

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051302128

UDC_____

廈門大學

碩 士 学 位 论 文

抗 DR5 抗体诱导鼠肝癌细胞凋亡的研究

A study on Anti- DR5 mAb inducing mouse Hepatocellular carcinoma cells Apoptosis

陈彩霞

指导教师姓名: 庄国洪 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 6 月

论文答辩时间: 2008 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 李东辉

评 阅 人: _____

2008 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版,有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅,有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索,有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后使用本规定。

本学位论文属于

- 1、保密(), 在 年解密后适用本授权书。
- 2、不保密()

(请在以上相应括号内打“√”)

作者签名:

日期: 年 月 日

导师签名:

日期: 年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

原发性肝癌是我国常见恶性肿瘤之一，居我国癌症发病率的第二位，每年约有 13 万人死于肝癌。近些年来其发病率和死亡率有逐年升高的趋势。由于其具有侵袭性强、易复发、转移等生物学特性，目前包括手术、放疗、化疗等各种治疗方法的效果均不佳，而生物治疗在肝癌综合治疗中的应用取得较大进展，成为肿瘤治疗的第四模式。死亡受体 5 (DR5/TRAILR2) 是 TRAILR 中的一员，属于肿瘤坏死因子受体超家族。当它与相关配体结合时，能选择性地杀伤多种肿瘤细胞而对正常细胞没有毒性，曾被誉为最有发展前途的抗肿瘤靶点。本文将抗 Anti-DR5 mAb 体内、外作用于鼠肝癌细胞，并联合应用化疗药物阿霉素(ADM)或放线菌素-D (ACTD)，观察 Anti-DR5 mAb 与化疗药物对肝癌细胞的协同杀伤作用，以研究探讨 Anti-DR5 mAb 与化疗药物联合应用于肝癌的治疗作用及机制。

我们采用重叠 PCR 技术获得了 DR5 基因，构建原核表达载体 pET22b(+)/DR5，通过优化其表达条件，实现目的蛋白在大肠杆菌 Rosetta-gami 中的高效表达。表达产物主要以包涵体的形式存在，且表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。用镍亲和层析柱纯化目的蛋白，得到的蛋白纯度均在 95% 以上。ELISA 结果表明所纯化的蛋白可与抗 DR5 抗体发生特异结合。用纯化的 sDR5 免疫小鼠，制备 Anti-DR5 mAb，应用流式细胞术与细胞毒性试验检测 Anti-DR5 mAb、ADM 和 ACTD 诱导肝癌细胞凋亡的作用。建立小鼠肝癌模型，皮下注射 Anti-DR5 mAb、ADM、ACTD、Anti-DR5 mAb-ADM 和 Anti-DR5 mAb-ACTD，观察它们对小鼠肿瘤体积与重量增长的抑制、小鼠体重的增加以及对小鼠存活率的影响作用，并通过 HE 染色和 TUNEL 实验观察其对肝癌细胞的凋亡作用以及对正常肝细胞是否具有毒性作用。

结果表明，Anti-DR5 mAb、ADM 和 ACTD 作用于肝癌细胞后，均可诱导肝癌细胞凋亡，Anti-DR5 mAb、ADM、ACTD、Anti-DR5 mAb-ADM 和 Anti-DR5 mAb-ACTD 作用于 HCC 小鼠后，使小鼠肿瘤重量增加减缓，极大的延长了小鼠的存活时间，HE 染色与 TUNEL 实验也显示 Anti-DR5 mAb 与 ADM/ACTD 化疗药物联合应用时，对诱导肝癌细胞凋亡具有协同增效作用，同时，大幅度降低

了 Anti-DR5 mAb、ADM 和 ACTD 化疗药物对正常肝细胞的毒性。

总之，我们通过基因工程技术成功地构建了 DR5 基因，并在原核表达体系获得高效表达。纯化复性 DR5 蛋白免疫小鼠，制备了 Anti-DR5 mAb。Anti-DR5 mAb 用于小鼠肝癌的治疗，体内外实验结果显示 Anti-DR5 mAb、ADM、ACTD 对 HCC 细胞具有协同杀伤作用，联合应用时对正常肝细胞的毒性小。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 ADM、ACTD 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。Anti-DR5 mAb 作用肝癌的机制不仅是通过细胞凋亡的途径，还可能与线粒体依赖途径有关，这些为肝癌发病机理的研究及有效治疗提供了新的靶点。

