

单克隆抗体 MGd1 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响 *

安艳新 任 贵 田启飞 赵青川[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究不同浓度的 MGd1 对外培养胃癌细胞 SGC-7901 增殖及凋亡的影响。方法:采用 MTT 法测定不同浓度 MGd1 对 SGC-7901 生长抑制作用,流式细胞术(FCM)进行细胞凋亡分析。激光共聚焦显微镜观察 MGd1 抗原(MGd1-Ag)的亚细胞定位。结果:MTT 结果显示不同浓度的 MGd1 均对 SGC-7901 细胞产生明显的抑制效应($P=0.02$),流式细胞术分析发现 MGd1 可诱导 SGC-7901 发生凋亡并呈浓度和时间依赖性($P<0.01$);共聚焦显微镜结果显示 MGd1-Ag 主要定位于细胞膜上。结论:以上结果证实胃癌特异性单抗 MGd1 可抑制 SGC-7901 的增殖并促进凋亡发生。它可能通过与细胞膜上抗原特异性结合,影响下游信号传导,从而发挥抑制效应。

关键词 单克隆抗体;MGd1;增殖;凋亡

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)08-1409-04

Effect of Monoclonal Antibody MGd1 on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cell SGC-7901*

AN Yan-xin, REN Gui, TIAN Qi-fei, ZHAO Qing-chuan[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology & Xijing Hospital of Digestive Diseases,

Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P.R.China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of MGd1 with different concentration on the cell proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods:** Cell proliferation was detected by MTT assay and cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. Subcellular localization of MGd1-Ag in SGC-7901 was detected by immunofluorescence staining using Laser scanning confocal microscope. **Results:** MGd1 could inhibit the cell proliferation and promote apoptosis of SGC7901 in dose- and time-dependent manners. The localization of MGd1-Ag was detected under confocal microscopy, and it showed that MGd1-Ag was mainly located in the membrane. **Conclusion:** MGd1 inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of SGC7901 by banding with MGd1-Ag.

Key Words: Monoclonal antibody; MGd1; Proliferation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC):R735.2 Document code:A

Article ID:1673-6273(2011)08-1409-04

前言

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其病死率在全球恶性肿瘤中居第二位^[1-2]。近年来随着对胃癌分子生物学研究的不断深入,分子靶向治疗已成为治疗胃癌的一种新手段。目前以 EGFR 和 VEGF 等为靶点的多株单克隆抗体类药物已成功用于临床^[3-7],如 Cetuximab(西妥昔单抗)、Trastuzumab(曲妥珠单抗)、Bevacizumab(贝伐珠单抗)等。但由于 EGFR、HER2R 等受体在胃癌中表达程度不均^[8],个体差异较大,在一定程度上影响了该类药物在胃癌中的广泛应用。因此,寻找胃癌特异性的分子靶点和药物是目前研究的重点。

MGd1 是本实验室制备的一株特异性抗胃癌单克隆抗体^[9]。本研究旨在通过 MTT 试验、流式细胞术等观察 MGd1 对胃癌细胞 SGC7901 增殖和凋亡的影响,进而为研发新的胃癌特异性靶向药物奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

人胃癌 SGC-7901 细胞(第四军医大学西京消化病医院,肿瘤生物学国家重点实验室,常规保存),RPMI1640 和胎牛血清均系美国 GIBCO 公司产品, MGd1 由本室制备,由北京博奥森生物技术有限公司纯化, DAPI 购自美国 Sigma 公司,噻唑蓝(thiazolylblue, MTT)购自美国 Biosharp 公司,多功能酶标仪(美国 Bio-Red 公司),激光共聚焦显微镜(FV1000, Olympus),流式细胞仪(Flow cytometer, FCM, 美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和实验分组 将胃癌 SGC-7901 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 完全培养液中,在含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行后续试验。实验分为对照组:不含 MGd1 的空白组,抗体对照组(同源小鼠 IgG),实验

* 基金项目:国家重点基础发展计划项目(973 计划)(No. 2009CB521705);国家自然科学基金(No.30971337)

作者简介:安艳新(1983-),男,硕士研究生,研究方向:单克隆抗体对胃肠道肿瘤作用的研究,电话:15002993710, E-mail: ayx1120@yahoo.cn。

通讯作者:赵青川, E-mail: qingzhao@hotmail.com。

(收稿日期:2011-01-23 接受日期:2011-02-18)

