

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.20.002

文章编号: 1005-8982(2016)20-0006-06

论著

免疫毒素 CCL25-PE38 抗急性 T 淋巴细胞白血病实验研究

刘晓蕾¹, 高磊², 崔娜³

(河北省保定市第一中心医院 1.血液内科, 2.彩超室, 3.妇科, 河北 保定 071000)

摘要:目的 探讨免疫毒素 CCL25-PE38 对急性 T 淋巴细胞白血病(T-ALL)细胞系 MOLT4(天然高水平表达 CCR9)的杀伤作用, 以期为 T-ALL 的靶向治疗提供基础。方法 通过流式细胞术、共聚焦显微术检测 CCL25-PE38 与 MOLT4 细胞的结合及内化, Transwell 趋化小室检测其趋化能力, 细胞增殖试剂 WST-1 检测其细胞杀伤能力, Annexin V-FITC/PI 染色检测其凋亡诱导效应, 建立 SCID 小鼠白血病细胞异种移植肿瘤(CCR9⁺ 肿瘤)模型检测 CCL25-PE38 的抑瘤效果。结果 WST-1 检测结果显示 CCL25-PE38 能特异性杀伤 MOLT4 细胞; Annexin V-FITC/PI 染色显示 CCL25-PE38 主要通过凋亡诱导效应引起 MOLT4 细胞死亡; 在 SCID 小鼠白血病细胞异种移植瘤模型中, 注入 CCL25-PE38 能缓解 CCR9⁺ 肿瘤的生长。结论 CCL25-PE38 通过凋亡诱导作用引起 MOLT4 细胞死亡, 缓解异种移植 CCR9⁺ 肿瘤的生长。

关键词: CCL25-PE38; 急性 T 淋巴细胞白血病; 免疫毒素

中图分类号: R733.71

文献标识码: A

Study of CCL25-PE38 immunotoxin in treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)

Xiao-lei Liu¹, Lei Gao², Na Cui³

(1. Department of Hematology, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Ultrasound Department, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China;

3. Gynecology, Baoding First Central Hospital, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To investigate the killing effect of CCL25-PE38 immunotoxin on MOLT4 cell line in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) (CCR9 natural high-level expression), and to provide the foundation of targeting treatment of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Methods Flow cytometry and confocal microscopy were used to detect the binding and internalization of CCL25-PE38 and MOLT4 cells. Transwell chemotaxis chamber method was used to detect the chemotaxis. Cell Proliferation Reagent WST and Annexin V-FITC/PI stain were used to detect killing ability of cells and the apoptosis induced effect respectively. And antitumor effect of CCL25-PE38 was detected by building the SCID leukemia cells in mice xenograft tumor (CCR9⁺ tumors) model. Results WST-1 test showed that CCL25-PE38 produce specific lethal effect on MOLT4 cell. Annexin V-FITC/PI stain showed that the cause of death of MOLT4 cells was induced by apoptosis of CCL25-PE38. Injection of CCL25-PE38 in SCID leukemia cells in mice xenograft tumor (CCR9⁺ tumors) model can retard growth speed of CCR9⁺ cancer. Conclusions The cause of death of MOLT4 is induced by apoptosis-inducing effect of CCL25-PE38, which can retard the growth of CCR9⁺ xenotransplanted tumors.

Keywords: CCL25-PE38; T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL); immunotoxin