关键词： DR5； 肝癌； 细胞凋亡； Anti-DR5 mAb

Abstract

Death receptor 5 (TRAIL-R2), a member of the TRAILR, belonging to tumor necrosis factor receptor superfamily. When DR5 is binding to its ligand, they can selectively destruct a variety of tumor cells and have no cytotoxicity to normal live cells and other cells. DR5 has been known as the most promising anticancer drug. Primary hepatic carcinoma is one of common malignant tumors, its attack rate occupies the second in our country, thirteen thousand personnel died of hepatoma every year, and the recent years its morbidity and mortality elevated year by year. Due to the bionomics of powerful invasion, easily recurrence and diversion, various kinds of therapy including operation, radiotherapy and chemical-therapy all have low effect. However biotherapy gained a great progress recently, it will become the 4th therapy mode of Hepatocellular carcinoma. This study observed Anti-DR5 mAb, ADM and ACTD have synergic lethal effect on HCC and investigated the therapeutic significance and mechanism of Anti-DR5 mAb-chemotherapeutics to hepatoma.

We constructed the fused genes of DR5 with overlapping PCR, and then it was inserted into vector pET22 b (+), expressed efficiently in *E.coli* Rosetta-gami under optimization condition. The fusion proteins were purified through Nickel-affinity chromatography column. Anti-DR5 mAb was prepared by using the purified DR5 protein to immunity mice. It was Showed that Anti-DR5 mAb, ADM, ACTD have a synergic lethal effect on HCC, The toxicity to normal liver cells was reduced greatly by injecting Anti-DR5 mAb with ADM or ACTD. The current work shows that Anti-DR5 mAb has anti-tumor properties in vivo and in vitro and it can sensitize murine HCC cells to anti-DR5, ACTD or ADM-induced apoptosis.

In conclusions, the fused genes DR5 was constructed by gene engineering technology and fusion protein were expressed efficiently in *E.coli*. Anti-DR5 mAb was prepared by using the purified DR5 protein. It was Showed that Anti-DR5 mAb, ADM, ACTD have a synergic lethal effect on HCC, The toxicity to normal liver cells

was reduced greatly by injecting Anti-DR5 mAb with ADM or ACTD in vivo and vitro experiments. Our study will provide valuable theoretical and experimental evidence for treatment to Hepatocellular carcinoma.

