

# 人源抗 Trop-2 Fab 对宫颈癌细胞生物学特性的影响

褚楚<sup>1</sup>,刘金荣<sup>1</sup>,张慧林<sup>1</sup>,唐小军<sup>2</sup>,林红<sup>2</sup>,刘鹏<sup>3</sup>,苏亦平<sup>1</sup>,冯振卿<sup>2</sup>,童华<sup>1\*</sup>,朱进<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属南京妇幼保健院,江苏南京 210004;<sup>2</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,江苏南京 210029;<sup>3</sup>南京军区军事医学研究所,江苏南京 210002)

**[摘要]** 目的:观察人源抗 Trop-2 Fab 对宫颈癌细胞生物学特性的影响。方法:流式细胞术和免疫荧光检测宫颈癌 HeLa 细胞表面 Trop-2 蛋白的表达;划痕实验和 Transwell 检测人源抗 Trop-2 Fab 对宫颈癌细胞迁移能力的影响;流式细胞术检测人源抗 Trop-2 Fab 对宫颈癌细胞凋亡的诱导作用;CCK-8(cell counting kit-8)检测人源抗 Trop-2 Fab 对宫颈癌细胞增殖的影响。结果:HeLa 细胞表面有 Trop-2 蛋白表达,人源抗 Trop-2 Fab 能够抑制 HeLa 细胞的增殖,有效降低 HeLa 细胞的迁移和侵袭能力,同时能够诱导 HeLa 细胞凋亡。结论:人源抗 Trop-2 Fab 能明显降低宫颈癌细胞的恶性生物学行为,Trop-2 可作为宫颈癌治疗的潜在靶点。

**[关键词]** 人源抗 Trop2 抗体;宫颈癌;生物学特性

**[中图分类号]** R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)03-320-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150305

## Effects of human anti-Trop-2 Fab antibody on biological characteristics of cervical cancer cells

Chu Chu<sup>1</sup>, Liu Jinrong<sup>1</sup>, Zhang Huilin<sup>1</sup>, Tang Xiaojun<sup>2</sup>, Lin Hong<sup>2</sup>, Liu Peng<sup>3</sup>, Su Yiping<sup>1</sup>, Feng Zhenqing<sup>2</sup>, Tong Hua<sup>1\*</sup>, Zhu Jin<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004; <sup>2</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Medical Research Institute of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:**To investigate effects of human anti-Trop-2 Fab antibody on biological characteristics of cervical cancer cells. **Methods:**The expression of Trop-2 protein from cervical cancer cells was assessed by flow cytometry(FCM)and immunofluorescence. The effect of human anti-Trop-2 Fab antibody on migration in human cervical cells was examined by wound healing assay and transwell test. Cell apoptosis induced by Trop-2 Fab was analyzed by flow cytometry. Human anti-Trop-2 Fab antibody influence on cervical cell proliferation was detected by cell counting kit-8(CCK8)assay. **Results:**Trop-2 protein was confirmed to express on human cervical cells. Human anti-Trop-2 Fab antibody inhibited human cervical cancer cell growth,migration and invasion,at the same time induced cervical cancer cell apoptosis. **Conclusion:**Human anti-Trop-2 Fab antibody can significantly inhibit the malignant biological behavior of cervical cancer cells. This fusion antibody may play a role in tumor targeting therapy,and Trop-2 may be a potential therapeutic target for cervical cancer.

**[Key words]** human anti-Trop2 Fab antibody; cervical cancer; biological characteristics

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(03): 320-325]

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,其发病率在女性肿瘤中居第 2 位,在所有肿瘤中居第 7 位<sup>[1]</sup>,其

中 85%发生在中低收入国家。宫颈癌最常见的病理类型是鳞状细胞癌,其次是腺癌。我国宫颈癌发病及死亡数占全世界的 1/3,严重威胁女性生命。人滋养层细胞表面抗原 2(human trophoblast cell surface antigen 2, Trop-2)是一种单次跨膜的表面糖蛋白,它在正常组织中限制性表达或者不表达,而在多种上皮癌中过表达,如宫颈癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、