组 MGd1 分为 20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 三组。

1.2.2 MTT 法测定细胞增殖 取对数期生长 SGC-7901 细胞 胰酶消化后,调整细胞密度为 8×10³ cell/mL,每孔 200μL 接种于 96 孔板。待细胞贴壁后 吸去培养液 按分组给药,同时设空白调零组(只加入含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液)。每个浓度设 6 个复孔,每孔体积为 200 μL。常规培养 24、48 和 72 h。每孔加入新鲜配制的浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20μL,继续培养 4 h。弃去培养液,每孔加入 150 μL DMSO,在微量振荡器上振荡 10 min,充分溶解结晶后,用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度(A)值。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 MGd1 作用 24 和 48 h 后,收集细胞。将样品 1500 r/min 4 °C 离心 10 min,弃上清,用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。重悬细胞,调整密度为 1×10⁶ cell/mL。取 195μL 细胞悬液和 5 μL AnnexinV-FITC 轻轻混匀,间隔 3 min 后,加入 10μL 20 μg/mL PI 溶液,室温避光孵育 10 min,最后加 300 μL 结合缓冲液,轻轻混匀,用流式细胞仪测定凋亡率。获取的数据用 AnnexinV-FITC 荧光强度(FL1)为 x 轴,PI 荧光强度(FL2)为 Y 轴的散点图分析,将图中细胞分为 4 个亚群:左上象限(UL)为 AnnexinV-/PI+ 区域,表示操作过程中被破坏的细胞;右上象限(UR)为 AnnexinV+/PI+ 区域,表示晚期凋亡和死亡的细胞;左下象限(LL)为 AnnexinV-/PI- 区域,代表正常细胞;右下象限(LR)为 AnnexinV+/PI- 区域,表示早期凋亡细胞。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检及 MGd1-Ag 的亚细胞定位 取对数生长期细胞,调整密度为 1×10⁴ cell/mL,制备细胞爬片。常规培养 24 h 后,用 4%多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤 2 次。MGd1(1:400 稀释)作为一抗 4 °C 孵育过夜。次日, PBS 洗 2 次,加入 DyLight™ 488 交联的驴抗鼠红色荧光二抗(1:200, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) 室温孵育 1.5 h。PBS 洗 2 次,滴加亲脂性绿色荧光染料 DIO(1:200, Beyotime) 室温孵育 20 min, DAPI(1:100, Beyotime) 染胞核 5 min。封片,进行激光共聚焦显微镜检测(FV1000, Olympus)。

1.2.5 统计学分析 实验均重复 3 次。数据采用 SPSS17.0 软件进行统计处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐的多组比较采用单因素方差分析和 Dunnett-t 检验;方差不齐的采用非参数秩和检验(Kruskal-Wallis test)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MGd1 显著抑制人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖

20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 的 MGd1 分别对 SGC-7901 细胞作用 24 h、48 h 及 72 h 后产生较为明显的抑制效应,尤以 100.0 μg/mL 作用 72 h 抑制作用最为显著。与对照组及组间相比,差异具有统计学意义 (P=0.02)(图 1)。本实验结果表明 MGd1 可抑制 SGC-7901 细胞的增殖,且抑制程度与浓度及时间呈正相关。

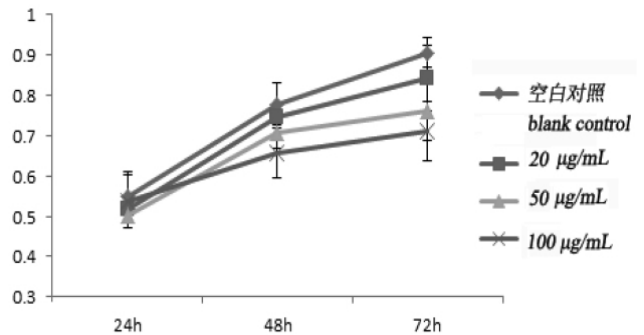


图 1 MTT 法分析不同条件下 MGd1 对 SGC-7901 增殖的影响

Fig.1 The effects of MGd1 on proliferation of SGC-7901 cell line 20.0、50.0 和 100.0 μg/mL 的 MGd1 分别对 SGC-7901 细胞作用 24 h、48 h 及 72 h 后产生较为明显的抑制效应,尤以 100.0 μg/mL 作用 72 h 抑制作用最为显著。与对照组及组间相比,差异具有统计学意义 (P=0.02)(图 1)。本实验结果表明 MGd1 可抑制 SGC-7901 细胞的增殖,且抑制程度与浓度及时间呈正相关。

