

靶向抑制表皮生长因子受体EGFR逆转骨肉瘤恶性生物学行为研究

向华夏^{1,2} 康权^{1,2} 李志鹏^{1,2} 罗庆^{1,2*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院肝胆外科, 重庆 400014; ²重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所干细胞实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

摘要 该研究探讨应用表达重组抗表皮生长因子受体三型变体(EGFRvIII)的单链可变区片段(scFv)抗体的重组腺病毒感染骨肉瘤细胞, 靶向抑制EGFRvIII活性后, 骨肉瘤恶性生物学行为的变化情况。收获重组腺病毒, 感染骨肉瘤细胞143B、MG63、TE85, 靶向抑制EGFRvIII活性; 体外通过MTT、结晶紫染色、划痕实验、细胞吸附、细胞Matrigel迁移等实验探讨骨肉瘤细胞增殖、黏附、迁移、侵袭等肿瘤恶性生物学行为的变化情况。体内通过感染骨肉瘤动物模型, 靶向抑制EGFRvIII活性后, 应用Xenogen imaging成像技术分析对肿瘤生长的影响。体外实验结果显示, 靶向抑制骨肉瘤EGFRvIII活性, 可以明显下调肿瘤细胞的增殖、黏附、迁移、侵袭能力, 逆转肿瘤恶性生物学行为; 体内实验结果显示, 靶向抑制骨肉瘤EGFRvIII活性, 可明显下调肿瘤细胞的增殖生长能力。靶向抑制EGFRvIII活性可能逆转骨肉瘤恶性生物学行为, 其可能成为骨肉瘤治疗中极有希望的新靶点。

关键词 靶向抑制; 骨肉瘤; EGFR; EGFRvIII; 逆转; 恶性生物学行为

Targeting Inhibition of EGFR Reverses the Malignant Behavior of Osteosarcoma

XIANG Huaxia^{1,2}, KANG Quan^{1,2}, LI Zhipeng^{1,2}, LUO Qing^{1,2*}

(¹Department of Hepatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; ²Laboratory of Stem Cell Biology and Therapy, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorder, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

Abstract The aim of this work was to investigate the malignant behavior changes of osteosarcoma. These osteosarcoma cells were infected with adenovirus which can express recombinant anti-epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) single-chain variable fragment (scFv) antibody. This kind of antibody can inhibit EGFRvIII in osteosarcoma cells. We harvest the recombinant adenovirus to infect osteosarcoma cells 143B, MG63, TE85. *In vitro*, MTT, crystal violet staining, cell scratch assay, cell assay, cell migration, matrigel experiment methods were used to investigate the changes of tumor malignant behaviors such as proliferation, adhesion, migration

收稿日期: 2019-06-12 接受日期: 2019-09-03

国家自然科学基金(批准号: 81172545)和重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(批准号: 2017MSXM041)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13452336031, E-mail: 352934430@qq.com

Received: June 12, 2019 Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81172545), and Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (Grant No.2017MSXM041)

*Corresponding author. Tel: +86-13452336031, E-mail: 352934430@qq.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:11:16 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1111.024.html>

and invasion of osteosarcoma cell. *In vivo*, we built animal models of osteosarcoma which were treated by targeted inhibition of EGFR and then detected the tumor growth by using Xenogen imaging analysis. The malignant behaviors of osteosarcoma 143B, MG63, TE85 were significantly inhibited after inhibiting EGFRvIII. Xenogen imaging results indicate that the growth of tumor is slowing down. The malignant behaviors of osteosarcoma could be significantly decreased and reversed after inhibiting EGFRvIII in osteosarcoma cells *in vitro*. And also the growth ability of tumor cell proliferation may be significantly decreased after inhibiting EGFRvIII *in vivo*. EGFRvIII may be the very promising new treatment target of osteosarcoma in the future.

Keywords targeting inhibition; osteosarcoma; EGFR; EGFRvIII; reverse; malignant

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是儿童及青少年最常见的、恶性程度较高的原发性骨肿瘤,其生物学行为多呈高度恶性,患者早期即可发生远处转移,死亡率较高。手术切除原发病灶加新辅助化疗是骨肉瘤目前标准的治疗方式,使其远期生存率提高为60%~70%,但在近三十年中,骨肉瘤伴远处转移的患者生存率并没有明显改善,化疗效果也未获得明显的突破,且目前对骨肉瘤的治疗仍存在争论^[1-2],因此,亟需开发有效治疗骨肉瘤的新药物,以提高患者的生存率。

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族,又称为erbB家族,由四个主要成员构成:erbB-1(EGFR)、erbB-2(Her2/neu)、erbB-3以及erbB-4。有研究提出,EGFR表达异常与肿瘤发生、发展密切相关,且与恶性肿瘤细胞增殖、黏附、血管形成、转移、放射敏感性等方面关系密切,尤其表皮生长因子变异体EGFRvIII更是和肿瘤的预后密切相关,EGFR已成为抗肿瘤分子靶向研究热点^[3-6]。但是,目前国内外研究中,关于EGFR尤其是EGFRvIII在骨肉瘤中表达情况的报道较少,而且关于EGFRvIII在骨肉瘤中表达对骨肉瘤恶性生物学行为影响尚不明确。

本课题组前期已证明,表皮生长因子变异体EGFRvIII在经典骨肉瘤系143B、MG63、TE85中高表达;并成功构建表达重组抗表皮生长因子受体三型变异体(EGFRvIII)的单链可变区片段(scFv)抗体的重组腺病毒,证明其能发挥靶向抑制EGFRvIII的作用。

本研究旨在探讨应用表达重组抗表皮生长因子受体三型变异体(EGFRvIII)的单链可变区片段(scFv)抗体的重组腺病毒感染骨肉瘤细胞143B、MG63、TE85,靶向抑制表皮生长因子受体EGFRvIII活性后,能否逆转骨肉瘤恶性生物学行为。

1 材料及方法

1.1 材料

人骨肉瘤细胞株143B、人骨肉瘤细胞株MG63、人骨肉瘤细胞株TE85、HEK293细胞、腺病毒AdR-scFv-EGFRv3、AdR-RFP、质粒pSEB-LUC、pAmpho、电穿孔感受态细菌DH10B均由美国芝加哥大学分子肿瘤中心实验室惠赠;脂质体转导试剂Lipofectamine购自Invitrogen公司;MTT、DMSO购自Sigma公司;Matrigel购自BD公司;荧光素酶底物购自Sigma公司;裸鼠,6~8周龄,18~20 g,雌性,清洁级,由重庆医科大学动物实验中心提供。

1.2 细胞培养及腺病毒转染

将143B、MG63、TE85细胞复苏培养,状态良好后,接种于T25培养瓶,培养于8 mL含10% FBS的DMEM完全培养基中,置于二氧化碳培养箱(5.0% CO₂、37 °C)培养;接种后6 h,分别用表达scFv-EGFRvIII、RFP的腺病毒感染143B、MG63、TE85细胞,病毒用量为25 μL/瓶;腺病毒感染后12 h倒置荧光显微镜观察腺病毒感染效率,待感染效率大于90%,进行下一步实验。