**[基金项目]** 南京市医学科技发展项目(ZKX12025);南京市科学技术委员会第八批科技发展项目(201208025);江苏省妇幼保健科研项目(F201211)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: thua8@163.com; zhujin1968@njmu.edu.cn

前列腺癌等,研究发现Trop-2可以提高肿瘤的转移和侵袭能力,并与患者预后呈负相关<sup>[2-9]</sup>。因此,Trop-2可以作为多种恶性肿瘤靶向治疗的靶点<sup>[10]</sup>。本研究在本实验室已制备抗Trop-2 Fab抗体的基础上<sup>[11-13]</sup>,观察人源抗Trop-2 Fab抗体对宫颈癌细胞生物学特性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 抗体

人源抗Trop2 Fab抗体原核表达系统由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室构建并保存。

#### 1.1.2 细胞株

人宫颈癌细胞(Hela细胞)和人肝细胞(LO2细胞)由本实验室保存。

#### 1.1.3 主要试剂

胎牛血清、RPMI-1640培养基、2.5 g/L胰酶均购自美国Gibco公司;CCK-8试剂购自日本DOJINDO公司;Annexin V/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司;PE标记的Anti-Human Trop2抗体购自美国e-Bioscience公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

培养条件:Hela细胞和LO2细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中。细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养。细胞生长密度接近80%左右时,用2.5 g/L胰酶消化,以1:3或者1:4传代。

#### 1.2.2 流式细胞术检测Trop2蛋白的表达

用含10%胎牛血清的培养基重悬细胞后计数,5×10<sup>5</sup>个/孔接种于6孔板中,培养24 h后收集细胞,胰酶消化,PBS洗涤后,用缓冲液重悬细胞,加入PE标记的Anti-Human Trop2抗体,混匀室温避光孵育40 min,用PBS洗涤后再用缓冲液重悬每组细胞,1 h内用BD FACSCalibur流式细胞仪进行分析。

#### 1.2.3 免疫荧光检测Trop2蛋白的表达

将细胞培养于细胞培养箱中,固定后用封闭液室温封闭1 h,加入PE标记的Anti-Human Trop2抗体,37℃孵育1 h,PBS洗涤后用DAPI染色,Leica TCS NT激光共聚焦显微镜观察。

#### 1.2.4 CCK-8检测细胞增殖抑制情况

将1×10<sup>4</sup>个对数生长期细胞接种于96孔板中,每株细胞设立3个复孔,以只加培养基不加细胞的空白对照孔调零。检测时,每孔加10 μl CCK-8,37℃孵育2 h后直接用酶联免疫检测仪测定细胞在450 nm处

的吸光度。以抗体浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制细胞增殖抑制曲线。相同条件下实验重复3次。

#### 1.2.5 划痕实验

细胞接种于24孔板中,待细胞汇合达85%时,用100 μl枪头沿孔底直径均匀笔直划痕,吹走划落细胞。对照组不加抗体,实验组加入人源抗Trop-2 Fab 400 μg/ml。为了减少细胞增殖对细胞迁移结果的影响,改用含3%胎牛血清的培养基培养,并于0、24、48 h在倒置显微镜下观察、拍照和测量划痕闭合宽度。相同条件下试验重复3次。

#### 1.2.6 Transwell迁移实验

无血清培养基重悬细胞并调整其密度为2×10<sup>5</sup>个/ml,取200 μl加入Transwell上室,下室为含趋化因子的无血清培养基,在37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养。24 h后棉签擦去上室非迁移细胞,甲醇固定下室膜30 min,PBS洗去固定液,0.1%结晶紫染色20 min,PBS洗涤后倒置荧光显微镜观察,拍照计数分析。每次实验每种细胞设置2个复孔,相同条件下重复3次。

#### 1.2.7 Transwell侵袭实验

将Matrigel铺在Transwell上室底部聚碳酸酯膜上,在培养箱内孵育风干,备用。无血清培养基重悬细胞并调整其密度为2×10<sup>5</sup>个/ml,取200 μl加入到成胶的Transwell上室,同时在Transwell下室加入细胞上清液(含趋化因子),37℃、5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养。取出Transwell Chamber,用棉签头擦掉Matrigel,倒置、风干,PBS洗涤后甲醇固定,PBS洗去固定液,0.1%结晶紫染色,PBS洗涤后倒置荧光显微镜观察,计数拍照分析。每次实验每种细胞设置2个复孔,相同条件下重复3次。

