

全人源化 PD-L1 单抗功能活性及其对人肺腺癌 HCC827 细胞毒性作用的研究

谢庆书¹, 束军¹, 陈晴晴¹, 胡思怡²

摘要 目的 初步探索自行研制的全人源化 PD-L1 单抗的功能活性及其对人肺腺癌 HCC827 细胞毒性作用的影响。方法 利用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)鉴定阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗的纯度;以阿特朱单抗为阳性对照,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测该自研 PD-L1 单抗的结合活性和竞争性阻断活性;细胞阻断试验分别测定两抗体的细胞阻断活性;流式细胞术(FACS)测定人肺腺癌 HCC827 细胞表面 PD-L1 的表达;检测两抗体的抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)效应。结果 SDS-PAGE 鉴定出高纯度阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗;ELISA 法检测结果显示自研 PD-L1 单抗、阿特朱单抗均可与人 PD-L1 结合并且阻断 PD-L1 与 PD-1 结合;自研 PD-L1 单抗及阿特朱单抗均可以阻断两细胞表面分子 PD-L1 与 PD-1 的结合,其 EC50 分别为 0.208 5、0.154 8 $\mu\text{g/ml}$,在一定浓度上两者差异无统计学意义;FACS 结果显示人肺腺癌 HCC827 细胞高表达 PD-L1 分子;细胞毒性实验结果表明当效应细胞与靶细胞比值一定时,自研 PD-L1 单抗与阿特朱单抗对人肺腺癌 HCC827 细胞都有强的毒性作用。结论 该自研全人源化 PD-L1 单抗有一定的功能活性,可通过阻断细胞表面的 PD-L1 与 PD-1 的结合而减弱 T 细胞受体信号,并可通过 ADCC 效应发挥一定的抗肿瘤作用。

关键词 PD-L1 单抗;阿特朱单抗;ADCC;肺癌

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0176-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.003

程序性死亡受体 1(programmed death receptor-1, PD-1)最初在 1992 年从鼠 T 细胞杂交瘤中分离出来^[1],属于 CD28 分子家族,表达在活化的 T 细胞、B 细胞、单核细胞和树突状细胞表面。PD-1 有两个已知的配体,包括程序性死亡配体-1(programmed death ligand-1, PD-L1)又称 B7-1 或 CD274

和程序性死亡配体-2(programmed death ligand-2, PD-L2)又称 B7-DC 或 CD273^[2]。PD-L1 属于 B7 家族成员,为 I 型跨膜蛋白,在正常情况下,PD-1/PD-L1 通路通过负性调节免疫应答防止过度刺激和维持自身抗原的免疫耐受^[3]。然而,PD-L1 在肿瘤组织中的过表达,包括黑色素瘤、卵巢癌及非小细胞肺癌^[4],导致肿瘤微环境中的免疫反应障碍。PD-1/PD-L1 通路抑制 T 淋巴细胞增殖、减少细胞因子的释放,并降低 T 淋巴细胞活性,导致肿瘤特异性 T 细胞耗竭和凋亡^[5]。PD-L1 抗体可以抑制 PD-L1 与受体 PD-1 的相互作用解除其免疫抑制,增强 T 细胞的细胞毒活性从而发挥抗肿瘤作用^[6]。该研究从分子及细胞水平初步验证自研 PD-L1 单抗的体外功能活性,为研究 PD-L1 类抗体提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞 人肺癌 HCC827 细胞株购自美国 ATCC 公司,中国仓鼠卵巢癌细胞 DHO-DG44(DHFR 缺陷)、中国仓鼠卵巢癌细胞 CHO-PD-L1-TCR 及急性 T 细胞白血病细胞 Jurkat-PD1-NFAT 由安徽安科生物工程股份有限公司技术研发中心实验室馈赠。

