

## Anti-DR5 mAb 诱导佐剂型关节炎大鼠滑膜细胞凋亡及机理初探

李文珠 殷平 张佳锴 邱劲华 胡庆中 陶惠然 庄国洪  
(厦门大学医学院抗癌研究中心, 厦门 361005)

中国图书分类号 R593 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2009)11-0969-04

**[摘要]** 目的:探讨 Anti-DR5 mAb 诱导佐剂型关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)大鼠滑膜细胞凋亡作用及其可能机理。方法:注射弗氏完全佐剂建立 AA 大鼠模型,分离并体外培养大鼠滑膜细胞。MTT 检测、DNA 倍体分析及流式细胞术分析 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞的凋亡作用,Western blot 检测大鼠滑膜细胞 Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达,Caspase 抑制剂实验分析 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞凋亡作用的机制。结果:MTT 实验表明 Anti-DR5 mAb 能抑制大鼠滑膜细胞的增殖,流式细胞术分析这种作用模式为细胞凋亡。Anti-DR5 mAb 处理后的大鼠滑膜细胞中 Caspase-3 蛋白水平上升,Bcl-2 蛋白水平下调。Caspase 抑制剂实验证明 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡是通过 Caspase 途径实现的。结论:Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡,这种作用与滑膜细胞表面 Caspase-3、Bcl-2 蛋白表达相关。

**[关键词]** Anti-DR5 mAb;佐剂型关节炎;滑膜细胞;细胞凋亡

### Induction of apoptosis by Anti-DR5 mAb in synovial cells of adjuvant arthritis rats and its possible mechanisms

LI Wen Zhu, YIN Ping, ZHANG Jia Kai, QIU Jin Hua, HU Qing Zhong, TAO Hui Ran, ZHUANG Guo Hong. *Anti-Cancer Research Center, Medical College, Xiamen University, Xiamen 361005, China*

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of Anti-DR5 mAb on inducing synovial cells of adjuvant arthritis (AA) rats and its mechanisms. **Methods:** AA was induced by CFA in rats. The synovial cells of rats were separated and cultured in vitro system. The apoptosis induced by anti-DR5 mAb on synovial cells was measured by MTT analysis, DNA fragmentation and flow cytometry. Caspase-3 and Bcl-2 expression in synovial cells were detected by Western blot. The involvement of the apoptotic pathway was further proved by a caspase inhibition assay. **Results:** MTT result showed that Anti-DR5 mAb could inhibit synovial cells growth. And flow cytometry suggested that the cell death mode was apoptosis. The protein level of caspase-3 in synovial cells treated with anti-DR5 mAb was raised, while Bcl-2 level declined. When the caspase inhibitor was added to the synovial cells treated with anti-DR5 mAb, it was showed in a dose-dependence inhibition effect, indicating that anti-DR5 mAb inducing apoptosis might be through the caspase pathway. **Conclusion:** Anti-DR5 mAb could induce synovial cell apoptosis through caspase pathway. And this effect may be related to the protein level of Caspase-3 and Bcl-2.

**[Key words]** Anti-DR5 mAb; Adjuvant arthritis; Synovial cells; Cell apoptosis

类风湿性关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节组织慢性病变为主要表现的自身免疫性疾病,其主要病理特点是滑膜细胞增生,衬里层增厚,滑膜组织过度增生,多种炎性细胞浸润和血管翳形成等。RA 患者滑膜组织中凋亡细胞频率较低,衬里下层成纤维样滑膜细胞的凋亡率仅为 3%,衬里层细胞几乎无凋亡迹象,其生长性质及病理学行为

在许多方面类似于肿瘤组织的特性<sup>[1]</sup>。在 RA 动物模型 TAX 转基因小鼠的关节内注入抗 Fas 抗体,使滑膜细胞和浸润的淋巴细胞凋亡可抑制关节炎<sup>[2]</sup>。因此,RA 滑膜细胞凋亡缺陷是 RA 发病的一个重要病理机制<sup>[3]</sup>。

作为凋亡家族分子,TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand)在自身免疫性疾病研究中正逐渐受到重视,实验提示 TRAIL 与 RA、MS(多发性硬化症)、SLE(系统性红斑狼疮)等自身免疫病发生有关<sup>[4]</sup>。在类风湿的小鼠模型中,当 TRAIL 系统被阻断时,出现自身免疫性关节炎症状;而当恢复 TRAIL 系统时,关节炎症状能得到明显改善。TRAIL (-/-)老鼠对胶原质介导的类风湿性关节炎的发生非常敏感,很可能是因为它们不能特异性的去除相关的 T

本文为福建省自然科学基金项目(C0710046)

厦门大学生命科学学院,厦门 361005

共同第一作者

厦门大学附属中山医院,厦门 361005

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

作者简介:李文珠(1983年-),女,博士,主要从事细胞生物学研究,

E-mail: zz\_xx@126.com.

