

# 抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段诱导凋亡过程中活性氧 Caspase-3 的变化

杨 铭, 范冬梅, 刘银星, 熊冬生, 许元富, 邵晓枫, 杨纯正

**RAS and Caspase-3 Change in Apoptosis of B Lymphoma Cells Induced by One Amino Acid Mutation in An Anti-CD20 Antibody Fragment Fab**

YANG Ming, FAN Dong-mei, LIU Yin-xing, XIONG Dong-sheng, XU Yuan-fu, SHAO Xiao-feng, YANG Chur-zheng

National Laboratory of Hematology, Institute of Hematology, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China

**Abstract:** **Objective** To study effect of one amino acid mutation in an anti-cd20 antibody fragment Fab on ROS, Caspase-3 in B lymphoma Raji cells. **Methods** MTT was used to observe the effect of anti-CD20 Fab on Raji cell growth; morphologic change through microscope were used to assay apoptosis induced by anti-CD20 Fab, ROS labeled with DCFH-DA in cells was processed on FACS, Caspase-3 gene expression local change in Raji cells FACS using Western-blotting. **Results** The result of MTT indicated that the growth of Raji cell was inhibited by chimeric anti-CD20 antibody fragment Fab, the apoptotic bodies were observed, ROS and Caspase-3 level in Raji cell was increased by anti-CD20 Fab. **Conclusion** The increasing of ROS, Caspase-3 level is important in the apoptosis of Raji cell induced by anti-CD20 Fab.

**Key words:** Anti-CD20 antibody; Gene mutation; Apoptosis; ROS; Caspase

**摘要:** **目的** 研究抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段诱导 Raji 细胞凋亡过程中活性氧 (ROS), Caspase-3 的变化。 **方法** 利用 MTT 法测定突变型 Fab 片段抑制细胞生长, 形态学方法观察凋亡细胞的变化, 用流式细胞仪检测 DCFH-DA 荧光探针标记细胞内 ROS 的变化, 以及用酶标仪和 Western blot 检测细胞内 Caspase-3 的变化。 **结果** MTT 法测定突变型 Fab 片段对 Raji 细胞的生长具有抑制作用, 其抑制作用呈明显的剂量依赖性, 荧光显微镜下观察细胞出现凋亡, 流式细胞仪, 酶标仪以及 Western blot 检测细胞内 ROS, Caspase-3 的表达增高, 并与作用时间, 剂量呈依赖关系。 **结论** ROS, Caspase-3 表达的增高, 在抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段诱导 Raji 细胞凋亡的过程中起到重要作用。

**关键词:** 抗 CD20 抗体; 随机突变; 凋亡; ROS; Caspase

中图分类号: Q753 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)11-0673-04

## 0 引言

CD20 是一个比较成熟的 B 细胞表面标记, 分子质量是 33 ~ 37ku, 属于非糖基化 III 型, 4 次跨膜的磷酸蛋白。CD20 特异性地表达在正常前 B 细胞以后的 B 细胞分化全过程 (浆细胞时消失), 以及相应的恶性 B 细胞肿瘤细胞上; 在其他组织中均无 CD20 的表达, 在人血清中也几乎无游离 CD20 的存在, 因此 CD20 可作为 B 淋巴瘤治疗的一个很好的选择性治疗靶点<sup>[1]</sup>。1997 年美国 FDA 批准人鼠嵌合抗体 Rituximab 用于治疗非何杰金氏 B 细胞淋巴瘤<sup>[2]</sup>, 2001 年和 2003 年又相继批准<sup>90</sup>Y 和<sup>131</sup>I

标记的抗 CD20 抗体 Zevalin<sup>TM</sup> 和 Bexxar<sup>TM</sup> 用于临床, 均获得较为理想的治疗效果。HI47 是我所于 1990 年研制成功的抗 CD20 鼠源性单克隆抗体, 第四届国际人类白细胞分化抗原会议将 HI47 命名为 CD20 + X<sup>[3]</sup>。先前我们成功的将 HI47 的可变区与人的恒定区连接起来, 构建并在大肠杆菌中表达了嵌合的抗 CD20 抗体的 Fab 片段<sup>[4]</sup>, 在此基础上, 利用随机突变获得了一个产量和活性均有所提高的突变基因。体外实验亦证实它具有抑制 B 淋巴瘤细胞的生长作用<sup>[5]</sup>, 并能诱导细胞凋亡, 以及在凋亡过程中涉及到的 bcl-2/bax, 细胞色素 C 和 Ca<sup>2+</sup> 的变化, 本文发现该凋亡过程与活性氧的产生和 Caspase-3 的变化有一定的关系, 在探讨抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段诱导凋亡的机制中起到关键的作用。

