

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)11-0992-02

整合素 $\alpha v\beta 3$ 单克隆抗体对内异症在位内膜细胞黏附力的影响

赵 军, 李亚里, 宗利丽 (解放军总医院妇产科, 北京 100853)

Effect of monoclonal antibody to integrin $\alpha v\beta 3$ on adherent ability of eutopic endometrium cells in women with endometriosis

ZHAO Jun, LI Ya-Li, ZONG Li-Li

Department of Gynaecology and Obstetrics, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 AIM: To explore the effect of monoclonal antibody to integrin $\alpha v\beta 3$ on the adherent ability of eutopic endometrium cells in women with endometriosis. **METHODS:** The cells from eutopic endometrium of women with endometriosis were cultured in 96-well plates. The effect of Lm609 and 7E3, two monoclonal antibodies to integrin $\alpha v\beta 3$, on the adherent ability of endometrium cells at different concentrations was examined with the MTT assay. The experiments at each concentration were repeated three times for each case. **RESULTS:** The monoclonal antibody to integrin $\alpha v\beta 3$ had greater effects on the adherent ability of eutopic endometrium cells in the experimental groups than those in the control group, with no significant difference between different concentrations. **CONCLUSION:** Lm609 and 7E3, the monoclonal antibodies to integrin $\alpha v\beta 3$, can inhibit the adherent ability of endometrium cells and may thus inhibit the formation of endometriosis.

【Keywords】 endometriosis; $\alpha v\beta 3$; 7E3; monoclonal antibody; treatment

【摘要】 目的: 探讨整合素 $\alpha v\beta 3$ mAb 对子宫内膜异位症(内异症)在位内膜细胞黏附力的影响。方法: 选择 3 例异位症患者的在位内膜进行原代细胞培养接种于 96 孔板。用 MTT 法检测整合素 $\alpha v\beta 3$ mAb Lm609 和 7E3 在不同浓度下对内膜细胞黏附能力的影响。每例细胞重复 3 次, 每个抗体浓度重复 3 次。结果: 对细胞黏附能力的影响实验组优于对照组。结论: 整合素 $\alpha v\beta 3$ mAb Lm609 和 7E3 能抑制子宫内膜细胞的黏附功能, 进而可望达到抑制异位病灶形成的作用。

【关键词】 子宫内膜异位症; $\alpha v\beta 3$; 7E3; 单克隆抗体; 治疗

【中图分类号】 R711.71 **【文献标识码】** A

收稿日期 2005-03-01; 修回日期 2005-04-30

基金项目 国家自然科学基金重点课题(39830350)

通讯作者 李亚里。Tel. (010) 66958418 Email. bjzhaojun@sohu.com

作者简介 赵 军(1974-), 女(汉族), 北京市人, 住院医师, 硕士生(导师李亚里)。Tel. (010) 66958418 Email. bjzhaojun@sohu.com

0 引言

子宫内膜异位症(内异症)的发病机制仍不清楚, 现普遍认为内异症患者子宫内膜细胞的异位种植、侵袭和血管新生等类似恶性肿瘤的生物学行为, 是异位症发生、发展的重要机制之一, 有效的阻断这一环节有可能成为治疗异位症的新途径^[1]。整合素 $\alpha v\beta 3$ 在肿瘤新生血管生成及肿瘤转移过程中发挥重要作用。异位症与整合素 $\alpha v\beta 3$ 的相关性研究也取得了一定进展^[2]。我们探讨整合素 $\alpha v\beta 3$ mAb 对子宫内膜细胞黏附功能的作用及相关治疗价值。

1 材料和方法

1.1 材料 细胞取自 2003-10/12 本院妇产科行腹腔镜下巧克力囊肿手术患者的在位子宫内膜。术前 6 mo 未用过激素, 不合并其他疾病, 在位内膜呈分泌期改变。SP 免疫试剂盒购自中山生物技术公司。整合素 $\alpha v\beta 3$ mAb Lm609, 7E3 由军事医学科学院孙启鸿教授赠送。纤维结合素购自美国 Sigma 公司。用酶联免疫仪进行检测。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养(混合培养法) 将子宫内膜组织剪碎至 1 mm³ 小块, 加等量体积的 10 g/L 胶原酶, 放入 37℃, 50 mL/L CO₂ 恒温孵箱中消化 60 min。消化后的细胞悬液加入 PBS 离心漂洗 2 次(700 r/min, 5 min), 弃上清加入 DMEM 培养液, 细胞计数, 接种于培养瓶中, 置于恒温培养箱中培养。3 d 更换培养液 1 次。倒置显微镜中观察, 细胞生长铺满 80% 瓶壁时即可传代。

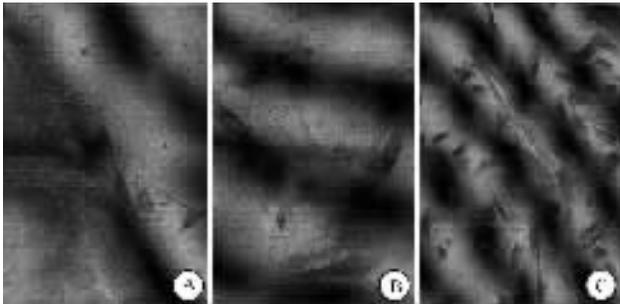
1.2.2 细胞鉴定 用免疫组化法对培养细胞鉴定。取出长满细胞的盖玻片, 100 mL/L 山羊血清封闭 30 min。分别用细胞角蛋白抗体(中山生物公司, 工作液)、波形蛋白抗体(中山生物公司, 工作液)、Lm609 (1:100)、7E3 (1:100) 作为一抗, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。严格按照试剂盒操作要求进行。