细胞,或使活化的 T 细胞沉默<sup>[5]</sup>。注射表达 TRAIL 的腺病毒载体到 IL-1 介导的 AA 老鼠能有效抑制滑膜细胞增生<sup>[6]</sup>。

死亡受体(Death Receptor 5, DR5)是 TRAIL 受体之一,属于肿瘤坏死因子受体超家族,其与相关配体结合能选择性地杀伤多种肿瘤细胞,而对正常细胞没有毒性,可能是通过 DR5 受体上的 FADD 形成 DISC 和 Caspase-8,然后启动非线粒体依赖途径和线粒体依赖途径来介导细胞的凋亡信号<sup>[7]</sup>。TRAIL 是最先发现的 DR5 配体,但是随后发现不同形式的 TRAIL 对正常人的不同细胞有毒性,尤其是肝细胞<sup>[8]</sup>。于是, Ichikawa 等<sup>[9]</sup>研制出 TRA-8 针对人 DR5 受体的特异性 mAb,发现其不仅杀瘤效应比 TRAIL 强出数倍,而且对正常人的肝细胞及其他细胞均没有毒副作用。

已有研究发现,利用 TRA-8 在正常滑膜组织中检测不到 DR5 蛋白的表达,并且像肿瘤组织和细胞一样,AA 滑膜细胞表达高水平的 DR5,并且对 DR5 介导的细胞凋亡高度敏感<sup>[9]</sup>,提示死亡受体 DR5 可能是治疗 AA 的有效靶点。

我们已经利用佐剂型关节炎(AA)动物模型,发现 Anti-DR5 mAb 能缓解 AA 大鼠的病情,抑制滑膜细胞和淋巴细胞的过度增殖<sup>[10]</sup>。本文通过体外分离培养大鼠滑膜细胞进一步研究 Anti-DR5 mAb 作用大鼠滑膜细胞的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,体重(200 ±2)克,2~3 月龄,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.1.2 主要试剂 弗氏完全佐剂(FCA)、型胶原酶为 Sigma 公司生产,兔抗 Caspase-3 mAb、Bcl-2 mAb、His ×6 mAb 和 HRP 标记的大鼠抗兔 IgG 抗体以及 Caspase 抑制剂均购自 Sigma 公司。DR5-His ×6 蛋白由本实验室制备提供(纯度 99%)。

### 1.2 方法

1.2.1 Anti-DR5 mAb 的制备和生物学功能鉴定 按常规方法制备杂交瘤细胞株,生物学功能研究见参考文献<sup>[11]</sup>。

1.2.2 大鼠 AA 模型的建立 于大鼠右后足垫皮内注射 0.1 ml 弗氏完全佐剂(FCA)致炎<sup>[12]</sup>。24 天后,处死大鼠,进行各项指标检测。

1.2.3 滑膜细胞(Synovial membrane tissue cells, SMCs)的分离和培养 致炎 24 天后,处死 AA 模型组大

鼠,无菌取下滑膜组织;用无 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 含青霉素 200 kU/L、链霉素 200 mg/L 的 D-Hanks 液漂洗 3 次,剪成约 1~2 mm<sup>3</sup> 小块,先离心洗涤 2 次,去除脂肪组织,移 2 ml 含 10% 小牛血清的 RPMI1640 或 DMEM 培养液和 2 ml 0.2% 型胶原酶(二者体积比为 1:1)到培养瓶中,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱消化 2~6 小时;将未粘附细胞(贴壁细胞为滑膜组织的巨噬细胞)移入离心管,离心(1 700 r/min, 10 分钟)弃上清,再加入适量 0.25% 胰蛋白酶 4 ml 消化 30 分钟。200 目尼龙网过滤,去除结缔组织,洗涤、离心(1 700 r/min, 10 分钟)、镜下计数,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时,弃去未粘附细胞(如淋巴细胞、红细胞),此时的贴壁细胞为原代滑膜细胞。原代细胞主要为巨噬细胞样细胞。继续培养约 7 天后,用 0.05% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 使细胞游离,可进行传代培养。

