

## 抗 AGR2 单克隆抗体 18A4 抑制细胞外 AGR2 诱导的 肿瘤细胞活性

于天弘<sup>1</sup>, Siva Bharath MERUGU<sup>1#</sup>, Hema NEGI<sup>1#</sup>, 孙宋暄<sup>2</sup>, 丁云鹤<sup>1</sup>, 武正华<sup>1\*</sup>, 李大伟<sup>1,3\*\*</sup>

(上海交通大学<sup>1</sup>药学院, 上海 200240; <sup>2</sup>生物医学工程学院; <sup>3</sup>细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心, 上海 200240)

**摘要** 在两种自身不表达肿瘤相关蛋白 AGR2 的黑色素瘤细胞 A375 和 B16-F10 中加入 AGR2 以增强肿瘤细胞活性, 观察以 AGR2 为靶点的单克隆抗体 18A4 对细胞外 AGR2 诱导的肿瘤细胞活性的抑制作用。用 MTT 法和克隆形成实验检测 AGR2, 18A4 抗体单用和联合作用对细胞增殖能力的影响; 流式细胞术检测 AGR2, 18A4 抗体单用和联合作用对细胞周期的影响; 划痕实验检测细胞迁移能力; 鬼笔环肽染色检测细胞形态变化; Western blot 和免疫荧光染色检测细胞内 p53 表达量。结果表明, 单克隆抗体 18A4 能够抑制细胞外 AGR2 诱导的肿瘤细胞增殖速度加快, G<sub>1</sub>/S 细胞周期转化, 迁移速度加快和细胞形态的变化。Western blot 和免疫荧光染色检测发现在化疗药物阿霉素处理的细胞中, 细胞外 AGR2 降低细胞内 p53 的表达量, 而 18A4 能够抑制这一现象。实验结果表明 18A4 能够抑制细胞外 AGR2 诱导的多种肿瘤细胞活性, 是一种潜在的抗肿瘤药物。

**关键词** 单克隆抗体; 18A4; AGR2; 肿瘤微环境; p53

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2018)02–0238–09

doi: 10.11665/j.issn.1000–5048.20180215

**引用本文** 于天弘, Siva Bharath MERUGU, Hema NEGI, 等. 抗 AGR2 单克隆抗体 18A4 抑制细胞外 AGR2 诱导的肿瘤细胞活性[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(2): 238–246.

**Cite this article as:** YU Tianhong, Siva Bharath MERUGU, Hema NEGI, et al. AGR2-blocking antibody 18A4 inhibits cellular tumorigenic properties induced by extracellular AGR2[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(2): 238–246.

## AGR2-blocking antibody 18A4 inhibits cellular tumorigenic properties induced by extracellular AGR2

YU Tianhong<sup>1</sup>, Siva Bharath MERUGU<sup>1#</sup>, Hema NEGI<sup>1#</sup>, SUN Songxuan<sup>2</sup>, DING Yunhe<sup>1</sup>, WU Zhenghua<sup>1\*</sup>, LI Dawei<sup>1,3\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; <sup>2</sup>School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240; <sup>3</sup>Engineering Research Center of Cell and Therapeutic Antibody of Ministry of Education, School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract** This study was to evaluate the cellular inhibition effects induced by anti-AGR2 monoclonal antibody 18A4 in two AGR2-negative melanoma cells, A375 and B16-F10, treated with external oncoprotein AGR2. MTT assay and colony formation assay were performed to detect the cell proliferation rate. Flow cytometry analysis was performed to evaluate cell cycle transition. Cell migration rate was analyzed by wound healing assay. Cell morphological changes were detected by phalloidin staining. The expression of p53 was detected by Western blotting and immunofluorescence. Results showed that 18A4 inhibited the AGR2-dependent tumor properties including enhanced proliferation, accelerated cell cycle, increased cell migration and morphological changes of cells. In addition, by

**收稿日期** 2018-03-21 **通信作者** \*Tel: 021–34205436 E-mail: wuzhenghua@sjtu.edu.cn

\*\*Tel: 021–34204744 E-mail: daweil@sjtu.edu.cn

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目 (No. 81373319, No. 81550110261)

<sup>#</sup>国际留学生

Western blot analysis and immunofluorescence, AGR2 blocking antibody 18A4 also restored p53 expression that was repressed by external AGR2 treated by chemotherapeutic drug doxorubicin. These findings suggest that 18A4 is able to inhibit the cellular tumorigenic properties induced by external AGR2 and is a potential drug against tumor.

**Key words** monoclonal antibody; 18A4; anterior gradient-2; tumor microenvironment; p53

The study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81373319, No. 81550110261)

前梯度蛋白 2 (anterior gradient 2, AGR2) 是蛋白二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 家族的成员, 具有促进蝾螈断肢再生<sup>[1]</sup>、皮肤伤口愈合<sup>[2]</sup>和在胰腺组织再生的过程中激活表皮生长因子受体信号通路等作用<sup>[3]</sup>。AGR2 也是一种肿瘤相关蛋白, 在乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌、卵巢癌等肿瘤组织中过表达<sup>[4-8]</sup>。细胞内 AGR2 在肿瘤中与肿瘤增殖、存活、迁移、黏附、不良预后、耐药等特性息息相关<sup>[9-12]</sup>。另外, 在肿瘤组织中, AGR2 可以被分泌至细胞外并能在肿瘤病人的血液和尿液中被检测到<sup>[13-14]</sup>。细胞外的 AGR2 是肿瘤微环境中的重要参与者, 已知的功能有导致前列腺基质细胞的程序性死亡<sup>[15]</sup>, 影响上皮细胞的极性和黏附, 引起上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)<sup>[16]</sup>, 与血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 结合, 增强 VEGF 和 FGF 形成二聚体的能力, 继而促进血管内皮细胞和成纤维细胞向肿瘤组织迁移, 引起血管生成<sup>[17]</sup>。这些特性都说明 AGR2 是一个潜在的抗肿瘤靶点。

