

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2012.03.009

· 基础研究 ·

单克隆抗体 CH12 抑制头颈部鳞状细胞癌裸鼠种植瘤的生长

杨雅琼, 李宗海, 胡素文, 蒋华(上海交通大学医学院附属仁济医院上海市肿瘤研究所 癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032)

[摘要] **目的:** 观察嵌合型单克隆抗体 CH12 对头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC)裸鼠种植瘤生长的抑制作用, 为进一步研究 CH12 单抗在肿瘤治疗中的作用提供参考数据。 **方法:** Western blotting 检测 5 种 HNSCC 细胞系 A253、CAL27、Detroit 562、FaDu 和 RPMI 2650 中表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达, 流式细胞术检测 CH12 单抗同这 5 种细胞系的结合能力。皮下接种 CAL27 和 A253 细胞, 建立 HNSCC 裸鼠种植瘤模型。模型鼠腹腔注射 CH12 单抗, 以 PBS 作为阴性对照, 观察肿瘤生长情况, 绘制肿瘤生长曲线。 **结果:** EGFR 在 CAL27、A253、FaDu 及 Detroit 562 细胞中均有不同程度的表达, 其中 CAL27 细胞中 EGFR 的表达水平最高, A253 细胞次之。CH12 单抗与 5 种 HNSCC 细胞系的结合能力由高到低依次为 CAL27、FaDu、A253、Detroit 562 和 RPMI 265 细胞。CH12 单抗对 CAL27 和 A253 细胞裸鼠种植瘤的生长均有显著抑制作用, 抑瘤率分别为 56.8% ($P=0.022$) 和 59.7% ($P=0.015$)。 **结论:** 单克隆抗体 CH12 对 EGFR 高表达的 HNSCC 细胞种植瘤的生长具有明显的抑制作用。

[关键词] CH12; 单克隆抗体; 表皮生长因子受体; 头颈部鳞状细胞癌

[中图分类号] R739.9; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2012)03-0276-04

CH12 monoclonal antibody inhibits growth of head and neck squamous cell carcinomas xenografts in nude mice

YANG Ya-qiong, LI Zong-hai, HU Su-wen, JIANG Hua (State Key Laboratory of Oncogenes & Related Genes, Shanghai Cancer Institute, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of chimeric monoclonal antibody CH12 on the growth of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) xenografts *in vivo*, and to provide basis for further study on the effect CH12 antibody on tumor therapy. **Methods:** The protein expression levels of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in A253, CAL27, Detroit 562, FaDu and RPMI 2650 HNSCC cell lines were analyzed by Western blotting. The binding capacity of CH12 antibody with these five cell lines was detected by flow cytometry. CAL27 and A253 cells were subcutaneously inoculated into nude mice to establish HNSCC xenograft models. The mice with xenografted tumor were randomized into two groups: a vehicle control group (PBS) and a treatment group (CH12). Tumor volume was recorded at a regular time interval, and then the tumor growth curve was drawn. **Results:** EGFR was expressed in CAL27, A253, FaDu and Detroit 562 cell lines, with the highest expression in CAL27 cells and the second highest expression in A253 cells. The binding affinity of CH12 with five cell lines was followed by CAL27, FaDu, A253, Detroit 562 and RPMI 265. CH12 significantly inhibited the tumor growth in both CAL27 and A253 xenografts compared with that in the control group, and the tumor growth inhibition ratios were 56.8% ($P=0.022$) and 59.7% ($P=0.015$) respectively. **Conclusion:** CH12 antibody can effectively inhibit the tumor growth of EGFR high-expressed HNSCC xenografts *in vivo*.