1.2.4 MTT 法检测 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞增殖的抑制作用 计数细胞,按 5 ×10<sup>5</sup> 个/孔接种培养板,依次加入 50.0、25.0、12.5、6.25、3.125、1.562 5 mg/L Anti-DR5 mAb,培养 4 小时。加入 20 μl 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。抑制率 = (1 - 实验组的 A 值 / 对照组的 A 值) ×100%<sup>[13]</sup>。

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 1 ×10<sup>6</sup> 个/ml,然后参照文献<sup>[14, 15]</sup>进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6 流式细胞仪分析 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞的作用模式 将 25 μg/ml Anti-DR5 mAb 作用于细胞 12 小时后收集,然后用 Annexin 及碘化丙啶(PD)按说明书所示进行荧光染色。Annexin 和碘化丙啶染色均为阴性者为活细胞,Annexin 染色阳性者为早期凋亡细胞,Annexin 及碘化丙啶染色均阳性者为晚期凋亡细胞。染色后上流式细胞仪分析细胞凋亡情况,细胞凋亡分析软件为 cell quest 软件。

1.2.7 Western blot 检测大鼠滑膜细胞中 Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达 SDS-PAGE:将各组织器官研磨后,加细胞裂解液提取蛋白,然后进行 SDS-PAGE 分离蛋白质。转膜:把分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜。Ag-Ab 反应:加入鼠源 Anti-Caspase-3 mAb 和 Anti-Bcl-2 mAb 一抗,反应 1 小时,洗涤液洗涤 3 次;加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗,反应 1 小时,洗涤。显色:DAB 显色。

1.2.8 MTT 法检测 Caspase 抑制剂对 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞凋亡的作用 计数细胞,5 ×10<sup>5</sup>

个/孔接种培养板,加入 Anti-DR5 mAb ( $IC_{50} = 12.5 \mu\text{g/ml}$ ) 1 小时后,加入 5、10、15、20、25、30、35  $\mu\text{mol/L}$  浓度的 Caspase 抑制剂,继续培养 4 小时。加入 20  $\mu\text{l}$  MTT(7.5 g/L)继续培养 4 小时,加 100  $\mu\text{l}$  异丙醇,于波长 570 nm 测定吸光度(A)值,并计算抑制率(%)。重复实验 3 次,取平均值。抑制率 = (1-实验组 A 值/对照组 A 值)  $\times 100\%$ 。

1.3 统计学方法 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料的组间显著性检验采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞生长的影响

MTT法分析发现大鼠滑膜细胞对 Anti-DR5 mAb 敏感,且呈现剂量依赖性,组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。50  $\mu\text{g/ml}$  的 Anti-DR5 mAb 处理大鼠滑膜细胞 12 小时,细胞杀伤率约 (55.49  $\pm$  0.9) %;相同时间下,1.562 5  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb 对细胞杀伤率为 (25.99  $\pm$  0.51) %,差异有显著性 ( $P < 0.01$ ,图 1),提示 Anti-DR5 mAb 可抑制大鼠滑膜细胞的增殖。

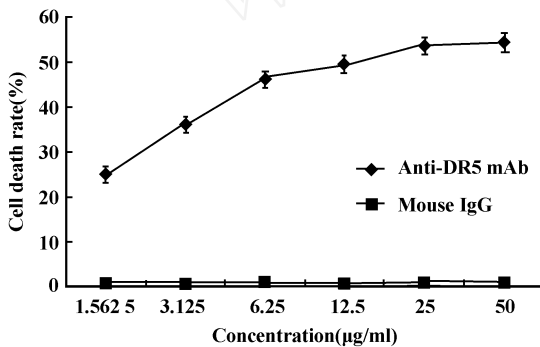


图 1 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞生长的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of Anti-DR5 mAb on proliferation of rat synovial cells

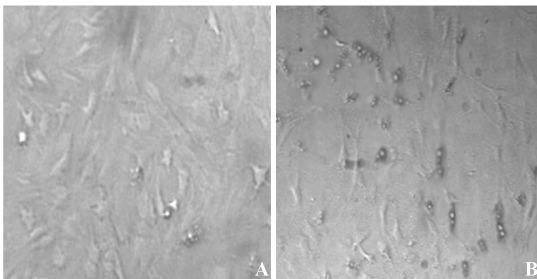


图 2 Anti-DR5 mAb 作用大鼠滑膜细胞后的形态学观察

Fig.2 Rat synovial cells were observed under optical microscope

Note :A. Rat synovial cells ;B. Rat synovial cells were cultured with 50  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb for 4 h.

