

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720061152126

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗 DR5 单克隆抗体对佐剂型关节炎大鼠模
型的作用分析及机制探讨

Impact Analysis and Mechanism Investigation to Rat's
Adjuvant Arthritis Model Using Anti-DR5 mAb

张佳锴

指导教师姓名: 王重刚 教授

庄国洪 副教授

专 业 名 称: 动物学

论文提交日期: 2009 年 月 日

论文答辩时间: 2009 年 月 日

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

类风湿性关节炎 (Rheumatoid Arthritis, RA) 是以关节慢性炎症为特征的自身免疫性疾病。虽然 RA 的确切发病机制还不清楚, 但是 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞和滑膜成纤维细胞在关节发炎及疾病发展的过程中处于重要地位。细胞因子、Th1/Th2 细胞平衡、细胞凋亡等在 RA 的发病过程中也起着重要作用。RA 与滑膜组织中多种淋巴细胞及滑膜成纤维细胞凋亡不足有关, 因此诱导这些细胞凋亡防止其过度增殖成为治疗 RA 的有效途径。

TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) 为 II 型跨膜蛋白, 属于 TNF 超家族。TRAIL 能诱导表达 TRAIL 特异性受体的细胞发生凋亡。DR5 又称 TRAIL-R2, 是 TRAIL 的特异性受体, 在多种肿瘤组织中高表达。而 TRAIL 给药后造成严重的肝毒性, 限制了它的应用。本实验室通过可溶性 DR5 (sDR5) 免疫小鼠, 建立杂交瘤细胞系, 筛选出能诱导细胞凋亡的抗 DR5 单克隆抗体。该单克隆抗体与 DR5 特异结合, 不与其他 TRAIL 受体交叉反应。而且该单抗能特异性诱导一些表达 DR5 的肿瘤细胞凋亡。

为了研究 Anti-DR5 mAb 对大鼠佐剂型关节炎 (AA) 的作用及其免疫机理, 本实验采用注射弗氏完全佐剂的方法建立了佐剂型关节炎 (AA) 大鼠模型, 尾静脉注射 Anti-DR5 mAb, 观察大鼠关节肿胀度、血清和滑膜液中炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 水平的变化。另外, 利用 RT-PCR 检测各组织器官、滑膜和淋巴细胞中 DR5 mRNA 水平的表达, 以 Western blot 技术分析各组织器官中凋亡相关因子 Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达情况。

实验发现 Anti-DR5 mAb 能缓解 AA 病情, 使关节肿胀度降低。用 Anti-DR5 mAb 治疗后, 血液和滑膜组织细胞产生 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 水平下降, 且抑制了滑膜细胞和淋巴细胞的过度增殖。因此, 本实验室制备的 Anti-DR5 mAb 能用于大鼠 AA 的治疗, 其治疗机制与细胞表面 DR5 mRNA 的表达、细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 水平和 Caspase-8 蛋白表达有重要关系。

关键词: DR5; 单克隆抗体; 佐剂型关节炎; 细胞凋亡

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterised by chronic inflammation of the joints. Although the precise pathogenesis of RA remains unclear, T cells, B cells, macrophages, neutrophils and synovial fibroblasts are central to the mechanisms of joint inflammation and disease progression. RA is connected with the apoptosis inhibition of synovioblasts and lymphocytes in synovial tissues. To induce apoptosis of these cells could prevent them from excessive proliferation, and therefore would be an effectual way to treat RA.

TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) are type II transmembrane protein which are members of TNF superfamily. TRAIL can induce apoptosis of those cells expressing receptors that are specific for TRAIL. DR5 (also called TRAIL-R2) is the specific receptor to TRAIL, which was highly expressed in many kinds of tumor tissues. To administrate TRAIL could, however, bring about severe hepatotoxicity, thus limit its usage. Through the method of immunizing the mice by soluble DR5 (sDR5), our laboratory had established a hybridoma cell line secreting Anti-DR5 monoclonal antibody which can induce some tumor cell to apoptosis. This mAb binds DR5 specifically, and don't react with other TRAIL receptor. Furthermore, the mAb is able to induce apoptosis of some tumor cells which express DR5.

