

· 基础医学 ·

人源抗 c-Met 抗体与 rAGAP 偶联物对卵巢癌细胞生物学特性的影响

冯恬¹, 龚丹丹¹, 王露瑶¹, 王怡雯², 周婷婷², 朱进², 张慧林^{1*}, 童华^{1*}

¹南京医科大学附属妇产医院妇科, 江苏 南京 210004; ²东部战区疾病预防控制中心, 江苏 南京 210002

[摘要] 目的: 制备人源抗 c-Met 的全分子抗体(c-Met-IgG1)及其与重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤多肽(recombinant analgesic-antitumor peptide, rAGAP)偶联的新型抗体(c-Met-IgG1-rAGAP), 分析它们的生物学特性, 检测其对卵巢癌细胞生物学行为的影响。方法: 以本实验室保存的人源抗 c-Met 抗体基因为模板, 构建 c-Met-IgG1-rAGAP 真核表达载体并转染真核细胞, 表达并纯化抗体偶联物。通过亲和力检测、免疫荧光、流式细胞术等方法, 评估 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的生物学特性。通过 CCK-8、划痕实验、Transwell 侵袭实验检测抗体对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。结果: 成功制备出能够与 c-Met 蛋白特异性结合的 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 两种抗体; 一系列实验证明了 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 均可抑制 c-Met 阳性的卵巢癌细胞 HO8910 的增殖、迁移、侵袭, 且 c-Met-IgG1-rAGAP 对卵巢癌细胞的抑制作用要强于 c-Met-IgG1, 而在 c-Met 阴性的 IOSE386 细胞中并未观察到这些作用。结论: 研究结果表明 c-Met-IgG1-rAGAP 可靶向作用于 c-Met 阳性的卵巢癌细胞并具有抗肿瘤活性, 可为探索卵巢癌分子靶向治疗奠定研究基础。

[关键词] c-Met; 抗体药物偶联物; 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤多肽; 卵巢癌

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)06-817-09

doi: 10.7655/NYDXBNS20210605

Effects of human anti-c-Met antibody conjugated with rAGAP on the biological properties of ovarian cancer cells

FENG Tian¹, GONG Dandan¹, WANG Luyao¹, WANG Yiwen², ZHOU Tingting², ZHU Jin², ZHANG Huilin^{1*}, TONG Hua^{1*}

¹Department of Gynaecology, the Affiliated Obstetrics and Gynaecology Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210004; ²Center of Eastern Theater for Disease Control and Prevention, Nanjing 210002, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to prepare a human anti-c-Met full-molecule antibody (c-Met-IgG1) conjugated with recombinant analgesic-antitumor peptide (rAGAP) to analyze their biological characteristics and detect their effects on the biological behavior of ovarian cancer cells. **Methods:** Using the human anti-c-Met antibody gene stored in our laboratory as a template, construct the c-Met-IgG1-rAGAP eukaryotic expression vector was constructed and transfected it into eukaryotic cells to obtain the antibody conjugate. The immunological properties of c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP were evaluated by methods such as affinity detection, immunofluorescence, and flow cytometry. CCK-8, scratch test, and Transwell invasion test were used to detect the effects of antibodies on the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells. **Results:** Two antibodies, c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP, which can specifically bind to c-Met protein, were successfully prepared; c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP proved in a series of experiments can inhibit the proliferation, migration and invasion of the c-Met-positive ovarian cancer cell HO8910, and the inhibitory effect of c-Met-IgG1-rAGAP on ovarian cancer cells is higher than that of c-Met-IgG1, while these effects were not observed in the c-Met-negative IOSE386 cells. **Conclusion:** The research results show that c-Met-IgG1-rAGAP can target c-Met-positive ovarian cancer cells and has anti-tumor activity, which can lay a research foundation for exploring molecular targeted treatment of ovarian cancer.

[Key words] c-Met; antibody-drug conjugate; recombinant analgesic-antitumor peptide; ovarian cancer

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(06):817-825]

[基金项目] 江苏省重点研发计划专项(BE2018613); 江苏省科教强卫工程青苗人才(QNRC2016104)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zh1068@163.com; thua8@163.com

卵巢癌作为最常见的妇科恶性肿瘤之一,是妇科恶性肿瘤死亡的主要原因^[1]。尽管减瘤手术、铂类为主的化学疗法、免疫疗法等多种治疗方法取得了一定进步,但早期诊断困难、化疗耐药、复发率高、预后不良等一系列问题仍然困扰着相关医疗工作者^[2]。因此,人们急需研究出一种能够有效改善卵巢癌患者治疗效果特别是减少化疗耐药发生的治疗方法^[3]。抗体药物偶联物(antibody drug conjugate, ADC)是将毒素或药物与单克隆抗体偶联的一种靶向疗法,它可以作为一种新型的靶向疗法应用于卵巢癌的治疗,将细胞毒性药物传递至癌细胞,降低对正常组织细胞毒性的同时,增强疏水化合物的溶解度和延长血浆半衰期,以发挥抗肿瘤活性^[4-5]。

作为ADC的关键成分之一的单克隆抗体,需要高度选择性地作用于靶细胞上的抗原,研究表明c-Met在60%的卵巢癌患者肿瘤中呈过表达,与卵巢癌发生以及预后相关^[6]。c-Met是由MET原癌基因编码,通过二硫键连接的由高度糖基化的50 kDa α 亚基和跨膜145 kDa β 亚基组成的异二聚体^[7]。c-Met与配体肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)结合后被激活,通过触发下游磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/Akt通路诱导肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭^[8-9]。因此,可以通过靶向c-Met阻断HGF和c-Met间的相互作用达到有效治疗卵巢癌的目的^[10]。另外,蝎毒对某些肿瘤具有显著的防治作用,其有效组分在癌症治疗方面已取得了显著效果^[11]。东亚钳蝎镇痛抗肿瘤多肽(analgesic-antitumor peptide, AGAP)是从蝎毒多肽中分离出来的一种毒素,不仅具有镇痛作用,还能对胆管细胞癌^[12]、肝癌^[13]、脑胶质瘤^[14]、乳腺癌^[15]等多种恶性肿瘤起到抑制作用。因此从东亚钳蝎蝎毒中提取纯化出的重组镇痛抗肿瘤多肽(recombinant analgesic-antitumor peptide, rAGAP)有望成为构建ADC的小分子细胞毒素^[16]。