1.1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基均购于美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,Ficoll 淋巴细胞分离液购自 Biorad 公司,G418 硫酸盐(G418 sulfate)及潮霉素 B(hygromycin B, Hg)购自上海生工生物工程股份有限公司,生物素标记的人 PD-L1(Bio-hPD-L1)、人 PD-1 与鼠 Fc 的嵌合体(hPD-1-mFc)^[7]突变体由安徽安科生物工程股份有限公司自行研制,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗人 IgG1 购自美国 Sigma 公司,FITC 标记的山羊抗鼠 IgG1 购自美国 Jackson 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗人 IgG1 二抗、HRP 标记链霉亲和素(简称 SA-HRP)购自 Thermo 公司,荧光素酶试剂盒购于美国 Promega 公司,

2017-11-15 接收

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(编号:1308085MH141);

安徽高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2011A173)

作者单位:¹ 安徽医科大学第四附属医院呼吸内科,合肥 230022

² 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司,合肥 230088

作者简介:谢庆书,女,硕士研究生;

束军,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: J. Shu

@126.com

ExpressPlus™ 预制胶购自金斯瑞生物科技公司。以罗氏公开的 PD-L1 抗体 Atezolizumab 序列为参考,安徽安科生物工程(集团)股份有限公司自行构建未糖基化的 IgG1 亚型的 PD-L1 抗体(为方便描述简称阿特朱单抗),自研全人源化 PD-L1 单抗由安徽安科生物工程(集团)股份有限公司馈赠(简称自研 PD-L1 单抗)。

1.1.3 主要仪器 FLX800UV 荧光分析仪购于美国 Biotek 公司,超净工作台购于苏州安泰空气技术有限公司,CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司,流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HCC827 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养; Jurkat-PD1-NFAT、CHO-PD-L1-TCR 细胞分别用含有 0.5 mg/ml G418 和 0.1 mg/ml Hg 加压的 Ham's F12 和 RPMI1640 培养基培养,细胞生长汇合度达到 80% ~ 90% 时,消化传代培养,37 °C、5% CO₂ 培养箱内常规传代培养。

1.2.2 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)鉴定两抗体纯度 转染 PD-L1 的 CHO-DG44 细胞的上清液中含抗体,经过滤、提纯、12% Express-Plus™ 预制胶凝胶电泳、考马斯亮蓝染色。

1.2.3 ELISA 法测定两抗体的结合活性及阻断活性 缓冲液分别稀释 hPD-L1 及 hPD-1-mFc 铺板,100 μl/孔 4 °C 冰箱铺板过夜。TPBS(含 0.1% Tween20 的 PBS)洗涤 3 次,封闭剂 37 °C 烘箱封闭 1 h。TPBS 洗涤 3 次,结合:封闭剂分别稀释两抗体使浓度 1 μg/ml,3 倍稀释,依次稀释 8 个梯度,100 μl/孔;阻断:稀释后的两抗体(8 μg/ml 开始,4 倍稀释)分别与 Bio-hPD-L1(终浓度为 50 ng/ml)预混,向 96 孔板加入 100 μl/孔,室温震荡孵育 1 h。TPBS 洗 3 次,分别加封闭剂稀释的 HRP-羊抗人 Fc、HRP-羊抗鼠 Fc 二抗 100 μl/孔,室温震荡孵育 30 min。TPBS 洗 3 次,加入 OPD 显色、终止、酶标仪测定 490 nm 吸光值,每次实验均重复 3 次。

1.2.4 细胞阻断实验测定两抗体的阻断活性 取对数生长期的 CHO-PD-L1-TCR 细胞(5×10^5 /ml)接种于 96 孔板,其余孔加入等体积的 PBS,CO₂ 培养箱培养 16 ~ 24 h。用含 10% FBS 的 RPMI1640(理论 buffer)培养基稀释抗体使终浓度为 100 μg/ml,3 倍梯度稀释,浓度依次为 100.00、33.33、11.11、3.70、1.23、0.41、0.05、0.02、0.00 μg/ml。取对数生长期的 Jurkat-PD1-NFAT 细胞,计数、离心后用理论 Buffer 重悬调整细胞浓度为 6.25×10^5 /

