

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520081153474

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

抗人 DR5 单链抗体特性鉴定及体内外功能
分析

aDR5scFv specific identification and functional analysis in *vitro*
and *vivo*

程小峰

指导教师姓名: 庄国洪 副教授

专业名称: 肿 瘤 学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 6 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 5 月

抗人 IgM 单链抗体特性鉴定及体内外功能分析

程小峰

指导教师

庄国洪

副教授

厦门大学

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其他个人或集体已经发表的研究成果,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

背景及目的

肺癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤，从大体上可分为小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（NSCLC）。其中大部分为非小细胞肺癌，约占 80%，小细胞肺癌约占 20%。约 65%~70%的非小细胞肺癌在就诊时就已处于晚期。早期小细胞肺癌可以取得较好的治疗效果。但晚期的非小细胞肺癌无论手术或者放射治疗均不能取得满意的治疗效果。单克隆抗体作为一种新的治疗方法，虽然在临床上还不够成熟，但是它是一种具有很大潜力的免疫学治疗方法。

目前现有的研究证实，抗 DR5 单克隆抗体 (aDR5mAb) 可通过与 DR5 的特异性结合，诱导表达 DR5 的肿瘤细胞凋亡，但同时也有报道证明抗 DR5 单克隆抗体亦存在肝毒性。目前制备的抗 DR5 单克隆抗体多数属于鼠源性，直接作用人体会产生机体排斥反应，降低治疗效果。故为了降低人体对单克隆抗体的排斥反应，对单克隆抗体进行改造，成为了新的方向。本实验室已制备出抗人 DR5 单克隆抗体，并证实其能明显的诱导肿瘤细胞凋亡且无明显肝毒性，本实验室钓出了该单克隆抗体的轻重链基因，构建并表达了抗 DR5 单链抗体。为了进一步研究单链抗体的功能，我们拟探讨其特性，体内抑瘤效果及与放疗联合的作用体外抑瘤效果。

方法

本实验室构建了抗 DR5 单链抗体 (aDR5scFv)，通过 ELISA 方法对单链抗体进行了特异性分析。通过 MTT 法检测 aDR5scFv 对肺腺癌细胞 973 的细胞毒效应；流式细胞术检测 aDR5scFv 诱导 973 的凋亡率；Western blot 检测 Bax, caspase-3, 细胞色素 c 的蛋白表达；为了研究体内 aDR5scFv 对肺腺癌的作用，我们应用 973 细胞建立了裸鼠肺腺癌模型，腹腔注射给药，并联合放射治疗，观察 aDR5scFv 的体内抑瘤效果，通过 HE 染色和 TUNEL 分析其可能机制。

结果

结果发现 aDR5scFv 能够与 eDR5 特异结合，MTT 结果显示 aDR5scFv 抑制

973 细胞生长呈剂量依赖性, aDR5scFv 终浓度分别为 0.225, 0.45, 0.9, 1.2 mg/mL 应用 200 μ L 时, 对 973 细胞的生长抑制率分别为 28.8%, 52.3%, 65.3%, 89.8%; 与流式细胞术检测结果相符。Western blot 检测到 aDR5scFv 作用细胞 4h 后 Bax, caspase-3, 细胞色素 c 蛋白表达上调。

体内实验观察到 aDR5scFv 实验组与空白组相比, 肿瘤体积明显减小, 并观察到 aDR5scFv 与放疗联合应用时, 肿瘤体积明显小于单独应用组。Tunel 及 HE 染色发现 aDR5scFv 与放疗联合应用组凋亡明显强于单独应用组。

结论

1. aDR5scFv 能够特异结合 eDR5 ;
2. 体外实验表明 aDR5scFv 抑制肺腺癌 973 细胞生长与 Bax, caspase-3 及细胞色素 c 表达上调相关;
3. 体内实验表明 aDR5scFv 能够抑制 973 细胞生长, 并且对正常肝细胞无毒性作用。 aDR5scFv 与放疗联合应用组明显强于单独应用组。