收稿日期: 2004-12-30; 修回日期: 2005-04-29

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2003AA215080); 天津重大科技攻关资助项目 (003119511)

作者单位: 300020 天津, 中国医学科学院协和医科大学血液学研究所血液病医院实验血液学国家重点实验室

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

MTT, 2, 7-二氯双氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)均购自 Sigma 公司, AO 购自 Fluka 公司, 兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为北京中山生物技术有限公司产品, Caspase-3 Colorimetric Assay 试剂盒购自 Gibco 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 B 淋巴瘤细胞株 Raji 细胞为我室所存, 细胞生长于 RPMI1640 培养基中, 含 15% 灭活小牛血清, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

1.2.2 MTT 法测定肿瘤细胞生长抑制作用 将处于对数生长期的 Raji 细胞稀释并按每孔 2 × 10<sup>4</sup> 个细胞接种培养板中, 然后加入不同浓度的突变型 Fab 片断溶液, 每组 3 个孔, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 环境中培养 72h。实验终止前 4h 每孔加入新鲜配置的 MTT 磷酸缓冲液 20μL, 继续培养 4h 后, 将 96 孔板离心, 弃掉上清, 每孔加入 DMSO 200μL, 然后振荡摇匀, 于酶标仪测定各孔吸光度值。

1.2.3 形态学观察 利用荧光显微镜观察细胞形态, 将经过突变型 Fab 片断处理的 Raji 细胞用 PBS 洗 2 遍, 用甩片机将细胞固定在载玻片上, 滴加 AO 染液, 于室温风干后, 荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 测定细胞内活性氧水平 以 DCFH-DA 为指示细胞胞浆内过氧化物(主要为过氧化氢)含量的荧光探针。利用流式细胞仪测定细胞胞浆内活性氧的水平。细胞经不同浓度的突变型 Fab 片断溶液作用后, 收集细胞用含有 0.2% BSA 的 PBS 洗 2 遍, 加入 10μmol/L DCFH-DA, 37℃ 温育 60min 后, 离心收集细胞, 以 PBS 漂洗细胞 1 次, 立即在流式细胞仪 FACS 上检测 ROS 水平。激发光为氩离子激光 488nm, 每个样品测定 10 000 个活细胞。

1.2.5 测定细胞内 Caspase-3 酶活性 按照 Caspase-3 Colorimetric Assay 试剂盒说明书进行,

于酶标仪上测其 OD<sub>405</sub> 值。

1.2.6 Western blots 测定细胞 Caspase-3 蛋白的表达 Raji 细胞经细胞裂解液裂解后, 经 Folin-酚法测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度至等量上样, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉 4 封闭过夜, 室温下与兔抗人 Caspase-3 单克隆抗体反应 1.5h, 辣根过氧化物酶标记的二抗反应 1.5h, 充分洗膜, 用发光试剂盒显色并拍照。

### 2 结果

#### 2.1 MTT 法测定结果

为了检验抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片断对 Raji 细胞的生长抑制作用, 以 PBS 为阴性对照, 用 MTT 法测定其对 Raji 细胞生长的影响, 其结果显示, 突变型 Fab 片断对 Raji 细胞具有抑制作用, 其抑制作用具有明显的剂量依赖性, 其半数抑制量约为 29.5μg/mL。

2.2 细胞凋亡的形态特征 AO 染色后, 荧光显微镜下观察, 正常活细胞呈均匀荧光染色; 凋亡细胞呈致密浓染颗粒或者是块状荧光。

#### 2.3 突变型 Fab 片断对细胞胞浆中活性氧水平的影响

DCFH-DA 具有亲脂性, 能够自由扩散进入细胞, 进入细胞后被酯酶水解为亲水性的 DCFH, 从而保留在胞浆中。DCFH 易被细胞胞浆中的过氧化物(主要是过氧化氢)氧化为具有荧光的 DCF(2, 7-二氯荧光素), DCF 的量与细胞内过氧化物的量直接相关。FACS 结果表明, 随着突变型 Fab 片断浓度的升高, ROS 的释放也随之增强, 并呈剂量依赖关系。因为它是部分细胞发生凋亡, 所以用百分比表示比较科学, 见图 1。