本课题组通过杂交瘤技术制备了以 AGR2 为靶点的单克隆抗体, 命名为 18A4<sup>[18]</sup>。初步药效实验发现, 18A4 能够抑制 AGR2 表达阳性的乳腺癌细胞的生长和迁移<sup>[19]</sup>, 通过抑制血管生成的功能减缓了 SKOV3 卵巢癌细胞的裸鼠移植瘤的生长<sup>[17,20]</sup>。但 18A4 的药理活性研究仍然存在拓展的空间。本研究运用两种自身不表达 AGR2 的黑色素瘤细胞, 将 AGR2 蛋白和 18A4 同时作用于细胞, 观察 18A4 抗体能否抑制细胞外 AGR2 引起的肿瘤细胞活性。

## 1 材料

### 1.1 试剂

单克隆抗体 18A4, His 标签 AGR2 蛋白由本实验室构建、表达、纯化<sup>[2,18]</sup>。人黑色素瘤细胞 A375, 小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 购自美国 ATCC 中心。DMEM 基础培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清、青

霉素-链霉素混合液; MTT、结晶紫 (索莱宝生物科技有限公司); 细胞周期与细胞凋亡试剂盒 (碧云天生物技术有限公司); 罗丹明标记鬼笔环肽、DAPI (美国 Millipore 公司); 兔抗人 p53 抗体 (美国 Proteintech 公司); 鼠抗  $\beta$ -actin 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); IRDye 680CW 标记的羊抗兔抗体、IRDye 800CW 标记的羊抗鼠抗体 (美国 Odyssey 公司); Dylight488, Dylight594 标记的羊抗兔抗体 (联科生物有限公司)。

### 1.2 仪器

FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 激光共聚焦显微镜 (德国徕卡公司); Odyssey 双色红外激光成像仪 (美国 Li-Cor 有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

A375 和 B16-F10 细胞分别在含 10% 胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基, 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。取对数期生长的细胞进行实验。细胞增殖、细胞周期、细胞迁移、细胞形态观察实验分成空白对照组和 AGR2 组 (50, 100 ng/mL); 18A4 组 (20  $\mu$ g/mL) 及 AGR2 + 18A4 组 (100 ng/mL AGR2 + 20  $\mu$ g/mL 18A4)。Western blot 和免疫荧光实验分成空白对照组和阿霉素组 (1  $\mu$ mol/L); 阿霉素 + AGR2 组 (1  $\mu$ mol/L 阿霉素 + 100 ng/mL AGR2) 及阿霉素 + AGR2 + 18A4 组 (1  $\mu$ mol/L 阿霉素 + 100 ng/mL AGR2 + 20  $\mu$ g/mL 18A4)。

### 2.2 MTT 法检测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加药, 每组设 8 个复孔。培养 24 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 20  $\mu$ L, 继续培养 4 h。吸去培养基, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 10 min 使结晶溶解。酶标仪

测定 490 nm 下的吸收度, 计算细胞生长的抑制率: 抑制率 = (对照组吸收度的平均值 - 实验组吸收度的平均值) / (对照组吸收度的平均值) × 100%。

### 2.3 克隆形成实验测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞增殖的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $2 \times 10^3$  个细胞接种于 6 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加药。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 10 d。吸去培养基, PBS 洗涤后每孔加入 0.5% 结晶紫 500 μL, 染色 30 min。PBS 洗涤, 拍照, 计数。

### 2.4 流式细胞仪检测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞周期的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $5 \times 10^5$  个细胞接种于 6 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h, 加药。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。胰酶消化收集所有细胞, 70% 乙醇固定过夜。PBS 洗涤后 PI 染色, 37 °C 避光水浴 30 min, 流式细胞仪检测细胞周期。

### 2.5 划痕实验检测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞迁移的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养至细胞长满。换成 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基刺激 24 h。用 200 μL 枪头在孔内划痕, PBS 洗涤后加药, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。在 0 h 和 24 h, 每个划痕拍照 4 张, 分析两个时间点上划痕宽度的变化。

### 2.6 鬼笔环肽染色检测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞形态的改变

取对数生长期细胞, 以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于含细胞爬片的 12 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。加药, 继续培养 24 h。PBS 洗涤后取细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后加罗丹明交联的鬼笔环肽, 避光染色 45 min。PBS 洗涤, DAPI 避光染色 5 min。抗荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜镜检, 拍照。

### 2.7 Western blot 检测 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞中 p53 表达量的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $1 \times 10^6$  个细胞接种于 6 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。加药, 继续培养 24 h。胰酶消化收集所有细胞, PBS 洗涤后加入预冷、含蛋白酶抑制剂的 NP40 细胞裂解液裂解, 每个样品中加入等体积的  $5 \times$  上样缓冲液, 混匀, 95 °C 水浴 5 min, -20 °C 储存备用。样

品经 10% SDS-PAGE 分离, 将分离的蛋白电转移至硝酸纤维素膜上, 恒流 300 mA 转膜 1 h。在 5% 脱脂奶中室温振荡封闭 1 h。加 1:1 000 稀释的兔抗人 p53 抗体, 鼠抗 β-actin 抗体, 4 °C 孵育过夜, TNET 溶液洗膜 10 min × 3 次。加 1:5 000 稀释的 IRDye 680CW 标记的羊抗兔抗体或 IR Dye 800CW 标记的羊抗鼠抗体, 室温孵育 1 h, TNE-T 溶液 (10 mmol/L Tris-base, 2.5 mmol/L EDTA-2Na, 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) 洗膜 10 min × 3 次。双色红外激光成像仪扫描, 用 Quantity One 软件分析蛋白条带的深浅。

