

单抗 NJ001 杀伤肺腺癌细胞机制的初步研究

史新惠,潘世扬,黄珮珺,姜鉴芳,张淑平,柯星,许雨乔,黄蕾,徐婷,王芳*

(南京医科大学第一附属医院检验学部,国家临床检验重点专科建设单位,江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**观察单克隆抗体 NJ001 杀伤肺腺癌细胞的活性,并探索其分子机制。**方法:**选择肺腺癌细胞株 SPC-A1 作为研究对象,流式细胞仪检测细胞凋亡率;相差显微镜观察凋亡细胞形态学改变;Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 caspase-8、caspase-9、caspase-3、PARP 和 Bcl-2、Bax 表达的变化。**结果:**单克隆抗体 NJ001 可以导致 SPC-A1 细胞发生凋亡,且凋亡率呈剂量依赖性。显微镜下观察到 SPC-A1 细胞皱缩变圆,甚至脱落,呈现典型的凋亡改变;Western blot 检测结果显示,在单抗 NJ001 作用下,PARP 蛋白被剪切,caspase-3 的表达量因被剪切而降低,caspase-8 和 caspase-9 蛋白均表现活化,表现为 cleaved caspase-8 和 cleaved caspase-9 蛋白的表达上调。另外促凋亡蛋白 Bax 表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达下调。**结论:**单克隆抗体 NJ001 能通过诱导细胞凋亡发挥其杀伤肺腺癌细胞的活性,且其凋亡机制与 caspase 活化和 Bcl-2 家族蛋白的调节有关。

[关键词] 单抗 NJ001;细胞凋亡;机制

[中图分类号] Q786;R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-858-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140702

Researches on lung adenocarcinoma cell killing mechanism of McAb NJ001

Shi Xinhui, Pan Shiyang, Huang Peijun, Lou Jianfang, Zhang Shuping, Ke Xing, Xu Yuqiao, Huang Lei, Xu Ting, Wang Fang*

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, National Key Clinical Department of Laboratory Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-cancer activity of McAb NJ001 against lung adenocarcinoma cells, and explore its molecular mechanism. **Methods:** We selected SPC-A1 cell lines as research object, used flow cytometry to detect cell apoptosis, and observed morphological changes of SPC-A1 cells by phase contrast microscope. We detected the expressions of apoptosis-related proteins such as caspase-8, caspase-9, caspase-3, PARP, Bax, and Bcl-2 by Western blotting assays. **Results:** McAb NJ001 induced apoptosis in SPC-A1 cells in a dose-dependent manner. After treatment with NJ001, SPC-A1 cells showed shrinkage, and became round or even fell off, which were typical morphological changes of apoptosis. **Results:** Western blots showed that after treatment with McAb NJ001, PARP were cleaved so that caspase-3 expression was decreased, caspase-8 and caspase-9 were activated and their protein expression levels were increased. The expression of pro-apoptotic protein Bax increased while the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 decreased. **Conclusion:** McAb NJ001 has strong anti-cancer activity due to its apoptosis inducing effect. In addition, caspase activation and up-regulation of Bax/Bcl-2 were involved in NJ001-induced apoptosis.

[Key words] McAb NJ001; cell apoptosis; mechanism

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):858-862]

多年来,肺癌一直是全世界癌症死亡的主要原因,其中约 85%是非小细胞肺癌,在非小细胞肺癌

[基金项目] 国家自然科学基金(81371894,81272324,81000754,81101322,81201359);国家临床检验重点专科建设项目;江苏高校优势学科建设工程基金项目;江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: shywf74@sina.com

中腺癌则占了 50%左右^[1]。由于具有很高的复发率且传统的治疗方法疗效有限,几十年来肺癌总的 5 年生存率只有 10%~15%^[2],因此我们迫切需要寻找新的候选药物,从而为肺癌的治疗提供有效方法^[3]。