#### 2.4 突变型 Fab 片断对 Raji 细胞中 Caspase-3 酶活性的影响

于酶标仪上测定 OD 值, 实验结果显示, 以非相关抗体 HIT3a 为对照, 不同剂量的突变型 Fab 片断

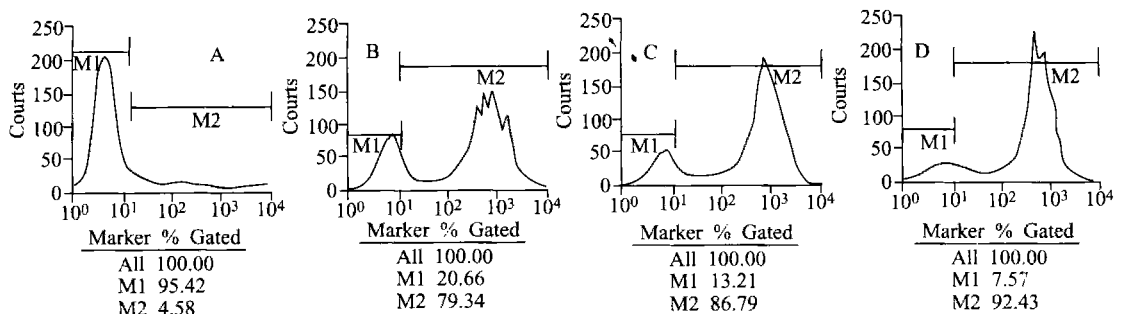


图 1 抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片断对 Raji 细胞中 ROS 的影响

A. 对照组; B. 抗体浓度 25μg/mL; C. 抗体浓度 50μg/mL; D. 抗体浓度 100μg/mL

与 Raji 细胞作用后,细胞中 Caspase-3 酶的活性可明显增强。随浓度的增高而增强,并呈剂量依赖关系,见图 2。

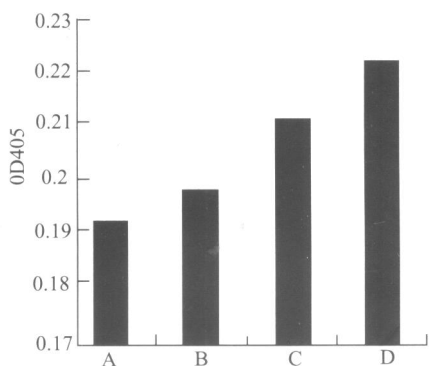


图 2 抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段对 Raji 细胞中 Caspase-3 酶活性的影响  
A. 对照组; B. 抗体浓度 25µg/ mL;  
C. 抗体浓度 50µg/ mL; D. 抗体浓度 100µg/ mL

### 2.5 Western blots 测定细胞中 Caspase-3 蛋白的表达

Western blot 分析突变型 Fab 片段对 Raji 细胞中 Caspase-3 蛋白表达的影响。结果显示, Raji 细胞经过突变型 Fab 片段 24、48 和 72h 不同时间的孵育后, Caspase-3 蛋白的表达明显增高,并随作用时间的延长, Caspase-3 蛋白的表达也随之增强,与作用时间呈相关性,见图 3。

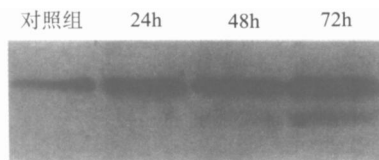


图 3 抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段对 Raji 细胞中 Caspase-3 表达的影响

### 3 讨论

B 细胞淋巴瘤是常见的恶性肿瘤之一,传统的治疗通常采用细胞毒药物,虽然能使大部分患者缓解和生存期延长,但治愈率仍很低,其原因在于细胞毒药物毒性大,选择性不强,在杀伤肿瘤细胞的同时,对正常组织细胞也有毒害作用,尤其是骨髓造血细胞与胃肠道黏膜上皮细胞,这些副作用限制了临床采用足量的药物治疗,因此只杀伤肿瘤细胞而正常细胞不受损害的靶向治疗一直受到关注<sup>[6]</sup>。单克隆抗体因其特异性高,本身具有细胞毒作用,可携带药物、毒物和放射性同位素而成为靶向治疗的主要策略。作为单独的治疗剂,抗 CD20 抗体主要是通过抗体依赖的细胞毒作用,补体依赖的细胞毒作用和诱导肿瘤细胞凋亡等机制来杀伤肿瘤细胞,但其