关键词: DR5; 单链抗体; 肺腺癌 973 细胞株; 凋亡

ABSTRACT

Background & objective

Lung cancer is one of common malignant tumors in the world. There are two kinds of Lung cancer. One is SCLC. The other is NSCLC. The number of people who suffer from NSCLC accounted for most of the number of people who have Lung cancer. It's about 80 percent. About 65%~70% of NSCLC are found to be in the advanced stage. Although the expectation of patients who have SCLC in early stage is almost good, the expectation of most patient who have NSCLC in advanced stage is not so good. Immunotherapy is a new therapy which is not popular in clinical, but it is a potential therapy.

Today, research have confirm that aDR5mAb can recognise DR5 specifically and induce the apoptosis of cells which express DR5; but there was some report about aDR5mAb responsible for the cytotoxicity in hepatocytes. So far most aDR5mAb are mouse aDR5mAb. It will be rejected by human and its power decline. therefore, most people choose to change the structure of aDR5mAb. We have produce aDR5mAb, and we confirm that it can induce apoptosis in tumor cells with no untoward effects on hepatocytes. We have obtain the heavy chain and light chain of aDR5mAb and construct aDR5scFv. Aim to know the power of aDR5scFv, we have planed experiments which can help us to know the characterization of aDR5scFv, its ability that induce apoptosis in tumor cells in *vitro* and in *vivo*.

METHOD

Our laboratory had constructed aDR5scFv. aDR5scFv could recognize eDR5 specifically. It was confirmed by ELISA. We employed MTT assay to detect the aDR5scFv cytotoxicity against 973 cell. Bax, Cyto c and caspase-3, such proteins which expression in aDR5scFv-treated 973 cells are detected by western blot.

. In order to know whether aDR5scFv can induce 973 cell apoptosis in *vivo*, first, we established nude rats' lung cancer animal model by injecting human 973 cell lines; After

that, I administrated aDR5scFv to those nude rats' lung cancer animal model using intraperitoneal injection for the sake of finding out the variation of rat's tumor volume . I harvest the tumor of the rats and weight it .. HE staining and TUNEL assay for the tumor tissue were performed to detect apoptosis.

RESULT

During the research process, I was observing the phenomenon that aDR5scFv could recognize eDR5 specifically; aDR5scFv inhibited the growth of 973 cells in a dose-dependent manner (aDR5scFv final concentrations of 0.225, 0.45, 0.9, 1.2 mg/mL correspond to 973 cell growth inhibition rates of 28.8%, 52.3%, 65.3%, 89.8%); Western blotting showed the expression of intracellular Bax, Cyto c and caspase-3 protein was increased in aDR5scFv-treated 973 cells ; Tumor growth of aDR5scFv-treated group was slower than control group . Combined treatment using aDR5scFv and radiotherapy displayed obvious suppressive effect on 973 tumor growth as compared to single treatment ($p < 0.05$). Cell apoptosis was found by HE staining and TUNNEL. Apoptosis in combined treatment group is the most obvious .

CONCLUSION

1. aDR5scFv could recognize eDR5 specifically
2. The experiment in *vitro* shows that the mechanism that aDR5scFv make on the nude rats' Lung cancer animal model based on this therapy may be really linked to the expression level of Bax, cyto c, Caspase-3 protein.
3. The experiment in *vivo* shows that aDR5scFv can induce 973 cell line apoptosis with no significant untoward effects on normal cells. Apoptosis in combined treatment group of radiotherapy/ aDR5scFv is the most obvious.

