

漿細胞瘤抑制素誘發細胞自戕之研究

劉倩君

摘 要

巨噬細胞的生物效應之一，即對腫瘤細胞產生胞殺作用。本實驗室數年前發現一種對 MOPC-315 漿細胞瘤具有胞殺作用的因子 (Plasma-lytoma cytotoxic factor; PCF)，對 MOPC-315、MPC-11 漿細胞瘤及 FO 等骨髓瘤細胞有毒性，但對 J558 骨髓瘤細胞沒有影響。本實驗以 DEAE-Sephacel 離子交換色層管柱，由 P388D1 培養基上清液純化 PCF，再以此 PCF 為免疫原製備一系列單株抗體，這些單株抗體皆可中和 P388D1 對 MOPC315 細胞的胞殺作用。以硫酸銨分割法 (40-60% 飽和度) 初步純化 PCF 之後，直接透過抗 PCF 之單株抗體 (CB7-C2) 製成之免疫親和性管柱純化出 PCF，在 SDS-PAGE 分析中呈一 M.W. 62 KDa 之蛋白帶，以 CB7 作西方點墨法，證實此 62 KDa 蛋白為 PCF，但是以 CB7-C2 為探針則呈現一分子量約 130 KDa 之蛋白帶，顯示 PCF 可能以雙倍體存在。PCF 之 N 端胺基酸序列為 Ala-Ile-Leu-Leu-Ala，呈相對油溶性。初步研究結果顯示，粗純化之 PCF 會造成 MOPC-315 DNA 斷裂現象，即 PCF 殺死腫瘤之機制可能是細胞自戕 (apoptosis)。以純化之 PCF 進一步處理 MOPC-315 細胞後，經 agarose gel 與 TUNEL 標示 DNA 片段，以及以 Annexin V 標示 phosphatidylserine 技術分析，證實 DNA 斷裂程度及 apoptosis 的程度，與 PCF 之用量及處理之時間長度呈正比。而抗 PCF 單株抗體 CB7 可使 apoptosis 的程度降低或完全消除，進一步證實造成 MOPC-315 apoptosis 現象的因子，確實是分子量 62 KDa 的 PCF。經 PCF 處理過之細胞以 RT-PCR 技術分析，發現其 IL-1 β 轉換酵素 (IL-1 β converting enzyme; ICE) 之 mRNA 量顯著增加，加入 CB7 單株抗體即使 ICE 基因表現顯著降低，證明 PCF 透過與 TNF α 相似的 ICE pathway，造成 MOPC-315 腫瘤細胞之細胞自戕現象。

關鍵字：漿細胞瘤抑制素、細胞自戕、IL-1 β 轉換酵素

壹、前言

動物細胞的死亡可以用兩種方式進行：(一)當細胞受到有害環境或有毒因子產生的多元性傷害而死亡，其死亡方式稱為壞死(Necrosis)；壞死的作用早期引起粒線體形狀及功能改變，細胞膜滲透壓改變，導致細胞膨脹，溶小體釋出水解酵素，分解蛋白質、DNA、RNA、細胞破裂，引起發炎現象，細胞漸趨於死亡。(二)在正常生理狀況下所產生的死亡方式，有學者稱為計劃性死亡(programmed cell death)或自戕(Apoptosis)。自戕是 1972 年 Kerr 等人歸納前人報告及實驗結果提出的名詞，取自古希臘凋零(falling off)之意。自戕(Apoptosis)的死亡過程分為兩時期；第一期發生細胞核質與細胞質濃縮，分裂成數個由原生質膜所包圍的完整胞器稱為 Apoptotic body，第二期 Apoptotic body 發生吞噬或瓦解。自戕過程可觀察到細胞變小，細胞膜之選擇性通透失去控制，胞內鈣離子增加，造成膜上磷脂酵素活化，膜的磷脂質裂解，導致水分及電解質流失，核內染色質凝縮附於核膜，細胞膜出現指狀突起，接著細胞核分裂成數個球體，此過程中會發生 DNA 流失，並形成一個個自戕小體，然後被巨噬細胞吞噬，故沒有發炎現象發生。

誘發細胞自戕之刺激物很多，類固醇(Glucocorticoids)藥物可以誘導胸腺細胞產生細胞自戕，過程與內生性核酸內切酵素(endogenous endonuclease)有關(Williams and Smith, 1993)；放射性物質(irradiation)UV、X-射線；毒性物質(poisons)會驅動細胞自戕之活化因子，使 DNA 進行不完全性修補，導致利他性自殺行為(altruistic suicide)，以利配子的存活。

細胞自戕在胞內訊息可發現胞內鈣離子增加、蛋白激活酵素 A (protein kinase A; PKA) 與蛋白激活酵素 C (protein kinase C; PKC) 的活化、巨大分子合成、基因的表現改變等(Lanotte et al., 1991; McConkey et al., 1990)。細胞自戕是由基因表現所引導的過程，誘導細胞自戕的基因有 fas/apo-1、c-myc、p53(Cohen, J.J., 1993)；fas 基因的產物 Fas 抗原為一種表面抗原，屬 TNF 受體膜蛋白群，當 Fas 抗體出現時將誘發含 Fas 抗原的細胞核酸內切酵素產生細胞自戕(Cohen, J.J., 1993)；另外 Bax、ICE(IL- β converting enzyme; ICE)等能活化各種蛋白酵素，扮演促進自戕的角色，活化的酵素包含 CPP32、PARP、endonuclease 等，可以引發 DNA 切割成大小約 180-200 核苷酸鹼基序列之片斷及無法修補的內在變化，引導細胞死亡。另有基因 TRPM-2(又稱 clusterin)、SGP-2、RP-2 和 RP-8 在自戕細胞內表現增加。另一些基因則扮演調控自戕的角色，如：Bcl-2、Bcl-x2、P53。p53 為一腫瘤阻遏基因，正常具有 p53 基因的細胞，在細胞受到放射性照射或破壞 DNA 藥物作用下，細胞週期將停留在 G1 期，等待 DNA 修補系統的修補，如修補恢復，則細胞進入 S 期，進一步行細胞分裂；如修補失敗，則細胞行自戕。將 p53 基因植入缺乏 p53 基因的老鼠

骨髓淋巴細胞、人類的結腸癌細胞誘發細胞自戕(Wang et al.,1993)；Bcl-2 基因與免疫球蛋白重鏈的基因作並列(Boise et al.,1993),在人類濾泡型 B-淋巴細胞瘤(Lymphoma)表現增加，被視為抗自戕基因(Anti-apoptosis gene)；在離體實驗中 Bcl-2 阻止由生長因子所產生的細胞自戕,但並不能保護胞殺型 T-淋巴細胞所標的之細胞或由細胞激素所產生的細胞自戕。基因 c-myc 有時促進細胞增殖，有時又誘發細胞自戕,c-myc 致癌基因誘發培養中的纖維母細胞產生細胞自戕(Evan et al.,1992),c-myc antisense 抑制 T 細胞融合瘤於細胞活化時所產生的細胞死亡，但對 dexamethasone 誘發的細胞自戕無作用(Shi et al.,1992)。

近年來，科學家分離出六種哺乳類蛋白質與 CED-3 及 ICE 的核苷酸序列，為一群具專一性 cysteine 蛋白酵素作用蛋白，具有相似功能或彼此調控活性。在 1997 年提出導致細胞自戕的連鎖反應，此連鎖反應中顯現出藉由 Fas 或 TNF 接受器經由刺激後，可以活化細胞質內許多酵素，經由活化酵素的連鎖作用，將導致細胞產生自戕，這些酵素如:ICE、CPP32、PARP...，因此這些酵素基因的 m-RNA 轉錄，將可當成探測細胞進行自戕的指標。Anderson, P 提出的連鎖反應如下：