白血病在全球发病率呈上升趋势,我国白血病发病率为十万分之三,每年约新增 40 000 例患者。白血病表现为骨髓造血组织恶性增生,形成大量异常的白细胞,广泛浸润组织器官,引起多种组织器官不可逆损害,直接威胁患者生命。白血病的转移、复发与白血病细胞及其生长微环境相互作用密切相关。免疫毒素是一种由抗体或细胞因子与化学毒素耦合组成的融合蛋白。通过受体介导的内吞作用和随后的毒素成分被转运到细胞质,并与二磷酸腺苷结合,核糖基化延伸因子 2(EF-2),从而导致蛋白质合成被抑制和靶细胞死亡^[1]。PE38,38 kD 的截短型绿脓杆菌外毒素 A 的衍生物,已被广泛作为免疫毒素毒素组分。例如,抗 CD22 的重组免疫毒素 BL22,基于 PE38 的作用治疗毛细胞白血病证明是成功的^[2]。重组免疫毒素 8H9-PE38 用于乳腺癌,骨肉瘤,神经母细胞瘤的治疗^[3]。因此,重组免疫毒素可能是一种用于治疗癌症患者,尤其是血液肿瘤患者有前途的方法。以趋化因子受体介导的免疫治疗是一个极具吸引力的策略。本研究推测,毒素与趋化因子融合构成的新型免疫毒素,可能对高水平表达 CCR9 的急性 T 淋巴细胞白血病(T lineage acute lymphoblastic leukemia,T-ALL)细胞的存活产生影响。为了检验该假设,本研究设计一个免疫毒素分子 CCL25-PE38,构建其真核表达载体,并表达在真核细胞 293T 中,然后检测其对 T-ALL 细胞系 MOLT4 的杀伤作用以及抗 MOLT4 细胞异种移植肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 MOLT4 细胞(自然高水平表达 CCR9),小鼠成纤维细胞 L929,HEK 293T 细胞购自美国模式菌种收集中心,RPMI 1640、DMEM、胰酶来源于美国 Hyclone 公司,青霉素、链霉素购自美国 Sigma 公司,Fetal bovine serum(FBS)购自美国 Gibco 公司,限制性内切酶来源于美国 New England Biolabs 公司,pcDNA3.1(+)载体来源于美国 Invitrogen 公司,Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System 来源于 Promega,Entranster™-D 来源于中国 Engreen,重组人 -CCL25 来源于美国 Peprotech 公司,鼠抗人 CCR9 单克隆抗体购自美国 R&D 公司,BCA 蛋白分析试剂盒购自碧云天生物有限公司,过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG,FITC/R-PE 标记羊抗兔 IgG,R-PE 标记驴抗鼠 IgG(H+L)来源于美国 Protein

Tech 公司,Annexin V-FITC 试剂盒来源于美国 BD 公司,细胞增殖试剂 WST-1 来源于美国 Roche 公司,甘油来源于美国 Sigma 公司。

1.1.2 主要仪器 电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司),Eppendorf PCR 仪(德国 Eppendorf AG 公司),Air Tech 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),KHB CT-360 自动多功能酶标仪(上海科华实验系统有限公司),GENE GENIUS 凝胶成像分析系统(英国 Syngene 公司),Eppendorf 移液器(德国 Eppendorf AG 公司),Eppendorf 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf AG 公司),蛋白电泳仪、转印仪(北京六一),Transwell 趋化小室(美国 Corning 公司),细胞培养箱(美国 Forma 公司),倒置显微镜(日本 Nikon 公司),流式细胞仪(美国 Beckman 公司),共聚焦显微镜(德国 Leica)。

