

单克隆抗体 12H6 的靶抗原在肺癌细胞中的表达及功能研究

徐洁¹, 孙立新², 遇琰², 冉宇靓², 孙力超², 杨治华¹

(1.广西医科大学附属肿瘤医院, 广西南宁 530021;

2.中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

摘要: [目的] 分析抗肺癌单抗 12H6 的靶抗原在肺癌细胞系和肺癌组织中的表达, 研究单抗 12H6 体内外生物学功能。[方法] 细胞免疫荧光、流式细胞荧光法检测单抗 12H6 靶抗原在 3 种肺癌细胞系中的表达及其定位, 免疫组化法检测其在人肺癌组织中表达及特异性; Transwell 法和 CCK-8 法分别检测 12H6 体外对肺癌细胞系侵袭和增殖功能的影响。共接种模型裸鼠体内治疗实验研究 12H6 对移植瘤生长的抑制作用。[结果] 单抗 12H6 的靶抗原在人肺腺癌细胞(A549、GLC-82)、人肺鳞癌细胞(GLC-P)的胞内及胞膜均有表达, 在 3 种细胞系胞膜的表达比例分别为 31.2%、15.4%和 16.7%。单抗 12H6 在人肺癌组织中的表达比例为 80.6%, 较配对癌旁组织显著上调。单抗 12H6 在体外能明显抑制肺癌细胞侵袭和增殖; 体内能明显抑制移植瘤生长, 抑制率为 40%。[结论] 单抗 12H6 具有优良的体内外抑瘤功能, 可能为肺癌靶向治疗提供潜在的靶向治疗药物。

关键词: 肺癌; 功能性单克隆抗体; 靶向治疗

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2013)02-0120-06

Study on Expression and Function of Targeted Antigen of Anti-lung Cancer Monoclonal Antibody 12H6

XU Jie¹, SUN Li-xin², YU Long², et al.

(1. Guangxi Cancer Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Oncology, Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of the targeted antigen of anti-lung cancer monoclonal antibody 12H6 in lung cancer cell lines and lung cancer tissues, and to study the biological function of 12H6 mAb in vivo and in vitro. [Methods] The expression and localization of targeted antigen in 3 lung cancer cell lines were examined by immunofluorescence and flow cytometry. Expression and specificity of 12H6 mAb in lung cancer tissues were examined by immunohistochemistry. Transwell and CCK-8 assay were performed to evaluate the function of 12H6 mAb against invasion and proliferation of lung cancer cell lines in vitro. Treatment experiment of co-inoculation model to nude mouse was performed to evaluate the inhibitory function of 12H6 mAb against the growth of transplantation tumor. [Results] The targeted antigen of 12H6 mAb were expressed in the cytoplasm and cell membrane of human lung adenocarcinoma cell lines(A549, GLC-82) and squamous carcinoma cell lines(GLC-P). The expression rates at cell membrane of the 3 cell lines were 31.2%, 15.4%, 16.7% respectively. The expression of targeted antigen in lung cancer tissues was 80.6%, which was significantly up-regulated compared with paracancerous tissues. The 12H6 mAb obviously inhibited proliferation, invasion of lung cancer cells in vitro and growth of transplantation tumor in vivo with inhibitory rate of 40%. [Conclusions] 12H6 mAb has excellent anti-tumor function in vivo and in vitro, and might be a potential agent in targeted therapy for lung cancer.