In order to investigate the effect and immune mechanism that Anti-DR5 mAb make on the rat's adjuvant arthritis model, I adopted measures as follow: First, we established rat's adjuvant arthritis animal model by injecting complete Freud's adjuvant (CFA) into the joints of rats; After that, I administrated Anti-DR5 mAb to those artificial patients using caudal intravenous injection for the sake of finding out the variation of rat's articular tumidity and the inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IFN- γ in serum and synovia. In addition, I used RT-PCR to detect DR5 mRNA expression in each main tissues or organs, synovium and lymphocytes, while used western blot to analyse the expression of apoptosis-related factors that include Caspase-8 and Bcl-2 in the main tissues and organs.

During the research process, I was observing the phenomenon that Anti-DR5 mAb brought about the remission of RA and the improvement of articular

swelling. After treated with Anti-DR5 mAb, the rats produced far more less IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ in their blood and synovial tissue, and the overmultiplication of synoviocytes and lymphocytes was even restrained. In conclusion, Anti-DR5 mAb produced by our lab are capable of treating the rat's AA and acquired well therapeutic effect. The mechanism based on this therapy may be really linked to the expression level of cell surface DR5, cytokines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ), Caspase-8 protein.

Keywords: DR5; Monoclonal antibody; Adjuvant arthritis; Apoptosis

目 录

第一章 前言	01
一、类风湿关节炎的发病因素	01
1 细胞因子与类风湿关节炎.....	02
2 Th1/Th2 平衡与类风湿关节炎.....	05
3 细胞凋亡与类风湿关节炎.....	06
4 性激素与类风湿关节炎.....	06
5 原癌基因与类风湿关节炎.....	07
二、类风湿关节炎的治疗	08
1 外科治疗.....	08
2 内科治疗.....	08
3 生物治疗.....	10
4 基因治疗.....	13
5 造血干细胞移植疗法.....	14
6 新的治疗靶向.....	14
三、作为免疫相关性疾病靶点的死亡受体 5 (DR5) 的研究进展	15
1 死亡受体 5 (DR5) 的结构和分布.....	16
2 死亡受体 5 (DR5) 与肿瘤细胞凋亡.....	16
3 死亡受体 5 (DR5) 与类风湿关节炎.....	21
四、实验方案设计	22
1 研究目的和意义.....	22
2 研究内容.....	23
第二章 抗人 DR5 单克隆抗体的制备及作用分析	24
一、材料和方法	24
1 材料.....	24
1.1 实验动物及细胞株.....	24
1.2 主要试剂及耗材.....	24
1.3 主要仪器及设备.....	25
1.4 主要溶液的配制.....	25

2 方法.....	29
2.1 杂交瘤细胞系的建立.....	29
2.2 单克隆抗体的制备和纯化.....	31
2.3 单克隆抗体的特异性鉴定.....	31
2.4 单克隆抗体的效价及 Ig 亚类鉴定.....	33
2.5 流式细胞仪检测 L342 细胞表面 DR5 的表达.....	34
2.6 RT-PCR 检测肿瘤细胞 Fas 和 DR5 的表达.....	34
2.7 MTT 法检测 FasL、Anti-DR5 mAb 对肿瘤细胞 L342 增殖的影响.....	36
2.8 流式细胞仪检测 Anti-DR5 mAb 对肿瘤细胞 L342 的凋亡诱导作用.....	36
2.9 统计学方法处理实验数据.....	36
二、结果与分析.....	37
1 杂交瘤细胞系的建立.....	37
2 单克隆抗体的纯化.....	37
3 单克隆抗体的特异性鉴定.....	37
4 单克隆抗体的效价测定及 Ig 亚类鉴定.....	39
5 流式细胞仪检测 L342 细胞表面 DR5 的表达.....	40
6 Fas 和 DR5 在肿瘤细胞的表达 (mRNA 水平).....	40
7 FasL、Anti-DR5 mAb 对肿瘤细胞 L342 增殖的影响.....	40
8 流式细胞仪检测 Anti-DR5 mAb 对肿瘤细胞 L342 的凋亡诱导作用.....	42
三、讨论.....	42
第三章 佐剂型关节炎 (AA) 大鼠模型的建立和 Anti-DR5 mAb 作用机理的研究.....	44
一、材料和方法.....	44
1 材料.....	44
1.1 实验大鼠.....	44
1.2 主要试剂及耗材.....	44
1.3 主要仪器及设备.....	45
1.4 主要溶液的配制.....	45
2 方法.....	47