研究指出 CPP32 為 cystein 蛋白酶，可以分解 113KD PARP 成活化 89KD 的片段，使之失去 DNA 修補或基因監督 endonuclease 之活性等生理功能。CPP-32 切割 PKC δ ，可能與 Cysteine protease 及 Kinase cascades 有關。CPP32 認識 DEVD motif，對 PARP 切割，而不裂解 Pro-IL-1 β (甚至 CPP32 提高 5 千倍)，而 ICE 則對 Pro-IL-1 β 作用遠大於 CPP32。Livia Casciola-Rosen 於 1996 提出 CPP32 裂解受質，均帶有 DXXD motif，包括 U1-70KDa(RNA-結合蛋白)、PARP(DNA-結合蛋白)及 DNA-PK α (pI-3 Kinase-類似蛋白)等，使之失去活性。而這些物質的作用，又都與 mRNA splicing 或斷裂雙股 DNA 的修補有關，因此我們推測 CPP32(apopain)在自戕所扮演主要角色為破壞 DNA。

巨噬細胞(Macrophage)是多功能的細胞，能消滅外來物質，不僅具抗微生物之能力、亦能殺腫瘤細胞、負擔組織的修復與創傷的復原，在非特異性免疫方面扮演重要角色。離體實驗活化的巨噬細胞已被證實可以破壞腫瘤細胞(Weinberg et al.,1978)。巨噬細胞可以接受特殊細菌產物或免疫調節因子的刺激而活化成抗腫瘤狀態(tumoricidal state)，殺死轉型細胞或抑制其生長，卻對正常細胞沒有影響(Cleveland et al., 1974;Diessens et al., 1975;Fidler et al.,1985)。Dingemans et al 於 1981 年提出利用電子顯微技術，觀察到被巨噬細胞胞殺的 SL2 淋巴癌細胞株染色質凝縮附於核膜(chromatin condensation)，細胞表面出現許多泡狀突出物的自戕小泡(Apoptotic body)等自戕現象之形態特徵。另外巨噬細胞對 L929 fibroblast, P815 mastocytoma 亦有胞殺作用，且發現 DNA 片斷(即為 Nucleosomal Ladder)。1995 年亦證實巨噬細胞能誘導周邊血液 T 淋巴球及骨髓 B 淋巴球之自戕 (Fisher et al., 1995; Munn et al., 1996)。

巨噬細胞對腫瘤細胞之胞殺作用方式包括：

- (一) 接觸性的破壞，巨噬細胞需藉著與細胞與細胞間的直接接觸才可產生作用。學者 Oda 於 1989 年提出巨噬細胞經由表面的凝集素(lectin)會與自戕細胞的糖蛋白產生專一性結合，進行胞殺(Oda et al.,1989);1991 年 Bernasconi 提出人類巨噬細胞膜上有 integrin 接受器，會與細胞之 Thrombospondin binding moiety 結合，進行胞殺(Bernasconi et al.,1991);自戕細胞內膜上之 phosphatidyl serine 會轉移至外膜，而被巨噬細胞之 phosphatidyl serine 接受器偵測到進行結合及胞殺；1994 年 Ben-Efrain 指出白三烯素(leukotrienes; LT)中的 LTC $_4$ 、LTD $_4$ ，可促進巨噬細胞和腫瘤細胞如 plasmacytoma MOPC-315、mastocytoma P815 直接接觸，以進行細胞胞殺作用(Ben-Efrain et al., 1994)。
- (二) 分泌胞殺介質：巨噬細胞可分泌上百種之免疫介質，小至分子量 32KDa 之過氧化物，大至分子量 440KDa 的纖維接合素 (fibronectin)(Nathan, 1987)，及其他一些抗腫瘤因子也已陸續被發表，而不同抗腫瘤因子對腫瘤細胞的胞

殺作用亦具專一性(Bernasconi et al. 1991, Aono et al, 1994)。巨噬細胞分泌有關之胞殺介質如下：(1)一氧化氮(NO)：巨噬細胞 NO synthase 分解 L-arginine 產生 NO，可抑制 DNA 合成、阻礙粒線體的呼吸、作用破壞 TCA cycle(Martin et al.,1993)；(2)活性氧(ROI) 包含 superoxide、hydrogen peroxide..可破壞胞內蛋白質、核酸，導致細胞膜上的輸送蛋白變性，間接破壞訊息傳導途徑(Martin et al.,1993 ;Rubbo et al.,1994)。(3).脂肪酸代謝物如白三烯素(leukotrienes)，LTB₄ 可以抑制腫瘤細胞 melanoma B16，Re43 的增生(Santoro et al.1976, Ben-Feraim et al. 1994)；(4)酵素，如 Neutral protease 對多種腫瘤細胞具有胞殺作用的巨噬細胞分泌液中，可側出多種 neutral protease；(5)細胞激素，如腫瘤壞死因子- α (TNF- α)，分子量為 17KDa，可直接胞殺 fibroblast L929、melanoma A3755、OC494；干擾素(INF- γ)，分子量為 21~24 KDa，(Shinagawa et al.1991)；(6)類介白質素 IL-1，分子量為 17KDa，可直接胞殺 myeloma K562、lymphoma E6、melanoma A375，誘導細胞發生細胞自戕(Shinagawa et al.,1991)；第一介白質素(IL-1)分子量 17KDa 可抑制 myeloma K562 和 lymphoma E6 的生長(Lovett et al.,1986)；第六介白質素(IL-6)，分子量為 20~30 KDa，可胞殺 lymphoma U937、chronic B-leukemic cells、B lymphoma；(8)第八介白質素(IL-8)，分子量為 10 KDa，藉活化 T-淋巴球間接胞殺 colon cancer cell PROB；第十二介白質素(IL-12)，分子量為 75KDa，透過 INF- γ 及 T_H 淋巴球間接胞殺 melanoma B16 F10、sarcoma MCA-207(Bruna et al.,1994)。

本實驗室發現以脂多醣體刺激一類似巨噬細胞的腫瘤細胞株 P388D₁，可以分泌抑制素抑制漿細胞瘤 MOPC315 及骨髓瘤細胞 MPC-11、FO 等腫瘤細胞的增長，根據 trypan blue 染色與 ⁵¹Cr 釋放分析結果顯示 P388D₁ 所分離出的上清液對 MOPC-315 具有抑制生長與胞殺作用(Chu et al.,1998)。經分析結果顯示此因子對胰蛋白酵素、HCl 與 2-mercaptoethanol 敏感，但在 100°C、20 分鐘作用仍具有活性。經由以 DEAE-Sephacel 離子交換與 Sephacryl S-300 初步純化 P388D₁ 巨噬細胞株分泌物質，發現數種分子量為 874KDa、112KDa、45KDa、18KDa 的蛋白質，加入 protease inhibitor 或抗老鼠之 IL-1、IL-6 與 TNF 抗體都不能抑制其活性，因此證實此抑制分子並非以前發表的胞殺因子(Tseng and Ferng, 1993)。本實驗繼續進一步製備抗漿細胞瘤抑制素單株抗體，並利用單株抗體製作親和性色層分析管柱，純化漿細胞瘤胞殺素(Plasmacytoma Cytotoxic Factor)，以下簡稱 PCF。再以此 PCF 為免疫原製備一系列單株抗體，這些單株抗體皆可中和 P388D₁ 對 MOPC315 細胞的胞殺作用。以硫酸銨分割法(40-60% 飽和度)初步純化 PCF 之後，直接透過抗 PCF 之

單株抗體 (CB7-C2) 製成之免疫親和性管柱純化出 PCF, 在 SDS-PAGE 分析中呈一 M.W. 62 KDa 之蛋白帶, 以 CB7 作西方點墨法, 證實此 62 KDa 蛋白為 PCF, 但是以 CB7-C2 為探針則呈現一分子量約 130 KDa 之蛋白帶, 顯示 PCF 可能以雙倍體存在。PCF 之 N 端胺基酸序列為 Ala-Ile-Leu-Leu-Ala, 呈相對油溶性(Chu et al.1998)。