1.3 MTT比色法细胞增殖实验

病毒感染36 h后,将细胞从培养瓶中消化下来,重悬计数以10⁶~10⁷个/mL细胞量接种于96孔板;分别在接种后6 h、12 h、24 h、36 h,加MTT溶液混匀,置于二氧化碳培养箱(5.0% CO₂、37 °C)培养,4 h后加入DMSO混匀,置于二氧化碳培养箱(5.0% CO₂、37 °C)培养;1 h后吸光度(D)值测定,测定波长为570 nm。

1.4 结晶紫染色检测细胞增殖实验

病毒感染36 h后,将细胞从培养瓶中消化下来,重悬计数以10⁶~10⁷个/mL细胞量接种于24孔板,每组处理3孔;分别在接种后12 h、24 h、48 h进行结晶紫染色;吸去培养液,加入结晶紫染色试剂1 mL/孔,静置30 min,自来水冲洗,室温干燥照相。

1.5 细胞吸附实验

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的I型胶原包被96孔板,放入孵箱内,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;PBS洗涤2次,并用1%BSA封闭1 h,移除BSA液体;将目的细胞与含有1%血清的培养基混匀后铺板;分别在0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h 6个时间点,进行如下操作;PBS洗涤6次;10%的福尔马林固定;加入50 μL 含1%的亚甲蓝和0.01 mmol/L的硼酸盐缓冲液室温下染色30 min;吸出亚甲蓝,洗涤3次;加入盐酸混合液,振荡。设定波长630 nm。

1.6 划痕实验检测细胞迁移

将用100%酒精浸泡的三叉孔移入6孔板,紫外光消毒备用;在病毒感染36 h后,将细胞从培养瓶中消化下来,重悬计数后以 $10^6\sim 10^7/\text{mL}$ 细胞量接种于6孔板,3孔重复;细胞贴壁后,轻轻移出三叉孔;分别在接种后12 h、24 h、36 h、48 h 4个时间点在倒置荧光显微镜下观察成像。

1.7 细胞侵袭实验

将浓度为0.1~1.0 mg/mL的基质胶加入Insert;将Insert放在操作台,风机吹干;加入培养基在Insert底部,湿润2 h;移除培养基;将病毒感染36 h后的骨肉瘤细胞重悬配成浓度为 $1\times 10^5\sim 2\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液备用;加300 μL 化学吸引剂;转移Insert到12孔板内,迅速加入0.3 mL细胞悬液,孵育24 h;移出Insert,浸泡于PBS中,清除未贴壁细胞;福尔马林固定10 min, PBS清洗1次;将Insert浸泡入苏木素30 min,用蒸馏水洗3次;用沾湿棉签在Insert表面擦拭,将没有迁移进入基质胶的细胞擦掉;将膜从Insert切下来,放在载玻片上,中性树脂封片;在高倍镜下按方向选10个视野,计数侵入基质胶的细胞个数。

1.8 筛选表达荧光素酶的稳定细胞株并鉴定

将质粒pSEB-LUC、pAmpho转入DH10B电穿孔感受态细菌,行电转导后,接入LB培养基37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜培养;Wizard试剂盒提取2个质粒DNA;转染前3~5 h,接种HEK293于T25培养瓶,细胞密度为60%左右,使用含FBS和含有青/链霉素混合液(penicillin/streptomycin, P/S)的DMEM培养基,5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育;转染时,使用10 μL 质粒pSEB-LUC、5 μL pAmpho,加入15 μL 转染试剂脂质体Lipofectamine、500 μL DMEM培养基(不含FBS及P/S),混匀,室温下放置20 min;取出3~5 h前准备的融合度为40%~60%的HEK293,吸弃培养基,加入3 mL DMEM培养基(不含FBS和P/S),轻轻洗涤细胞后吸

弃培养基,再次加入2.5 mL不含FBS和P/S的DMEM培养基,5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育约10 min;将质粒及脂质体混合液加入HEK293细胞,轻轻地摇晃培养瓶混匀,5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育;4 h后,吸弃不含FBS和P/S的培养基,加入4 mL DMEM培养基(含10% FBS及P/S),置入5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育;转染后36 h、60 h、84 h、108 h收集逆转录病毒病毒上清;将143B、MG63、TE85细胞复苏培养,观察细胞状态良好,接种143B、MG63、TE85细胞于T25培养瓶,细胞密度为40%左右;细胞贴壁后,吸弃培养基,加入收集备用的4 mL逆转录病毒原于T25培养瓶,置入5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中过夜孵育;重复感染2~4次;加入5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗生素Blastin筛选已感染逆转录病毒,每天观测对照组和实验组的生长状态,至实验组细胞大部分死亡,而对照组基本全部死亡时,筛选出稳定表达荧光素酶的稳定细胞株143B-LUC、MG63-LUC、TE85-LUC;检测细胞荧光素酶读数鉴定是否已经获得稳定细胞株:将细胞接种于24孔板,24 h后,每孔加入100 μL 细胞裂解液,充分裂解后,取50 μL 加入荧光素酶底物20 μL 混合,上机读数检测。

1.9 使用稳定细胞株进行体内注射及动物实验分组

将稳定细胞株143B-LUC、MG63-LUC、TE85-LUC复苏培养,观察状态良好后,接种于100 mm细胞培养皿,根据接种动物量准备,置于二氧化碳培养箱(5.0% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$);接种6 h后,分别用表达scFv-EGFRvIII、RFP的腺病毒感染稳定细胞株;腺病毒感染12 h后,倒置荧光显微镜观察病毒转染率,达90%以上;在病毒感染36 h后,收集细胞,离心,去上清,根据计数得细胞密度,加入PBS稀释至 10^7 个/mL;1 mL针管吸取50 μL 细胞,裸鼠膝关节注射建立动物模型。每种骨肉瘤细胞系动物模型均设置3个观察时间点(注射细胞1周后、2周后、3周后),每个时间点重复实验2次,每组设置2只对照动物模型(#1、#2)和3只实验模型(#3、#4、#5)。动物实验严格遵循重庆医科大学伦理委员会制定的相关规定(伦理审批号:17036M)。

1.10 荧光素酶成像仪观测肿瘤生长情况

建立动物肿瘤模型后,每周(1周后、2周后、3周后)使用荧光素酶成像仪观测动物模型的肿瘤成瘤情况;取动物于荧光素酶成像仪所在房间,待裸鼠麻醉后,腹腔注射100 μL 荧光素酶底物,计时;打开

和调试好仪器, 根据我们照相的裸鼠数量, 选择合适的照射范围, 确认各参数, 将裸鼠放入照射区域。在腹部注射荧光素酶底物10 min后, 开始取景; 保存图像; 将照射完的裸鼠复苏, 归还动物房; 分析Xenogen imaging成像仪的数据。

1.11 统计学方法

采用SPSS 20统计软件进行数据分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析和 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT比色实验

MTT比色细胞增殖实验结果如图1所示, 图1A、图1B、图1C分别代表143B、MG63、TE85 3种骨肉瘤细胞系的增殖曲线, 红色曲线代表对照RFP组, 蓝色曲线代表EGFRvIII抑制组; 在病毒感染6 h、12 h、24 h、36 h后检测, 与对照RFP组相比, EGFRvIII抑制组的细胞增殖速度在143B、MG63、TE85 3种实

