

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.16.002

抗人 IgM 抗体对鼻咽癌 HNE-1 细胞生物学特性的影响*

周 珊¹, 刘彦婷¹, 赵飞鹏¹, 冯华君¹, 涂晓敏¹, 杨金亮², 梁传余³, 覃 纲^{1△}

(1. 西南医科大学附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川泸州 646000; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 成都 610041; 3. 四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科, 成都 610041)

[摘要] **目的** 研究抗人免疫球蛋白 M(IgM) 抗体对鼻咽癌 HNE-1 细胞增殖、凋亡、细胞周期和成瘤的影响。**方法** 经抗人 IgM 抗体处理后, 采用细胞增殖抑制实验观察 HNE-1 细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡及周期, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色检测细胞凋亡; 构建裸鼠动物模型, 腹腔注射抗人 IgM 抗体, 观察移植瘤的生长, 免疫组织化学 SP 法检测移植瘤中 IgM 和糖蛋白 96(gp96) 的蛋白表达。**结果** 抗人 IgM 抗体可呈浓度和时间依赖性抑制 HNE-1 细胞的增殖($P < 0.05$); 流式细胞术检测表明抗人 IgM 抗体可促进 HNE-1 细胞 G₁ 期细胞百分比明显降低, S 期细胞百分比明显增加, 细胞凋亡率明显增高($P < 0.05$); TUNEL 检测提示抗人 IgM 抗体可促进 HNE-1 细胞凋亡($P < 0.01$); 移植瘤实验显示抗人 IgM 抗体可明显抑制移植瘤的体积和质量($P < 0.05$); 移植瘤免疫组织化学显示裸鼠腹腔注射抗人 IgM 抗体后, 移植瘤内 IgM 和 gp96 蛋白的表达水平明显低于对照组($P < 0.05$)。**结论** 抗人 IgM 抗体可有效抑制 HNE-1 细胞的增殖、促进细胞凋亡、阻滞细胞周期, 并且能抑制裸鼠移植瘤的生长, 其机制可能与抑制 IgM 和 gp96 蛋白表达有关。

[关键词] 鼻咽肿瘤; 免疫球蛋白 M; 抗体; HNE-1; 生物学特性**[中图分类号]** R739.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)16-2117-05

Effect of anti-human IgM antibody on biological characteristics of human nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cell line in vitro and in vivo*

ZHOU Shan¹, LIU Yanting¹, ZHAO Feipeng¹, FENG Hua jun¹, TU Xiaomin¹, YANG Jinliang², LIANG Chuanyu³, QIN Gang^{1△}

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of anti-human immunoglobulin M (IgM) on proliferation, apoptosis, cell cycle and tumor formation in human nasopharyngeal carcinoma HNE-1 cell line in vitro and in vivo. **Methods** After treatment with anti-human IgM antibody, proliferation of HNE-1 cells was observed by cell proliferation inhibition assay, apoptosis and cell cycle of HNE-1 cells were detected by flow cytometry, and apoptotic cells were detected by TUNEL staining. Nude mouse models were constructed, and were injected intraperitoneally with anti-human IgM antibodies (once every 3 days). The growth of transplanted tumor was observed once every 4 days. After the fifth injection, the expression levels of IgM and gp96 protein in transplanted tumor were observed by immunohistochemical method (streptavidin-peroxidase conjugated method, SP). **Results** MTS assay showed that anti-human IgM antibody can significantly inhibit the proliferation of HNE-1 cells in concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that the anti-human IgM antibody promoted a significant decrease in percentage of cells in G₁ phase, a significant increase in percentage of cells in S phase, and a significant increase in apoptotic rate of HNE-1 cells ($P < 0.05$). TUNEL staining showed that the anti-human IgM antibody promoted apoptosis of HNE-1 cells ($P < 0.01$). Transplantation tumor experiment showed that anti-human IgM antibody can significantly inhibit the volume and weight of transplanted tumor ($P < 0.05$). The immunohistochemistry showed that the expression levels of IgM and

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81602570, 81773529); 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目(2015LZCYD-S02 4/11)。作者简介: 周珊(1993-), 住院医师, 在读硕士, 主要从事耳鼻咽喉头颈外科基础与临床研究。△ 通信作者, E-mail: qin-lzm@163.com。

gp96 proteins in mouse transplanted tumors after intraperitoneal injection with anti-human IgM antibodies were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The anti-human IgM antibody could effectively inhibit the proliferation of HNE-1 cells, promote apoptosis, and arrest cell cycle. Anti-human IgM antibody could also inhibit the growth of transplanted tumor in nude mouse, which might be related to inhibition of the expressions of IgM and gp96 proteins.

