

研究论文

Ad-FGF-Trap对头颈部鳞癌细胞的抑制及其与西妥昔单抗的联合作用

谢雨琼¹ 李春春¹ 辛永萍¹ 余美荣¹ 李祎¹ 严毛晓^{2*} 曹江^{1*}¹浙江大学医学院附属第二医院, 临床研究中心, 杭州 310009;²浙江大学医学院附属第二医院, 耳鼻咽喉科, 杭州 310009)

摘要 西妥昔单抗的耐药问题在头颈部鳞癌(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)治疗过程中较为突出, 成纤维生长因子受体1(fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)旁路活化是一个重要原因。在抑制FGFR1活性方面, 已有的FGFR小分子抑制剂副作用较大, “诱饵受体”蛋白可能具有优势。该工作通过分子克隆方法构建了腺病毒穿梭质粒pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3用以表达人FGF的“诱饵受体”, 利用AdMaxTM腺病毒系统包装、扩增、纯化获得了高滴度的Ad-FGF-Trap重组腺病毒。Ad-FGF-Trap感染HNSCC细胞CAL 27、WSU-HN6后, 可显著抑制细胞增殖、迁移、侵袭能力。CAL 27细胞感染Ad-FGF-Trap后发生凋亡, 同时PI3K/MAPK信号通路下调, PARP剪切增加。WSU-HN6细胞感染Ad-FGF-Trap后, p27、p53、PCNA等周期相关蛋白表达量增加, 细胞发生G₁/S期阻滞, 但EGFR通路代偿性激活, 显示出FGFR1和EGFR两个信号通路之间有重要的相关性。利用CAL 27细胞进行的裸鼠体内实验表明Ad-FGF-Trap可抑制肿瘤生长。进一步研究表明, Ad-FGF-Trap联合西妥昔单抗, 可更有效地抑制FGFR1及EGFR同时高表达的WSU-HN6细胞增殖, 显示出联合用药将获得更佳疗效。该研究表明可表达“诱饵受体”的Ad-FGF-Trap能够为HNSCC的靶向治疗提供新的思路。

关键词 头颈部鳞癌; Ad-FGF-Trap; 诱饵受体; 西妥昔单抗; 联合治疗

Inhibition Effect of Ad-FGF-Trap on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells and Its Combination Therapy with Cetuximab

XIE Yuqiong¹, LI Chunchun¹, XIN Yongping¹, YU Meirong¹, LI Yi¹, YAN Maoxiao^{2*}, CAO Jiang^{1*}¹Clinical Research Center, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;²Department of Otorhinolaryngology, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract The bypass activation of FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) is one of the major reasons for the common resistance to Cetuximab in the treatment of HNSCC (head and neck squamous cell carcinoma). “Decoy receptor” may have advantages over small molecule inhibitor in FGFR1 inactivation with regard to side effects. In this work, a recombinant shuttle plasmid pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3 was constructed by genetic engineering for the expression of “Decoy receptor”. High-titer recombinant adenovirus Ad-FGF-Trap was obtained after packaging, amplification and purification using AdMaxTM adenovirus system. The proliferation, migration, invasion of

收稿日期: 2021-09-17 接受日期: 2021-10-22

浙江省自然科学基金(批准号: LY18H160006、LQ19H160017)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn; Tel: 0571-87315207, E-mail: 2315097@zju.edu.cn

Received: September 17, 2021 Accepted: October 22, 2021

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LY18H160006, LQ19H160017)

*Corresponding authors. Tel: +86-571-87315201, E-mail: caoj@zju.edu.cn; Tel: +86-571-87315207, E-mail: 2315097@zju.edu.cn

human HNSCC cells CAL 27 and WSU-HN6 were significantly inhibited by infection of Ad-FGF-Trap. Apoptosis of CAL 27 cells occurred when treated with Ad-FGF-Trap, accompanied by down-regulation of PI3K/MAPK signaling pathway and up-regulation of cleaved PARP. G₁/S-arrest was observed for WSU-HN6 cells treated with Ad-FGF-Trap, accompanied with up-regulation of cyclin-dependent proteins p27, p53 and PCNA, whereas enhanced compensatory activation of EGFR pathway. Ad-FGF-Trap inhibited tumor growth of CAL 27 xenografts in nude mice *in vivo*. Furthermore, Ad-FGF-Trap combined with Cetuximab more effectively inhibited the proliferation of WSU-HN6 cells which had high FGFR1 and EGFR expression. The current study of “decoy receptor”-expressing Ad-FGF-Trap provides a new strategy for the targeted therapy of HNSCC.

Keywords HNSCC; Ad-FGF-Trap; decoy receptor; Cetuximab; combination therapy

头颈部鳞癌起源于口腔、咽、喉和鼻腔的黏膜上皮细胞, 预计2020年将有93万新增病例和47万死亡病例^[1]。HNSCC通常采用手术切除, 并根据病情分期进行辅助放化疗。对于无手术或放疗指征的复发、不可切除或转移性癌, 一线化疗药物主要包括顺铂、氟尿嘧啶、西妥昔单抗等, 三者联用方案为I类推荐方案之一^[2]。免疫治疗药物, 如纳武利尤单抗、帕博利珠单抗等也正处于临床试验中^[1]。但超过80%的HNSCC患者在放化疗过程中会产生不良反应, 西妥昔单抗的临床耐药问题也较为突出, 使得5年总体生存率仍在65%的较低水平^[3-4]。因此寻找新的治疗靶点, 克服西妥昔单抗耐药难题, 是HNSCC治疗亟待解决的问题。

*FGFR*基因突变、扩增或染色体易位融合等机制可调节*FGFR*信号通路, 影响癌细胞的增殖、凋亡、有丝分裂、上皮-间质转变、血管新生等功能^[5-6]。多项研究表明: *FGFR1*基因扩增或*FGFR1*蛋白过表达是HNSCC的常见分子事件^[7-9], 异常的*FGF/FGFR*通路活化和西妥昔单抗的耐药有关^[10-11]。FISH分析显示在人乳头状瘤病毒(human papillomavirus, HPV)阴性的HNSCC中*FGFR1*存在9.3%~17.4%的基因扩增^[12-15]。*FGFR1*在82% HPV阳性和75% HPV阴性HNSCC患者中呈高表达。在HPV阴性HNSCC中, *FGFR1*表达水平与总生存率及无病生存率呈负相关^[16-19]。

目前已有广谱*FGFR*靶向药物用于临床, 如FDA批准的Erdafitinib, 用于治疗携带有*FGFR2/FGFR3*突变或融合的晚期或转移性尿路上皮癌; Pemigatinib, 用于治疗*FGFR2*基因融合或重排的晚期胆管癌患者。但该类抑制剂作用的ATP结合位点在所有激酶家族中均高度保守, 导致药物特异性差、毒副作用较大。同时其活性受ATP浓度影响, 易产

生耐药^[20]。

鉴于蛋白类药物毒副作用显著低于小分子抑制剂, 本研究拟根据诱饵受体“Trap”概念^[21], 制备重组腺病毒Ad-FGF-Trap。利用基因治疗手段表达诱饵受体, 靶向肿瘤微环境中的*FGFs*, 阻止配体与细胞表面*FGFR1*受体结合。通过判断Ad-FGF-Trap对细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭能力影响, 同时联合西妥昔单抗, 评价两者的协同作用效果, 为HNSCC靶向治疗以及克服西妥昔单抗耐药难题提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人舌鳞状细胞癌CAL 27、下咽鳞癌细胞FaDu购自ATCC; 人舌鳞状细胞癌WSU-HN6、人喉鳞状细胞癌AMC-HN8细胞由复旦大学附属耳鼻喉科医院陈剑博士惠赠。

1.1.2 主要试剂 逆转录酶、PCR kit、dNTPs、RNA酶抑制剂、T4 DNA Ligase、荧光定量试剂盒GoTaq qPCR Master购自Promega公司; RNA提取试剂Trizol购自Invitrogen公司; 切胶回收试剂盒Gel Extraction Kit、质粒中抽试剂盒Plasmid Midi Purification Kit、转染试剂Attractene Transfection Reagent均购自QIAGEN公司; DNA marker 1 Kb ladder plus购自广州东盛生物科技有限公司; 限制性内切酶*Hind* III、*Sac* I购自New England Biolabs公司; RPMI1640培养液、DMEM高糖培养液购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自Biological Industries公司; 氯化铯购自Amresco公司; 腺病毒滴度测试Adeno-X Rapid Titer Kit购自Clontech公司; Cell Counting Kit-8购自Dojindo公司; 丝裂霉素C购自TCI公司; 悬挂式

