

抗甲胎蛋白单链抗体与阿霉素联合对人肝癌细胞 Huh7 增殖的抑制作用

沈艳丽, 姬晓南, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 探讨抗人甲胎蛋白(AFP)单链抗体和阿霉素(DOX)单用或联用对人肝癌细胞 Huh7 细胞增殖的抑制作用。采用 MTT 法检测抗 AFP 单链抗体、阿霉素单用及联合作用对 Huh7 细胞增殖的影响;采用 Annexin V/PI 荧光双染法检测抗 AFP 单链抗体、阿霉素单用及联合作用对 Huh7 细胞凋亡的影响;采用 PI 单染法检测抗 AFP 单链抗体、阿霉素单用及联合作用对 Huh7 细胞周期分布的影响。结果表明,抗 AFP 单链抗体、阿霉素单药组与联用组均能有效抑制 Huh7 细胞增殖,呈剂量依赖性,且两药联用具有协同效应;抗 AFP 单链抗体、阿霉素单用及联用均可诱导细胞凋亡且抗 AFP 单链抗体(40 $\mu\text{g/mL}$)与阿霉素(0.25 $\mu\text{g/mL}$)联合组凋亡率明显高于单独给药组,具有统计学意义($P < 0.05$);抗 AFP 单链抗体(40 $\mu\text{g/mL}$)单独作用后,Huh7 的细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,阿霉素(0.25 $\mu\text{g/mL}$)单独作用 Huh7 的细胞周期阻滞于 S 期,而当两种药物联用时,Huh7 的细胞周期被阻滞于 G_2/M 期,抑制细胞增殖。

关键词 甲胎蛋白;单链抗体;阿霉素;联合用药;肝癌;细胞增殖

中图分类号 R965;R392.1 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)01-0101-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160115

引用本文 沈艳丽,姬晓南,高向东. 抗甲胎蛋白单链抗体与阿霉素联合对人肝癌细胞 Huh7 增殖的抑制作用[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1): 101–105.

Cite this article as: SHEN Yanli, JI Xiaonan, GAO Xiangdong. Combination of scFv-AFP with doxorubicin inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma cell Huh7[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(1): 101–105.

Combination of scFv-AFP with doxorubicin inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma cell Huh7

SHEN Yanli, JI Xiaonan, GAO Xiangdong*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study was to investigate the inhibitory effects of single-chain variable fragment of alpha fetoprotein (scFv-AFP) in combination with doxorubicin on the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines Huh7. Huh7 cells were treated with different concentrations of scFv-AFP or doxorubicin alone or their combination. The inhibitory effects were detected by MTT assay, and cycle arrest and apoptosis of Huh7 cells were analyzed by flow cytometry in different groups using PI and Annexin V/PI-staining, respectively. Results showed that scFv-AFP, doxorubicin alone or in combinations dose-dependently inhibited the proliferation of Huh7, and a synergistic effect was observed in their combined action. The combined therapy resulted in significantly higher apoptosis than those in other groups ($P < 0.05$). scFv-AFP (40 $\mu\text{g/mL}$) markedly blocked the Huh7 cell progression by arresting the cells in the G_0/G_1 phase, and the percentage of cells in S phase decreased dramatically ($P < 0.05$); and scFv-AFP combined with doxorubicin blocked the Huh7 cell progression by arresting the cells in G_2/M phase ($P < 0.01$).

Key words alpha fetoprotein; single-chain variable fragment; doxorubicin; combination; hepatocellular carcinoma;

cell proliferation

This work was supported by the Fundamental Research Funds for Central Universities (No. ZJ13081)

