

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.005

早孕因子单克隆抗体对黑色素瘤细胞 A-375 增殖、凋亡的影响 *

吴文林 钟永怡 周 泉 唐 杰 王家骥[△]

(广州医科大学公共卫生学院 广东 广州 511436)

摘要 目的:研究早孕因子单克隆抗体(EPF-McAb)对黑色素瘤细胞 A-375 增殖、凋亡的影响。**方法:**体外培养黑色素瘤细胞 A-375,通过 CCK-8 实验检测 EPF-McAb 对 A-375 细胞增殖的影响;通过流式细胞术检测 EPF-McAb 对 A-375 细胞凋亡的影响;Western Blot 检测 EPF-McAb 对 A-375 细胞 EPF 蛋白表达的影响。**结果:**CCK-8 结果显示 EPF-McAb 可以抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖,且随着作用时间延长和药物浓度的增加,对 A-375 细胞增殖的抑制作用也增强;流式细胞术实验结果显示 EPF-McAb 可以促进黑色素瘤细胞 A-375 的凋亡,且凋亡率随着药物浓度的增加而升高,0.2、0.4、0.8 mg/mL 的 EPF 单抗作用于 A-375 细胞 24 h 后,细胞凋亡率分别为:14.68 % ($P<0.01$)、19.81 % ($P<0.01$)、23.97 % ($P<0.01$);Western Blot 实验结果显示 EPF-McAb 可以降低黑色素瘤细胞 A-375 EPF 蛋白的表达。**结论:**早孕因子单克隆抗体可以抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖,并促进其凋亡。

关键词:早孕因子;单克隆抗体;黑色素瘤

中图分类号:R-33;R739.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)05-820-04

Effect of Monoclonal Antibody against Early Pregnancy Factor on Proliferation and Apoptosis of Melanoma cell A-375*

WU Wen-lin, ZHONG Yong-yi, ZHOU Quan, TANG Jie, WANG Jia-ji[△]

(School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 511436, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of early pregnancy factor monoclonal antibody (EPF-McAb) on proliferation and apoptosis of melanoma cell A-375. **Methods:** CCK-8 experiment, flow cytometry and Western Blot were conducted on cultured melanoma cells A-375 in vitro to understand the effect of EPF-McAb on proliferation, apoptosis and protein expression of A-375 cells respectively. **Results:** CCK-8 results showed that EPF-McAb could inhibit the proliferation of A-375 in melanoma cells, and the effect was also enhanced with the prolongation of action time and the increase of drug concentration. The results of flow cytometry showed that EPF-McAb could promote the apoptosis of A-375 in melanoma cells, and the rate of apoptosis was associated with the drug concentration. The increase of 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL EPF monoclonal antibody on A-375 cells 24 h, the cell apoptosis rate was 14.68% ($P<0.01$), 19.81% ($P<0.01$), 23.97% ($P<0.01$); Western Blot experimental results showed that EPF-McAb can reduce the expression of A-375 EPF protein in melanoma cells. **Conclusion:** EPF-McAb can not only inhibit the proliferation of melanoma cell A-375, but also promote its apoptosis.

Key words: Early pregnancy factor; Monoclonal antibody; Melanoma

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-820-04

前言

黑色素瘤,又称恶性黑色素瘤,是常见的皮肤肿瘤之一,其恶性程度高,临床预后较差,死亡率较高^[1]。恶性黑色素瘤在欧美国家发病率较高,在亚洲地区相对较低,但是近年来,我国黑色素瘤的发病率呈显著上升趋势^[2,3],其传统的治疗方法,手术治疗、放疗、化疗等,治疗效果均不佳^[4],随着分子生物学的发展,逐渐开展了对黑色素瘤的靶向治疗^[5,6],早孕因子(EPF)是在妊娠早期哺乳动物血清中存在的一种分泌性蛋白,由澳大利亚