2.1 佐剂型关节炎 (AA) 大鼠模型的建立、分组及给药治疗.....	47
2.2 滑膜组织细胞的分离.....	47
2.3 血液淋巴细胞的分离.....	47
2.4 滑膜与淋巴细胞总蛋白的提取.....	48
2.5 关节滑膜液的获取与检测.....	48
2.6 各组织器官总蛋白的提取.....	48
2.7 各组织器官和滑膜细胞膜蛋白的提取.....	49
2.8 各项指标的检测.....	49
2.9 数据处理.....	52
二、结果与分析.....	52
1 Anti-DR5 mAb 对 AA 大鼠关节炎的影响.....	52
2 Anti-DR5 mAb 对 AA 大鼠关节病理改变的影响.....	52
3 Anti-DR5 mAb 治疗后血清和滑液中 IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 水平的变化.....	53
4 RT-PCR 分析 DR5 mRNA 的表达.....	54
5 Western blot 分析各组织 Caspase-8、Bcl-2 蛋白的表达.....	55
三、讨论.....	56
总结.....	58
参考文献.....	59
致谢.....	68

Contents

Chapter I Introduction.....	01
I Etiology of rheumatoid arthritis.....	01
1 Cytokines and rheumatoid arthritis.....	02
2 Th1/Th2 cellular balance and rheumatoid arthritis.....	05
3 Apoptosis and rheumatoid arthritis.....	06
4 Sex hormone and rheumatoid arthritis.....	06
5 Oncogene and rheumatoid arthritis.....	07
II Therapy of rheumatoid arthritis.....	08
1 Surgical therapy.....	08
2 Medical therapy.....	08
3 Biological therapy.....	10
4 Gene therapy.....	13
5 Replacement Therapy using hemopoietic stem cell transfer.....	14
6 New therapeutic targets.....	14
III Research progress to DR5 as the target of disease related to immunity	
.....	15
1 Structure and distribution of death receptor 5(DR5).....	16
2 Death receptor 5(DR5) and apoptosis of tumor cell.....	16
3 Death receptor 5(DR5) and rheumatoid arthritis.....	21
IV The experimental design.....	22
1 Objective and significance of my study.....	22
2 Content of research.....	23
Chapter II Preparation and impact analysis of Anti-DR5	
monoclonal antibody.....	24
I Materials and methods.....	24
1 Materials.....	24
1.1 Experimental animals and cell strains.....	24
1.2 Main reagents and consumptive material.....	24
1.3 Primary instruments and equipments.....	25
1.4 Primary solution making.....	25