Key words: lung cancer; functional monoclonal antibody; targeted therapy

近年来, 肺癌的发病率和死亡率一直居恶性肿

瘤的首位^[1,2], 肺癌的治疗模式也日趋多样化。分子靶向治疗以其较低的不良反应和较高的治疗有效性为肺癌的治疗提供了新的策略, 越来越成为研究热点^[3]。现已有一些靶向治疗药物成功应用于肺癌临床

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家自然科学基金(81172033); 重大新药创制科技重大专项(2011ZX09102-010-02 和 2011ZX09401-030)

通讯作者: 杨治华, E-mail: yang_zhihua_prof@yahoo.com.cn

治疗,如针对表皮生长因子受体 EGFR 的西妥昔单抗^[4]、针对血管内皮细胞生长因子受体 VEGFR 的贝伐单抗^[5]等。但由于肿瘤组织中癌细胞的高度异质性,包括基因表达谱的异质性,加之肺癌病理类型多,目前已有的分子靶向治疗对肺癌的疗效仍然有限,因此,需要寻找更多的新的肺癌靶向治疗剂和分子靶点。本室建立了一种基于功能性单克隆抗体库和功能差异细胞模型的免疫蛋白质组学技术平台,并利用此平台筛选获得了多个抗肺癌的功能性单克隆抗体^[6-9],其中编号为 12H6 的单克隆抗体初步证明对人肺癌细胞系 GLC-P 的增殖有明显的抑制作用^[6]。本研究拟观察单克隆抗体 12H6 所识别的抗原在人肺腺癌、肺鳞癌细胞系中的表达和亚细胞定位,以及对该单抗在患者肺癌组织中表达的特异性进行分析研究,进一步探讨该单抗在体内外对肺癌细胞生物学行为的抑制和阻断作用,从而评价该抗体作为肺癌分子靶向治疗药物的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肺腺癌细胞系 A549、GLC-82、人肺鳞癌细胞系 GLC-P,小鼠骨髓瘤细胞系 SP2/0-AG14(以下简称 SP2/0),杂交瘤细胞 12H6 均为本室保存。细胞培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清为北京元亨金马生物技术公司生产,单抗亚类 ELISA 检测试剂盒为 SouthernBiotech 公司生产,生物素(biotin)、Cy3 标记的羊抗鼠 IgG + IgM(H+L)购自 Jackson 公司,Ultra-Sensitive™ S-P 免疫组织化学试剂盒购自迈新公司,Hitrap IgM 疏水柱购自 Amersham Biosciences 公司。4~6 周龄 BALB/C(nu/nu)裸鼠购自北京维通利华实验动物技术公司[动物合格证号 SCXK(京)2012-0001]。人肺癌组织及癌旁组织均取自中国医学科学院肿瘤医院外科手术切除的样本。

1.2 细胞培养

GLC-82、GLC-P 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养基;A549 细胞用含 10% FBS 的 McCoy'5A 培养基;杂交瘤细胞 12H6 用含有 10% FBS 的 DMEM-H 培养基。以上细胞均培养于 5% CO₂, 37℃ 的二氧化碳孵箱中。

1.3 单克隆抗体 12H6 上清的收集、抗体亚类的测定及抗体纯化

将分泌单克隆抗体的 12H6 杂交瘤细胞扩大培养,待细胞生长至 80% 满时,换无血清培养基培养,5~6d 后收集培养上清。采用 SouthernBiotech 的单抗亚类 ELISA 检测试剂盒检测单抗 12H6 亚类,操作按照试剂盒说明书进行。抗体的纯化采用 Amersham Biosciences 公司提供的 Hitrap IgM 疏水柱,纯化后的抗体经 SDS-PAGE 鉴定其纯度。

1.4 细胞免疫荧光

固定细胞免疫荧光法:提前在 24 孔板内放置好合适的玻片,按 4 万/孔接种肿瘤细胞于孔内玻片上,37℃、5% CO₂ 培养 2d,待细胞长至 70%~80% 满时,用 PBS 洗涤细胞 1 次。4% 多聚甲醛固定细胞 15min,弃固定液,再加入 0.5% Tritonx-100 通透 5min,用 0.1% BSA 的 PBST 洗涤 5min×5 次,每孔加入 200μl 杂交瘤上清,同时设立阳性对照(α-tubulin)和阴性对照(PBS),37℃ 孵育 1h,用含 0.1% BSA 的 PBST 洗涤 5min×5 次,每孔加入 200μl Cy3 标记的羊抗鼠 IgG + IgM (1:300 稀释),37℃ 避光孵育 30min,用 0.1% BSA 的 PBST 洗涤 5min×5 次,PBS 洗涤 5min×2 次,最后用含 50% 甘油的 2μg/ml 的 DAPI 封片。荧光显微镜下观察结果,荧光共聚焦显微镜拍照。

