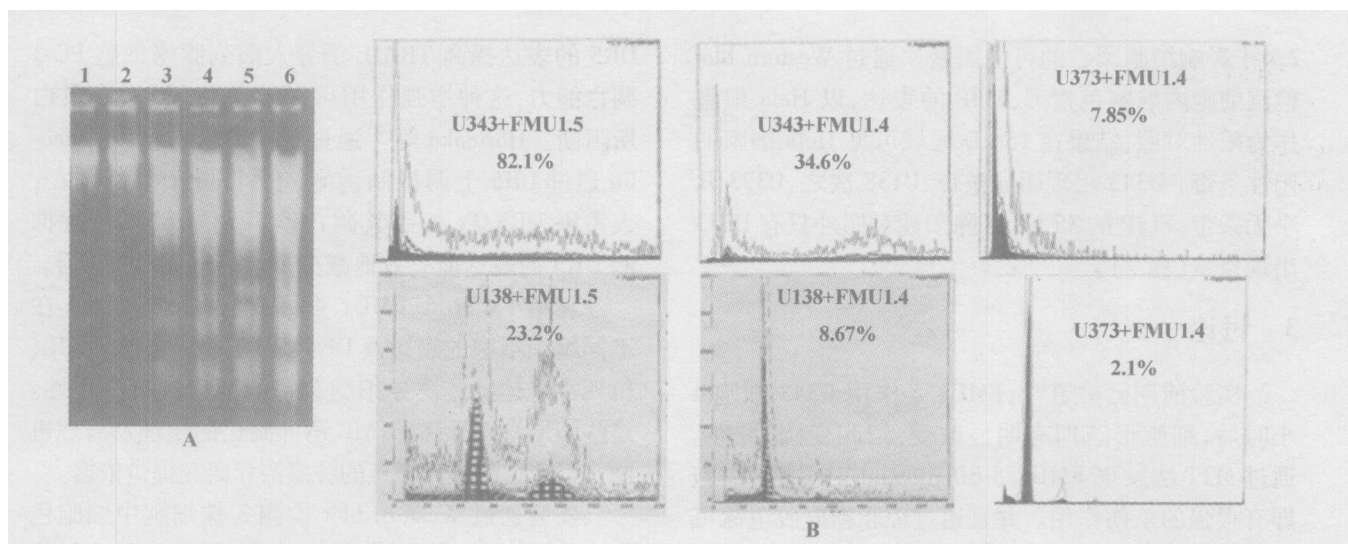


图 6 凝胶电泳、FACS 检测 FMU1.5/FMU1.4 作用 4 小时后细胞的 DNA 片段

Fig. 6 Cells was cultured with 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FMU1.5/FMU1.4 for 4 h, the DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis and FACS

Note: A. DNA ladder, 1. U373 + FMU1.4; 2. U373 + FMU1.5; 3. U38 + FMU1.4; 4. U138 + FMU1.5; 5. U343 + FMU1.4; 6. U343 + FMU1.5; B. DNA p bdy analysis

FMU1.4 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, U343 细胞死亡率为 35.33% \pm 1.86%; 与 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FMU1.4 对细胞杀伤率 5.27 \pm 0.63 比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。流式细胞学分析亦显示组间凋亡率有显著性差异 ($P < 0.01$)。FMU1.5 浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 细胞死亡率为 77.32% \pm 4.57%; 与 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FMU1.5 对细胞杀伤率 7.88 \pm 1.03 比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。流式细胞学分析显示组间凋亡率有显著性差异 ($P < 0.01$)。同剂量的 FMU1.4、FMU1.5 及 FMU1.4 与 FMU1.5 联合应用时三组组间差异明显 ($P < 0.01$), 只有 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FMU1.4、FMU1.5 组间无差异 ($P > 0.05$, 图 3A)。

同剂量的 FMU1.4、FMU1.5 单独应用于 U138 及 FMU1.4 和 FMU1.5 联合应用, 在高剂量时三组组间差异明显 ($P < 0.05$), 而 2.5、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FMU1.4/FMU1.5 组间无差异 ($P > 0.05$); FMU1.4、FMU1.5 单独应用时各组间均有差异 ($P < 0.05$, 图 3B)。

FMU1.4、FMU1.5 单独应用于 U373 及 FMU1.4 和 FMU1.5 联合应用组间无差异 ($P > 0.05$)。流式细胞术定量分析细胞特异性凋亡率, 基本不诱导细胞凋亡, 组间凋亡率并无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 3C)。

2.2.2 抗体对细胞的杀伤与作用时间的关系 实验设计了 4 个时间点研究抗体杀伤力与作用时间的相关性, 分别在 4、8、12、24 小时检测两种抗体对细胞的杀伤力, 结果显示在 4 个时间点 FMU1.5/FMU1.4 对 U343、U138、U373 的杀伤力无差别 ($P > 0.05$), 也

