

doi: 10. 3969/ j. issn. 1000-484X. 2010. 09. 008

抗人死亡受体 5 单链抗体 ZF1 对鼠 H22 肝癌细胞的作用分析^①

孟庆宇 程晓峰 张佳锴^② 庄国洪^③ (厦门大学医学院抗癌中心, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.31 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2010)09-0801-06

[摘要] 目的: 研究抗人死亡受体 5 单链抗体 ZF1 对 H22 肝癌细胞体外抑制增殖作用。方法: MTT 法检测 ZF1 对 H22 肝癌细胞体外杀伤作用, 流式细胞术检测 ZF1 诱导 H22 的凋亡率, 建立 H22 移植瘤模型, 随机分为 PBS 组、ZF1 组、EPI 组和 ZF1/EPI 联合组四组。观察肿瘤生长和小鼠体重变化情况。治疗 13 天后分离肿瘤组织, 进行 HE 染色检查、TUNNEL 法检测细胞凋亡。结果: 体外实验显示: ZF1 可抑制 H22 细胞的增殖, 呈剂量依赖性, 抑制率最高为 84.5%。体内实验结果显示单独应用 ZF1 或联合应用 ZF1/EPI 时, 肿瘤增长受到明显抑制。HE 染色和 TUNNEL 分析结果表明 ZF1 可有效诱导肝癌肿瘤凋亡, ZF1/EPI 联合组效果更明显, 而对正常肝细胞无毒性。结论: 单链抗体 ZF1 具有良好抑制 H22 细胞增殖的作用。ZF1 和 EPI 联合应用效果更明显。

[关键词] DR5; 单链抗体; 凋亡; H22

Analysis of single-chain antibody against death receptor 5 (ZF1) on murine H22 hepatocellular carcinoma cell

MENG Qing-Yu, CHENG Xiao-Feng, ZHANG Jia-Kai, ZHUANG Guo-Hong. Anti-Cancer Research Center Xiamen University Medical College, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective:** The purpose of this study is to evaluate the effects of a single-chain antibody against death receptor 5 (ZF1) on tumor growth and survival in murine H22 hepatocellular carcinoma tumor model. **Methods:** Killing effect of ZF1 on H22 cells was analyzed by MTT assay in vitro. The apoptosis rate of H22 cells induced by ZF1 was detected using Flow Cytometry assay. The transplanted model of H22 tumor was developed in mice. The mice were randomly divided into four groups, PBS group, ZF1 group, EPI group and combined treatment group of ZF1/EPI. Tumor growth and body weight changes were observed. After treatment over 13 days, the tumor tissue for HE staining and TUNNEL assay was performed to detect apoptosis. **Results:** The results showed that ZF1 could inhibit growth of H22 cells in a dose dependent manner. The growth inhibition rate was up to 84.5%. The results showed that ZF1 alone or in combination with ZF1/EPI, the tumor growth was significantly inhibited. HE staining and TUNNEL analysis showed that ZF1 could effectively induce apoptosis of tumor cells without toxic effects, especially in ZF1/EPI combined treatment group. **Conclusion:** It is showed that ZF1 induces a good inhibition on the proliferation of H22 cell, especially in combined treatment group of ZF1/EPI.

[Key words] DR5; scFv; Apoptosis; H22

细胞凋亡(Cell apoptosis) 是受基因调控、细胞主动参与、其自身有一定程序的生理性死亡过程, 又称为程序性细胞死亡或细胞自杀^[1]。Wiley 等^[2]发现 TNF 超家族成员肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand), 可以通过其受体 DR4 (Death receptor 4) 及 DR5 (Death receptor 5) 诱导肿瘤细胞凋亡, 而对正常细胞无影响, 近年来成为肿瘤研究领域的热门靶点之一^[3]。在正

常生理条件下, DR5 与 TRAIL 的亲合力明显大于 DR4, 因此 DR5 在传递 TRAIL 的死亡信号、诱导肿瘤细胞凋亡方面的作用尤为重要^[4]。本实验室已成功研制出抗 DR5 的功能性单链抗体 ZF1 (另见报道)。

化疗是肝癌术后的重要治疗方法。化疗药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡达到清除肿瘤的目的^[5,6], 如表阿霉素 (Epirubicin, EPI) 是蒽环类抗肿瘤药物阿霉素的衍生物, 它能快速进入肿瘤细胞, 抑制核酸合成和有丝分裂, 在临床上得到广泛使用。但杀死肿瘤细胞的必要条件之一是化疗药物必须达到一定的浓度, 可这时化疗药物杀伤肿瘤细胞的同时对人体正常细胞也具有较强烈的毒性。因此化疗药物的用量受到了一定的限制, 使肝癌化疗的总体效果不能令人满意^[7-9]。合理的联合用药可以发挥协