学者 Morton 在实验中发现并命名^[7]。研究报道 EPF 主要是通过纯化的方法从人^[8]、猪^[9]、牛^[7,10]、羊^[11]、血小板^[12]、胚胎培养基^[13,14]等生物标本中提取而来,随着研究深入,有学者发现黑色素瘤患者和一些恶性生殖细胞肿瘤患者的体内也存在早孕因子^[15-17]。本研究旨在制备早孕因子单克隆抗体,然后将其作用于黑色素瘤细胞,探讨 EPF 单克隆抗体用于治疗黑色素瘤的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目:广东省自然科学基金项目(2015A030313455)

作者简介:吴文林(1992-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤免疫学,E-mail: wuwenlin2020@163.com

△ 通讯作者:王家骥(1955-),硕士生导师,教授,主要研究方向:全科医学,E-mail: wjiagi@163.com

(收稿日期:2018-07-07 接受日期:2018-07-30)

人恶性黑色素瘤细胞 A-375 购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清、DMEM 及 0.25 %胰酶购自 Gibco 公司;EPF 单克隆抗体是由本实验室前期通过杂交瘤细胞技术制备而来;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物科技股份有限公司;细胞裂解液及 PMSF 购自上海碧云天生物技术有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京鼎国生物科技有限责任公司;ECL 发光液购自美国 millipore 公司;倒置显微镜购自德国 Leica 公司;流式细胞仪购自美国 Beckman 公司;凝胶成像分析系统购自美国 Azure 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 配制含 15 %胎牛血清 (FBS)+DMEM 培养基 +1 %PS 的培养液。从液氮罐中取出 A-375 冻存管,迅速转移至 37℃ 水浴锅中,快速晃动冻存管,使得细胞快速融化。待冻存管内液体有融化迹象时,取出冻存管,进入细胞房,吸出液体至 15 mL 离心管中,加 10 mL 细胞培养液到离心管并轻轻吹打混匀,1000 rpm 离心 5 min。弃去上清液,加入 1 mL 细胞培养液重悬细胞,将细胞悬液移至培养瓶内,加入 4 mL 细胞培养液,放置 37℃,5 % CO₂ 培养箱中培养。当细胞长满细胞瓶时,用 PBS 洗涤三遍,再用 0.25 %胰酶消化传代。

1.2.2 CCK-8 法检测 A-375 细胞活性 常规培养 A-375 细胞,待其长至对数生长期时,用胰酶进行消化,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,将 A-375 细胞接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L,置于 37℃,5 % CO₂ 培养箱中培养 24 h,将培养液更换为含 EPF 抗体的培养液悬液,共设置 6 个药物浓度,每个浓度设置 3 复孔,每孔加入含 EPF 抗体的培养液 100 μ L,药物浓度分别为:0,0.05,0.1,0.2,0.4,0.8 mg/mL,分别继续培养 24 h,48 h,72 h,吸去孔内旧培养液,每孔分别加入培养液 90 μ L 和 CCK-8 10 μ L,置于细胞培养箱中孵育 2 h,酶标仪 450 nm 处测定吸光值(OD 值)。计算细胞生长抑制率。

细胞生长抑制率 = $1 - (\text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$

1.2.3 流式细胞术检测 A-375 细胞凋亡情况 将 A-375 细胞接种于培养瓶中,培养箱培养 24 h 后,将培养液更换为含 EPF 抗体的培养液,EPF 抗体浓度分别为:0,0.2,0.4,0.8 mg/mL,24 h 后,倒掉培养液,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,1000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入 500 μ L 的 Binding Buffer 重悬细胞,充分混匀后移至流式管中,然后再加入 5 μ L Annexin V-FITC,充分混匀,加入 5 μ L Propidium Iodide,充分混匀后室温避光反应 15 min,于 1 h 内进行流式细胞仪检测 A-375 细胞凋亡率。