[Key words] nasopharyngeal neoplasms; immunoglobulin M; antibody; HNE-1; biological characteristics

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种头颈部常见的恶性肿瘤,多起源于鼻咽黏膜的上皮,在西方国家发病率极低(0.5/100 000),但高发于我国南方(30/100 000)^[1]。经以放疗为主的综合治疗,早期 NPC 患者 5 年生存率可达 90%,而晚期 NPC 患者的 5 年生存率仅维持在 70%左右,甚至更低^[2]。因此,研究 NPC 的发病机制和寻找新的治疗靶点具有重要的临床意义。免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)是一类重要的免疫球蛋白分子,经典的免疫学理论认为仅由 B 淋巴细胞产生。近年的研究发现,上皮来源的组织和细胞系也可以表达 Ig,如 IgA、IgG 和 IgM^[3-4]。研究证实,IgM 在多种人上皮来源的肿瘤细胞中高表达,可能参与肿瘤免疫反应^[5],在肝癌、前列腺癌和卵巢癌的筛选和诊断方面具有生物标志物的潜力^[6-8]。然而,IgM 在 NPC 中的表达和功能尚不明确。本研究旨在探讨抗人 IgM 抗体对 NPC HNE-1 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响,并构建裸鼠移植瘤模型进行验证,为 NPC 的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人鼻咽癌 HNE-1 细胞系由四川大学华西医院实验室提供;RPMI-1640 和胎牛血清(FBS)购自美国 Thermo 公司;羊抗人 IgM 抗体、羊抗 IgG 纯化免疫球蛋白和碘化丙啶(PI)均购自美国 Sigma 公司;3-(4,5-二甲基吡啶-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(MTS)实验试剂盒和脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测试剂盒均购自美国 Promega 公司;细胞周期检测试剂盒购自南京吉凯科技有限公司;兔抗人 gp96 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗人 IgM 多克隆抗体、生物素化羊抗 IgG 抗体、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;免疫组织化学 SP 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司;BALB/c-nu 裸鼠(雌性)购自成都达硕实验动物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HNE-1 细胞在 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度孵箱中采用含 10% FBS+1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基培养。

1.2.2 细胞增殖检测 严格按照试剂盒说明书进行。浓度梯度检测:取对数生长期的细胞,以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板,培养 24 h 后,弃培养液,分 3 组加药:实验组(100 μL 含不同浓度羊抗人 IgM 抗体+含

2.5% FBS 的 RPMI-1640)、IgG/磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(100 μL 含相同浓度羊抗 IgG 或 PBS+含 2.5% FBS 的 RPMI-1640)、空白对照组(100 μL 含 2.5% FBS 的 RPMI-1640),羊抗人 IgM 抗体、羊抗 IgG 和 PBS 设置的浓度梯度均为 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 μg/mL,设置校正孔,未接种细胞,加入 100 μL 含 2.5% FBS 的 RPMI-1640 校正吸光度值(A 值),培养 3 d 后,加入 20 μL MTS,酶标仪测 490 nm 处 A 值(A₄₉₀ 值)。时间梯度检测:种板、分组同前,培养 24 h 后,弃培养液,分 3 组加药,每隔 24 h 加入 20 μL MTS,酶标仪测 A₄₉₀ 值,连续测 6 d。空白对照组调零,每组设 3 个复孔,重复 3 次;细胞增殖抑制率(%)=(1-处理组 A₄₉₀/空白对照组 A₄₉₀)×100%。

1.2.3 细胞凋亡检测 流式细胞仪检测:将细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养 24 h,弃上清液;分 3 组,对应分别加 1 mL 含已调整浓度为 200 μg/mL 的羊抗人 IgM 抗体、羊抗 IgG 或含有相同体积的 PBS 的 2.5% FBS 的 RPMI-1640,继续培养 72 h;收集每孔细胞制成含 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个细胞的单细胞悬液,离心,70%乙醇固定,加 1 mL PI 染液,调整细胞密度为 5×10^5 个/毫升,上机检测及铺片拍照;细胞凋亡率(%)=(凋亡细胞总数/总细胞数)×100%。TUNEL 试剂盒检测:按试剂盒说明书进行,将细胞以 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中培养;阴性对照组以 1 μL 双蒸水代替 rTdT 酶,阳性对照组以 Dnase I 预处理细胞,通过荧光显微镜观察拍照,将细胞核呈强蓝色荧光的细胞作为阳性细胞;细胞凋亡指数(%)=(一个视野的凋亡细胞数/通过视野的细胞总数)×100%。

