

中图分类号: R965; R734.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)22-0057-05

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.22.012



卡瑞利珠单抗联合顺铂对 *KRAS* 突变型非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞的影响*

周 敏, 李庆玲, 周 宁, 丁 宁, 周辛灿[△]

(徐州医科大学附属市立医院, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨卡瑞利珠单抗联合顺铂对 *KRAS* 突变型(*KRAS*-MUT)非小细胞肺癌(NSCLC)NCI-H460 细胞的抑制作用及其机制。方法 以 0, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂和 20, 40, 80, 160, 320 ng/mL 卡瑞利珠单抗作用于 NCI-H460 细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, 以确定药物最终浓度。实验分为模型组(A 组, 常规培养液)、顺铂组(B 组, 8 $\mu\text{mol/L}$)、卡瑞利珠单抗组(C 组, 80 ng/mL)和联合用药组(D 组, 8 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂+80 ng/mL 卡瑞利珠单抗)。采用流式细胞术检测细胞凋亡情况, 免疫印迹(Western blot)法检测 B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl-2)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)和剪切胱天蛋白酶 3(C-caspase-3)蛋白表达水平。结果 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 或 0 ng/mL 比较, 8~32 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂和 80~320 ng/mL 卡瑞利珠单抗作用下 NCI-H460 增殖率均显著降低($P < 0.05$)。与 A 组比较, B 组和 C 组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$); 与 B 组比较, D 组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。与 A 组比较, B 组和 C 组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低, 而 Bax 和 C-caspase-3 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$); 与 B 组比较, D 组 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低, 而 Bax 和 C-caspase-3 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 卡瑞利珠单抗可增强顺铂抑制 NCI-H460 细胞的作用, 其作用机制可能与下调 Bcl-2, 上调 Bax 和 C-caspase-3 表达有关。

关键词: 非小细胞肺癌; *KRAS* 突变; 卡瑞利珠单抗; 顺铂; 作用机制

Effect of Camrelizumab Combined with Cisplatin on *KRAS* - Mutant Non - Small Cell Lung Cancer NCI - H460 Cells

ZHOU Min, LI Qingling, ZHOU Ning, DING Ning, ZHOU Xincan

(The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, China 221002)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect and mechanism of camrelizumab combined with cisplatin on *KRAS* mutant (*KRAS* - MUT) non - small cell lung cancer (NSCLC) NCI - H460 cells. **Methods** NCI - H460 cells were treated with cisplatin at concentrations of 0, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$ and camrelizumab at concentrations of 20, 40, 80, 160, 320 ng/mL , respectively. The CCK - 8 method was used to detect cell proliferation and determine the final drug concentrations. The experiment was divided into four groups: model group (Group A, regular culture medium), cisplatin group (Group B, 8 $\mu\text{mol/L}$), camrelizumab group (Group C, 80 ng/mL), and combined treatment group (Group D, 8 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin + 80 ng/mL camrelizumab). Flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and Western blot was used to detect the expression levels of B cell lymphoma 2 (Bcl - 2), Bcl - 2 associated X protein (Bax), and cleaved caspase - 3 (C - caspase - 3) proteins. **Results** Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ or 0 ng/mL group, the proliferation rates of NCI - H460 cells treated with 8 - 32 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin and 80 - 320 ng/mL camrelizumab were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with Group A, the apoptosis rate of Group B and Group C was significantly increased ($P < 0.05$); compared with Group B, the apoptosis rate of Group D was significantly increased ($P < 0.05$). Compared with Group A, the expression level of Bcl - 2 protein in Group B and Group C was significantly decreased, while the expression levels of Bax and C - caspase - 3 proteins were significantly increased ($P < 0.05$); compared with Group B, the expression level of Bcl - 2 protein in Group D was significantly decreased, while the expression levels of Bax and C - caspase - 3 proteins were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Camrelizumab can enhance the inhibitory effect of cisplatin on NCI - H460 cells, and its mechanism may be related to down - regulating the expression of Bcl - 2 and up - regulating the expressions of Bax and C - caspase - 3.