原发性肝癌是一种常见的恶性肿瘤,病死率在癌症中位居第二^[1],具有易转移、易复发、预后差等特点,其预防和治疗是世界性难题,至今仍缺乏有效的防治手段^[2]。甲胎蛋白(AFP)是肝癌诊断标志物,被用于预测肝癌的转移和复发,近年来对AFP生物学功能的深入研究证明,肝癌细胞中AFP的高表达与癌细胞耐受TNF- α 和TRAIL等因子相关,该耐受性的存在是诱导肝癌细胞凋亡困难的主要原因^[3]。因此,调节肝癌细胞内AFP水平成为抗癌药物研发的新方向。由于肝癌的耐药性非常明显,已不推荐化疗药物的单独使用,除了与手术、介入、基因治疗等手段配合使用外,化疗药物与靶向药物的联合应用逐渐成为肝癌治疗的新方向^[4-5]。本研究将抗AFP单链抗体与阿霉素联合作用于人Huh7肝癌细胞,考察对肝癌细胞的抗增殖作用,为其进一步的体内研究提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂

抗AFP单链抗体由本实验室构建^[6]、表达并纯化得到;阿霉素(大连美仑公司);DMEM基础培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Clark公司);MTT(中国Biosharp公司)用PBS配制成质量浓度为5 mg/mL;细胞周期与细胞凋亡试剂盒和Annexin V-FITC/PI试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。

1.2 仪器

FACS Calibur分析型流式细胞仪(美国BD公司),全波长酶标仪(美国Thermo Fisher公司)。

1.3 细胞株

人肝癌Huh7细胞株由江苏省人民医院提供。

2 方法

2.1 细胞培养与实验分组

Huh7细胞在含10%胎牛血清,60 U/mL青霉素,100 U/mL链霉素的DMEM完全培养基,37℃含5%CO₂的培养箱中培养,取生长良好的对数期

细胞进行实验。实验分成无药对照组和抗AFP单链抗体组(2.5, 10, 40 μ g/mL);阿霉素组(0.25, 0.5, 1.0 μ g/mL)及联合用药组(抗AFP单链抗体2.5 μ g/mL+阿霉素0.25 μ g/mL、抗AFP单链抗体10 μ g/mL+阿霉素0.25 μ g/mL、抗AFP单链抗体40 μ g/mL+阿霉素0.25 μ g/mL),共10组。

2.2 MTT法检测抗AFP单链抗体及阿霉素对Huh7细胞增殖的影响

MTT法检测抗AFP单链抗体及阿霉素单独及联合作用对Huh7细胞增殖的影响。取对数生长期细胞,以每孔 5×10^3 个接种于96孔板,37℃,5%CO₂培养12 h后,加入药物。每个剂量设6个复孔。分别培养24, 48 h后每孔加入MTT 20 μ L,继续培养4 h。终止培养,弃上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,振荡10 min使结晶物溶解,全波长酶标仪测定A₅₇₀和A₆₃₀,计算细胞抑制率。抑制率(%)=(对照组(A₅₇₀-A₆₃₀)-实验组(A₅₇₀-A₆₃₀))/对照组(A₅₇₀-A₆₃₀) \times 100。

2.3 流式细胞仪检测抗AFP单链抗体及阿霉素对Huh7细胞周期及细胞凋亡的影响

取对数生长期Huh7细胞,以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于6孔板,12 h后加入药物,每组3个复孔;药物处理24 h后,胰酶消化收集全部细胞,进行细胞周期和细胞凋亡检测。细胞周期检测:70%乙醇固定过夜,PBS洗涤后进行PI染色,37℃避光反应30 min,流式细胞仪检测细胞周期;细胞凋亡检测:加入Annexin V-FITC 5 μ L,PI 10 μ L室温避光反应20 min,流式细胞仪检测,分析凋亡率。

2.4 统计学处理

采用GraphPad Prism 5软件进行数据统计学分析,对两组样本采用Student's *t*-test进行显著性比较;对两组以上的样本采用Kruskal-Wallis test进行显著性比较,并在比较事后用Dunn's post-hoc test进行检验。其中 $P < 0.05$,表示具有显著性差异, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 用来表示具有极显著性差异。

3 结果

3.1 抗 AFP 单链抗体对 Huh7 细胞增殖的抑制作用

单独加入抗 AFP 单链抗体对 Huh7 细胞增殖具有一定的抑制作用,且细胞抑制率与药物作用时间,和剂量呈正相关。作用 48 h 后,scFv (40 $\mu\text{g/mL}$)对 Huh7 细胞增殖的抑制率最大达 (29.2 \pm 1.98)%,如图 1 所示。