ml。弃 96 孔板中细胞培养上清液,分别加入稀释后自研 PD-L1 单抗、阿特朱单抗,其余孔加等体积 PBS,室温孵育 20 min 后,向 96 孔板中加入 Jurkat-PD1-NFAT,其余孔加入等体积的 PBS,CO₂ 培养箱中培养 6 h 后每孔加入荧光酶底物 Bio-Glo™ Reagent,37 °C 烘箱孵育 10 min 后 FLX800UV 酶标仪上机检测其相对光单位(RLU),实验重复 3 次。RLU 标化值 = 实验组相对光单位/对照组相对光单位。

1.2.5 流式细胞仪检测 HCC827 细胞 PD-L1 的表达 收集 HCC827 细胞 5×10^5 个,分对照组(抗体为 0)和实验组,用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 封闭后,加入自研 PD-L1 单抗(10、1、0.1、0.01 μg/ml),冰上孵育 30 min,封闭液洗涤 2 次后,再加入 FITC-羊抗人 IgG 二抗,重复上述洗涤 3 次后上流式细胞仪检测。

1.2.6 细胞毒性试剂盒检测抗体 ADCC 效应 取对数生长期的 HCC827 细胞用 5% FBS 的无酚红 RPMI1640 调整细胞浓度为 1×10^5 /ml 接种于圆底 96 孔板,每孔 50 μl。自研 PD-L1 单抗、阿特朱单抗用培养基稀释至终浓度为 1 μg/ml,4 倍梯度稀释,共 9 个梯度,每孔加入 50 μl。将昨日提取的等体积的人外周血单个核细胞(human peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) (2×10^6 /ml),每孔加入 50 μl,6 000 r/min 离心 4 min,37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 5 h 后,6 000 r/min 离心板子 4 min,取 50 μl 上清液至新的 96 孔板。每孔加入显色试剂 50 μl,室温避光显色 30 min,酶标仪测量 490 nm 吸光值。靶细胞组:设置 3 个复孔,每孔加入上述浓度的 HCC 827 细胞 50 μl,然后用培养基调节体积为 150 μl;靶细胞最大裂解组:设置 3 个复孔,每孔加入上述浓度的 HCC 827 细胞 50 μl,收集上清液之前 15 min 加入细胞裂解液,使之充分裂解;效靶细胞组:设置 3 个复孔,为未加入抗体,用等体积的培养基替代。细胞裂解率 = OD(实验组 - 效靶细胞组) / OD(靶细胞最大裂解组 - 靶细胞组)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较用单因素方差分析,两独立样本的均数比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两抗体 SDS-PAGE 电泳分析 转染 PD-L1 的 CHO-DG44 细胞,其培养上清液经过过滤、提纯后,

SDS-PAGE 分析结果显示,阿特朱单抗与自研 PD-L1 抗体经过二硫苏糖醇 (DTT) 还原后,由分别是 45、20 ku 轻重链组成,与分子为 130 ku 的未还原型阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗相符,见图 1。