①本文受福建省自然科学基金资助项目 (C0710046)、国家级大学生创新实验项目基金 (091038658) 资助

②厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

③通讯作者, E-mail: zhuangguohong@yahoo.com.cn

作者简介: 孟庆宇 (1987 年-), 男, 在读本科, E-mail: 317671516@qq.com。

同作用, 在提高治疗效果的同时降低药物浓度, 从而减少药物毒副作用和肿瘤耐药现象的发生^[10]。

本实验通过自行制备抗 DR5 功能性单链抗体 ZF1 并联合应用 EPI, 研究联合应用这两种药物诱导肝癌细胞凋亡的作用, 探讨可能机制, 为今后研究特异性抗肿瘤治疗方法或研制免疫导向药物奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 雄性 BALB/c 小鼠 32 只, 体重 (20 ± 2) 克, 由厦门大学医学院实验动物中心提供。H22 细胞系由厦门大学医学院实验动物中心提供。

1.2 材料 鼠抗人 DR5 功能性单链抗体 ZF1, 由本实验室制备。DMEM medium (powder) 购自 Gibco BRL 公司, 表阿霉素 (EPI) 粉剂购自辉瑞公司。ANNEXIN V/PI 双染试剂盒购自南京凯基生物公司。四氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司。Model 3550 酶标仪购自 Bio-Rad 公司。EPICS XL 流式细胞仪购自 COULTER 公司。组织切片机购自 Leica 公司。TUNNEL 试剂盒购自 Merck 公司。

1.3 方 法

1.3.1 MTT法检测 ZF1 对 H22 的细胞毒性效应 96 孔板每孔加 100 μl H22 细胞悬液 (3 × 10⁴/孔) 4 复孔培养, 分为实验组与阴性对照组, 实验组分别加入终浓度为 0.225、0.45、0.9、1.2 mg/ml 的 200 μl ZF1 溶液; 阳性对照组分别加入终浓度为 0.0125、0.025、0.05、0.1 mg/ml 的 200 μl EPI 溶液; 阴性对照组加入鼠 IgG。培养 24 小时, 加入 MTT 工作液 20 μl/孔, 继续培养 4 小时。弃上清, 每孔加入 200 μl DMSO 振荡, 用酶标仪测 A570 吸收值。实验重复 3 次。细胞生长抑制率 (%) = (1 - 实验孔 OD570 / 对照孔 OD570) × 100%。

1.3.2 Annexin V/PI 流式细胞仪法对 ZF1 诱导细胞凋亡率的检测 取对数生长期的 H22 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为 1 × 10⁶ ml⁻¹。收集并制备细胞悬液, 加入 6 孔培养板, 2 ml/孔, 每孔细胞终浓度为 3 × 10⁵ ml⁻¹, 置 37℃、5% CO₂ 培养 24 小时, 实验孔加入 ZF1 溶液, 终浓度分别 0.225、0.45、1.2 mg/ml 2 ml, 阴性对照孔加 DMEM 培养液, 置 37℃、5% CO₂ 培养 4 小时。胰酶消化, 收集细胞于 Eppendorf 管中离心, 用 PBS 洗涤 1 次, 取 10⁴ 细胞悬浮于 500 μl 标记液中, 加 Annexin V 染液及 PI 染液各 5 μl, 避光混匀后, 室温放置 15 分钟, 流式细胞术检测细胞凋亡率。WinMDI 2.9 软件分析所得数据。

1.3.3 肿瘤动物模型的建立、分组及治疗 从已移

植了鼠源性肝癌细胞 H22 的小白鼠腹腔抽取出肝癌细胞 H22, 显微镜下计数后, 用 0.01 mol/L PBS (pH7.2) 稀释至约 1 × 10⁷ 个细胞/ml, 用 1 ml 注射器分别移植至 32 只 9~12 周龄的雄性 BALB/c 小鼠右腋旁 (腋周毛已除尽), 每只约 1 × 10⁶ 个细胞 (即 0.1 ml)。待确定所有小鼠均长出肿瘤后, 随机将 32 只小鼠分成 4 个实验组, 每组 8 只: PBS 组、ZF1 组、EPI 组、ZF1/EPI 联合组。