1.2.3 黏附实验 取 96 孔培养板, 每孔加 20 mg/L Fibronectin 100 μ L, 4℃ 过夜。弃去液体加入 10 mL/L 胎牛血清白蛋白 100 μ L, 37℃, 2 h。PBS 冲洗培养板。用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 用含 2 g/L

BSA 的无血清培养基稀释至 $1 \times 10^7/L$ 细胞悬液。先与抗体共孵育 15 min, 抗体为 Lm 609 和 7E3, 抗体浓度分别为 80, 40, 20 和 10 mg/L, 每个浓度重复 3 个孔, 空白对照加同体积 PBS。放入 96 孔培养板, 每孔 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后, 每孔加 15 μ L MTT, 继续孵育 4 h, 弃液体。每孔加 100 μ L DMSO, 震荡 20 min。置酶联免疫仪上 492 nm 读取 A 值。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 免疫组化 一抗为角蛋白时 90% 以上上皮细胞胞质成棕色 (Fig 1A)。一抗为波形蛋白时 90% 以上间质细胞胞质成棕色 (Fig 1B)。证明原代子宫内膜细胞培养纯度高, 可达到实验要求。一抗为 Lm609 和 7E3 时上皮细胞胞质、间质细胞胞质均成棕色, 表明内腺上皮细胞及间质细胞均有黏附分子 av β 3 表达 (Fig 1C)。



A: Cytokeratin SP $\times 200$; B: Vimentin SP $\times 200$; C: Lm609 SP $\times 100$.
Fig 1 Immunohistochemical staining of the cultured cells

图 1 培养细胞的免疫组化染色

2.2 黏附实验 黏附分子 av β 3 mAb Lm609 和 7E3 对内膜细胞黏附能力有一定的影响 (Tab 1)。

表 1 不同浓度抗体作用下黏附细胞的 A 值

Tab 1 Adherent ability of endometrium cells

Group	(n=3, $A_{492\text{nm}}$, $\bar{x} \pm s$)			
	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L	80 mg/L
Control	0.06 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.07 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01
Lm609	0.05 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01
7E3	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01

3 讨论

研究表明, 培养的子宫内膜上皮及间质细胞均有整合素 av β 3 的表达。av β 3 的 mAb Lm609 和 7E3 在较低浓度 (10 μ g/L) 就对内膜细胞的黏附有抑制作用。以整合素 av β 3 为作用靶点以及抗血管形成的药物作为新型抗肿瘤药物已进入临床实验。Klotz 等^[3] 在血液病研究中发现 Lm609 和 7E3 能抑制镰刀形红

细胞与血管内皮细胞的黏附, Lm609 能阻断碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 诱导的血管新生, Lm609 和 7E3 可以抑制肿瘤细胞的生长及其血管形成, 从而阻止肿瘤的发展, 例如 Rader 等^[4] 将 Lm609 用于卡波奇肉瘤治疗, 能明显抑制肿瘤生长。整合素 av β 3 的抗体已用于乳腺癌、黑色素瘤、结肠癌等的研究。基于子宫异位内膜细胞与肿瘤细胞有相似的生物学特点, 提示可将此类抗肿瘤药物应用于异位症的治疗。

整合素是一类细胞表面受体家族, 由 α 和 β 两条链通过非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白, 广泛分布于多种动物细胞。目前已发现 16 种不同的 α 亚单位和 8 种 β 亚单位, 两者组合构成 20 余种整合素。整合素可分为胞外区、胞质区和穿膜区 3 部分。整合素功能多样, 参与细胞的增殖、分化、凋亡、细胞周期和淋巴细胞的归巢等多种细胞活动。所有这些功能, 均是整合素通过介导细胞外的 ECM 配体与细胞内的骨架蛋白的信号传递实现的。整合素 av β 3 具有介导细胞与细胞外基质黏附、血小板聚集、免疫、组织修复、肿瘤浸润、血管生长等功能。肿瘤细胞转移与具有功能活性的整合素 av β 3 有关^[5]。异位的内膜细胞具有类似于肿瘤细胞的生物学行为。研究发现, 内异症患者的在位内膜、异位内膜及正常子宫内膜的培养细胞均有整合素 av β 3 的表达, 并且内异症患者的异位内膜的表达强度高于在位内膜, 而两者表达强度又高于正常子宫内膜。整合素 av β 3 的异常表达证明其在子宫内膜细胞异位黏附、侵袭和血管生成等内异症病灶的形成中起重要作用。

Lm609 是整合素 av β 3 的 mAb, 7E3 是整合素 av β 3 和 α IIb β 3 的 mAb, 它们通过竞争结合 RGD 序列, 阻断整合素 av β 3 与细胞外基质蛋白的结合, 从而阻断整合素 av β 3 介导的细胞黏附、侵袭、血管形成等病理过程, 进而可望抑制异位病灶的形成。

【参考文献】

- [1] Healy DL, Rogers PA, Hi L, et al. Angiogenesis: A new theory for endometriosis [J]. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(6): 736-740.
- [2] Illera MJ, Juan L, Stewart CL, et al. Effect of peritoneal fluid from women with endometriosis on implantation in the mouse model [J]. *Fertil Steril*, 2000, 74(1): 41-48.
- [3] Klotz O, Park JK, Pleyer U, et al. Inhibition of corneal neovascularization by α (v)-integrin antagonists in the rat [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2000, 238(1): 88-93.
- [4] Rader C, Popkov M, Neves JA. Integrin α (v) β 3 targeted therapy for Kaposi's sarcoma with an *in vitro* evolved antibody [J]. *Faseb J*, 2002, 16(1): 2000-2002.
- [5] Jin H, Varner J. Integrins: Roles in cancer development and as treatment targets [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(4): 561-565.

编辑 许昌泰