2.2 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞凋亡的形态学改变 高剂量 Anti-DR5 mAb (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 作用大鼠滑膜细胞 4 小时后,显微镜观察细胞形态改变,细胞由正常的梭形、贴壁状态变为圆形、皱缩,并呈悬浮状态(图 2)。

2.3 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞凋亡 DNA 断裂的定性检测 高剂量 Anti-DR5 mAb (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 处理大鼠滑膜细胞,细胞 DNA 呈现明显的梯状带(图 3),提示 Anti-DR5 mAb 可诱导大鼠滑膜细胞凋亡。

2.4 流式细胞仪检测 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞生长的影响 25  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb 处理大鼠滑膜细胞 12 小时,Annexin 和碘化丙啶染色,上机检测。与对照组相比,Anti-DR5 mAb 处理后细胞呈 Annexin 染色阳性(图 4),说明 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞的杀伤模式为细胞凋亡。

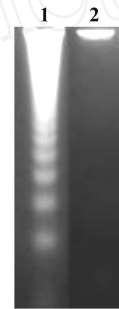


图 3 凝胶电泳检测 Anti-DR5 mAb 作用 4 小时后细胞的 DNA 片段

Fig.3 Cells were cultured with 50  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb for 4 h, the DNA fragmentation was analyzed by agarose gel electrophoresis

Note :1. Rat synovial cells were cultured with 50  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb for 4 h;2. Rat synovial cells.

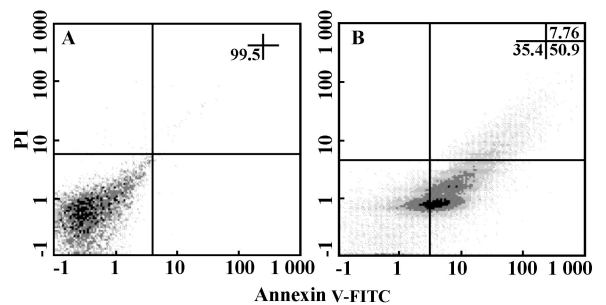


图 4 流式细胞仪检测 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡

Fig.4 Flow cytometric analysis of death mode of rat synovial cells after staining by Annexin/PI

Note :A. Rat synovial cells ;B. Rat synovial cells were cultured with 25  $\mu\text{g/ml}$  Anti-DR5 mAb for 12 h.

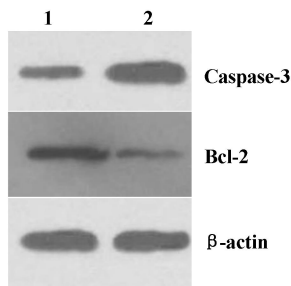


图 5 Western blot 检测大鼠滑膜细胞 Caspase-3、Bcl-2 的表达  
Fig. 5 Caspase-3, Bcl-2 expression was analyzed by Western blot

Note: 1. Rat synovial cells; 2. Rat synovial cells were cultured with 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Anti-DR5 mAb for 12 h.

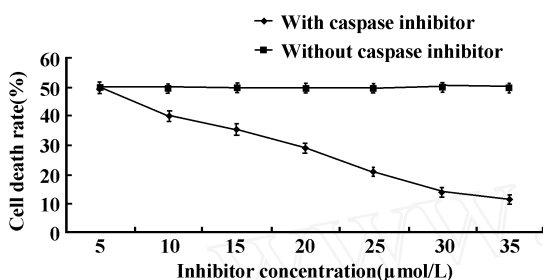


图 6 Caspase 抑制剂可以解除 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞生长的抑制作用

Fig. 6 Caspase inhibitor could relieve the inhibitory effect of anti-DR5 mAb on proliferation of rat synovial cells

2.5 Western blot 分析大鼠滑膜细胞中 Caspase-3、Bcl-2 的蛋白表达 通过 Western blot 检测大鼠滑膜细胞 Caspase-3、Bcl-2 蛋白表达的结果见图 5, 与未处理的细胞相比, Anti-DR5 mAb 处理后 Caspase-3 的表达上升, Bcl-2 的表达下降, 提示 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞凋亡可能与 Caspase 有关。

2.6 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞凋亡的可能机制 MTT 法分析发现, Caspase 抑制剂可抑制 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的增殖, 且呈现剂量依赖性(图 6)。随着 Caspase 抑制剂浓度的升高, 这种抑制作用达到饱和, 说明 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡作用其机制是通过 Caspase 途径来实现的。