### 2.8 免疫荧光分析 AGR2 和 18A4 抗体对 A375 和 B16-F10 细胞中 p53 表达量的影响

取对数生长期细胞, 以每孔  $2 \times 10^5$  个细胞接种于含细胞爬片的 12 孔板。37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h。加药, 继续培养 24 h。PBS 洗涤后取细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 0.1% Triton X-100 通透 15 min, 5% 羊血清封闭 1 h。加 1:200 稀释的兔抗人 p53 抗体, 室温孵育 2 h, PBS 洗涤。加 1:500 稀释的 Dylight488 或 Dylight594 标记的羊抗兔抗体, 室温避光孵育 1 h, PBS 洗涤。DAPI 避光染色 5 min, 抗荧光淬灭剂封片, 激光共聚焦显微镜镜检, 拍照。

### 2.9 数据分析

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 比较差异显著性。P < 0.05 表示有显著性差异。

## 3 结果

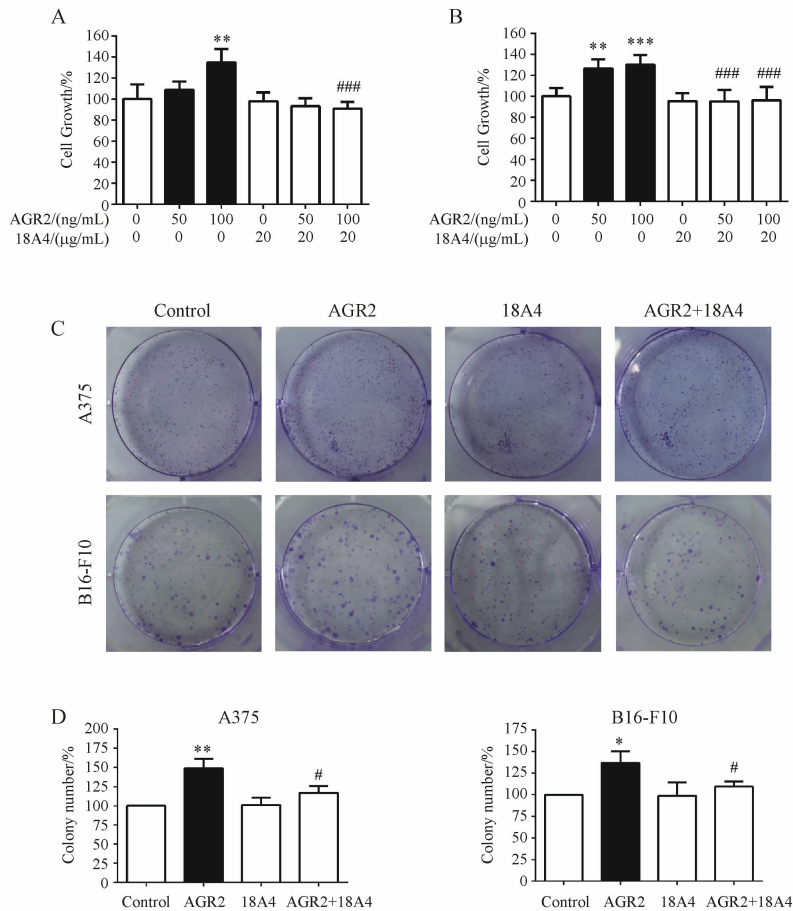
### 3.1 18A4 抗体对胞外 AGR2 引起的细胞增殖加快的抑制作用

运用 MTT 实验测定细胞外 AGR2 和 18A4 对两种黑色素瘤细胞 A375 和 B16-F10 增殖的影响。结果发现, 加入 50 ng/mL AGR2 刺激 24 h 仅显著加快 B16-F10 的增殖, 而 100 ng/mL AGR2 能同时显著提高 A375 和 B16-F10 细胞的增殖, 分别高于对照组生长率 (34.74 ± 7.69)% 和 (29.87 ± 5.02)%。而在加入 100 ng/mL AGR2 的基础上加入 20 μg/mL 18A4, 与 AGR2 组相比, 两种细胞的生长率均有显著的降低, 分别降低了 (43.99 ± 5.93)% 和 (33.63 ± 6.48)%, 如图 1 所示。

用克隆形成实验再次验证 MTT 实验的现象。

与对照组相比,100 ng/mL AGR2 单独作用后,A375 和 B16-F10 细胞形成克隆的数量分别显著增加了 $(49.00 \pm 7.12)\%$ 和 $(36.67 \pm 7.77)\%$ 。而在100 ng/mL AGR2 和20  $\mu\text{g/mL}$  18A4 同时作用的条件下,A375 和 B16-F10 细胞形成克隆的数量与

AGR2 组相比分别减少了 $(32.00 \pm 8.64)\%$ 和 $(27.33 \pm 8.50)\%$ ,如图1C,1D所示。两项实验均表明18A4 抗体能抑制胞外 AGR2 引起的肿瘤细胞增殖加快。



**Figure 1** Monoclonal antibody 18A4 blocked the proliferation enhancement induced by extracellular AGR2 in melanoma cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