1.2.4 细胞周期检测 按照周期试剂盒说明书处理细胞,调整细胞密度为 5×10^5 个/毫升,流式细胞仪检测红色荧光,用 Multicycle 软件分析。

1.2.5 体内移植瘤实验 将 1×10^6 个 HNE-1 细胞皮下接种于雌性 BALB/c-nu 裸鼠(4~5 周龄)的右背腹侧;建模成功后,随机分成实验组、IgG 对照组和 PBS 对照组,分别于腹腔注射等量的羊抗人 IgM 抗体、羊抗 IgG 及 PBS,每 3 天注射 1 次,每只裸鼠 1.5 mg,共 5 次;每 4 天测肿瘤体积;在第 5 次给药完成后 1 周处死裸鼠,剥离移植瘤,称重。瘤体体积= $(D \times d^2)/2$,D 为最长径,d 为最短径。动物实验得到西南医科大学动物实验伦理委员会的批准,批准号为 201605045。

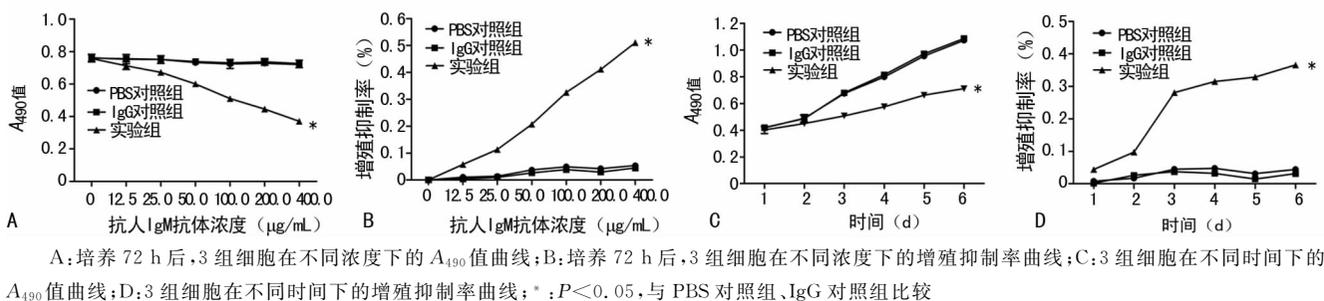


图 1 抗人 IgM 抗体抑制 HNE-1 细胞增殖

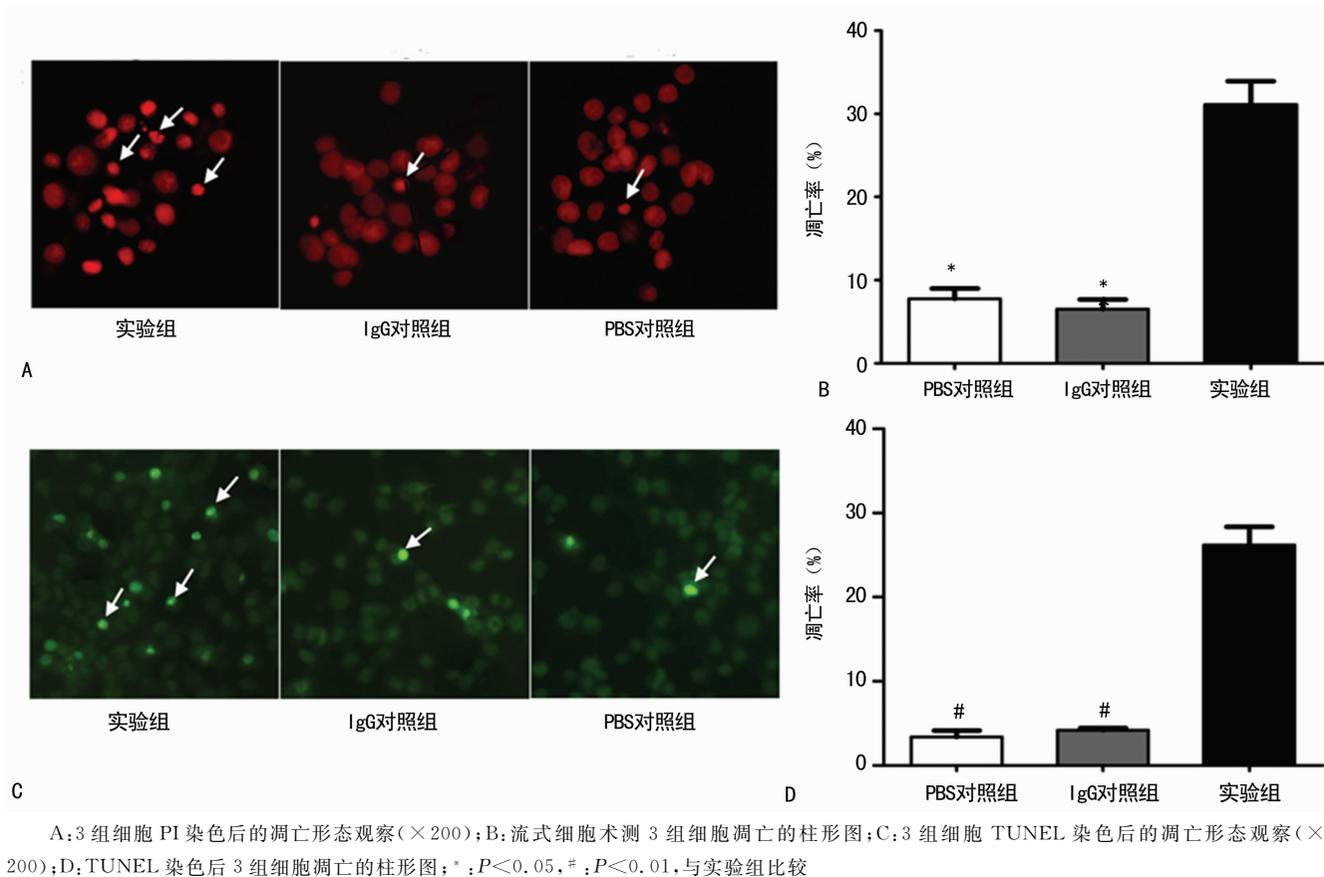


图 2 抗人 IgM 抗体诱导 HNE-1 细胞凋亡

1.2.6 免疫组织化学检测 将石蜡包埋的移植瘤组织 $4 \mu\text{m}$ 切片, 按免疫组织化学 SP 试剂盒说明书进行; 双盲法观察每张切片的阳性表达, 细胞质呈黄棕色为阳性表达; 每张切片选 5 个视野, 显微镜($\times 400$ 