活细胞免疫荧光法:在一抗加入前细胞无需固定和通透处理,一抗孵育洗涤后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15min,弃固定液,再加入 0.5% Tritonx-100 通透 5min,其他步骤同固定细胞荧光。

1.5 流式细胞荧光

消化对数生长期的肿瘤细胞,制备单细胞悬液,分装到 1.5ml EP 管中,1×10⁶/管;离心弃上清,PBS 洗 1 次;加入一抗 300μg/ml(设 PBS 为阴性对照)室温孵育 1h;离心弃上清,PBS 洗 3 次;加入 FITC 标记的二抗,室温避光孵育 30min,离心弃上清,PBS 洗 3 次;将细胞重悬于 500μl 1% 多聚甲醛固定,4℃ 保存;送检前过筛网。

1.6 免疫组化

石蜡包埋的人肺癌及癌旁组织的免疫组化检测采用 S-P 法,杂交瘤上清 12H6 原液(30μg/ml)作为一抗,操作程序按试剂盒说明书进行。染色结果采用积分法计算,即根据每张切片的染色强度和阳性细

胞比例计分。着色强度:不着色为0分,黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分;着色细胞比例:阳性细胞数<10%为0分,10%~40%为1分,40%~70%为2分,≥70%为3分。染色评分=着色强度+着色细胞比例,0~1分评为(-),2分评为(+),3~4分评为(++),5~6分评为(+++)。

1.7 Transwell 细胞侵袭实验

用消化肿瘤细胞制备单细胞悬液,用无血清培养基洗1次,2×无血清培养基重悬,调整细胞密度为 80×10^4 /ml,与抗体上清按体积1:1的比例共孵育1~2h,用无血清培养基稀释 Matrigel(需提前4℃过夜融解)至1mg/ml,在Transwell上层小室加入60μl的Matrigel(冰上操作),37℃包被1h,PBS洗涤2次,Transwell上层小室加入100μl含抗体的细胞悬液,Transwell小室下层加入600μl完全细胞培养液。37℃、5%CO₂条件下继续培养24h;用棉签拭去Transwell上层小室中的细胞,50%甲醇+50%丙酮固定15min,PBS洗3次,DAPI封片,荧光镜显微镜系观察侵袭细胞数并拍照,IPP6.0计数细胞数。实验设立PBS组作为阴性对照组,与加抗体的实验组对比计算抗体对肿瘤细胞侵袭的抑制能力。

1.8 CCK-8 法体外增殖实验

在96孔培养板中接种肺癌细胞 5×10^3 个,12h后加入含有纯化的单克隆抗体12H6的培养基,48h后换含有抗体12H6的新鲜培养液1次,5d后按照CCK-8试剂盒说明书加入CCK-8试剂,测定OD₄₅₀值。实验设立PBS组作为阴性对照组,与加抗体的实验组对比计算抗体对肿瘤细胞增殖的抑制能力。按照以下公式计算抑制率:

抑制率=(对照组 OD₄₅₀-实验组 OD₄₅₀)/对照组 OD₄₅₀×100%

1.9 裸鼠移植瘤抗体靶向治疗实验

利用小鼠接种杂交瘤细胞形成实体瘤后小鼠血液中也持续存在高浓度的相应单克隆抗体的原理,采用肿瘤细胞和产生相应单克隆抗体的杂交瘤细胞同时接种小鼠的双接种模型,模拟单克隆抗体治疗小鼠移植瘤的体内治疗实验^[8]。将BALB/c(nu/nu)裸鼠分为杂交瘤细胞12H6实验组和SP2/0细胞对照组,每组8只裸鼠。接种杂交瘤细胞 5×10^5 /只于左后侧背部皮下,4d后在裸鼠右后侧背部皮下接种肺癌细胞GLC-82 1.5×10^6 /只,观察20d后处死小鼠称