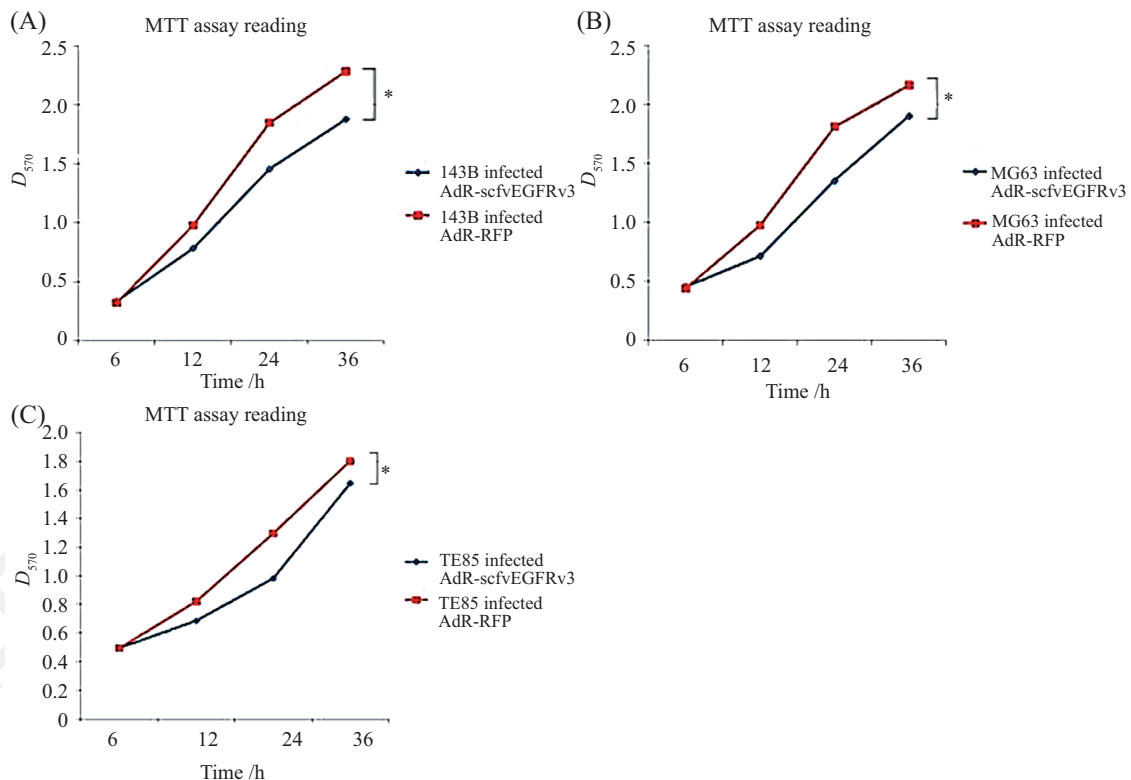
验细胞组中均有下降, 总体呈下降趋势, 差异具有统计学意义($*P < 0.05$)(图1)。

2.2 结晶紫染色检测细胞增殖实验

分别在病毒感染12 h、24 h、48 h后对三种不同肿瘤细胞进行结晶紫染色, 结果如图2所示, 与对照RFP组相比, EGFRvIII抑制组的细胞增殖速度在143B、MG63、TE85 3种实验细胞组中都有下降趋势(图2), 而且这种抑制在143B与MG63细胞组中表现明显。MTT比色法实验和结晶紫染色实验结果显示, 靶向抑制EGFR变异体活性后, 能抑制肿瘤增殖能力, 说明EGFRvIII可能与骨肉瘤的肿瘤增殖有相关性。

2.3 细胞吸附实验

细胞吸附实验结果如图3所示, 图3A、图3B、图3C分别代表143B、MG63、TE85 3种不同骨肉瘤细胞系的吸附结果, 红色柱状代表RFP对照组, 蓝色柱状代表EGFRvIII抑制组; 病毒感染后0.5 h、1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h分别检测3种骨肉瘤细胞



A: 骨肉瘤细胞143B在病毒感染6 h、12 h、24 h、36 h后增殖实验结果; B: 骨肉瘤细胞MG63在病毒感染6 h、12 h、24 h、36 h后增殖实验结果; C: 骨肉瘤细胞TE85在病毒感染6 h、12 h、24 h、36 h后增殖实验结果。红色曲线代表对照组, 蓝色曲线代表实验组。 $*P < 0.05$ 。

A: result of cell proliferation of osteosarcoma cell 143B at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h after viral infection; B: result of cell proliferation of osteosarcoma cell MG63 at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h after viral infection; C: result of cell proliferation of osteosarcoma cell TE85 at 6 h, 12 h, 24 h, 36 h after viral infection. The red curve represents the control group and the blue curve represents the experimental group. $*P < 0.05$.

图1 MTT比色法细胞增殖实验

Fig.1 MTT cell proliferation assay

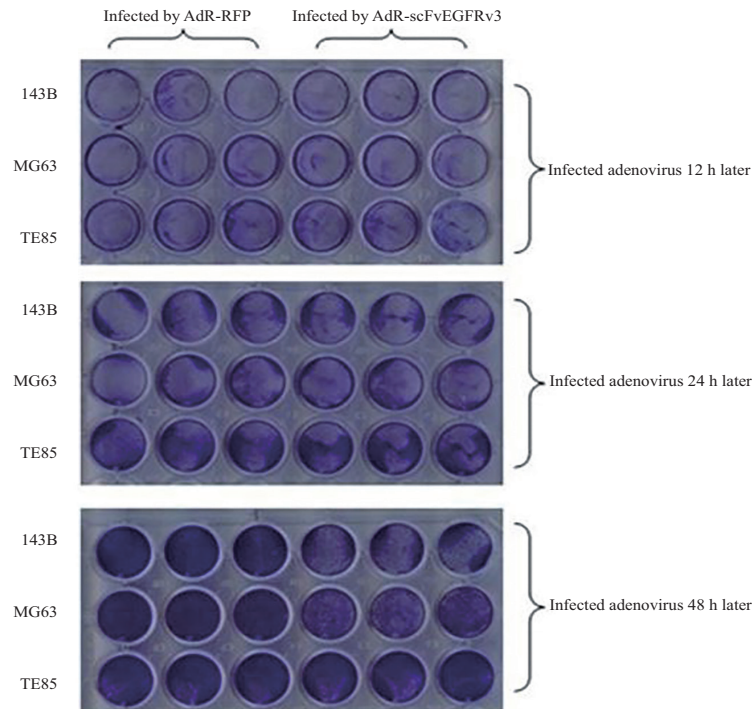


图2 结晶紫染色检测细胞增殖实验

Fig.2 Cell proliferation assay by Crystal Violet staining

吸附能力, 我们发现, 在143B与MG63细胞组中, 与对照RFP组比, EGFRvIII抑制组细胞黏附能力明显下降, 差异具有统计学意义($*P < 0.05$), 而TE85组没有发现明显变化, 无统计学意义($P > 0.05$)(图3)。

2.4 划痕实验检测细胞迁移

图4、图5、图6分别代表143B、MG63及TE85 3种不同骨肉瘤细胞系的细胞在病毒感染12 h、24 h、36 h和48 h后迁移实验结果, 我们可以发现, 与对照RFP组相比, EGFRvIII抑制组细胞的迁移均受到不同程度的抑制。