#### 1.2.8 流式细胞术(Annexin V-PI双染法)分析细胞凋亡

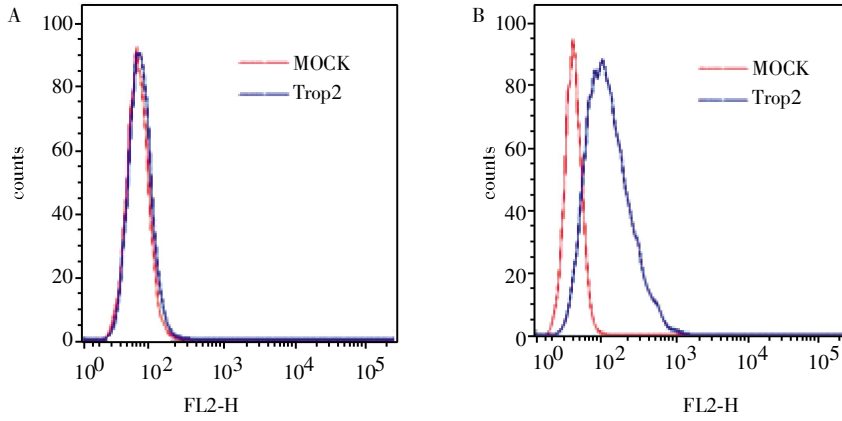
用不含血清的培养基悬浮细胞后计数,4×10<sup>4</sup>个/孔接种于6孔板中,培养24 h后收集细胞及细胞上清,胰酶(不含EDTA)消化,2 000 r/min离心5 min,PBS洗涤后用Binding Buffer悬浮细胞,加入Annexin V和PI,混匀,室温避光孵育15 min,1 h内采用BD FACSCalibur流式细胞仪进行分析。凋亡率为Annexin V单阳细胞(右下象限为早期凋亡)与Annexin V、PI双阳细胞(右上象限为晚期凋亡)合计,相同条件下重复实验3次。

### 1.3 统计学方法

用SPSS21.0统计软件进行χ<sup>2</sup>检验和t检验,P ≤ 0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞术检测宫颈癌细胞表面 Trop2 蛋白的表达



A: LO2 细胞; B: HeLa 细胞。MOCK: 同型对照抗体; Trop2: PE 标记的 Anti-Human Trop2 抗体。

图 1 流式细胞术检测细胞表面 Trop-2 蛋白的表达

Figure 1 Trop-2 expression levels in cells were evaluated by FACS

### 2.2 免疫荧光检测宫颈癌细胞表面 Trop2 蛋白的表达

免疫荧光检测宫颈癌 HeLa 细胞和人正常肝细胞 LO2 细胞膜表面 Trop-2 蛋白的表达情况。免疫荧光结果显示: 抗 Trop2 抗体(红色)可以与 HeLa 细胞特异性结合, 阳性信号主要存在于细胞膜上(图 2)。

### 2.3 CCK-8 检测细胞增殖抑制情况

CCK-8 生长曲线显示: 人源抗 Trop-2 Fab 抗体对 HeLa 细胞有明显抑制作用, 加入 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  人源抗 Trop-2 Fab 抗体时 HeLa 细胞的生存率只有 66.6%, 而此时 LO2 细胞的生存率却达到 91.36%, 二者之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ , 图 3)。

流式细胞术检测宫颈癌 HeLa 细胞和人正常肝细胞 LO2 表面 Trop-2 蛋白的表达。结果显示 HeLa 细胞表面有 Trop-2 蛋白的表达, LO2 细胞未见 Trop-2 蛋白的表达(图 1)。