[Key words] CH12; monoclonal antibody; epidermal growth factor receptor (EGFR); head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)

[Chin J Cancer Biother, 2012, 19(3): 276-279]

[基金项目] 上海市科委生物医药重点科技攻关项目资助(No. 10431903700);教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助(No. 20090073120109)。Project supported by the Key Program Project of the Shanghai Science and Technology Committee (No. 10431903700), and the Doctoral Program Foundation of Institutions of Higher Education of China (No. 20090073120109)。

[作者简介] 杨雅琼(1985-),女,山西省长治市人,硕士,主要从事肿瘤生物治疗的研究。E-mail: yangyaqiong228@163.com

[通信作者] 蒋华(JIANG Hua, corresponding author), E-mail: jianghuayp@163.com

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一个经典的跨膜蛋白,在肿瘤的生长、发展以及肿瘤干细胞的维持中都有着非常重要的作用^[1-2],EGFR 的过度表达及突变往往导致其下游信号通路异常激活,使细胞发生恶性转化^[3]。EGFR 在大约 1/3 的人体肿瘤中过度表达,尤其在头颈部鳞状细胞癌(head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC)的表达率高达 80% ~ 100%^[4]。因此,EGFR 可以作为靶向药物治疗 HNSCC 的一个理想靶点。本实验室在前期研究中,自主研发了一种靶向 EGFR III^[5-6]型变异体(epidermal growth factor receptor variant type III, EGFRv III)的人鼠嵌合型单克隆抗体——CH12^[7],并证实该抗体只能同 EGFRv III 及过表达的 EGFR 相结合,而同正常表达水平的 EGFR 不结合,表现出很好的靶向特异性^[7-8]。在体内治疗实验中发现,CH12 单抗对 EGFRv III 表达阳性的 Huh7-EGFRv III 和 SMMC-7721 肝癌裸鼠种植瘤的生长具有明显的抑制作用^[7]。此外,CH12 单抗还对 EGFR 变异体 de4 EGFR^[9]阳性的脑胶质瘤具有良好的疗效。为进一步探讨 CH12 单抗是否有潜力应用于 HNSCC 治疗,本研究对 5 种 HNSCC 细胞系中 EGFR 的表达情况进行检测,选取 EGFR 过表达的细胞系进行 CH12 单抗体抗肿瘤实验,观察其对 HNSCC 裸鼠皮下种植瘤生长的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

CH12 单抗由本实验室在 DHFR-deficient CHO DG44 细胞系中表达^[7],用 Protein G 纯化后溶于 PBS 中,4 ℃ 保存。抗 EGFR 单克隆抗体 12H23 由本实验室提供^[7]。抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自上海康成公司, FITC 标记的羊抗人 IgG 抗体为 Proteintech Group 公司产品,蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo Scientific 公司, Super Signal West Pico 化学发光检测试剂盒购自 Pierce 公司。流式细胞仪购自 BD 公司。

人 HNSCC 细胞系 A253、CAL27、Detroit 562、FaDu 以及 RPMI 2650 均购自美国物种保藏中心。DMEM 细胞培养液、胎牛血清购自 Gibco 公司。4 ~ 6 周龄的 BALB/c(nu/nu)雌性小鼠[SYXK(沪) 2007-0001]由上海市肿瘤研究所实验动物室提供,在无特定病原体条件下进行饲养。

1.2 Western blotting 检测不同 HNSCC 细胞系中 EGFR 蛋白的表达

将对数生长期的 A253、CAL27、Detroit 562、FaDu 和 RPMI 2650 细胞分别接种于 6 cm 直径培养皿,待细胞长满后加入蛋白裂解液进行蛋白收集,之后 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经 10% SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素滤膜上,然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 12H23 抗体和抗 GAPDH 抗体,4 ℃ 孵育过夜。加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,室温孵育 2 h。硝酸纤维素滤膜与化学发光试剂进行反应, X 线片曝光、显影、定影,然后拍照并进行图像分析。