2.5 细胞侵袭实验

图7、图8、图9为3种不同骨肉瘤细胞侵袭实验结果, 在100倍、200倍视野下观察, 与对照组相比, 靶向抑制EGFR变异体活性后, 肿瘤细胞穿膜数量明显减少; 对照组和抑制组分别进行穿膜细胞计数发现, 抑制组较对照组肿瘤细胞穿膜数量减少, 差异具有统计学意义($*P < 0.05$)。

2.6 建立了表达荧光素酶的143B、MG63、TE85稳定细胞株

采用293细胞包装携带有 luc 基因的逆转录病毒, 收获逆转录上清后, 用于感染骨肉瘤细胞, 由于构建的逆转录病毒内含有Blastin抗性, 使用Blastin加压筛选出稳定表达荧光素酶的稳定细胞株143B-LUC、

MG63-LUC、TE85-LUC。检测细胞荧光素酶读数(表1), 证明已经获得稳定细胞株。

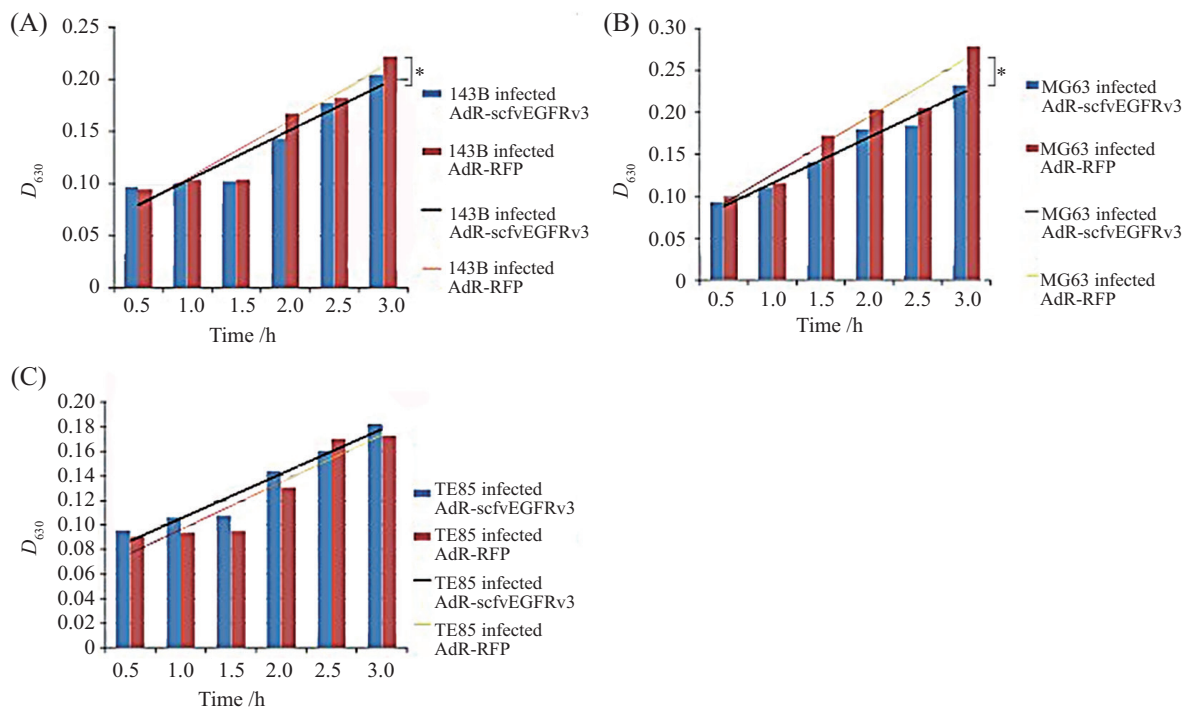
2.7 荧光素酶成像仪观测肿瘤生长情况

结果如图10、图11、图12所示, 在骨肉瘤细胞注入裸鼠膝关节1周、2周、3周后观测肿瘤细胞在体内的成瘤情况, 在构建的143B、MG63及TE85 3种骨肉瘤动物模型中, 我们发现, EGFRvIII抑制组较对照组骨肉瘤生长受到抑制, 肿瘤生长速度减慢。

3 讨论

骨肉瘤是儿童及青少年最常见的恶性骨肿瘤, 该病具有高转移率和耐药性^[7]。有研究发现, 近20%骨肉瘤患者在诊断时就可探查其转移病灶, 最常见转移部位是肺。在使用有效化疗前骨肉瘤预后差、生存率低, 手术切除和/或放疗后2年总生存率为15%~20%^[8]。随着新辅助化疗方案的提出, 包括3~4种细胞毒性药物(顺铂、阿奇霉素、甲氨蝶呤、异环乙酰胺), 骨肉瘤无远处转移患者5年生存率提高至65%~70%, 而伴有远处转移的患者5年生存率仅为19%~30%^[9-10]。因此, 研发新的和有效的治疗骨肉瘤的化疗药物是目前亟待解决的问题。

目前, EGFR是抗肿瘤分子靶向治疗中的研究热点。该受体的异常表达或变异体与肿瘤的恶性生



A: 骨肉瘤细胞143B在病毒感染0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h、3.0h后吸附实验结果; B: 骨肉瘤细胞MG63在病毒感染0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h、3.0h后吸附实验结果; C: 骨肉瘤细胞TE85在病毒感染0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h、3.0h后吸附实验结果。红色柱状代表对照组, 蓝色柱状代表实验组。* $P < 0.05$ 。

A: adhesion result of osteosarcoma cell 143B after virus infection at 0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2.0 h, 2.5 h, 3.0 h; B: adhesion result of osteosarcoma cell MG63 after virus infection at 0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2.0 h, 2.5 h, 3.0 h; C: adhesion result of osteosarcoma cell TE85 after virus infection at 0.5 h, 1.0 h, 1.5 h, 2.0 h, 2.5 h, 3.0 h. The red bars represent the control group and the blue bars represent the experimental group. * $P < 0.05$.

