

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.001.html>

◇基础医学研究◇

重组抗人表皮生长因子受体人源化单克隆抗体注射液对 Bcap37 人乳腺癌细胞生长的抑制作用

曹玉婷^{1,2}, 王珊珊², 杨德宣², 李琳娜², 袁守军^{1,2}

摘要 目的 观察重组抗人表皮生长因子受体人源化单克隆抗体注射液(MIL41)对 Her2 高表达人乳腺癌细胞体内外的抑制作用。方法 通过流式细胞仪分析人乳腺癌细胞 Bcap37 中 Her2 受体的表达量, CCK8 法测定 MIL41 在体外对乳腺癌细胞 Bcap37 生长的抑制作用; 在体内研究中采用人乳腺癌细胞裸鼠皮下移植瘤模型的建立评价 MIL41 对肿瘤生长的抑制作用。结果 体外实验表明 Bcap37 为 Her2 受体过表达的人乳腺癌细胞, CCK8 法检测结果显示 MIL41 对受试细胞 Bcap37 的生长有较强抑制作用。体内实验表明受试药 MIL41 对受试的人乳腺癌细胞 Bcap37 的裸鼠皮下移植瘤的生长有明显的抑制效应, 同时呈现出良好的浓度依赖关系。分别给予 3、6、12 mg/kg 不同浓度的受试药, 其瘤体抑制率分别为 33.7%、47.8%、59.0%, 瘤重抑制率分别为 29.6%、44.7%、55.6%。结论 MIL41 对 Bcap37 人乳腺癌细胞在体内外的生长有较强的抑制作用。

关键词 表皮生长因子; 单克隆抗体; Her2; Bcap37; 乳腺癌; 抗肿瘤活性

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1555-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.001

在女性群体中乳腺癌是所有恶性肿瘤中发病率及死亡率极高的癌症^[1], 其中 20%~30% 的乳腺癌患者的表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor-2, Her2)为阳性^[2-4]。对于 Her2 阳性乳腺癌患者, 恶性程度高、易发生转移、复发率高、预后较差。Her2 受体是有受体酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白, 属于表皮生长因子受体家族^[5], 研究^[6]表明其在多数恶性肿瘤细胞的转化中起关键性作用, 以表皮生长因子受体 Her2 为单克隆抗体作用靶

点的药物在临床中已成功运用, 但是 Her2 其他抗原表位的单克隆抗体仍是研究中所关注的热点。北京天广实生物技术股份有限公司研发的重组抗人表皮生长因子受体人源化单克隆抗体注射液(MIL41)是靶向 Her2 受体新型抗原表位的单克隆抗体, 其作用机制与 Pertuzumab 较为相似。该研究以 Trastuzumab、Pertuzumab 为阳性药, 对 MIL-41 作用于 Her2 过表达乳腺癌细胞的体外及体内抗肿瘤作用进行药效学评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂 MIL-41 购于北京天广实生物技术股份有限公司; Trastuzumab(上海罗氏制药有限公司, 批号: B3457, 稀释批号: B2040, 分滤批号: SH0006); Pertuzumab(规格: 30 mg/瓶, 北京天广实生物技术股份有限公司无菌分装)。RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司); Her2/NEU PE 荧光单克隆抗体[美国碧迪医疗器械(上海)有限公司]; CCK8 检测液(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 气体培养箱(德国贺立氏仪器公司); 倒置显微镜(重庆重光食品公司); 流式细胞检测仪(美国 Beckman Coulter 公司); Multiskan Ascent 酶标仪(芬兰 Thermo Labsystems 公司)。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄 BALB/c 裸鼠, SPF 级, 17.0~22.0 g, 雌性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。受试动物饲养于无菌的独立送风 IVC 笼中, 饲以专门为小鼠配制的消毒饲料, 自由饮用纯净水。动物实验室内温度约 25℃, 相对湿度 40%~70%, 每日光照 12 h。

1.1.4 肿瘤细胞株 Bcap37 人乳腺癌细胞, 购自中国医学科学院细胞中心, 由军事医学科学院放射与辐射医学研究所肿瘤药理室传代、保存。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 接种细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中(补充青、链霉素各 100 μl/ml), 置

2016-07-10 接收

基金项目: 国家重大新药创新科技重大专项综合新药研究开发技术大平台项目(编号: 2012ZX09301003-001)