本實驗欲瞭解 PCF 對 MOPC-315 腫瘤細胞的胞殺行為是否為誘導細胞自戕所造成, 並藉由單株抗體來中和 PCF 對 MOPC-315 漿細胞誘發的自戕作用, 進而探究 Fas/TNF 自戕連鎖反應中的自戕指標 ICE 基因是否轉錄, 以了解 PCF 造成 MOPC-315 自戕的機轉是否藉由 TNF α 相似的 ICE Pathway。

貳、實驗方法

壹、材料:

P388D1 細胞株(由 DBA/2 老鼠以 methylcholanthrene 誘導出來的巨噬細胞株; ATCC CCL 46)MOPC-315 細胞株(以 Mineral oil 誘導出來的老鼠漿細胞瘤, 可不斷分泌 IgA; ATCC CRL 1581)

單株抗體的製備:

以 P388D1 培養劑上清液, 經 DEAE-Sephacel 離子交換色層分析, 得出抑制活性蛋白後免疫 Balb/c 老鼠, 經脾臟細胞與骨髓瘤細胞株融合產生融合瘤, 經由 PCF 抑制生物活性及酵素免疫分析法進行篩選出 CA5-123、CB2-2.18、CB7-1.1、EA10-1.26、EE6-2.2、FF11-2.26 六種融合瘤細胞株抗體(Chu et al.,1998)。CB7-C2 單株抗體由 CB7-1.1 選殖而來, 對於抑制活性的蛋白具有較高的親和力。感謝實驗室朱敬儀學姊提供其所製備的單株抗體。

貳、方法:

一、細胞株的培養

P388D1、MOPC-315 細胞株培養於 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, NY, USA) 中並添加 10% 的胎牛血清、4mM L-glutamine、100 unit/ml penicillin 與 100 μ l/ml streptomycin 培養液的 pH 值為 7.4。P388D1 每七天分株一次, 使細胞

數減為 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 。MOPC-315 每三天分株一次，使細胞數減為 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 。所有細胞均培養於 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、飽和濕度的培養箱中。

二、MOPC-315 的抑制效果測定

將存活率 85% 以上的 MOPC-315 細胞，調成濃度 $5 \times 10^4/\text{ml}$ ，培養於 T75 培養瓶 ($1 \times 10^6 \text{ cell / total}$)，對照組加入 300 μl PBS、實驗組分別處理 250 μl PCF ($5.0 \mu\text{g/ml}$) 或 250 μl PCF 混合 50 μl anti-PCF (CB7 純化對抗 PCF 之單株抗體)， 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 、飽和濕度的培養箱中培養 48 小時。以 Trypan blue exclusion method 測定抑制效果。

(一) Trypan blue assay

取出 40 μl 的細胞樣品與等量 0.4% Trypan blue 充分混合，以血球計數器計算細胞數目，在顯微鏡下觀察活細胞呈透明亮度，死細胞則被染呈藍色，計算出存活率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{活細胞數}}{\text{細胞總數}} \times 100\%$$

(二) MTT assay

110 μl 細胞樣品加入 20 μl MTT solution (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide, Sigma, 5 mg/ml 溶於 PBS buffer 中) 在 37°C 中反應四小時後，加入 120 μl 之 0.04N HCl (溶於 isopropylalcohol) 混合均勻使紫色結晶溶解。反映後活細胞使黃色的 tetrazolium (在 MTT 中) 轉變成紫色的 formazan 隨後溶於 isopropanol 中。經由 ELISA 讀質儀讀得 O.D.₅₉₀，並換算成胞殺率如下：

$$\frac{\text{對照組 O.D. 值} - \text{樣品組 O.D. 值}}{\text{對照組 O.D.}} \times 100\%$$

三、漿細胞瘤胞殺素單株抗體親和性膠柱的備製

(一) 漿細胞瘤 [胞殺素] 單株抗體之備製

6 隻 8 週大的 Balb/c 公鼠，分別注射 0.5ml pristane 十日後再分別注射 0.5ml 的漿細胞瘤胞殺素單株抗體融合瘤 CB7-C2 細胞 (細胞濃度為 1×10^7 個/ml)。七日後，公鼠腹部脹大，抽其腹水，並以 2000 rpm，離心 10 分鐘，收集淡黃色上清液，即含單株抗體，置於 -20°C 備用。

(二) 漿細胞瘤胞殺素單株抗體之純化

取 3ml protein G-agarose 裝置於迷你膠柱，用 30ml 含緩衝溶液

(0.01M 磷酸鹽溶液, pH=7.0) 沖洗平衡, 接著用 2ml 老鼠腹水混合等量的接合緩衝溶液(流速為 1~2ml/分鐘)通過膠柱, 然後改以接合緩衝溶液沖洗, 直到流出液的 o.d._{280} 小於 0.05 為止, 改換沖提緩衝溶液(0.1M glycine hydrochloride, pH=2.6)沖提, 同時以每管 1ml 的量收集流出液, 並立刻用 2M Tris-HCl(pH=8.0)中和之, 分別測 o.d._{280} 。純化之單株抗體, 以 0.1M mops (pH=7.5) 於 4°C 透析 24 小時。透析 24 小時的純化單株抗體, 用 0.01N HCl 稀釋 100 倍, 測 o.d._{280} , 求得單株抗體之濃度。取 3ml affi 10-gel, 先以 4°C, 二次蒸餾 H_2O 20ml, 經 glass fritted 漏斗沖洗, 再用 20ml, 0.1M mops 沖洗, 保持溼潤狀態, 以藥匙挖到 50ml 錐形瓶中, 將純化的單株抗體加入, 置於 4°C 振盪 4 小時, 而後在冰箱中靜置 15~30 分鐘, 讓膠體沈澱。取少量上清液, 以 0.01N HCl 稀釋 100 倍, 測 O.D._{280} , 推測單株抗體與膠體的結合量。加 0.3ml 1M ethanol amine/HCl (pH=8.0), 4°C 振盪 1 小時, 進行阻斷(blocking)反應即可裝置膠柱。並以 0.01M PBS, pH=7.4) 20ml 沖提平衡之。

四、漿細胞瘤胞殺素 (plasmacytoma cytotoxic factor, 以下簡稱 PCF) 之純化

(一) p338d₁ 細胞株分泌液之收集

培養 p338d₁ 於含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液中, 細胞株經 3~4 天(細胞長滿 T75 培養瓶底層即可), 移去培養基, 加入 10ml free-dmem 清洗二次。換入不含胎牛血清但含 10 μM LPS 之 dmem 培養液, 在 37°C、5% CO_2 、飽和濕度的培養箱中養三天, 在收集細胞分泌液, 以 1400rpm 離心 10 分鐘; 收集含抑制因子的上清液, 貯存於 4°C, 備用。

(二) 硫酸銨鹽析

將 P338D1 細胞培養收集之上清液 3l, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 硫酸銨分以 0~40%, 40~60% 等不同之濃度進行鹽析, 然後用 0.1M PBS (pH=7.4) 透析 48 小時。可置於 -20°C 備用。

五、單株抗體對 PCF 抑制 MOPC-315 胞殺作用的中和效應

將 MOPC-315 (5×10^4 cell/well) 150 μl , 實驗組加入六種融合瘤單株抗體細胞培養液 50 μl (CA5-123、CB2-2.18、CB7-1.1、EA10-1.26、EE6-2.2、FF11-2.26 製備抗體), 加入經純化的漿細胞瘤抑制素 PCF 與 MOPC-315 細胞; 控制組加入 50 μl PBS 及 PCF (5.0 $\mu\text{g/ml}$), 在 37°C、5% CO_2 、95% 濕度的培養箱中, 共同細胞培養 72 小時, 收集細胞並經由 MTT 分析法測得各融合瘤分泌抗體對 PCF 活性中和的效果。