瘤重,按以下公式计算单克隆抗体12H6对肺癌移植瘤的抑制率:

抑制率=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重×100%

1.10 统计学处理

应用SPSS13.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,组间差异采用t检验或秩和检验,检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 单克隆抗体12H6的抗体亚类鉴定和纯化

亚类鉴定结果显示,单克隆抗体12H6为鼠IgM型,轻链为鼠入链。

采用Hitrap IgM疏水柱纯化单抗12H6,用SDS-PAGE电泳进行分析,重链分子量在80KD,轻链分子量在26KD,呈现出典型的鼠IgM抗体特征。CS9301PC蛋白纯度扫描仪扫描结果显示纯度90%。

2.2 单克隆抗体12H6识别靶抗原在肺癌细胞系中的表达

固定细胞荧光显示,单抗12H6识别靶抗原在肺腺癌细胞系(A549、GLC-82)和肺鳞癌细胞系(GLC-P)胞内有表达(Table 1、Figure 1),表达强度均为(+++)。

Table 1 Expression of targeted antigen of 12H6 mAb in 3 lung cancer cell lines

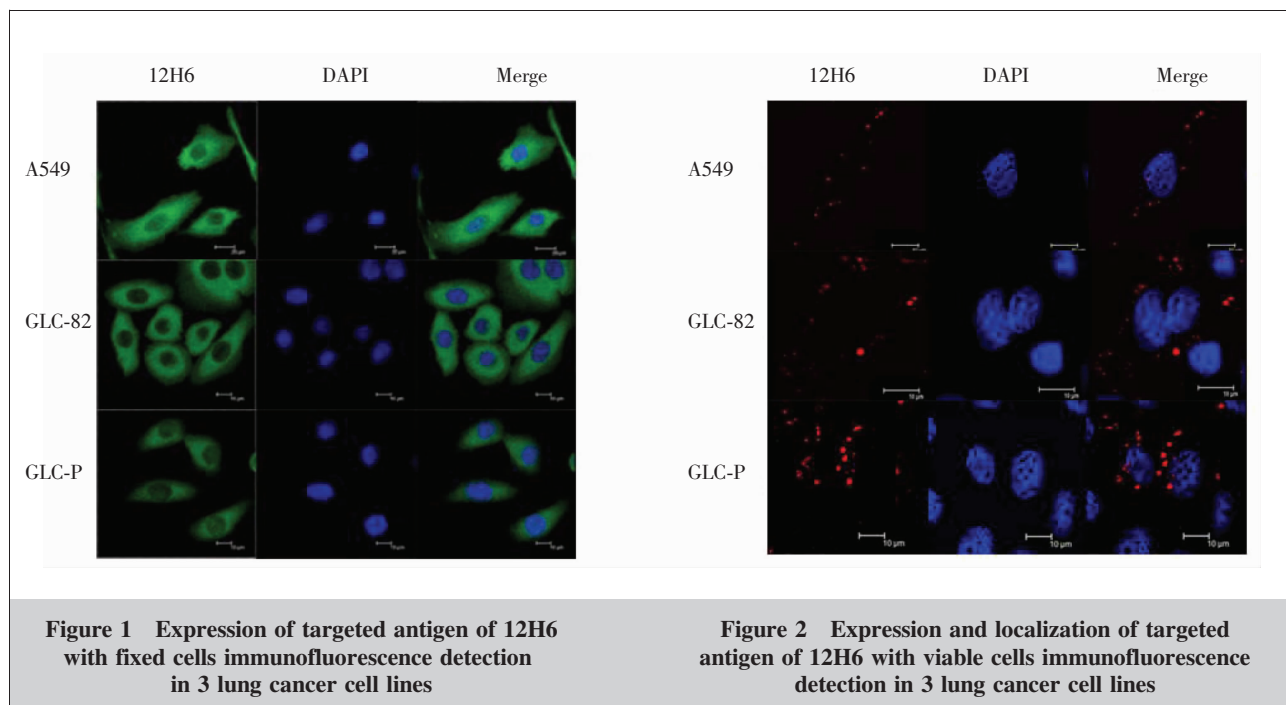
Type	Cell line	Immunofluorescence	
		Fixed cell	Viable cell
Adenocarcinoms	A549	+++	++
	GLC-82	+++	++
Squamous carcimoms	GLC-P	+++	++