8 μm Transwell小室购自 Millipore公司; Matrigel基质胶购自 BD公司; 0.1%结晶紫溶液购自 Beyotime公司; 细胞周期检测试剂盒PI/RNase Staining Buffer(550825)、细胞凋亡检测试剂盒PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I(559763)购自BD公司; 蛋白酶抑制剂Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet购自 Santa Cruze公司; 磷酸酶抑制剂Phosphatase Inhibitor Cocktail 2购自 Sigma公司; TGX Stain-Free 丙烯酰胺凝胶试剂盒购自 Bio-Rad公司; p-FGFR1、FGFR1、p-EGFR、PDGFR β 、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、p-ERK1/2、ERK1/2、PARP抗体购自CST公司; EGFR抗体购自 Abcam公司; p53、p21、PCNA抗体购自 Santa Cruze公司; HRP标记的GAPDH、 β -actin抗体购自上海康成生物工程有限公司; Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate购自 Merck Millipore公司; 蛋白预染marker、Slide-A-Lyzer透析卡、BCA蛋白定量试剂盒购自 Thermo公司; 4~6周BALB/c- ν 雄性裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司; 西妥昔单抗注射液(爱必妥)购自 Merck kGaA公司。

1.2 方法

1.2.1 分泌型FGF-Trap序列设计 FGFR1受体胞外域包含3个免疫球蛋白样结构(Ig1、Ig2、Ig3), 其中Ig2和Ig3结构域是配体FGFs特异性结合所必需的, 而Ig1以及Ig1和Ig2之间连续的8个酸性残基对

受体结合具有自抑制功能。因此, 基于“诱饵受体”策略, 需构建仅包含FGFR1受体Ig2和Ig3结构域的腺病毒重组穿梭质粒pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3。N-端为分泌型Gaussia荧光素酶信号肽, C-端为6 \times His tag标签, 起始密码子前增加Kozak序列(GCCACC), 两端引入Hind III、Sac I酶切位点, 如图1所示。其中Gaussia荧光素酶信号肽序列为pSF-CMV-Puro-NH2-GAUS-Gaussia(Luciferase)分泌型质粒(Sigma-Aldrich, OGS1498)的nt 882~929, FGFR1 Ig2+Ig3功能域序列为GenBank数据库中人FGFR1 mRNA序列(NM_023110.3)的nt 1 215~1 820。

1.2.2 实时荧光定量PCR检测细胞受体、配体表达 CAL 27、FaDu、WSU-HN6、AMC-HN8细胞培养于含10% FBS的DMEM高糖培养基中, 待细胞生长汇合度达到85%~90%, 收集细胞。利用Trizol试剂提取细胞总RNA, 进行逆转录。逆转录产物进行实时荧光定量PCR反应, 检测各细胞FGFR1、FGF2、EGFR、EGF表达水平。特异性上下游引物(表1), 由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。根据各细胞的FGFR1、FGF2、EGFR、EGF、GAPDH的循环阈值(cycle threshold, Ct), 以 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 进行细胞间各基因相对内参GAPDH的表达差异分析。

1.2.3 重组腺病毒包装及鉴定 利用AdMax™腺病毒包装系统进行重组腺病毒Ad-FGF-Trap的包装。Adeno-X 293细胞(P30代以内)接种于6孔板中, 24 h

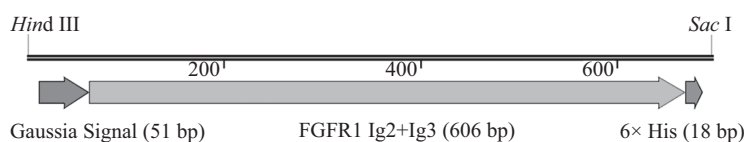


图1 分泌型FGF-Trap序列设计图

Fig.1 Illustration for secretory FGF-Trap

表1 实时荧光定量PCR检测用引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescent quantitative PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence
FGFR1 Forward	5'-AAT GAG TAC GGC AGC ATC AAC-3'
FGFR1 Reverse	5'-ACC TCG ATG TGC TTT AGC CAC-3'
FGF2 Forward	5'-AGT GTG TGC TAA CCG TTA CCT-3'
FGF2 Reverse	5'-ACT GCC CAG TTC GTT TCA GTG-3'
EGFR Forward	5'-AGG CAC GAG TAA CAA GCT CAC-3'
EGFR Reverse	5'-ATG AGG ACA TAA CCA GCC ACC-3'
EGF Forward	5'-TGG ATG TGC TTG ATA AGC GG-3'
EGF Reverse	5'-ACC ATG TCC TTT CCA GTG TGT-3'

后细胞密度达到80%~85%。取1 μg pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3、4 μg pBHGlox(delta)E1,3Cre, 按试剂说明书要求进行转染。转染后10天左右, 观察细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。当细胞出现大量CPE后, 收集培养物, 离心重悬置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

PCR鉴定: 上述收集物经 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}/37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次, 离心并经0.22 μm 滤膜过滤后收集病毒液上清。少量上清经蛋白酶K(20 mg/mL)处理后, 取2 μL 作为模板进行PCR鉴定。Ad-Control以穿梭质粒中的MCMV为检测条带, Ad-FGF-Trap以FGFR1 Ig2+Ig3为检测条带, 分别设计引物进行PCR鉴定, 均设置阳性对照(相应质粒)和阴性对照(ddH₂O)。鉴定引物序列如下, MCMV(Forward: 5'-TCT AGA GAT ATA CTG AGT CAT TAG G-3', Reverse: 5'-GAA TTC GAT CTG CGT TCT ACG GTG G-3'); FGFR1 Ig2+Ig3(Forward: 5'-AAG CTT GCC ACC ATG GGC GTG AAG G-3', Reverse: 5'-GAG CTC TCA ATG ATG ATG ATG A-3')。

蛋白表达分泌鉴定: CAL 27细胞经胰酶消化重悬后接种于100 mm培养皿中。24 h后, 用含1% FBS的DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap后进行感染, 72 h收集上清。经冷冻干燥、超滤除盐后, 用HRP标记的6 \times His抗体检测FGFR1 Ig2+Ig3蛋白的表达分泌情况。

1.2.4 细胞增殖能力检测 选取对数生长期的CAL 27、FaDu、WSU-HN6、AMC-HN8细胞, 胰酶消化重悬至 $4\times 10^5/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 接种至96孔板中。24 h后, 用含1% FBS的DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap或对照病毒Ad-Control, 配制不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)病毒液(MOI 0、25、50、100、200)。弃原培养液, 加入50 μL 不同MOI病毒液, 每组6个重复。6 h后, 补加150 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 含1% FBS的DMEM高糖培养基。72 h后, 弃原培养液, 每孔加入含10% CCK-8的培养液, 培养1 h后测定 D_{450} 吸光度值, 判断重组腺病毒Ad-FGF-Trap对HNSCC细胞增殖能力的影响。

1.2.5 细胞运动迁移能力检测 划痕实验: 取对数生长期的CAL 27、WSU-HN6细胞, 胰酶消化重悬后将其分别接种至6孔板中。每孔加入丝裂霉素C至1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 工作浓度抑制细胞增殖。24 h后, 用10 μL Tip划痕, 经PBS洗涤后拍照记录为0 h。用含1% FBS的DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap或对照病毒

Ad-Control后感染细胞, 24 h后拍照记录划痕范围。迁移实验: CAL 27、WSU-HN6细胞缺血清24 h后, 经胰酶消化重悬至 $1\times 10^6/\text{mL}$ 和 $4\times 10^5/\text{mL}$ 。取200 μL 上述细胞悬液与200 μL 无血清DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap或对照病毒混匀, 加入至Transwell上室。下室中加入600 μL 20% FBS-DMEM高糖培养基。24 h后进行固定染色, 拍照记录。

1.2.6 细胞侵袭能力检测 Transwell上室中预先加入60 μL 用无血清DMEM高糖培养基稀释至0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的基质胶, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 凝固过夜。次日, 加入无血清DMEM培养基水化1 h。细胞接种、感染、小室染色操作如1.2.5迁移实验所述。

1.2.7 细胞凋亡检测 取对数生长期的CAL 27细胞, 胰酶消化重悬后接种至6孔板中。24 h后, 用含1% FBS的DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap或对照病毒后感染细胞。72 h后, 用不含EDTA胰酶消化重悬, 按细胞凋亡检测试剂盒PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I说明书要求进行流式分析检测。