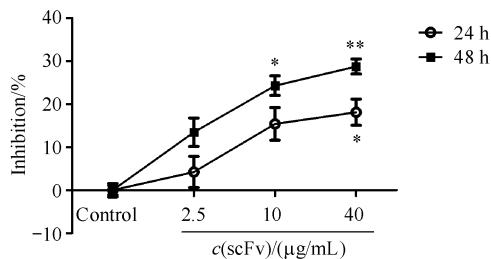


Figure 1 Inhibitory effects of alpha fetoprotein (scFv-AFP) on the proliferation of Huh7 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.2 阿霉素对 Huh7 细胞增殖的抑制作用

阿霉素单独作用于 Huh7 细胞,对其增殖产生抑制作用,抑制率也呈时间和剂量依赖性,阿霉素 (1.0 $\mu\text{g/mL}$)作用 48 h 后,抑制率最高达 (60.8 \pm 0.03)%,如图 2 所示。

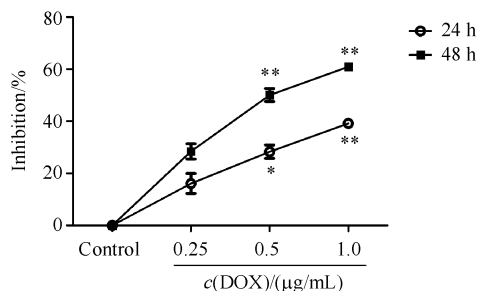


Figure 2 Inhibitory effects of doxorubicin (DOX) on the proliferation of Huh7 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 抗 AFP 单链抗体和阿霉素联用对 Huh7 细胞增殖的抑制作用

结合前期数据选择 3 个浓度的抗 AFP 单链抗体 (2.5, 10, 40 $\mu\text{g/mL}$) 分别与阿霉素 (0.25 $\mu\text{g/mL}$) 联合给药。结果表明抗 AFP 单链抗体和

阿霉素 (0.25 $\mu\text{g/mL}$) 联用对 Huh7 细胞增殖的抑制作用强于两种药物单独作用,抑制率最高达 (49.08 \pm 0.39)%,明显高于阿霉素 (0.25 $\mu\text{g/mL}$) 单独用药组的 (19.91 \pm 1.02)%,且 $P < 0.01$,具有极显著性差异,结果如图 3 所示。

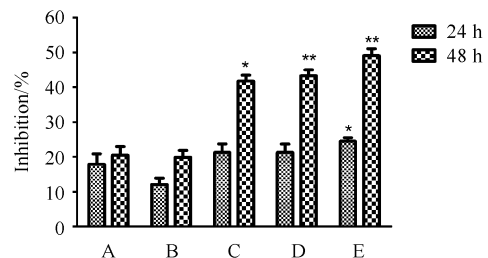


Figure 3 Inhibitory effects of scFv-AFP combined with DOX on the proliferation of Huh7 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: scFv (40 $\mu\text{g/mL}$); B: DOX (0.25 $\mu\text{g/mL}$); C: scFv (2.5 $\mu\text{g/mL}$) + DOX (0.25 $\mu\text{g/mL}$); D: scFv (10 $\mu\text{g/mL}$) + DOX (0.25 $\mu\text{g/mL}$); E: scFv (40 $\mu\text{g/mL}$) + DOX (0.25 $\mu\text{g/mL}$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DOX (0.25 $\mu\text{g/mL}$) group

3.4 抗 AFP 单链抗体和阿霉素联用对 Huh7 细胞的促凋亡作用

进一步利用流式细胞仪对细胞凋亡效果进行考察,结果表明抗 AFP 单链抗体和阿霉素单独用药及联合用药均表现出了明显的促凋亡作用,与对照组相比具有极显著性差异;联合组 (抗 AFP 单链抗体 40 $\mu\text{g/mL}$ + 阿霉素 0.25 $\mu\text{g/mL}$) 与阿霉素 (0.25 $\mu\text{g/mL}$) 单独用药组相比,细胞凋亡率由 (40.26 \pm 0.27)% 增加至 (56.81 \pm 0.53)% ($P < 0.05, n=3$),结果如图 4 所示。