即此杀伤力不随作用时间的延长而增强, 但两种抗体在不同时间点对 3 株细胞的杀伤力有显著差异 ($P < 0.01$, 图 4)。

2.3 抗体杀伤胶质瘤细胞的可能机制

2.3.1 FMU1.5 诱导 U343 细胞凋亡的形态学改变

高剂量 FMU1.5、FMU1.4 作用 U343 4 小时后, 透射电子显微镜观察细胞呈不规则形、凋亡细胞可出现核固缩、核分裂; 染色质边缘化或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, 胞浆变化不明显; 胞膜出胞等变化 (图 5)。

2.3.2 FMU1.5 诱导细胞凋亡 DNA 断裂的定性和定量检测

凋亡细胞除具有上述典型的形态学改变外, DNA 电泳时也出现特征性的“梯状带”, 因此判断细胞是否发生凋亡的重要指标之一是形态学变化, 二是 DNA 电泳时是否出现 180~220 bp 的断裂带。高剂量 FMU1.5、FMU1.4 处理 U343 组, 高剂量 FMU1.5 处理 U138 组, 细胞 DNA 可见明显的梯状带, 而高剂量 FMU1.4 处理 U138 组, 高剂量 FMU1.5/FMU1.4 处理 U373 组均未见梯状带。由此可见, DNA 电泳只可定性判断细胞是否发生凋亡 (图 6A)。为了明确上述凋亡细胞的数量, 实验采用 FACS 对上述凋亡细胞进行了定量检测 (图 6B)。结果表明, U343、U373、U138 的凋亡率各不相同 (表 2), 并且上述细胞经 FMU1.5、FMU1.4 处理后, 细胞凋亡数目不随体外培养时间的延长而增多。

2.4 影响细胞凋亡的可能因素 通过 Western blot 检测细胞内细胞色素 C、FLIP 的表达,以 HeLa 细胞作为阳性对照,结果在 15 kD 区域可见 HeLa 细胞的阳性条带, U343 出现明显条带、U138 次之、U373 几乎无条带; FLIP 的 35 kD 区除阳性对照外只有 U373 出现条带 (图 7)。

3 讨论

实验前期已报道^[4], FMU1.5 作用 U343 细胞 4 小时后,细胞形态即有明显改变,细胞变圆、漂浮。通过 MTT 法发现 FMU1.5 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 对 U343 细胞即有很强的杀伤作用。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 FMU1.5 不需要交联即可以直接诱导 U343 凋亡。

对于敏感株 U343, 同剂量的 FMU1.5、FMU1.4 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、DR4 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 FMU1.5、FMU1.4 诱导同种细胞凋亡的活性与其受体表达有相关性。

FMU1.5、FMU1.4 能不同程度地诱导 3 株胶质瘤细胞凋亡, U343 对 FMU1.5 敏感, U138 对 FMU1.5 部分敏感, U373 对 FMU1.5 耐受。U343 对 FMU1.4 部分敏感, U138 对 FMU1.4 不敏感; U373 对 FMU1.4 耐受。

FACS 检测 3 株胶质瘤细胞株死亡受体蛋白水平的表达,发现 DR5/DR4 表达量从高到低的顺序依次是 TRAIL 敏感株 U343、部分敏感株 U138、耐受株 U373。通过 RT-PCR 检测 DR4/DR5 mRNA 水平的表达符合蛋白表达情况。经实验发现 U343、U138、U373 都有 DR5 的表达, FMU1.5 诱导细胞凋亡的能力与细胞对 TRAIL 的敏感性相对应,并且实验结果显示抗体诱导细胞凋亡的能力与细胞表面 DR4、DR5 的表达呈正相关,也说明了 DR5、DR4 的表达量不同是 TRAIL 选择性诱导凋亡的关键点。实验中 DR4 的表达较 DR5 明显低,而其抗体诱导凋亡的能力也较 DR5 抗体低,这也说明死亡受体在 TRAIL 诱导细胞凋亡中的决定性作用。总之,这些发现说明 DR5 是 TRAIL 诱导肿瘤细胞凋亡的重要受体。Ma 等^[6]也证实了 DR5 的表达与 TRAIL 诱导凋亡能力具有显著正相关性 ($r = 0.997$, $P < 0.001$)。Shiraishi 等^[7]报道 Tunicamycin 通过上调

DR5 的表达提高 TRAIL 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。

利用 FMU1.5、FMU1.4 可以检测 DR4、DR5 在不同组织细胞的表达及 DR4、DR5 的表达与 TRAIL、抗死亡受体抗体诱导细胞凋亡的能力具有相关性。这些结果将为研究 TRAIL 诱导凋亡的生理及病理机制及以死亡受体为靶点的肿瘤治疗研究提供依据。

实验通过 Western blot 检测 3 株细胞中细胞色素 C 的表达时发现,正常状态下 U343 细胞中细胞色素 C 表达量高与阳性对照相近,而 U138 较 U343 的表达量低, U373 较 U138 还低,三株细胞的敏感性也是这种趋势,这说明细胞色素 C 的表达与细胞对 TRAIL 及 FMU1.5/FMU1.4 的敏感性相关。