Keywords: DR5; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

| | |
|--------------------------------------|-----------|
| 第一章 前言 | 1 |
| 一、肝癌与细胞凋亡 | 1 |
| 1 肝癌的形成与细胞凋亡 | 1 |
| 2 细胞凋亡的相关基因及作用 | 1 |
| 3 参与细胞凋亡的其他分子 | 3 |
| 4 诱导细胞凋亡的其他分子 | 7 |
| 二、肝癌的生物治疗 | 8 |
| 1 基因治疗 | 8 |
| 2 免疫治疗 | 9 |
| 3 干细胞移植治疗 | 11 |
| 4 抑制血管生成治疗 | 11 |
| 5 抗体靶向治疗 | 12 |
| 三、以死亡受体为靶点的肿瘤生物治疗 | 13 |
| 1 TRAIL/ DR5 系统抗肿瘤应用的研究 | 13 |
| 2 抗人 DR5 单克隆抗体的抗肿瘤研究 | 15 |
| 3 以 DR5 为靶点的肿瘤生物治疗的意义 | 16 |
| 四、阿霉素与放线菌素-D 等化疗药物的抗癌作用 | 18 |
| 1 阿霉素的作用机制 | 18 |
| 2 放线菌素-D 的作用机制 | 18 |
| 第二章 实验方案设计 | 19 |
| 一、研究目的和意义 | 19 |
| 二、研究内容 | 19 |
| 第三章 融合蛋白 DR5 的表达、鉴定 | 21 |
| 一、材料与方法 | 21 |
| 1 实验材料 | 21 |
| 1.1 菌株及质粒 | 21 |
| 1.2 生物信息学工具 | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 1.3 主要试剂及耗材..... | 21 |
| 1.4 主要仪器及设备..... | 22 |
| 1.5 主要溶液的配制..... | 22 |
| 2 实验方法 | 24 |
| 2.1 确定 DR5 的核苷酸序列 | 24 |
| 2.2 DR5 核苷酸的分段与合成..... | 24 |
| 2.3 重叠 PCR 组装 DR5 基因 | 25 |
| 2.4 原核表达质粒 pET-22b(+)/DR5 的构建与转化..... | 27 |
| 2.5 重组子的筛选与序列分析..... | 29 |
| 2.6 目的蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化..... | 31 |
| 2.7 目的蛋白 ELISA 鉴定其特异性 | 35 |
| 2.8 目的蛋白 MTT 法鉴定其活性..... | 35 |
| 二 结果与分析 | 35 |
| 1. DR5 胞外域编码序列的重组..... | 35 |
| 2 菌落 PCR 的筛选结果..... | 36 |
| 3 pET-22b(+)/DR5 的双酶切结果..... | 36 |
| 4 DR5 基因的表达和纯化..... | 37 |
| 5 sDR5 浓度的确定 | 40 |
| 6 特异性鉴定 | 40 |
| 7 可溶性 DR5 的生物活性鉴定..... | 40 |
| 三 讨论 | 41 |
| 第四章 Anti-DR5 单克隆抗体的制备及对鼠肝癌细胞的作用分析 .. | 43 |
| 一、材料和方法 | 43 |
| 1 材料 | 43 |
| 1.1 实验大鼠..... | 43 |
| 1.2 主要试剂及耗材..... | 43 |
| 1.3 主要仪器及设备..... | 43 |
| 1.4 主要溶液的配制..... | 44 |
| 2 方法 | 45 |
| 2.1 抗 DR5 单克隆抗体的制备 | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 体外单克隆抗体对肝癌细胞的杀伤作用..... | 45 |
| 2.3 肿瘤动物模型的建立及分组..... | 46 |
| 2.4 肿瘤动物模型的药物治理..... | 46 |
| 2.5 小鼠体重的称量及药物对小鼠存活率的影响观察..... | 46 |
| 2.6 各组织器官的获取及肿瘤大小、重量的测量..... | 46 |
| 2.7 HE 染色、脱水和封片 | 47 |
| 2.8 TUNEL 法检测细胞凋亡率..... | 47 |
| 2.9 数据处理..... | 47 |
| 二、结果与分析 | 47 |
| 1 小鼠的免疫和 Anti-DR5 mAb 的制备 | 47 |
| 2 Anti-DR5 mAb, AMD and ACTD 对 HCC 肿瘤细胞毒作用 | 47 |
| 3 流式细胞仪对细胞凋亡分析 | 49 |
| 4 肿瘤大小、重量的测量 | 50 |
| 5 各组小鼠体重变化 | 51 |
| 6 小鼠存活率结果 | 53 |
| 7 HE 染色 | 53 |
| 8 TUNEL 检测 | 55 |
| 三、讨论..... | 57 |
| 总结 | 60 |
| 参考文献 | 61 |
| 致谢语 | 64 |