PBS、ZF1、EPI 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 并用无菌 0.01 mol/L PBS (pH7.2) 分别稀释至表 1 中的浓度。通过腹腔注射给药, 每天一次, 每次 100 μl/只, 连续 13 天。

1.3.4 小鼠体重的称量 小鼠给药后, 每天用电子天平称量小鼠的体重, 记录小鼠体重的连续变化。

1.3.5 各组织器官的获取及肿瘤大小、重量的测量 自第一天给药开始每天观察肿瘤生长及小鼠存活状况, 并用游标卡尺每天按时测一次肿瘤大小 (长、宽、高), 利用公式: $V = \frac{\pi \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}}{6}$, 计算肿瘤大小, 连续观察至肿瘤较大、小鼠体重减少 > 20%。并用精密电子天平称量肿瘤的重量。观察结束, 处死小鼠。根据肿瘤的部位、形状、大小、颜色以及与周围组织的关系, 有无完整或不完整的包膜, 取每只小鼠皮下肿瘤组织及正常组织 (肝、肾), 用取材刀取大小约 1 cm × 1 cm × 2 cm 的组织。

1.3.6 HE 染色、脱水和封片 经常规的组织固定和石蜡包埋后, 将脱蜡水化后的切片侵入加油冰醋酸的苏木精液中染色 5 分钟; 自来水缓洗 10 分钟; 浸入 1% 盐酸乙醇溶液进行分化至组织块呈紫红色, 约 1 分钟; 自来水洗 1 分钟; 1% 稀氨水蓝化 30 秒; 蒸馏水洗 1 分钟; 伊红复染 20~30 秒; 自来水洗 1 分钟; 蒸馏水洗 1 分钟; 70% 乙醇 5 分钟; 80% 乙醇 5 分钟; 95% 乙醇 5 分钟 × 2 道; 无水乙醇 5 分钟 × 2 道; 二甲苯 5 分钟 × 2 道; 中性树胶封片; 显微镜下镜检。

1.3.7 TUNNEL法检测细胞凋亡率 用 20 mg/ml 蛋白酶 K 滴加到切片上, 室温孵育 10 分钟, 再用 1% 多聚甲醛固定组织切片 10 分钟, 为了阻止内源性过氧化酶作用, 用含 0.3% 过氧化氢的甲醇孵育

表 1 小鼠治疗分组方案

Tab. 1 A scheme for grouping mice

Groups	n	Amount (ml/d)	Concentration (mg/ml)
Control group	8	0.1	—
EPI group	8	0.1	0.05
ZF1 group	8	0.1	0.9
EPI+ ZF1 group	8	0.1	0.45/0.025

20 分钟。标记: 脱蜡水化后的切片加 80 μ l 平衡缓冲液悬浮细胞, 室温放置 5 分钟, 让 Nucleotide Mix 在冰上解冻, 准备 TdT 反应液, Equilibration Buffer 45 μ l+ Nucleotide Mix 5 μ l+ TdT Enzyme 1 μ l 共 51 μ l。加入 TdT 反应液 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴箱内, 60 分钟, 避光。加 20 mmol/L EDTA 1 ml 终止反应, PBS 洗 2 次, 加 PI/RNase/PBS 0.5 ml。室温下, 避光反应 15~30 分钟, 上机检测。

2 结果

2.1 MTT 法检测 ZF1 诱导 H22 凋亡的细胞毒性效应 ZF1 对 H22 细胞有杀伤作用, H22 细胞的生长抑制率与 ZF1 呈明显的剂量依赖性。当 200 μ l ZF1 终浓度为 0.225 mg/ml 时, 对 H22 细胞抑制率为 33.5%; 200 μ l ZF1 终浓度为 0.45 mg/ml 时, 对 H22 细胞抑制率为 51.7%; 200 μ l ZF1 终浓度为 0.9 mg/ml 时, 对 H22 细胞抑制率为 59.5%; 200 μ l 终浓度为 1.2 mg/ml 时, 对 H22 细胞抑制率为 84.5%。各浓度均高于阳性对照表阿霉素 EPI 组的 29.7%、36.9%、43.1%、80.7%, 见图 1。