作者单位: ¹安徽医科大学研究生院, 合肥 230032

²军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850

作者简介: 曹玉婷, 女, 硕士研究生;

袁守军, 男, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

ysjyuan@139.com

于 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中,每隔 1~2 d 换液 1 次。0.25% 胰蛋白酶消化,传代和收集细胞。

1.2.2 流式细胞仪检测 Her2 受体将待检细胞用胰蛋白酶消化,取 10⁵~10⁶ 个细胞 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,收集细胞。PBS 洗 2 遍,用 0.05 ml PBS 将细胞混悬备用。将 Her-2 PE 荧光素标记抗体 5 μl 加入细胞悬液中,室温下孵育 30 min。将孵育好的细胞悬液 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用 0.05 ml PBS 混悬检测。

1.2.3 CCK8 法检测细胞增殖 将对数生长期细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 细胞培养液配制成 2.5 × 10⁴ /ml 的细胞悬液,按每孔 2 000~4 000 个细胞(100 μl)加入到 96 孔细胞培养板中,培养 24 h 后,每孔加入含有不同浓度(1 500、750、375、187.5、93.75、46.875、23.437 5 μg/ml) 受试药物的培养基 100 μl,每个浓度设 4 个平行孔。培养 72 h 后,每孔加入 10 μl CCK8 检测液,37 ℃ 培养 2~4 h 后用酶标仪检测吸光度(optical density, OD) 值,检测波长为 450 nm。按方法进行 1 次重复性实验。

1.2.4 皮下移植瘤实验 将对数生长期的 Bcap37 细胞用胰酶消化收集,并用 PBS 洗涤重悬,悬液浓度 >5 × 10⁷ 个细胞/ml,将 0.2 ml 的肿瘤细胞悬液注射于裸鼠右腋皮下,建立传代荷瘤鼠模型。传代保种裸鼠皮下肿瘤生长体积至 1 000~1 500 mm³ 时,无菌条件下取出瘤块,将其切成约(1.0 × 1.0 × 1.0) mm³,并接种于裸鼠右前肢腋部皮下。待皮下移植瘤体积达到 100~150 mm³ 时,按照肿瘤体积随机分组。

MIL41 对人乳腺癌细胞 Bcap37 细胞系裸鼠皮下移植瘤生长的影响,各受试药组药剂量为 3、6、12 mg/kg,尾静脉注射给药,每周给药 2 次,连续给药 3 周。每 2~3 d 测定动物体重及肿瘤体积,记录肿瘤体积变化。肿瘤瘤重生长抑制率(%) = (对照组瘤重 - 给药组瘤重) / 对照组瘤重 × 100%。肿瘤体积 = 0.5ab² (a = 肿瘤长径; b = 肿瘤短径)

1.3 统计学处理 采用 Origin 8.5 软件及 Graph-Pad Prism 5 软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组样本间两两比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式检测 Her2 表达量结果 实验结果表明经过抗体标记 Bcap37 细胞的 Her2 表达量为 95.0%;与 Her2 高表达细胞 BT474 相比,人乳腺癌