图3 细胞吸附实验

Fig.3 Cell adhesion assay

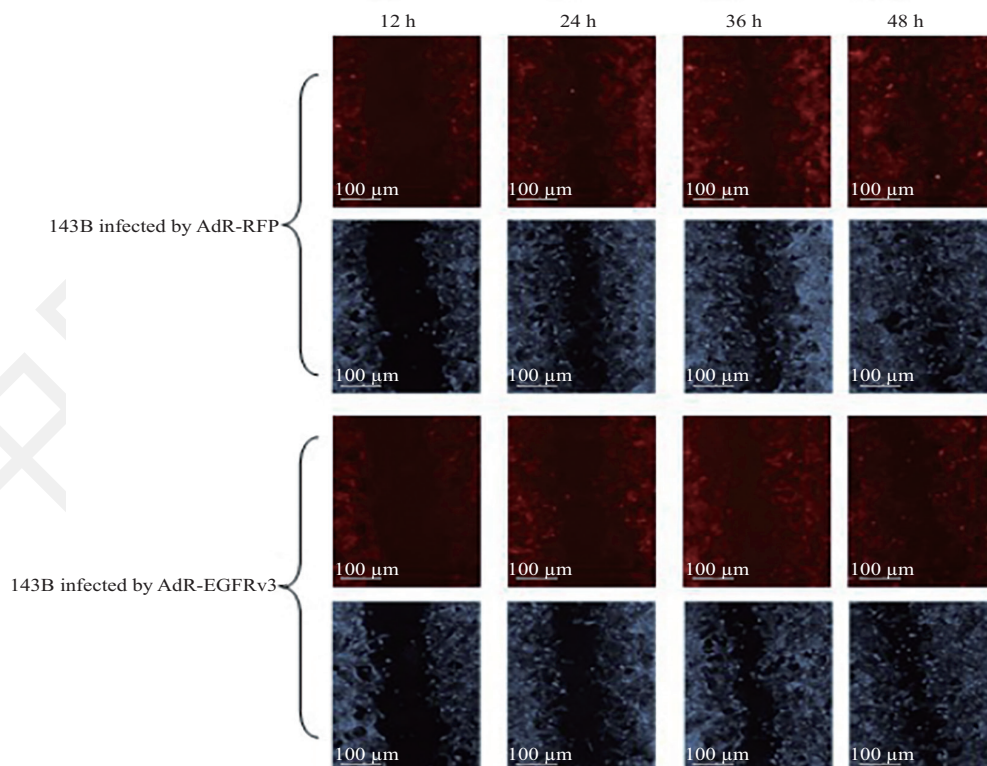


图4 细胞体外划痕实验检测143B细胞迁移

Fig.4 *In vitro* 143B cell migration assay by cell wound healing

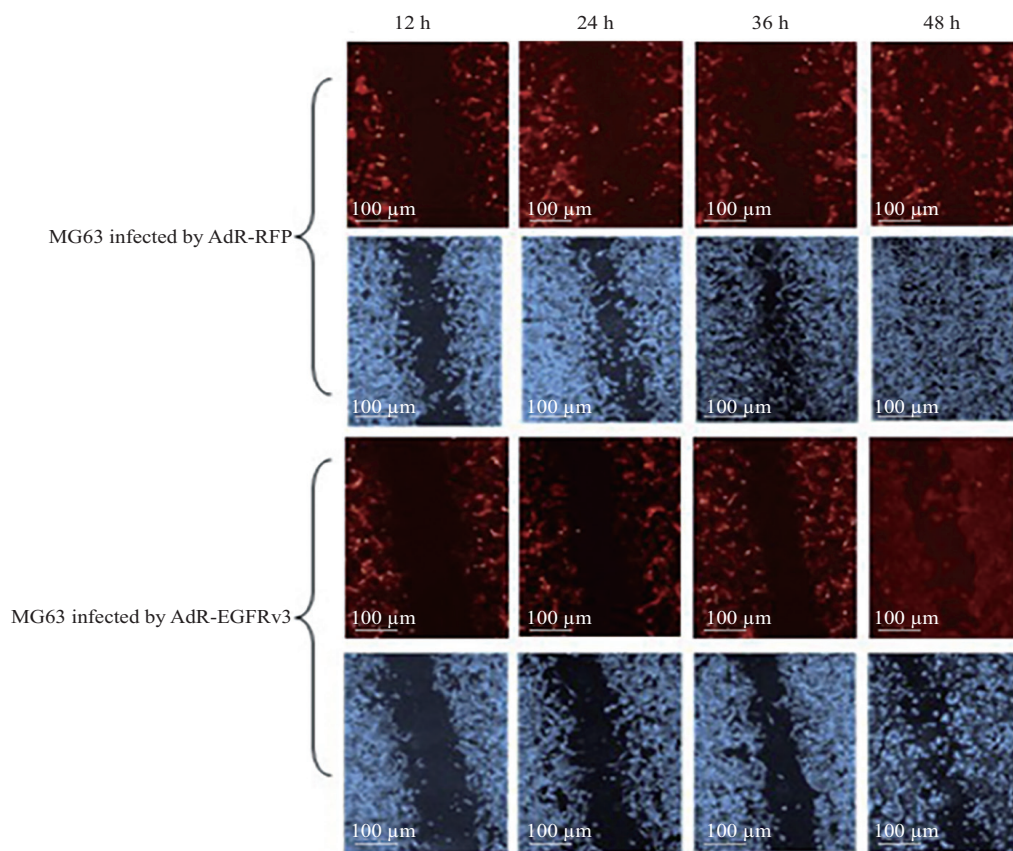


图5 细胞体外划痕实验检测MG63细胞迁移

Fig.5 *In vitro* MG63 cell migration assay by cell wound healing

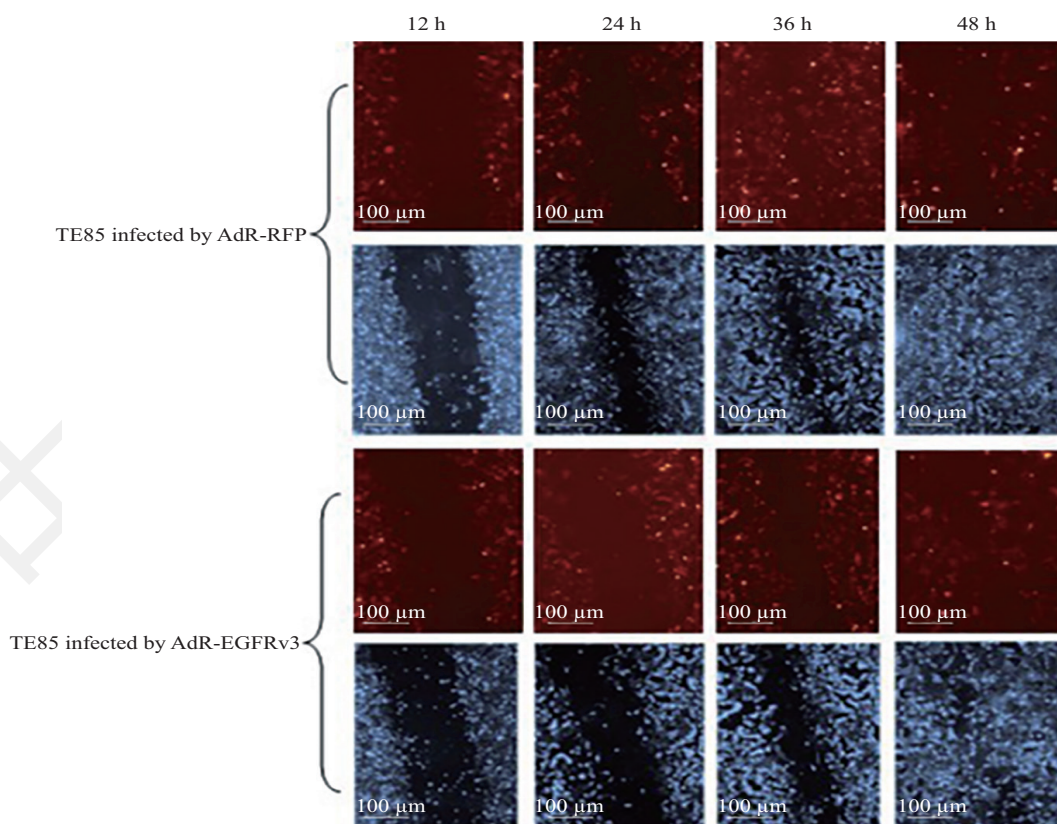
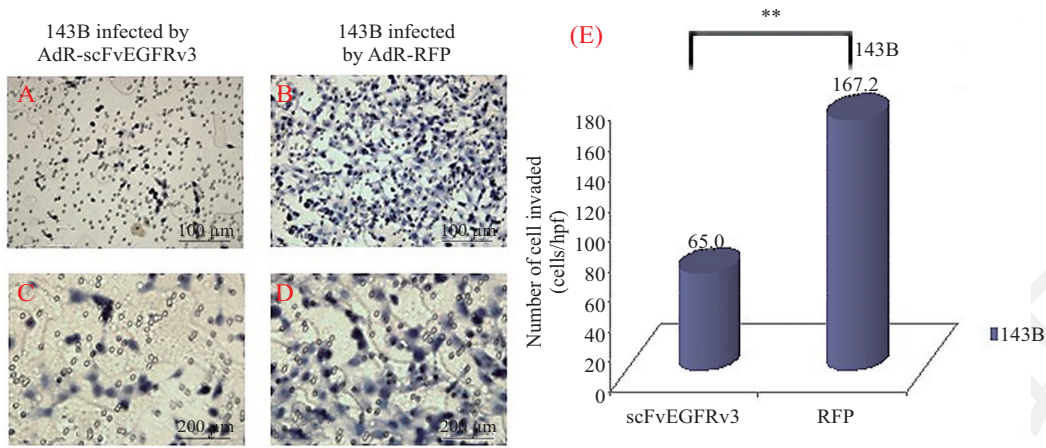