2.2 ANNEXIN V/PI 流式细胞仪法对 ZF1 诱导细胞凋亡率的检测 流式细胞术检测结果表明 2 ml 终浓度 0.225 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时, H22 细胞凋亡率为 23.93%, 其中早期凋亡率 8.51%, 晚期凋亡率 15.42%, 如图 2B 所示。2 ml 终浓度 0.45 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时, H22 细胞凋亡率为 45.57%, 其中早期凋亡率为 23.28%, 晚期凋亡率为 22.29%, 如图 2C 所示。2 ml 终浓度 1.2 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时, H22 细胞凋亡率为 80.09%, 其中早期凋亡率 12.43%, 晚期凋亡率 67.66%, 如图 2D 所示。结果说明 ZF1 对诱导肿瘤细胞 H22 的凋亡呈剂量依赖相关(图 2)。

2.3 各组小鼠肿瘤重量及体积情况 从给药时开始, 每天测量肿瘤的长、宽、高, 利用公式: $\Pi \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高} / 6$, 计算肿瘤体积。第 14 天处死小鼠时, 取肿瘤组

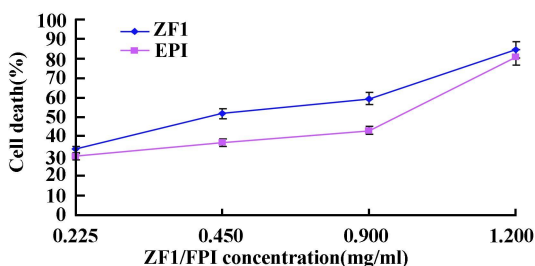


图 1 MTT 比色法检测不同浓度 ZF1 对 H22 细胞增殖的影响
Fig. 1 Viability of mice tumor cell lines H22 in response to treatment with ZF1 and EPI in MTT assay

织, 称量肿瘤重量, 绘制 H22 肿瘤重量柱形图(图 3A)。结果发现, 与阴性对照组相比, 各治疗组小鼠的肿瘤生长均受到抑制, 且随着给药时间的延长, 抑制效果更加明显。与 EPI 治疗组相比, 单链抗体 ZF1 组抑制作用明显, 联合治疗组对肿瘤的抑制作用更加明显。另外, 我们比较了各治疗组和阴性对照组小鼠 H22 肿瘤生长的情况(图 3B)。结果发现, 与阴性对照组相比, 各治疗组小鼠的肿瘤生长均受到抑制, 且随着给药时间的延长, 抑制效果更加明显。与 EPI 治疗组相比, 单链抗体 ZF1 组和联合治疗组对肿瘤的抑制作用最明显。

2.4 各组小鼠体重变化 从给药时开始, 每天测一次小鼠的体重, 绘制小鼠体重增长曲线, 比较各治疗组和阴性对照组小鼠体重增长的情况(图 4)。与阴性对照组相比, 治疗组体重均较高, 其中联合用药组小鼠体重表现出介于单独用药的中间值, 推测联合应用单链抗体 ZF1 和药物 EPI 时在抑制肿瘤细胞生长方面具有协同作用, 同时又会降低化疗药物对胃肠道功能所带来的不适和正常肝脏的毒副作用。

2.5 HE 染色 HE 染色显示, 阴性对照组肿瘤组织切片中可观察到肿瘤组织边缘有大量异性肿瘤细胞及病理性核分裂现象, 肿瘤侵及周围脂肪组织, 并且可见坏死和炎症细胞的渗出。与阴性对照组比较, EPI 治疗组肿瘤组织出现弥漫性的变性坏死, 显微镜下可见大量的细胞碎片及中性粒细胞; ZF1 治疗组在肿瘤细胞大量死亡期间可见残存的肿瘤细胞及少量中性粒细胞。而 EPI/ZF1 联合治疗组的切片, 细胞死亡方式明显不同于前两组, 表现得更弥漫; 死

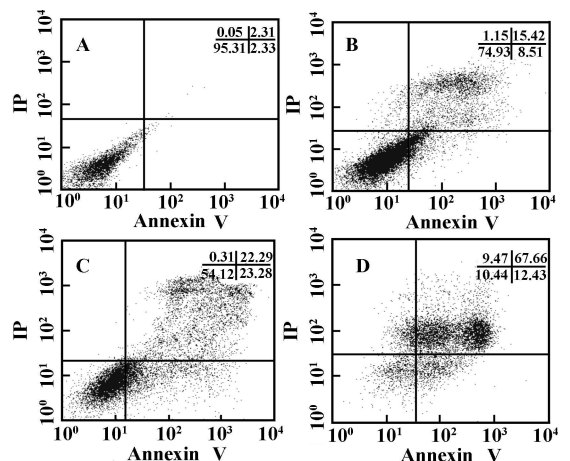


图 2 ZF1 诱导 H22 细胞凋亡的流式细胞仪分析结果

Fig. 2 Analysis H22 cell apoptosis treated by ZF1 by FCM

Note: A. H22 cells; B. H22 cells treated with 0.225 mg/ml ZF1; C. H22 cells treated with 0.45 mg/ml ZF1; D. H22 cells treated with 1.2 mg/ml ZF1.