本研究制备人源抗c-Met的全分子抗体(c-Met-IgG1)及其与rAGAP偶联的新型抗体(c-Met-IgG1-rAGAP),分析它们的生物学特性,检测其对卵巢癌细胞生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

CHO-S细胞、人卵巢癌细胞系HO8910、人正常卵巢上皮细胞IOSE386、pMH3质粒、抗c-Met抗体的载体及人源抗炭疽保护性抗原PA抗体(PA-IgG)均由本实验室提供和保存。CHO悬浮培养基(上海迈

邦公司),DMEM及DMEM/F12培养基(Gibco公司,美国),限制性内切酶EcoR I、Not I(Invitrogen公司,美国),T4连接酶(Takara公司,日本),电转杯(Bio-rad公司,美国),0.22微米滤膜(Millipore公司,美国),Protein A亲和纯化柱(GE公司,美国),重组人c-Met蛋白(R&D公司,美国),HRP标记抗人Fab和FITC标记抗人Fc的特异性抗体(Sigma公司,美国),CCK8试剂盒(Dojindo公司,日本),Transwell小室(Corning公司,美国),DAPI、结晶紫染液(上海碧云天公司),G418硫酸盐、DH5 α (上海生工公司)。

1.2 方法

1.2.1 c-Met-IgG1-rAGAP真核表达载体的构建

为制备c-Met-IgG1-rAGAP真核表达载体,首先,以pUC57-c-Met-IgG1-rAGAP载体为模板,PCR扩增获得与rAGAP基因相偶联的轻链(c-Met-IgG1-L-rAGAP)编码序列,Not I和EcoR I双酶切后与同样双酶切的pMH3载体相连,转化DH5 α ,通过Not I和EcoR I双酶切和测序鉴定阳性克隆,从而成功构建pMH3-c-Met-IgG1-L-rAGAP真核表达载体。

1.2.2 c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP的表达和鉴定

通过电转染将重链和轻链真核表达载体共转进CHO-S细胞,以含G418硫酸盐的DMEM/F12培养基进行筛选,通过Dot blot和亚克隆筛选高效表达抗体的细胞株,将培养定株的细胞重悬,收集细胞上清液,用0.22 μ m滤膜过滤收集细胞上清液,AKTA蛋白纯化系统和Protein A亲和层析柱纯化;用SDS-PAGE检测c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP的目的蛋白。

1.2.3 c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP生物学特性分析

实时荧光定量PCR(qRT-PCR):培养HO8910、IOSE386至对数生长期,利用RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,测量调整RNA浓度,然后应用PCR扩增仪将RNA逆转录成cDNA,10 μ L cDNA稀释4倍,将其作为qRT-PCR模板。qRT-PCR反应体系为20 μ L,反应条件为94 $^{\circ}$ C 5 s;60 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 15 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40次循环;每个样品均设3个复孔,记录Ct值。c-Met的mRNA相对表达量根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析计算,GAPDH用作内部参考。

Western blot:培养HO8910、IOSE386细胞至对数生长期,接种到6孔板,在细胞培养箱中培养过夜,裂解细胞提取总蛋白,加入蛋白上样缓冲液后,100 $^{\circ}$ C煮15 min,上样进行蛋白电泳,转NC膜后5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,抗c-Met抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜,

PBST 洗涤后加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 曝光仪曝光。

亲和力检测:将重组人 c-Met 抗原用缓冲液 Kinetic buffer 稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后在传感器上固化, 再将抗体 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 分别用缓冲液 Kinetic buffer 进行梯度稀释, 各浓度的两种抗体分别与已固化 c-Met 抗原的传感器进行结合反应, 结合反应时间为 240 s。待结合反应完成后, 将传感器转入 Kinetic buffer 缓冲液进行解离, 解离时间为 900 s。最后将实验数据导入软件 (DATA Analysis HT 12.0) 进行分析。

免疫荧光:将 HO8910 和 IOSE386 细胞培养在 6 孔板中, 细胞汇合度为 80% 时, 用 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 20 min, 5% 脱脂奶粉溶液封闭 1 h 后分别用两种抗体孵育 2 h, 再用羊抗人 IgG1-FITC 抗体避光孵育 1 h, DAPI 染液染核 20 min 后用 LSM 800 激光共聚焦显微镜观察拍照。

流式细胞术:将 HO8910 和 IOSE386 细胞, 消化重悬计数, 每管计数细胞 5×10^5 个, 将每种细胞分为 4 组, 分别为 PBS 组、FITC 组、c-Met-IgG1 组及 c-Met-IgG1-rAGAP 组。5% 脱脂奶粉溶液 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱封闭 1 h 后, 依次加入 PBS、PBS、c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1 h, 之后向 PBS 组加入 PBS, 其余组都加入 FITC 标记 Fc 特异性的羊抗人 IgG1, 室温避光孵育 1 h 后洗涤, 150 μL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测分析。

1.2.4 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 对卵巢癌细胞生物学特性的影响

CCK-8 实验:将 HO8910 细胞及 IOSE386 细胞消化重悬后按每孔 8×10^3 个细胞数铺 96 孔板, c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP 和 PA-IgG 分别设置 5 个浓度梯度: 0、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个浓度设置 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱中培养 48 h。实验结束时弃去原培养基, 向每孔加入 100 μL DEME 培养基和 10 μL CCK8, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