KEY WORDS: DR5; scFv; 973 cells lines; Apoptosis

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
前 言	1
一. 肺癌的病因	2
1. 吸烟	2
2. 氡气	2
3. 石棉	2
4. 肺部放射治疗	2
5. 砷	3
6. 个人和家族病史	3
7. 饮食与维他命	3
8. 空气污染	3
9. 大麻	3
10. DNA 与基因改变	3
二. 非小细胞肺癌治疗	4
1. 外科手术治疗	4
2. 放射治疗	5
3. 肺癌的药物治疗	5
4. 免疫治疗	6
5. 物理治疗	7
三. 死亡受体 5(DR5) 的研究进展	7
1. 死亡受体 5(DR5) 的结构和分布	8
2. 死亡受体 5(DR5) 与肿瘤细胞凋亡	8
3. 抗死亡受体 5 单克隆抗体结合其他抗体与肿瘤	13
4. 非凋亡信号	20
5. TRAIL 的生理功能	21

6. TRAIL 的作为一种治疗手段	22
四. 细胞凋亡	23
1. 细胞凋亡	23
2. 凋亡时细胞的主要变化	24
3. 细胞凋亡的调控	24
4. 细胞凋亡的基本机制	24
5. 细胞凋亡的信号转导途径	25
6. 重要的凋亡调控基因	29
五. 实验方案设计	30
1. 研究目的和意义	30
2. 研究内容	30
第二章 抗 DR5 单链抗体的特异性鉴定和体外功能分析	31
一. 材料和方法	31
1. 材料	31
1.1 动物及细胞株	31
1.2 主要试剂及耗材	31
1.3 主要仪器及设备	32
1.4 主要溶液的配制	32
2 方法	36
2.1 目的蛋白的高效表达	36
2.2 目的蛋白的纯化和复性	36
2.3 ELISA 间接法	37
2.4 Western blot 检测细胞 Bax , caspas-3 , 细胞色素 c 蛋白的表达	38
2.5 药物 MTT 法实验步骤	41
2.6 流式细胞术检测凋亡	43
2.7 ANNEXIN V/PI 荧光显微镜法观察细胞凋亡情况	43
二. 结果与分析	44
1. aDR5scFv 在大肠杆菌中的表达及纯化	44
2. 效价分析	45
3. aDR5scfv 亲和常数的测定	45

4. 表位分析	46
5. Western Blot	47
6. MTT 法检测 aDR5scFv 诱导 973 凋亡的细胞毒性效应	47
7. aDR5scFv 对 973 细胞的凋亡率的检测	48
8. Western blot 检测 Bax, 细胞色素 c, caspas-3 蛋白的表达	48
9. ANNEXIN V/PI 荧光显微镜法观察细胞凋亡情况	49
三. 讨论	50
第三章 肺腺癌裸鼠模型的建立与分组和抗 DR5 单链抗体作用于肺腺癌	
裸鼠模型机理研究	53
一. 材料和方法	53
1. 材料	53
1.1 动物及细胞株	53
1.2 主要试剂及耗材	53
1.3 主要仪器及设备	53
1.4 主要溶液的配制	54
2. 方法	54
2.1 肿瘤动物模型的建立、分组及治疗	54
2.2 小鼠体重的称量	54
2.3 HE 染色、脱水和封片	55
2.4 TUNNEL 法检测细胞凋亡率	56
二. 结果与分析	57
1. 各组裸鼠肿瘤重量及体积情况	57
2. HE 染色	59
3. TUNEL 检测	60
三. 讨论	61
总 结	64
参考文献	65

CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE.....	I
ABSTRACT IN ENGLISH	III
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
I. etiology of gastric cancer.....	1
1. Smoking and lung cancer	2
2. Radon and lung cancer	2
3. Asbestos and lung cancer	2
4. lung cancer radiation therapy	3
5. arsenic and lung cancer.....	3
6. Personal and family history of lung cancer	3
7. diet and vitamins and lung cancer.....	3
8. air pollution and lung cancer	3
9. cannabis and lung cancer	3
10. DNA and the gene and lung cancer	4
II. the treatment of NSCLC.....	4
1. Surgical treatment	4
2. Radiation Therapy	5
3. Lung cancer drugs	6
4. Immunotherapy	6
5. Physical Therapy	7
III the Research of the death receptor 5 (DR5)	7
1. death receptor 5 (DR5) of the structure and distribution	8
2. death receptor 5 (DR5) and tumor cell apoptosis	8
3. aDR5 mAb in combination with other antibodies and cancer	13
4. Non-apoptotic signaling.....	21
5. Physiological functions of TRAIL.....	21
6. TRAIL as a therapeutic modality.....	22