活细胞免疫荧光检测结果显示(Table 1、Figure 2),单抗12H6识别的靶抗原在3种肺癌细胞膜表面均有明显表达。

活细胞流式细胞荧光检测结果显示,单抗12H6识别的靶抗原在3种肺癌细胞系A549、GLC-82、GLC-P细胞膜上阳性表达的比例分别为31.2%、15.4%和16.7%。

2.3 单克隆抗体12H6抗原在肺癌组织中表达的研究

采用免疫组化方法检测了98例肺癌患者的癌



组织及其配对的癌旁组织，其中肺腺癌组织 33 例，肺鳞癌组织 47 例。结果表明，单抗 12H6 的靶抗原在癌组织的表达较癌旁组织明显上调 (Table 2) ($P < 0.01$), 但鳞癌和腺癌间无明显差别。

2.4 单克隆抗体 12H6 体外对肺癌细胞系侵袭功能的影响

在肺腺癌细胞系 GLC-82 的 Transwell 侵袭实验中，实验组每视野侵袭的细胞数是 94.75 ± 19.79 ，对照组每视野侵袭细胞数为 154.75 ± 32.78 ，前者明显少于后者 ($P < 0.05$), 表明 12H6 对 GLC-82 细胞系侵

袭有抑制作用 (Figure 3), 其抑制率为 20.21%; 在对肺鳞癌细胞系 GLC-P 的 Transwell 侵袭实验中，实验组每视野侵袭的细胞数是 102.50 ± 29.36 ，对照组每视野侵袭细胞数为 168.75 ± 22.26 ，前者明显少于后者 ($P < 0.05$) (Figure 3), 表明 12H6 对 GLC-P 细胞系侵袭有抑制作用，抑制率为 46%。

2.5 单克隆抗体 12H6 体外对肺癌细胞系增殖功能的影响

CCK-8 法增殖抑制实验结果显示，单抗 12H6 能够显著性抑制人肺腺癌细胞系 GLC-82 的增殖，抑制率为 15.9% (Figure 4A)。而在人肺鳞癌细胞系 GLC-P 中的抑制率为 11.4% (Figure 4B)。前者的增殖抑制作用高于后者。因此，下一步研究选择 GLC-82 细胞用于 12H6 的体内功能研究。