2.2 MGd1 可诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡

流式细胞术检测结果显示,SGC-7901 经过 20.0、50.0、100.0 μg/mL MGd1 作用 24 h 后,凋亡率分别为 (8.86±0.29)%、(16.36±1.15)%、和(28.60±1.04)% ,与 MGd1 浓度呈正相关(图 2)。与对照组凋亡率(3.24±0.45)% 比较及组间比较,差异有显著性(P<0.01)。当 20.0 μg/mL MGd1 作用 24、48 及 72 h 后,凋亡率分别为(6.6±0.53)%、(13.62±0.99)%和(16.02±0.72)% ,不同作用时间组间比较差异有显著性(P<0.01),趋势呈时间依赖性(图 3)。而小鼠 IgG 组细胞凋亡率为(3.40±0.64)% ,与对照组凋亡率比较差异没有显著性(P>0.05)。

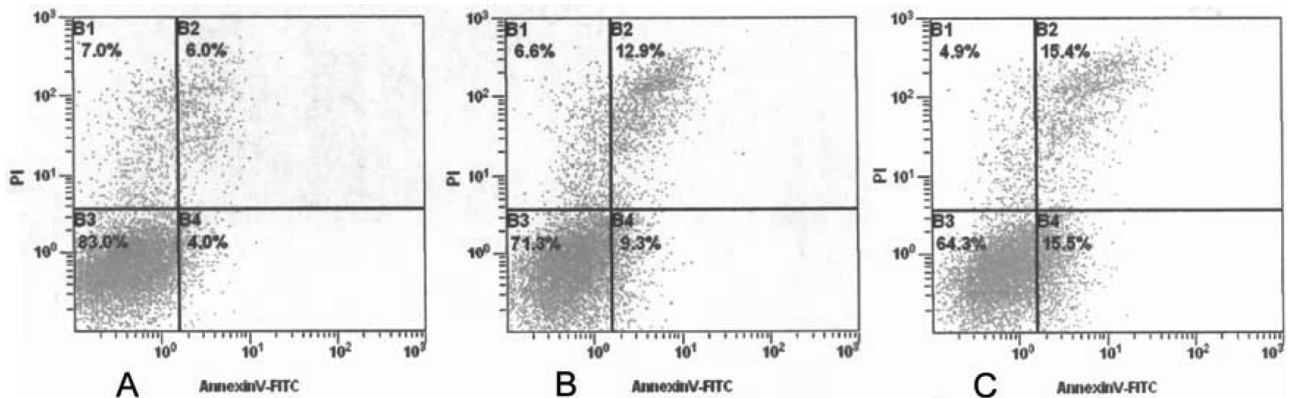


图 2 不同浓度条件下 MGd1 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 A: 20.0 μg/mL 处理组 B: 50.0 μg/mL 处理组 C: 100.0 μg/mL 处理组

Fig.2 The effects of MGd1 with different doses on apoptosis of SGC-7901 cell line A: 20.0 μg/mL group B: 50.0 μg/mL group; C: 100.0 μg/mL group