划痕实验:将 HO8910 细胞和 IOSE386 细胞分别接种到 24 孔板培养至细胞汇合度为 80%, 用 200 μL 移液管径直划出 1 条直线, PBS 洗涤后分别用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 处理, 并于 0 h、24 h、48 h 在显微镜下拍照、测量。

Transwell 侵袭实验:将 HO8910 和 IOSE386 细胞培养至对数生长期, 每种细胞 PBS 组、c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP。向小室中加入 200 μL 细

胞悬液, 并于下室中加入 600 μL 含 15% FBS 的培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵箱中培养 48 h。用 4% 多聚甲醛固定下室 30 min, 结晶紫染色 20 min 后, 用棉签擦去上室中未穿过的细胞, 在显微镜下观察、拍片和计数分析。

1.3 统计学方法

应用 Stata 12.0 和 Graphpad 5.0 对数据进行统计学分析, 实验数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本均数间比较采用配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

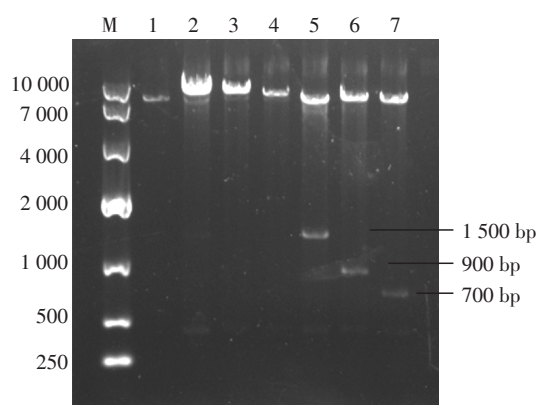
2 结果

2.1 重组 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 真核表达载体的构建

凝胶电泳鉴定结果显示: c-Met-IgG1-H、c-Met-IgG1-L、c-Met-IgG1-rAGAP-L 基因的大小分别为 1 500 bp、750 bp、900 bp, 与预期结果相符。将目的条带分别与线性化的 pMH3 质粒相连接完成真核表达载体的构建 (图 1)。将重组后的真核表达载体质粒分别转入 DH5 α , 通过 *Not*I 和 *Eco*R I 双酶切筛选出阳性克隆送公司测序, 证实与设计序列完全相同。

2.2 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的表达与纯化

将 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的重组质粒分别电转染 CHO-S 细胞, 用含 G418 硫酸盐的



M: DL10 000 bpDNA 标准分子量; 1: pMH3 质粒空载; 2: 重组质粒 pMH3-c-Met-IgG1-H; 3: 重组质粒 pMH3-c-Met-IgG1-rAGAP-L; 4: 重组质粒 pMH3-c-Met-IgG1-L; 5: pMH3-c-Met-IgG1-H 酶切得 c-Met-IgG1-H; 6: pMH3-c-Met-IgG1-rAGAP-L 酶切得 c-Met-IgG1-rAGAP-L; 7: pMH3-c-Met-IgG1-L 酶切得 c-Met-IgG1-L。

图 1 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 真核表达载体的构建与鉴定

Figure 1 Construction and identification of recombinant c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP eukaryotic expression vectors

DMEM/F12 培养基筛选获得阳性细胞,经 Dot blot 及亚克隆筛选出能够高效表达抗体的单克隆细胞株(图2A)。将定株的细胞悬浮培养以收集细胞上清,用 Protein A 柱纯化,获得 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 两种抗体。将上清液、流穿液及纯化所得的抗体进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,结果显示纯化后的抗体条带大小与预期相符且无明显杂带(图2B)。

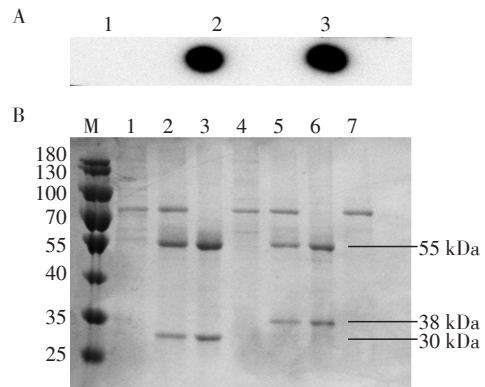
2.3 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 生物学特性分析

2.3.1 c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP 的亲和力测定

重组人 c-Met 抗原用缓冲液 Kinetic buffer 稀释后在传感器上固化,将 c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP 抗体梯度稀释后与其反应,结果显示,c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 与重组人 c-Met 抗原结合的亲和力分别为 5.607×10^{-8} mol/L(图3A)和 8.389×10^{-8} mol/L(图3B)。

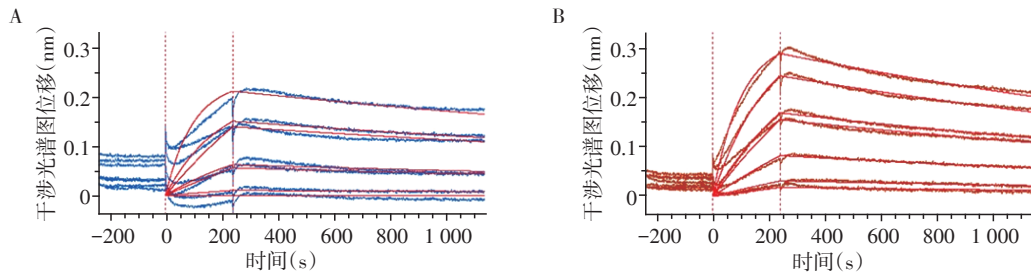
2.3.2 qRT-PCR 检测卵巢癌细胞 c-Met mRNA 的表达

根据 RNA 提取试剂盒说明书提取 HO8910、



A: c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的 Dot blot 检测。1: 正常 CHO-S 细胞上清点样;2: 表达 c-Met-IgG1 细胞上清点样;3: 表达 c-Met-IgG1-rAGAP 细胞上清点样。B: c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的 SDS-PAGE 电泳。M: 蛋白 Marker;1: CHO 上清;2: 纯化前表达 c-Met-IgG1 的细胞上清;3: 纯化的 c-Met-IgG1 抗体;4: 表达 c-Met-IgG1 的细胞上清流穿;5: 纯化前表达 c-Met-IgG1-rAGAP 的细胞上清;6: 纯化的 c-Met-IgG1-rAGAP 抗体;7: 表达 c-Met-IgG1-rAGAP 的细胞上清流穿液。