本实验室通过人 SPC-A1 肺腺癌活细胞抗原免疫小鼠制备出单克隆抗体并命名为 NJ001^[4]。前期研究已表明,单克隆抗体 NJ001 对肺癌细胞株具有

高亲和力和特异性,在体内外实验中均表现出有效的抗肿瘤活性^[5]。我们发现 NJ001 作用后的肺腺癌细胞形态学发生凋亡改变,表明 NJ001 诱导的细胞凋亡是杀伤肺腺癌细胞的主要机制。然而,它促进肺腺癌细胞凋亡的分子机制并不清楚,目前也没有相关报道。在本研究中,我们对单克隆抗体 NJ001 诱导肺腺癌细胞凋亡的分子机制进行了初步探索。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞株 SPC-A1 购自中科院上海生命科学研究院细胞库,以含 10% (V/V) 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养液 (美国 Invitrogen 公司) 在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术分析

将 SPC-A1 细胞接种到 6 孔板,贴壁培养 24 h 后,加入不同剂量 (0、100、200、400 μg/ml) 的 NJ001 作用 48 h,利用膜联蛋白 V 和 PI 双标记进行流式细胞仪检测。首先用胰酶消化并收集细胞,离心分离除去培养基,用 PBS 洗涤两次,加入 100 μl 1×结合缓冲液,并用 5 μl FITC 膜联蛋白 V 和 5 μl 碘化丙啶 (PI) 进行标记,室温避光 15 min 后利用流式细胞仪 (FACScan, 美国 BD Biosciences 公司) 进行检测。

1.2.2 细胞形态学观察

NJ001 作用 SPC-A1 细胞 48 h 后,自 CO₂ 培养箱中取出,放置在光学显微镜 (OLYMPUS IX71) 下,选择相差环 Ph2 (200×) 观察,并拍照。

1.2.3 总蛋白提取及 Western blot 分析

为检测凋亡相关蛋白的表达水平,首先用 IP 裂解液 (上海碧云天) 裂解细胞提取总蛋白,用 BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天) 测定蛋白质浓度。制备 8%~12% 的 SDS-PAGE 凝胶,加入等量的蛋白质电

泳后电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。以 5% 脱脂奶粉或 BSA 1:1 000 稀释一抗,4℃孵育 20 h, TBST 洗膜 3 次, 5% 脱脂奶粉 1:3 000 稀释 HRP 标记的二抗 (北京中山生物), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 发光液 (美国 Millipore 公司), 避光 2 min 后进行曝光压片,利用美国 BIO-RAD 公司的 GEL DOC 凝胶成像系统拍照。以 GAPDH 为内参。实验所用一抗包括: caspase-8、活化 caspase-8、caspase-9、caspase-3、cleaved caspase-3、PARP、Bcl-2 和 Bax,均购自美国 Cell Signaling 公司。

1.3 统计学方法

实验数据用 SPSS16.0 进行统计分析,数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 来表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