IV. Apoptosis.....	23
1. Apoptosis	24
2. major changes of apoptotic cells	24
3. The regulation of apoptosis	24
4. Basic mechanisms of apoptosis	25
5. Apoptosis signal transduction pathway.....	25
6. Important apoptosis genes	29
V. Experimental design	30
1. Purpose and significance of	30
2. Research	30
CHAPTER II ADR5SCFV SPECIFIC IDENTIFICATION AND IN VITRO FUNCTIONAL ANALYSIS	31
I. materials and methods	31
1. Materials	31
1.1 Animals and cell lines	31
1.2 Reagents and supplies	31
1.3 The main instruments and equipment	32
1.4 The main solution preparation	32
2. Method	36
2.1 Expression of proteins.....	36
2.2 Purification and renaturation of proteins.....	36
2.3 ELISA indirect method	37
2.4 Western blotting to detect cell bax, caspas-3, cytochrome c protein expression	38
2.5 Drug MTT method experimental procedure	41
2.6 Apoptosis by flow cytometry	43
2.7 Apoptosis observed by fluorescence microscopy.....	43
II Results and Analysis	44
1. Expression of aDR5scFv.....	44
2. Titre of aDR5scfv.....	45
3. affinity constants of aDR5scfv.....	45

4. Epitope analysis	46
5. Western Blot	47
6. MTT assay aDR5scFv apoptosis induced by cytotoxic effect of 973.....	48
7. aDR5scFv apoptosis rate of 973 test.....	48
8. Western blot detection of Bax, cytochrome c, caspas-3 protein expression.....	49
9. Apoptosis of aDR5scFv-treated 973cells observed by fluorescence microscopy.....	50
III discussion	51
CHAPTER III LUNG CANCER MODEL IN NUDE MICE WITH THE GROUP AND THE ROLE OF ANTI-HUMAN DR5 MONOCLONAL ANTIBODY IN NUDE MICE MODEL OF LUNG ADENOCARCINOMA MECHANISM	53
I materials and methods.....	53
1. Materials	53
1.1 experimental animals and cell lines.....	53
1.2 Main reagents and supplies.....	53
1.3 The main instruments and equipment	53
1.4 The main solution preparation	54
2. Method	54
2.1 Tumor animal model, group and treatment	54
2.2 body weight of mice weighing	54
2.3 HE staining, dehydration and mounted	55
2.4 Detection of apoptosis by TUNEL	56
II Results and Analysis	57
1. The nude mice tumor weight and volume of cases	57
2. HE staining	59
3. TUNEL detection	60
III Discussion.....	61
CONCLUSION.....	64
REFERENCES	65

第一章 前言

肺癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤，占全部恶性肿瘤的 16%，全部癌症死亡人数的 28%，严重危害人类的健康。据估计，全球每年有 60 万左右的新患者，在我国，肺癌的发病率一直呈上升趋势，平均每年递增 11.9%，预计到 2025 年，我国每年新发肺癌病人数可达 100 万人，成为第一大肺癌大国。原发性肺癌（以下简称肺癌）是我国最常见的恶性肿瘤之一。2010 年卫生统计年鉴显示，2005 年肺癌死亡率占我国恶性肿瘤死亡率的第 1 位。