1.2.4 Western Blot 检测 EPF 蛋白的表达 (1)细胞总蛋白提取:将 A-375 细胞以相同密度种植于 2 个培养瓶中,细胞培养箱内培养 24 h 后,分别加入普通培养液和含 0.8 mg/mL EPF 抗体的培养液。24 h 后,倒掉培养液,PBS 洗涤三次,按 1 mL 裂解液加 10 μ L PMSF 配制裂解工作液,每瓶细胞加 500 μ L 工作液,于冰上裂解 30 min,期间需要经常晃动培养瓶,使细胞充分裂解。裂解完成之后,用干净的细胞刮将细胞刮到培养瓶的侧面,然后将细胞碎片和裂解液用枪转移到 1.5 mL EP 管中,4℃ 12000 rpm 离心 5 min,收集上清,测定浓度后保存。(2)SDS-PAGE 电泳:选用 4~20%蛋白预制胶,每孔上样蛋白 30~50 μ g,对照孔加入 4 μ L 预染的 Marker,恒压 140 V 电泳至溴

酚蓝到达凝胶底部上方约 0.5 cm,关闭电源。(3)转膜、封闭:转膜结束后,用 TBST 洗涤膜 3 次,参考蛋白预染 Marker,分别剪取 42 kD 和 12 kD 条带的膜,加入配制好的 5 %脱脂奶粉溶液,放在摇床上封闭 1 h;(4)孵育一抗:将 EPF 单克隆抗体用 TBST 稀释至适当浓度,将 42 kD 和 12 kD 条带的膜分别放入含有 beta-actin 和 EPF 抗体的孵育盒中,放入 4℃ 冰箱过夜。(5)孵育二抗:第二天取出膜,用 TBST 清洗膜 3 次,放入含有辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 的孵育盒中,室温下置于摇床中孵育 2 h。(6)ECL 显影:将 A 液和 B 液两种试剂在 5 mL EP 管中等体积避光混合,用滤纸吸去膜上的液体,将混合液均匀滴在膜上,将膜放入仪器中曝光,保存结果。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件对结果进行统计学分析,均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EPF 单克隆抗体抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖

应用 CCK8 检测不同浓度的 EPF 单克隆抗体在不同时间点对黑色素瘤细胞 A-375 的作用。实验结果如图 1 所示,EPF 单克隆抗体能抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖,特别是当抗体浓度增加至 0.2 mg/mL 以后,抑制 A-375 细胞增殖作用更加明显($P < 0.01$),另外我们还发现 EPF 单克隆抗体抑制 A-375 细胞的增殖呈时间和浓度依赖性,即随着作用时间延长和药物浓度的增加,对 A-375 细胞增殖的抑制作用也增强。

2.2 EPF 单克隆抗体促进黑色素瘤细胞 A-375 的凋亡

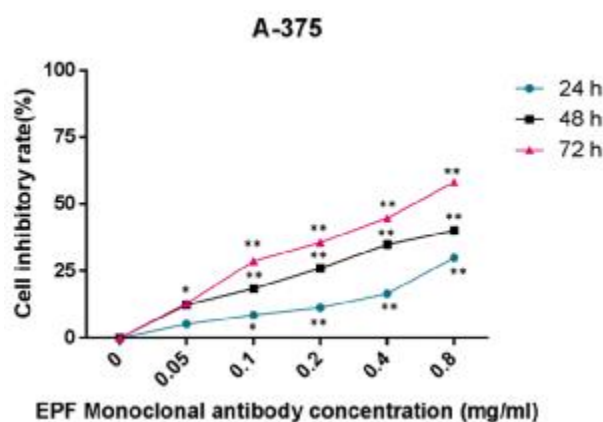


图 1 EPF 单克隆抗体对 A-375 细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of EPF monoclonal antibody on the proliferation of A-375 cells

Note: Compared with the control group, * indicated $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

应用流式细胞术检测 EPF 单克隆抗体对黑色素瘤细胞 A-375 凋亡的影响。实验中,EPF 单克隆抗体预处理细胞 24 h 后,再收集 A-375 细胞进行 Annexin V-FITC 和 Propidium Iodide 双标记染色后,上流式细胞仪进行凋亡检测。研究发现,与空白对照组相比,EPF 单克隆抗体可明显促进 A-375 细胞的凋亡,且凋亡率随着药物浓度的增加而升高。0.2、0.4、0.8 mg/mL 的 EPF 抗体作用于 A-375 细胞 24 h 后,A-375 细胞凋亡率逐渐增加,分别为:14.68 % ($P < 0.01$)、19.81 % ($P < 0.01$)、23.97 % ($P < 0.01$),如图 2 所示。