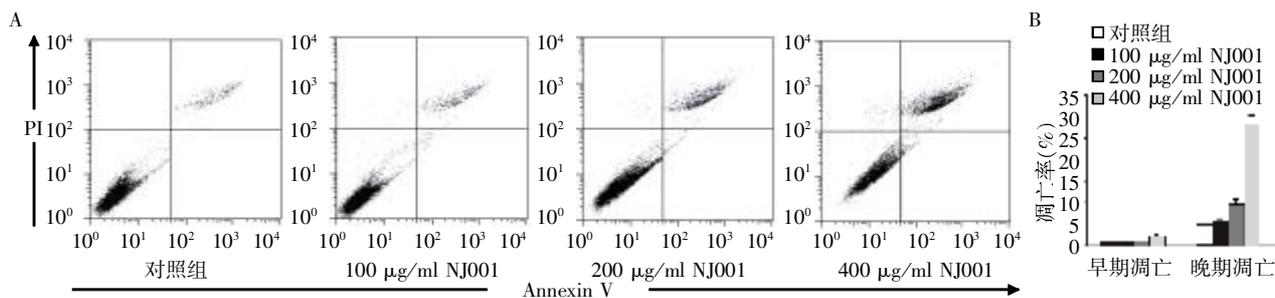
2 结果

2.1 NJ001 诱导 SPC-A1 细胞凋亡

细胞凋亡早期的特征之一是磷脂酰丝氨酸外翻,本实验利用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测 SPC-A1 细胞凋亡率,实验结果显示,对照组以及不同浓度单抗 NJ001 组 (100、200、400 μg/ml) 处理 SPC-A1 细胞 48 h 后,早期凋亡率分别为 (0.30 ± 0.09)%、(0.49 ± 0.19)%、(0.75 ± 0.20)%、(2.18 ± 0.31)%、晚期凋亡率分别为 (4.71 ± 1.53)%、(5.35 ± 1.04)%、(9.79 ± 1.60)%、(28.07 ± 3.49)% (图 1),凋亡率呈抗体浓度依赖性,200 和 400 μg/ml 组分别与对照组相比,凋亡率均有显著上升,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05, n = 3$),表明 NJ001 对 SPC-A1 细胞有促凋亡作用。

2.2 细胞形态学改变

NJ001 (100、200、400 μg/ml) 作用 SPC-A1 细胞 48 h 后,在相差显微镜下观察细胞形态学的改变,



A: 细胞流式图; B: NJ001 (100、200、400 μg/ml) 作用 48 h 时 SPC-A1 细胞的凋亡率, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01, n = 3$ 。

图 1 不同浓度 NJ001 作用 48 h 时 SPC-A1 细胞的凋亡率

Figure 1 Apoptosis rate of SPC-A1 cells after treatment of NJ001 with different concentrations for 48 h

结果显示未经 NJ001 处理的对照组细胞正常贴壁,呈多边形,而经过 NJ001 处理的细胞,随着单抗浓度

的增加,细胞明显皱缩,变圆,甚至脱落,且细胞壁完整没有发生破裂,呈现细胞凋亡的形态特征(图 2)。



A:对照组;B: NJ001 100 µg/ml; C: NJ001 200 µg/ml; D: NJ001 400 µg/ml。

图 2 SPC-A1 细胞经 NJ001 作用 48 h 后在相差显微镜下的形态学改变($\times 200$)

Figure 2 Morphological changes of SPC-A1 cells after treatment of NJ001 for 48 h under the phase contrast microscope ($\times 200$)

2.3 Western blot 分析凋亡相关蛋白的表达

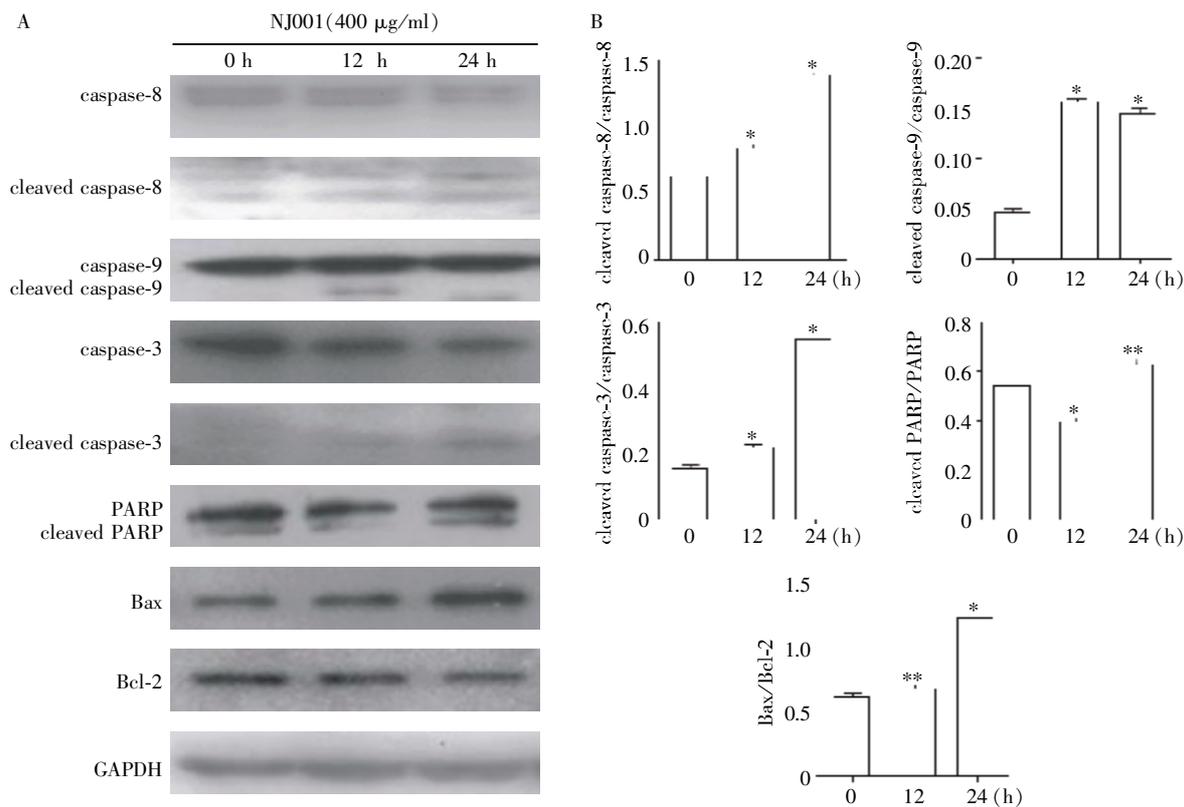
为进一步研究 NJ001 诱导 SPC-A1 凋亡的分子机制,我们利用 Western blot 技术检测了一系列凋亡相关蛋白的表达水平。结果显示在单抗 NJ001 (400 µg/ml) 作用下,PARP 蛋白被剪切,cleaved PARP 的表达量在 24 h 显著增加,caspase-3 蛋白由于被剪切表达量逐渐降低,活化的 caspase-3 表达量则有增加趋势,caspase-8、caspase-9 蛋白均被剪切发生活化。且 Bcl-2 蛋白家族中的促凋亡蛋白 Bax 随 NJ001 作用时间的延长呈增加趋势,而能够维持线粒体膜电位的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达却逐渐降低(图 3)。这些结果表明,在 NJ001 作用下 SPC-A1 细胞中 caspase 蛋白发生了活化,死亡受体途径和线粒体凋亡途径均参与 NJ001 诱导 SPC-A1 细胞凋亡的过程,并且 Bcl-2 家族蛋白的调节也在其中发挥了作用。