倍)下拍照, Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件检测平均光密度(MOD)值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 用 Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件检测 MOD 值, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验或单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

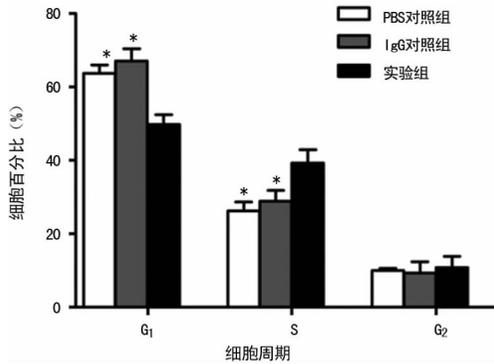
2.1 抗人 IgM 抗体对 HNE-1 细胞增殖的影响 与 IgG 和 PBS 对照组比较, 不同浓度抗人 IgM 抗体培养 HNE-1 细胞 72 h 后, 随浓度的增加 A_{490} 值减小, 增

殖抑制率增加, 从浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 开始, A_{490} 值和增殖抑制率出现明显差异, 见图 1A、B。含 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的抗人 IgM 抗体培养 HNE-1 细胞 6 d, 结果显示: A_{490} 值和增殖抑制率随时间的增加而增加; 与 IgG 和 PBS 对照组比较, 实验组从第 3 天出现明显抑制, 见图 1C、D。