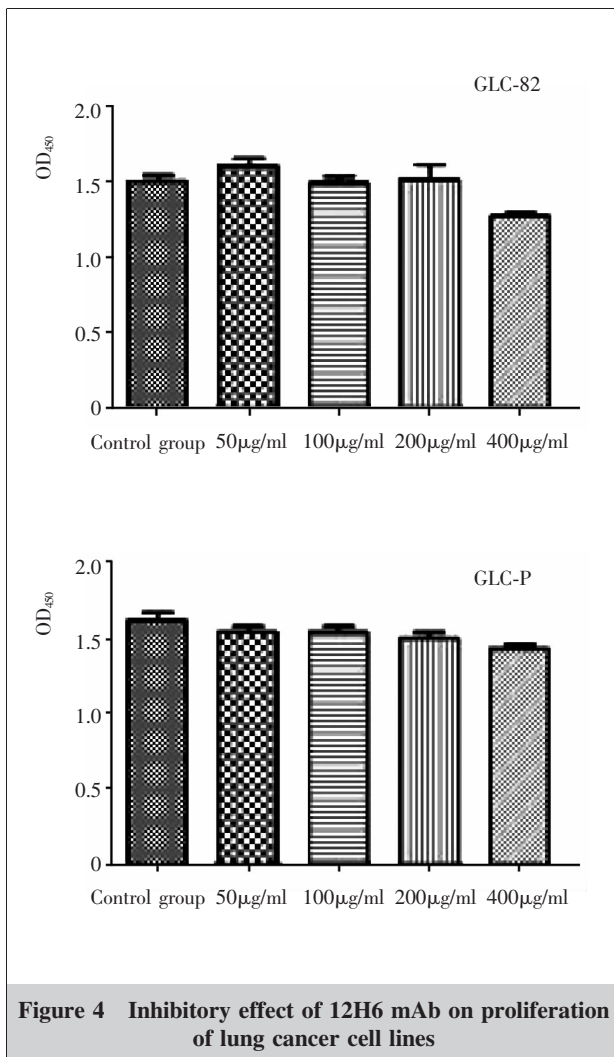
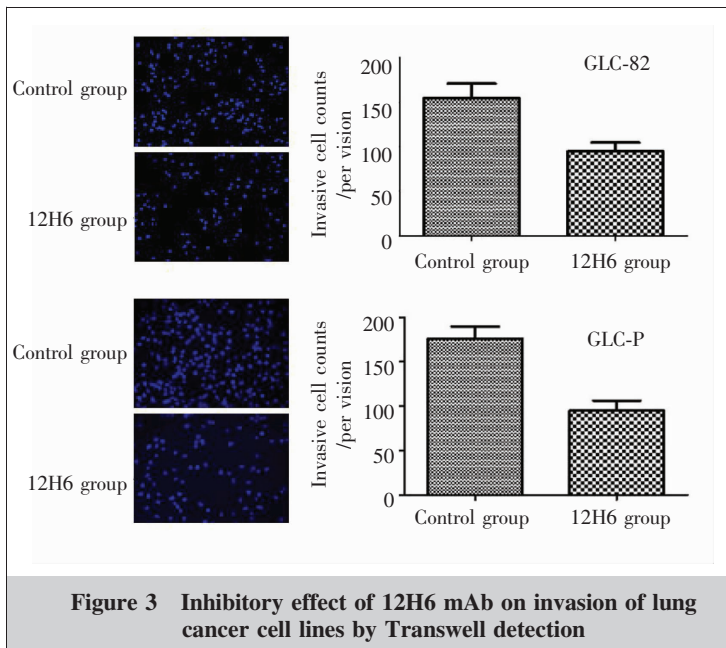
2.6 单克隆抗体 12H6 对裸鼠体内人肺腺癌 GLC-82 移植瘤生长的影响

为进一步探讨单抗 12H6 对裸鼠体内人肺腺癌移植瘤生长的作用，我们采用共接种模型，进行单克隆抗体对裸鼠移植瘤的体内治疗实验。接种 12H6 杂交瘤细胞 20d 后，治疗组平均瘤重为 $0.135 \pm 0.067\text{g}$ ，而对照组平均瘤重为 $0.225 \pm 0.072\text{g}$ ，抑制率达 40% ($P < 0.05$) (Figure 5), 表明单抗 12H6 能

Table 2 Expression of targeted antigen of 12H6 mAb in lung cancer and paracancerous tissues

Type	N	Expression ratio of antigen via 12H6 identification			Positive rate(%)
		-	+~++	+++	
Lung cancer tissues					
Squamous carcinoma	47	6	30	11	87.23 [*]
Adenocarcinoma	33	10	21	2	69.70 [*]
Adenosquamous carcinoma	10	2	6	2	80.00 [*]
Small cell cancer	8	1	5	2	87.50
Total	98	19	62	17	80.61
Paracancerious tissues					
Squamous carcinoms	47	45	2	0	4.26
Adenocarcinoma	33	29	4	0	12.12
Adenosquamous carcinoma	10	9	1	0	10.00
Small cell cancer	8	7	1	0	12.50
Total	98	90	8	0	8.16