1.3 FACS 检测 CH12 单抗与不同 HNSCC 细胞的结合能力

取生长状态良好的 A253、CAL27、Detroit 562、FaDu 和 RPMI 2650 细胞,分别接种于 10 cm 直径培养皿中,接种细胞密度为 80%, 37 ℃、5% CO₂ 培养过夜。次日,使用 10 mmol/L 的 EDTA 消化细胞, 300 × g 离心 3 min,用含 1% 小牛血清的 PBS 重悬细胞, 3 000 × g 离心 5 min。每种细胞分为 2 组,分别加入 100 μl 同型对照抗体(IgG1 型)和 100 μl CH12 单抗(20 μg/ml),冰上孵育 45 min。用 PBS(含 1% NCS)洗 3 次,加入 100 μl FITC 标记的二抗于各管中,冰上孵育 45 min 后用 PBS(含 1% NCS)洗 3 次。最后用 0.5 ml PBS 重悬细胞,转移至流式仪专用管中,流式仪检测分析样品,并用 WinMDI2.9 软件对所得数据进行处理并绘图。

1.4 体内抑瘤实验检测 CH12 单抗对 CAL27 和 A253 裸鼠种植瘤的生长抑制

将 CAL27 细胞、A253 细胞分别以 3 × 10⁶ 细胞/只接种于小鼠右侧肋部皮下,当肿瘤平均体积长至 40 ~ 50 mm³ 后,将每种种植瘤模型裸鼠随机分为 2 组(PBS 组和 CH12 单抗治疗组),各组 6 只。抗体治疗组小鼠经腹腔注射给药,CH12 单抗为 0.5 mg/只,隔天 1 次,1 周 3 次,共持续 2 周。注射的同时测量肿瘤体积,计算公式:长 × 宽² × 0.5。实验结束后将小鼠处死,取瘤组织称重。

1.5 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本间的比较及自身的比较采用 *t* 检验,对照组与处理组比较采用方差分析, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 在 HNSCC 细胞系中的表达

Western blotting 检测结果(图 1)表明,5 种 HNSCC 细胞系中,除了 RPMI 2650 细胞外,EGFR

在 CAL27、A253、FaDu 及 Detroit 562 细胞中均有不同程度的表达,其中 CAL27 细胞中 EGFR 的表达水平最高,A253 细胞其次。

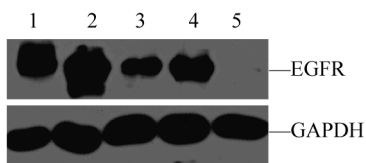


图1 EGFR 蛋白在 5 种 HNSCC 细胞中的表达

Fig. 1 Expression of EGFR in 5 HNSCC cell lines

1: A253; 2: CAL27; 3: Detroit 562; 4: FaDu; 5: RPMI 2650

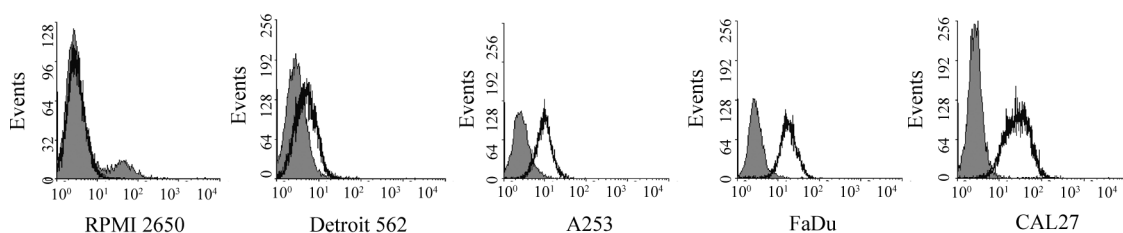


图2 FACS 检测 CH12 单抗与不同 HNSCC 细胞的结合能力

Fig. 2 FACS analysis of binding affinity of CH12 mAb with different HNSCC cell lines