图6 细胞体外划痕实验检测TE85细胞迁移

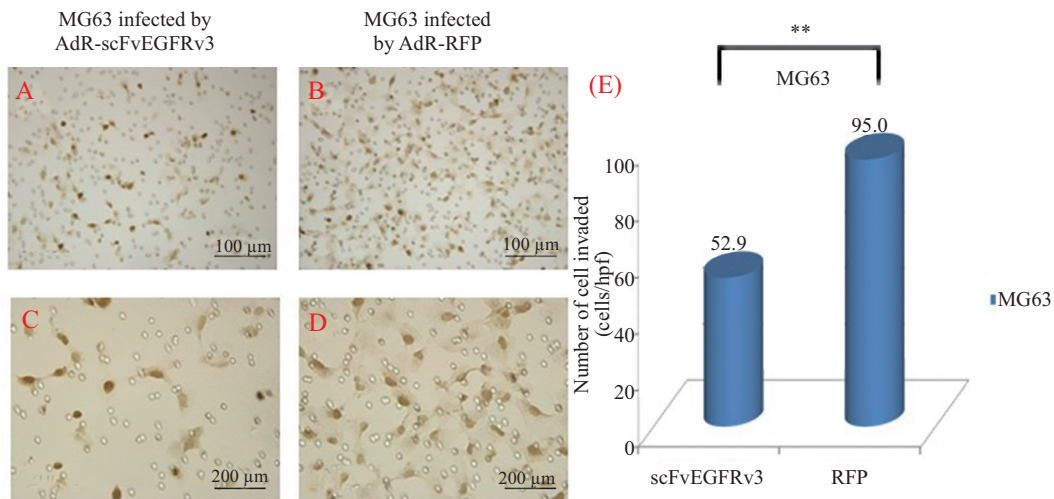
Fig.6 *In vitro* TE85 cell migration assay by cell wound healing



A: 实验组143B细胞侵袭实验结果; B: 对照组143B细胞侵袭实验结果; C: 实验组143B细胞侵袭实验结果; D: 对照组143B细胞侵袭实验结果; E: 实验组与对照组细胞计数结果。 ** $P < 0.01$ 。

A : results of invasion of 143B cells in the experimental group; B: results of invasion of 143B cells in the control group; C: results of invasion of 143B cells in the experimental group; D: results of invasion of 143B cells in the control group; E: cell count results of experimental group and control group. ** $P < 0.01$.

图7 143B细胞体外Matrigel细胞侵袭实验
Fig.7 143B *in vitro* cell invasion assay using Matrigel



A: 实验组MG63细胞侵袭实验结果; B: 对照组MG63细胞侵袭实验结果; C: 实验组MG63细胞侵袭实验结果; D: 对照组MG63细胞侵袭实验结果; E: 实验组与对照组细胞计数结果。 ** $P < 0.01$ 。

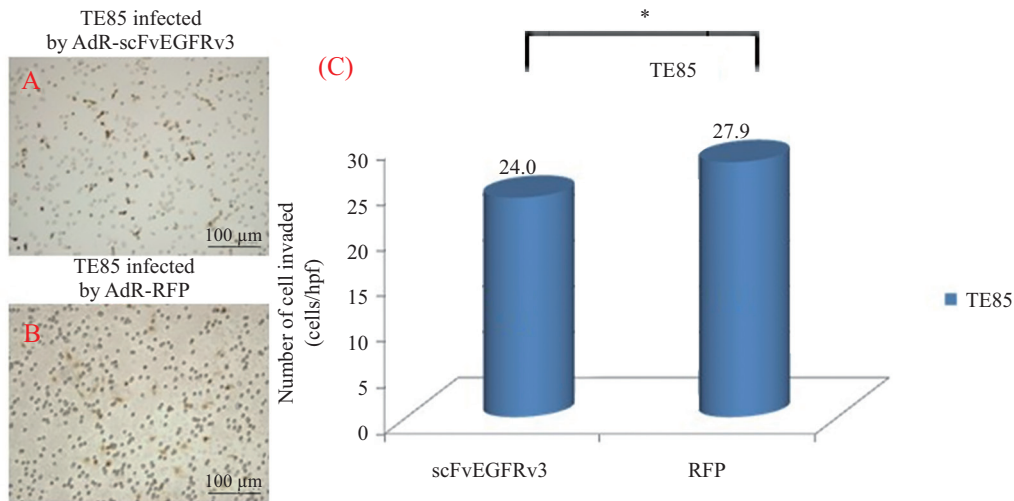
A: results of invasion of MG63 cells in the experimental group; B: results of invasion of MG63 cells in the control group; C: results of invasion of MG63 cells in the experimental group; D: results of invasion of MG63 cells in the control group; E: cell count results of experimental group and control group. ** $P < 0.01$.

图8 MG63细胞体外Matrigel细胞侵袭实验
Fig.8 MG63 *in vitro* cell invasion assay using Matrigel

表1 肿瘤细胞荧光素酶检测报告

Table 1 Tumor cell luciferase assay report

细胞名称 Cell name	孔1读数 Hole 1 reading	孔2读数 Hole 2 reading	孔3读数 Hole 3 reading
143B-LUC	2 549 851	2 897 872	2 675 698
143B	32	43	36
MG63-LUC	1 897 657	1 908 768	1 987 601
MG63	23	47	27
TE85-LUC	1 976 854	1 568 709	1 465 092
TE85	14	29	27



A: 实验组TE85细胞侵袭实验结果; B: 对照组TE85细胞侵袭实验结果; C: 实验组与对照组细胞计数结果。* $P < 0.05$ 。

A: results of invasion of TE85 cells in the experimental group; B: results of invasion of TE85 cells in the control group; C: cell count results of experimental group and control group. * $P < 0.05$.