Key words: non - small cell lung cancer; *KRAS* mutation; camrelizumab; cisplatin; action mechanism

肺癌是全球范围内影响人类健康的重要公共卫生问题, 近年来, 我国肺癌新发病例数呈上升趋势, 是我国癌症相关发病和死亡的主要原因之一^[1-3]。其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌病例的 80%~85%^[4]。尽管手

* 基金项目: 徐州医科大学附属医院发展基金资助项目[XYFM202238]。

第一作者: 周敏, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为肺癌防治, (电子信箱)xiechun0803@163.com。

[△] 通信作者: 周辛灿, 男, 大学本科, 副主任医师, 研究方向为肺癌防治, (电子信箱)22445365@qq.com。

术、放射治疗、化学治疗(以下简称化疗)、免疫治疗和分子靶向治疗均已用于 NSCLC 的治疗,但疗效欠佳^[5]。鼠类肉瘤病毒癌基因(*KRAS*)是 *RAS* 基因家族中的一种原癌基因^[6-7],也是恶性肿瘤中最常见的突变,尤其在结直肠癌、胰腺癌和 NSCLC 中^[8-11]。传统化疗对 *KRAS* 突变型(*KRAS* - MUT)肿瘤的疗效常比对 *KRAS* 野生型(*KRAS* - WT)肿瘤差^[12]。卡瑞利珠单抗已被证实可在多种癌症治疗中发挥积极作用^[13-15],如联合吉西他滨和奥沙利铂治疗晚期肝内胆管癌^[16],联合紫杉醇可治疗三阴性乳腺癌^[17]。本研究中探讨了卡瑞利珠单抗联合顺铂对 *KRAS* - MUT NSCLC NCI - H460 细胞的影响,以期卡瑞利珠单抗辅助治疗 *KRAS* - MUT NSCLC 提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞株

仪器:BC - J160 型 CO₂ 培养箱(上海迅博医疗生物仪器股份有限公司);BioTek SynergyHT 型多功能酶标仪(美国 Agilent 公司);C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司);HT - 600C 型通用电泳仪(北京鸿涛基业科技发展有限公司);5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

试剂:顺铂注射液(齐鲁制药有限公司,批号为 2030132DB);卡瑞利珠单抗(苏州盛迪亚生物医药有限公司,批号为 202108102F);RPMI - 1640 培养基(批号为 PM150110)、胎牛血清(FBS,批号为 164210)、青霉素 - 链霉素混合液(批号为 PB180120),均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK - 8 试剂盒(批号为 C0038)、磷酸盐缓冲液(PBS,批号为 C0221A)、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(批号为 P0013C)、增强化学发光(ECL)试剂盒(批号为 P0018M),均购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V - 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(FITC/PI)凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号为 CA1020);BCA 检测试剂盒(批号为 ab102536)、B 细胞淋巴瘤因子 2(Bcl - 2)抗体(批号为 ab182858)、Bcl - 2 关联 X 蛋白(Bax)抗体(批号为 ab32503)、剪切胱天蛋白酶 3(C - caspase - 3)抗体(批号为 ab32042)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(批号为 ab6721),均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;甘油醛 - 3 - 磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号为 10494 - 1 - AP)。

细胞株:人 NSCLC *KRAS* - MUT 细胞株 NCI - H460(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号为 CL - 0299)。

1.2 方法

细胞培养:取 NCI - H460 细胞复苏,用含有 10% FBS 和 1% 青霉素 - 链霉素混合液的 RPMI - 1640 培养液,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养,每 24 h 更换 1 次

新鲜培养液。当细胞培养至对数生长期(融合度约为 80%)时,进行传代培养或细胞计数。

细胞增殖情况:取对数生长期细胞,以每孔 2×10^3 个细胞密度接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 培养液,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养 24 h,弃去上清液,分别以 2, 4, 8, 16, 32 μ mol/L 顺铂和 20, 40, 80, 160, 320 ng/mL 卡瑞利珠单抗,于 5% CO₂、37 °C 条件下继续培养 48 h,弃去培养液,每孔加入 100 μ L 培养液和 10 μ L CCK - 8 溶液,避光继续孵育 1 h。以酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(OD),并计算细胞增殖率。实验设空白对照(仅加入培养液),并以不作任何处理的细胞作为模型对照组(0 μ mol/L),每组设置 5 个复孔。细胞增殖率(%) = $(OD_{\text{用组}} - OD_{\text{空白对照}}) / (OD_{\text{模型对照}} - OD_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ 。

细胞凋亡情况:采用流式细胞术。取对数生长期细胞,以每孔 1×10^5 个细胞密度接种于 12 孔板中,每孔加入 1 mL 培养液,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养 24 h,弃去上清液。实验分为模型组(A组,常规培养液)、顺铂组(B组,8 μ mol/L)、卡瑞利珠单抗组(C组,80 ng/mL)和联合用药组(D组,8 μ mol/L 顺铂 + 80 ng/mL 卡瑞利珠单抗),于 5% CO₂、37 °C 条件下继续培养 48 h。用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化细胞,并收集细胞,调节细胞密度为 5×10^6 / mL,取细胞悬液 100 μ L,置 5 mL 流式管中,加入 5 μ L Annexin V - FITC 混匀后于室温避光孵育 5 min。加入 5 μ L PI 和 400 μ L PBS 后,以流式细胞仪[激发波长(E_x)为 488 nm,发射波长(E_m)为 530 nm]检测细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率。