### 2.4 划痕实验

划痕实验结果显示未加抗体的 HeLa 细胞在划痕 48 h 后划痕宽度恢复达到 95% 左右, 加入 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的人源抗 Trop-2 Fab 后划痕宽度基本上未有变化, 两者差距之间有统计学意义( $P < 0.05$ )。LO2 细胞在未加抗体组与加入抗体组划痕区别不明显, 两者差距之间没有统计学意义( $P > 0.05$ , 图 4)。

### 2.5 Transwell 迁移、侵袭实验

Transwell 迁移实验结果显示, 24 h 后 HeLa 细胞未加抗体对照组平均穿膜细胞数明显多于加入抗体组, 差异有统计学意义( $t=34.55, P < 0.005$ , 图 5)。Transwell 侵袭实验结果显示, 48 h 后 HeLa 细胞未

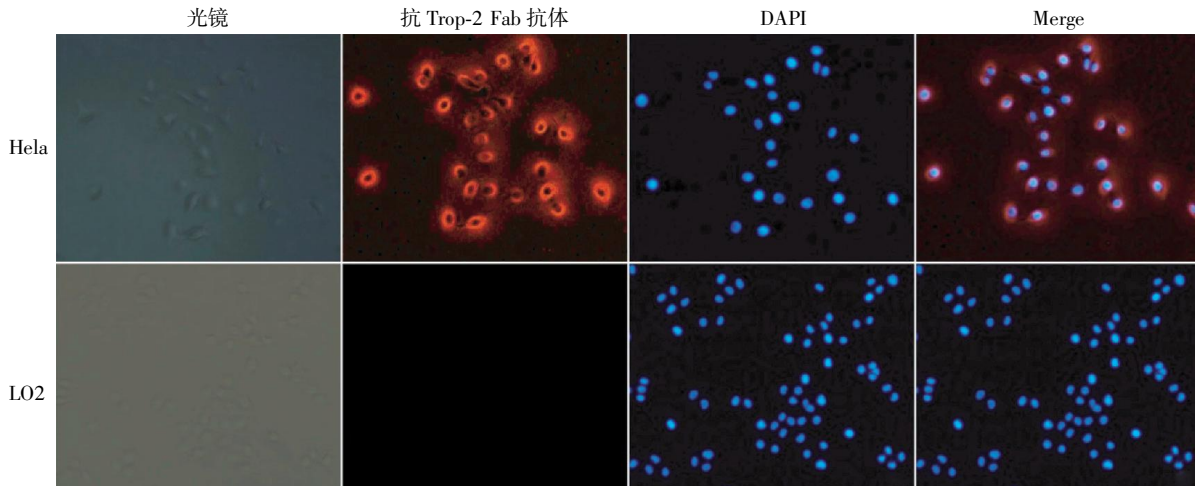


图 2 抗 Trop-2 抗体检测细胞膜表面 Trop-2 蛋白表达情况( $\times 400$ )

Figure 2 The combination of anti-Trop-2 antibody with cell surface by immunofluorescence microscopy( $\times 400$ )

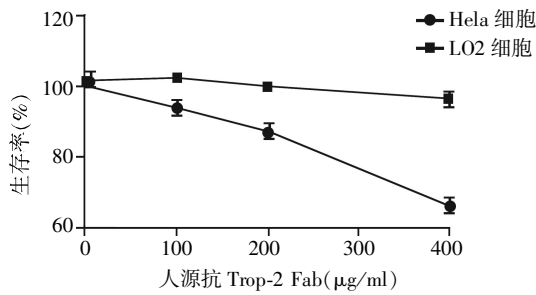


图 3 不同浓度人源抗 Trop-2 Fab 对 HeLa 细胞和 LO2 细胞增殖的影响

Figure 3 Effect of anti-tumor cytotoxicity of anti-Trop-2 antibody Fab on proliferation of HeLa cells and LO2 cells in different concentrations

加抗体对照组平均穿膜细胞数明显多于加入抗体组,差异有统计学意义( $t = 26.68, P < 0.005$ ,图 6)。而 LO2 细胞在迁移实验和侵袭实验中差异没有统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.6 流式细胞术检测宫颈癌 HeLa 细胞和人正常肝细胞 LO2 的凋亡比例