在 CAL27 裸鼠种植瘤模型中,第 36 天起,CH12 单抗治疗组与对照组的差异开始具有统计学意义;到第 51 天治疗结束时,CH12 单抗治疗组平均抑瘤率达到 56.8% ($P = 0.022$)。在 A253 裸鼠种植瘤模型中,第 23 天起两组间种植瘤的生长差异具有统计学意义,到第 32 天治疗结束时,CH12 单抗治疗组平均抑瘤率达到 59.7% ($P = 0.015$)。治疗组肿瘤平均质量有明显降低[CAL27 组为 (32 ± 5) vs (68 ± 12)mg; A253 组为 (46 ± 7) vs (142 ± 26) mg],表明 CH12 单抗对于 EGFR 表达量较高的 HNSCC 的生长均有较明显的抑制作用(图 3)。

3 讨论

本研究发现 EGFR 在 CAL27、A253、FaDu 及 Detroit 562 细胞中均有不同程度的表达。CH12 单抗与 EGFR 表达水平较高的 CAL27、FaDu 和 A253 细胞的亲和力较高。体内抗肿瘤实验证实,CH12 单抗能够有效抑制 CAL27 和 A253 细胞裸鼠种植瘤的生长,抑瘤率分别达 56.8% 和 59.7%。证明在 HNSCC 中,CH12 单抗对于高表达 EGFR 的肿瘤表现出良好的抑制效果,为进一步研究 CH12 单抗在肿瘤治疗中的作用提供了实验证据。

2.2 CH12 单抗与不同 HNSCC 细胞的结合能力

为了进一步确定 CH12 单抗是否与 HNSCC 细胞结合,采用 FACS 检测其与 CAL27、A253、FaDu、Detroit 562 及 RPMI 2650 细胞的结合能力。结果(图 2)发现,CH12 单抗与 5 种 HNSCC 细胞结合的亲和力由高到低依次为:CAL27、FaDu、A253、Detroit 562 和 RPMI 265 细胞,并且其结合能力与细胞内 EGFR 的表达量呈正相关。

2.3 CH12 对 CAL27、A253 裸鼠种植瘤生长的抑制

选取与 CH12 单抗具有较高亲和力的两种 HNSCC 细胞系(CAL27 和 A253)进行裸鼠体内抑瘤实验。

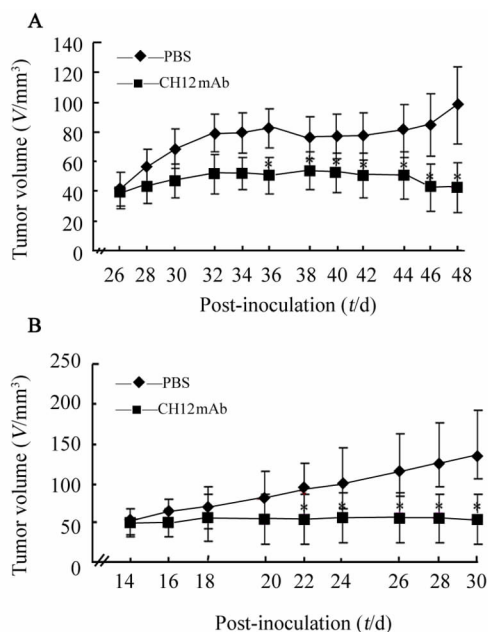


图3 CH12 单抗抑制 CAL27(A)和 A253(B)裸鼠种植瘤的生长

Fig. 3 CH12 mAb inhibited growth of CAL27 and A253 implanted tumors in nude mice

* $P < 0.05$ vs PBS group

HNSCC 是头颈部恶性肿瘤中最常见类型,恶性程度高,预后不佳,很高病死率。手术加术后放疗,

总的5年生存率约50%,其中I~II期为75%,III~IV期为35%^[11]。近几年来随着手术技巧的改进,精确放疗和新型的化疗药物以及靶向药物的出现,使得头颈部恶性肿瘤的治疗更加接近理想的目标^[12-13]。针对EGFR的西妥昔单抗是治疗HNSCC最受瞩目的靶向药物^[14-15],一些临床试验^[14, 16-17]表明,西妥昔单抗联合放疗或化疗能够显著延长HNSCC患者的无进展生存期和总生存期。然而西妥昔单抗所引起的不良反应也不容忽视,少数患者会出现严重的过敏反应、输液反应、败血症、肺间质疾病、肾功能衰竭、肺栓塞和脱水等^[18]。引起毒性作用的主要原因是由于西妥昔单抗的靶向特异性不够强,不仅能和肿瘤组织表面的EGFR结合,也能和皮肤、胃肠道等正常组织表面的EGFR结合。西妥昔单抗与人体正常组织中的EGFR结合后,在正常组织中会被大量消耗,其在肿瘤中的浓度会受到影响,进而其药效会受到影响。因此,寻找可以特异性靶向过表达EGFR的抗肿瘤药物成为减少靶向治疗毒性作用的关键。