亡程度介于 EPI 和 ZF1 组之间, 纤维组织增生明显, 肿瘤细胞变形和死亡面积增大。

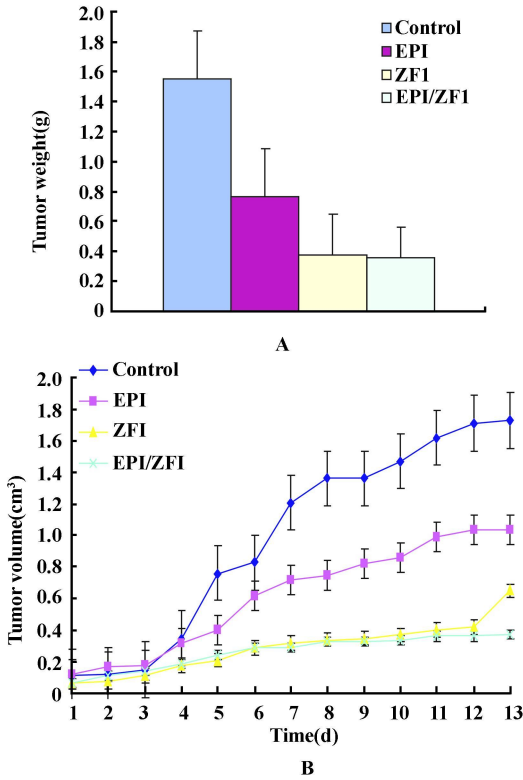


图 3 各组小鼠肿瘤重量和体积情况

Fig. 3 Comparison of tumor height and tumor volume in H22 tumor-bearing mice of each group

Note: A. Weight of mice tumor after 14 days treatment; B. Volume of mice tumor treated per day.

另外一方面, 各治疗组肝脏大体形态正常, 包膜完整, 色泽鲜红, 未见明显病变。光镜下 HE 染色显示肝细胞索排列规则, EPI 治疗组可见肝细胞水样变性和坏死, 坏死区可见大量淋巴细胞浸润, 而单链抗体 ZF1 组和联合治疗组肝脏正常, 无肝细胞坏死; 此外各治疗组肾脏大体形态正常, 包膜完整, 色泽鲜红, 未见明显病变。EPI 治疗组还可见肾小球滤过膜细胞显著增生, 部分切片可见肾小球坏死伴淋巴细胞浸润, 同时有肾小管上皮细胞变性和轻度坏死。ZF1 治疗组和联合治疗组肾脏大致正常, 虽然有肾小球滤过膜细胞增生及肾小管上皮细胞变性, 但程度较轻, 并且无肾小球、肾小管上皮细胞的坏死 (图 5)。