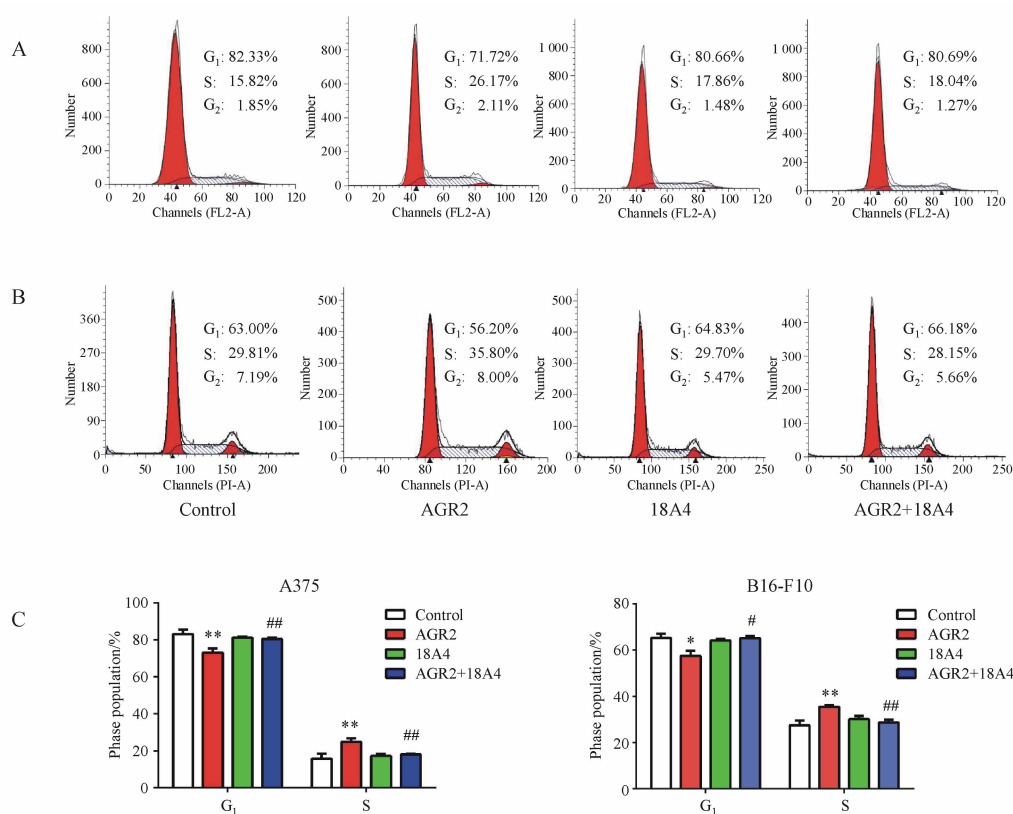
A: MTT assay of AGR2 and mab 18A4 on the proliferation of A375 cells; B: MTT assay of AGR2 and mab 18A4 on the proliferation of B16-F10 cells; C: Colony formation assay of A375 and B16-F10 cells treated with AGR2, 18A4 or a combination of them; D: Quantification of colony numbers in histograms

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group, #  $P < 0.05$ ; ###  $P < 0.001$  vs AGR2 group

### 3.2 18A4 抗体对胞外 AGR2 引起的细胞周期改变的抑制作用

细胞增殖与细胞周期调控密切相关,故通过流式细胞仪检测胞外 AGR2 与 18A4 抗体对两种黑色素瘤细胞周期的影响。与对照组相比,AGR2 组细胞的  $G_1$  期比例分别减少了 $(10.02 \pm 1.92)\%$ 和 $(7.73 \pm 1.70)\%$ ,S 期比例分别增加了 $(9.09 \pm 1.85)\%$ 和 $(8.01 \pm 1.23)\%$ ,统计结果表明 AGR2

组与对照组存在显著性差异。所以胞外 AGR2 能引起肿瘤细胞  $G_1/S$  细胞周期转化。而与 AGR2 组相比,AGR2 + 18A4 组细胞的  $G_1$  期比例分别增加了 $(7.39 \pm 1.37)\%$ 和 $(7.60 \pm 1.40)\%$ ,S 期比例分别减少了 $(6.78 \pm 1.12)\%$ 和 $(6.76 \pm 0.78)\%$ ,统计结果表明 AGR2 + 18A4 组与 AGR2 组存在显著性差异,如图2所示。所以 18A4 抗体能抑制胞外 AGR2 引起的  $G_1/S$  细胞周期转化。



**Figure 2** Monoclonal antibody 18A4 hindered the cell cycle transition induced by extracellular AGR2 in melanoma cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A: Flow cytometry analysis of AGR2 and mab 18A4 on the cell cycle of A375 cells; B: Flow cytometry analysis of AGR2 and mab 18A4 on the cell cycle of B16-F10 cells; C: Statistical analysis of G<sub>1</sub> and S phase distributions in histograms

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs AGR2 group

### 3.3 18A4 抗体对胞外 AGR2 引起的细胞迁移加快和细胞形态变化的抑制作用

通过细胞划痕实验分析胞外 AGR2 和 18A4 抗体对细胞迁移的影响。结果表明, AGR2 组细胞的迁移速度分别比对照组细胞提高了  $(27.88 \pm 8.61)\%$  和  $(49.81 \pm 10.64)\%$ , 两组间有显著性差异。而 AGR2 + 18A4 组细胞的迁移速度分别比 AGR2 组细胞降低了  $(21.21 \pm 8.36)\%$  和  $(40.21 \pm 10.22)\%$ , 两组间有显著性差异, 如图 3A ~ 3D 所示。