2.3 Western Blotting 检测 EPF 蛋白的表达

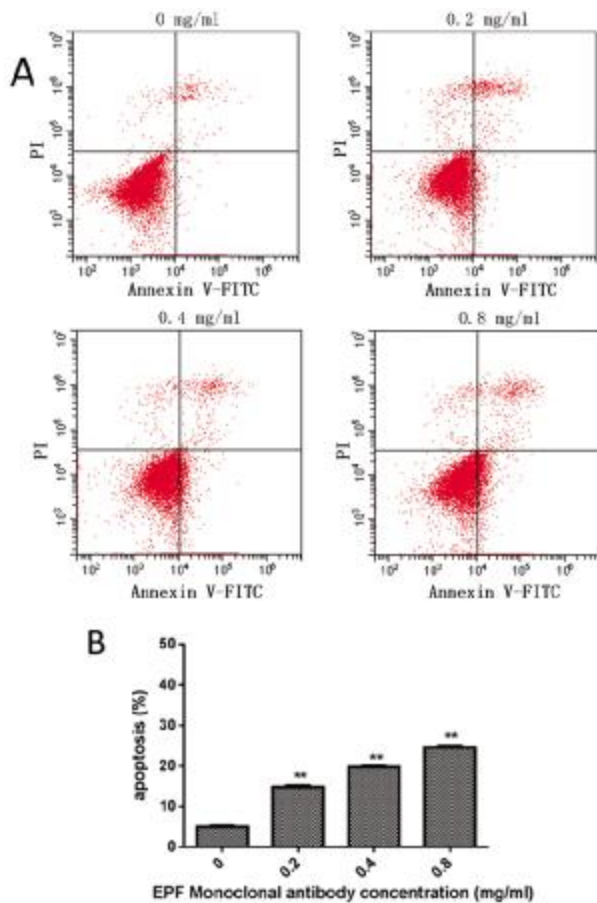


图2 EPF 单克隆抗体对 A-375 细胞促进凋亡作用的影响

Fig.2 Effect of EPF monoclonal antibody on apoptosis of A-375 cells

Note: Compared with the control group, * indicated $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

为了进一步证实 EPF 单克隆抗体对黑色素瘤细胞 A-375 的促进凋亡作用,我们应用 Western Blotting 来检测 EPF 蛋白的表达。分别用 0、0.8 mg/mL EPF 单克隆抗体预处理 A-375 细胞 24 h 后,提取收集细胞总蛋白,然后进行 Western Blotting 检测 EPF 蛋白的表达情况,结果如图 3 所示,0.8 mg/mL 组的 EPF 蛋白的表达量明显低于不加 EPF 抗体组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

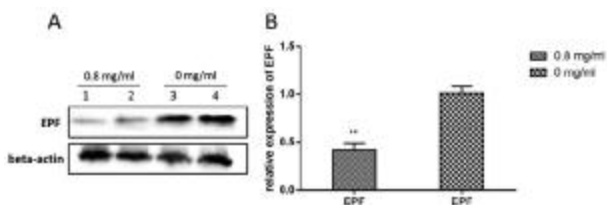


图3 EPF 单克隆抗体作用于 A-375 细胞后 EPF 蛋白的表达情况

Fig.3 Expression of EPF after EPF monoclonal antibody acting on A-375 cells

Note: Compared with the control group, * indicated $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

黑色素瘤恶性程度极高,临床预后较差,死亡率较高,其传统的治疗方法有手术治疗、放疗、化疗等。黑色素瘤是一种转移率高、病情发展迅速的肿瘤疾病,很多患者发现时已到晚期,或

发病后迅速发展到晚期,这使得手术切除的治疗方法非常局限^[18]。黑色素瘤对于化疗和放疗都不敏感,达卡巴嗪是美国 FDA 批准的晚期黑色素瘤的首选药物,然而其客观有效率还不足 15 %^[19,20]。由于这些治疗手段的肿瘤反应率低,对于恶性黑色素瘤的治疗仍然需要寻找新的治疗策略。