1.2.8 细胞周期检测 取对数生长期的WSU-HN6细胞, 胰酶消化重悬后接种至6孔板中。24 h后, 用含1% FBS的DMEM高糖培养基稀释重组腺病毒Ad-FGF-Trap或对照病毒后感染细胞。24 h后, 收集细胞, 洗涤重悬后经75%乙醇 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。经离心洗涤, 按细胞周期检测试剂盒PI/RNase Staining Buffer说明书要求进行流式分析检测。

1.2.9 Western blot 收集的细胞沉淀经含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的三去污裂解液(0.5 mol/L Tris-HCl(pH8.0)、0.15 mol/L NaCl、0.2 g/L叠氮钠、1 g/L SDS、100 mg/L苯甲基黄酰氟、1 mg/L Aprotinin、1 mL/L Nonidet P-40、5 g/L去氧胆酸钠)冰上裂解提取总蛋白, 利用BCA定量试剂盒测定总蛋白浓度。30 μg 总蛋白经热变性后, 进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳。转膜完成后, 将PVDF膜放入5% BSA-TBST中室温封闭1 h, 一抗(1:1 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 0.1% TBST洗涤5次, 5 min/次, 再加入山羊抗小鼠或山羊抗兔的二抗(1:5 000)室温孵育1 h, 经0.1% TBST洗涤, 最后加入化学发光底物进行显色。内参检测使用HRP标记的GAPDH抗体或 β -actin抗体(1:5 000), 室温孵育1 h, 经0.1% TBST洗涤, 加入化学发光底物进行显色。

1.2.10 裸鼠成瘤实验 收集对数生长期的CAL 27细胞, 离心重悬, PBS洗涤2次去除残留血清。细胞

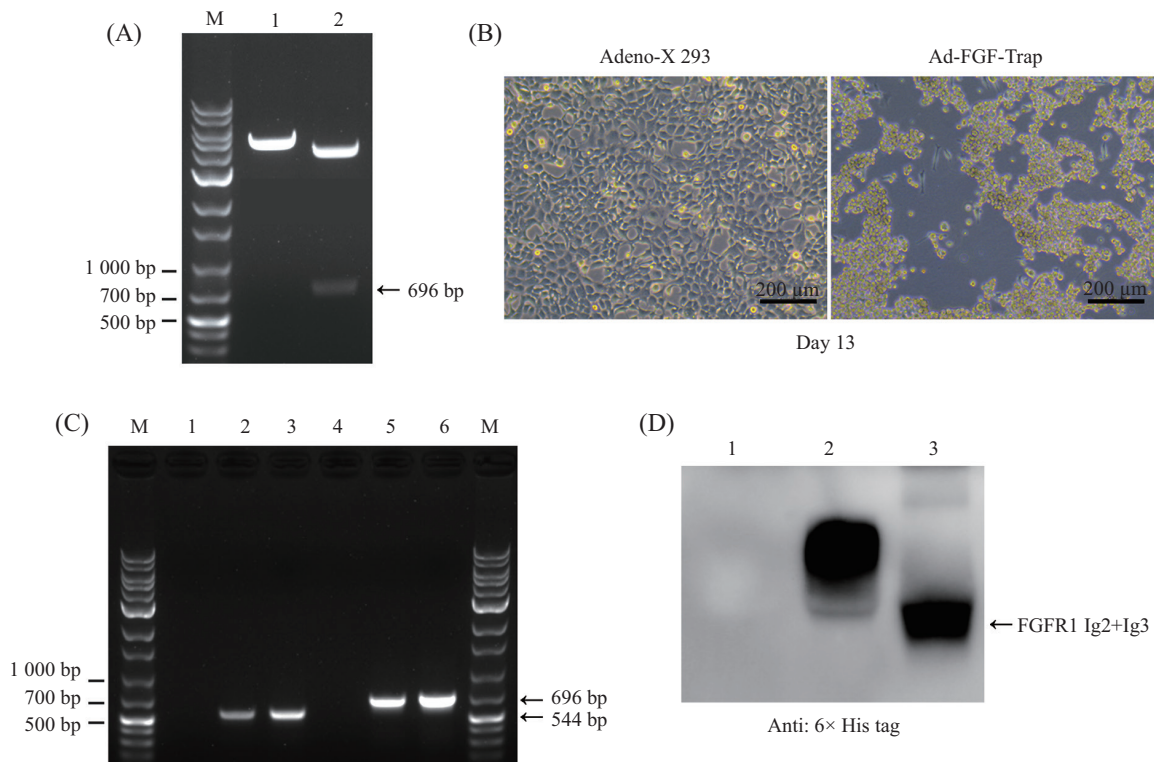
计数后加适量PBS, 调整密度至 $2.5 \times 10^7/\text{mL}$ 。在每只裸鼠右背部皮下注射 $200 \mu\text{L}$ CAL 27细胞悬液, 即每只接种 5×10^6 个舌鳞癌细胞。当肿瘤体积 $\geq 200 \text{ mm}^3$ 时, 随机分为3组, 即PBS组、Ad-Control组、Ad-FGF-Trap组。以MOI 200进行瘤内腺病毒注射治疗, 即病毒量为 1×10^9 pfu/只, 注射体积为 $100 \mu\text{L}$ /只。以首次治疗日为第0天, 分别给予如上剂量的病毒, 给药频率为3天/次。第一次给药前测量裸鼠体重, 瘤体大小, 以后每3天(直至第30天)测量瘤体大小, 计算瘤体体积, 称量裸鼠体重。治疗期间观察裸鼠精神状态、饮食及活动情况。末次给药后第3天或瘤体 $\geq 2500 \text{ mm}^3$ 以颈椎脱臼法处死, 取出瘤体称重。该研究已通过浙江大学医学院附属第二医院动物伦理委员会审核批准(批件号: 2019年度第013号)。

2 结果

2.1 Ad-FGF-Trap重组腺病毒的包装与鉴定

利用分子克隆技术构建重组穿梭质粒, 酶切鉴定目的片段是否正确插入。重组穿梭质粒酶切鉴定结果如图2A所示, 经*Hind* III、*Sac* I双酶切后, pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3得到大小为696 bp和3 903 bp的2个条带(泳道2), 与预期相符。经测序比对分析后, FGFR1 Ig2+Ig3的序列信息与NCBI中序列信息100%符合, 表明重组穿梭质粒pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3构建成功。

Adeno-X 293细胞分别转染穿梭质粒(pDC316、pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3)及骨架质粒pBHGlox(delta) E1,3Cre后, 在第10~13天出现典型CPE现象, 细胞变圆呈葡萄串样飘起, 皿底出现空斑, 与正常Adeno-X



A: pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3重组穿梭质粒酶切鉴定(M: 1 Kb DNA ladder; 1: pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3经*Hind* III单酶切; 2: pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3经*Hind* III、*Sac* I双酶切); B: 病毒包装过程中典型的CPE效应; C: PCR分别扩增*MCMV*、*FGFR1 Ig2+Ig3*片段鉴定Ad-Control和Ad-FGF-Trap(M: 1 Kb DNA ladder; 1: *MCMV*阴性对照; 2: *MCMV*阳性对照; 3: Ad-Control病毒上清液; 4: *FGFR1 Ig2+Ig3*阴性对照; 5: *FGFR1 Ig2+Ig3*阳性对照; 6: Ad-FGF-Trap病毒上清液); D: 重组腺病毒感染CAL 27细胞后FGFR1 Ig2+Ig3蛋白表达鉴定(1: Ad-Control; 2: 阳性对照Ad-EGF-Trap; 3: Ad-FGF-Trap)。

A: characterization of recombinant shuttle plasmids pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3 by restriction endonuclease digestion (M: 1 Kb DNA ladder; 1: pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3 digested by *Hind* III; 2: pDC316-FGFR1 Ig2+Ig3 digested by *Hind* III and *Sac* I); B: typical cytopathic effects in adenovirus packaging; C: identification of *MCMV*, *FGFR1 Ig2+Ig3* fragment in Ad-Control and Ad-FGF-Trap by PCR (M: 1 Kb DNA ladder; 1: negative control of *MCMV*; 2: positive control of *MCMV*; 3: supernatant of Ad-Control; 4: negative control of *FGFR1 Ig2+Ig3*; 5: positive control of *FGFR1 Ig2+Ig3*; 6: supernatant of Ad-FGF-Trap); D: Western blot analysis of the expression of FGFR1 Ig2+Ig3 in supernatant after CAL 27 cells infected by recombinant adenovirus (1: Ad-Control; 2: positive control Ad-EGF-Trap; 3: Ad-FGF-Trap).