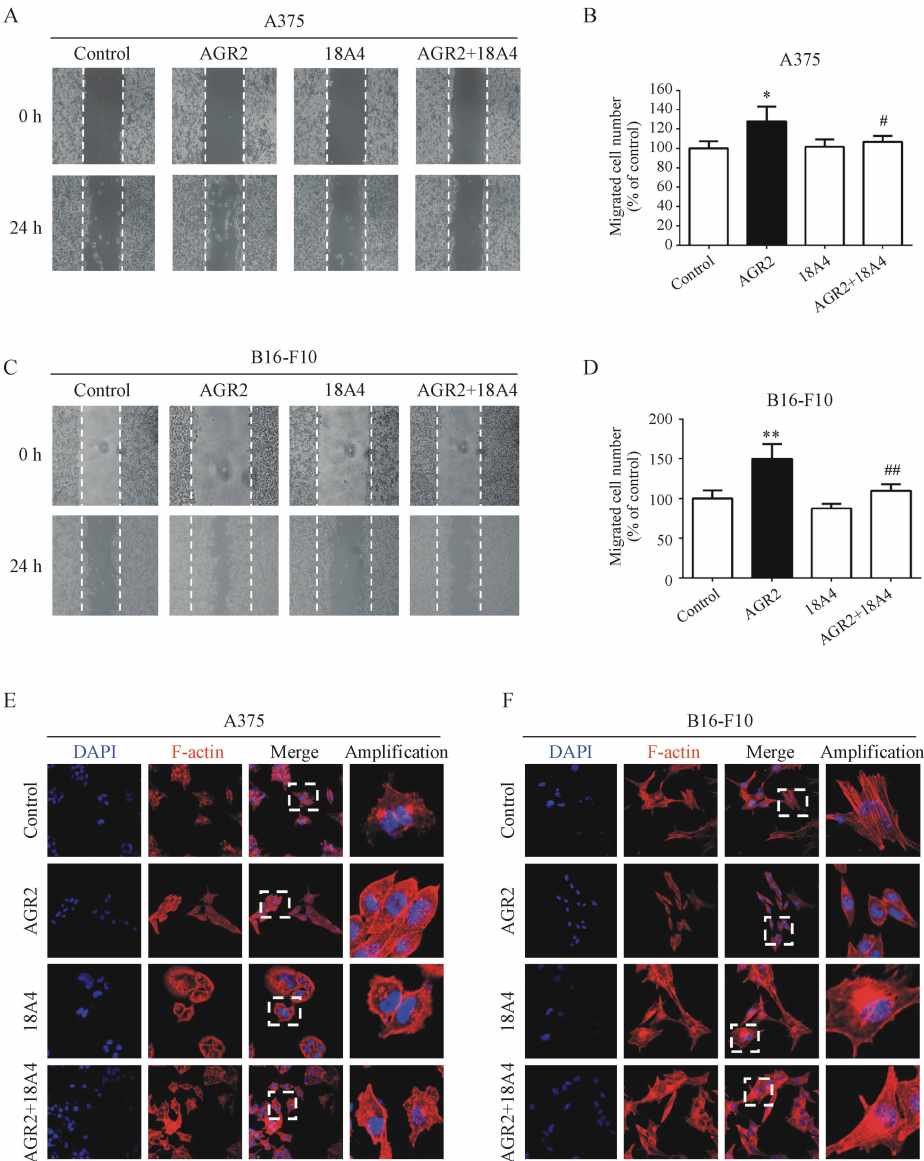
细胞迁移与细胞形态的变化相关, 进一步用鬼笔环肽染色法观察 AGR2 和 18A4 抗体对两种黑色素瘤细胞形态的影响。研究发现与对照组上皮细胞形态相比, AGR2 组的细胞均呈现成纤维细胞的形态, 而 AGR2 + 18A4 组的细胞仍然维持上皮细胞的形态 (图 3E, 3F), 说明胞外 AGR2 能够改变肿瘤细胞的形态, 而 18A4 抗体能抑制 AGR2 的这一作用。

### 3.4 18A4 抗体对胞外 AGR2 引起的 p53 表达量变化的抑制作用

选择检测抑癌基因 p53 的表达量来观察胞外 AGR2 和 18A4 抗体对细胞信号的影响。为了更清晰地观察 p53 表达量的变化, 加入  $1 \mu\text{mol/L}$  阿霉素来增加 p53 的表达量。Western blot 结果显示, 阿霉素组 A375 和 B16-F10 细胞的 p53 表达量分别达到对照组表达量的  $(8.41 \pm 1.91)$  倍和  $(5.90 \pm 0.94)$  倍, 上调明显。与阿霉素组相比, 阿霉素 + AGR2 组细胞的 p53 表达量又明显降低, 分别是阿霉素组 p53 表达量的  $(27.33 \pm 4.15)\%$  和  $(25.50 \pm 7.39)\%$ , 两组间有显著性差异, 说明胞外 AGR2 降低了 p53 的表达量。而阿霉素 + AGR2 + 18A4 组细胞 p53 表达量与阿霉素 + AGR2 组相比有明显的回升, 分别是阿霉素 + AGR2 组 p53 表达量的  $(3.22 \pm 0.57)$  倍和  $(3.85 \pm 1.09)$  倍, 两组间有显著性差异, 说明胞外 AGR2 对 p53 表达量的影响被 18A4 抗体中和, 如图 4A ~ 4D 所示。

为了再次验证 Western blot 的结果,进一步用免疫荧光染色法检测各组细胞的 p53 表达量。实验结果与 Western blot 的结果类似,同时在两种细胞内发现,阿霉素明显提升了荧光强度,即 p53 表达量。阿霉素 + AGR2 组细胞的荧光强度与阿霉

素组相比明显回落,而阿霉素 + AGR2 + 18A4 组细胞的荧光强度又明显回升,如图 4E,4F 所示。Western blot 和免疫荧光的结果均说明胞外 AGR2 引起肿瘤细胞 p53 表达量降低的现象能被 18A4 抗体所抑制。