随着分子生物学的发展,逐渐开展了对黑色素瘤的靶向治疗^[5],研究发现恶性黑色素瘤患者血清中能检出 EPF,组织中 EPF 高表达。研究显示,EPF 具有免疫抑制的功能,EPF 通过与淋巴细胞结合而抑制淋巴细胞功能^[21];EPF 还可以降低某些粘附分子的活性,而这些粘附分子是淋巴细胞活化的必需因素^[22]。EPF 还具有生长调节作用,对体内 DNA 的合成和细胞分裂有重要的支持作用,抗 EPF 抗体处理小鼠后其对胸腺嘧啶的摄取量明显下降^[23]。这些提示黑色素瘤中 EPF 高表达,一方面可以使得其逃避机体免疫,另一方面可以促进自身肿瘤细胞的生长。制备出抗 EPF 抗体并将其应用于黑色素瘤,是一种很好的靶向治疗方法,且 EPF 单克隆抗体在肿瘤治疗方向的探索已取得一些成果,如 Quinn 等^[24]发现 EPF-McAb 可以抑制 MCA-2 瘤细胞的增殖。本研究利用 EPF-McAb 特异性结合 EPF 蛋白的特性,从体外层面研究 EPF 对黑色素瘤细胞增殖和凋亡的影响。

细胞癌化主要是因为抑癌基因的突变,或者是细胞过度增殖、凋亡调节机制紊乱引起的细胞永久繁殖,其中细胞增殖是衡量肿瘤生长的一个重要指标,同时也可以衡量抗癌药物的抑癌率^[25,26]。本研究运用 CCK-8 检测 EPF-McAb 对 A-375 黑色素瘤细胞增殖的作用,研究结果显示,EPF-McAb 能抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖,且其抑制作用呈时间和浓度依赖性,随着作用时间延长和药物浓度的增加,对 A-375 细胞的抑制作用也增强。细胞凋亡不同于细胞坏死,它是机体为了维护自身稳定,由基因控制的细胞程序性死亡,细胞凋亡是肿瘤治疗的有效路径。本研究流式细胞术结果显示,EPF-McAb 能促进 A-375 细胞的凋亡,且凋亡率随着药物浓度的增加而升高,细胞凋亡率分别为:14.68 %、19.81 %、23.97 %。研究结果提示,EPF-McAb 抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖,可能是通过促进 A-375 的凋亡来实现。Western Blot 实验结果显示 EPF-McAb 可以降低黑色素瘤细胞 A-375 EPF 蛋白的表达,EPF-McAb 使肿瘤细胞体外生长受到限制,可能是由于 EPF-McAb 干扰了维持肿瘤细胞增殖活性阶段的机制^[24]。EPF 具有免疫抑制作用,主要抑制淋巴细胞功能,而且 EPF 与肿瘤生长有关^[27,28],用 EPF-McAb 去中和 EPF 蛋白,可能减轻 EPF 对免疫系统的抑制作用,从而抑制 A-375 黑色素瘤细胞的增殖。

综上所述,本研究结果表明 EPF 单克隆抗体可以抑制黑色素瘤细胞 A-375 的增殖、促进 A-375 的凋亡,其作用机制可能与抑制 EPF 蛋白的表达有关。本研究为 EPF 单克隆抗体在黑色素瘤方面的应用提供了一定的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] Nikolaou V A, Stratigos A J, Flaherty K T, et al. Melanoma: New Insights and New Therapies [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2012, 132(302): 854-863
- [2] Eggermont A M, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma [J]. Lancet, 2014, 383(9919): 816-827
- [3] 乌新春. 恶性黑色素瘤的研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25