1.2 实验方法

1.2.1 重组免疫毒素 CCL25-PE38 靶向杀伤

MOLT4 细胞实验 收集 1×10^5 MOLT4 细胞,PBS 洗涤。分别取 CCL25-PE38、PE38(0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 及 2.0 nmol/ml,PBS 稀释),加至细胞悬液中,混合后加至 96 孔板的各小孔中。以 PBS 处理作为阴性对照组。37℃、二氧化碳 CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱中培养 48 h 后,加入 10 μ l WST-1(美国 Roche 公司)继续培养 4 h。酶标仪测定 450 nm 下的光密度(optical density,OD)值。同时为检测 CCL25-PE38 对 MOLT4 细胞的特异性杀伤作用依赖于 CCR9,设立 CCL25-PE38 加抗 CCR9 抗体(美国 R&D 公司)处理组。收集 MOLT4 细胞,PBS 洗涤 1 次。先用抗 CCR9 抗体处理 1 h,然后加入 CCL25-PE38。其他处理同上。为检测 CCL25-PE38 对 CCR9- 细胞增殖能力的影响,收集 1×10^5 L929 细胞,PBS 洗涤 1 次。取 CCL25-PE38(0.5 nmol/ml,PBS 稀释),加至细胞悬液中,混合后加至 96 孔板的各小孔中。以 PBS 处理作为阴性对照组。37℃、二氧化碳 CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱中培养 48 h 后,加入 10 μ l WST-1 继续培养 4 h。酶标仪测定 450 nm 下的 OD 值。重组免疫毒素 CCL25-PE38 凋亡诱导效应,收集 1×10^5 MOLT4 细胞,PBS 洗涤 1 次。取 CCL25-PE38(0.5 nmol/ml,PBS 稀释),加至细胞悬液中,混合物加至 24 孔板的各小孔中。37℃、二氧化碳 CO₂ 浓度为 5% 的细胞培养箱中培养 0、24 及 48 h。离心收集处理后的细胞,结合缓冲液洗涤 1 次,加入 Annexin V-FITC/PI(美国 BD 公司)于暗处孵

育15 min。立即上流式细胞仪(美国 Beckman 公司)进行检测。

1.2.2 重组免疫毒素 CCL25-PE38 抗肿瘤实验

MOLT4 细胞异种移植肿瘤(CCR9⁺)模型建立: SCID 小鼠由武汉大学动物实验中心提供,6~8 周龄,雌性,许可证编号:SCXK(鄂)2008-2004。小鼠饲养在无菌隔离器中。一周后无菌条件下将 MOLT4 细胞接种至 SCID 小鼠背部皮下(1×10^7 只),接种后约 7~9 d 可触及到约 300 mm³ 大小的肿瘤块,将未长出肿瘤的小鼠弃掉不用,余下动物分成 3 组,每组 5 只。重组免疫毒素 CCL25-PE38 处理及抗瘤效果观察:于第 9 天开始分别经尾静脉注射(静脉注射不成功的采用腹腔注射)CCL25-PE38、PE38 (0.5 nmol/只/d)、PBS;连续注射 14 d。每隔一天测量瘤体的长和宽,并计算瘤体大小。至实验第 29 天,采取颈椎脱臼方式将 SCID 荷瘤小鼠处死,剥离肿瘤体并称重。HE 染色:用 4% 中性甲醛固定剥离得到的肿瘤,送本校组织胚胎学教研室进行石蜡包埋、切片、HE 染色。在显微镜下观察肿瘤块组织学特点。流式细胞术检测 CCR9⁺ 肿瘤中 CCR9 的表达情况:无菌条件下碾磨肿瘤块,使用 200 目的细胞滤网收集肿瘤细胞,PBS 洗涤 2 次。传代培养 3 次后,收集细胞检测其表面 CCR9 的表达水平。分离收集各处理组 1×10^5 细胞,加 10 μ g/mL 的抗 CCR9 单克隆抗体(美国 R&D 公司)至细胞悬液中,于 4℃ 孵育 1 h,以 MOLT4 细胞作为对照,加入 PBS 处理。PBS 洗涤 2 遍后,加入 R-PE 标记的羊抗鼠 IgG(美国 ProteinTech 公司),4℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 2 次后上流式细胞仪(美国 Beckman 公司)进行检测。

1.3 统计学方法

采用 Graph Prism 5 统计软件进行数据分析,计量资料用均数比较的 *t* 检验处理和单因素方差分析,定性资料用独立样本 $R \times C$ 列联表资料的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫毒素 CCL25-PE38 靶向杀伤 MOLT4 细胞能力检测

为检测免疫毒素 CCL25-PE38 对细胞存活的影响,本研究检测免疫毒素 CCL25-PE38 对 MOLT4 细胞的杀伤作用以及对 L929 细胞增殖的影响。如图 1 所示,CCL25-PE38 能特异性杀伤 MOLT4 细胞,随着免疫毒素 CCL25-PE38 浓度的增加其杀伤效应也