图9 TE85细胞体外Matrigel细胞侵袭实验

Fig.9 TE85 *in vitro* cell invasion assay using Matrigel

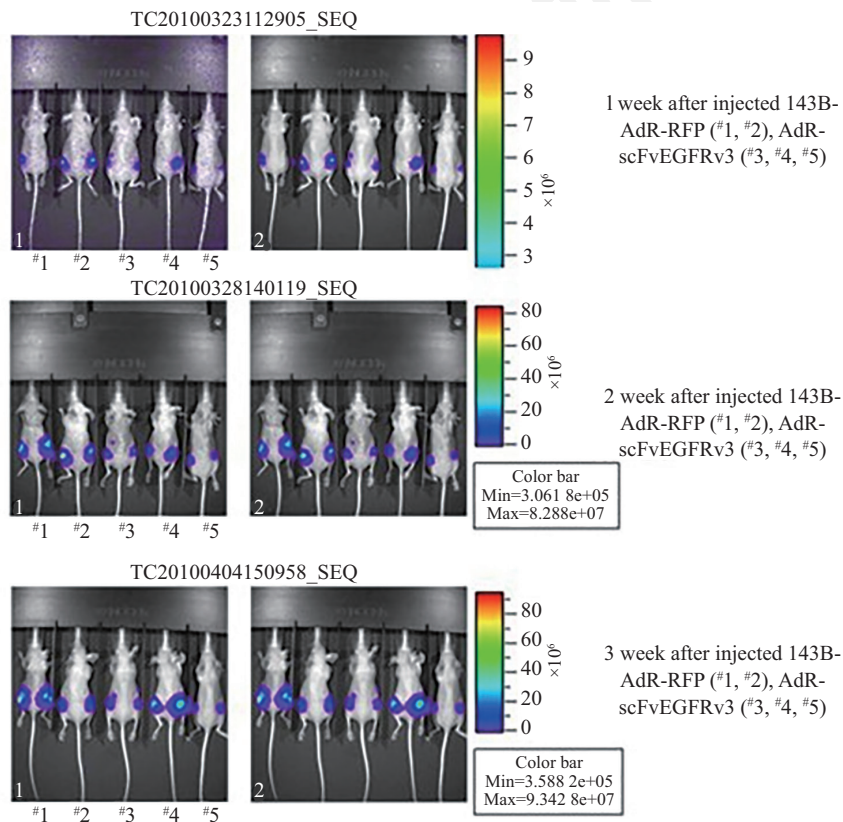


图10 荧光素酶成像仪观测143B体内成瘤情况

Fig.10 Xenogen imaging analysis 143B proliferation *in vivo*

物学行为关系密切, 恶性生物学行为包括: 细胞增殖、黏附、转移等, 尤其是表皮生长因子受体变异体与肿瘤的预后关系更为密切^[1]。目前已研发出了EGFR靶向药物, 在针对不同类型的人类癌症的治疗方

面, 取得了巨大的临床进展。两种抗EGFR单克隆抗体(西妥昔单抗和帕尼单抗)以及两种小分子可逆性EGFR酪氨酸激酶抑制剂(吉非替尼和埃罗替尼)在一些国家已被批准用于治疗转移性非小细胞肺癌、

