

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)12-1057-03

重组抗 HER2 ScFv /tBid 基因的表达及其对乳腺癌 SKBr-3 细胞的促凋亡作用

王芳¹, 裘秀春³, 王立锋¹, 许彦鸣¹, 赵晶¹, 孟艳玲², 贾林涛¹, 王成济¹, 范清宇³, 杨安钢² (第四军医大学:
¹ 基础部生物化学与分子生物学教研室, ² 免疫学教研室 陕西 西安 710033, ³ 唐都医院骨科 陕西 西安 710038)

Expression and proapoptotic activity of recombinant anti-HER2 ScFv/ tBid gene in SKBr-3 cells

WANG Fang¹, QIU Xiu-Chun³, WANG Li-Feng¹, XU Yan-Ming¹, ZHAO Jing¹, MENG Yan-Ling², JIA Lin-Tao¹, WANG Cheng-Ji¹, FAN Qing-Yu³, YANG An-Gang²

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, ²Department of Immunology, School of Basic Medicine, Xi'an 710033, China, ³Department of Orthopaedics, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

【Abstract】 AIM: To observe the expression and the effect of recombinant anti-HER2 ScFv/tBid gene in the transfected SKBr-3 cell line. **METHODS:** Recombinant gene of PE transmembrane domain and tBid was obtained from pcDNA-bid plasmid by restriction enzyme digestion, and then cloned into vector pCMV and the recombinant plasmid pCMV-rpb was transfected into SKBr-3 cells. Expression of recombinant plasmid and morphologic changes of SKBr-3 cells were detected by immunofluorescent staining. MTT test was used to show how the cells' living status was affected by the gene transfection. **RESULTS:** The recombinant plasmid was constructed and transfected into SKBr-3 cells successfully. The fusion protein was found in the cytoplasm of transfected SKBr-3 cells. MTT test and indirect immunofluorescent staining showed the apoptosis of transfected SKBr-3 cells. **CONCLUSION:** Recombinant proapoptotic protein of tBid can be expressed in transfected SKBr-3 cells and the expressed fusion protein can induce apoptosis.

【Keywords】 Bid; breast neoplasms; apoptosis; ScFv antibody

【摘要】 目的: 观察构建的重组抗 HER2 ScFv /tBid 基因在

收稿日期 2005-12-15; 接受日期 2006-01-30

基金项目 国家“973”计划资助项目(2004CB518805), 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT0459), 国家自然科学基金项目(30471988, 30400403)

通讯作者 杨安钢. Tel: (029) 84774528 Email: agyang@fmmu.edu.cn
 作者简介 王芳. 硕士生(导师杨安钢). Tel: (029) 84774516 Ext. 22

Email: wfl1082003@sina.com

SKBr-3 细胞中的表达及其对转染的 SKBr-3 细胞的作用。方法: 用限制性内切酶双酶切已构建的 pcDNA-bid 质粒, 获得带有 PE 转膜结构域和 tBid 的重组基因, 将所获基因插入到真核表达载体 pCMV 单链抗体基因 ScFv23e 的下游, 转染 SKBr-3 细胞。间接免疫荧光法检测目的蛋白的表达, MTT 法检测目的基因转染后细胞的增殖情况。结果: 转染 SKBr-3 细胞后, 检测出目的蛋白的表达。MTT 实验发现细胞的增殖被明显抑制。间接免疫荧光双标记染色检测 tBid 的表达, 并可观察到 Cyt c 在细胞质中存在, SKBr-3 细胞出现凋亡。结论: 重组抗 HER2 ScFv /tBid 分子可以在转染的 SKBr-3 细胞中表达, 并且可抑制转染细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡。

【关键词】 Bid; 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; ScFv 抗体

【中图分类号】 Q255 **【文献标识码】** A

0 引言

Bid (BH3 interacting death agonist) 是 Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) 家族蛋白, 编码区 cDNA 长 588 bp, 编码表达产物长度为 195 个氨基酸, 分子质量为 22×10^3 。Bid 只含有一个 BH3 结构域 (90-98 aa 的区域), 而没有 Bcl-2 家族成员的其他保守区域 (如: BH1, BH2, BH4), 也没有大部分 Bcl-2 家族成员所具有的 C-末端疏水的膜锚定区域。Bid 分子定位于胞质, 能够被 caspase-8, Granzyme B 等剪切活化, 去除 N 末端后, 截短的 $M_r 15 \times 10^3$ 片段 (truncated Bid, tBid) 从胞质转位到线粒体, 使线粒体通透性改变, 释放细胞色素 c 和其他的促凋亡分子调节细胞凋亡^[1-2]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 有 30% 左右的乳腺癌患者 HER2 特异性高表达, 并且 HER2 表达量越高, 肿瘤的恶性程度越高, 患者预后也越差^[3-4]。本研究中所构建的靶向重组促凋亡分子是以 HER2 为靶点, 旨在研究该重组蛋白对乳腺癌 SKBr-3 细胞的促凋亡作用。

1 材料和方法

1.1 材料 DH5 α 感受态细菌, pCMV 空载体, pCMV-immuno-caspase6 质粒^[5], pcDNA3-bid 质粒^[6-7], 人乳腺癌细胞系 SKBr-3 由第四军医大学生物化学与

分子生物学教研室保存;RPMI1640,脂质体 Lipofectamine2000™,新生牛血清及反转录试剂盒(Invitrogen 公司),山羊抗人 Bid,兔抗人 Cyt c 多克隆抗体(Santa Cruz 公司);Biotin 标记的兔抗山羊 IgG, FITC 标记的驴抗兔 IgG, DAPI, Avidin-Cy3(Molecular Probes 公司);限制性核酸内切酶 *Hind* III, *Xba* I, *Eco*R I, *Not* I, T4 DNA ligase(TaKaRa 公司).