细胞 Bcap37 为 Her2 受体表达量较高的细胞。见图 1。

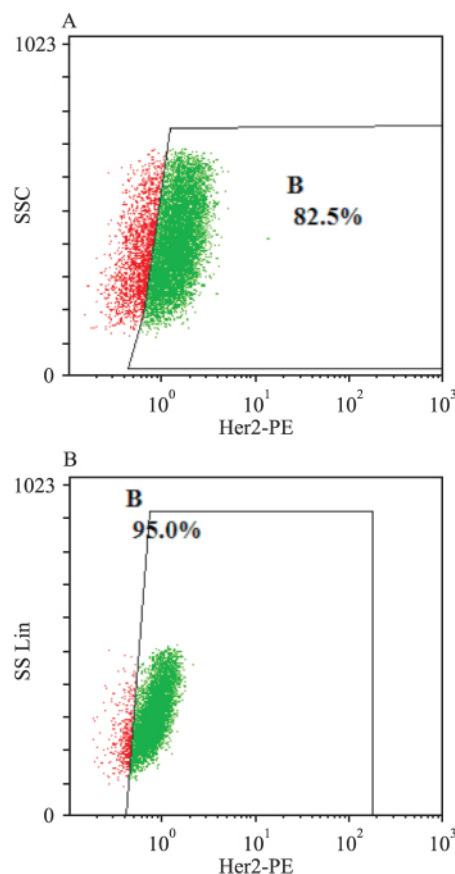


图 1 流式细胞术检测 Bcap37 细胞 Her2 表达量

A: BT474 细胞 Her2 受体表达量; B: Bcap37 细胞 Her2 受体表达量

2.2 MIL41 对 Bcap37 细胞增殖的影响 CCK8 法实验结果表明 MIL41 对 Her2 受体过表达的细胞 Bcap37 的生长抑制作用呈现良好的浓度依赖关系,受试药物设置浓度基本涵盖了药物效应窗口。通过比较发现, MIL41 对肿瘤细胞增殖抑制率与阳性药相当,差异无统计学意义。同时, MIL41 对肿瘤细胞增殖的抑制呈现剂量依赖性。见表 1。

2.3 MIL41 抑制 Bcap37 细胞裸鼠皮下移植瘤生长 实验结果显示, MIL41 对人乳腺癌 Bcap37 裸鼠皮下移植瘤生长有明显抑制作用。从体内的药效结果可以看出,在相同剂量情况下, MIL41 在体内的抗肿瘤药效略高于阳性药组。在试验中动物未出现死亡,说明 MIL41 无毒性。见表 2、图 2~4。

3 讨论

人表皮生长因子受体 Her2 是有酪氨酸激酶活性的表皮生长因子家族中的一员,其受体的聚合作

表1 MIL41 对细胞生长的抑制效应

浓度(μg/ml)	抑制率(%)					
	第1次			第2次		
	MIL41	Pertuzumab	Trastuzumab	MIL41	Pertuzumab	Trastuzumab
空白对照组	—	—	—	—	—	—
1 500	56.5	54.5	55.5	54.2	51.0	53.8
750	43.9	39.4	40.3	53.9	49.7	50.5
375	44.2	31.8	34.9	48.6	45.7	46.8
187.5	39.6	24.0	31.2	46.2	39.2	41.8
93.75	31.8	22.6	26.4	43.7	33.9	33.5
46.875	24.6	21.2	26.3	30.1	26.0	19.9
23.437 5	12.5	11.1	15.2	21.3	20.5	17.1

表2 MIL41 对人乳腺癌细胞 Bcap-37 裸鼠皮下移植瘤生长抑制影响($n=8 \bar{x} \pm s$)

组别	宿主(nu/nu) 反应			肿瘤反应			
	平均体重(g)		最大体重变化 (%, 第n天)	瘤重(g)	瘤重抑 瘤率(%)	瘤体积 (mm ³)	瘤体积 抑制率(%)
	第1天	第19天					
空白对照	20.89 ± 1.43	21.61 ± 2.99	+5.8, 第12天	1.333 1 ± 0.405 7	—	1 371.95 ± 433.71	—
Trastuzumab	22.14 ± 1.24	21.65 ± 2.44	+2.2, 第5天	0.748 3 ± 0.287 0**	43.9	740.39 ± 253.73**	46.0
Pertuzumab	22.39 ± 1.24	22.06 ± 1.14	+1.1, 第17天	0.764 2 ± 0.300 8**	42.7	778.12 ± 315.79**	43.3
MIL41 3 mg/kg	21.31 ± 1.68	22.41 ± 2.32	+7.8, 第17天	0.938 5 ± 0.321 9*	29.6	909.57 ± 350.44*	33.7
MIL41 6 mg/kg	22.35 ± 1.47	22.53 ± 3.54	+5.9, 第8天	0.736 6 ± 0.448 1*	44.7	716.02 ± 428.23**	47.8
MIL41 12 mg/kg	21.89 ± 1.80	21.95 ± 2.90	+9.9, 第17天	0.591 6 ± 0.230 5**	55.6	562.05 ± 252.52**	59.0