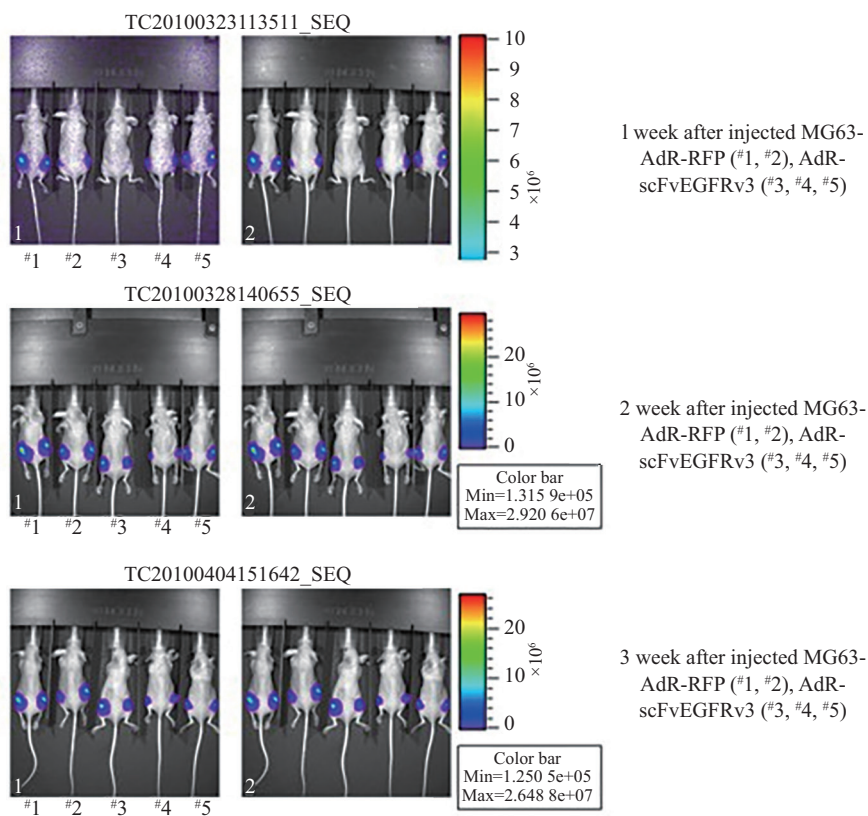


图11 荧光素酶成像仪观测MG63体内成瘤情况

Fig.11 Xenogen imaging analysis MG63 proliferation *in vivo*

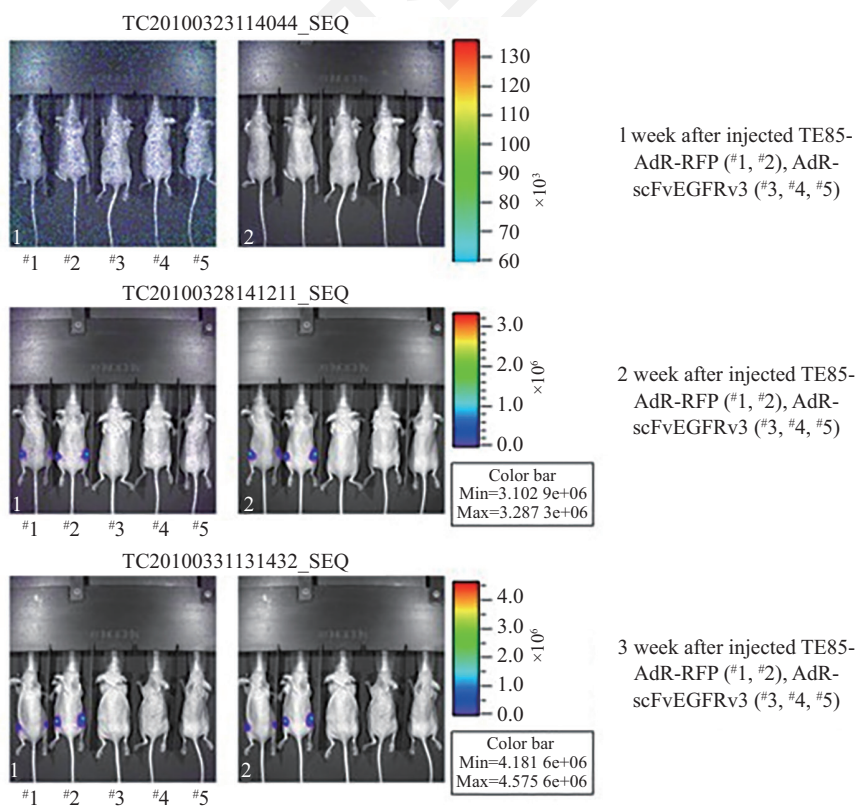


图12 荧光素酶成像仪观测TE85体内成瘤情况

Fig.12 Xenogen imaging analysis TE85 proliferation *in vivo*

前列腺癌、结直肠癌、头颈部鳞状细胞癌等^[12-15]。但是,目前国内外研究中,关于EGFR尤其是EGFRvIII在骨肉瘤中表达情况的报道较少,而且EGFRvIII在骨肉瘤中表达对骨肉瘤的恶性生物学行为的影响尚不清楚。

本课题组前期通过基因芯片筛选,发现EGFR在骨肉瘤细胞系MG63中高表达。逆转录PCR检测发现,经典骨肉瘤细胞系143B、MG63、TE85、SaOs以及原代骨肉瘤细胞系UCHOS4、7、11、14、15中有EGFR的表达。进一步证明,表皮生长因子受体变异体EGFRvIII在经典骨肉瘤系143B、MG63、TE85中高表达;另外,成功构建了表达重组抗表皮生长因子受体三型变异体(EGFRvIII)的单链可变区片段(scFv)抗体的重组腺病毒,并证明其能发挥靶向抑制骨肉瘤细胞(143B、MG63、TE85)EGFRvIII的作用。

本研究应用表达重组抗表皮生长因子受体三型变异体(EGFRvIII)的单链可变区片段(scFv)抗体的重组腺病毒感染骨肉瘤细胞模型,靶向抑制表皮生长因子受体EGFRvIII表达,观察其对骨肉瘤恶性生物学行为的影响。(1)MTT比色法和结晶紫染色实验是细胞增殖实验,结果显示,在骨肉瘤3种细胞系中抑制组较对照组骨肉瘤细胞增殖能力明显受到抑制,且143B、MG63较TE85抑制增殖效果更加明显。这说明EGFRvIII与骨肉瘤的肿瘤细胞的增殖能力具有相关性,靶向抑制EGFRvIII后能下调骨肉瘤细胞的增殖能力。(2)细胞吸附实验结果显示,在143B与MG63细胞组中,与对照RFP组相比,EGFRvIII抑制组细胞黏附能力明显下降,而TE85组没有发现明显变化。这说明,EGFRvIII与骨肉瘤的肿瘤细胞的黏附性有相关性,靶向抑制EGFR变异体的表达,可以下调肿瘤细胞的细胞黏附能力。(3)划痕实验显示,与对照RFP组相比,EGFRvIII抑制组细胞的迁移均受到不同程度的抑制。这说明,EGFRvIII与骨肉瘤的肿瘤细胞迁移能力有相关性,靶向抑制EGFR变异体的表达可以下调肿瘤细胞黏附性。(4)侵袭实验结果显示,对于143B、MG63,靶向抑制EGFR变异体表达后,肿瘤细胞穿膜数量明显减少,这说明,EGFR变异体的异常高表达与肿瘤细胞的侵袭相关,抑制EGFR变异体表达可以下调肿瘤细胞侵袭能力。体内动物实验显示,在143B、MG63及TE85 3种动物模型中,EGFRvIII抑制组与RFP对照

组相比,肿瘤生长受到抑制,肿瘤生长速度减慢。这说明EGFRvIII与骨肉瘤的肿瘤生长与增殖有相关性,靶向抑制EGFR变异体的表达,能抑制肿瘤生长增殖。

综上所述,靶向抑制表皮生长因子受体EGFR变异体在骨肉瘤的表达后,体外可以明显下调肿瘤细胞的增殖、黏附、迁移、侵袭能力,逆转肿瘤的增殖、黏附、迁移、侵袭恶性生物学行为。体内实验证实靶向抑制表皮生长因子受体EGFR在骨肉瘤的表达,可以明显下调肿瘤细胞的增殖生长能力。因此,靶向抑制EGFR变异体后能够逆转骨肉瘤恶性生物学行为,EGFR变异体可能成为骨肉瘤治疗中极有希望的新靶点。

参考文献 (References)

- 1 Lamplot JD, Denduluri S, Qin J, Li R, Liu X, Zhang H, *et al.* The current and future therapies for human osteosarcoma. *Current Canc Thera Rev* 2013; 9(1): 55-77.
- 2 Bertrand TE, Cruz A, Binitie O, Cheong D, Letson GD. Do surgical margins affect local recurrence and survival in extremity, nonmetastatic, high-grade osteosarcoma? *Clinical Ortho Rel Res* 2016; 474(3): 677-83.
- 3 Wang Z. ErbB receptors and cancer. *ErbB Rec Sign* 2017; 1652: 3-35.
- 4 Herbst RS, Hong WK. IMC-C225, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for treatment of head and neck cancer. *Expert Opin Biol Thera* 2001; 29(5): 18-30.
- 5 Colquhoun JA, Mellon JK. Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgrad Med J* 2002; 78(924): 584-9.
- 6 Liu X, Wang P, Zhang C, Ma Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR): a rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(30): 50209-20.
- 7 Wang X, Zheng H, Shou T. Effectiveness of multi-drug regimen chemotherapy treatment in osteosarcoma patients: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *J Orthop Surg Res* 2017; 12(1): 52.
- 8 Marina N. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist* 2004; 9(4): 422-41.
- 9 Grohar PJ, Janeway KA, Mase LD. Advances in the treatment of pediatric bone sarcomas. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2017; 37: 725-35.
- 10 Bishop MW, Janeway KA, Gorlick R. Future directions in the treatment of osteosarcoma. *Current Opin Ped* 2016; 28(1): 26-33.
- 11 Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical Can Res* 2006; 12(24): 7242-51.
- 12 Sirotnak FM, Zakowski MF, Miller VA, Scher HI. Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Clin Cancer Res* 2000; 6(12): 4885-92.
- 13 Battaglin F, Dadduzio V, Bergamo F, Manai C, Schirripa M,

- Lonardi S, *et al.* Anti-EGFR monoclonal antibody panitumumab for the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview of current practice and future perspectives. *Expert Opin Biol Ther* 2017; 17(10): 1297-308.
- 14 Boeckx N, Koukakis R, Op d BK, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, *et al.* Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Annals Oncol* 2017; 28(8): 1862-8.
- 15 Bonomo P, Loi M, Desideri I, Olmetto E, Delli Paoli C, Terziani F, *et al.* Incidence of skin toxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy and cetuximab: a systematic review. *Critical Rev Oncol/Hem* 2017; 120: 98-110.

中国细胞生物学学报