图2 Ad-FGF-Trap重组腺病毒的包装与鉴定

Fig.2 Packaging and identification of recombinant adenovirus Ad-FGF-Trap

293细胞形态差异显著,如图2B所示。初步判断腺病毒Ad-FGF-Trap包装成功。

以P1代病毒上清液为模板,利用MCMV、*FGFR1* Ig2+Ig3引物进行PCR鉴定,鉴定结果如图2C所示: Ad-Control的PCR产物在544 bp有特异性条带,与MCMV大小一致(泳道3); Ad-FGF-Trap的PCR产物在696 bp有特异性条带,与*FGFR1* Ig2+Ig3大小一致(泳道6)。以上鉴定结果表明: Ad-Control、Ad-FGF-Trap已携带目的序列MCMV、*FGFR1* Ig2+Ig3,病毒包装完成。

Ad-Control、Ad-FGF-Trap经扩增、纯化,并经Adeno-X Rapid Titer Kit病毒滴度试剂盒测得Ad-Control、Ad-FGF-Trap滴度分别为 1.10×10^{12} ifu/mL、 5.05×10^{11} ifu/mL。以MOI 100感染CAL 27细胞,感染后72 h收集培养上清。利用HRP标记的6× His tag抗体,对经冷冻干燥、超滤除盐处理后的培养上清进行Western blot分析显示: 感染Ad-FGF-Trap的CAL 27细胞可顺利表达分泌FGFR1 Ig2+Ig3重组蛋白,即FGF-Trap(图2D)。

以上结果表明: 重组腺病毒Ad-FGF-Trap包装成功,可顺利感染HNSCC细胞,表达并分泌FGF-Trap,可用于后续功能研究。

2.2 头颈部鳞癌细胞FGFR1、EGFR及相关配体的表达差异分析

根据诱饵受体“Trap”原理,拟通过腺病毒感染细胞后表达分泌型的FGFR1 Ig2+Ig3重组蛋白,结合细胞周围微环境中的FGFs配体,以阻断配体对肿瘤

细胞FGFR1受体的活化,从而达到抑制肿瘤细胞的目的。因此,需明确各HNSCC细胞FGFR1、EGFR及相关配体表达情况。

利用实时荧光定量PCR对HNSCC细胞的*FGFR1*、*FGF2*、*EGFR*、*EGF*表达情况进行检测,并根据内参*GAPDH*进行差异分析,如图3所示。结果显示:*FGFR1*表达水平从高到低依次为WSU-HN6、FaDu、CAL 27、AMC-HN8;*FGF2*表达水平从高到低依次为AMC-HN8、FaDu、WSU-HN6、CAL 27;*EGFR*表达水平从高到低依次为WSU-HN6、CAL 27、AMC-HN8、FaDu;*EGF*表达水平从高到低依次为CAL 27、AMC-HN8、WSU-HN6、FaDu。

2.3 Ad-FGF-Trap显著抑制CAL 27及WSU-HN6细胞增殖能力

FGF/FGFR信号通路主要参与肿瘤细胞的增殖、凋亡、有丝分裂、上皮-间质转变等过程,因此将从这些角度对Ad-FGF-Trap的作用效果进行判断。

Ad-Control和Ad-FGF-Trap分别以不同MOI(0、25、50、100、200)感染4种HNSCC细胞,72 h后利用CCK-8试剂进行增殖能力检测。结果显示: Ad-FGF-Trap(MOI 50)可显著抑制人舌鳞状细胞癌CAL 27、WSU-HN6细胞增殖能力($P < 0.01$); Ad-FGF-Trap对下咽鳞癌FaDu细胞增殖有微弱抑制作用;而Ad-Control和Ad-FGF-Trap在喉鳞状细胞癌AMC-HN8中可促进其增殖(图4)。根据以上结果,后续研究主要在舌鳞状细胞癌CAL 27细胞和WSU-HN6细胞中开展。

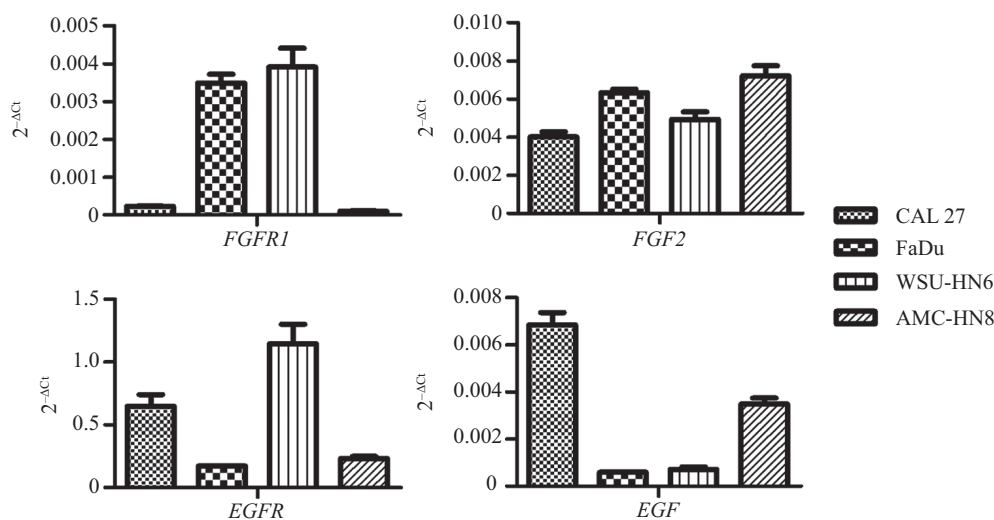


图3 头颈部鳞癌细胞*FGFR1*、*EGFR*及相关配体mRNA水平表达分析

Fig.3 Histogram analysis of mRNA levels of *FGFR1*, *EGFR* and related ligands in HNSCCs

2.4 Ad-FGF-Trap显著抑制CAL 27及WSU-HN6细胞迁移、侵袭能力

Ad-FGF-Trap以MOI 50感染经丝裂霉素C处理后的CAL 27细胞及WSU-HN6细胞,划痕实验结果显示24 h后, CAL 27及WSU-HN6细胞的Blank组、Ad-Control组均发生明显运动迁移,而Ad-FGF-Trap划痕间隙仍较大(图5A),表明感染Ad-FGF-Trap后, CAL 27及WSU-HN6细胞运动能力下降。Transwell迁移实验也表明, Ad-FGF-Trap感染CAL 27及WSU-HN6细胞24 h后,穿过膜的细胞数量显著减少($P<0.001$),如图5B所示。

侵袭实验中,0.1%结晶紫染色结果显示, Ad-FGF-Trap感染CAL 27及WSU-HN6细胞48 h后,穿过含基质胶膜的细胞数量明显减少,表明细胞侵袭能力显著下降($P<0.001$),如图5C所示。Ad-FGF-Trap抑制CAL 27及WSU-HN6细胞迁移、侵袭能力的数据分析如图5D柱状图所示。

2.5 Ad-FGF-Trap诱导CAL 27细胞凋亡发生

CAL 27细胞感染Ad-FGF-Trap 48 h后,细胞呈圆球皱缩状,贴壁能力下降,部分细胞飘起,流式分析检测发现约14.5%细胞发生早期凋亡,15.3%细胞发生晚期凋亡(图6A和图6B),初步判断Ad-FGF-Trap可诱导CAL 27细胞凋亡,但细胞周期未有明显变化(图6C)。