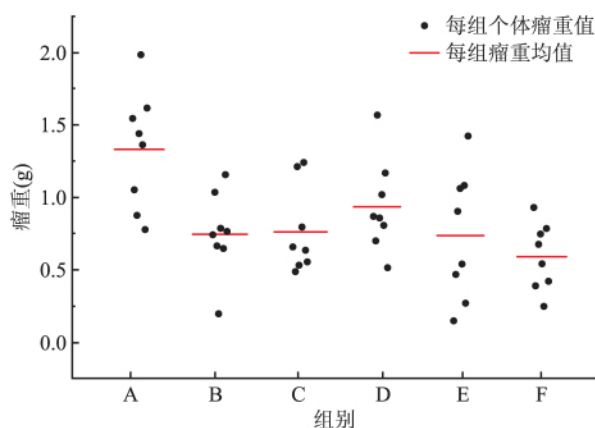
与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图2 MIL41 对人乳腺癌细胞 Bcap-37

裸鼠皮下移植瘤生长的抑制作用

A: 空白对照; B: Trastuzumab; C: Pertuzumab; D: MIL41 3 mg/kg;

E: MIL41 6 mg/kg; F: MIL41 12 mg/kg

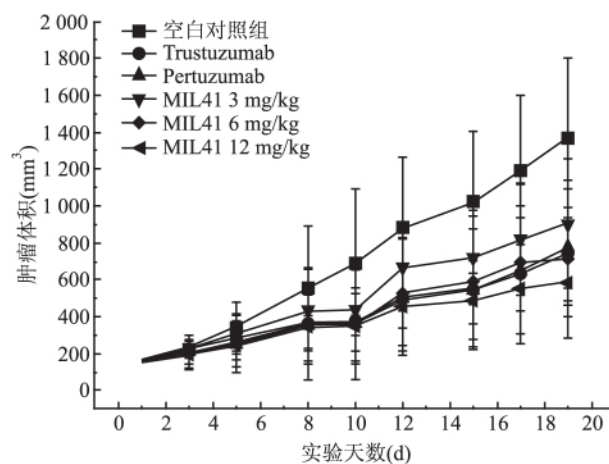


图4 MIL41 对人乳腺癌细胞 Bcap-37

裸鼠皮下移植瘤体积生长的影响

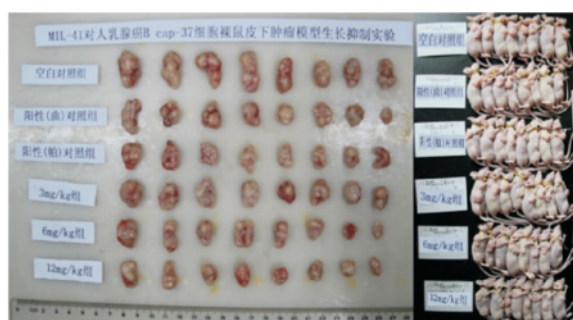


图3 MIL41 对人乳腺癌细胞 Bcap-37

裸鼠皮下移植瘤生长抑制作用

用会导致酪氨酸残基的磷酸化,启动多种信号通路导致细胞的增生和肿瘤的发生发展。Her2 在 25% 的乳腺癌患者体内为高表达^[7], Her2 可以通过下游靶点来增加癌细胞的转移能力使得 Her2 阳性的乳腺癌更有侵袭能力^[8] 以及参与细胞的生长、增殖和凋亡等功能性调节^[9]。随着分子生物学的发展,抗癌靶向药物成为研究的热点。在乳腺癌治疗中,除了传统的手术、放化疗等治疗方法外,靶向治疗成了一种新型的治疗手段^[10],靶向药物也相继问世,如通过与 HER2 受体结合后干扰其自身磷酸化及阻碍

相应异源二聚体形成的 Trastuzumab ,以及第一个被称作“HER 二聚化抑制剂”的单克隆抗体 Pertuzumab。因此在临床中凡检测到 Her2 过表达的患者都应接受抗 Her2 的治疗^[11]。

本研究中将 MIL41 对乳腺癌 Bcap37 细胞体外及体内进行系统的药效评价。以 Her2 受体高表达细胞 BT474 作为检测 Bcap37 细胞 Her2 表达量的对照发现 ,Bcap37 细胞中 Her2 高表达。体外实验结果显示 ,随着药物浓度的增加对 Bcap37 细胞生长抑制作用明显增强 ,体现出浓度依赖性。在体内实验中 ,荷瘤鼠给予 MIL41 药物治疗后 ,肿瘤生长明显缓解 ,通过瘤重抑制率来看 ,存在明显的统计学差异。实验结果表明 MIL41 对 Her2 过表达乳腺癌 Bcap37 的生长有较好的抑制作用 ,体现了良好的抗癌活性 ,为相关的基础研究提供了药效数据 ,同时也为临床研究提供依据。目前 ,MIL41 已被批准进入临床阶段研究 ,有望成为治疗肿瘤中 HER2 高表达新型靶向药物。