CONTENTS

| | |
|--|-----------|
| Chapter I Introduction..... | 1 |
| I Hepatocellular Carcinoma and cell apoptosis..... | 1 |
| 1 Hepatocellular Carcinoma genesis and cell apoptosis..... | 1 |
| 2 The related gene of Hepatocellular Carcinoma cell apoptosis | 1 |
| 3 Hepatocellular Carcinoma and cytokines | 3 |
| 4 The related factors of Hepatocellular Carcinoma cell apoptosis..... | 7 |
| II Biotherapy of hepatocellular carcinoma | 8 |
| 1 Gene Therapy..... | 8 |
| 2 Immunotherapy | 9 |
| 3 Stem Cell Transplant Therapy | 11 |
| 4 Treatment by inhibiting angiogenesis | 11 |
| 5 New target | 12 |
| III The study advancement on DR5..... | 13 |
| 1 The application of TRAIL/DR5 system for anti-tumor..... | 13 |
| 2 The study of Anti-DR5 mAb..... | 15 |
| 3 The tumor biotherapy significance of DR5 | 16 |
| IV Adriamycin and Dactinomycin chemotherapeutics Anti-tumor effect..... | 18 |
| 1 The effective mechanism of ADM..... | 18 |
| 2 The effective mechanism of ACTD..... | 18 |
| Chapter II The designation of experiment scheme. | 19 |
| I The purpose and significance of this thesis | 19 |
| II The content of this thesis..... | 19 |
| Chapter III Expression and characterization of DR5 | 21 |
| I Materials and methods | 21 |
| 1 Materials | 21 |
| 1.1 Bacterium strains and vectors | 21 |
| 1.2 Bioinformation tools | 21 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1.3 | Regents..... | 21 |
| 1.4 | Main instruments | 22 |
| 1.5 | Primary solutions | 22 |
| 2 | Methods | 24 |
| 2.1 | Establish nucleotide sequence of DR5..... | 24 |
| 2.2 | Synthesis primers DR5 | 24 |
| 2.3 | Overlapping PCR to construct DR5 genes..... | 25 |
| 2.4 | Construction of recombinant plasmids and their transformation..... | 27 |
| 2.5 | Screening of recombinants and analysis of sequences | 29 |
| 2.6 | Expression of proteins..... | 31 |
| 2.7 | Purification and renaturation of proteins | 35 |
| 2.8 | Analysis of proteins' activity by ELISA and MTT..... | 35 |
| II | Results and analysis..... | 35 |
| 1 | Construction of genes | 35 |
| 2 | Screening of recombinants and analysis of sequences | 36 |
| 3 | Forecast of proteins high construction..... | 36 |
| 4 | Expression and purification of proteins with high yield..... | 37 |
| 5 | Calculation of proteins' concentration..... | 40 |
| 6 | Verification of proteins' specificness | 40 |
| 7 | Identification of sDR5 bioactivity..... | 40 |
| III | Discussion..... | 41 |
| | Chapter IV The preparation of Anti-DR5 mAb and the analysis of effect on HCC..... | 43 |
| I | Materials and methods..... | 43 |
| 1 | Materials..... | 43 |
| 1.1 | Mice | 43 |
| 1.2 | Regents..... | 43 |
| 1.3 | Main instruments | 43 |
| 1.4 | Primary solutions | 44 |
| 2 | Methods..... | 45 |
| 2.1 | Preparation and verification of Anti-DR5 mAb..... | 45 |
| 2.2 | Lethal effect of Anti-DR5 mAb on HCC in vitro..... | 45 |
| 2.3 | Establishment and classification of HCC mice models..... | 46 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.4 | Investigational drug preparation and injection | 46 |
| 2.5 | The mice body weight and survival rate..... | 46 |
| 2.6 | Measurement of the tumor size and weight..... | 46 |
| 2.7 | HE staining | 47 |
| 2.8 | TUNNEL detection..... | 47 |
| 2.9 | Statistical analysis..... | 47 |
| II | Results..... | 47 |
| 1 | The detection and verification of Anti-DR5 mAb | 47 |
| 2 | Cell toxicity test detected HCC apoptosis induced by Anti-DR5 mAb, ADM or ACTD..... | 47 |
| 3 | Flow cytometry detected HCC apoptosis induced by Anti-DR5 mAb, ADM or ACTD..... | 49 |
| 4 | The mice tumor weight and size..... | 50 |
| 5 | The change of mice body weight..... | 51 |
| 6 | The mice survival rate..... | 53 |
| 7 | HE staining..... | 53 |
| 8 | TUNEL detection..... | 55 |
| III | Discussion..... | 57 |
| | Conclusion | 60 |
| | References..... | 61 |
| | Acknowledgments..... | 64 |

第一章 前言

肝细胞癌(HCC)是我国常见的恶性肿瘤,其死亡率仅次于胃癌,全国每年至少有 13 万人被肝癌夺去生命。中国肝癌死亡人数已占全球肝癌死亡总人数的 44%,人称"癌中之王"。肝细胞癌变是一个多基因作用的过程,包括原癌基因的激活和抑癌基因的失活,二者共同作用导致细胞癌变。

一、肝癌与细胞凋亡

细胞凋亡(apoptosis)又称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),是活体内单个细胞或小团细胞的死亡,是机体为维护自身稳定在基因调控下细胞发生主动消亡的过程。细胞凋亡和坏死是细胞死亡的两种不同的形式。凋亡的细胞膜不破裂,不自溶,而是形成凋亡小体,凋亡也不引起急性炎症反应。生理情况下细胞凋亡参与胚胎的发生、发育、衰老、器官细胞平衡稳定等过程,病理情况下与肿瘤等疾病发生有关。