确切的作用机理还有待阐明<sup>[7]</sup>。

本研究利用 MTT 法检测抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段对 Raji 细胞的生长抑制作用,其结果显示,突变型 Fab 片段对 Raji 细胞具有抑制作用,其抑制作用呈明显的剂量依赖性。AO 染色后,荧光显微镜下观察可见凋亡细胞呈致密浓染颗粒或块状荧光。

最近,很多研究表明,细胞凋亡是一个可被激活或抑制的可调节过程,其中活性氧是介导细胞凋亡的物质。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是真核细胞有氧呼吸时的产物,在线粒体呼吸链上电子传递过程中,一小部分氧不能被完全还原,生成了单电子还原产物超氧阴离子,并可进一步演化生成过氧化氢、羟自由基,这些产物具有较强的氧化能力,统称为 ROS,同时细胞内存在一套抗氧化酶类,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等,能够清除代谢过程中不断产生的 ROS,使得细胞内 ROS 水平处于一个相对稳定的水平。我们的研究表明, Raji 细胞经不同的突变型 Fab 片段溶液作用 24h,均可激发 Raji 细胞产生活性氧来诱导凋亡,并且随着抗体浓度的增加, Raji 细胞活性氧产生增强,凋亡细胞百分比升高,呈剂量依赖关系。细胞内自由基的增加,破坏了原有的平衡,因而细胞也作出了相应反应。细胞内产生活性氧可通过以下不同途径诱导 Raji 细胞发生凋亡: 直接损伤 DNA; 损伤蛋白质,导致许多具有酶活性的蛋白质功能丧失。另外,蛋白质被活性氧化后还可能影响该基因的转录,激活凋亡途径; 通过影响基因转录,改变细胞的表型特征,诱导细胞凋亡; 作用于细胞膜,诱导脂质过氧化,从而影响细胞的信号传递系统,激发有关的调控基因,诱导凋亡<sup>[8]</sup>。提示抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段可能通过与活性氧相关的途径诱导 Raji 细胞凋亡,说明自由基的改变是抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段诱导凋亡的一个因素。

天冬氨酸特异性半胱氨酸酶 (Caspase) 是凋亡中最重要的酶, ROS 与它的相互作用表明了 ROS 在凋亡中的重要作用。某些信号作用于细胞,通过提高 ROS 水平激活 Caspase 导致凋亡。另外,一些信号则会诱导细胞产生更多的 ROS,改变 Caspase 半胱氨酸残基的氧化还原状态,抑制 Caspase 的激活和活性,造成损伤细胞凋亡向坏死的转变<sup>[9]</sup>。

进而用蛋白质印迹的方法检测了抗 CD20 嵌合抗体突变型 Fab 片段对蛋白表达的影响。最初发现多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶 (PARP) 和 Caspase-3 被剪切, PARP 是凋亡的标志性底物。它参与

DNA 的修复及基因的整合,另外也能抑制与细胞凋亡晚期核小体间染色体的断裂有关的  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  依赖性核酸内切酶的活化。它的降解打破了细胞的平衡状态,细胞因此不能进行正常的生理活动,核酸内切酶的活化又促成了核内 DNA 的断裂,从而使细胞走向凋亡。

Caspase-3 的剪切则说明经典凋亡的共同通道—天冬氨酸特异性半胱氨酸酶级联反应启动了。Caspase 的激活是凋亡信号传导过程中最重要的环节,它在细胞质中以单链的酶原形式存在,被上游蛋白剪切激活后,能直接水解与 DNA 断裂等凋亡特征性改变密切相关的蛋白,如 PARP 等,从而启动细胞凋亡,因此也被称为‘死亡蛋白’。

进一步研究显示,与 PARP 和 Caspase-3 剪切相对应,胞质中细胞色素 C 增加了,并呈剂量依赖关系(文章待发表)。近年来的研究表明,线粒体在凋亡的发生中起到了非常重要的作用,其中关键的步骤就是细胞色素 C 从线粒体中的释放<sup>[10]</sup>,它作为凋亡蛋白酶激活因子能够激活 Caspase 级联反应。其结果显示抗 CD<sub>20</sub> 嵌合抗体突变型 Fab 片段通过不同作用时间、不同的剂量与 Raji 细胞孵育后,显示 Raji 细胞中 Caspase-3 酶活性和蛋白表达明显升高,提示 Caspase-3 激活在这一过程中起着重要作用。