参考文献

- [1] 周佳丽 , 颜蕴文 , 江巧玲 , 等. 全反式维甲酸及其衍生物对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报 , 2015 , 50(2) : 154 - 7.
- [2] Yin K , Cao Y J. Study on efficacy and safety of trastuzumab chemotherapy for the treatment of human epidermal growth factor receptor-2 positive breast cancer [J]. Chin J Clin Pharmacol , 2015 , 31(9) : 725 - 7.
- [3] Zhong A S. Clinical application of second-line scheme containing trastuzumab in HER2-positive breast cancer and security analysis [J]. Practical J Cancer 2014 , 29(9) : 1121 - 3.
- [4] 刘 君 , 杨艳芳 , 顾 林. 曲妥珠单抗在 HER-2 阳性乳腺癌新辅助治疗中的应用研究进展 [J]. 中国肿瘤临床 , 2014 , 41(16) : 1065 - 8
- [5] Li W , Pan Y , Li X J. Research progresses in resistance mechanisms to trastuzumab for HER 2 positive breast cancer and novel molecular targeted therapeutic strategies [J]. Chin J Clin Pharmacol 2014 , 30(1) : 48 - 51.
- [6] Liu P P , Liao H H , Liu W X , et al. Development method for determination of biological activity of anti-epithelial growth factor receptor monoclonal antibody [J]. Chin J Biologicals , 2015 , 28(4) : 414 - 7.
- [7] Recondo G Jr , Diaz Canton E , Vega M , et al. Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer: Perspectives and future directions [J]. World J Clin Oncol 2014 , 5(3) : 440 - 54.
- [8] Zhang L , Sullivan P S , Goodman J C , et al. MicroRNA-1258 suppresses breast cancer brain metastasis by targeting heparanase [J]. Cancer Res , 2011 , 71(3) : 645 - 54.
- [9] Ren Y X , Wang G L. The mechanism of HER2-amplified breast cancer with trastuzumab resistance and the research for novel therapy [J]. Chinese Bulletin Life Sci , 2012 , 24(5) : 421 - 7.
- [10] 徐 璐 , 曾 雪 , 张志强 , 等. 乳腺癌分子靶向治疗的现状与展望 [J]. 中国实用外科杂志 , 2015 , 35(7) : 790 - 3.
- [11] Mukai H. Treatment strategy for HER2-positive breast cancer [J]. Int J Clin Oncol , 2010 , 15(4) : 335 - 40.

Evaluation of anti-cancer effect of anti-epithelial growth factor receptor monoclonal antibody on human breast cancer Bcap37 cells

Cao Yuting^{1,2} , Wang Shanshan² , Yang Dexuan² , et al

(¹School of Graduate Studies , Anhui Medical University , Hefei 230032;

²Dept of Pharmacology and Toxicology , Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of anti-epithelial growth factor receptor monoclonal antibody(MIL41) on human breast cancer Bcap37 cell line *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The flow cytometry instrument was used to evaluate the level of Her2 expression in Bcap37 cells , the anti-cancer activity of MIL41 *in vitro* by CCK8 inspection , while the activity *in vivo* was evaluated by subcutaneous implanted tumors in nude mice model.

Results *In vitro* experiments showed the over-expression of Her2 in human breast cancer Bcap37 cells , meanwhile , the replicated CCK8 inspection showed the MIL41 had inhibitory effect in Bcap37 cells. The results showed that MIL41 had strong inhibitory effect in dose-dependent manner on human breast cancer Bcap37 xenotransplanted in nude mice. The inhibition rates of tumor volume were 33.7% , 47.8% and 59.0% when the administrated concentration was 3 , 6 , 12 mg/kg; moreover , the inhibition rates of tumor weight were 29.6% , 44.7% and 55.6% . **Conclusion** MIL41 could efficiently inhibit the proliferation of human breast cancer Bcap37 *in vivo* and *in vitro*.

Key words epithelial growth factor receptor; monoclonal antibody; Her2; Bcap37; human breast cancer; anti-cancer activity