2.2 抗人 IgM 抗体对 HNE-1 细胞凋亡的影响 流式细胞仪检测结果: 浓度为 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗人 IgM 抗体作用于实验组 HNE-1 细胞, 培养 72 h 后显示, 实验组的凋亡率 [$(31.10 \pm 2.81)\%$] 明显高于 IgG 对照组 [$(6.56 \pm 1.14)\%$] 和 PBS 对照组 [$(7.79 \pm 1.21)\%$], 差异有统计学意义 ($F = 161.6673, P < 0.05$), 见图 2B; 并且用 PI 染色也可观察到类似结果, 见图 2A。TUNEL 检测结果: HNE-1 细胞经含抗人 IgM 抗体培养基培养 72 h 后, 细胞凋亡明显, 呈较强

的绿色荧光,见图 2C;实验组凋亡指数 $[(26.19 \pm 2.17)\%]$ 明显高于 IgG 对照组 $[(4.18 \pm 0.27)\%]$ 和 PBS 对照组 $[(3.38 \pm 0.77)\%]$,差异有统计学意义 $(F=281.0989, P<0.01)$,见图 2D。

2.3 抗人 IgM 抗体对 HNE-1 细胞周期的影响 流式细胞检测结果显示,与 IgG 对照组和 PBS 对照组比较,实验组 HNE-1 细胞 G₁ 期细胞百分比减少、S 期细胞百分比增加,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,见图 3。

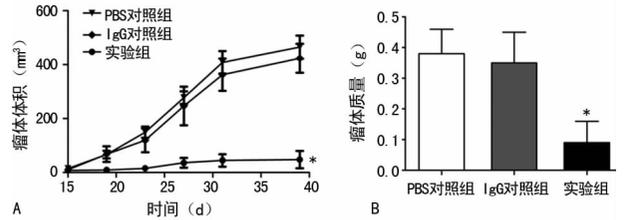


*: $P<0.05$, 与实验组比较

图 3 流式细胞仪检测 HNE-1 细胞周期分布

2.4 抗人 IgM 抗体对移植瘤的影响 裸鼠皮下接种 HNE-1 细胞,成功构建移植瘤模型,分 3 组(每组 5 只),3 组裸鼠在实验期间均无死亡。实验结果显示:腹腔注射药物结束后 1 周,实验组的平均瘤体体积 $[(26.73 \pm 16.51) \text{ mm}^3]$ 明显低于 IgG 对照组

$[(204.97 \pm 151.88) \text{ mm}^3]$ 和 PBS 对照组 $[(230.16 \pm 167.78) \text{ mm}^3]$,差异有统计学意义 $(P<0.05)$;实验组的瘤体平均质量 $[(0.09 \pm 0.07) \text{ g}]$ 明显低于 IgG 对照组 $[(0.35 \pm 0.10) \text{ g}]$ 和 PBS 对照组 $[(0.38 \pm 0.08) \text{ g}]$,差异有统计学意义 $(P<0.05)$,见图 4。相对于 IgG 对照组和 PBS 对照组,实验组的瘤体质量抑瘤率分别为 74.29% 和 76.32%。



A: 瘤体体积; B: 瘤体质量; *: $P<0.05$, 与 PBS 对照组、IgG 对照组比较

图 4 裸鼠移植生长情况

2.5 移植瘤中 IgM 与糖蛋白 96(gp96) 的表达 将 HNE-1 移植瘤组织切片行免疫组织化学染色,结果显示:IgM 蛋白和 gp96 蛋白主要表达于细胞质中,呈棕黄色,见图 5;实验组的 IgM MOD 值 (0.01 ± 0.01) 明显低于 IgG 对照组 (0.06 ± 0.03) 和 PBS 对照组 (0.05 ± 0.03) ,差异有统计学意义 $(P<0.05)$;同样,实验组的 gp96 MOD 值 (0.05 ± 0.01) 明显低于 IgG 组 (0.10 ± 0.03) 和 PBS 对照组 (0.11 ± 0.02) ,差异有统计学意义 $(P<0.05)$ 。