图2 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 的纯化与鉴定
Figure 2 Purification and identification of c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP



A: c-Met-IgG1 与重组人 c-Met 蛋白亲和力检测结果;B: c-Met-IgG1-rAGAP 与重组人 c-Met 蛋白亲和力检测结果。

图3 c-Met-IgG1 及 c-Met-IgG1-rAGAP 与重组人 c-Met 抗原的亲和力检测

Figure 3 Affinity detection of c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP with recombinant human c-Met antigen

IOSE386 细胞总 RNA 后分别逆转录成 cDNA,用 qRT-PCR 方法检测细胞中 c-Met 的 mRNA 表达水平。qRT-PCR 分析显示,HO8910 细胞中的 c-Met mRNA 明显高于 IOSE386 细胞(图4)。

2.3.3 Western blot 检测卵巢癌细胞 c-Met 蛋白的表达

c-MET 阳性的 HO8910 细胞可检测到 c-Met 蛋白的前体(170 kDa)和成熟体(140 kDa),而未在 IOSE386 细胞中检测到 c-Met 蛋白(图5)。

2.3.4 免疫荧光检测

共聚焦显微镜下观察本研究制备的 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 与细胞的结合特性及其在细胞中的定位。结果显示 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 可以与细胞膜上 c-Met 蛋白特异性结合(图6)。

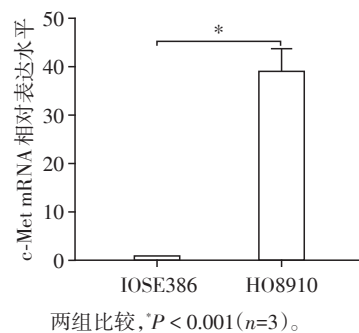
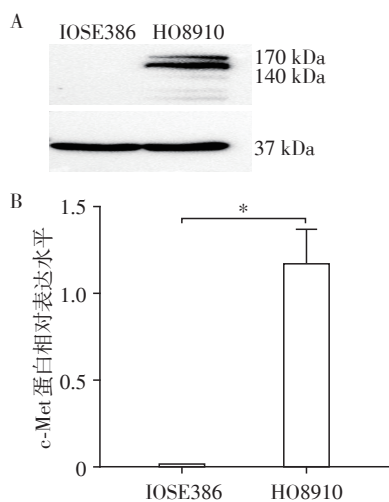


图4 qRT-PCR 检测卵巢癌细胞 c-Met mRNA 的表达

Figure 4 Detection of c-Met mRNA expression in ovarian cancer cells by qRT-PCR

2.3.5 流式细胞术检测 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 与抗原的结合能力

流式细胞术检测 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-



A: Western blot 检测结果; B: 定量分析细胞中 c-Met 蛋白表达水平, 两组比较, * $P < 0.001$ ($n=3$)。

图5 Western blot检测卵巢癌细胞c-Met的表达

Figure 5 Detection of c-Met expression in ovarian cancer cells by Western Blot

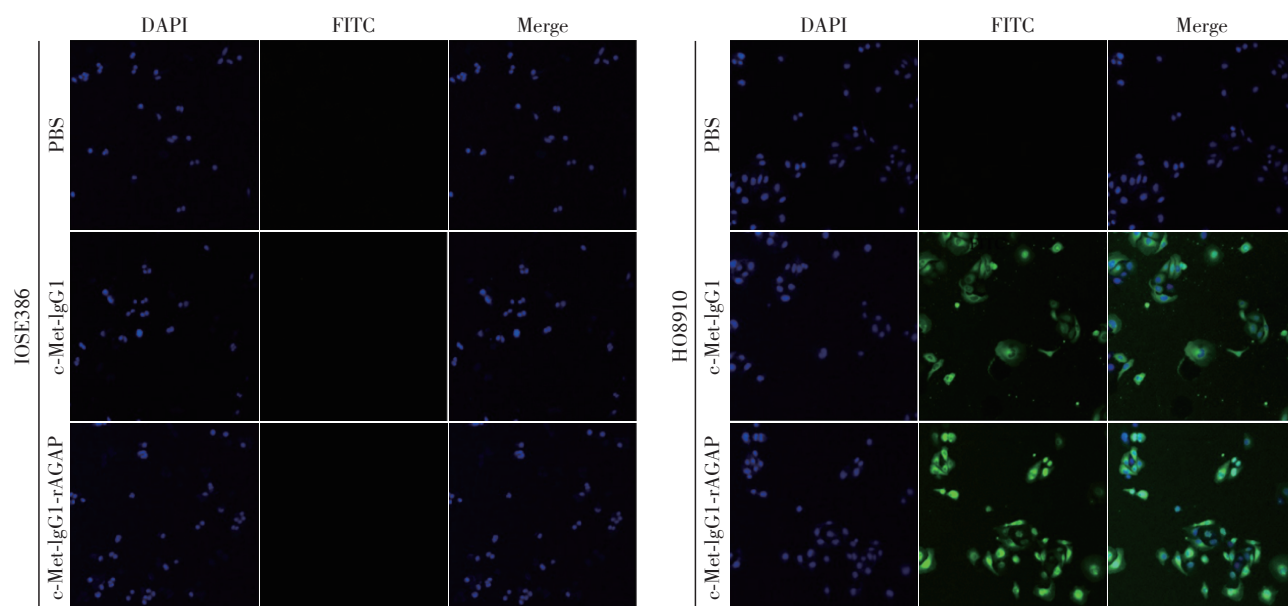


图6 免疫荧光检测c-Met-IgG1及c-Met-IgG1-rAGAP与细胞的特异性结合($\times 100$)