六、單株抗體中和 P338D1 對 MOPC315 的胞殺效應測定

將 150 μ l P388D1 (1×10^6 細胞)放入 96 格的培養盤中，培養 24 小時後，以顯微鏡觀察細胞長至密合狀態，加入 50 μ l 的 actinomycin D (20 μ g/ml 溶於 DMEM 培養液中)，培養 24 小時。去除上清液，用不含血清之 DMEM 培養液沖洗兩次，加入 MOPC-315(5×10^4 cell/well)150 μ l，實驗組加入融合瘤胞培養液 50 μ l(CA5-123、CB2-2.18、CB7-1.1、EA10-1.26、EE6-2.2、FF11-2.26)或無血清培養液 50 μ l(正控制組)，即無 MOPC-315 的負控制組(50 μ l 的 DMEM 完全培養基 50 μ l 無血清 DMEM 培養基共二組)，另一負控制組為 MOPC-315(5×10^4 cell/well)200 μ l，共培養三天，收集細胞做胞殺作用測定，分析融合瘤細胞所製備之單株抗體對 P388D1 造成 MOPC-315 的胞殺作用之抑制效應。

七、DNA 片段測定

(一) DNA 片段抽取

取 MOPC-315 cell，濃度 5×10^4 cell/ml，放入 T75 的培養瓶，加入 PBS 300 μ l 為對照組，實驗組加入純化的 PCF 250 μ l 或 PCF 250 μ l 處理 CB7-C2 單株抗體 50 μ l，共同培養於 37°C，5% CO₂ 的培養箱 48 小時，取出細胞離心後，計算細胞數目及存活率，取 3×10^6 cell/total 於 4°C，1400rpm 離心後，沉澱物部分加入 500 μ l 細胞溶解緩衝液 TTE buffer(20Mm Tris，10Mm EDTA，0.2% Triton X-100)，細胞移入微量離心瓶，取 1ml 針筒 25G 針頭來回抽取細胞數次，再於 4°C，14000 rpm 離心 15 分鐘，收集上清液，加入 100 μ l 5M NaCl，充分混合後再加入 700 μ l isopropanol，置於 -20°C 中，使 DNA 沉澱。隔日取出沉澱 DNA 之溶液，於 4°C，14000 rpm 離心 15 分鐘，加入 1ml 75% cold-ethanol，於 4°C 14000rpm 離心 10 分鐘，倒除上清液陰乾後，加入 20 μ l TE buffer(10mM Tris/HCl，1mM EDTA，pH:7.4)，續加入 1 μ l RNase A，於 37°C 水浴作用 2 小時，加熱 65°C 10 分鐘後，跑 1.5% agarose gel(含 EtBr)，觀察 DNA 片段並拍照。

(二) DNA 膠體電泳

以 1X TBE buffer(每升含 Tris base 10.8g，boric acid 5.5g，0.05M EDTA 4ml)配置成 1.5% 的 agarose gel，在加入 0.71 μ g/ml ethidium bromide。將 10 μ l 的樣品與 2 μ l 的 loading buffer 充分混合，跑電泳約 16 分鐘並以 UV 下觀察拍照。

(三) DNA 片段的定量

將 DNA 抽取片段剩餘下 0.2ml 的 DNA 片段與加入 TE buffer 後的

genomic DNA 分別加入 0.2ml 1N 過氯酸，置於 70°C 下作用 10 分鐘。續置於冰上 5 分鐘，以 4000rpm 離心 6 分鐘之後，取出上清液加入 0.8ml DPA 試劑(1.5g diphenylamine 溶於 100ml glacial acetic acid, 加入濃度為 98-100% 硫酸 0.5ml，均勻混合，使用前續加入 0.5ml 0.01M 96% acetaldehyde)。置於黑暗 37°C 中作用 18 小時。取出 200μl 於 ELISA 培養盤中，以 ELISA Reader 波長 590nm、輔助波長 630nm，測出吸光值。DNA 片段形成百分比計算: (Carlos et al., 1993)

$$\frac{2 \text{ (OD of fragment)}}{2 \text{ (OD of fragment)} + \text{OD of genomic DNA}} \times 100\%$$

八、RT-PCR 測定

(一)製備 cDNA

取 MOPC-315 cell，濃度 5×10^4 cell/ml，放入 T75 的培養瓶，加入 PBS 300 μl 為對照組，實驗組加入純化的 PCF 250μl 或 PCF 250μl 處理 CB7-C2 單株抗體 50μl，共同培養於 37°C，5% CO₂ 的培養箱 48 小時，取出細胞離心後，計算細胞數目及存活率。以 40 ml 1x PBS-RNase free-water 清洗，1300 rpm 離心 10 分鐘，將上清液倒除，沉澱物加入 1ml TRIzol (Gibco-BRL, NY, USA.)，移入 1ml 微離心瓶，利用 1ml 針筒，25G 針頭來回出取約 10 次，續加入 200 μl chloroform，充分混合後，於室溫下靜置 10 分鐘，4°C、12000 rpm 離心 15 分鐘，小心吸出上清液，加入 0.5ml isopropanol，充分混合後，於室溫靜置 10 分鐘，4°C、12000rpm 離心 10 分鐘，倒出上清液，沉澱部分加入 1 ml cold ethanol-RNase free water，於 4°C 7000 rpm 離心 5 分鐘，倒去上清液，沉澱物於冰中乾燥 20 分鐘。續加入 20 μl RNase free water (Gibco-BRL, NY, USA.)，以 Gene Quant II (Pharmacia/LKB, Uppsals, Sweden) 測 OD 值定 RNA 量。取 2 μg RNA 混合 RNase free water 至 10μl 續合成單股 cDNA。加入 Oligo (dT)₁₅ primer 0.5 μl 及 2.5 μl RNase free water 混合液，70°C 加熱 10 分鐘，再加入 4 dNTP 1μl (10mM，RT buffre 4 μl，DDT 1 μl，M-MLV (RNase Hminus) 1 μl，RNasin 0.5 μl，混合後於 37°C 作用 60 分鐘，續加入 20 μl RNase free water，儲存於 -20°C。

(二) PCR

取出製備的 cDNA ,加入二次蒸餾 H₂O 27 μ l PCR buffer 5 μ l MgCl₂ 2 μ l(2mM) 、4dNTP 0.5 μ l ,Taq polymerase 0.5 μ l(500 unit/ μ l , Gibco-BRL , NY , USA.) 、Primer 10 μ l (exon2 2.5 μ M ,exon10 2.5 μ M) 、template 5 μ l ,混合均勻。跑 PCR 的程式為：94°C30 秒(第 1 cycle) , 94°C30 秒 , 54°C30 秒 , 72°C1 分鐘 , 共 30 cycle , 72°C1 分鐘 , 以 1.5% agarose gel 電泳觀察並照相分析。

5'Primer exon2 : CCTGAGGGCAAAGAGGAAGC

3'Primer exon10 : GGCACGATTCTCAGCATAGG

結 果

一、單株抗體對 PCF 抑制 MOPC-315 胞殺作用的中和效應

將 CA5-1.23 、CB2-2.18 、CB7-1.1 、EA10-1.26 、EE6-2.2 、FF11-2.26 六種融合瘤細胞株擴大培養 ,打入老鼠腹腔中 , 10 天後抽出腹水 , 再以 protein A column 純化出 IgG 部分。實驗時將純化之單株抗體與 PCF 混合之後 , 加入 MOPC-315 細胞 , 並培養 72 小時 , 培養終止時經由 MTT 分析法測得各融合瘤分泌抗體對 PCF 活性中和的效果(表一)。結果顯示六種融合瘤細胞株皆可中和 PCF 對 MOPC-315 細胞的胞殺效應 , 其中以 CB2-2.18 細胞株所製備之抗體中和效應最差 , 中和後仍可使 PCF 對 MOPC-315 細胞胞殺作用達 33.68(65%) ; 而以 CB7-1.1 中和胞殺作用效果最佳 , 中和後僅餘 17.26(33%)。