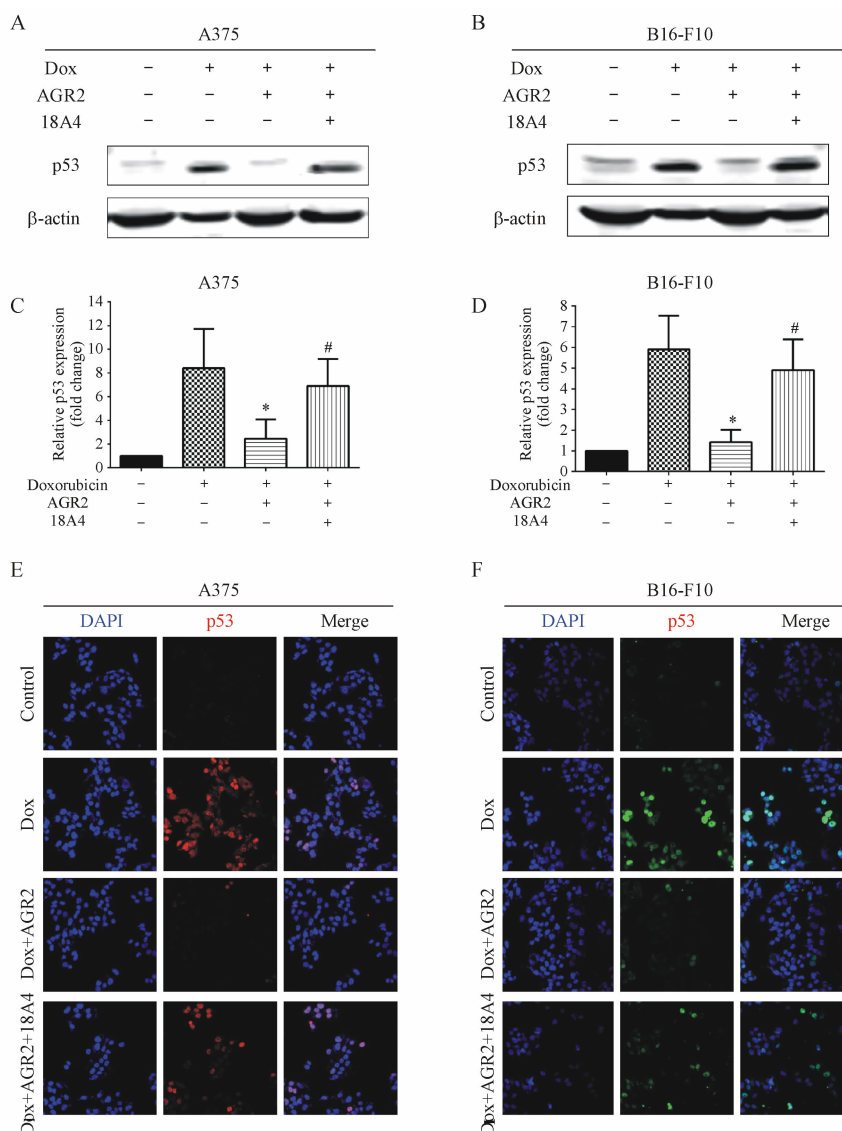


**Figure 3** Monoclonal antibody 18A4 decreased the migration acceleration and morphological changes induced by extracellular AGR2 in melanoma cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Wound healing assay of AGR2 and mab 18A4 on the migration of A375 cells; B: Statistical analysis of A375 cell migration in histograms; C: Wound healing assay of AGR2 and mab 18A4 on the migration of B16-F10 cells; D: Statistical analysis of A375 cell migration in histograms; E: Cell morphology staining of A375 cells with corresponding treatments; F: Cell morphology staining of B16-F10 cells with corresponding treatments

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs AGR2 group





**Figure 4** Monoclonal antibody 18A4 masked the decline of p53 expression level induced by external AGR2 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A; Western blot analysis of p53 expression in A375 cells with corresponding treatments; B; Western blot analysis of p53 expression in B16-F10 cells with corresponding treatments.  $\beta$ -actin was served as an internal control; C; Statistical analysis of the band intensities on Western blots as compared to  $\beta$ -actin bands in A375 cells; D; Statistical analysis of the band intensities on Western blots as compared to  $\beta$ -actin bands in B16-F10 cells; E; Immunofluorescence assay of p53 expression in A375 cells; F; Immunofluorescence assay of p53 expression in B16-F10 cells

\*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs AGR2 group

#### 4 讨论

AGR2 在多种肿瘤组织中过表达,细胞内和细胞外 AGR2 均与肿瘤增殖、转移、耐药等有关,所以 AGR2 是一个潜在的抗肿瘤靶点。虽然科学家们已经提出了若干种抑制 AGR2 功能的策略,但是针对 AGR2 的药物至今尚未出现<sup>[21]</sup>。故本研究探究了以 AGR2 为靶点 18A4 抗体能否抑制细胞外 AGR2 引起的肿瘤细胞活性。

首先通过 MTT 实验和克隆形成实验发现了

18A4 抗体能够抑制细胞外 AGR2 引起的肿瘤细胞增殖加快,并进一步检测胞外 AGR2 与 18A4 对细胞周期的影响。敲降细胞内 AGR2 能够让乳腺癌和前列腺癌细胞阻滞在  $G_1$  期<sup>[22-23]</sup>,但胞外 AGR2 能否影响细胞周期还是未知的。本研究中细胞周期检测结果说明胞外 AGR2 的刺激能够减少  $G_1$  期细胞,增加 S 期细胞。更重要的,胞外 AGR2 对肿瘤细胞周期的调控能被 18A4 抗体抑制。

AGR2 与肿瘤细胞的迁移有着紧密的联系。敲降胞内 AGR2 可减慢肿瘤细胞的侵袭性,反之,

将 AGR2 转入肿瘤细胞,细胞的迁移能力明显增强<sup>[8,24-25]</sup>。同样的,胞外 AGR2 促进了上皮细胞的迁移,引起 EMT,加快伤口愈合<sup>[2,16]</sup>。所以本研究通过划痕实验和细胞形态染色检测 18A4 能否缓解胞外 AGR2 导致的肿瘤细胞迁移加快和细胞形态变化。本研究结果证实 18A4 抗体具有减缓胞外 AGR2 引起的细胞迁移加快和形态变化。

p53 是经典的抑癌基因,超过半数的肿瘤组织中存在 p53 的突变和缺失<sup>[26]</sup>。Hrstka 等<sup>[27]</sup>发现胞内 AGR2 通过双特异性磷酸酶 10 (DUSP10, dual specificity protein phosphatase 10) 的调控降低 p53 的活性,但胞外 AGR2 能否影响 p53 的表达还是未知的。本研究用阿霉素处理肿瘤细胞以增加 p53 的表达量,通过 Western blot 和免疫荧光染色说明胞外 AGR2 的刺激能够降低 p53 的表达量,而 18A4 抗体能够稳定 p53 的表达量,抑制 AGR2 对 p53 表达量的影响。