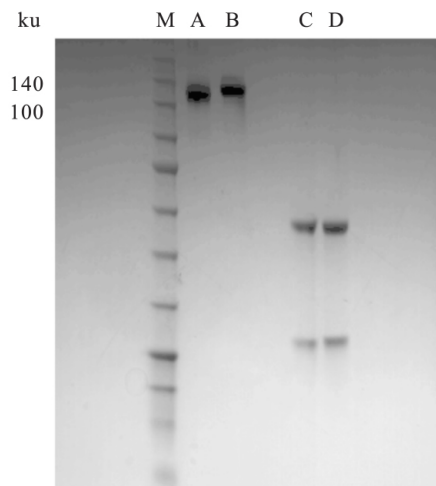


图1 阿特朱单抗及自研 PD-L1 抗体凝胶电泳分析

M: marker; A ~ D 分别为未还原型阿特朱单抗、自研 PD-L1 单抗;还原型阿特朱单抗、自研 PD-L1 单抗

2.2 ELISA 实验中两抗体的结合与阻断活性 结果表明阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗均可以与 hPD-L1 结合,EC₅₀ 分别为 7.88 ng/ml、18.86 ng/ml (图 2A)。两者均可以竞争性阻断 hPD-L1 与 hPD-1-mFc 的结合,IC₅₀ 分别为 56.28 ng/ml 和 190.70 ng/ml (图 2B)。自研 PD-L1 单抗的结合和阻断活性稍弱于阿特朱单抗。

2.3 细胞阻断实验中两抗体的阻断活性 利用基因工程改造的两个细胞株: CHO-PD-L1-TCR 细胞分别为稳定表达 PD-L1 和 TCR 激活剂, Jurkat-PD-1-NFAT 细胞含荧光素酶驱动基因 NFAT 并表达 PD-1。当两个细胞共培养时, Jurkat-PD-1-NFAT 细胞表面的 TCR 被 CHO 细胞表面的 TCR 激活剂激活, 荧光素酶基因表达, 但两细胞表面 PD-L1 与 PD-1 的结合阻断 TCR 信号, 导致荧光素酶活性减弱。PD-L1 抗体可以阻断 PD-L1/PD-1 抑制通路, 导致 TCR 信号及下游荧光素酶活化。细胞阻断试验结果表明, 阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗均可阻断两细胞表面 PD-L1 与 PD-1 的结合, EC₅₀ 分别为 0.154 8 μg/ml 和 0.208 5 μg/ml。如图 3 所示, 阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗从低浓度 (0 μg/ml) 到高浓度 (100 μg/ml) 对应的 RLU 标化值用均数 ± 标准差表示, 两抗体在相同浓度下利用两独立样本 t 检验进

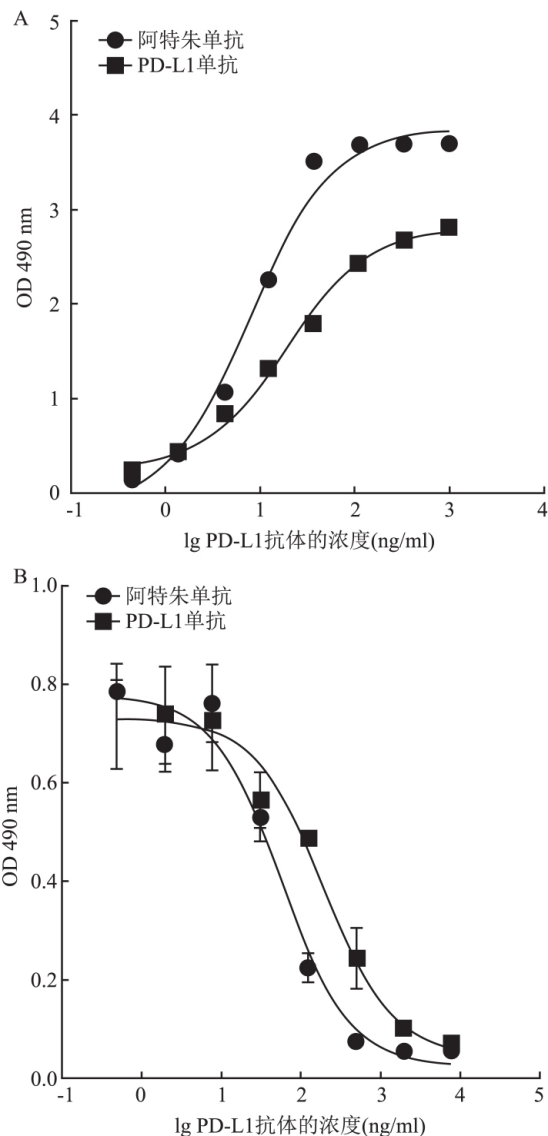


图2 不同浓度阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗与 hPD-L1 的结合及两抗体阻断 hPD-L1 与 PD-mFc 结合