随着增强,同时其杀伤作用能被抗 CCR9 的抗体特异性阻断。CCL25-PE38 对 CCR9 表达阴性细胞的增殖无影响。

2.2 免疫毒素 CCL25-PE38 凋亡诱导效应

为探讨免疫毒素杀伤 MOLT4 细胞的机制,本研究检测免疫毒素诱导 MOLT4 细胞凋亡的作用。随着 CCL25-PE38 作用于 MOLT4 细胞时间的增加,发生凋亡的 MOLT4 细胞数(Annexin-V FITC 阳性和 Annexin-FITC、PI 双阳性细胞)逐渐增加,见图 2。24 h 凋亡率为 30.7%,48 h 凋亡率达到 41.3%。与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。见附表。

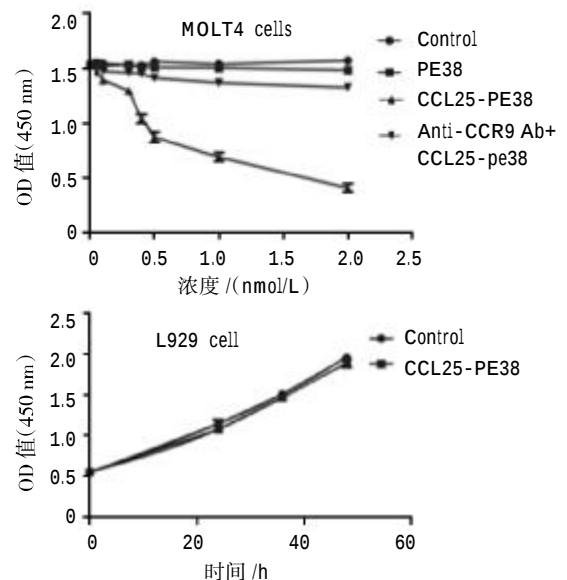


图 1 免疫毒素 CCL25-PE38 细胞毒作用检测

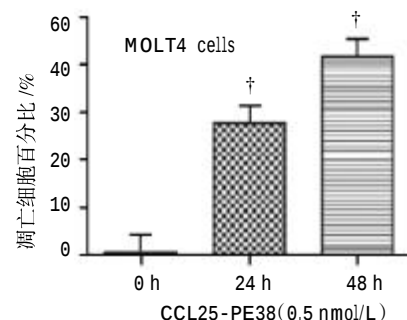


图 2 免疫毒素 CCL25-PE38 诱导 MOLT4 细胞凋亡效应

附表 两组免疫毒素 CCL25-PE38 诱导 MOLT4 细胞凋亡效应的比较 %

组别	24 h 凋亡细胞率	48 h 凋亡细胞率
处理组	30.7	41.3
对照组	2.4	3.9
χ^2 值	12.323 [†]	

注:† 两组 MOLT4 细胞凋亡率比较, $\chi^2 > 0.05$, $P < 0.01$

2.3 免疫毒素 CCL25-PE38 抗 CCR9⁺ 肿瘤效应

为进一步验证免疫毒素特异性杀伤白血病细胞的能力,本研究检测免疫毒素在体内抗 CCR9⁺ 肿瘤作用。首先建立 MOLT4 细胞异种移植 CCR9⁺ 肿瘤,接种 MOLT4 细胞 9 d 后,可检测到大小为 300 mm³ 瘤体。然后注入 CCL25-PE38 并观察其对移植肿瘤生长的影响。如图 3 所示,注入 CCL25-PE38 12 d 以后能观察到瘤体的生长受到抑制。而 PBS 及 PE38 处理组瘤体的体积持续增长。因此,采用静脉注射重