二、單株抗體對 P388D1 與 MOPC-315 共同培養對胞殺作用的中和效應

先將 P388D1 細胞培養 24 小時後 , 長滿培養盤底層 , 使用 actinomycin D 抑制 P388D1 生長 , 24 小時後 , 再加入 MOPC-315 細胞及五種融合瘤製備的抗體(分別為 CA5-1.23 、CB2-2.18 、CB7-1.1 、EA10-1.26 、EE6-2.2) , 結果顯示單株抗體亦可中和 P388D1 對 MOPC-315 的胞殺效應(表二)。對照組 P388D1 抑制 MOPC-315 高達 95.31% , 當加入單株抗體後即可中和 P388D1 的胞殺效應 , 以 CB7-1.1 中和效果最佳 , 當 CB7-1.1 混合培養後 , P388D1 抑制能力降為 63.16% , CB2-2.18 中和效果較差 , CB2-2.18 混合培養後 , P388D1 對 MOPC-315 的胞殺效應仍高達 86.4%。可見 P388D1 對 MOPC-315 的胞殺作用 , 還涉及 PCF 以外的機制。

三、PCF 對 MOPC-315 自狀的濃度效應

將不同濃度之抑制素 PCF(0-20 μ g/ml)與 MOPC-315 細胞共同培養 48 小時後 , 收取細胞分別用 Trypan blue Assay 和 MTT Assay 測得 PCF 對 MOPC-315 的胞殺效

應，並利用 Burton's Assay 測得 DNA 片段的量(表三)。由數值顯示，用 Trypan blue Assay 和 MTT Assay 測得 PCF 對 MOPC-315 的胞殺效應，隨 PCF 濃度增加而逐漸增加。由 Burton's Assay 測得 DNA 片段的量，隨 PCF 加入的濃度而逐漸增加，即加入 PCF 量愈多 造成 MOPC-315 細胞 DNA 片段量愈多；抽取所實驗之 DNA 以 1.5% agarose gel 觀察 DNA 片段，結果顯示 PCF 量愈多，造成 MOPC-315 細胞 DNA 片段的現象愈明顯(圖一)。

四、PCF 對 MOPC-315 漿細胞自狀的時間效應

將 MOPC-315 細胞(1×10^6 cell，存活率 85%以上)與抑制素 PCF 120 μ g/ml 混合培養，分別於 24、48 小時收集細胞懸浮液，抽取細胞 DNA 以 1.5% agarose gel 觀察 DNA 片段形成的情形(圖二)。結果發現 PCF 與 MOPC-315 細胞作用 24 小時，無 DNA 片段產生，48 小時後實驗組才有 DNA 片段呈現，顯示 PCF 造成 MOPC315 細胞 DNA 斷裂，是發生於 24 小時以及 48 小時之間。

五、PCF 誘發 ICE 基因的表現

將 MOPC-315 細胞(1×10^6 cell，存活率 85%以上)，分別處理 PCF(120.0 μ g/ml)或 PCF(120.0 μ g/ml)加對抗 PCF 的抗體(由 CB7.C2；CB7-1.1 的 subclone)，共同培養 48 小時後，以 RT-PCR 觀察 ICE 基因的表現情形(圖三)。結果顯示對照組 MOPC-315 以及經由 PCF 120 μ g/ml 處理的細胞，由 RT-PCR 技術分析，皆有 ICE 基因的表現。但是加入 CB7-C2 單株抗體後，ICE 基因表現即受到明顯抑制，證實 CB7-C2 抗 PCF 單株抗體可以中和 PCF 誘導 ICE 的作用，且具有抑制 ICE 基因表現的功能。

六、不同濃度 PCF 誘發 ICE 基因的表現

將 MOPC-315 細胞(1×10^6 cell，存活率 85%以上)，分別處理 250、500、1000 μ g/ml 之 PCF 以及 PCF 加 CB7.C2 抗 PCF 抗體 50 μ l，共同培養 48 小時後，以 RT-PCR 觀察 ICE 基因的表現情形(圖四)。結果顯示對照組 MOPC-315 仍有 ICE 基因表現，而經由 PCF 不同濃度處理的細胞，隨 PCF 濃度的增加，其 ICE 基因表現有增加的趨勢。在加入 CB7-C2 單株抗體中和 PCF 後，處理 PCF250、500 μ g/ml 的二組，ICE 基因表現即受到明顯抑制，PCF 提高至 1000 μ g/ml 時，ICE 基因又顯現出，由此結果可見 CB7-C2 單株抗體的作用的確是中和 PCF 的作用，抑制 ICE 的基因表現，但當濃度太高時，CB7-C2 單株抗體中和效應已達飽和狀態，無法完全抑制 PCF，故仍能測得 ICE mRNA 的轉錄。

根據本實驗室前人的研究，P388D1 巨噬細胞經脂多醣體活化後，可以分泌抑制漿細胞瘤細胞株 MOPC-315 生長的因子，進行胞殺作用。實驗室亦致力於 P388D1 巨噬細胞株的擴大培養，並利用離子交換色層分析管柱純化出 60KD 的漿細胞瘤抑制素 PCF。本實驗則延續追蹤 PCF 對 MOPC-315 造成胞殺作用的機轉。

由本實驗可以得到 CA5-1.23、CB2-2.18、CB7-1.1、EA10-1.26、EE6-2.2、FF11-2.26 六種融合瘤細胞株所分泌的抗體，與 PCF 經 72 小時共同細胞培養後，皆可以中和 PCF 對 MOPC-315 的胞殺效應(表一)，而 P388D1 與 MOPC-315 混合培養時，單株抗體的中和效果不如純化的 PCF 高，可能原因分析為單株抗體對於細胞與細胞接觸所導致的胞殺效應的中和效果較差，也可能是單株抗體所採用的劑量不足以完全中和 P388D1 的胞殺作用，另外由實驗中發現 P388D1 經 actinomycin D 處理 24 小時後，仍然可以呈現 PCF 的胞殺效應代表其 m-RNA 的半生期很長，符合細胞激素具長半生期的特性(Akahane et al.,1994)。

經由硫酸銨沉澱初步純化的 PCF 對 MOPC-315 具有誘發其自戕作用的效應，PCF 對 MOPC-315 細胞的胞殺作用，隨著 PCF 濃度的增加而增加，而 DNA 片段的量及經 1.5% agarose gel 電泳顯現 DNA 斷裂的情形也更明顯，證實 PCF 對 MOPC-315 之胞殺作用，是利用細胞自戕的方式進行。與學者們提出腫瘤細胞所驅動的免疫阻遏因子在活體外可抑制淋巴細胞的增殖；且由 esophageal squamous carcinoma 所驅動產生的 ISF(Immune suppressive factor)能經由細胞自戕，抑制淋巴細胞的增生(O'Mahony et al., 1993)的機制相似。

大部分的腫瘤細胞具有可執行細胞自戕的基因，巨噬細胞所分泌之 TNF 可誘導纖維母細胞 L929 與巨噬細胞 BAM3 細胞株中 fas/apo 基因的表現，進而誘發腫瘤細胞自戕(Rie et al., 1992)，故 MOPC-315 也可能有 fas/apo-1 的表現；此外學者提出的數種細胞自戕因子引發細胞自戕的時間皆很短，如：PGE2 為 1-5 小時、Ca²⁺ ionophore A23187 為 0-3 小時、低劑量放射線照射為 1.5-6 小時(Sellins, K. and Cohen, J.J. 1987)，而本實驗發現之 PCF 對 MOPC-315 自戕為細胞培養 48 小時後才有清楚的 DNA 片段(圖二)，根據自戕發生的時間，顯示 PCF 造成 MOPC-315 產生自戕的機轉與上述各因子的途徑相異，故本實驗初步探討 PCF 是否經由 Fas 的胞內途徑誘發細胞自戕。

Anderson, P. 1997 年提出 Fas 誘發細胞自戕的流程，他認為正常細胞 IL-1 β 轉換酵素(IL-1 β converting enzyme: ICE)可引發胞內酵素活化，導致細胞自戕。由圖三結果顯示，對照組 MOPC-315 及加入 PCF 處理的細胞，經由 RT-PCR 技術分析，皆有 ICE 基因的表