2.6 TUNEL 检测 荧光显微镜观察 TUNEL 标记的凋亡细胞, 细胞及细胞核呈黄绿色见图 6。与阴性对照组比较, 单独应用 EPI 和单链抗体 ZF1 时, 部分

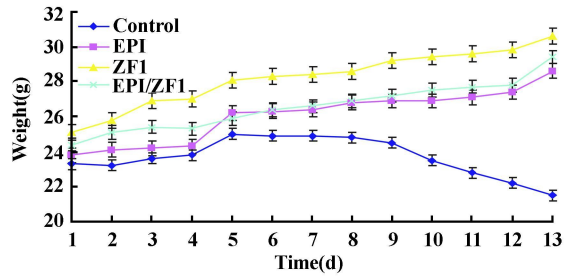


图 4 各组小鼠体重变化情况

Tab. 4 Comparison of body weight in H22 tumor-bearing mice of each group

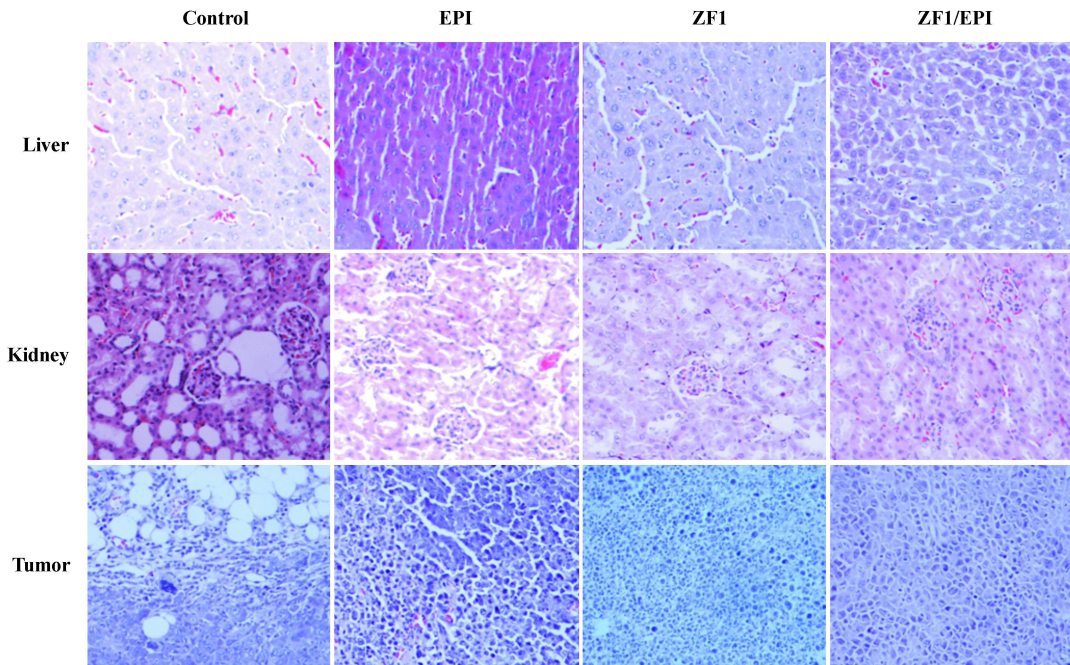


图 5 肝脏、肾脏和肿瘤组织的 HE 染色

Fig. 5 HE staining of liver, kidney and tumor

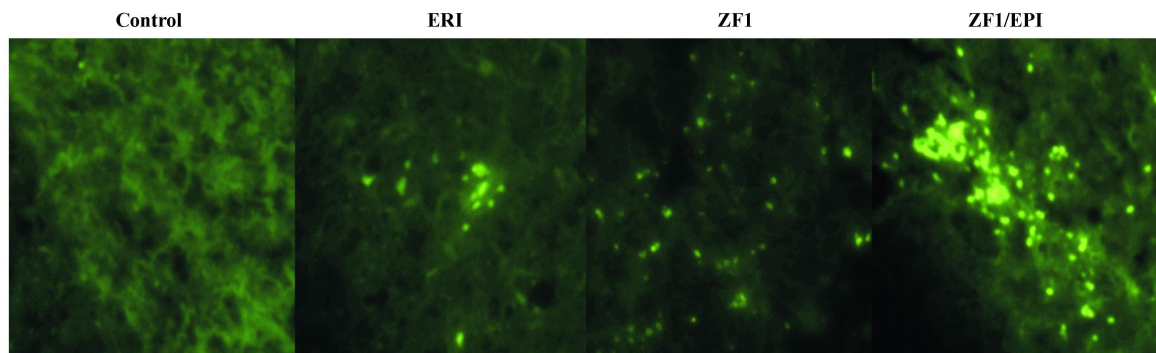


图 6 肿瘤组织的 TUNEL 染色

Fig. 6 TUNEL staining of tumor

细胞呈绿色,与单独治疗组比较,ZF1/EPI 联合治疗组,肿瘤切片中可见大量明亮的绿色,说明联合用药组能更有效地诱导肿瘤细胞凋亡。

3 讨论

EPI 是一种新的具有抗肿瘤活性的萘环类抗生素,其主要作用是直接嵌入 DNA 碱基对之间,干扰转录过程,阻止 mRNA 的形成。它能抑制 DNA、RNA 的合成,所以对细胞周期各阶段均有作用,为细胞周期非特异性药物。在临床上不仅对肿瘤细胞具有杀伤作用,也会对正常的肝脏细胞产生一定的毒副作用。单链抗体是目前应用最为广泛的重组抗体,它由抗体分子中构成抗原结合部位的重链可变区和轻链可变区借助一连接短肽连接而成。相对完整抗体及 Fab 抗体片段,单链抗体的优势在于分子量较小 (Mr 30 000, 相当于完整抗体的 1/6), 使其能够迅速渗透到实体瘤内部。此外,由于没有 Fc 段,免疫源性大大降低,同时不能与非靶细胞的 Fc 受体结合,更利于集中到达肿瘤部位,使其有可能成为肿瘤诊断和治疗的导向载体。