组免疫毒素 CCL25-PE38 能有效缓解 SCID 小鼠异种移植肿 CCR9⁺ 瘤的生长。

2.4 HE 染色结果

为验证 CCL25-PE38 体内抑瘤作用,本研究制作肿瘤组织切片并作 HE 染色。通过组织学分析,发现 CCL25-PE38 处理组与对照组比较血管分布密度减少,肿瘤细胞数目明显减少。见图 4。

2.5 CCR9⁺ 肿瘤中 CCR9 的表达水平

在本实验中,尽管免疫毒素 CCL25-PE38 能有效

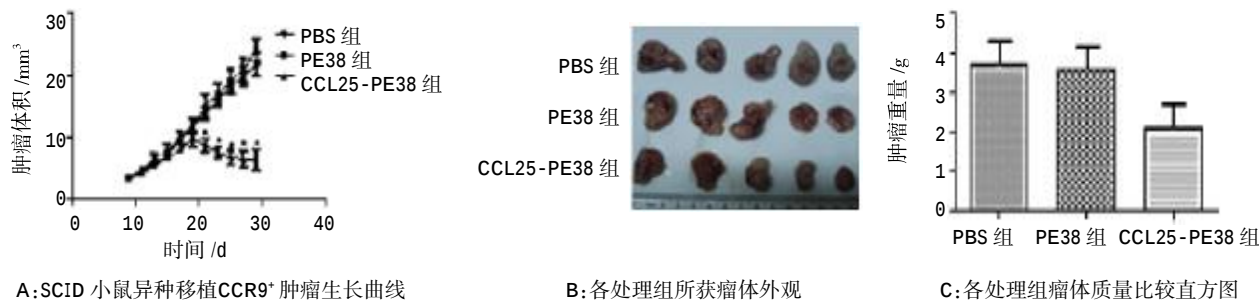


图 3 免疫毒素 CCL25-PE38 抑制异种移植 CCR9⁺ 肿瘤的生长

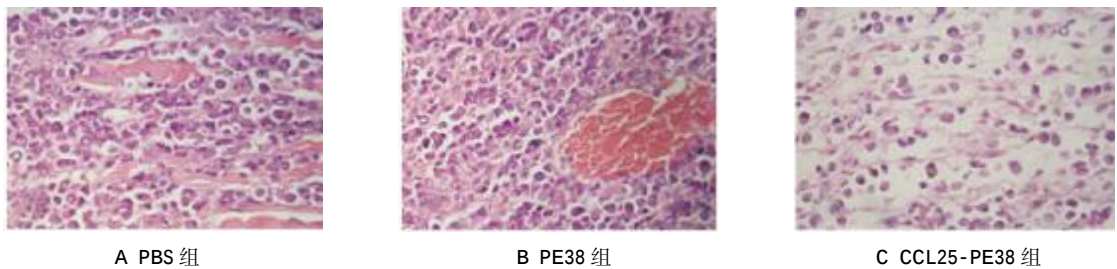
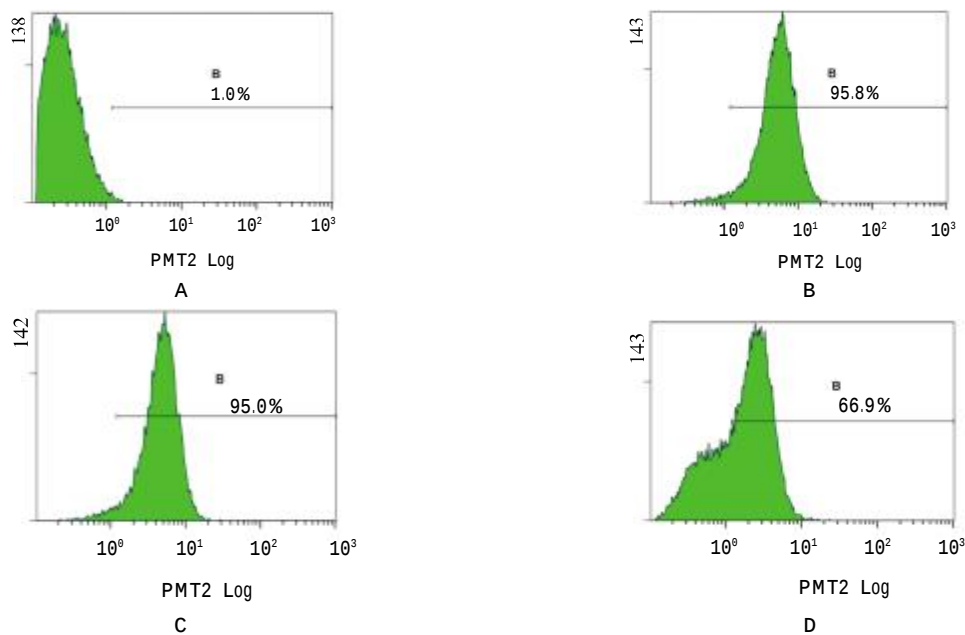