3 讨论

单抗靶向治疗成为近年来抗肿瘤研究的热点^[6]。单克隆抗体 NJ001 是本实验室制备的针对人非小细胞肺癌的一种新型特异性单克隆抗体,前期实验表明其仅对肺腺癌及鳞癌细胞系有特异性反应,与正

常肺细胞、健康人外周血单个核细胞(PBMC)及其他一些常见的肿瘤细胞系(肝癌、乳腺癌及结肠癌)无反应或低反应性^[4],且具有有效的抗肿瘤活性,有望成为治疗非小细胞肺癌的有效药物。为了阐明单克隆抗体 NJ001 促进肿瘤细胞凋亡的分子机制,我们对其诱导人非小细胞肺癌细胞株 SPC-A1 凋亡的机制进行了初步探索。

细胞凋亡是由基因控制的有序的主动死亡过程,能够调节细胞增殖和细胞死亡之间的平衡,保持机体内环境稳态^[7]。最近,越来越多的证据表明,细胞凋亡的失衡会导致癌变的发生^[8-9]。而药物促进肿瘤细胞凋亡能力的大小也在一定程度上决定了肿瘤对这种药物的敏感程度。细胞凋亡的典型特征包括线粒体膜通透性的改变,激活凋亡蛋白酶 caspase,核小体间 DNA 裂解,染色质浓缩和边缘化等^[10]。caspase 家族蛋白通过一系列级联反应,对细胞功能蛋白和结构蛋白进行剪切,在细胞凋亡中发挥着核心作用^[11]。其中 caspase-8 是死亡受体途径的启动者,caspase-9 是线粒体途径的启动者,两者分别在两个凋亡通路中扮演中心角色^[12]。两个凋亡通路最终都激活凋亡执行者 caspase-3,进而剪切一系列功能蛋白和结构蛋白,如 DNA 修复酶 PARP,诱导



A: Western blot 结果图; B: 相对灰度分析, 与 0 h 比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 3 Western blot 检测 NJ001 作用下 SPC-A1 细胞凋亡相关蛋白的表达

Figure 3 Expressions of SPC-A1 cells apoptosis related proteins after treatment with NJ001 were detected by Western blot