- (3): 309-312
- [4] Mohamed A, Gonzalez R S, Lawson D, et al. Tumor stem cells (CD271, c-kit, SOX10) in Melanomas: prognostic and outcome implications[J]. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* Aimm, 2015, 22(2): 142-145
- [5] 罗小美, 陈继冰, 牛立志. 靶向免疫治疗联合放射治疗在晚期黑色素瘤中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, (4): 255-258
- [6] Bol K F, Figdor C G, Aarntzen E H, et al. Intranasal vaccination with mRNA-optimized dendritic cells in metastatic melanoma patients[J]. *OncoImmunology*, 2015, 4(8): e1019197
- [7] Morton H, Hegh V, Clunie G J A. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test [J]. *Nature*, 1974, 249(5456): 459-460
- [8] Clarke F M, Morton H, Clunie G J. Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy [J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 1978, 32(2): 318-323
- [9] H M, Dj M, F E. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig [J]. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1983, 69(2): 437-446
- [10] Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. Application of anti-bovine CD2 monoclonal antibody to the rosette inhibition test for detection of early pregnancy factor in cattle [J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1995, 57(4): 721-725
- [11] Clarke F M, Morton H, Rolfe B E, et al. Partial characterisation of early pregnancy factor in the sheep [J]. *Journal of Reproductive Immunology*, 1980, 2(3): 151-162
- [12] Cavanagh A C, Halle M. The purification of early pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2010, 222(2): 551-560
- [13] Cavanagh A C. Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity [J]. *J Reprod Fertil*, 1984, 71(2): 581-592
- [14] Cavanagh A C. Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role[J]. *Rev Reprod*, 1996, 1(1): 28-32
- [15] Rolfe B E, Morton H, Cavanagh A C, et al. Detection of an Early Pregnancy Factor-Like Substance in Sera of Patients With Testicular Germ Cell Tumors [J]. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1983, 3(2): 97-100
- [16] 张冬云, 王家骥, 杨英, 等. 肿瘤源性早孕因子的筛选、纯化及鉴定[J]. *中国生化药物杂志*, 2002, 23(1): 3-6
- [17] 王敏华, 苏宝田. 恶性滋养叶细胞肿瘤患者血清中早孕因子样物质的初步提纯[J]. *安徽医科大学学报*, 1992, (2): 98-101
- [18] 张永慈, 周圆, 杨铭, 等. 人黑色素瘤细胞裸鼠肺转移模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(1): 1-4
- [19] Yang A S, Chapman P B. The history and future of chemotherapy for melanoma[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009, 23(3): 583-597
- [20] Hersh E M, O'day S J, Ribas A, et al. A phase 2 clinical trial of nab-paclitaxel in previously treated and chemotherapy-naïve patients with metastatic melanoma[J]. *Cancer*, 2010, 116(1): 155-163
- [21] Akyol S, Gerceltaylor C, Reynolds L C, et al. HSP-10 in ovarian cancer: expression and suppression of T-cell signaling [J]. *Gynecologic Oncology*, 2006, 101(3): 481-486
- [22] Harness J, Cavanagh A, Morton H, et al. A protective effect of early pregnancy factor on experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rats by inoculation with myelin basic protein[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2003, 216(1): 33-41
- [23] Quinn K A, Cavanagh A C, Hillyard N C, et al. Early pregnancy factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats: relationship with chaperonin 10[J]. *Hepatology*, 1994, 20(5): 1294-1302
- [24] Quinn K A, Morton H. Effect of monoclonal antibodies to early pregnancy factor (EPF) on the in vivo growth of transplantable murine tumours[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 1992, 35(3): 223-223
- [25] 郭双平, 王丽, 王文亮, 等. 抑癌基因 PTEN 在肝癌组织中的突变及其对肝癌细胞增殖和凋亡的调控作用 [J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(8): 467-472
- [26] 王光辉. 三类天然化合物的抗癌活性机制研究[D]. 沈阳药科大学, 2007
- [27] Quinn K A, Athanasas-Platsis S, Wong T Y, et al. Monoclonal antibodies to early pregnancy factor perturb tumour cell growth[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2010, 80(1): 100-108
- [28] 张改平, 王爱萍, 凯权, 等. 早孕因子中具有免疫抑制作用的关键活性肽段 [M]. 2009