结果显示 HeLa 细胞加入抗体后的凋亡率为 34%左右,未加抗体对照组凋亡率为 19%左右,两者之间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。但是 LO2 细胞加抗体与未加抗体组比较差异没有统计学意义( $P > 0.05$ ,图 7)。

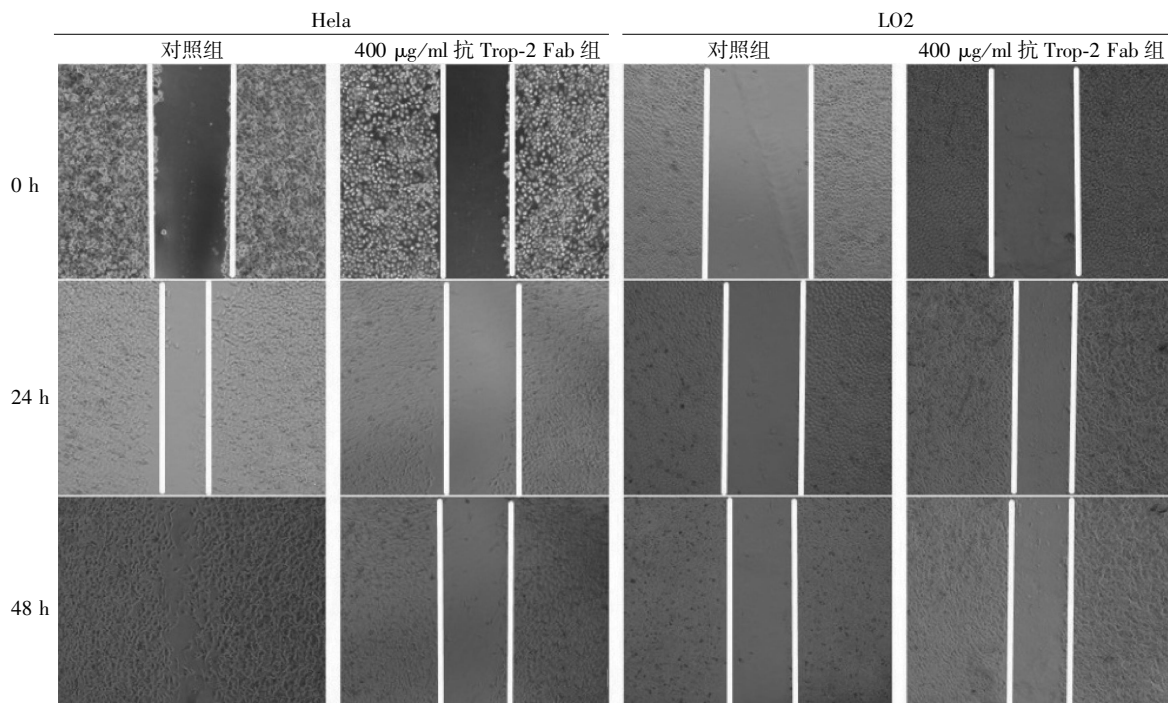


图 4 划痕实验检测人源抗 Trop-2 Fab 抑制 HeLa 细胞的迁移( $\times 40$ )

Figure 4 Human anti-Trop-2 Fab inhibited the migration of HeLa cells detected by wound healing assay( $\times 40$ )

## 3 讨论

传统手术和放化疗在治疗中晚期宫颈癌方面有一定局限,中晚期宫颈癌仍有较高的病死率。随着分子生物学和免疫学技术的发展,宫颈癌治疗逐渐向微观方向发展,其中备受关注的是宫颈癌分子靶向治疗。近年来,单克隆抗体作为一种新型生物制剂,技术越来越成熟。抗体靶向治疗疗效高、不良反应小,已逐渐成为肿瘤治疗的发展方向<sup>[14]</sup>。

Trop-2 亦被称为 EGP-1、M1S1、GA733-1,属于 TACSTD 基因家族,是一种分子量为 36 000 的细胞表面糖蛋白<sup>[3]</sup>。早在 1981 年,Linpinski 等<sup>[15]</sup>采用多种单克隆抗体研究正常人体细胞和癌变的滋养层细