2.6 Ad-FGF-Trap引起WSU-HN6细胞发生G₁/S期周期阻滞

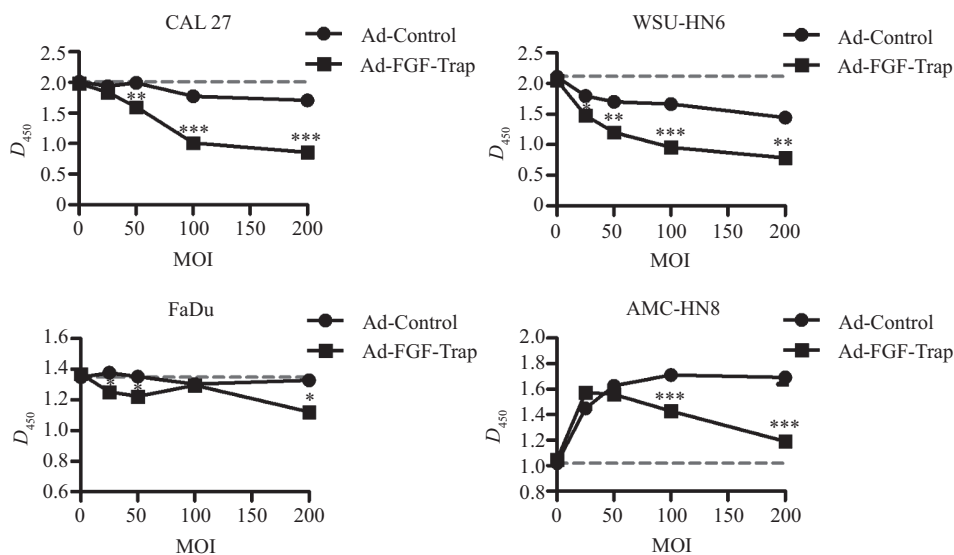
WSU-HN6细胞感染Ad-FGF-Trap 24 h后,倒置

显微镜下观察发现与对照细胞相比, Ad-FGF-Trap组细胞基本无增殖(图7A)。细胞周期检测发现G₁期细胞增加(Ad-Control: 63.60%; Ad-FGF-Trap: 81.13%),S期细胞减少(Ad-Control: 23.21%; Ad-FGF-Trap: 7.42%),即发生G₁/S期细胞阻滞(图7B)。感染48 h后,细胞仍能维持原有形态,无增殖,流式分析检测未发现明显凋亡现象(图7C)。因此,初步判断Ad-FGF-Trap可诱导WSU-HN6发生G₁/S期细胞周期阻滞,但不引起细胞凋亡发生。

2.7 Ad-FGF-Trap作用于头颈部鳞癌的机制分析

CCK-8增殖实验表明, Ad-FGF-Trap可明显抑制CAL 27和WSU-HN6细胞的增殖能力,但流式分析表明Ad-FGF-Trap作用于CAL 27细胞主要通过诱导凋亡发生,作用于WSU-HN6细胞主要通过诱导细胞周期发生G₁/S期阻滞。Ad-FGF-Trap作用于两种细胞的不同机制,需要进一步分析。

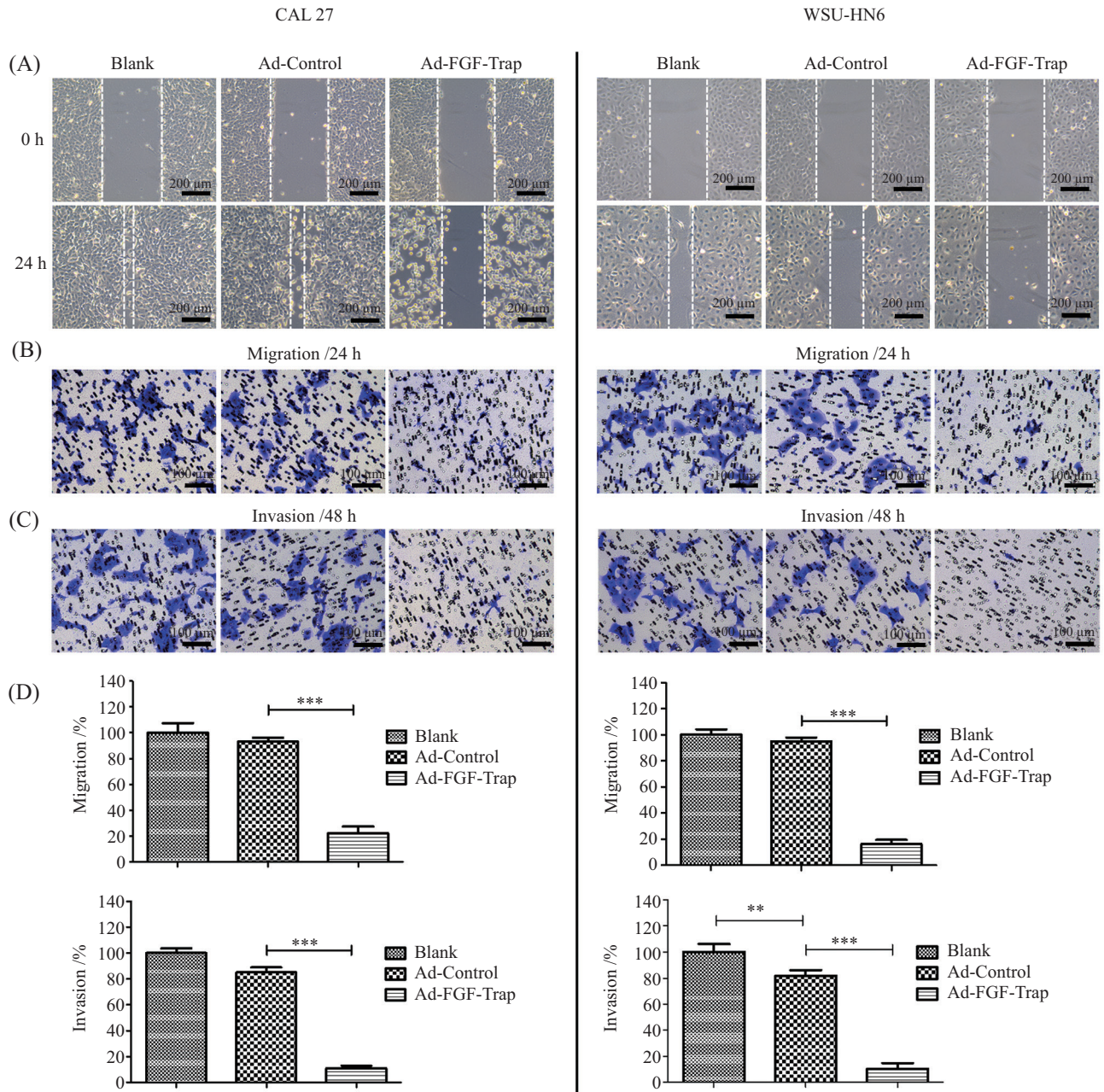
Western blot结果显示, Ad-FGF-Trap作用于CAL 27细胞72 h后, PI3K p55亚基第199位酪氨酸磷酸化显著下调, ERK1/2磷酸化下调,即PI3K/MAPK信号通路被抑制; PARP剪切增加,失去其DNA修复酶的功能,与流式凋亡结果相符(图8A)。Ad-FGF-Trap作用于WSU-HN6细胞72 h后, EGFR磷酸化明显增强,同时伴随ERK1/2磷酸化上调,周期相关蛋白p53、p27、PCNA均上调,剪切形式的PARP减少,发挥其DNA修复酶功能,表明细胞可能通过EGFR代偿通路,激活MAPK信号通路,细胞主动识别结构损伤的



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图4 Ad-FGF-Trap对头颈部鳞癌细胞增殖能力影响

Fig.4 Effects of Ad-FGF-Trap on proliferation ability of HNSCCs



A: 划痕实验结果表明Ad-FGF-Trap可显著抑制CAL 27、WSU-HN6细胞运动迁移能力; B: Transwell迁移实验结果表明Ad-FGF-Trap可显著抑制CAL 27、WSU-HN6细胞迁移能力; C: Transwell侵袭实验结果表明Ad-FGF-Trap可显著抑制CAL 27、WSU-HN6细胞侵袭能力; D: Ad-FGF-Trap对CAL 27、WSU-HN6细胞迁移、侵袭能力影响的柱状图分析(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

A: scratch assay showed that the Ad-FGF-Trap could significantly inhibit the migration ability of CAL 27 and WSU-HN6 cells; B: Transwell migration assay showed that Ad-FGF-Trap could significantly inhibit the migration of CAL 27 and WSU-HN6 cells; C: Transwell invasion assay showed that Ad-FGF-Trap could significantly inhibit the invasion ability of CAL 27 and WSU-HN6 cells; D: histogram analysis of the effects of Ad-FGF-Trap on migration and invasion of CAL 27 and WSU-HN6 cells (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