虽然膜蛋白 CD<sub>20</sub> 确切的生物机制还不清楚,根据 CD<sub>20</sub> 与抗 CD<sub>20</sub> 的抗体结合后 B 细胞产生的一系列的生物学反应,推测 CD<sub>20</sub> 可能参与 B 细胞的增殖、分化以及信号转导。许多实验均已证明 CD<sub>20</sub> 与

肿瘤的关系确实存在,是 B 淋巴细胞肿瘤免疫治疗的有效靶点。CD<sub>20</sub> 作为靶点成功的靶向治疗已被许多临床证实,研究 CD<sub>20</sub> 的生理作用将有利于阐明抗 CD<sub>20</sub> 抗体抗肿瘤的机制。

参考文献:

[1] Chang KL, Arber DA, Weiss LM, et al. CD20: A review Applied Immunohistochem, 1996, 4: 123-225.  
 [2] Dillman RO. Magic Bullets at last: Finally-Approval of a Monoclonal Antibody for the Treatment of Cancer[J]. Cancer Biother Radiopharm, 1997, 12(4): 223-225.  
 [3] 杨希峰,沈德诚,金宇光,等. HI47, 一种抗人成熟 B 细胞单克隆抗体制备、鉴定及其生物学特性研究[J]. 上海免疫学杂志, 1990, 10(2): 65-68.  
 [4] 赖增祖,熊冬生,许元富,等. 抗 CD20 嵌合抗体片断 Fab 在大肠杆菌中高效表达[J]. 高技术通讯, 2000, 10(4): 9-12.  
 [5] Yin xing Liu, Dong sheng Xiong, Dong mei Fan, et al. Apoptosis of Raji cells by an anti-CD20 antibody HI47 and its fragment[J]. Leukemia Research, 2004, 28(2): 209-211.  
 [6] 李扬秋,刘启发. 血液肿瘤靶向治疗和免疫治疗[J]. 肿瘤防治研究, 2004, 31(6): 封 2.  
 [7] Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance[J]. 2003, 22(47): 7359-7368.  
 [8] 李异,郑荣梁. 活性氧与细胞凋亡的研究进展[J]. 细胞生物学杂志, 1997, 19(3): 115-119.  
 [9] Samali A, Nordgren H, Orrenius S, et al. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced Caspase inactivation leads to necrosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 255(1): 6-11.  
 [10] Ludicovio P, Rodrigues F, Almeida A, et al. Cytochrome C release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in saccharomyces cerevisiae[J]. Mol Bio Cell, 2002, 13(8): 2598-2606.

[编辑:刘红武]

· 动态 · 简讯 ·

中华现代医院管理杂志征稿

《中华现代医院管理杂志》是由中华临床医药学会主办的国际性医院管理专业期刊,具有 ISSN/ CN 标准刊号,被《中文生物医学期刊文献数据库》、国家科技部《中文科技期刊数据库》、《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊全文数据库》、中华首席医学网等收录,国内外读者均可在中华首席医学网(www.shouxi.net)免费阅读杂志全文,并得到国内 1 000 多家权威医院及 2 000 多位管理专家的支持。

本刊积极倡导职业化医院管理理念,探讨有中国特色的医院发展之路。为医院院长、医院职业管理人员及从事医院管理的教学者提供一个学习、交流和展示成果的平台。栏目设有:医院管理论坛、经营管理、人力资源管理、信息管理、质量管理、医疗设备管理、护理管理、病案管理、医技科室管理、药事管理、门诊管理、医院文化、后勤管理、专题研究、医事法规、医疗事故与纠纷管理、危机管理、服务管理、国外医院管理、文献综述、学术讲座、医院介绍等。

关于本刊的详细介绍请登录 [www.shouxi.net](http://www.shouxi.net) 免费查询。

投稿邮箱:北京 100088-74 信箱 中华现代医院管理杂志编辑部收 邮编:100088

电话:010-62250990 010-62252523 E-mail:hospital@chinamed.cn

网站:[www.shouxi.net](http://www.shouxi.net) 网络实名:医学杂志、中华首席医学网