### 3 讨论

我们应用淋巴细胞杂交瘤技术, 共获得 5 株抗 DR5 mAb, 其腹水效价较高, 反应性好、亲和力高, 并可与 DR5 结合并诱导肿瘤细胞的凋亡; 具有减缓 AA 大鼠模型病情的作用<sup>[5,7]</sup>。本研究通过体外培养 AA 大鼠滑膜细胞, 利用抗 DR5 mAb 作用 AA 大鼠滑膜细胞, 研究其具体的作用机制。

经 MTT 实验分析发现 Anti-DR5 mAb 能够抑制大鼠滑膜细胞的生长, 并且表现为细胞死亡率与浓度升高成比例。在光学显微镜下观察 Anti-DR5 mAb 处理后大鼠滑膜细胞的形态改变, 其由正常的梭形、贴壁状态变为圆形、皱缩, 并呈悬浮状态。提取大鼠滑膜细胞基因组, 电泳表明 DNA 被降解成特异的“ladder”条带。流式细胞术检测发现 Anti-DR5 mAb 处理后的细胞呈 Annexin 染色阳性, 说明 Anti-DR5 mAb 对大鼠滑膜细胞的杀伤模式为细胞凋亡。Anti-DR5 mAb 处理后的大鼠滑膜细胞, Caspase-3 的蛋白表达上升, Bcl-2 的蛋白表达下降, 提示 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡可能是通过 Caspase 途径来实现的。进一步研究表明 Caspase 抑制剂能抑制 Anti-DR5 mAb 诱导的凋亡作用, 证明了 Anti-DR5 mAb 诱导大鼠滑膜细胞的凋亡就是通过 Caspase 途径发生的。

综上所述, Anti-DR5 mAb 可以诱导大鼠滑膜细胞的凋亡, 这种作用与滑膜细胞中 Caspase-3、Bcl-2 蛋白的表达有关。

### 4 参考文献

- 周京国, 郭晓兰, 唐中 *et al.* 可溶性尿激酶型纤溶酶原激活物受体在 RA 患者血浆和滑液的水平及其临床意义[J]. 中华风湿病学杂志, 2006; 10(12): 713-716.
- Martinez-Lorenzo M J, Anel A, Saez-Gutierrez B *et al.* Rheumatoid synovial fluid T cells are sensitive to APO2L/TRAIL [J]. Clin Immunol, 2007; 122(1): 28-40.
- Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature, 2003; 423(6937): 356-361.
- Tsokos G C, Tsokos M. The TRAIL to arthritis [J]. Clin Invest, 2003; 112(9): 1315-1317.
- Lamhamedi-Cherradi S E, Zheng S J, Maguschak K A *et al.* Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL<sup>-/-</sup> mice [J]. Nature Immunol, 2003; 4(3): 255-260.
- Song K, Chen Y, Goke R *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression [J]. J Exp Med, 2000; 191(7): 1095-1104.
- 朱冉旭, 林菊生. 死亡受体 DR5 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 世界华人消化杂志, 2004; 12(8): 1909-1912.
- David Lawrence, Zahra Shahrokh, Scot Marsters *et al.* Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions [J]. Nature Medicine, 2001; 7(4): 383-385.
- Ichikawa K, Liu W M, Fleck M *et al.* TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis [J]. J Immunol, 2003; 171(2): 1061-1069.
- 李文珠, 陶惠然, 庄国洪 *et al.* 抗死亡受体 DR5 抗体对大鼠佐剂型关节炎的作用机理探讨 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007; 27(7): 651-655.
- 刘瑞振, 张长弓, 庄国洪 *et al.* 抗人 DcR3 单克隆抗体的制备、鉴定及应用 [J]. 免疫学杂志, 2009; 25(1): 53-57.
- 高宗强, 郭雄, 陈君长 *et al.* 抗风湿颗粒对佐剂型关节炎大鼠血清肿瘤坏死因子的影响 [J]. 陕西中医, 2008; 29(9): 1254-1255.
- 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.
- Li W Z, Wang S Y, Zhuang G H *et al.* Induction tumor cell lines apoptosis via FasL/DR5 [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2006; 3(6): 467-471.
- Li W Z, Zhang C G, Zhuang G H *et al.* Correlation between expression of DcR3 on tumor cells and sensitivity to FasL [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2007; 4(6): 455-460.

[收稿 2009-04-20 修回 2009-06-15]  
(编辑 倪鹏)