DNA 片段化,从而导致细胞的死亡。本研究结果表明, caspase-8 介导的死亡受体途径和 caspase-9 介导的线粒体凋亡途径均参与了单克隆抗体 NJ001 诱导 SPC-A1 细胞凋亡的过程。

Bcl-2 家族在细胞凋亡过程中起着至关重要的作用,包括抗凋亡蛋白成员和促凋亡蛋白成员,这些蛋白直接或间接地影响线粒体的形态和功能^[13]。Bcl-2 和 Bax 蛋白是其中重要的两个成员。Bcl-2 可以抑制 caspase 介导的细胞凋亡^[14],是存在于许多正常细胞和癌细胞中的一个重要的抗凋亡蛋白^[15]。促凋亡蛋白 Bax 可以通过与 Bcl-2 结合,抑制 Bcl-2 的抗凋亡活性,在凋亡信号作用下, Bax 通过发生构象变化,膜插入和寡聚化反应,在线粒体外膜形成通道,导致线粒体内相关凋亡因子释放到细胞质。另外 Bax 蛋白还能通过诱导线粒体分裂,促进细胞凋亡^[16-17]。我们观察到,肺腺癌细胞在单抗 NJ001 诱导的细胞凋亡中,促凋亡蛋白 Bax 表达水平明显上调,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 明显下调,这对促进线粒体膜通透性增大和激活线粒体途径有重要作用。

综上所述,本研究表明单克隆抗体 NJ001 可通过死亡受体通路和线粒体通路 2 个途径诱导 SPC-

A1 细胞凋亡。另外由于在单抗制备时,小鼠腹水经过了补体灭活处理,细胞培养体系中的血清也经过了补体灭活处理,因此可以排除补体介导 SPC-A1 死亡的作用。鉴于单抗 NJ001 对非小细胞肺癌的高特异性和亲和力,及其诱导肺癌细胞凋亡的活性, NJ001 有望作为一种新的肺癌靶向治疗药物,然而应用于临床治疗之前还需要进行更加深入的研究。本研究初步探索了单克隆抗体 NJ001 诱导 SPC-A1 细胞凋亡的分子机制,这为应用单抗 NJ001 对非小细胞肺癌进行靶向治疗提供了有力的实验依据。

[参考文献]

[1] Youlten DR, Cramb SM, Baade PD. The international epidemiology of lung cancer: geographical distribution and secular trends[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(8): 819-831
 [2] Cagle PT, Dacic S. Lung cancer and the future of pathology[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(3): 293-295
 [3] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776
 [4] 徐婷, 潘世扬, 王芳. 抗人非小细胞肺癌单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 216-218

[5] Pan S, Wang F, Huang P, et al. The study on newly developed McAb NJ001 specific to non-small cell lung cancer and its biological characteristics[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33009

[6] 谢力, 李鸿钧, 孙茂盛. 单克隆抗体在肿瘤治疗中的应用进展[J]. 国际免疫学杂志, 2012, 35(6):445-452

[7] Subramanian S, Steer CJ. MicroRNAs as Gatekeepers of apoptosis[J]. J Cell Physiol, 2010, 223(2):289-298

[8] Favaloro B, Allocati N, Graziano V, et al. Role of apoptosis in disease[J]. Aging (Albany NY), 2012, 4(5):330-349

[9] Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure[J]. Bioessays, 2000, 22(11):1007-1017

[10] Abnosi MH, Jafari Yazdi Z. Low dose and long term toxicity of sodium arsenite caused caspase dependent apoptosis based on morphology and biochemical character[J]. Cell J, 2012, 14(3):161-170

[11] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351(1-2):41-58

[12] Yang XH, Zheng X, Cao JG, et al. 8-Bromo-7-methoxy-chrysin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells involves ROS and JNK[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(27):3385-3393

[13] Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, et al. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1762(2):191-201

[14] Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(2):a008722

[15] Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(11):1733-1740

[16] Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, et al. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis [J]. Nature, 2006, 443(7112):658-662

[17] Hoppins S, Edlich F, Cleland MM, et al. The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes[J]. Mol Cell, 2011, 41(2):150-160

[收稿日期] 2013-11-29

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)