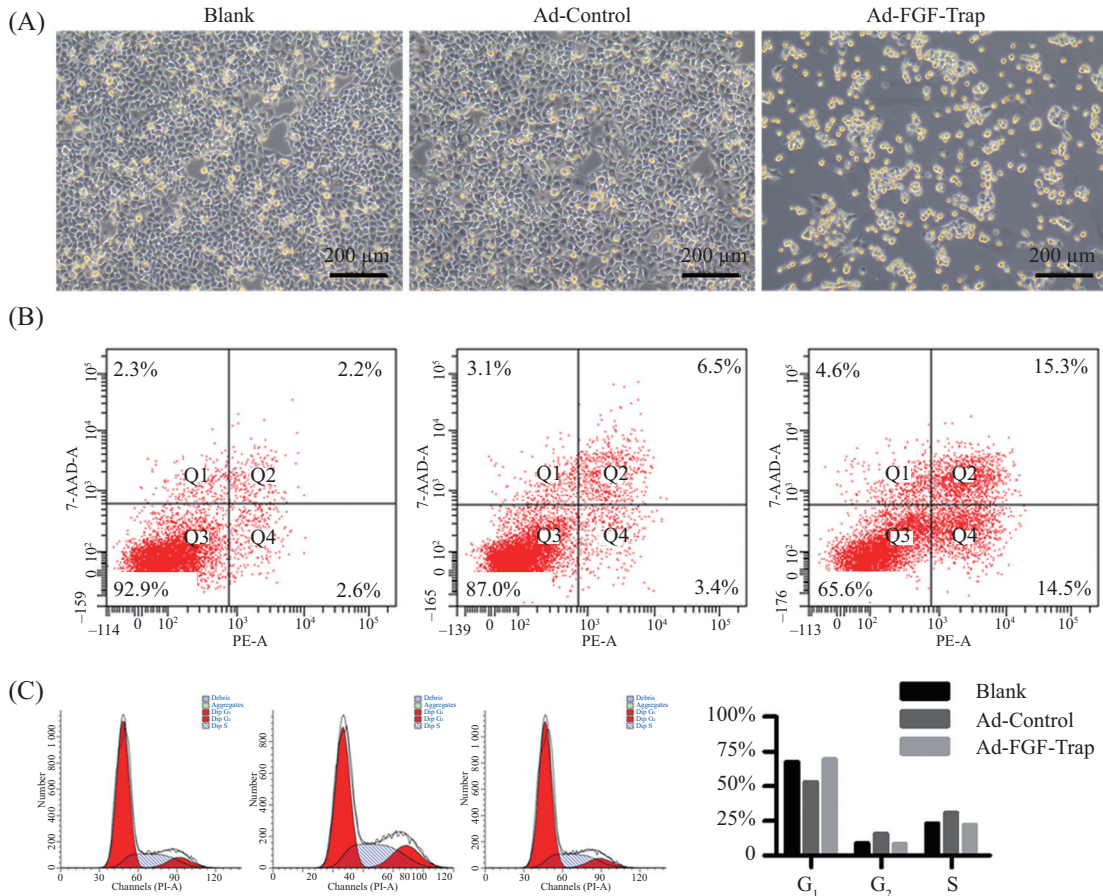
图5 Ad-FGF-Trap显著抑制CAL 27、WSU-HN6细胞迁移、侵袭能力

Fig.5 Ad-FGF-Trap significantly inhibited migration, invasion ability of CAL 27 and WSU-HN6

DNA片段, 处于自我修复状态, 与流式周期结果一致(图8B)。

2.8 Ad-FGF-Trap抑制CAL 27细胞体内肿瘤生长
以首次治疗日为第0天, 分别给予瘤内注射等

体积PBS、Ad-Control、Ad-FGF-Trap, 并在第3、6、9、12、15、18、21、24、27天重复给药, 每3天测量一次肿瘤大小, 到达实验终点后解剖所得肿瘤组织见图9A。肿瘤生长曲线如图9B所示。结果显示:



A: CAL 27细胞感染Ad-FGF-Trap 48 h后形态变化; B: 细胞凋亡流式检测结果; C: 细胞周期检测结果及分析。

A: morphology changes of CAL 27 cells transfected by Ad-FGF-Trap after 48 h; B: apoptosis assay detected by flow cytometry; C: cell cycle analysis detected by flow cytometry.

图6 Ad-FGF-Trap诱导CAL 27细胞凋亡发生
Fig.6 Ad-FGF-Trap induced apoptosis of CAL 27 cells

Ad-FGF-Trap重组腺病毒注射治疗30天肿瘤体积较PBS组明显减小,抑制率为35.86%,具有统计学差异($P=0.009$);较Ad-Control组减小21.99%,但未形成统计学意义($P=0.246$)。用药30天时各组裸鼠体重比较的统计学分析显示,Ad-FGF-Trap组与PBS组($P=0.484$)和Ad-Control组($P=0.056$)无显著差异,表明Ad-FGF-Trap在治疗过程中无明显毒副作用(图9C)。以上结果表明:Ad-FGF-Trap虽在一定程度上可抑制肿瘤生长,但单一抑制FGFR通路作用效果欠佳,需考虑联合用药,例如:联合靶向EGFR信号通路。

2.9 Ad-FGF-Trap联合西妥昔单抗作用于EGFR阳性头颈部鳞癌细胞

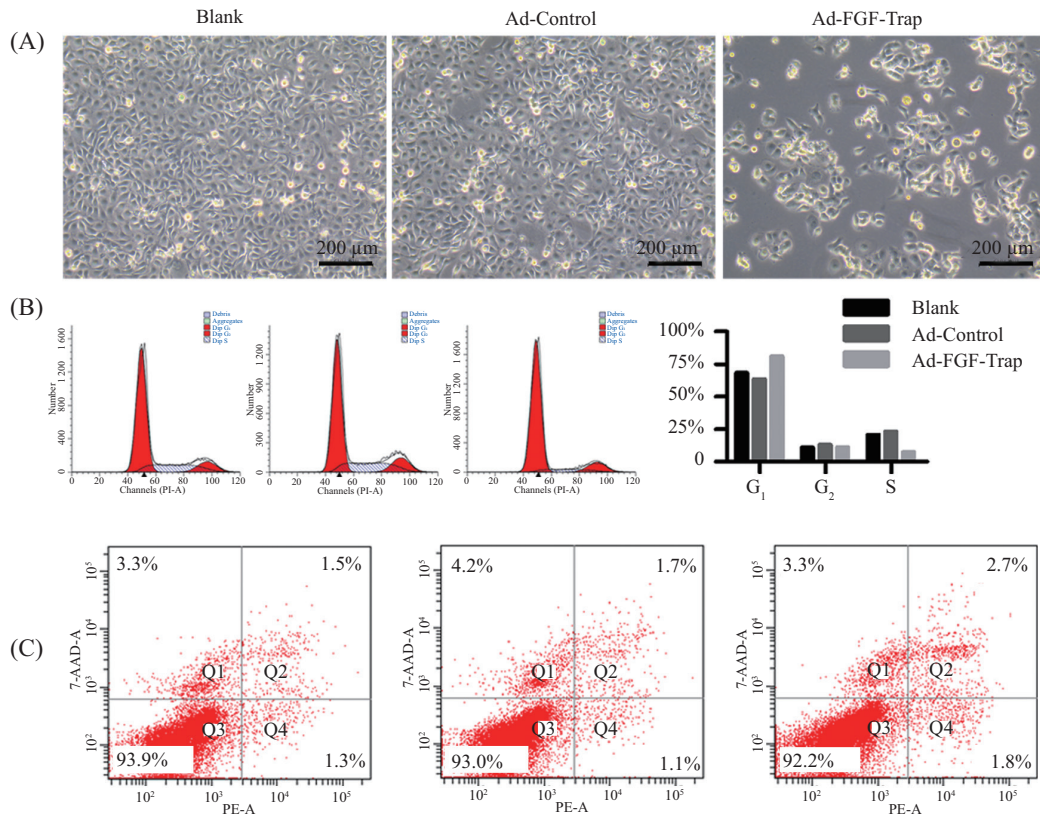
因Ad-FGF-Trap作用于WSU-HN6细胞后,会引起EGFR通路代偿性激活。体内实验也证实单一靶向FGFR信号通路抑制瘤体生长但未达到显著性差

异。提示HNSCC可能需要多靶点联合治疗。细胞表面受体差异分析显示WSU-HN6细胞中EGFR表达量高于CAL 27,而PDGFR β 表达无明显差异(图10A)。因此,进一步探索Ad-FGF-Trap联合西妥昔单抗(Cetuximab)作用效果十分必要。

CCK-8结果显示,在WSU-HN6细胞中,Ad-FGF-Trap单用组抑制率为59.68%,Cetuximab组为39.48%,两药联合组为74.58%,表明对于高表达EGFR的HNSCC,Ad-FGF-Trap联合Cetuximab可使其抑制率再提高14.9%,差异显著(图10B, $P=0.013$)。而低表达EGFR的CAL 27细胞,未能体现出联合用药效果(图10C, $P=0.091$)。以上结果,为探索西妥昔单抗耐药的HNSCC治疗,提供了新的研究方向。