*: $P < 0.01$ (cancer vs paracancerous tissue)



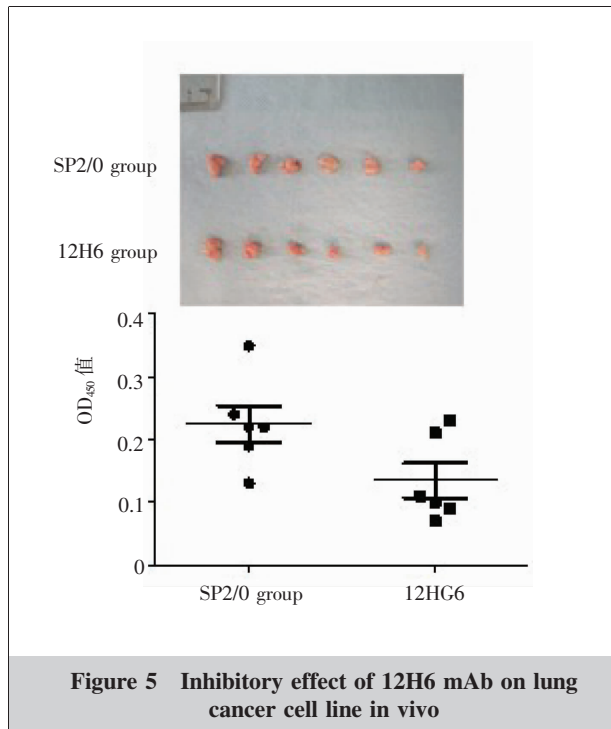
够抑制肺癌细胞的体内生长。

3 讨论

肿瘤的靶向治疗近年来在肿瘤治疗领域发展迅速,为肺癌的治疗提供了新的治疗手段。然而目前已有的分子靶向治疗肺癌的疗效依然有限,需要寻找更多的新的肺癌靶向治疗剂和分子靶点。

本实验室成功建立了一种基于功能性单抗库和功能差异细胞模型的免疫蛋白质组学技术平台,并通过此平台成功筛选出多个体内外抑制肿瘤生物学特性的功能性单抗,并鉴定与肺癌生物学特性相关的功能性基因。

本研究应用固定免疫荧光技术发现单克隆抗体12H6 识别的靶抗原表达于多种人肺癌细胞系的胞内;根据活细胞免疫荧光亚细胞定位的方法证实该单抗识别的靶抗原可以表达于肺癌细胞膜表面;并通过流式细胞荧光法检测了 12H6 的抗原在人肺癌细胞系 A549、GLC-82、GLC-P 胞膜的阳性表达比例,分别为 31.2%、15.4%和16.7%;免疫组化结果显示其识别的抗原在人肺癌组织中表达



比例为 80.6%，相对于配对的癌旁组织显著上调表达。体外功能实验证明了单克隆抗体 12H6 能够显著性抑制肺腺癌细胞 GLC-82 和肺鳞癌细胞 GLC-P 的侵袭和增殖；应用裸鼠共接种模型检测单抗 12H6 体内对 GLC-82 细胞系移植瘤的抑制效果，证明了单抗 12H6 在体内对 GLC-82 细胞系的生长具有较为理想的抑制效果，并且这种体内抑制效应大于体外抑制效应。推测其原因，可能与以下两个因素有关：①肿瘤血管生成：体外实验证明 12H6 有抑制肺癌细胞侵袭的作用。而一般认为抑制侵袭经常通过抑制肿瘤血管生成来实现。在体内抑制实验中，肿瘤细胞可能缺乏足够的血液供应，从而使生长更加受到抑制；②细胞微环境：体内实验和体外实验细胞的微环境不同，体内实验过程中，移植瘤细胞和单克隆抗体存在于较完整的肿瘤微环境中，更有利于单抗 12H6 发挥其生物学特性。