2	Methods.....	29
2.1	Establishment of hybridoma clone.....	29
2.2	Preparation and purification of monoclonal antibody	31
2.3	Identification of monoclonal antibody's specificity.....	31
2.4	Identification of monoclonal antibody's titer and Ig subtype	33
2.5	Using Flow Cytometer to detect DR5 expression on surface of L342 cell strain.....	34
2.6	Using RT-PCR to detect Fas and DR5 expression of tumor cell strains.....	34
2.7	Using MTT to detect the impact on tumor cell L342 strain's proliferation by FasL, Anti-DR5 mAb.....	36
2.8	Using Flow Cytometer to detect apoptosis of tumor cell L342 strain induced by Anti-DR5 mAb	36
2.9	Statistical method to deal with experimental data	36
II	Results and analysis.....	37
1	Establishment of hybridoma clone.....	37
2	Purification of monoclonal antibody	37
3	Identification of monoclonal antibody 's specificity.....	37
4	Identification of monoclonal antibody 's titer and Ig subtype.....	39
5	Using Flow Cytometer to detect DR5 expression on surface of L342 cell strain.....	40
6	Fas and DR5 expression of tumor cell strains(mRNA level).....	40
7	Impact on tumor cell L342 strain's growth by FasL, Anti-DR5 mAb.....	40
8	Using Flow Cytometer to detect apoptosis of tumor cell strains induced by Anti-DR5 mAb.....	42
III	Discussion.....	42
	Chapter III The establishment of rat' s adjuvant arthritis model and mechanism of impact investigation of Anti-DR5 mAb	44
I	Materials and methods.....	44
1	Materials	44
1.1	Experimental rats	44
1.2	Main reagents and consumptive material.....	44

1.3	Primary instruments and equipments.....	45
1.4	Primary solution making.....	45
2	Methods.....	47
2.1	Establishment,classification and treatment of adjuvant arthritis(AA) rat's models.....	47
2.2	Segregation of synoviocytes.....	47
2.3	Segregation of hematic lymphocytes.....	47
2.4	Extraction of total proteins in synovium and lymphocytes.....	48
2.5	Extraction and detection of synovia from joints.....	48
2.6	Acquirement of total proteins from each tissues and organs.....	48
2.7	Acquirement of membrane proteins from each tissues and organs.....	49
2.8	The detection of each index.....	49
2.9	Statistical method to deal with experimental data.....	52
II	Results and analysis.....	52
1	The effect of Anti-DR5 mAb on rat's articular inflammation.....	52
2	The effect of Anti-DR5 mAb on rat's pathologic changes.....	52
3	Variation of IL-1 β ,TNF- α ,IFN- γ in serum and synovia after treatment by Anti-DR5 mAb.....	53
4	Using RT-PCR to detect DR5 mRNA.....	54
5	Using Western blot to analyse Caspase-8,Bcl-2 protein expression of each main tissues.....	55
III	Discussion.....	56
	Conclusion.....	58
	References.....	59
	Acknowledgments.....	68

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
Ab	Antibody	抗体
Ag	Antigen	抗原
APP	Acute-phase proteins	急性相蛋白
APRA	Acute phase reactive protein	急性时相反应蛋白
BCR	B-cell receptor	B 细胞受体
BMT	Bone marrow transplantation	骨髓干细胞移植
CF	Chemotactic factor	趋化因子
COX	Cyclooxygenase	环氧化酶
CsA	Chondroitin sulfate A	硫酸软骨素 A
CSF	Colony stimulating factor	集落刺激因子
CTC	Cytotoxic T cell	细胞毒性 T 细胞
DD	Death domain	死亡结构域
DED	Death effector domain	死亡效应器
DISC	Death-inducing signal complex	死亡诱导信号复合体
FADD	Fas-associated death domain	Fas 相关死亡结构域
FGF	Fibroblast growth factor	成纤维细胞生长因子
FLS	Fibroblast-like synovial cells	成纤维细胞样滑膜细胞
GAG	Glycosaminoglycan	氨基多糖
GM-CSF	Granulocyte macrophage-colony stimulating factor	粒细胞、巨噬细胞-集落刺激因子
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation	造血干细胞移植
IC	Immunologic complex	免疫复合物
IFN	Interferon	干扰素
IL	Interleukin	白细胞介素
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MCP	Monocyte chemoattractant protein	单核细胞趋化蛋白