通过 Western blot 技术检测发现 3 个细胞系 FLIP 的表达情况不同,耐受株 U373 有 FLIP 的表达,敏感株 U343、部分敏感株 U138 没有 FLIP 的表达。故认为 FLIP 在 TRAIL 诱导的细胞凋亡中发挥抗凋亡作用。实验从另一方面证实 FLIP 与胶质瘤细胞凋亡相关,与胶质瘤细胞的敏感性相关。

综上所述,本文实验结果对 3 株胶质瘤细胞对 TRAIL、FMU1.5/FMU1.4 敏感性与其死亡受体的表达、细胞色素 C、FLIP 的相关性提供了较有力的实验证据,对深入探索胶质瘤细胞耐药性的分子机制提供了新的信息与启示。

抗人 DR5/DR4 McAb 可以直接诱导表达 DR5/DR4 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 DR5/DR4 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。

4 参考文献

- 1 MacFarlane M, Ahmad M, Srinivasula S M *et al* Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. *J Biol Chem*, 1997; 272 (410): 25417-25420.
- 2 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.
- 3 Takeda K, Yamaguchi N, Akiba H *et al* Induction of tumor-specific T cell immunity by anti-DR5 antibody therapy [J]. *Exp Med*, 2004; 199 (4): 437-448.

(下转第 1118 页)

需进一步研究证实。

总之,本研究显示了 MS患者中 CD8⁺ T_{CM}上调,可能反映了在 MS早期被诱导产生的一个持续的慢性炎症应答,我们推测 CD8⁺ T_{CM}可能在维持 MS慢性炎症过程中起着重要作用,而 L-15 则可能参与了促进 T_{CM}分化的免疫调节过程。

4 参考文献

- 1 Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001; 14 (3): 299-304.
- 2 Stuerzebecher S, Martin R. Neuroimmunology of multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis Neuroimaging [J]. *Clin N Am*, 2000; 10 (4): 649-668.
- 3 Hemmer B, Cepok S, Nessler S *et al* Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology [J]. *Curr Opin Neurol*, 2002; 15 (3): 227-231.
- 4 Liblau R S, Wong F S, Mars L T *et al* Autoreactive CD8⁺ T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention [J]. *Immunity*, 2002; 17 (1): 1-6.
- 5 Babbe H, Roers A, Waisman A *et al* Clonal expansions of CD8⁺ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction [J]. *J Exp Med*, 2000; 192 (3): 393-404.
- 6 Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells [J]. *J Exp Med*, 2001; 194 (12): 1711-1719.
- 7 Farber D L. Remembrance of antigens past: new insights into memory T cells [J]. *Scand J Immunol*, 2003; 58 (2): 145-154.
- 8 Schluns K S, Lefrancois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003; 3 (4): 269-279.
- 9 Alt C, Laschinger M, Engelhardt B. Functional expression of the

- lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Eur J Immunol*, 2002; 32 (8): 2133-2144.
- 10 Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E *et al* Lymphoid chemokines CCL19 and CCL21 are expressed in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the maintenance of chronic neuroinflammation [J]. *Brain Pathol*, 2003; 13 (1): 38-51.
- 11 Giunti D, Borsellino G, Benelli R *et al* Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS [J]. *J Leukoc Biol*, 2003; 73 (5): 584-590.
- 12 Wulff H, Calabresi P A, Allie R *et al* The voltage-gated Kvl. 3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS [J]. *J Clin Invest*, 2003; 111 (11): 1703-1713.
- 13 Kivisakk P, Mahad D J, Callahan M K *et al* Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity [J]. *Ann Neurol*, 2004; 55 (5): 627-638.
- 14 Losy J, Niezgod A, Zaremba J. L-15 is elevated in sera of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis [J]. *Folia Neuropathol*, 2002; 40 (3): 151-153.
- 15 Blanco-Jerez C, Plaza J F, Masjuan J *et al* Increased levels of L-15 mRNA in relapsing-remitting multiple sclerosis attacks [J]. *J Neuroimmunol*, 2002; 128 (1-2): 90-94.
- 16 Måns Grundsten, Guang-Zhi Liu, Johan Pernert *et al* Increased central memory T-cells in patients with chronic pancreatitis [J]. *Pancreatology*, 2005; 5 (2-3): 177-182.

[收稿 2005-07-13 修回 2005-12-05]

(编辑 徐杰)

(上接第 1114页)

- 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 X D, Franco A V, Nguyen T *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: 3961-3970.
- 6 Ma Y F, Zhang J, Zhao Y P *et al* Correlation between sensitivity to TRAIL and expression level of DR5 on surface of tumor cells [J]. *Zhonghua zhongliu zazhi*, 2004; 26 (9): 528-530.
- 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 upregulation in human malignant tumor cells [J]. *Oncogene*, 2005; 138 (1): 71-77.

[收稿 2006-01-10 修回 2006-04-03]

(编辑 徐杰)