体外实验经 MTT 法检测显示,当 200 μl ZF1 终浓度分别为 0.225、0.45、0.9、1.2 mg/ml 时,H22 细胞的生长抑制率分别为 33.5%、51.7%、59.5%、84.5%。通过 MTT 实验说明,ZF1 对 H22 细胞有杀伤作用,并且 ZF1 对细胞的生长抑制率是随着剂量的增加而增加的。

流式细胞术检测结果表明 1.2 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时,H22 细胞凋亡率为 80.09%,其中早期凋亡率 12.43%,晚期凋亡率 67.66%。0.45 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时,H22 细胞凋亡率为 45.57%,其中早期凋亡率为 23.28%,晚期凋亡率为 22.29%。0.225 mg/ml 的 ZF1 作用 H22 细胞 4 小时,H22 细胞凋亡率为 23.93%,其中早期凋亡率 8.51%,晚期凋亡率 15.42%。流式细胞术结果

更进一步说明,ZF1 可诱导肿瘤细胞 H22 的凋亡,并呈剂量依赖性。

体内试验采用昆明小鼠 H22 移植瘤模型观察 ZF1、EPI、以及 ZF1 协同 EPI 联合治疗的对比观察,研究 ZF1 的体内抑瘤活性。由于建立模型需要大量的细胞,且直接在肝脏建立模型难度较大,故从已移植了鼠源性肝癌细胞 H22 的小白鼠腹腔一次抽取足够的 H22 细胞,通过移植在鼠腋窝处皮下建立肿瘤模型,待肿瘤细胞在皮下增殖,并在肉眼明显可见时证明模型建立成功,随机分四组。之后按 PBS 组、ZF1 组、EPI 组和 ZF1/EPI 联合组进行治疗并观察肿瘤生长和小鼠体重变化情况。

结果显示单独应用单链抗体 ZF1 或联合应用 ZF1 和 EPI 时,肿瘤增长受到抑制,肿瘤体积和重量的增长明显滞后于 PBS 对照组以及单独应用 EPI 治疗组。HE 染色和 TUNEL 检测的实验结果显示,比较 PBS 对照组,治疗组肿瘤组织切片均可见凋亡和坏死的肿瘤细胞,其中联合用药组具有较多的凋亡细胞,提示联合应用单链抗体 ZF1 和 EPI 诱导肝癌细胞凋亡作用明显。同时,肝组织切片染色结果显示对照组与单独应用 EPI 治疗组有大量的坏死细胞,而 ZF1 组和联合治疗组未见坏死细胞,说明 ZF1 不具有肝毒性,且联合应用 ZF1 和 EPI 会降低 EPI 对正常肝细胞的细胞毒作用。

文献已报道,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^[11,12]。该结果与报道的化疗药物可以增强 TRAIL 杀伤肿瘤细胞的功能一致。许多学者对于肿瘤细胞的化疗凋亡机制提出了多种不同假说,其中 Yusuf^[13]提出的假说影响最大,其观点提示,不同的化疗药物有不同的靶分子和作用点,最终汇集至凋亡调控点以决定是否触发细胞凋亡。所以单链抗体 ZF1 和化疗药物 EPI 协同杀伤 H22 细胞可能主要是通过诱导细胞凋亡实现的。(下转第 809 页)

同,骨髓在受到外来抗原刺激后并不生成生发中心,其抗体分泌细胞来源于从外周返回的B细胞,占据骨髓中有限的地方,因此抗原特异的B细胞并不大量增加,融合后反映出阳性克隆率较低^[5,7]。

骨髓融合细胞和脾融合细胞在性质上可能存在较大的差异。骨髓中的浆细胞和记忆细胞亲和力较高,且寿命较长,而外周的浆细胞寿命较短^[7,8]。从膜抗体的表达看,我们发现骨髓细胞含mIg 非常高表达的细胞,而外周来源的细胞则没有这个现象,这些mIg 高表达细胞的来源和性质还有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Brenner T, Timore Y, Wirguin I. In vitro synthesis of antibodies to acetylcholine receptor by Epstein-Barr virus-stimulated B-lymphocytes derived from patients with myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmunol*, 1989; 24(3): 217-222.