3.5 抗 AFP 单链抗体和阿霉素联用对 Huh7 细胞周期的影响

对给药后细胞周期的考察结果表明,抗 AFP 单链抗体 (40 $\mu\text{g/mL}$) 组与对照组相比, G_0/G_1 期细胞比例增加,细胞被阻滞在 G_0/G_1 期, $P < 0.05$,具有统计学意义;阿霉素 (0.25 $\mu\text{g/mL}$) 与对照组相比, S 期细胞比例明显增加, G_0/G_1 期细胞比例减少,细胞被阻滞在 S 期, $P < 0.01$,具有极显著差异;联合用药组与对照组相比, G_2/M 期细胞比例增加, G_0/G_1 期细胞比例减少,细胞被阻滞在 G_2/M 期, $P < 0.01$,具有极显著差异,结果如图 5、图 6 所示。

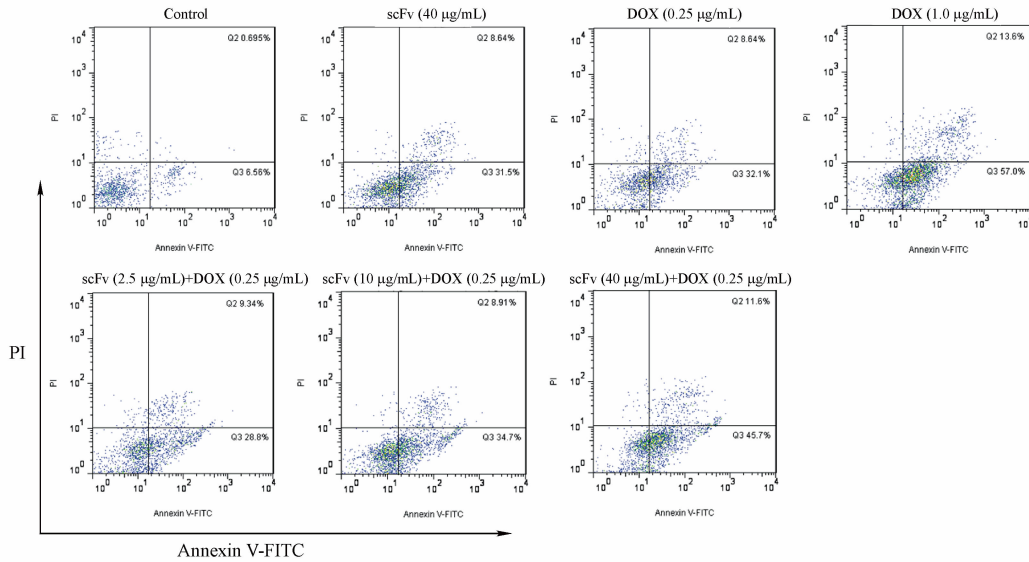


Figure 4 Annexin V-FITC/PI assay of apoptosis of Huh7 cell treated by scFv-AFP, DOX, or scFv-AFP combined with DOX