胞,并发现了 4 种表面抗原,分别命名为 Trop-1、2、3、4。Trop-2 是一种单次跨膜糖蛋白,编码 323 个氨基酸;疏水前导肽 26 个氨基酸,胞外区 248 个氨基酸,跨膜区 23 个氨基酸,胞质尾区 26 个氨基酸<sup>[3]</sup>。由于 Trop-2 在肿瘤的转移和侵袭中扮演极其重要的角色,并且 Trop-2 蛋白表达主要在细胞膜上,而在胞质中表达较少,因此 Trop-2 成为靶向治疗的重要候选分子和肿瘤治疗的潜在靶点<sup>[16]</sup>。

本研究通过流式细胞术和免疫荧光证实 Trop-2 在宫颈癌细胞上有表达。从绘制的增殖抑制曲线可见,加入人源抗 Trop-2 Fab 抗体后能够明显抑制宫颈癌细胞的增殖能力并呈浓度依赖性,即呈现量效依赖关系,而对正常人肝细胞 LO2 无明显抑制作用。以上

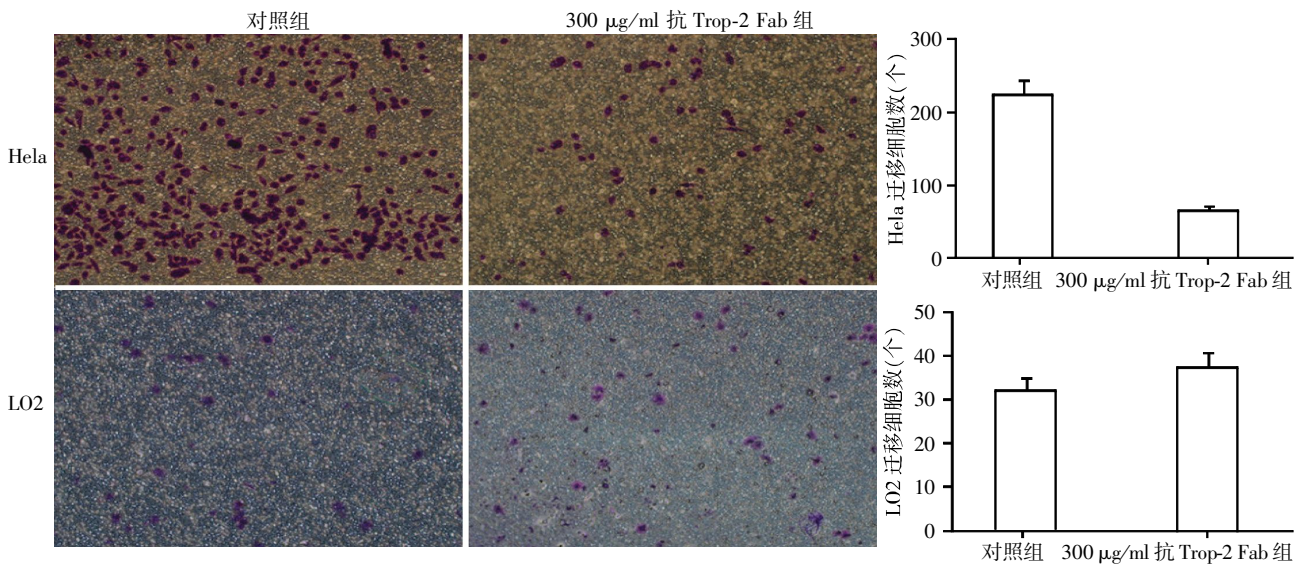


图5 人源抗 Trop-2 Fab 对 HeLa、LO2 细胞迁移能力的影响(×40)

Figure 5 Effect of human anti-Trop-2 on migration of HeLa cells and LO2 cells(×40)