A: 阿特朱单抗及 PD-L1 单抗的结合活性; B: 阿特朱单抗及 PD-L1 单抗的阻断活性

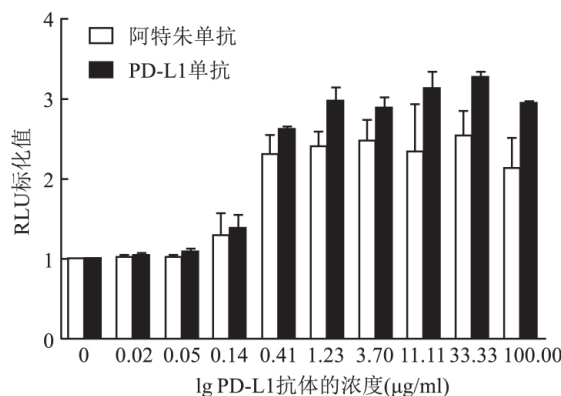


图3 不同浓度阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗阻断两细胞表面 PD-L1 与 PD-1 的结合

行两两比较,各浓度组差异均无统计学意义。两个抗体 EC₅₀ 没有明显差异,剂量效应呈 S 型曲线关系。

2.4 FACS 测定人肺腺癌 HCC827 细胞表面 PD-L1 的表达 以自研 PD-L1 单抗作为一抗,检测结果表明,在一定浓度范围内随着抗体浓度增加,荧光强度逐渐增加。表明肺腺癌 HCC827 细胞高表达 PD-L1,自研 PD-L1 抗体与肿瘤细胞表面 PD-L1 抗原分子有特异结合,见图 4。

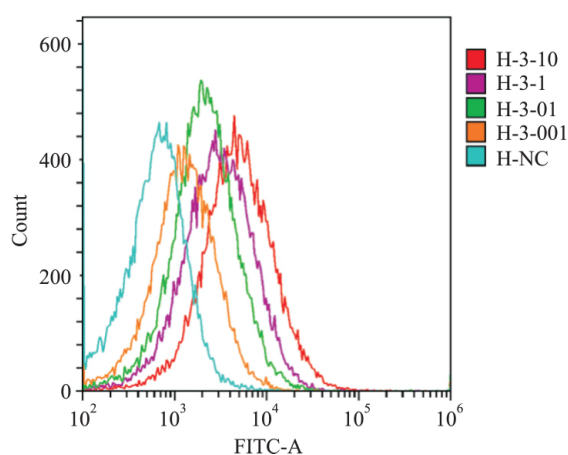


图4 HCC827 细胞表面 PD-L1 的表达

H-NC: 阴性对照; H-3-10、H-3-1、H-3-01、H-3-001 分别指 10、1、0.1、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 自研 PD-L1 抗体对应的荧光强度

2.5 细胞毒性试验中两抗体对 HCC827 的毒性作用 效应细胞与靶细胞比值为 20 : 1 时,阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗均可以介导人外周血单个核细胞对人肺腺癌 HCC827 细胞的杀伤活性,即有 ADCC 效应,并随着抗体浓度增加,杀伤活性增强,呈 S 型剂量效应曲线。利用单因素方差分析,分别比较自研 PD-L1 抗体各组(包括对照组即未加抗体组)细胞裂解率,各组之间差异有统计学意义($F = 146.234, P = 0.000$),利用单因素方差分析比较阿特朱单抗各实验组之间裂解率,差异有统计学意义($F = 196.235, P = 0.000$)。利用 Graphpad Prism 6 软件以抗体浓度对数为 x 轴,细胞溶解率为 y 轴(图 5),自研 PD-L1 及阿特朱单抗的 EC₅₀ 分别为 1.791 ng/ml 和 1.033 ng/ml。