凋亡相关蛋白表达情况:取对数生长期细胞,以每孔 5×10^5 个细胞密度接种于 6 孔板,每孔加入 3 mL 培养液,于 5% CO₂、37 °C 条件下培养 24 h。按“细胞凋亡情况”项下方法分组及给药,继续培养 48 h,取各组细胞,分别加 100 μ L RIPA 裂解液,冰上匀浆,裂解 30 min,于 4 °C 下 $12\,000 \times g$ 离心 10 min,取上清液。以 BCA 法检测蛋白含量,10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶(SDS - PAGE)电泳,后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入 Bax 一抗(1:1 000, V/V)、Bcl - 2 一抗(1:1 000, V/V)、C - caspase - 3 一抗(1:1 000, V/V)和内参蛋白 GAPDH 一抗(1:1 000, V/V),4 °C 下孵育过夜。用含 0.1% 吐温 - 20 的 PBS 洗 3 次,加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,加入 ECL 试剂,凝胶成像,用 Image J 软件进行蛋白灰度值分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组间比较行独立样本 *t* 检验,多组间比较行方差分析;反之则以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,行秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

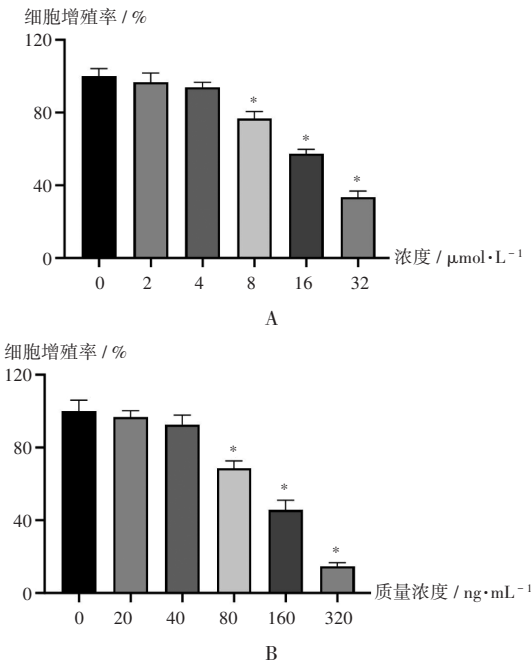
2 结果

2.1 细胞增殖情况

细胞增殖率均随药物浓度的升高呈下降趋势。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 或 0 ng/mL 比较, 顺铂浓度为 8 ~ 32 $\mu\text{mol/L}$ 、卡瑞利珠单抗质量浓度为 80 ~ 320 ng/mL 时, 细胞增殖率均显著降低 ($P < 0.05$)。详见图 1。

2.2 细胞凋亡情况

与 A 组比较, B 组和 C 组的细胞凋亡率均显著升高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, D 组的细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。详见图 2。



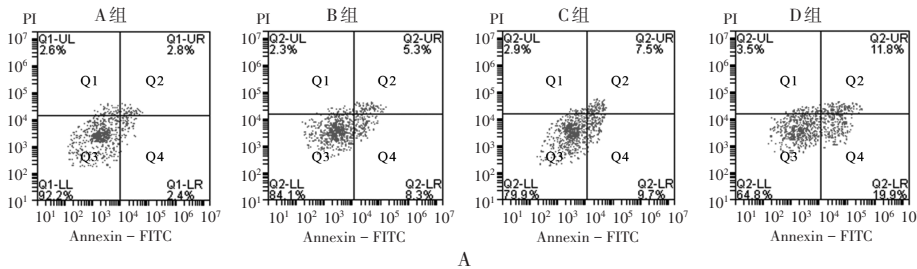
A. 顺铂 B. 卡瑞利珠单抗
注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 或 0 ng/mL 比较, $^*P < 0.05$ 。

图 1 NCI-H460 细胞增殖情况

A. Cisplatin B. Camrelizumab

Note: Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ or 0 ng/mL group, $^*P < 0.05$.

Fig. 1 Proliferation of NCI-H460 cells



A. 流式细胞图 B. 定量统计图
注: 与 A 组比较, $^*P < 0.05$; 与 B 组比较, $^*P < 0.05$ 。图 3 同。

图 2 NCI-H460 细胞凋亡情况

A. Flow cytometry plots B. Quantitative statistical graph

Note: Compared with group A, $^*P < 0.05$; compared with group B, $^*P < 0.05$ (for Fig. 2 - 3).