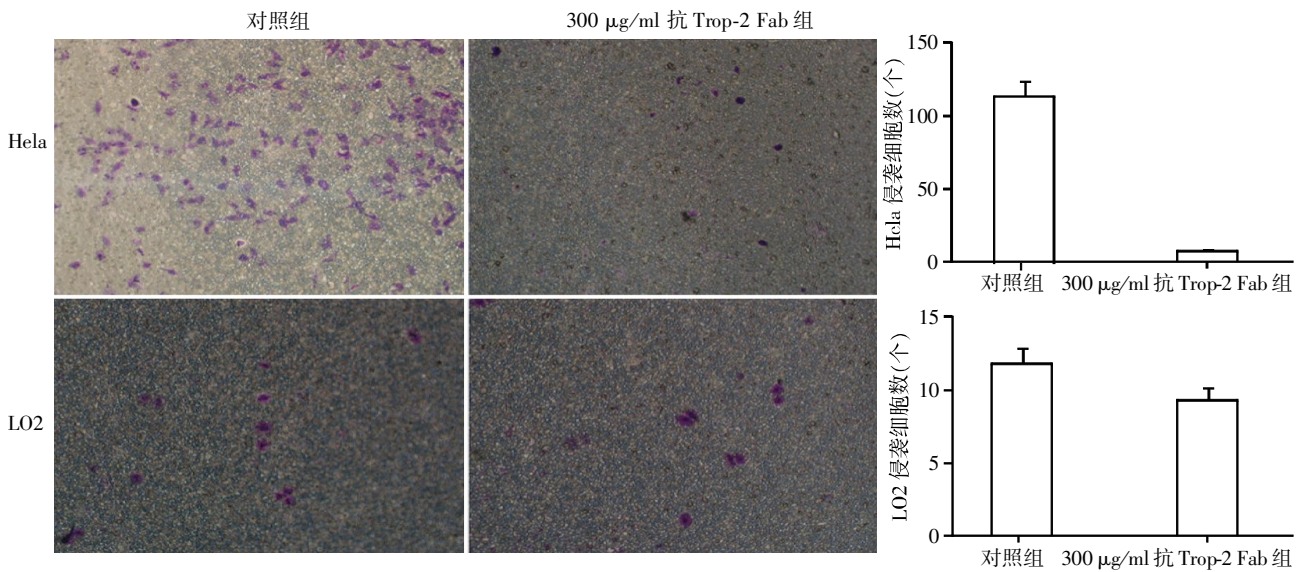


图6 人源抗 Trop-2 Fab 对 HeLa、LO2 细胞侵袭能力的影响(×40)

Figure 6 The effect of anti-Trop2 Fab on invasion of HeLa cells and LO2 cells(×40)