3 讨论

在各种类型的癌症患者中,肺癌是导致患者死亡的主要原因之一,其中非小细胞肺癌占肺癌总数的 85%,5 年生存率不到 15%^[1]。以铂类药物为基

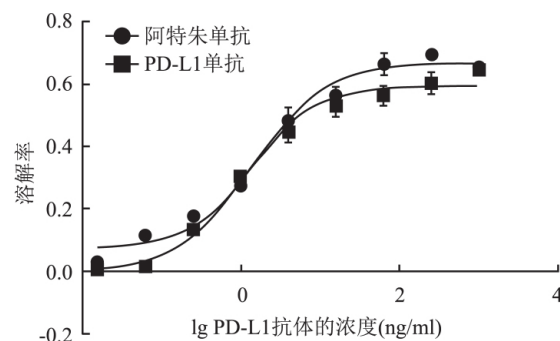


图5 阿特朱单抗及自研 PD-L1 单抗介导人 PBMCs 对 HCC827 的毒性作用

础的双药联合化疗是未提示基因突变或者易位的晚期非小细胞肺癌的一线治疗^[2],反应率仅有 15% ~ 30%^[3]。虽然肺癌患者有一部分亚群由特异性驱动基因的变异引起,通过分子靶向疗法一定程度可以提高患者中位生存期,然而肺癌治疗仍受限。过去人们认为肺癌是无免疫原性的肿瘤^[4],然而近年来免疫治疗特别是针对免疫检查点抑制剂相关的抗体使肺癌患者获益。2015 年、2016 年分别针对 PD-1、PD-L1 的抗体:纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和阿特朱单抗被批准用于非小细胞肺癌的治疗。例如罗氏的阿特朱单抗被批准用于铂类为基础的初始化疗失败或进展的转移性非小细胞肺癌的二线治疗^[5]。

PD-L1 不仅可以和 PD-1 结合,也可以与 CD80 结合,而靶向 PD-L1 的抗体是通过阻断 PD-L1 与 PD-1 的结合而间接发挥抗肿瘤作用的,本研究中 ELISA 实验结果表明自研 PD-L1 单抗可以与 hPD-L1 结合,并且可以竞争性阻断 hPD-L1 与 hPD-1 的结合。有研究^[6]应用基因工程设计的高表达 hPD-1 和 AP-1 驱动的荧光素酶报告基因的 Jurkat/AP-1-Luc/hPD-1 细胞和表达人 CD20 和 hPD-L1 的 HEK293/hCD20/hPD-L1 细胞检测 PD-1 单抗 REGN2810 生物学活性。本研究用相似模型在细胞水平上进一步验证自研 PD-L1 单抗可以阻断两细胞表面 PD-L1 与 PD-1 的结合,并且在一定程度上表明自研 PD-L1 单抗可以通过阻断 PD-L1/PD-1 通路激活 T 细胞受体下游信号。

PD-L1 在胃癌^[4]、肺癌等多种肿瘤中高表达,胃癌组织中 PD-L1 的高表达与 TNM 分期及淋巴结转移等临床病理特征相关,提示靶向 PD-L1 抗体可作为肺癌潜在治疗方法。PD-L1 抗体不仅可以通过抑制 PD-L1/PD-1 通路发挥抗肿瘤作用,ADCC 效应也可以发挥抗肿瘤作用。因此,本研究细胞毒性实

验表明自研 PD-L1 单抗及阿特朱单抗均有 ADCC 效应,对肺癌细胞 HCC827 有相似的毒性作用。虽然研究^[5]显示运用来自同一供体的从外周血单个核细胞提取的 NK 细胞与人 PBMCs 相比较,纯化的 NK 细胞与 Bavencio(Avelumab) 能够产生更大的溶解活性,实验中以人 PBMCs 作为效应细胞验证也是可行的。