1 肝癌的形成与细胞凋亡

细胞凋亡与肝癌的发生发展有关。正常人体细胞增生与死亡处于动态平衡,从而保持细胞总数的恒定。细胞增生与凋亡之间的平衡失调对细胞癌变的引发、癌前细胞和癌细胞的生存、生长起着基本作用。细胞复制的增强有助于增加突变的频率,而细胞凋亡通过丢失突变细胞抵抗致癌过程。若基因突变使凋亡调控信号下调,则发生突变的细胞得以生存,并可异常增生,最终形成肿瘤。在肿瘤发展过程中,肿瘤细胞不仅表现为过度增生,而且具有远远高于正常组织的凋亡率,在肿瘤发展的各个阶段增生大于凋亡,从而保持癌细胞数量的净增加。凋亡抑制剂如生长因子、雌激素、雄激素、苯巴比妥等可加速肿瘤得增长,而凋亡诱导剂如肿瘤坏死因子、转化生长因子、氧自由基、放疗、化疗药等能诱导肝细胞凋亡而削弱肿瘤生长。有研究发现在肝细胞癌中细胞增值、凋亡和坏死的复合指标较单一指标能更准确地反映肿瘤的预后,肿瘤组织中细胞增殖旺盛而凋亡和/或坏死不显著的病例临床预后更差。

2 细胞凋亡的相关基因及作用

细胞凋亡是一个多基因调控的复杂过程,主要是由诱导基因、抑制基因和双向控制基因相互作用结果^[1-6]。

2.1 P53 基因

p53 基因能促进细胞凋亡, 而突变型 p53 基因则抑制细胞凋亡。p53 的表达与抑制肿瘤细胞肿瘤细胞增生、介导凋亡密切相关, 与 Ras 基因表达的调控相关时, 肿瘤细胞倾向于转为 Fas 配体旁路介导的凋亡^[7]。研究表明, p53 促进凋亡使其独立上调了内源性 p21 (CIP1/Waf1) 和 Bax 蛋白, 同时激活了 p34 (cdc2) 激酶, 增加了 Rb2 蛋白的水平和磷酸化作用^[8]。人巨细胞病毒增强剂 (AdCMV-P53w) 不论对全身或局部治疗 HCCs 突变 p53 的表达均有效^[9]。人参皂苷 (Ginsenoside-Rs4, G-Rs4) 引起的凋亡主要是选择性地升高了人肝 SK-HEP-1 细胞中 p53 蛋白的水平和 p21WAF1 (野生型 p53 激活片段) 的水平^[10]。p53 表达状况与预后在统计学有明显的相关性, 即阳性者预后较差^[10]。

2.2 Fas 基因

HBV 感染了肝细胞, Fas/FasL 系统应答而发生肝炎, 然而一些 HBV 感染细胞绕过 Fas 介导的凋亡, 不能激活 caspases (凋亡效应分子) 并转变为癌细胞 (如 PLC/PRF/5 肝癌细胞)^[11]。分子量比较和免疫印迹法分析显示 PLC/PRF/5 细胞缺乏 Fas death domain (FAD) 相关蛋白 FADD。将 FADD 注射到 HepG2 细胞显示对 Fas 介导凋亡的耐受性, 注射到 PLC/PRF/5 细胞获得对 Fas 的敏感性。因此 FADD 功能缺失是乙肝肝细胞癌变的旁路之一。FADD 也可由 TNF- α 上调而激发肝细胞凋亡的级联过程^[12]。发生变异的肝细胞对 Fas 系统介导凋亡不敏感, 使异常肝细胞不断增生最终导致肝癌。肝癌细胞中未检出 Fas 而检出 FasL, 可能是一种肿瘤逃避免疫攻击的机制。也有人认为 Fas 介导的凋亡在肝细胞发生肿瘤中有双向作用, 即对雄性 C3H/HeJ 大鼠的实验表明, 大剂量抗 Fas 抗体 (5mg/只) 对清除二乙基亚硝胺诱发的肝细胞凋亡有显著作用, 而小剂量 (2 mg/只) 重复注射可促发肝细胞的致癌性^[13]。一般认为导致肝癌细胞凋亡是由于 Fas 受体的激活和之后的 caspase8 的激活, 或者通过 FasL 的上调。部分抗肝癌药物 (如干扰素) 即是通过该途径^[14]。

2.3 Caspase

Caspase 可被多种物质激活, 转染 caspase 的肿瘤细胞发生典型的凋亡。一般认为化疗药物以及高渗引起细胞凋亡大多通过激活 caspase 3 起作用^[15], 低浓度的谷胱甘肽-阿霉素 (GSH-ADM) 比 ADM 更有效地引起鼠肝细胞 (AH66) 的凋亡, 并能提高 caspase3 大约 100 倍。两种药物处理 12h 和 15h 后可见 caspase3 的活性增加和 DNA 的断裂^[16]。凋亡前各种强信号激活 caspase 是凋亡突增的必

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