综上所述,18A4 抗体能够抑制胞外 AGR2 引起的肿瘤细胞活性,包括增殖速度加快、G<sub>1</sub>/S 细胞周期转变、迁移速度加快、细胞形态的改变和 p53 表达量的降低,这些结果不仅延伸了 18A4 的药理作用,也说明 18A4 是一种潜在的抗肿瘤药物。

### 参考文献

- [1] Kumar A, Godwin JW, Gates PB, et al. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate [J]. *Science*, 2007, **318**(5851): 772 - 777.
- [2] Zhu Q, Mangukiy HB, Mashausi DS, et al. Anterior gradient 2 is induced in cutaneous wound and promotes wound healing through its adhesion domain [J]. *FEBS J*, 2017, **284**(17): 2856 - 2869.
- [3] Wodziak D, Dong A, Basin MF, et al. Anterior gradient 2 (AGR2) induced epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling is essential for murine pancreatitis-associated tissue regeneration [J]. *PLoS One*, 2016, **11**(10): e0164968.
- [4] Liu D, Rudland PS, Sibson DR, et al. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(9): 3796 - 3805.
- [5] Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, et al. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(19): 7811 - 7818.
- [6] Zhang JS, Gong A, Cheville JC, et al. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2005, **43**(3): 249 - 259.
- [7] Fritzsche FR, Dahl E, Dankof A, et al. Expression of AGR2 in non small cell lung cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2007, **22**(7): 703 - 708.
- [8] Park K, Chung YJ, So H, et al. AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration [J]. *Exp Mol Med*, 2011, **43**(2): 91 - 100.
- [9] Chevet E, Fessart D, Delom F, et al. Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development [J]. *Oncogene*, 2013, **32**(20): 2499 - 509.
- [10] Brychtova V, Vojtesek B, Hrstka R. Anterior gradient 2: a novel player in tumor cell biology [J]. *Cancer Lett*, 2011, **304**(1): 1 - 7.
- [11] Li Z, Zhu Q, Hu L, et al. Anterior gradient 2 is a binding stabilizer of hypoxia inducible factor-1alpha that enhances CoCl<sub>2</sub>-induced doxorubicin resistance in breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2015, **106**(8): 1041 - 1049.
- [12] Li Z, Zhu Q, Chen H, et al. Binding of anterior gradient 2 and estrogen receptor-alpha: dual critical roles in enhancing fulvestrant resistance and IGF-1-induced tumorigenesis of breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2016, **377**(1): 32 - 43.
- [13] Bu H, Bormann S, Schafer G, et al. The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection [J]. *Prostate*, 2011, **71**(6): 575 - 587.
- [14] Edgell TA, Barraclough DL, Rajic A, et al. Increased plasma concentrations of anterior gradient 2 protein are positively associated with ovarian cancer [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2010, **118**(12): 717 - 725.
- [15] Vitello EA, Quek SI, Kincaid H, et al. Cancer-secreted AGR2 induces programmed cell death in normal cells [J]. *Oncotarget*, 2016, **7**(31): 49425 - 49434.
- [16] Fessart D, Domblides C, Avril T, et al. Secretion of protein disulphide isomerase AGR2 confers tumorigenic properties [J]. *Elife*, 2016, **5**: e13887.
- [17] Guo H, Zhu Q, Yu X, et al. Tumor-secreted anterior gradient-2 binds to VEGF and FGF2 and enhances their activities by promoting their homodimerization [J]. *Oncogene*, 2017, **36**(36): 5098 - 5109.
- [18] Wu ZH, Zhu Q, Gao GW, et al. Preparation, characterization and potential application of monoclonal antibody 18A4 against AGR2 [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2010, **26**(1): 49 - 51.
- [19] 李坤. AGR2 单克隆抗体 18A4 抑制乳腺癌细胞的生长和迁移 [D]. 上海: 上海交通大学, 2011.
- [20] Guo H, Chen H, Zhu Q, et al. A humanized monoclonal antibody targeting secreted anterior gradient 2 effectively inhibits the xenograft tumor growth [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **475**(1): 57 - 63.
- [21] Li K. Monoclonal 18A4 against AGR2 inhibit human breast adenocarcinoma cell growth and migration [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2011.
- [22] Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, et al. Anterior gradient-2 plays



- a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor- $\alpha$  and survivin[J]. *Breast Cancer Res*, 2010, **12**(3): R32.
- [23] Hu Z, Gu Y, Han B, *et al.* Knockdown of AGR2 induces cellular senescence in prostate cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2012, **33**(6): 1178–1186.
- [24] Ma SR, Mao L, Deng WW, *et al.* AGR2 promotes the proliferation, migration and regulates epithelial-mesenchymal transition in salivary adenoid cystic carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2017, **9**(2): 507–519.
- [25] Wang Z, Hao Y, Lowe AW. The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation[J]. *Cancer Res*, 2008, **68**(2): 492–497.
- [26] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al.* p53 mutations in human cancers[J]. *Science*, 1991, **253**(5015): 49–53.
- [27] Hrstka R, Bouchalova P, Michalova E, *et al.* AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway[J]. *Mol Oncol*, 2016, **10**(5): 652–662.