Panousis等^[19]发现了一种专门针对EGFRvIII和肿瘤中过表达EGFR的治疗性单抗ch806,该单抗几乎不与正常细胞中的EGFR结合。在临床I期研究中,该单抗几乎只富集到肿瘤中,而与正常组织没有显著的结合^[20],使得ch806单抗相比之前的治疗性单抗有着非常独特的优势。然而ch806单抗在临床I期研究中的最高使用剂量只有40 mg/m²,主要原因可能是大规模生产有一定的难度,使得ch806单抗的进一步研究遇到了障碍^[20]。由于CH12单抗和ch806单抗结合在同一抗原表位^[7],所以也具有同样的肿瘤靶向性。此外,在研究CH12和ch806单抗的表达中,发现CH12单抗的产量显著优于ch806(未发表资料),CH12单抗更易于制备,因而更有望用于肿瘤的临床治疗中。本研究进一步拓展了CH12单抗的潜在临床使用适应症。

[参考文献]

- [1] Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: Targeting the epidermal growth factor receptor [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(10): 2958-2970.
- [2] Grunwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95(12): 851-867.
- [3] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(11): 1160-1174.
- [4] Schuler P, Boeckers P, Engers R, et al. EGFR-specific T cell frequencies correlate with EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2006, 9: 168.
- [5] Kuan CT, Wikstrand CJ, Bigner DD. EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2001, 8(2): 83-96.
- [6] Wang H, Jiang H, Zhou M, et al. Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity and resistance to 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2009, 279(1): 30-38.
- [7] Jiang H, Wang H, Tan Z, et al. Growth suppression of human hepatocellular carcinoma xenografts by a monoclonal antibody CH12 directed to epidermal growth factor receptor variant III [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(7): 5913-5920.
- [8] Wang H, Shi B, Zhang Q, et al. Growth and metastasis suppression of glioma xenografts expressing exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor by monoclonal antibody CH12-mediated receptor degradation [J]. *Faseb J*, 2011, 26(1): 73-80.
- [9] Wang H, Zhou M, Shi B, et al. Identification of an exon 4-deletion variant of epidermal growth factor receptor with increased metastasis-promoting capacity [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(5): 461-471.
- [10] Garrett TP, Burgess AW, Gan HK, et al. Antibodies specifically targeting a locally misfolded region of tumor associated EGFR [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(13): 5082-5087.
- [11] Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck [J]. *CA Cancer J Clin*, 1995, 45(6): 352-368.
- [12] Sharafinski ME, Ferris RL, Ferrone S, et al. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Head Neck*, 2010, 32(10): 1412-1421.
- [13] Sundvall M, Karrila A, Nordberg J, et al. EGFR targeting drugs in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2010, 15(2): 185-201.
- [14] Specenier P, Vermorken JB. Cetuximab in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(4): 511-524.
- [15] Reeves TD, Hill EG, Armeson KE, et al. Cetuximab therapy for head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review of the data [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2011, 144(5): 676-684.
- [16] Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(6): 567-578.
- [17] Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(11): 1116-1127.
- [18] Thienelt CD, Bunn PA, Hanna JN, et al. Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(34): 8786-8793.
- [19] Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, et al. Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(6): 1069-1077.
- [20] Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, et al. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(10): 4071-4076.

[收稿日期] 2012-01-21 [修回日期] 2012-03-28

[本文编辑] 韩丹