缩略词表

MIP	Macrophage inflammatory protein	巨噬细胞炎症蛋白
MTX	Methotrexate	氨甲喋呤
NK	Natural killer	自然杀伤细胞
NSAIDs	Non-steroidal anti-inflammatory drugs	非甾体抗炎药
OA	Osteoarthritis	骨关节炎
OPG	Osteoprotegerin	骨保护素
PBMC	Peripheral blood lymphocytes	外周血淋巴细胞
PBSCT	Peripheral blood stem cell transplantation	外周血干细胞移植
PG	Prostaglandin	前列腺素
PL	Plasmic lysophospholipase	胞浆型磷脂酶
RA	Rheumatoid arthritis	类风湿性关节炎
rAAV	recombinant Adeno-associated virus vector	重组腺相关病毒载体
RF	Rheumatoid factor	类风湿因子
SAS	Saturated ammonium sulfate	饱和硫酸铵
SFMC	Synovial fluid mononuclear cells	滑膜液中单个核细胞
TCR	T-cell receptor	T 细胞受体
TGF	Transforming growth factor	转化生长因子
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TRA-8	Agonistic monoclonal antibody specific for human DR5	人 DR5 特异的竞争性 mAb
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand	肿瘤坏死因子相关诱导配体
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮细胞生长因子