## · 校园信息 ·

### 中国药科大学 2017 年获授权专利情况(2)

序号	标题	发明人
47	氨基甲酸酯桥环咕啉衍生物、其制备方法和医药用途	张晓进; 尤启冬; 胡明阳; 李想; 孙昊鹏
48	一种 N-甲基-4-氨基-5-硝基靛红的制备方法	孙丽萍; 杨圣伟; 开晨晓; 王春萌
49	一种从广陈皮中快速制备 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮的方法	刘鄂湖; 李萍; 肖娉婷; 段莉; 窦莉莉
50	岩白菜素类衍生物及其制备方法和应用	曲玮; 张冬萍; 冯峰; 闫德彪; 叶峰; 解娅; 张仲涛
51	共递送药物和基因的纳米载体及其制备方法和用途	姜虎林; 张兵锋; 邢磊
52	一种具有抗血栓活性多肽的制备方法及应用	孔毅; 陈梅梅; 叶小惠
53	酒石酸唑吡坦口服脉冲释给药系统及其制备方法	李娟; 王广基; 朱正辉
54	香豆雌酮开环类似物及其医药用途	向华; 唐郑普; 骆国顺; 牛绍雄; 王文宾; 郭静沫; 陈明琪; 尤启冬
55	多功能主动靶向透明质酸聚乳酸载体合成及其抗肿瘤药物胶束制备方法	李娟; 王广基; 陈芳; 张经纬; 周芳
56	一类邻苯醌化合物、其制备方法和医药用途	张晓进; 尤启冬; 卞金磊; 钱雪; 王楠
57	千层纸素苷在制备抗肿瘤转移药中的应用	郭青龙; 魏立彬; 卢娜; 赵丽; 周煜新; 李志裕
58	一种区分乳腺腺癌型生物标志物的组合物	齐炼文; 李进; 朱伟; 范勇
59	一种高效萃取动物源性食品中磺胺类药物残留的方法	陈蓉; 曲斌; 沈卫阳; 杨盈盈; 李悦; 陆勇; 刘晓楠
60	噻啉类化合物、其制备方法及医药用途	赖宜生; 杨凤娇; 马骏; 罗明昊; 张姗; 张奕华
61	一种萘普生结肠定位释药微丸及其制备方法	刘建平; 张文丽; 王峻霖; 阙淑玲
62	一种禽流感病毒 H7N9 神经氨酸酶抑制剂的用途	周长林; 窦洁; 王婷婷; 郁洁; 王慧; 靳京
63	苯丙烯酸酯 1,5-二芳基-1,2,4-三氮唑衍生物、其制备方法及其医药用途	徐进宜; 蔡浩; 徐盛涛; 吴晓明; 江波; 裴杨溢; 张朋飞; 沈昊; 姚和权; 谢唯佳
64	诊断区分冠状动脉粥样硬化和稳定型心绞痛的标志物群	齐炼文; 李萍; 朱伟; 陈彦; 范勇
65	一类可抑制表皮生长因子受体的噻啉基乙酰胺类化合物及其应用	林森森; 顾铭; 袁胜涛; 孙立; 严明; 张陆勇; 吴亮; 高鹏; 练进
66	具有催化活性的人源尿酸氧化酶	陈建华; 谢光蓉; 赵百学
67	新型甾体类选择性雌激素受体调节剂、其制备方法及其医药用途	向华; 王叶俊; 唐智超; 吴成喆; 陈明琪; 尤启冬
68	九种人肝 CYP450 酶体外抑制效应快速筛选方法	王广基; 彭英; 孙建国; 吴慧; 张雪媛; 冯冬; 祁欢欢; 张凤逸; 仲云熙; 肖亚楠; 尤国皎
69	VEGFR2 单抗抗体与 MICA 融合蛋白的制备方法及其用途	张娟; 王旻; 戴斯蒙德·奥马内·阿奇姆彭; 唐铭英; 王佑富; 赵欣; 袁锡彬
70	一种去氧鬼臼毒素长循环脂质体冻干制剂	周建平; 王舒; 丁杨
71	一种氟苯尼考固体自乳化制剂	肖衍宇; 余艾玲; 徐郁蕊; 宋珏; 穆勇
72	三氮唑-N-乙基四氢异喹啉类化合物及其制备方法和应用	黄文龙; 钱海; 焦磊; 刘保民; 邱倩倩; 赵天笑; 黄文娟; 葛元丽
73	利用电气石回收水体中磷霉素的磷资源	史静; 陈建秋; 张斯路; 方梦媛; 余梦琳; 周璇; 张梦芸
74	Withaphysalin 型化合物及其用途	孔令义; 罗俊; 高彩云; 罗建光
75	pH 响应性一体双能纳米载体及其制备方法和用途	姜虎林; 崔朋飞; 邢磊
76	用于诊断急性冠脉综合征的代谢标志物	李萍; 刘丽伟; 范勇; 齐炼文
77	一种银杏内酯 L 的制备方法	李萍; 杨华; 郭汝洲; 楼凤昌; 刘新光
78	一种便于拆卸的生物制药实验器械清洗头	李仁杰; 单思明
79	一组用于诊断冠心病的代谢标志物群	齐炼文; 米茂德; 朱伟; 范勇
80	一种具有降血糖兼调脂作用的表位组合肽及其用途	李泰明; 焦琳方; 顾小莺; 王岐信; 孟凯特; 魏晓敏; 张婷婷; 何恬; 王全逸; 诸晓燕; 陈斯睿; 金亮
81	聚阴离子聚合物/磷酸钙纳米基因递送系统及制备方法	孙敏捷; 郭倩; 张灿; 平其能; 周占威
82	一种含光伏充电的足球训练用障碍杆	张陵; 薛壮; 智翔; 吴冰
83	上肢锻炼器	王振亚
84	一种应用超临界抗溶剂技术制备雌二醇超细微粒的方法	王志祥; 刘尚德; 缪虹刚; 王为彦; 宋雅琴; 高赵华
85	一种 $\gamma$ -吡喃酮化合物的合成方法	杜鼎; 董书顶
86	一种新型的组蛋白去乙酰化酶抑制剂	朱雍; 陈新; 赵爽; 陈亚东; 周庆发; 陆涛
87	冬凌草甲素衍生物在制备抗结核药物方面的新用途	徐进宜; 徐盛涛; 李达翔; 蔡浩; 裴玲玲; 姚鸿; 张恒源; 周志文; 王超磊; 姚和权; 吴晓明; 谢唯佳
88	一种普瑞巴林胃漂浮缓释片剂及其制备方法	尹莉芳; 朱春莉; 吴蒙蒙; 秦超; 何均; 徐思远; 黄晓敏
89	一种金纳米环类药物结合物及其制备方法和应用	丁娅; 张灿; 张文婕; 耿冬冬; 梁娟娟

(科技处)