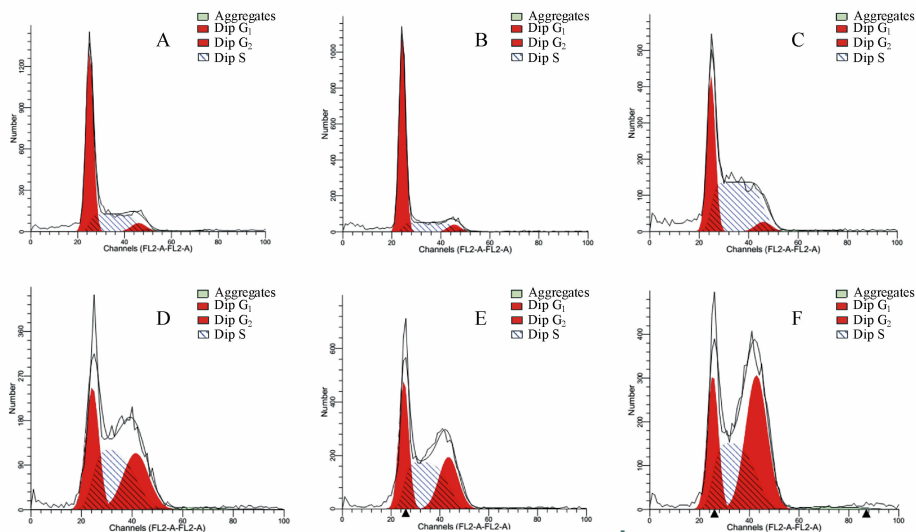


Figure 5 Influence of scFv-AFP, DOX, or scFv-AFP combined with DOX on the cell cycle of Huh7 cell

A: Control; B: scFv (40 µg/mL); C: DOX (0.25 µg/mL); D: scFv (2.5 µg/mL) + DOX (0.25 µg/mL); E: scFv (10 µg/mL) + DOX (0.25 µg/mL); F: scFv (40 µg/mL) + DOX (0.25 µg/mL)

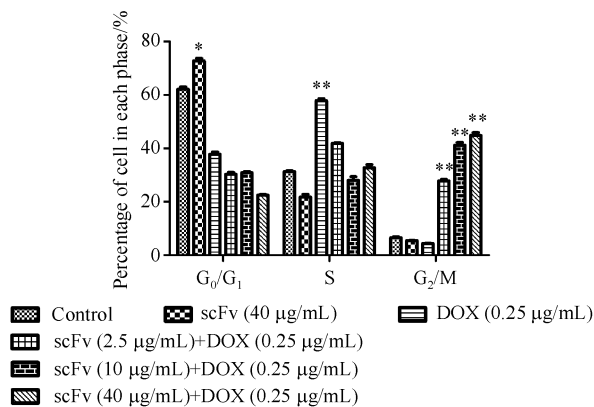


Figure 6 Cell cycle of Huh7 cell treated with scFv-AFP, DOX, or scFv-AFP combined with DOX for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

有研究表明, AFP 的存在可上调 Ras 的表达, 激活 PI3K/AKT 信号, 促进癌基因 Src 表达, 促使肝细胞发生癌变^[7-8]。近年来, 很多靶向药物在临床上取得了较好的疗效, 其中, 单克隆抗体药物也一直是抗肿瘤蛋白类药物的研究热点。然而以 AFP 为靶点的抗体药物却并未得到很好的开发, 其原因之一在于肝癌细胞内的 AFP 主要定位于细胞质的核周附近, 通过结合关键蛋白质参与细胞的生长或凋亡信号通路, 而单克隆抗体由于相对分子质量大, 透过癌细胞膜的效率低下, 不能有效中合胞

内抗原,达不到阻断信号调控的效果。利用基因工程改造的单链抗体,最大的优势就是对肿瘤的穿透率高,可以快速到达目的组织和肿瘤部位,并可进行胞内定位,同时因为其没有 Fc 片段,因此免疫原性较低,能够减少非特异性结合。本研究前期针对 AFP 靶点设计了抗 AFP 单链抗体,将其作为一种辅助治疗药物,与阿霉素联合作用肝癌细胞 Huh7,考察对肝癌细胞增殖的抑制,促进肝癌细胞凋亡的作用。

阿霉素是临床上常用的广谱化疗药物,但由于其不良反应较大,常与其他药物联合使用,以降低化疗使用剂量,达到较好的治疗效果。人肝癌 Huh7 细胞是一株高表达 AFP 的肝癌细胞株,对低剂量的化疗药物敏感性较弱,本研究将抗 AFP 单链抗体与阿霉素联合作用于该细胞,通过抗 AFP 单链抗体中和胞内 AFP,干扰其抗凋亡信号的传递,抑制其对细胞生长的调节作用,从而增加 Huh7 细胞对低剂量阿霉素的敏感性。