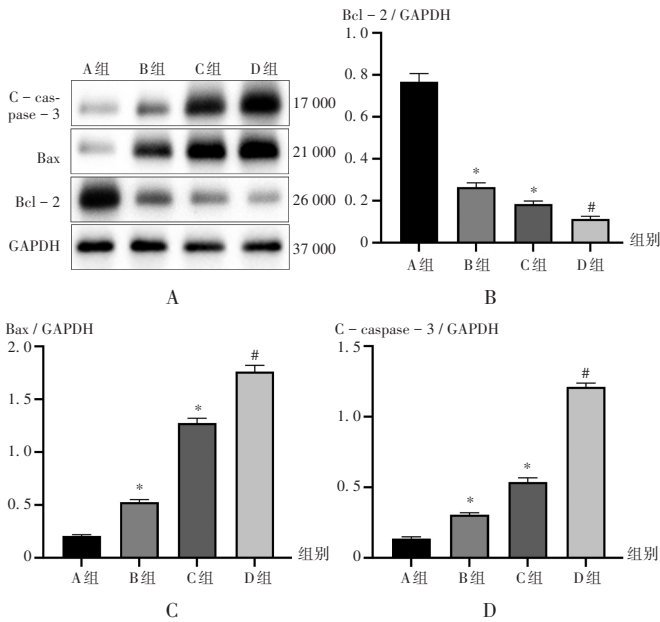
Fig. 2 Apoptosis of NCI-H460 cells

2.3 凋亡相关蛋白表达水平

与 A 组比较, B 组和 C 组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低, 而 Bax 和 C-caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, D 组 Bcl-2 蛋白表达量显著降低, 而 Bax 和 C-caspase-3 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$)。详见图 3。

3 讨论

NSCLC 5 年总生存率较低^[18]。铂类药物是一线治疗 NSCLC 的“金标准”。其中顺铂是铂类药物中使用最广泛的化疗药物, 但耐药性的产生导致肿瘤的进一步发展和产生骨髓抑制、药物性肾炎等副作用^[19-23]。因

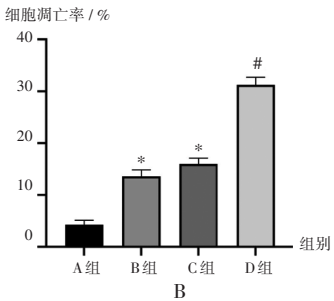


A. 凝胶电泳图 B. Bcl-2 定量统计图 C. Bax 定量统计图
D. C-caspase-3 定量统计图

图 3 凋亡相关蛋白表达情况

A. Gel electrophoresis diagram B. Quantitative statistical graph of Bcl-2 C. Quantitative statistical graph of Bax D. Quantitative statistical graph of C-caspase-3

Fig. 3 Expression of apoptosis-related proteins



A. 流式细胞图 B. 定量统计图
注: 与 A 组比较, $^*P < 0.05$; 与 B 组比较, $^*P < 0.05$ 。图 3 同。

图 2 NCI-H460 细胞凋亡情况

A. Flow cytometry plots B. Quantitative statistical graph

Note: Compared with group A, $^*P < 0.05$; compared with group B, $^*P < 0.05$ (for Fig. 2 - 3).

Fig. 2 Apoptosis of NCI-H460 cells

此,增强顺铂敏感性是NSCLC治疗的关键。

卡瑞利珠单抗是我国自主研发的程序性死亡受体1(PD-1)免疫检查点抑制剂,可阻断PD-1/程序性死亡配体1(PD-L1)通路,形成肿瘤免疫治疗基础。近年来,卡瑞利珠单抗联合放疗、化疗治疗癌症的临床研究逐渐增多,其中卡瑞利珠单抗联合化疗已用于食管鳞癌、肝癌、晚期NSCLC、结肠癌等^[24-28],疗效确切,可提高患者的生存质量。*KRAS*是NSCLC常见的致癌驱动因子,且高发于肺腺癌患者,且有研究表明,*KRAS*突变会导致NSCLC患者的化疗疗效减弱^[23]。本研究结果显示,8~32 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂和80~320 ng/mL卡瑞利珠单抗可显著抑制NCI-H460细胞的增殖并促进细胞凋亡。

综上所述,卡瑞利珠单抗可增强NCI-H460细胞的顺铂敏感性,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,具有协同抗肿瘤作用,其机制可能与抑制Bcl-2蛋白表达和促进Bax和C-caspase-3蛋白表达相关。