現。但加入 CB7-C2 抗 PCF 之單株抗體則 ICE 基因表現顯著降低，證實 CB7-C2 純化之單株抗體可以有要中和 PCF 對 MOPC-315 的胞殺作用，抑制 ICE 基因表現。由圖四的結果進一步證實 ICE 的表現與 PCF 有關，在 PCF 濃度 250、500 $\mu\text{g/ml}$ ，加入 CB7-C2 抗體後未見 ICE 基因，但當 PCF 濃度上升為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，可發現 ICE 基因的表現。由實驗可以證實 CB7-C2 純化的單株抗體確實是中和 PCF 對 MOPC-315 的胞殺效應，且是抑制 PCF 造成 ICE 基因的轉錄。當 PCF 濃度增加為 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時，單株抗體的中和效應達飽和狀態，無法完全中和所有的 PCF，導致剩餘的 PCF 造成 ICE 基因的轉錄。

目前推論，MOPC-315 細胞本身即會產生細胞自戕現象，因為在培養過程中發現 MOPC-315 對培養環境十分敏感，細胞濃度稍高、血清濃度不宜...細胞即呈現死亡。可能 MOPC-315 細胞本身在遇不良環境會自行誘發 ICE 基因轉錄，自行產生細胞自戕現象，而加入 PCF 後更加强 ICE 基因的表現，待加入單株抗體作用後，不但 PCF 被中和，這種造成 MOPC-315 自發性自戕現象的因子，也可被抗 PCF 的單株抗體中和，可見此因子應與 PCF 的性質相似或相同。欲進一步證明此因子，可將 MOPC-315 單獨培養，收取細胞懸浮液培養進行純化，再經由西方點墨法(Western-blot)分析，觀察收取的懸浮液中是否有與 PCF 相同 65KD 分子量的蛋白出現，若有此蛋白產生，即可推論此因子與 PCF 相似或相同。有關造成 MOPC-315 的腫瘤細胞自戕現象的機轉，可能很複雜且有趣，應可為注後提供許多研究的課題。

REFERENCE

- Adams, D. O.. 1980. Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors. *J. Immunol.* 124: 286.
- Akahane ,K., K.Someya, Y.Tsutomi, T.Akimoto, and A.Tohgo. 1994 Antitumor synthetic lipid a analoge DT-5461 a upergulates cytokine expression in a murine macrophage cell line throught LPS pathway. *Cell Immunol.* 155:42.
- Anderson.P.1997. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol Molecular Biol Rev.*61:33-46.
- Aono,K.,K.Isobe,I.Nakashima,S.Kondo,M.Miyachi,and Y.Nimura.1994. Kupffer cells cytotoxicity against hepatoma cells is related to nitric oxide. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*201:1175
- Ben-Efraim,S., and I.L.Bonta. 1994. Modulation of antitumour activity of macrophages by regulation of eicosanoids and cytokine production. *Int.J. Immunopharmac.*16:397
- Bernasconi,S., G.peri, M.Sironi, and A.Mantovani. 1991. Involement of leukocyte ($\beta 2$)integrins(CD₁₈/CD₁₁)in human monocyte tumoricidal activity. *Int. J. Cancer.* 49:267
- Boise, L. H., G.G. Marible,C.E. Postema, L. Ding, T. Lindsten,L.A. Turka, X. Mao,G.Nunez, and C.B. Thompson. 1993. bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominate regulator of apoptic cell death. *Cell.* 74:597.
- Bortner, C. D. , N.B.E Oldenburg and J. A. Cidlowski. 1995. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trend. Cell Biol.* 5: 21-26.
- Brunda,M.J., and M.K.Gatejy. 1994. Antitumor activity of interlukin-12. *Clin. Immunol.Immunopathol.*71:253
- Bucana, C., L. C. Hoyer, B. Hobbs, S. Breesman, M. McDaniel, And M. G. Hanna, Jr. 1976. Morphological evidence for the translocation of lysosomal organelles from cytotoxic macrophages into the cytoplasm of tumortarget cells. *Cancer Res.* 36:4444
- Burton, K. 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimeter estimated of deoxyribonuclic acid. *Biochem. J.*

62 :315.

- Chen, L., Y. Mory, A. Zilberstein and M. Revel. 1988. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon- β 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 8037.
- Chu, C.Y., T.H. Liu., J. Tseng. 1998 Induction of apoptosis in plasmacytoma cells by a cytotoxic factor secreted by P388D1 macrophage-like cell line. Int. J. Immunotherapy. 14.2:69
- Chung, T. and Y. B. Kim. 1988. Two distinct cytolytic mechanisms of macrophages and monocytes activated by phorbol myristate acetate. J. Leuk. Biol. 44: 329.
- Cleveland, R.P., M.S. Meltzer, and B. Zbra. 1974. Tumor cytotoxicity in vitro by macrophages from mice infected with *Mycobacterium bovis* strain BCG. J. National Cancer institute. 52(6):1887.
- Cohen, J.J. 1993. Apoptosis. Immunology today. 14:126
- Currie, G. A.. 1978. Activated macrophages kill tumor cells by releasing arginase. Nature. 273: 758.
- Cohen, J. J. 1991. Program cell death in the immune system. Adv. Immunol. 50: 55.
- Even, G. I., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C. M. Waters, L.Z. Peen, and D.C. Hancock. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell. 69:119.
- Flider, I.J. 1985. Macrophages and metastasis—a biological approach to cancer therapy: presidential address. Cancer research. 45:4714.
- Galfré, G. and C. Milstein. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: Strategies and procedures. Meth. Enzym. 73: 3.
- Higuchi, M., N. Higashi, H. Taki and T. Osawa. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages: Tumor necrosis factor and L-Arginine-Dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144: 1425.
- Kerr, J.F., A. Wyllie, and A. Currie 1972. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26:239
- Koren, H. S., B. S. Handwerger and J. R. Wunderlich. 1975. Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. J. Immunol. 114: 894

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227: 680-685.
- Lanotte, M., J. B. Rivere, S. Hermonuet, G. Houge, O.K. vintermyr, B.T.Giertsen, and S.O.Doskeland, 1991. Programmed cell death is induced rapidly and with positive cooperativity by activation of cyclic adenosine monophosphatekinase I in a myeloid leukemia cell line. *J.cell.physiol.* 146:73
- Lovett, D., B. Kozan, M. Hadam, K. Resch and D. Gemsa. 1986. Macrophage cytotoxicity: Interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J. Immunol.* 136: 340.
- MacConkey .D . J., Sorrenius, and M. Tondal. 1990. Cellular signalling in programmed cell death. *Immunology today.* 11: 120
- Martin,J-H.J., and S.W.Edwards. 1993. Changes in mechanisms of Monocyte / macrophage-mediated cytotoxicity during culture. *J Immunol.* 150:3478
- Mosmann, T.. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Meth.* 65: 55.
- Nathan,C.F.1987. Secretory products of macrophages. *Clin.Invest.*79:319
- Oda,S., M.sato, S.Toyoshima, and T.Qsawa. 1989. Binding of activated macrophages to tumor cells through a macrophage lectin and its role in macrophage tumoricidal activity. *J. Biochem.* 105:1040
- O'Mahony, A.M., T.G.Cotter. and J.K.Collin . 1993. An immune suppressive factor derived from esophageal squamous carcinoma induces apoptosis in normal and transformed cells of lymphoid lineage. *J. Immunol.* 151:4847.
- Rie. W.F., C.I.Brannan, N.S.Yonehara, N.G. Copeland, N.A.Jenkin, and S.Nagata. 1992. The cDNA structure,expression, and chromosomal assignment of the mouse fas antigen. *J.Immunol.* 148:1274.
- Rubbo, H.,A. Denciola, and R. Radi. 1994 Peroxynitrite inactivates thiolcontaining enzyme of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem.Biophys.*308:96
- Santoro, M.G., G.W. Philpott, and B.M.Jaffe.1976. Inhibition of tumor growth in vivo and iv vitro by prostaglandine E. *Nature* .263:777
- Shi, Y.,J.M. Glynn, L.J. Guibert, T.G. Cotter, R.P. Bissonnette, and G.R. Green. 1992, Role for c-cymc in activation-induced apoptosis cell death in T cell