研究结果显示,抗 AFP 单链抗体及阿霉素单药均可抑制人肝癌细胞 Huh7 细胞的增殖,促进细胞凋亡;不同浓度的抗 AFP 单链抗体和低浓度的阿霉素联用时,可产生相加或协同增强的抑制作用;联合作用时,抗 AFP 单链抗体浓度增加,细胞抑制率有所提高,但并不明显,原因可能是胞内 AFP 含量是一定的,低剂量的抗 AFP 单链抗体与 AFP 结合,对其活性已经产生抑制作用,达到阻断 AFP 对信号通路的调控的目的,使得细胞对化疗药物的敏感性增加,因而两药联用时,增加抗 AFP 单链抗体剂量,抑制作用没有显著增强。有研究表明,AFP 是肿瘤细胞逃避免疫监视、耐受化疗药物的因子之一,其可与 PTEN 结合并抑制其活性,从而激活 PI3K/AKT 信号通路,促进肝癌细胞耐受凋亡诱导;其亦能选择性与 caspase-3 结合,阻断凋亡信号通路^[9-10]。本研究研究的抗 AFP 单链抗体与胞内 AFP 特异结合,抑制其活性,这可能是两药联用后对 Huh7 细胞增殖抑制作用增强的原因之一。

细胞周期实验结果显示,抗 AFP 单链抗体使细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,S 期细胞比例显著减少,抑制细胞增殖;阿霉素是周期非特异性药物,对处于各个周期的细胞都有杀伤作用,使 Huh7 细胞

周期阻滞于 S 期。细胞停滞于 S 期主要有两个原因,一方面是 G₁/S 转换加快,如 c-Myc, c-jun, c-fos 等转录因子表达上调,或由于周期素及细胞周期素依赖性激酶的变化等,使更多的细胞进入 S 期;另一方面,进入分裂期细胞减少,如 DNA 复制不完全或 DNA 损伤修复等,使大多数细胞不能正常进入分裂期而停滞于 S 期。阿霉素阻滞细胞周期于 S 期的原因主要是后者,即是嵌入 DNA 而抑制核酸的合成。两药联用后,将 Huh7 细胞阻滞于 G₂/M 期而发挥直接杀伤作用,这与两药联用时增加细胞凋亡率的结果相吻合。

参考文献

- [1] Zhao Y, Wang Q, Deng X, *et al.* Quantitative assessment of the association between GSTP1 gene Ile105Val polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, **34**(4):2121-2126.
- [2] Zhu MY, Xia H, Li MS, *et al.* Alpha fetoprotein can induce malignant transformation of liver cells and be used as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *World Chin J Dige* (世界华人消化杂志), 2014, **22**(8):1070-1075.
- [3] Mc Govern, B J. Epidemiology and natural history of hepatitis B [J]. *Semin Liver Dis*, 2005, **25**(suppl):3-8.
- [4] Gupta R, Vyas P, Enver T. Molecular targeting of cancer stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2009, **5**(2):125-126.
- [5] Liu JT, Jiao YY, Zhang YH. Effect of 1B50-1, a novel antibody, combined with chemotherapeutic drugs on proliferation of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2015, **24**(2):157-161.
- [6] Lu HL, Ji XN, Feng LY, *et al.* Optimization of expression conditions of scFv-AFP and its immunologic activity [J]. *J China Pharma Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(5):460-465.
- [7] Li M, Zhu M, Li W, *et al.* Alpha-fetoprotein receptor as an early indicator of HBx-driven hepatocarcinogenesis and its applications in tracing cancer cell metastasis [J]. *Cancer Lett*, 2013, **330**(2):170-180.
- [8] Hung TM, Hu RH, Ho CM, *et al.* Downregulation of alpha fetoprotein expression by LHX4: a critical role in hepatocarcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2011, **32**(12):1815-1823.
- [9] Zheng L, Gong W, Liang P, *et al.* Effects of AFP-activated PI3K/Akt signaling pathway on cell proliferation of liver cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, **35**(5):4095-4099.
- [10] Li M, Li H, Li C, *et al.* Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2009, **124**(12):2845-2854.