图 4 肿瘤组织 HE 染色结果



A: MOLT4 细胞对照组, 只加二抗; B: PBS 处理组, CCR9 表达水平为 95.8%; C: PE38 处理组 CCR9 表达水平为 95.0%; D: CCL25-PE38 处理组, CCR9 表达水平为 66.9%

图 5 不同处理组来源的肿瘤细胞表面 CCR9 表达水平

缓解异种移植 CCR9⁺ 肿瘤生长,但是不能完全消除肿瘤。为探究产生此现象的原因,采用 FCM 检测了来源于各组瘤体中细胞表面 CCR9 的表达水平,结果发现在 CCL25-PE38 处理组,CCR9 的表达水平明显降低(66.9%),而 PBS 和 PE38 处理组肿瘤细胞表面 CCR9 水平未有明显改变,见图 5。因而可推测 CCR9 表达水平的下降可能与 MOLT4 细胞移植到小鼠体内后部分细胞不再表达 CCR9 有关。

3 讨论

趋化因子和趋化因子受体在疾病发生、发展的过程中发挥重要作用^[4]。最近有研究报道,CCX282-B,一个潜在的人 CCR9 拮抗剂,对肠道炎症具有较好的治疗效果^[5]。此外,文献^[6]报道,下调 CXCR4 的表达抑制癌细胞侵袭和转移。针对趋化因子和 /或趋化因子受体可能对控制相关疾病的发展进程具有治疗效果。CCR4 单克隆抗体已被证明可以诱导 T-ALL 患者白血病细胞的死亡,抑制表达 CCR4 肿瘤的进展^[7-9]。该作用导致细胞的死亡有赖于抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用,但是该治疗方式与患者的免疫功能状态有关。而针对趋化因子或趋化因子受体与细胞毒性药物的免疫毒素,直接杀伤靶细胞可能提供更好的治疗效果。

PE38 具有很强的诱导细胞死亡作用已被广泛用作免疫毒素的毒素成份^[10-12]。在本研究中,WST-1 检测结果显示,CCL25-PE38 特异性杀死 MOLT4 细胞,但不杀伤 L929 细胞。重要的是靶向杀伤作用可被 CCR9 中和性抗体有效地阻断,再次确认 CCL25-PE38 对 MOLT4 细胞的杀伤作用是由 CCR9 介导的。随后 Annexin V-FITC/PI 染色的结果表明,CCL25-PE38 呈时间依赖性诱导 MOLT4 细胞的凋亡。另一项研究报道与本研究一致的结果,VGEF-PE38 融合毒素进入胞浆后可诱导靶细胞凋亡^[13-15]。此外,本研究通过向 SCID 小鼠注射 MOLT4 细胞建立白血病细胞荷瘤(CCR9⁺ 肿瘤)模型,探讨 CCL25-PE38 对异种移植 CCR9⁺ 肿瘤生长的影响。在 SCID 小鼠白血病细胞移植瘤模型中,注入 CCL25-PE38 能有效缓解 CCR9⁺ 肿瘤的生长。经 FCM 检测发现瘤体(CCL25-PE38 处理组)中分离的肿瘤细胞 CCR9 的表达水平下降,提示有可能一部分细胞在体内丧失表面 CCR9 分子,对 CCL25-PE38 产生耐受。因此,提高免疫毒素 CCL25-PE38 的抗肿瘤效果是本研究下一步的工作目标,可能通过以下途径:①生物信息