- hybridomas. *Science*. 257:212
- Shinagawa, T., K. Yoshioka, S. Kakumu, T. Wakita, T. Ishika, Y. Itoh, and M. Takayanagi. 1991. Apoptosis in cultured rat hepatocytes : the effects of tumor necrosis factor α and interferon γ . *J. Pathol.* 165:247.
- Stuehr, D. J. and C. F. Nathan. 1989. Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169: 1543.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 75:1169.
- Tseng, J. and H-C. Ferng. 1993. Inhibitory effect of polysaccharide stimulated P388D1 macrophage-like cells on plasmacytoma cells. *Immunol. Invest.* 22: 283.
- Wang, Y., Lszekely, G. Klein, and K.G. Willman. 1993. Wild-type p53-triggered apoptosis is inhibited by bcl-2 in v-myc-induced T-cell lymphoma line. *Oncogene*. 8:3427
- Weliberstein, A., R. ruggieri, J.H. Korn, and M. Revel. 1986. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-bata-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO*. 5(10):2529
- Williams, G.T., and C.A. smith. 1993. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*. 74:777.
- Wong, A. M., A. A. Creasey, M. B. Ladner, L. S. Lin, J. Strickler, J. N. V. Arsdell and D. F. Mark. 1985. Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor. *Science*. 228: 149.

表 1 單株抗體對 PCF 抑制 MOPC-315 胞殺作用中和效應

Mabs	Partially purified PCF	% cytotoxicity to MOPC-315 cells ^a	Relative cytotoxicity ^b (%)
-	+	51.68	100
CA5-1.23 (γ1, λ)	+	21.39	41.4
CB2-2.18 (μ, κ)	+	33.68	65.2
CB7-1.1 (γ1, λ)	+	17.26	33.4
EA10-1.26 (μ, κ)	+	22.75	44.0
EE6-2.2 (γ1, κ)	+	28.76	55.6
FF11-2.26 (γ1, κ)	+	18.18	35.2

$$a : \% \text{ cytotoxicity} = \left(1 - \frac{\text{樣品組 O.D}}{\text{控制組 O.D}} \right) \times 100\%$$

$$b : \frac{\text{控制組-PCF+mAb 組 O.D 值}}{\text{控制組-PCF 組之 O.D 值}} \times 100\%$$

表 2 單株抗體阻斷 P388D1 細胞與 MOPC-315 共同培養的胞殺作用

Monoclonal Antibody	Average OD ₅₉₀ of MTT Assay ^a	Relative cytotoxicity ^b (%)
CA5-1.23	0.255±0.054	70.66
CB7-1.1	0.321±0.013	63.16
CB7-1.19	0.236±0.010	72.85
CB2-2.18	0.118±0.027	86.40
EE6-2.2	0.128±0.017	85.29
Positive control	0.040±0.005	95.37
Negative control	0.871±0.091	0.00

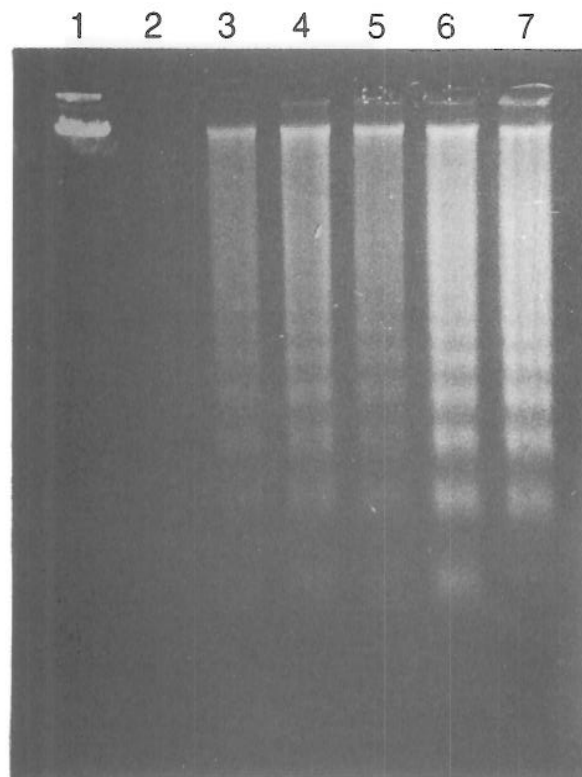
a : n=3 Mean± S.D

b :
$$\frac{\text{Positive control - Negative control + mAb 組 O.D 值}}{\text{Positive control - Negative control 之 O.D 值}} \times 100\%$$

表 3 PCF 誘發 MOPC-315 細胞胞殺作用產生 DNA 片段的濃度效應

PCF (μg/ml)	viable cells (10 ⁵ /ml)	MTT assay (O.D.)	DNA fragmentationa (%) ^A
0	12.2±0.4	0.994±0.019	16.2±2.2
2.5	7.2±1.0	1.033±0.040	23.6±6.6
5.0	5.9±0.2	0.907±0.017	24.0±4.4
10.0	2.1±0.4	0.647±0.016	26.5±4.3
20.0	1.4±0.1	0.343±0.012	33.0±10.9
40.0	0.4±0.3	0.167±0.012	37.3±5.4

^A: DNA 片段測定採 Burton's assay



圖一、PCF 對 MOPC-315 漿細胞自體的濃度效應

Lane 1 : Lambda DNA(unfragment)

Lane 2 : Negative control(Lysis bufer alone)

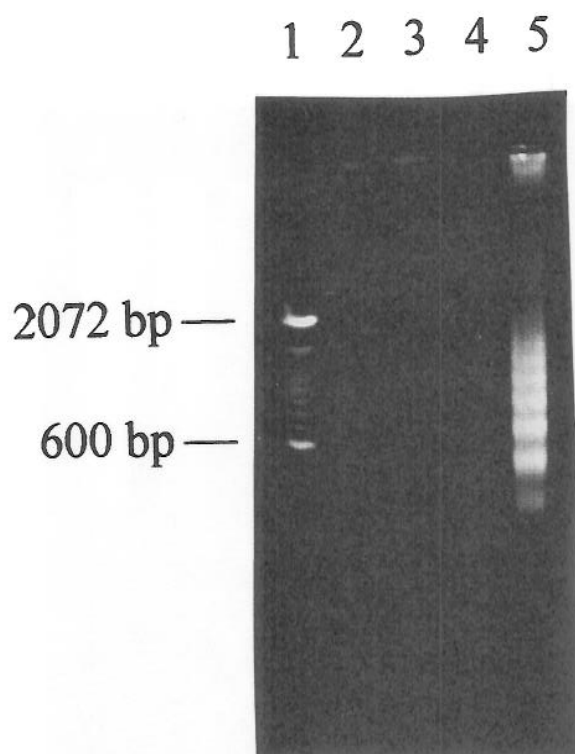
Lane 3 : MOPC 315 without treatment

Lane 4: treated with 2.5 $\mu\text{g/ml}$ PCF

Lane 5: treated with 5.0 $\mu\text{g/ml}$ of PCF

Lane 6: treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of PCF

Lane 7: treated with 20 $\mu\text{g/ml}$ of PCF.