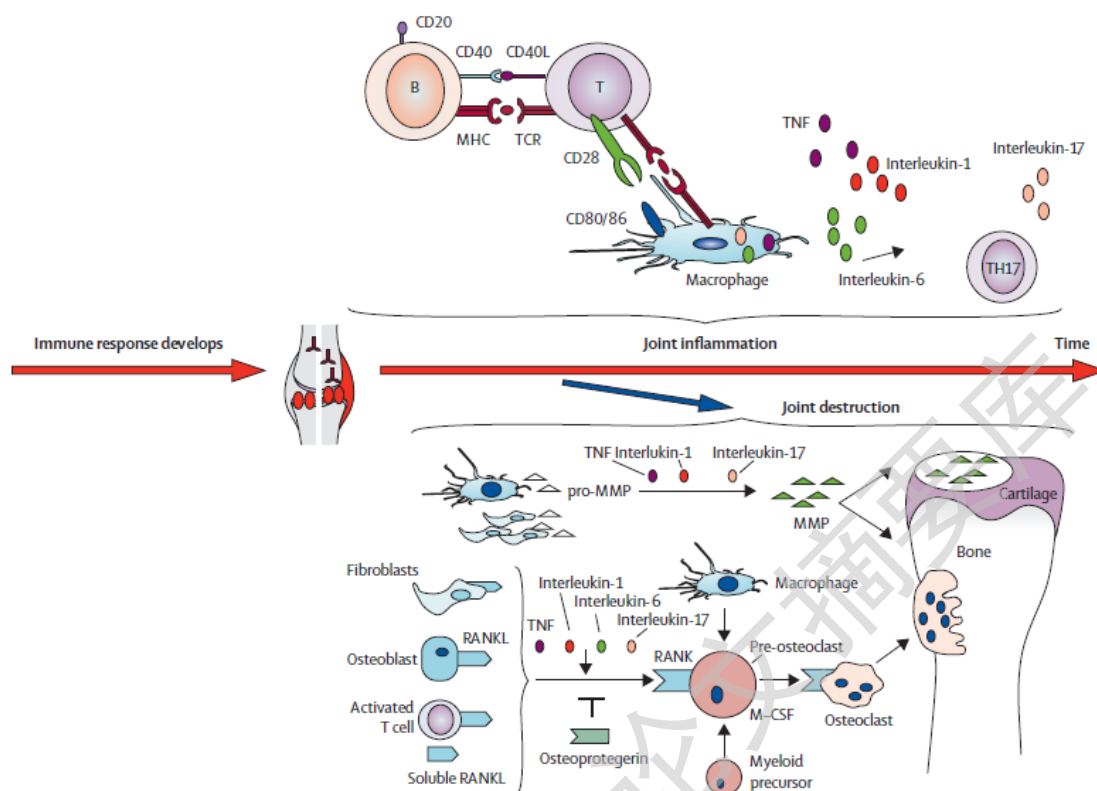
第一章 前言

类风湿性关节炎（Rheumatoid Arthritis, RA）是以慢性多关节滑膜炎、骨及软骨破坏为主要特征的全身性自身免疫性疾病。其临床表现为局部对称性关节疼痛、功能障碍等，具体表现为慢性滑膜炎、滑膜增生和纤维化^[1,2]。病理基础主要是滑膜和关节等全身结缔组织的破坏和解聚。结缔组织的破坏过程主要表现为纤维蛋白样变性、坏死、增殖和硬化，以及典型的血管炎与坏死性改变。随着分子生物学和免疫学研究的发展、RA 动物模型的建立，发现细胞因子、Th1/Th2 细胞平衡、细胞凋亡、性激素、原癌基因等在 RA 的发病过程中都起着重要作用。

一、类风湿性关节炎的发病因素

类风湿性关节炎是一种世界范围内的常见自身免疫病，全世界患病率平均为 1%，目前约有 3.6 亿人患有各种关节疾病。在美国，发病率约为 0.3%-1.5%，在我国的初步调查结果为 0.32%-0.4%，约有 400-500 万病人。类风湿性关节炎在女性人群中多发，女性患者的数量是男性的 3 倍^[3]。长期以来，类风湿性关节炎的病因一直是困扰人们的一个难题，若未及时诊治，70% 以上的患者 2 年后可能致残，90% 的重症患者将会严重致残并伴发关节外的器官损伤，且平均寿命缩短 10~15 年，严重影响到患者的生活质量甚至威胁生命，这使得类风湿性关节炎成为世界医学及生物学的研究热点。

以往认为类风湿性关节炎是以 III 型超敏反应为主，其血清中的自身抗体即类风湿因子（Rheumatoid factor, RF）^[4]，是针对 IgG Fc 片段的 IgM，RF 及其免疫复合物（Immunologic complex, IC）沉积于关节囊滑膜，引起滑膜增厚、充血、水肿、淋巴细胞和巨噬细胞浸润^[5]。随着分子生物学和免疫学的进展，特别是 RA 动物模型的建立及其在研究 RA 发病机理等方面的大量应用，人们发现细胞因子、Th1/Th2 细胞平衡、细胞凋亡、性激素、原癌基因等在 RA 的发病过程中起着重要作用（如下图所示）。



1 细胞因子与类风湿关节炎

细胞因子是由机体的免疫细胞和非免疫细胞合成和分泌的小分子多肽类因子，它们调节多种细胞的生理功能，这些因子统称为细胞因子（Cytokine），包括淋巴细胞产生的淋巴因子和单核巨噬细胞产生的单核因子等。白细胞介素（Interleukin,IL）、干扰素（Interferon,IFN）、集落刺激因子（Colony stimulating factor,CSF）、肿瘤坏死因子（Tumor necrosis factor,TNF）、转化生长因子（Transforming growth factor,TGF）、趋化因子（Chemotactic factor,CF）等都是目前已知的细胞因子。细胞因子具有广泛的生物活性，但偏重于对细胞生长和分化的调节。

在病理状态下或某些疾病的进程中，细胞因子会出现异常性表达，表现为细胞因子及其受体的缺陷、细胞因子表达过高、可溶性细胞因子受体的水平升高等。在类风湿关节炎等风湿性疾病病理过程中相关的细胞因子包括：① 辅助性 T 细胞两个功能亚群——Th1 和 Th2 细胞所分泌的细胞因子。Th1 细胞主要分泌 IL-2, IFN- γ , TNF, GM-CSF 等具有促炎症反应作用的细胞因子，而 Th2 细胞主要分泌 IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 等具有抑制炎症反应作用的细胞因子；② 具有促炎症作

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库