综上所述,该自研 PD-L1 单抗在体外有一定的功能活性,能够介导人外周血单个核细胞对人肺腺癌 HCC827 细胞产生毒性作用。以往被批准 PD-L1 单抗大多是从杂交瘤细胞获得,生产成本低并且杂交瘤细胞基因稳定性不易维持,有免疫原性。该自研抗体是从全人源噬菌体抗体库筛选和改造的,推测具有相对较低的免疫原性,然而本实验有一定的局限性,在动物和临床上的应用还有待进一步验证。

参考文献

- [1] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death [J]. *EMBO J*, 1992, 11(11) : 3887 - 95.
- [2] Ceeraz S, Nowak E C, Noelle R J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease [J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(11) : 556 - 63.
- [3] Riella L V, Paterson A M, Sharpe A H, et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(10) : 2575 - 87.
- [4] Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(19) : 12293 - 7.
- [5] Wherry E J. T cell exhaustion [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(6) : 492 - 9.
- [6] Blank C, Kuball J, Voelkl S, et al. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(2) : 317 - 27.
- [7] Maute R L, Gordon S R, Mayer A T, et al. Engineering high-affinity PD-1 variants for optimized immunotherapy and immuno-PET imaging [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(47) : E6506 - 14.
- [8] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1) : 11 - 30.
- [9] Aisner D L, Marshall C B. Molecular pathology of non small cell lung cancer: a practical guide [J]. *Am J Clin Pathol*, 2012, 138(3) : 332 - 46.
- [10] Schiller J H, Harrington D, Belani C P, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non small cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(2) : 92 - 8.
- [11] Holt G E, Podack E R, Raez L E. Immunotherapy as a strategy for the treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Therapy*, 2011, 8(1) : 43 - 54.
- [12] Weinstock C, Khozin S, Suzman D, et al. U. S. Food and Drug Administration approval summary: Atezolizumab for metastatic non-small cell lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(16) : 4534 - 9.
- [13] Burova E, Hermann A, Waite J, et al. Characterization of the anti-PD-1 antibody REGN2810 and its antitumor activity in human PD-1 knock-in mice [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(5) : 861 - 70.
- [14] 吴圣, 邵婧怡, 王芳, 等. PD-L1 和 PD-1 在胃癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(6) : 821 - 4.
- [15] Boyerinas B, Jochems C, Fantini M, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity activity of a novel anti-PD-L1 antibody Avelumab (MSB0010718C) on human tumor cells [J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(10) : 1148 - 57.

Functional activity of humanized PD-L1 monoclonal antibody and its toxic effects on human lung adenocarcinoma cell line HCC827

Xie Qingshu, Shu Jun, Chen Qingqing, et al

(*Dept of Respiratory Medicine, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022*)

Abstract Objective To explore the function and activity of human humanized PD-L1 monoclonal antibody and its toxicity to human lung adenocarcinoma cell line HCC827. **Methods** Sodium dodecyl sulfate polypropylene gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to determine the purity of Atezolizumab and PD-L1 monoclonal antibodies. The binding and competitive blocking activity of the self-developed PD-L1 monoclonal antibody were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with Atezolizumab as a positive control. Cell blocking activity of two antibody was measured by cell interruption test. Flow cytometry (FACS) was used to detect the expression of PD-L1 on the surface of human lung adenocarcinoma cell line HCC827, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) effects were detected in two of antibodies. **Results** High purity Atezolizumab and PD-L1 monoclonal