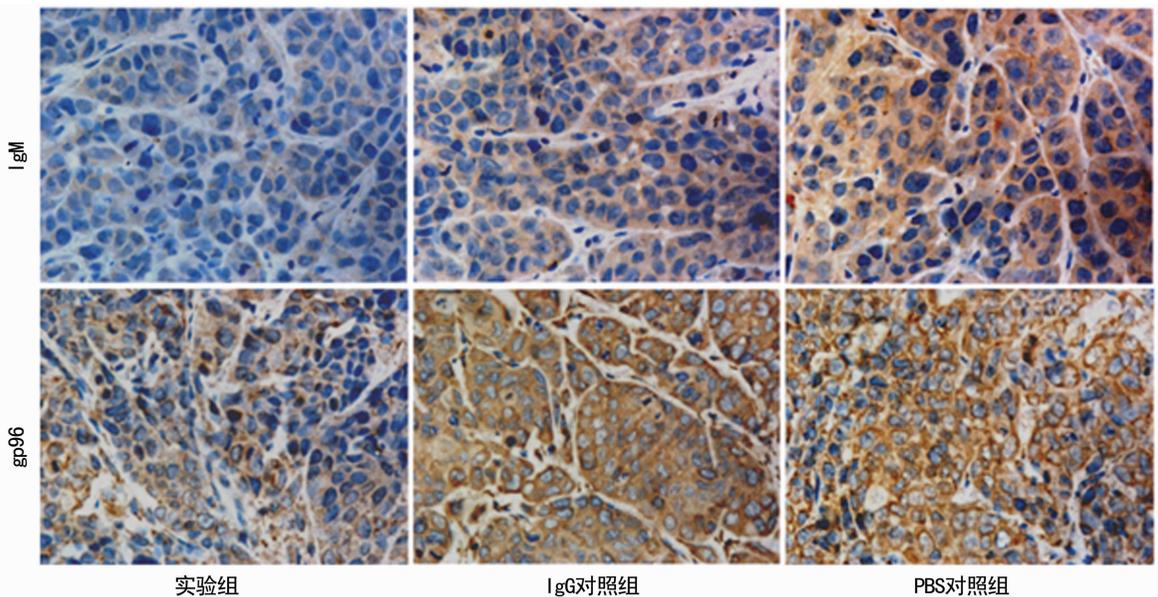


图 5 免疫组织化学检测瘤体中 IgM 和 gp96 蛋白的表达($\times 400$)

3 讨论

目前,上皮来源的恶性肿瘤组织和细胞中 Ig 的生物学活性和潜在机制已成为肿瘤研究的热点之一。如 ZHENG 等^[3]研究发现,人上皮肿瘤细胞衍生的 IgA 轻链可以诱导 S 期增加,促进细胞生长。尿道上皮肿

瘤中 IgG 的高表达可促进细胞增殖,抑制细胞凋亡;抗 IgG 抗体可诱导其细胞凋亡,IgG 也可抑制胰腺癌细胞凋亡,促进肿瘤生长^[9]。QIU 等^[10]证实了肿瘤细胞分泌的 IgG 是细胞生存和生长所必需的,利用特异性羊抗 IgG 抗体可诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖、

抑制裸鼠移植瘤的生长,提出肿瘤来源的 IgG 能促进肿瘤细胞的生长。最近,观察到含特异性 CDR3 片段的反义重组载体能够抑制结肠癌 HT-29 细胞中 Ig 表达,诱导细胞凋亡,成功地抑制肿瘤细胞的增殖,认为肿瘤来源的 Ig 能够促进细胞增殖及生长,即肿瘤细胞衍生的 Ig 具有生长因子样活性^[11]。

同样,本实验结果也揭示了抗人 IgM 抗体可能具有抑制 HNE-1 细胞增殖和生长的作用,并且抗人 IgM 抗体能有效地诱导 HNE-1 细胞凋亡。ZHENG 等^[3]发现抗人 Ig α 单克隆抗体封闭肿瘤细胞 Ig 的功能,抑制 CNE-1 和 HeLa 细胞的生长活性,随后进一步证实 Ig α 能够增加其恶性增殖能力,而且发现肿瘤来源的 Ig α 可促进细胞周期进入 S 期。本研究结果显示,抗人 IgM 抗体改变 HNE-1 细胞周期分布,阻滞于 S 期,G₁ 期减少,与 ZHENG 等^[3]结果一致。