3 讨论

西妥昔单抗是HNSCC重要的靶向治疗药物,但

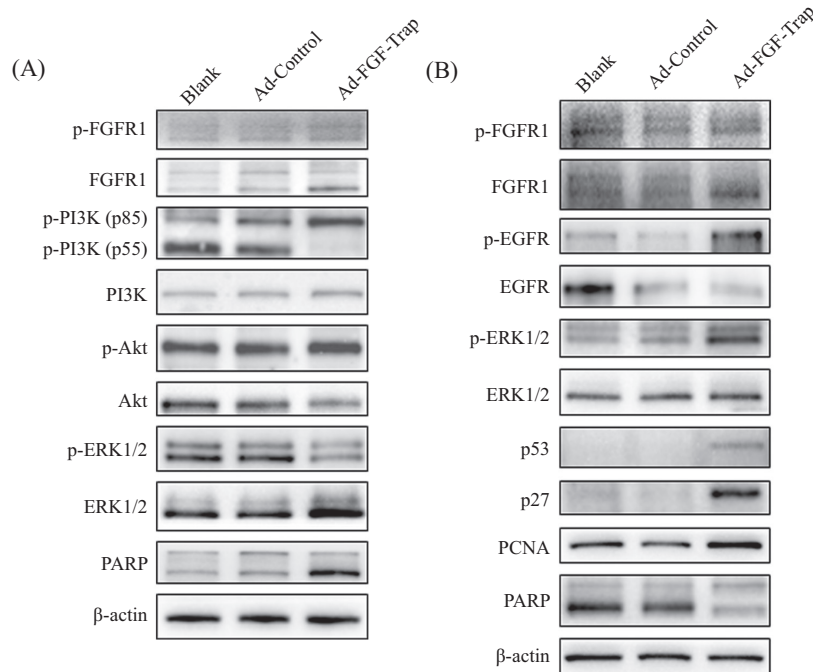


A: WSU-HN6细胞感染Ad-FGF-Trap 24 h后形态变化; B: 细胞周期检测结果及分析; C: 细胞凋亡流式检测结果。

A: morphology changes of WSU-HN6 cells transfected by Ad-FGF-Trap after 24 h; B: cell cycle analysis by flow cytometry; C: apoptosis assay detected by flow cytometry.

图7 Ad-FGF-Trap引起WSU-HN6细胞发生G₁/S期周期阻滞

Fig.7 Ad-FGF-Trap induced G₁/S phase cycle arrest in WSU-HN6 cells

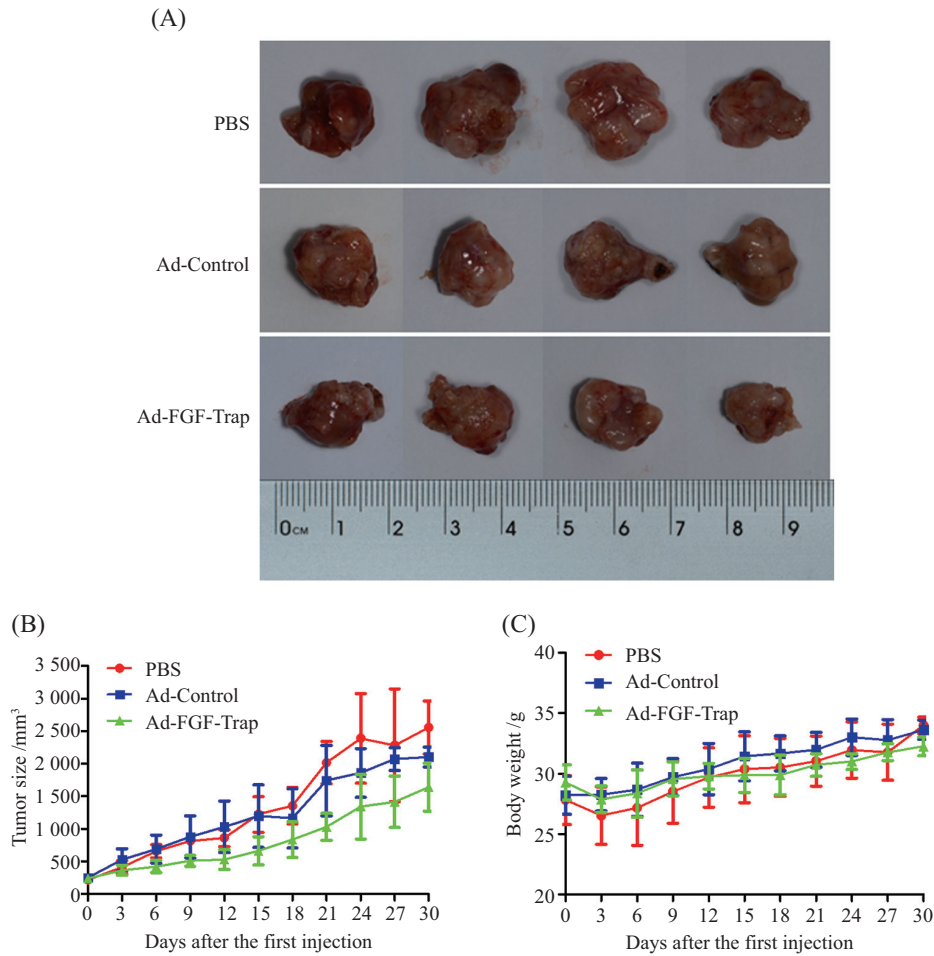


A: Ad-FGF-Trap引起CAL 27细胞凋亡机制分析; B: Ad-FGF-Trap引起WSU-HN6细胞周期阻滞机制分析。

A: mechanism analysis of Ad-FGF-Trap resulting in CAL 27 apoptosis; B: mechanism analysis of Ad-FGF-Trap resulting in WSU-HN6 cell cycle arrest.

图8 Ad-FGF-Trap作用于头颈部鳞癌的机制分析

Fig.8 Mechanism analysis of Ad-FGF-Trap in HNSCCs

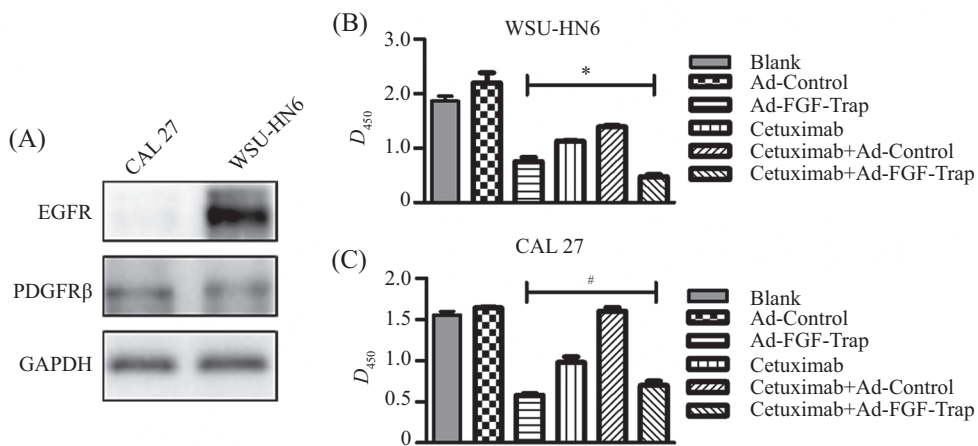


A: 实验终点解剖所得肿瘤组织; B: 肿瘤生长曲线; C: 治疗过程中裸鼠体重变化情况。

A: tumor tissues dissected at the end of the experiment; B: growth curve of tumor tissues; C: body weight changes of nude mice during treatment.

图9 Ad-FGF-Trap抑制CAL 27细胞体内肿瘤生长

Fig.9 Ad-FGF-Trap inhibited tumor growth of CAL 27 cells *in vivo*



A: CAL 27和WSU-HN6细胞受体表达差异分析; B: 西妥昔单抗联合Ad-FGF-Trap作用于WSU-HN6细胞(* $P < 0.05$); C: 西妥昔单抗联合Ad-FGF-Trap作用于CAL 27细胞(* $P > 0.05$)。

A: different receptor expression patterns of CAL 27 and WSU-HN6 cells; B: combination therapy of Cetuximab and Ad-FGF-Trap in WSU-HN6 cells (* $P < 0.05$); C: combination therapy of Cetuximab and Ad-FGF-Trap in CAL 27 cells (* $P > 0.05$).