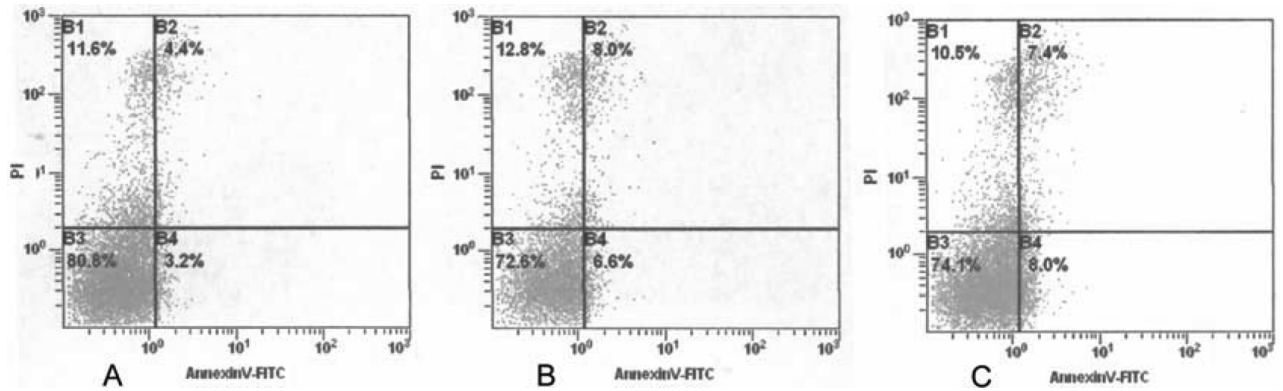


图3 MGd1作用不同时间条件下对SGC-7901细胞凋亡的影响:A:MGd1处理24h;B:MGd1处理48h;C:MGd1处理72h
Fig.3 The effects of MGd1 with different times on apoptosis of SGC-7901 cell line :A:24 h group ;B:48 h group ;C:72 h group

2.3 MGd1-Ag 主要定位于细胞膜上

激光共聚焦显微镜检测结果显示MGd1-Ag定位于胞浆及胞膜,但主要定位于细胞膜上(图4)。

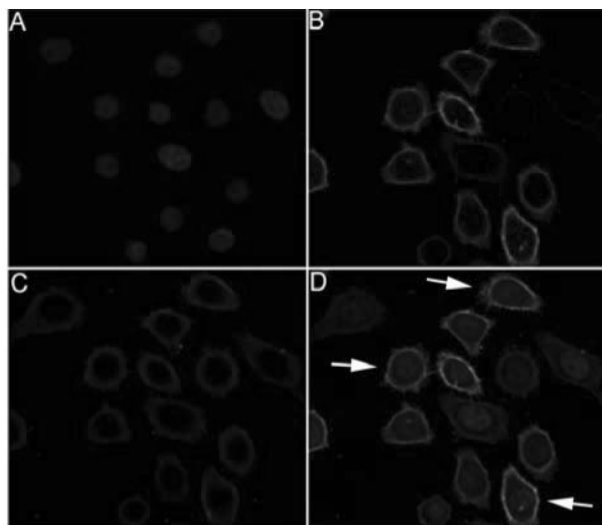


图4 激光共聚焦显微镜检测MGd1-Ag亚细胞定位:A:DAPI标记细胞核;B:DIO标记细胞膜;C:驴抗鼠红色荧光二抗标记MGd1-Ag;D:A、B、C三图叠加(箭头指示典型共定位现象)
Fig.4 Subcellular localization of MGd1-Ag using LCSM :A: nucleus was stained with DAPI; B: green shows cell membrane; C:red shows MGd1-Ag; D: merge of images (Co-localization was marked by arrowheads)

3 讨论

胃癌严重影响着人类健康。目前,手术治疗仍然是根治胃癌的最有效方法。然而,仅有30%-40%的胃癌患者可能通过单纯的手术而获得治愈。大部分患者死于肿瘤的再发或远处转移^[10]。胃癌的分子靶向治疗是目前一种新的治疗策略^[11-12]。已有多个分子靶向治疗药物在临床研究中显示出明确的抗肿瘤活性,但同时也带来了一些副反应^[13]。目前的靶向药物并非特异性针对胃癌^[14],而且多靶点药物联合应用将会是未来发展的趋势^[15],所以研发新的胃癌特异性治疗靶点,是医务人员面临的一项重大课题。上世纪八十年代,本实验室自主研制出一系列特异性抗胃癌单克隆抗体,MGd1是其中一株。前期大量免疫

组化和血清学研究发现,MGd1-Ag在胃癌中特异性表达,对组织学和血清学水平均对胃癌有较好的诊断价值^[16]。因此,MGd1-Ag在胃癌的发生发展过程中必然发挥着某种作用。但是MGd1能否发挥抑癌效应进而作为一个潜在的治疗胃癌的特异性靶向药物仍不确定。本实验率先选用胃癌细胞系SGC-7901来观察MGd1对其增殖和凋亡的影响。结果表明,与对照组相比,MGd1可显著抑制SGC-7901细胞的增殖。FITC和PI双染流式细胞术检测结果提示,SGC-7901细胞经不同浓度MGd1处理后,细胞凋亡率明显上升,并且呈浓度和时间依赖性,尤以早期凋亡为著。以上结果初步提示MGd1可能成为一个潜在的新的胃癌特异性靶向药物。