圖二、PCF 對 MOPC-315 漿細胞自狀的時間效應

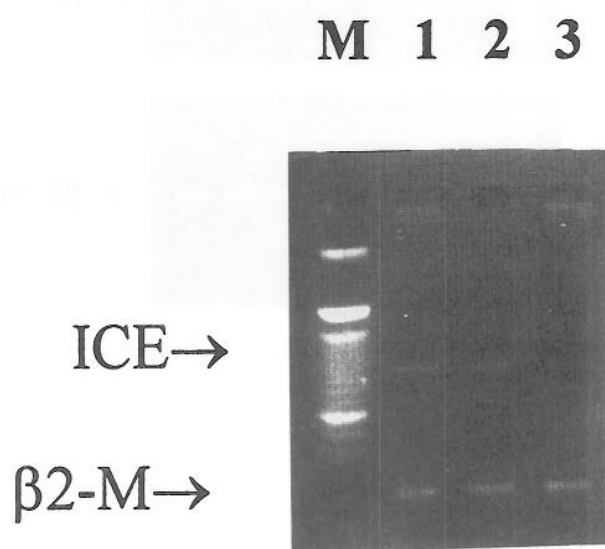
Lane 1: DNA marker (100 bp ladder, Gibco-BRL, CA)

Lane 2 : 24 h without treatment

Lane 3 : 24 h after PCF treatment

Lane 4 : 48 h without treatment

Lane 5 : 48 h after PCF treatment.



圖三、PCF 誘發 ICE 基因的表現

RT-PCR analysis of ICE mRNA level in PCF-treated cells.

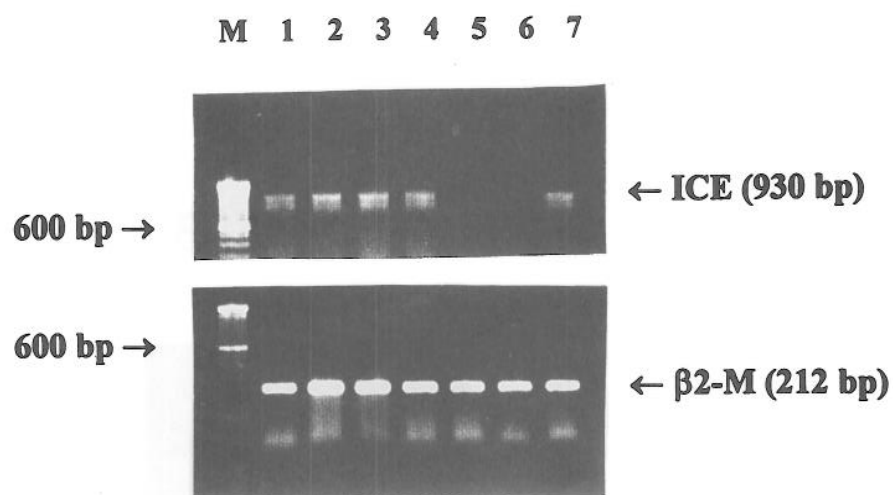
Lane M : DNA marker (100 bp ladder, Gibco-BRL, CA)

Lane 1 : Cells (1×10^6) no treatment

Lane 2 : 120 $\mu\text{g/ml}$ of partially purified PCF

Lane 3 : PCF in the presence of CB 7.C2

培養 48 小時後經由 RT-PCR 測 ICE m-RNA 的轉錄



圖四、不同濃度 PCF 誘發 ICE 基因的表現

RT-PCR analysis of ICE mRNA level in PCF-treated cells.

Lane M : DNA marker (100 bp ladder, Gibco-BRL, CA)

Lane 1 : Cells (1×10^6) no treatment

Lane 2 : 250 $\mu\text{g/ml}$ of partially purified PCF

Lane 3 : 500 $\mu\text{g/ml}$ of partially purified PCF

Lane 4 : 1000 $\mu\text{g/ml}$ of partially purified PCF

Lane 5 : 250 $\mu\text{g/ml}$ PCF in the presence of CB7.C2

Lane 6 : 500 $\mu\text{g/ml}$ PCF in the presence of CB 7.C2

Lane 7 : 1000 $\mu\text{g/ml}$ PCF in the presence of CB7.C2

培養 48 小時後經由 RT-PCR 測 ICE m-RNA 的轉錄

誌 謝

學校為鼓勵教師能發揮研究之精神，特提出研修時間及方案，讓教師能於不影響教學工作的情況下，致力於教學領域相關之研究，激發不斷思考及學習的精神，對於學術領域的擴展及思考助益良多。短短的八個月時間，從研究計劃的草擬、實驗步驟的設計及嘗試、實驗失敗的討論、實驗方法的請教、實驗器材及藥品經費來源、資料收集...舉凡種種的問題，對於需從事實驗室研究的教學者來說，真是心有餘力不足、困難重重，最大需克服的為時間的緊迫，實驗需時間嘗試失敗。八個月時間中，幸賴吾師 師大生物研究所 曾哲明教授，提供實驗器材及經費，並於研究方法及結果不斷啓迪引導，實驗失敗、挫折時共同討論及鼓勵，如和暖的春風，僅此獻上最深的謝意。

實驗期間，感謝朱敬儀學姊於百忙中提供寶貴意見，並提供所純化之單株抗體及漿細胞瘤抑制素，使實驗得以順利進行。禕珊、幸怡學妹更提供 PCR 的寶貴經驗及分享實驗失敗的掙扎及成功的喜悅。

短短八個月時間，得自於許多人的協助，也用心期望有所成果，但自知因時間上的受限及實驗需失敗的嚐試時間，結果仍有許多疏漏及不完善，僅此提出所研究...的結果供評審，得自各先進前賢之寶貴意見，更有助於往後的實驗設計。

Plasmacytoma Cytotoxic Factor Induce Apoptosis in Tumor Cell

Chiung-Chien Liu

ABSTRACT

Tumoricidal activity is one of the major effector functions of activated macrophages. Our previous study demonstrated that the culture supernatant of P388D1 murine macrophage-like cells showed a cytotoxic effect on plasmacytoma MOPC-315, MPC-11 and myeloma FO but no effect on J558 cells. In this study, the plasmacytoma cytotoxic factor (PCF) in P388D1 culture supernatant was partially purified by a DEAE-Sephacel ionic-exchanger chromatography and the partially purified PCF was used as an immunogen to prepare a panel of monoclonal antibodies against PCF. All monoclonal antibodies partially blocked the P388D1-mediated tumoricidal activity. A large scale purification was performed by ammonium sulfate fractionation (40-60% saturation), followed by an immunoaffinity chromatography using one of the anti-PCF monoclonal antibodies CB7-C2 (γ -1/ λ , titer 6.5×10^4). The affinity-purified PCF had IC_{50} at $3.11 \mu\text{g/ml}$ for 2×10^4 MOPC 315 cells and showed a major band with an estimated molecular weight of 62 KDa on SDS-PAGE gel. CB7 did recognize the 62 KDa protein but CB7.C2 recognized a single band with an estimated Mr of 130 KDa on Western blotting, suggesting that the native form of PCF could be a dimer. The NH_2 -terminal sequence of PCF is currently analyzed. The first five amino acid, Ala-Ile-Leu-Leu-Ala, is relatively hydrophobic and is irrelevant to the sequence of well-documented murine macrophage-derived proteins. Our preliminary data suggested that the PCF might kill the plasmacytoma cells by PCF-induced apoptosis. In this study, the tumor cells were treated with various dose of PCF and the extent of DNA fragmentation was monitored by both agarose gel electrophoresis and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL) method. Apoptosis was further confirmed by detection of phosphatidylserine redistribution by annexin V staining technique. All analytical data suggested that PCF induced apoptosis in MOPC 315 plasmacytoma cells with a dose-dependent and time-dependent manner. The purified PCF-induced apoptosis could be neutralized by anti-PCF antibody CB7. The extent of IL-1 β converting enzyme (ICE) gene expression was estimated by RT-PCR. Result indicated that PCF induced a significant increase in ICE gene expression and this augmented effect could be significantly reduced by anti-PCF antibody CB7, suggesting that PCF might induce an apoptosis in MOPC 315 cells through ICE pathway.

Key words: Plasmacytoma Cytotoxic Factor, Apoptosis, ICE