Figure 6 The specific binding of c-Met-IgG1 and c-MET-IgG1-rAGAP with cells surface by immunofluorescence microscopy ($\times 100$)

2.4.2 c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对细胞迁移的影响

200 $\mu\text{g/mL}$ 的c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP分别处理细胞,结果显示(图9):细胞划痕48 h后,HO8910细胞组中,PBS组的划痕愈合率为63.69%,c-Met-IgG1组划痕愈合率为51.17%,c-Met-IgG1-rAGAP组细胞划痕愈合率为38.44%。表明两种抗体对HO8910细胞的迁移能力均有抑制作用,且

rAGAP对c-Met阳性细胞的特异性结合能力。结果显示,经过c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP分别处理后,HO8910细胞检测到的荧光强度大于IOSE386细胞,显示c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP可特异性结合到c-Met阳性的HO8910的细胞膜上,而不与几乎不表达c-Met蛋白的IOSE386细胞结合(图7)。

2.4 体外评估c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对卵巢癌细胞恶性行为的影响

2.4.1 c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对细胞增殖能力的影响

CCK-8结果显示,c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对卵巢癌细胞的增殖均有抑制作用,且在相同浓度下,c-Met-IgG1-rAGAP抑制HO8910细胞增殖的能力要高于c-Met-IgG1,而这两种抗体对IOSE386细胞增殖的影响差异无统计学意义。另外,阴性对照PA-IgG对IOSE386和HO8910这两种细胞增殖的影响差异均无统计学意义(图8)。

c-Met-IgG1-rAGAP对细胞迁移的抑制作用要高于c-Met-IgG1组($P < 0.05$)。而在IOSE386细胞中,不同处理的细胞迁移率差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4.3 c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对细胞侵袭能力的影响

Transwell侵袭实验结果显示,200 $\mu\text{g/mL}$ 的c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP分别处理48 h后,

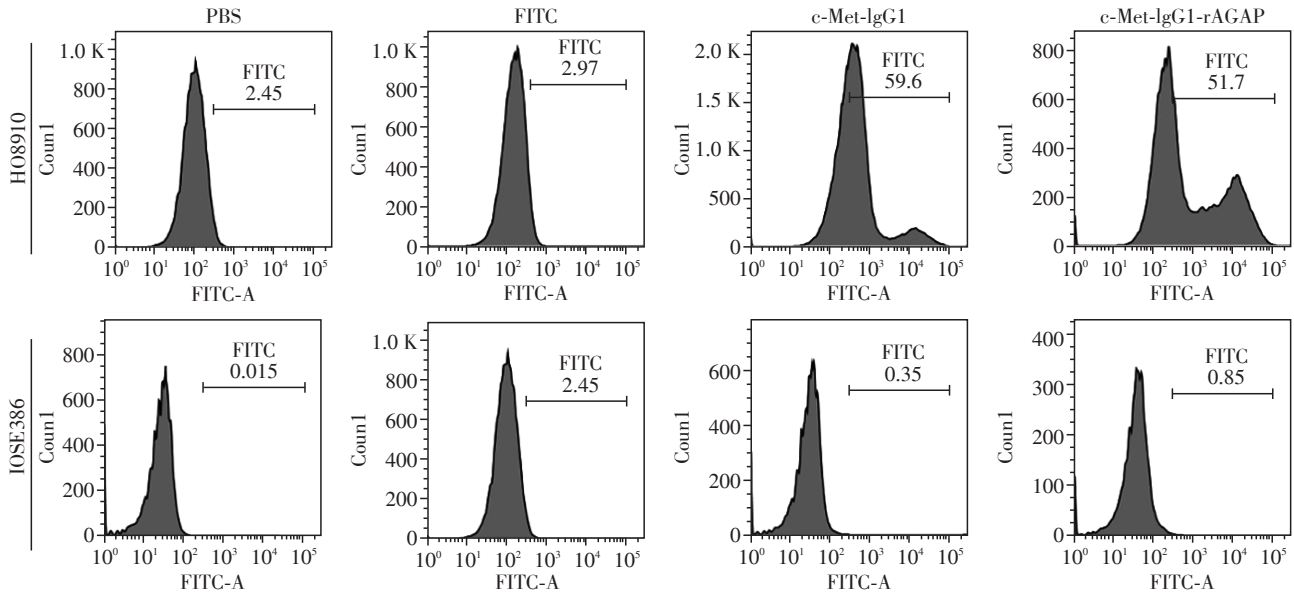
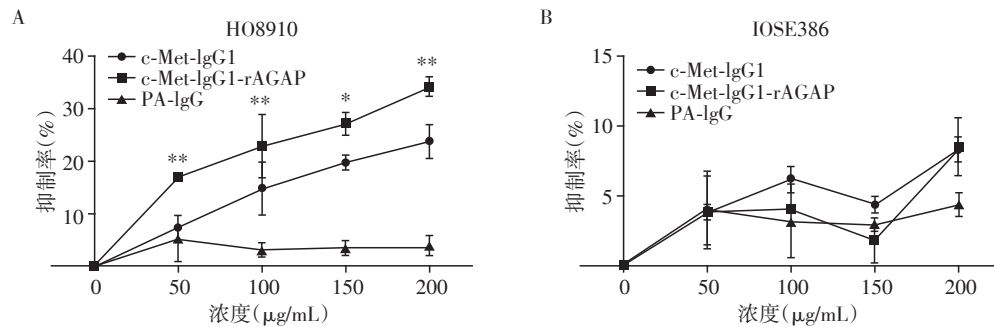


图7 流式细胞术检测c-Met-IgG1及c-Met-IgG1-rAGAP能特异性结合于卵巢癌细胞膜

Figure 7 Specific binding of c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP to ovarian cancer cells detected by flow cytometry