参考文献

- [1] GAO S, LI N, WANG S, et al. Lung Cancer in People's Republic of China [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2020, 15(10):1567-1576.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71(3):209-249.
- [3] CAO W, CHEN HD, YU YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chinese Medical Journal*, 2021, 134(7):783-791.
- [4] NOORELDEEN R, BACH H. Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16):8861.
- [5] ALDUAIS Y, ZHANG H, FAN F, et al. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment [J]. *Medicine*, 2023, 102(8):e32899.
- [6] LI Q, ZHOU Q, ZHAO S, et al. *KRAS* mutation predict response and outcome in advanced non-small cell lung carcinoma without driver alterations receiving PD-1 blockade immunotherapy combined with platinum-based chemotherapy: a retrospective cohort study from China [J]. *Translational Lung Cancer Research*, 2022, 11(10):2136-2147.
- [7] HUANG LM, GUO ZX, WANG F, et al. *KRAS* mutation: from undruggable to druggable in cancer [J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6(1):386.
- [8] TAKASHIMA A, FALLER DV. Targeting the RAS oncogene [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2013, 17(5):507-531.
- [9] BTEICH F, MOHAMMADI M, LI T, et al. Targeting *KRAS* in Colorectal Cancer: A Bench to Bedside Review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(15):12030.
- [10] STICKLER S, RATH B, HAMILTON G. Targeting *KRAS* in pancreatic cancer [J]. *Oncology Research*, 2024, 32(5):799-805.
- [11] CASCETTA P, MARINELLO A, LAZZARI C, et al. *KRAS* in NSCLC: State of the Art and Future Perspectives [J]. *Cancers*, 2022, 14(21):5430.
- [12] SUN X, LI K, ZHAO R, et al. Lung cancer pathogenesis and poor response to therapy were dependent on driver oncogenic mutations [J]. *Life Sciences*, 2021, 265:118797.
- [13] LUO HY, LU J, BAI YX, et al. Effect of Camrelizumab vs Placebo Added to Chemotherapy on Survival and Progression-Free Survival in Patients With Advanced or Metastatic Esophageal Squamous Cell Carcinoma: The ESCORT-1st Randomized Clinical Trial [J]. *JAMA*, 2021, 326(10):916-925.
- [14] REN SX, CHEN JH, XU XX, et al. Camrelizumab Plus Carboplatin and Paclitaxel as First-Line Treatment for Advanced Squamous NSCLC (CameL-Sq): A Phase 3 Trial [J]. *Journal of Thoracic Oncology*, 2022, 17(4):544-557.
- [15] XIA YX, TANG WW, QIAN XF, et al. Efficacy and safety of camrelizumab plus apatinib during the perioperative period in resectable hepatocellular carcinoma: a single-arm, open label, phase II clinical trial [J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2022, 10(4):e004656.
- [16] ZHANG ZY, WANG X, LI HH, et al. Case Report: Camrelizumab combined with gemcitabine and oxaliplatin in the treatment of advanced intrahepatic cholangiocarcinoma: a case report and literature review [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1230261.
- [17] CHEN L, JIANG YZ, WU SY, et al. Famitinib with Camrelizumab and Nab-Paclitaxel for Advanced Immunomodulatory Triple-Negative Breast Cancer (FUTURE-C-Plus): An Open-Label, Single-Arm, Phase II Trial [J]. *Clinical Cancer Research*, 2022, 28(13):2807-2817.
- [18] LI YT, YAN BS, HE SM. Advances and challenges in the treatment of lung cancer [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 169:115891.
- [19] KONOSHENKO M, LANSUKHAY Y, KRASILNIKOV S, et al. MicroRNAs as Predictors of Lung-Cancer Resistance and Sensitivity to Cisplatin [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14):7594.
- [20] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers [J]. *Nature*, 2012, 489(7417):519-525.
- [21] 耿梦圆. NSCLC患者*KRAS*突变的分子特征及其对免疫治疗疗效及预后的影响[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学, 2023.
- [22] 高丽媛. *KRAS*突变晚期非小细胞肺癌临床分子病理特征和预后分析[D]. 长春:吉林大学, 2023.
- [23] 刘蕾, 魏素菊. *KRAS*突变的非小细胞肺癌的研究进展 [J]. *中国肺癌杂志*, 2018, 21(5):419-424.
- [24] 隋鑫, 李林. 卡瑞利珠单抗联合化疗在局部晚期食管鳞癌术前新辅助治疗中的应用研究 [J]. *淮海医药*, 2024, 42(4):399-403.