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.014.html>

二氢生物喋呤还原酶减轻脂肪酸诱导的细胞凋亡的机制研究

古艳婷,冯茹,孙斯凡

摘要 目的 探讨二氢生物喋呤还原酶(QDPR)高表达对脂肪酸(PA)诱导的细胞凋亡的作用。方法 HEK293T细胞转染实验分为A、B、C3组,A组为空载体转染组,B组为经过PA刺激的空载体转染组,C组为经过PA刺激的QDPR重组质粒转染组。首先将空载体及构建的QDPR重组质粒分别转染至HEK293T细胞,培养24 h后采用0.5 mmol/L PA刺激上述细胞,将没有经过PA刺激的空载体组细胞、PA刺激的空载体组细胞和PA刺激QDPR重组质粒组细胞三组细胞继续培养24 h后收集细胞。采用四氢生物喋呤(BH₄)和活性氧簇(ROS)检测试剂盒检测3组BH₄和ROS的生成量;采用Western blot法检测3组凋亡相关蛋白Beclin 1、Caspase 3和Beclin 2的表达。结果 ①转染细胞后,QDPR融合蛋白成功表达;②与A组相比,B组的BH₄生成量差异无统计学意义;与B组相比,C组BH₄生成量明显增多($P < 0.05$);③与A组相比,B组的ROS生成量明显增加($P < 0.05$);与B组相比,C组ROS生成量明显下降($P < 0.05$);④Western blot结果显示:与A组相比,B组经过PA刺激后细胞中Beclin 1和Caspase 3表达水平显著上调($P < 0.05$),Beclin 2表达水平下降($P < 0.05$);QDPR过表达后C组Beclin 1和Caspase 3表达水平显著下调($P < 0.05$),Beclin 2表达水平升高($P < 0.05$)。结论 QDPR高表达后,可以刺激BH₄的生成,同时能降低PA诱导的ROS的生成

量,还可以降低细胞凋亡相关蛋白Beclin 1和Caspase 3的表达,增强抗凋亡蛋白Beclin 2的表达,提示其可能通过调节BH₄和ROS含量影响细胞凋亡。

关键词 二氢生物喋呤还原酶; HEK293T细胞; 凋亡; Beclin 1; 活性氧簇

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0181-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.004

糖尿病肾病是由很多因素导致的疾病,患者体内存在多种通路的失调,至今仍未完全阐明。研究显示糖尿病肾病存在自噬现象的下调,其中肾脏中的脂代谢紊乱会促进肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[1-2],且会导致肾小管细胞凋亡^[3]。研究者在前期实验中发现,二氢生物喋呤还原酶(dihydropteridine reductase, QDPR)在体外高表达可抑制细胞的氧化应激,但其对活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的抑制是否参与糖尿病肾病的发生发展还不确定^[4]。本研究构建了野生型QDPR重组质粒并转染至HEK293T细胞,使用脂肪酸(plamitic acid, PA)刺激细胞,观察QDPR过表达对PA诱导的细胞凋亡作用的影响,探讨QDPR在糖尿病肾病发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞 鼠单抗V5抗体(美国Invitrogen公司);兔多抗LC3(美国Sigma公司),兔多

2017-10-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81603091)

作者单位: 航空总医院药剂科,北京 100012

作者简介: 古艳婷,女,博士,主管药师;

冯茹,女,副主任药师,责任作者, E-mail: 13520708991@163.com

antibodies were identified by SDS-PAGE. Cell blocking activity of two antibody was measured by cell interruption test. ELISA showed that both PD-L1 monoclonal antibodies and Atezolizumab could bind to human PD-L1 and block the binding of PD-L1 to PD-1. Both PD-L1 monoclonal antibodies and Atezolizumab could block the binding of two cell surface molecules PD-L1 with PD-1, EC50 were 0.208 5 $\mu\text{g/ml}$ and 0.154 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively, there was no significant differences in certain concentration. FACS results showed that high expression of PD-L1 in human lung adenocarcinoma HCC827 cells. Cytotoxicity experiments showed that when the ratio between effector cells and target cells was constant, monoclonal antibodies against PD-L1 and Atezolizumab have strong toxic effects on human lung adenocarcinoma cell line HCC827. **Conclusion** The research of humanized monoclonal antibody PD-L1 has functional activity, T cell receptor signaling can be attenuated by blocking the combination of PD-L1 and PD-1 on the cell surface, and may exert a certain antitumor effect through the ADCC effect.

Key words PD-L1 antibody; Atezolizumab; antibody dependent cell-mediated cytotoxicity; lung cancer