A: c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP与PA-IgG对HO8910细胞增殖的影响;B: c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP与PA-IgG对IOSE386细胞增殖的影响。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图8 CCK-8实验检测c-Met-IgG1、c-Met-IgG1-rAGAP和PA-IgG对卵巢癌细胞增殖的抑制作用

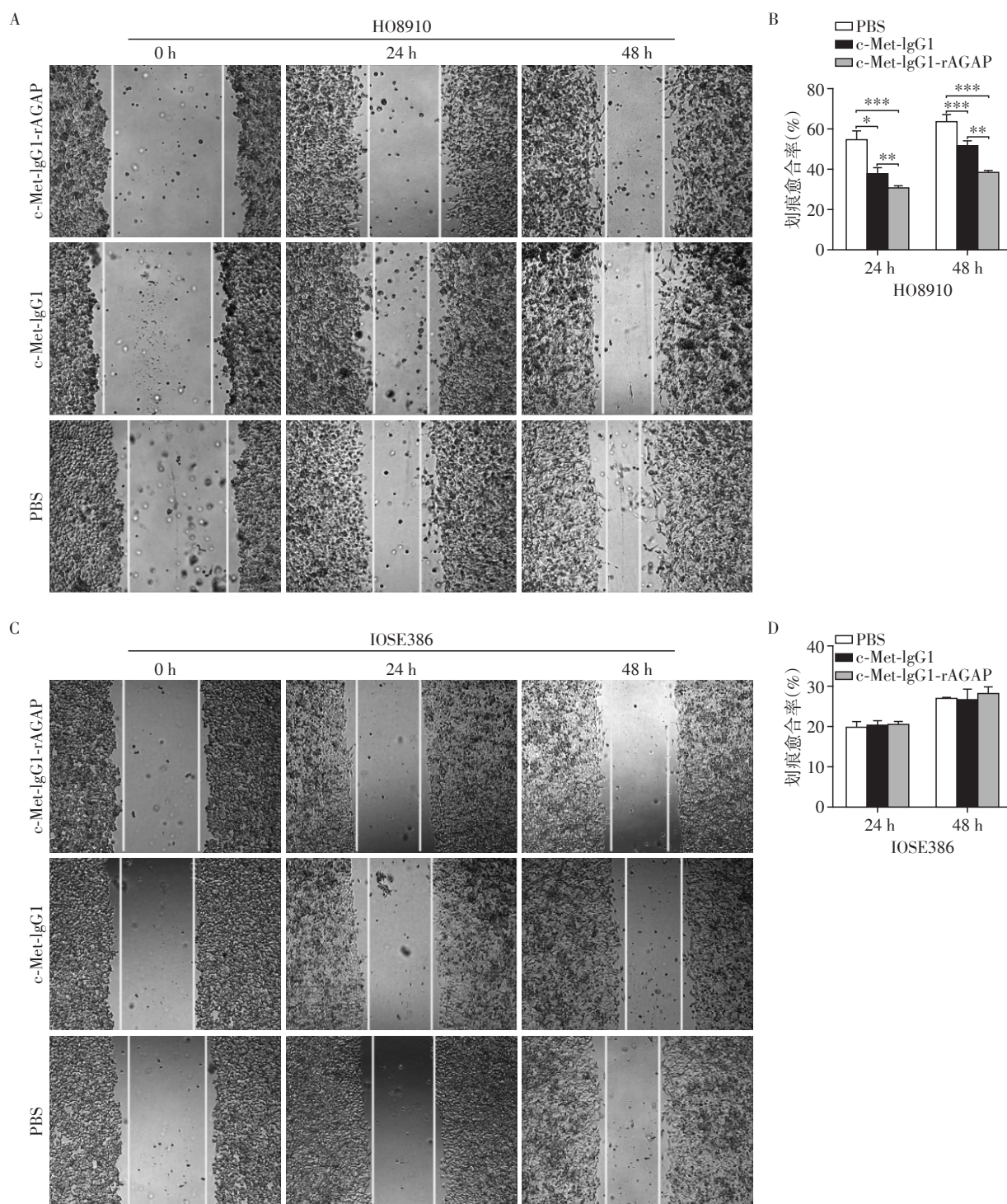
Figure 8 Effect of anti-tumor cytotoxicity of c-Met-IgG1, c-Met-IgG1-rAGAP and PA-IgG on proliferation of ovarian cancer cells detected by CCK-8 test

HO8910细胞中经抗体处理的细胞侵袭数均低于PBS组($P < 0.05$),且c-Met-IgG1-rAGAP抑制细胞穿膜的作用比c-Met-IgG1明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而在IOSE386细胞中,不同处理组细胞侵袭数量差异无统计学意义(图10)。

3 讨论

c-Met是异二聚体受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases, RTK)亚家族的成员,并且是HGF的受体^[17]。HGF与其配体c-Met的结合可诱导多种复杂的信号通路,促进肿瘤细胞的恶性行为^[18]。另外,在癌细胞耐药机制研究中还发现c-Met可与各种膜受体间发生交叉作用,而且与吉非替尼和厄洛

替尼等多种酪氨酸激酶抑制剂的耐药发生有关^[19]。此外,c-Met作为新的肿瘤治疗靶点已经应用于肝癌^[20]、脑肿瘤^[21]、鼻咽癌等多种恶性肿瘤的实验研究。本研究是在前期实验室制备的全分子人源化抗c-Met抗体的基础上,将抗体与抗肿瘤药物蝎毒素相偶联,研究其对卵巢癌细胞的恶性行为的抑制效果。本研究通过构建c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP真核表达载体,电转染CHO-S细胞后筛选出稳定表达两种抗体的细胞株,经AKTA蛋白纯化系统纯化得到抗体。细胞免疫荧光和流式细胞术证实两种抗体均可与c-Met阳性细胞系细胞膜上的c-Met蛋白选择性结合。CCK-8实验显示c-Met-IgG1和c-Met-IgG1-rAGAP对卵巢癌细胞的增殖均有抑