学方法,优化 CCL25-PE38 结构,以增加 CCL25-PE38 活性;②提高 CCL25-PE38 的稳定性,以促进其吸收;③使用与其他治疗方法如化疗相结合的策略。另外,为进一步研究免疫毒素 CCL25-PE38 体内抗白血病作用,进行以下实验:建立小鼠白血病模型,观察 CCL25-PE38 治疗白血病效果;观察 CCL25-PE38 的免疫原性、毒性、体内代谢等情况。

综上所述,本研究结果表明,免疫毒素 CCL25-PE38 能特异性杀伤高水平表达 CCR9 的 MOLT4 细胞,而不影响 CCR9 受体阴性细胞。此外,体内研究表明,CCL25-PE38 能缓解 CCR9⁺ 肿瘤的生长。所以,CCL25-PE38 在此呈现的生物活性使其有可能成为潜在治疗高水平表达 CCR9 癌症潜在的生物制剂,特别是 T-ALL。

参 考 文 献:

- [1] PASTAN I, HASSAN R, FITZGERALD D J, et al. Immunotoxin treatment of cancer[J]. Annu Rev Med, 2007, 58(1250): 221-237.
- [2] PEREZ-ATAYDE A R, SALLAN S E, TEDROW U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia[J]. Am J Pathol, 1997, 150(3): 815-821.
- [3] SUMINOE A, MATSUZAKI A, HATTORI H, et al. Expression of matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP) genes in blasts of infant acute lymphoblastic leukemia with organ involvement[J]. Leuk Res, 2007, 31(10): 1437-1440.
- [4] BECKER S E. The disease with hope: hairy cell leukemia[J]. Clin J Oncol Nurs, 2007, 11(5): 731-735.
- [5] ONDA M, WANG Q C, GUO H F, et al. In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9 (Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma[J]. Cancer Res, 2004, 64(4): 1419-1424.
- [6] WALTERS M J, WANG Y, LAI N, et al. Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2010, 335(1): 61-69.
- [7] YADAV V R, SUNG B, PRASAD S, et al. Celestrol suppresses invasion of colon and pancreatic cancer cells through the down-regulation of expression of CXCR4 chemokine receptor[J]. J Mol Med, 2010, 88(12): 1243-1253.
- [8] ISHIDA T, IIDA S, AKATSUKA Y, et al. The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(22): 7529-7539.
- [9] CHARRAD R S, GADHOUM Z, QI J, et al. Effects of anti-CD44 monoclonal antibodies on differentiation and apoptosis of human myeloid leukemia cell lines[J]. Blood, 2002, 99(1): 290-299.

- [10] SONG G, LIAO X, ZHOU L, et al. HI44 α , an anti-CD44 monoclonal antibody, induces differentiation and apoptosis of human acute myeloid leukemia cells[J]. Leuk Res, 2004, 28(10): 1089-1096.
- [11] KOURTI M, VAVATSI N, GOMBAKIS N, et al. Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia[J]. Int J Hematol, 2007, 86(2): 166-173.
- [12] KEPLER-HAFKEMEYER A, KREITMAN R J, PASTAN I. Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies[J]. Int J Cancer, 2000, 87(1): 86-94.
- [13] HU C C, KE Y Q, SUN X L, et al. Human mesenchymal stem cells-like cells as cellular vehicles for delivery of immunotoxin in vitro[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(2): 181-189.
- [14] KAKINUMA T, HWANG S T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2006, 79(4): 639-651.
- [15] SEEMA S, ANGURAJ S, RAKESH K. Chemokines in tumor angiogenesis and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, 26(3/4): 453-467.

(张蕾 编辑)