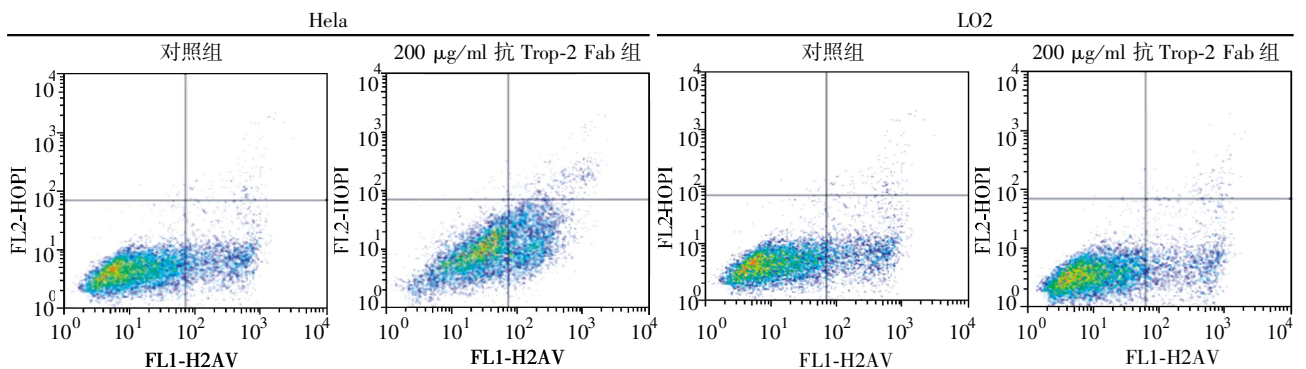


图7 流式细胞术检测凋亡

Figure 7 Cell apoptosis were analyzed by flow cytometry

结果说明抗 Trop-2 Fab 抗体对 HeLa 细胞有特异性的抑制作用。恶性肿瘤细胞以过度异常增生为基本特征,而另一特征为转移和侵袭。划痕、迁移实验都说明人源抗 Trop-2 Fab 抗体在较高浓度时能够降低 HeLa 细胞的平行迁移能力和垂直迁移能力,而对人正常肝细胞 LO2 影响较小。侵袭实验说明加入人源抗 Trop-2 Fab 抗体后,HeLa 细胞的侵袭能力明显降低。并且加入人源抗 Trop-2 Fab 抗体后可以诱导 HeLa 细胞凋亡,而对 LO2 细胞影响较小。以上实验结果都说明人源抗 Trop-2 抗体能够特异性结合和识别宫颈癌细胞,并对其有杀伤作用,而对正常细胞损伤较小。

对于靶向治疗,因为本实验室制备的抗体能够特异性识别 Trop2 蛋白,因此需要进行更加深入的研究,如确定这种蛋白与肿瘤转移的关系。同时,针对过表达 Trop-2 的肿瘤分子靶向治疗药物的研制和开发,也有着较大的临床应用前景,本实验室制备的抗体为进一步偶联药物进行靶向治疗奠定了一定基础。

#### [参考文献]

- [1] Ferlay J,Shin HR,Bray F,et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008:GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*,2010,127(12):2893-2917
- [2] Varughese J,Cocco E,Bellone S,et al. Cervical carcinomas overexpress human trophoblast cell-surface marker (Trop-2)and are highly sensitive to immunotherapy with hRS7,a humanized monoclonal anti-Trop-2 antibody[J]. *Am J Obstet Gynecol*,2011,205(6):5671-5677
- [3] El Sewedy T,Fornaro M,Alberti S. Cloning of the murine TROP2 gene\_conservation of a PIP2-binding sequence in the cytoplasmic domain of TROP-2[J]. *Int J Cancer*,1998,75(2):324-330
- [4] Ohmachi T,Tanaka F,Mimori K,et al. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*,2006,12(10):3057-3063
- [5] Fong D,Moser P,Krammel C,et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic can-

- cer[J]. *Br J Cancer*,2008,99(8):1290-1295
- [6] Fong D,Spizzo G,Gostner JM,et al. TROP2:a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity[J]. *Mod Pathol*,2008,21(2):186-191
- [7] Santin AD,Zhan F,Bellone S,et al. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium:identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy[J]. *Int J Cancer*,2004,112(1):14-25
- [8] Huang E,Cheng SH,Dressman H,et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes[J]. *The Lancet*,2003,361(9369):1590-1596
- [9] Bignotti E,Todeschini P,Calza S,et al. Trop-2 overexpression as an independent marker for poor overall survival in ovarian carcinoma patients[J]. *Eur J Cancer*,2010,46(5):944-953
- [10] Wang J,Day R,Dong Y,et al. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers[J]. *Mol Cancer Ther*,2008,7(2):280-285
- [11] 王小英,林红,张慧林,等.人源抗 Trop2 抗体 Fab 片段的制取和优化[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2012,32(1):35-39
- [12] 梁洁,刘金荣,张慧林,等.抗人滋养层细胞表面抗原-2 单抗的制备及免疫学特性分析[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2011,31(5):645-650
- [13] 林红,梁洁,张慧林,等.人源抗滋养层细胞表面抗原-2 基因工程抗体 Fab 的制备及特性分析[J]. *生物化学与生物物理进展*,2010,37(10):1101-1107
- [14] Deckert PM. Current constructs and targets in clinical development for antibody-based cancer therapy[J]. *Curr Drug Targets*,2009,10(2):158-175
- [15] Lipinski M,Parks DR,Rouse RV,et al. Human trophoblast cell-surface antigens defined by monoclonal antibodies[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1981,78(8):5147-5150
- [16] McDougall AR,Hooper SB,Zahra VA,et al. The oncogene Trop2 regulates fetal lung cell proliferation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*,2011,301(4):478-489

[收稿日期] 2014-08-11