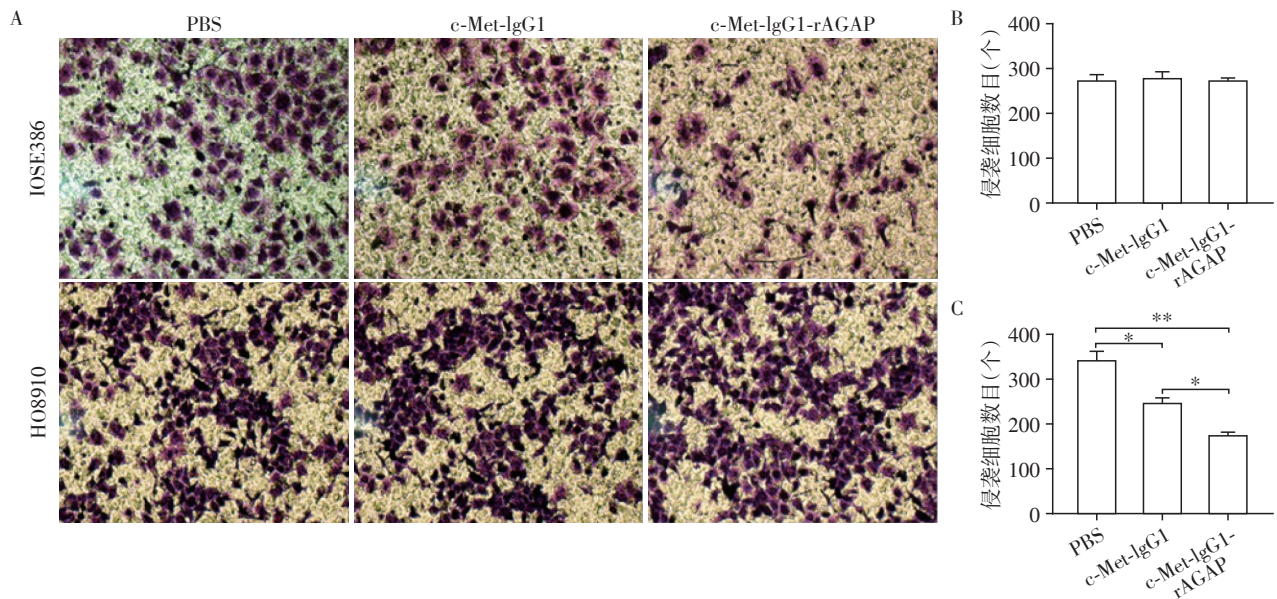
A、B: 不同处理下HO8910细胞的划痕实验结果(A, ×100)及定量分析(B); C、D: 不同处理IOSE386细胞划痕实验结果(C, ×100)及定量分析(D)。两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图9 划痕实验检测 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 对卵巢癌细胞迁移的抑制作用

Figure 9 c-Met-IgG1 and c-Met-IgG1-rAGAP inhibited the migration of ovarian cancer cells detected by wound healing assay

制效果,且融合了rAGAP的新型抗体对细胞增殖的抑制效果更明显。划痕实验和Transwell侵袭实验比较了两种抗体对卵巢癌细胞迁移、侵袭能力的影响,研究结果表明在相同浓度下,c-Met-IgG1-rAGAP

组的细胞愈合率更低,且小室中肿瘤细胞迁移数量更少,这些都表明了与c-Met-IgG1相比,偶联了细胞毒素rAGAP的新型抗体对卵巢癌细胞的恶性行为具有更明显的抑制作用。ADC作为一种新型的抗



A: Transwell 实验检测结果($\times 200$); B: 不同处理对 IOSE386 细胞侵袭能力的影响; C: 不同处理对 HO8910 细胞侵袭能力的影响。两组比较, $P < 0.01$, $**P < 0.001 (n=3)$ 。

图 10 Transwell 侵袭实验检测 c-Met-IgG1 和 c-Met-IgG1-rAGAP 对卵巢癌细胞侵袭的抑制作用

Figure 10 The inhibition of the invasion of IgG1-AGAP and Met-IgG1 to ovarian cancer cells by Transwell migration assay

肿瘤靶向药物,将细胞毒性分子与肿瘤细胞靶向抗体结合在一起,从而将化疗药物选择性递送至肿瘤细胞,增加了细胞毒性药物的治疗范围且减少药物不良反应,目前已经是临床上肿瘤治疗研究的一个重要方向^[20],本研究中抗体融合蛋白 c-Met-IgG1-rAGAP 既保留了 c-Met-IgG1 的靶向特性,又将蝎毒肽集中在肿瘤部位发挥细胞毒性作用,会减轻药物对其他正常组织的损伤。综上所述,未来该抗体可能会在 c-Met 阳性肿瘤的疾病诊断、靶向治疗中发挥重要价值。

[参考文献]

[1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (4):284-296

[2] LI J, ZHI X, SHEN X, et al. Depletion of UBE2C reduces ovarian cancer malignancy and reverses cisplatin resistance via downregulating CDK1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(2):434-440

[3] LI R, GONG L, LI P, et al. MicroRNA-128/homeobox B8 axis regulates ovarian cancer cell progression [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2019, 125(6):499-507

[4] YAGHOUBI S, KARIMI M H, LOTFINIA M, et al. Potential drugs used in the antibody-drug conjugate (ADC) architecture for cancer therapy [J]. J Cell Physiol, 2020, 235 (1):31-64

[5] KIM E G, KIM K M. Strategies and advancement in anti-

body-drug conjugate optimization for targeted cancer therapeutics [J]. Biomol Ther (Seoul), 2015, 23(6):493-509

[6] FAN G, ZHANG S, GAO Y, et al. HGF-independent regulation of Met and GAB1 by nonreceptor tyrosine kinase FER potentiates metastasis in ovarian cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(13):1542-1557

[7] SHAO Z, PAN H, TU S, et al. HGF/c-Met axis: the advanced development in digestive system cancer [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8:801