gp96 属于热休克蛋白 90(HSP90)家族中的一个成员,能够参与肿瘤抗原的合成、装配及抗原提呈,与肿瘤特异性抗原肽结合形成 gp96-肽复合物,激活抗肿瘤特异性免疫应答和免疫调节^[12]。gp96 在多种恶性肿瘤细胞中高表达,可能是恶性肿瘤诊断和免疫的靶点。研究表明,在喉癌组织高表达的 gp96 与喉癌的发生、发展和预后相关^[13]。QIAN 等^[14]发现提取不同骨髓瘤细胞系分泌的 gp96 混合成疫苗,可抑制小鼠骨髓瘤的侵袭。以上研究证明 gp96 在肿瘤免疫治疗中发挥重要的作用。有研究报道,肺癌组织中 gp96 和 IgG 高表达,可能二者共同参与肿瘤的免疫防御和逃逸^[15]。在本实验中构建裸鼠移植瘤模型,发现抗人 IgM 抗体可抑制移植瘤的生长,免疫组织化学检测瘤体组织中 IgM 和 gp96 表达情况,发现实验组中 IgM 和 gp96 表达明显低于对照组($P < 0.05$),提示抗人 IgM 抗体能抑制移植瘤的生长可能与抑制 IgM 和 gp96 蛋白表达有关。

综上所述,抗人 IgM 抗体能抑制 HNE-1 细胞的增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期于 S 期,减少细胞的 G₁ 期,并可能通过抑制 IgM 和 gp96 蛋白的表达进而抑制裸鼠移植瘤的生长。本研究结果可能为抗 NPC 研究提供新的思路。

参考文献

[1] LEE A W, MA B B, NG W T, et al. Management of nasopharyngeal carcinoma: current practice and future perspective[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(29): 3356-3364.

[2] BENSOUDA Y, KAIKANI W, AHBEDDOU N, et al. Treatment for metastatic nasopharyngeal carcinoma[J]. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 2011, 128(2): 79-85.

[3] ZHENG H, LI M, LIU H, et al. Immunoglobulin alpha

heavy chain derived from human epithelial cancer cells promotes the access of S phase and growth of cancer cells [J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(1): 82-87.

- [4] LIANG P Y, LI H Y, ZHOU Z Y, et al. Overexpression of immunoglobulin G prompts cell proliferation and inhibits cell apoptosis in human urothelial carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1783-1791.
- [5] HU F, ZHANG L, ZHENG J, et al. Spontaneous production of immunoglobulin M in human epithelial cancer cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51423.
- [6] MOSSAD N A, MAHMOUD E H, OSMAN E A, et al. Evaluation of squamous cell carcinoma antigen-immunoglobulin M complex (SCCA-IGM) and alpha-L-fucosidase (AFU) as novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11559-11564.
- [7] GALLOTTA A, ZIGLIOLI F, FERRETTI S A, et al. A novel algorithm for the prediction of prostate cancer in clinically suspected patients [J]. *Cancer Biomark*, 2013, 13(4): 227-234.
- [8] BANDIERA E, ZANOTTI L, FABRICIO A S, et al. Cancer antigen 125, human epididymis 4, kallikrein 6, osteopontin and soluble mesothelin-related peptide immunocomplexed with immunoglobulin M in epithelial ovarian cancer diagnosis [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(9): 1815-1824.
- [9] WAN X, LEI Y, LI Z, et al. Pancreatic expression of immunoglobulin G in human pancreatic cancer and associated diabetes [J]. *Pancreas*, 2015, 44(8): 1304-1313.
- [10] QIU X Y, ZHU X H, ZHANG L, et al. Human epithelial cancers secrete immunoglobulin G with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19): 6488-6495.
- [11] 邓郁青, 郑杰, 李国辉, 等. 免疫球蛋白在结肠癌 HT-29 细胞中的表达及其生物学活性探讨 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(2): 88-91.
- [12] WANG X, WANG Q, LIN H. Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 72 and glycoprotein 96 in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Clin Dev Immunol*, 2010(2010): 212537.
- [13] 陈才伟, 贾晓娟, 孟颂东, 等. Gp96 蛋白的免疫学及其临床应用研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 704-711.
- [14] QIAN J, HONG S, WANG S, et al. Myeloma cell line-derived, pooled heat shock proteins as a universal vaccine for immunotherapy of multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 114(18): 3880-3889.
- [15] 王慧贤, 刘彦仿, 杨守京, 等. 热休克蛋白 70, 葡萄糖调节蛋白 94 和 IgG 在人肺癌组织中的表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(5): 447-449.