靶向药物的研发多数针对胞膜靶点和功能靶点^[17]。以EGFR、VEGFR等胞膜靶点的单抗类药物较为多见且已用于临床实践^[5-7]。但胃癌特异性靶点鲜有报道。本研究通过激光共聚焦检测发现MGd1-Ag主要定位于细胞膜上。这提示MGd1可能通过与其特异性结合,抑制了下游分子信号的转导,从而发挥了抑制SGC7901增殖和诱导其凋亡的作用。当然在后续的研究中,仍需明确MGd1对SGC-7901细胞其它表型有无影响,在此基础上深入探讨其下游确切的分子转导通路。

参考文献(References)

- [1] Panani AD. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications[J]. Cancer Lett, 2008, 266: 99-115
- [2] Fan D, Zhang X, Chen X, et al. Bird's-eye view on gastric cancer research of the past 25 years [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(3): 360-365
- [3] Shitara K, Yokota T, Takahari D, et al. Cetuximab plus FOLFOX for patients with metastatic colorectal cancer with poor performance status and/or severe tumor-related complications [J]. Case Rep Oncol, 2010, 3(2): 282-286
- [4] Arkenau HT. Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135: 855-866
- [5] Nielsen DL, Andersson M, Kamby C. HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors [J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(2): 121-136
- [6] Francia G, Man S, Lee CJ. Comparative impact of trastuzumab and cyclophosphamide on HER-2 positive human breast cancer xenografts [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(20): 6358-6366

- [7] Brinkerhoff BT, Poetker DM, Choong NW. Long-term therapy with bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. N Engl J Med, 2011, 364(7): 688-689
- [8] Normanno N, Bianco C, De Luca A, et al. Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment [J]. Endocr-Relat Cancer, 2003, 10: 1-21
- [9] 张积仁, 张学庸, 陈希陶, 等. 一种新的胃癌相关糖脂糖蛋白抗原 MGd1-Ag 的初步研究[J]. 解放军医学杂志, 1990, 5: 28-30
ZHANG Ji-ren, ZHANG Xue-yong, CHEN Xi-tao, et al. Study of a new gastric cancer associated glycolipid and glycoprotein antigen (MGd1-Ag) [J]. Medical Journal of Chinese People's Liberation Army, 1990, 5: 28-30
- [10] Gong SJ, Jin CJ, Rha SY, et al. Growth inhibitory effects of tanstuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines [J]. Cancer Lett, 2004, 214(2): 215-224
- [11] Yohann L, Gabriel P, David M, et al. Drug Insight: gastrointestinal and hepatic adverse effects of molecular-targeted agents in cancer therapy [J]. Nat Clin Pract Oncol, 2008, 5(5): 268-278
- [12] Kim SY. A new paradigm for cancer therapeutics development [J]. BMB Rep, 2010, 43(6): 383-388
- [13] Widakowich C, Castro GD, Azambuja ED. Review: Side Effects of Approved Molecular Targeted Therapies in Solid Cancers [J]. The Oncologist, 2007, 12:1443-1455
- [14] Winder T, Lenz HJ. Vascular Endothelial Growth Factor and Epidermal Growth Factor Signaling Pathways as Therapeutic Targets for Colorectal Cancer [J]. Gastroenterology, 2010, 138: 2163-2176
- [15] Kwak EL, Clark JW, Chabner B. Targeted Agents: The Rules of Combination [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(18): 5232-5237
- [16] 张积仁, 张学庸, 吴觉平, 等. 胃癌相关抗原 MGd1-Ag 在消化道肿瘤血清价值中的初步应用[J]. 肿瘤防治研究, 1990, 17(3): 131-132
ZHANG Ji-ren, ZHANG Xue-yong, WU Jue-ping, et al. Detection of MGd1-Ag in serum as a diagnostic aid for tumors of the digestive system [J]. Cancer research on prevention and treatment, 1990, 17(3): 131-132
- [17] Tabernero J, Macarulla T, Ramos FJ, et al. Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer [J]. Annals of Oncology, 2005, 16: 1740-1748

· 重要信息 ·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述, 充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gamhbir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委, 国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委, 还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字, 收录图片 378 幅, 共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章, 主要介绍了分子影像学的发展简史, 分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等, 内容较第一版更为精准、完善, 覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈, 纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章, 着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况, 并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况, 重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展, 并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实, 深入浅出, 图文并茂, 可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用, 并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元, 全国各大书店有售。