[8] WU C C, WENG C S, HSU Y T, et al. Antitumor effects of BMS-777607 on ovarian cancer cells with constitutively activated c-MET [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2019, 58 (1):145-152

[9] DEYING W, FENG G, SHUMEI L, et al. CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells [J]. Biosci Rep, 2017, 37 (2) : BSR20160470

[10] LIU S, ZHENG Y, VOLPI D, et al. Toward operative *in vivo* fluorescence imaging of the c-Met proto-oncogene for personalization of therapy in ovarian cancer [J]. Cancer, 2015, 121(2):202-213

[11] 肖桂元. 蝎毒抗肿瘤研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999(2):161-163

[12] 葛贤秀, 曹鹏, 卢悟广, 等. 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽抑制人胆管癌细胞生长作用及其机制研究 [J]. 医学研究生学报, 2013, 26(4):343-347

[13] 金思思, 吴金明, 申苏建. 东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽体外

- 靶向肝细胞癌的实验研究[J]. 胃肠病学, 2009, 14(12): 742-745
- [14] ZHAO Y, CAI X, YE T, et al. Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(9): 2424-2434
- [15] LV P C, YANG Y S, ZC W. Recent progress in the development of small molecule c-Met inhibitors [J]. Curr Top Med Chem, 2019, 19(15): 1276-1288
- [16] 龚丹丹, 高梦云, 冯恬, 等. 人源化抗ROR1抗体及其AGAP偶联物对卵巢癌生物学特性的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2020, 40(3): 331-341
- [17] ZHANG Y, FARENHOLTZ K E, YANG Y, et al. Hepatocyte growth factor sensitizes brain tumors to c-MET kinase inhibition [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(6): 1433-1444
- [18] LIANG J W, LI S L, WANG S, et al. Synthesis and biological evaluation of novel (E)-N'-benzylidene hydrazides as novel c-Met inhibitors through fragment based virtual screening [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2020, 35(1): 468-477
- [19] YANG M H, BAEK S H, JY U, et al. Anti-neoplastic effect of ginkgolide c through modulating c-Met phosphorylation in hepatocellular carcinoma cells [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(21): 8303
- [20] HAN C, PERRONE E, ZEYBEK B, et al. In vitro and in vivo activity of sacituzumab govitecan, an antibody-drug conjugate targeting trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop-2) in uterine serous carcinoma [J]. Gynecol Oncol, 2020, 156(2): 430-438

[收稿日期] 2021-01-07

(上接第803页)

- [12] WANG Y, MACK J A, MAYTIN E V. CD44 inhibits α -SMA gene expression via a novel G-actin/MRTF-mediated pathway that intersects with TGF β R/p38MAPK signaling in murine skin fibroblasts [J]. J Biol Chem, 2019, 294(34): 12779-12794
- [13] CHEN C H, SUE Y M, CHENG C Y, et al. Oligo-fucoidan prevents renal tubulointerstitial fibrosis by inhibiting the CD44 signal pathway [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 40183
- [14] KROLIKOSKI M, MONSLOW J, PURÉ E. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: A temporal perspective [J]. Matrix Biol, 2019, 78-79(5): 201-218
- [15] HELDIN P, KOLLIPOULOS C, LIN C Y, et al. Involvement of hyaluronan and CD44 in cancer and viral infections [J]. Cell Signal, 2020, 65(1): 109427
- [16] SU Y J, LAI H M, CHANG Y W, et al. Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44 [J]. EMBO J, 2011, 30(15): 3186-3199
- [17] ALAMGEER M, NEIL W D, BANAKH I, et al. A phase IIa study of HA-irinotecan, formulation of hyaluronic acid and irinotecan targeting CD44 in extensive-stage small cell lung cancer [J]. Invest New Drugs, 2018, 36(2): 288-298
- [18] AMBARTSUMIAN N, KLINGELHÖFER J, GRIGORIAN M. The multifaceted S100A4 protein in cancer and inflammation [J]. Methods Mol Biol, 2019, 1929: 339-365
- [19] KRAUS C, ROHDE D, WEIDENHAMMER C, et al. S100A1 in cardiovascular health and disease: closing the gap between basic science and clinical therapy [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 47(4): 445-455
- [20] XIA H, GILBERTSEN A, HERRERA J, et al. Calcium-binding protein S100A4 confers mesenchymal progenitor cell fibrogenicity in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Clin Invest, 2017, 127(7): 2586-2597
- [21] QIAN L, HONG J, ZHANG Y, et al. Downregulation of S100A4 alleviates cardiac fibrosis via Wnt/ β -Catenin pathway in mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(6): 2551-2560
- [22] QIAN L, ZHANG Y, ZHU M, et al. Improvements in left ventricular regional and global systolic function following treatment with S100A4-shRNA after myocardial infarction in mice [J]. Quant Imaging Med Surg, 2019, 9(6): 1066-1075
- [23] SAMSON R, RAMACHANDRAN R, LE JEMTEL T H. Systolic heart failure: knowledge gaps, misconceptions, and future directions [J]. Ochsner J, 2014, 14(4): 569-575
- [24] VRTOVEC B, POGLAJEN G, LEZAIC L, et al. Effects of intracoronary CD34⁺ stem cell transplantation in nonischemic dilated cardiomyopathy patients: 5-year follow-up [J]. Circ Res, 2013, 112(1): 165-173
- [25] LIAO H X, LEVESQUE M C, PATTON K, et al. Regulation of human CD44H and CD44E isoform binding to hyaluronan by phorbol myristate acetate and anti-CD44 monoclonal and polyclonal antibodies [J]. J Immunol, 1993, 151(11): 6490-6499
- [26] FUJIMOTO T, KAWASHIMA H, TANAKA T, et al. CD44 binds a chondroitin sulfate proteoglycan, aggrecan [J]. Int Immunol, 2001, 13(3): 359-366

[收稿日期] 2020-12-13