图10 Ad-FGF-Trap联合西妥昔单抗作用于头颈部鳞癌细胞

Fig.10 Combination therapy of Ad-FGF-Trap and Cetuximab in HNSCC

其耐药问题一直是困扰学界多年的难题。研究发现, *FGFR1*基因扩增是HNSCC中常见的分子事件, 并作为更具侵袭性的潜在生物标志物。FGFR蛋白在39%~64%口腔鳞状细胞癌中与63%~79%口咽鳞状细胞癌中高表达^[22]。*FGFR1*基因扩增或FGFR1蛋白过表达将导致下游RAS/MAPK、PI3K/AKT、JAK/STAT通路异常活化^[23]。*FGFR1*扩增或FGFR1过表达可能是HNSCC的发病机制之一, 并参与西妥昔单抗耐药。

目前靶向FGF/FGFR通路的小分子药物存在特异性较差、毒副作用较大等缺点^[24-25]。FGFR单克隆抗体的研究也止步于动物实验中明显的毒副反应。蛋白类药物方面, FP1039由FGFR1全部胞外区和人IgG1 Fc段融合而成^[26-27]。但其包含了Ig1-Ig3全部结构, Ig1以及Ig1和Ig2之间的8个连续的酸性残基可抑制蛋白与FGF的结合, 从而影响对FGF的诱捕^[24]。因此, FP1039并非最理想的FGF诱饵受体, 目前相关研发工作已终止。

本课题组在前期工作中克隆获得了一种天然存在的可溶性*FGFR1*序列, 并以此作为新型“FGF-Trap”的基础结构。该序列与FP1039的不同在于: 不含FGFR1 Ig1及Ig1和Ig2之间的酸性残基, 仅保留Ig2和Ig3结构, 这种新型FGF-Trap理论上可以获得更高的FGF结合力, 提高FGFR通路阻断效果。利用重组腺病毒作为表达载体, 主要基于以下考虑: (1) 利用腺病毒载体表达融合蛋白有助于缩短研究周期, 验证科学设想, 传统蛋白药物涉及工程细胞的筛选、融合蛋白的大量真核表达、重组蛋白分离纯化鉴定等, 同时需考虑蛋白稳定性及给药方式; (2) HNSCC是位置相对较为表浅的实体肿瘤, 用重组腺病毒较易实现瘤内或瘤周反复多次给药。如果采用腺病毒表达载体这一方式治疗有效, 便于今后转化研究开展。

本研究初步证实了Ad-FGF-Trap在抑制HNSCC中的作用效果, 但未发现明显的FGFR1磷酸化水平下调, 这可能与磷酸化水平检测时间点的选择有关。抑或FGF-Trap也可通过其他途径, 如影响受体内吞等, 而非影响磷酸化水平发挥作用。FGF-Trap对各种FGF因子的诱捕能力检测, 也需要进一步测定分析。今后研究将利用课题组已建立的HNSCC人源肿瘤异种移植模型(patient-derived tumor xenograft, PDX), 挑选西妥昔单抗耐受者, 判断Ad-FGF-Trap与

西妥昔单抗在体内的联合治疗效果。

综上所述, 本研究成功制备靶向FGF/FGFR通路的重组腺病毒Ad-FGF-Trap, 分别在体外、体内水平进行功能验证。结果表明, Ad-FGF-Trap可有效抑制HNSCC细胞增殖、迁移、侵袭能力, 促进细胞凋亡或引起细胞周期阻滞, 抑制体内细胞移植瘤模型生长。在高表达EGFR的HNSCC细胞中, Ad-FGF-Trap联合西妥昔单抗具有显著的协同作用, 可进一步探索其临床转化应用价值。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] DAVID G P, SHARON S, DAVID A, et al. Head and neck cancers, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2020, 18(7): 873-98.
- [3] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [4] PICON H, GUDDATI A K. Mechanisms of resistance in head and neck cancer [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(9): 2742-51.
- [5] NAVID S, FAN C M, FLORES-VILLANUEVA P O, et al. The fibroblast growth factor receptors in breast cancer: from oncogenesis to better treatments [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(6): 2011.
- [6] WANG Y J, LIU D F, ZHANG T Y, et al. FGF/FGFR signaling in hepatocellular carcinoma: from carcinogenesis to recent therapeutic intervention [J]. *Cancers*, 2021, 13(6): 1360.
- [7] GOKE F, FRANZEN A, HINZ T K, et al. FGFR1 expression levels predict BGJ398 sensitivity of FGFR1-dependent head and neck squamous cell cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(19): 4356-64.
- [8] FORMISANO L, LU Y, SERVETTO A, et al. Aberrant FGFR signaling mediates resistance to CDK4/6 inhibitors in ER+ breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1373.
- [9] FISHER M M, SENTHILKUMAR G, HU R, et al. Fibroblast growth factor receptors as targets for radiosensitization in head and neck squamous cell carcinomas [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2020, 107(4): 793-803.
- [10] MARSHALL M E, HINZ T K, KONO S A, et al. Fibroblast growth factor receptors are components of autocrine signaling networks in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(15): 5016-25.
- [11] KAGOHARA L T, ZAMUNER F, DAVIS-MARCISAK E F, et al. Integrated single-cell and bulk gene expression and ATAC-seq reveals heterogeneity and early changes in pathways associated with resistance to cetuximab in HNSCC-sensitive cell lines [J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(1): 101-13.
- [12] GOKE F, BODE M, FRANZEN A, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 amplification is a common event in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(10): 1298-306.

- [13] FREIER K, SCHWAENEN C, STICHT C, et al. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC) [J]. *Oral Oncol*, 2007, 43(1): 60-6.
- [14] LI H, WAWROSE J S, GOODING W E, et al. Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(4): 571-82.
- [15] KIM E K, CHO Y A, KOH Y W, et al. Prognostic implications of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene amplification and protein overexpression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 348.
- [16] SCHULER M, CHO B C, SAYEHLI C M, et al. Rogaratinib in patients with advanced cancers selected by FGFR mRNA expression: a phase 1 dose-escalation and dose-expansion study [J]. *Lancet Oncol*, 2019, 20(10): 1454-66.
- [17] KOOLE K, BRUNEN D, KEMPEN P M W, et al. FGFR1 is a potential prognostic biomarker and therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15): 3884-93.
- [18] DUBOT C, BERNARD V, SABLIN M P, et al. Comprehensive genomic profiling of head and neck squamous cell carcinoma reveals FGFR1 amplifications and tumour genomic alterations burden as prognostic biomarkers of survival [J]. *Eur J Cancer*, 2018, 91: 47-55.
- [19] STARSKA K, FORMA E, LEWY-TRENDI I, et al. Fibroblast growth factor receptor 1 and 3 expression is associated with regulatory PI3K/AKT kinase activity, as well as invasion and prognosis, in human laryngeal cancer [J]. *Cell Oncol*, 2018, 41(3): 253-68.
- [20] YUE S T, LI Y K, CHEN X J, et al. FGFR-TKI resistance in cancer: current status and perspectives [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 23.
- [21] TAKAHASHI K, AKATSU Y, PODYMA-INOUE K A, et al. Targeting all transforming growth factor-beta isoforms with an Fc chimeric receptor impairs tumor growth and angiogenesis of oral squamous cell cancer [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(36): 12559-72.
- [22] KOOLE K, CLAUSEN M J, VAN ES R J, et al. FGFR family members protein expression as prognostic markers in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(4): 363-74.
- [23] HELSTEN T, SCHWAEDERLE M, KURZROCK R. Fibroblast growth factor receptor signaling in hereditary and neoplastic disease: biologic and clinical implications [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(3): 479-96.
- [24] DIENSTMANN R, RODON J, PRAT A, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumors [J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(3): 552-63.
- [25] LUO H, QUAN J, XIAO H, et al. FGFR inhibitor AZD4547 can enhance sensitivity of esophageal squamous cell carcinoma cells with epithelial-mesenchymal transition to gefitinib [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(5): 2270-8.
- [26] HARDING T C, LONG L, PALENCIA S, et al. Blockade of nonhormonal fibroblast growth factors by FP-1039 inhibits growth of multiple types of cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(178): 178ra39.
- [27] TOLCHER A W, PAPADOPOULOS K P, PATNAIK A, et al. A phase I, first in human study of FP-1039 (GSK3052230), a novel FGF ligand trap, in patients with advanced solid tumors [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(3): 526-32.