- 2 De Baets M, Stassen M H W. The role of antibodies in myasthenia gravis [J]. *J Neuro Sci*, 2002; 202(1): 5-11.
- 3 Link H, Xiao B G. Rat models as tool to develop new immunotherapies [J]. *Immunol Rev*, 2001; 184(1): 117-128.
- 4 Poulas K, Tsoubufis T, Tzartos S J. Treatment of passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis using papain [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000; 120(2): 363-368.
- 5 Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma cell development [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005; 5(3): 230-242.
- 6 Ellyard J I, Avery D T, Phan T G *et al*. Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow [J]. *Blood*, 2004; 103(10): 3805-3812.
- 7 Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger E O *et al*. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6(10): 741-750.
- 8 Mingos Wols H A, Underhill G H, Kansas G S *et al*. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity [J]. *J Immunol*, 2002; 169(8): 4213-4221.

[收稿 2010-05-10 修回 2010-05-25]
(编辑 倪鹏)

(上接第800页)

4 参考文献

- 1 Viau M, Zouali M. B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity [J]. *Clin Immunol*, 2005; 114(1): 17-26.
- 2 Tan H T, Low J, Lin S G *et al*. Serum autoantibodies as biomarkers for early cancer detection [J]. *FEBS J*, 2009; 276(23): 6880-6904.
- 3 Ozren N, El-Deiry W S. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2003; 13(2): 135-147.
- 4 Elrod H A, Sun S Y. Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008; 7(2): 163-173.
- 5 白慧玲, 赵粤萍, 刘广超 *et al*. 抗死亡受体-5 单克隆抗体的制备及特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006; 22(4): 514-520.
- 6 Mantovani A, Romero P, Palucka A K *et al*. Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment [J]. *Lancet*, 2008; 371(9614): 771-783.
- 7 Kischkel F C, Lawrence D A, Chuntharapai A *et al*. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors

4 and 5 [J]. *Immunity*, 2000; 12(6): 611-620.

- 8 Guicciardi M E, Gores G J. Life and death by death receptors [J]. *FASEB J*, 2009; 23(6): 1625-1637.
- 9 Boyden S V. Natural antibodies and the immune response [J]. *Adv Immunol*, 1966; 5: 1-28.
- 10 Schwartz-Albiez R, Monteiro R C, Rodriguez M *et al*. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2009; 158(Suppl 1): 43-50.
- 11 Berger A, Piqueras B, Pages F *et al*. Fas, fas ligand, immune tolerance, and cancer: implications in cancer of the colon [J]. *Bull Cancer*, 1998; 85(2): 129-133.
- 12 Merbl Y, Itzhak R, Vidar-Shalit T *et al*. A systems immunology approach to the host-tumor interaction: large-scale patterns of natural autoantibodies distinguish healthy and tumor-bearing mice [J]. *PLoS One*, 2009; 4(6): e6053-e6053.

[收稿 2010-03-21 修回 2010-05-18]
(编辑 张晓丹)

(上接第805页)

4 参考文献

- 1 Kerr J F R, Winterford C M, Hamon B V. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994; 73(8): 2013-2016.
- 2 Wiley S R, Schooley K, Smolak P J *et al*. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1995; 3(6): 673-682.
- 3 Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan A M *et al*. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. *Science*, 1997; 276(5309): 111-113.
- 4 Truneh A, Shama S, Silveanu C *et al*. Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000; 275(30): 23319-23325.
- 5 Dive C, Hickman J A. Drug-target interaction: only the first step in the commitment to a programmed cell death [J]. *Br J Cancer*, 1991; 64(1): 192-196.
- 6 Zhang X D, Wang W L. Experimental study of human hepatocellular carcinoma cell line HCG-9204 hepatoma cells apoptosis induced by adriamycin [J]. *Daxi Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 1995; 16(1): 168-174.
- 7 Idhikawa K, Liu W, Zhao L *et al*. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocytotoxicity [J]. *Nat Med*,

2001; 7(8): 954-960.

- 8 Kim J M, Seol T H, Esplen D W *et al*. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [J]. *Nat Med*, 2000; 6: 564-567.
- 9 Ma Y F, Chen Y G, Chen Y H *et al*. Analysis of TRAIL receptor expression using a novel anti-TRAIL death receptor 5 monoclonal antibody [J]. *CMJ*, 2003; 16: 947-950.
- 10 Wang R. Two companies, three crowds: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter [J]. *FASEB J*, 2002; 16(13): 1792-1798.
- 11 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.
- 12 Honnaka 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.
- 13 Yusuf A H. Apoptosis and dilemma of cancer chemotherapy [J]. *Blood*, 1997; 89(6): 1845-1853.

[收稿 2010-05-25 修回 2010-07-30]
(编辑 倪鹏)