以上结果提示，单克隆抗体 12H6 识别的靶抗原在肺癌的发生和发展中可能具有重要的作用，继续研究该抗原具有潜在的应用价值。为此，我们计划下一步对 12H6 单抗的靶抗原进行亲和纯化和 MALDI-TOF-PMF 质谱技术鉴定，并回证该基因是 12H6 单抗的靶抗原，研究该基因的组织表达谱以及作用机制，从而明确该基因作为肺癌靶向治疗分子靶标的潜力。

总之，本研究检测了抗肺癌功能性单克隆抗体 12H6 的抗原在肺癌细胞系和肺癌组织中的表达，并证实了该单抗体内外抑制肺癌生长的活性，为肺癌的靶向治疗提供了一种新的候选靶向治疗剂和靶分子。

参考文献:

- [1] Esposito L,Conti D,Ailavajhala R,et al. Lung cancer: are we up to the challenge? [J].Curr Genomics,2010,11 (7): 513-518.
- [2] Zhang ZP,Zhou YA,Xu H,et al.Expression of ABCG4 in NSCLC and its correlation with chemoresistance of NSCLC [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2009,16(1):33-35.[张志培,周勇安,徐钊,等. 非小细胞肺癌组织ABCG4 表达与耐药的相关性研究[J].中华肿瘤防治杂志,2009,16(1):33-35.]
- [3] Cagle PT,Chirieac LR. Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy [J]. Arch Pathol Lab Med,2012, 136(5): 504-509.
- [4] Rosell R,Robinet G,Szczesna A,et al. Randomized phase II study of cetuximab plus cisplatin/vinorelbine compared with cisplatin/vinorelbine alone as first-line therapy in EGFR-expressing advanced non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol,2008,19(2):362-369.
- [5] Du HZ,Yang CH,Liu GL,et al.Progress in international development of the targeted therapies for NSCLC [J]. Chinese Journal of New Drugs,2011,20 (16) :1522-1529.[杜海洲,杨春华,刘桂玲,等. 非小细胞肺癌靶向药物的开发研究进展[J]. 中国新药杂志,2011,20(16) :1522-1529.]
- [6] Lu YL,Ran YL,Yu L,et al.Screen for functional monoclonal antibodies and antigens of lung cancer by functional differential cell model [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy,2008,15(6): 501-507.[卢燕来,冉宇靓,遇珑,等. 功能差异细胞模型筛选抗肺癌功能性单克隆抗体及其抗原[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2008,15(6): 501-507.]
- [7] Yang WW,Yu L,Sun LC,et al.Growth of lung cancer can be inhibited by monoclonal antibody recognizing lung cancer membrane protein expressed highly [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology,2010,20(7): 1586-1589.[杨薇薇,遇珑,孙力超,等. 识别肺癌上调表达的膜蛋白单克隆抗体抑制肺癌生长 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20 (7): 1586-1589.]
- [8] Sun LX,Ran YL,Yang WW,et al.Expression and translation of targeted antigen of anti-lung cancer 15A1 monoclonal antibody in lung cancer cells[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy,2011,18(2): 133-138.[孙立新,冉宇靓,杨薇薇,等. 抗肺癌单克隆抗体 15A1 的靶抗原在肺癌细胞中的表达及其转位特征 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2011,18(2): 133-138.]
- [9] Hu H,Ran YL,Chen LZ,et al. Identification of functional antibodies of lung cancer by screening of functional antibody library[J]. Cancer Research on Prevention and Treatment,2007,34(6): 395-399.[胡海,冉宇靓,陈立钊,等. 采用抗体库技术筛选抑制肺癌的功能性抗体[J]. 肿瘤防治研究,2007,34(6): 395-399.]