肺癌从大体上可分为小细胞肺癌（SCLC）和非小细胞肺癌（NSCLC）。其中大部分为非小细胞肺癌，约占 80%，小细胞肺癌约占 20%。约 65%~70% 的非小细胞肺癌在就诊时就已处于晚期。非小细胞肺癌又细分成 3 种亚型。这些亚型的癌细胞在大小、形状或化学构造方面都不同。鳞状上皮细胞癌：肺癌约有 25% 至 30% 属于这种类型。这种肺癌与吸烟有关，通常在肺部中央接近支气管处发现。腺癌：这种类型约占肺癌的 40%，通常在肺的外层部分发现。大细胞（未分化）癌：肺癌约有 10% 至 15% 属于这种类型，这可能发生在肺部的任何部位。这种癌症通常发展和扩散快速，因此较难治疗。除了 2 类主要的肺癌，肺部也可能发现其他肿瘤。请注意，原发于其他器官的癌症（如乳癌、胰脏癌、肾脏癌或皮肤癌），扩散（转移）至肺部之后并不视为肺癌。例如，原发于乳房再扩散至肺部的癌症仍为乳癌，而非肺癌。

肺癌（包括小细胞和非小细胞）是男女癌症的死亡主因。死于肺癌的人数，比直肠癌、乳癌和前列腺癌三种癌症的死亡人数总和还多。肺癌很少发生在 45 岁以下的人身上。2008 年，美国约有 215,020 个新增肺癌病例（包括小细胞和非小细胞肺癌）：114,690 名男性，100,330 名女性。2008 年约有 161,840 人死于肺癌：90,810 名男性，71,030 名女性。男性平均终身罹患肺癌的平均机率为 13 分之 1，女性则为 16 分之 1。这些数字包括吸烟者和非吸烟者。吸烟者罹患肺癌的风险高出许多，而非吸烟者的风险较低。无论罹患哪种肺癌，10 人中约有 4 人在发现肺癌之后 1 年仍然存活。虽然肺癌病人的病情发展会十分严重，但有些人仍能治愈。

一. 肺癌的病因

1. 吸烟

吸烟显然是肺癌最大的危险因素。在肺癌病例中,每 10 人就有近 9 人是因为吸烟罹患癌。烟龄越长以及每天吸烟的包数越多,风险就越高。如果在罹患癌症之前戒烟,肺部组织会慢慢恢复正常。任何年龄戒烟都能够降低肺癌的风险。吸雪茄和烟斗导致肺癌的机率与吸香烟接近。此外也没有证据显示,吸低焦油香烟或“淡”烟比吸一般香烟安全或能够降低罹患肺癌的风险。不吸烟但吸二手烟者罹患肺癌的机率也较高。例如,与吸烟者同居的不吸烟配偶比起非吸烟者的配偶,罹患肺癌的机率高约 20% 至 30%。非吸烟者如果在工作场所吸到二手烟,罹患肺癌的机率也会较高。近年来,吸水烟筒在年轻人之间越来越受欢迎。水烟筒通常标榜比香烟安全。虽然水烟的烟草含量较少,但仍具危险性而且会上瘾。而且,吸水烟筒在日后可能会养成吸烟的习惯。

2. 氡气

氡气是一种放射性气体,会在铀自然衰变时释出,在美国某些地区的土壤中含量比其他地区高。氡气无色,无味且不易察觉。这种气体可能会聚集在室内,形成癌症的潜在风险。吸烟者对于氡气会特别敏感。环境保护署 (EPA) 的州立和地方办公室可提供如何检测居家室内氡气的相关资讯。ACS 的《氡气》一文亦提供详细资讯。

3. 石棉

石棉接触是肺癌的另一个危险因素。工作上接触石棉的人罹患肺癌的机率较高。如果他们也吸烟,那么机率就会大幅提高。接触石棉的吸烟者和非吸烟者也较容易罹患发生于肺部内层的癌症(称为间皮癌)。虽然过去已使用石棉多年,但政府现已禁止在工作场所和家居用品使用石棉。虽然石棉仍存在於许多建筑物中,但只要未释出到空气中,一般认为是无害的。

4. 肺部放射治疗

接受胸部放射治疗其他癌症的人罹患肺癌的机率较高,特别是吸烟者。在乳癌肿瘤切除术之后接受乳房放射治疗的妇女除非也吸烟,否则罹患肺癌的机率不会较高。

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