1.2 方法

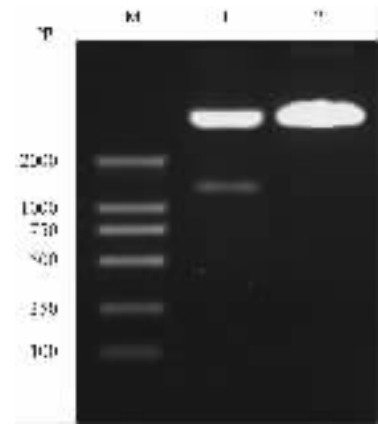
1.2.1 细胞转染 将处于对数生长期的 SKBr-3 细胞用 2.5 g/L 胰酶消化后,以 1×10^6 /孔接种于 6 孔板中,继续培养 24 h. 待 80% 以上贴壁后,吸出培养液,用 RPMI 1640 将细胞冲洗 2 遍. 取 3 μ g/孔的 pCMV-rpb 和 pCMV 质粒分别溶于 500 μ L RPMI 1640 培养液,称为 A1, A2 液. 将两份 6 μ L/孔的 Lipofectamine2000™各溶于 500 μ L RPMI 1640 培养液,室温孵育 5 min,为 B1, B2 液. 将 A1 和 B1, A2 和 B2 两液分别混合,轻轻摇动,室温孵育 20 min,缓缓滴加至洗过的细胞中,于 37℃, 50 mL/L CO₂ 条件下培养 8 h. 吸弃转染液,加入 1 mL 含 200 mL/L 小牛血清的无抗生素的 RPMI 1640 培养液,继续培养.

1.2.2 间接免疫荧光染色 制备细胞爬片,经转染 48 h 后,以 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 0.1 mL/L Triton X-100 处理, 30 mL/L H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶,再以正常山羊血清进行封闭. 依次加入一抗、生物素化的二抗或 FITC 标记的二抗、Avidin-Cy3 和 DAPI,以荧光显微镜观察并照相.

1.2.3 MTT 实验 以 5×10^3 /孔将 SKBr-3 细胞接种于 96 孔板中,转染后 24 h,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 37℃, 继续孵育 4 h, 终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解. 在酶联免疫检测仪上测定各孔 $A_{490\text{nm}}$ 值,以时间为横轴, $A_{490\text{nm}}$ 值为纵轴绘制细胞生长曲线.

2 结果

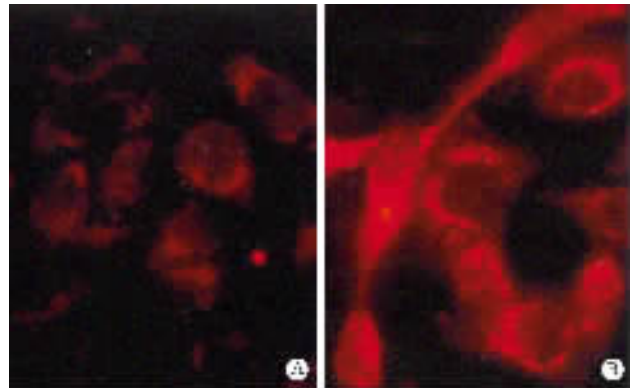
2.1 ScFv23e/PEdomain II-tbid 基因表达载体的构建 取 5 ng 的质粒 pCMV-immuno-caspas6,用 *Not* I, *Xba* I 双酶切,回收约 6500 bp 左右的载体片段,另取 5 ng 的质粒 pcDNA-bid,用 *Eco*R I, *Xba* I 双酶切,回收约 400 bp 的基因片段,用 T4 DNA ligase 连接两片段,转化、涂皿、过夜生长,挑取单克隆培养,提取质粒,以 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定. 电泳结果显示,切出了 1500 bp 左右的重组蛋白编码序列片段,与预期的大小一致,并且经测序证实,将载体命名为 pCMV-rpb(图 1).



M: DL2000 marker; 1: pCMV-rpb/*Hind* III + *Xba* I; 2: pCMV/*Hind* III + *Xba* I.

图 1 重组质粒 pCMV-rpb 的酶切鉴定

2.2 靶向重组基因在 SKBr-3 细胞中的表达 用间接免疫荧光染色(一抗为山羊抗人 Bid 抗体,二抗为 Biotin 标记的兔抗山羊 IgG, DAPI 染细胞核)可以观察到转染 pCMV 的对照组细胞中 Bid 蛋白在细胞质中均匀分布,荧光着色弱,呈本底表达(图 2A),而转染了 pCMV-rpb 的细胞中,荧光着色强,目的蛋白聚集在核周,似印戒状,呈分泌型蛋白表达的特征(图 2B).



A: 转染 pCMV; B: 转染 pCMV-rpb.

图 2 重组基因在 SKBr-3 细胞中的表达 $\times 1000$

2.3 重组蛋白对 SKBr-3 细胞增殖的影响 绘制生长曲线,可以看出实验组的细胞生长受到明显抑制(图 3).

2.4 重组蛋白对 SKBr-3 细胞的凋亡诱导作用 用荧光显微镜观察到转染 pCMV 的对照组细胞生长良好, Bid 蛋白在细胞质中均匀分布, Cyt c 在线粒体中呈点状分布,仅有微量表达,而转染了目的基因的细胞生长状态较差,细胞数目减少,有目的蛋白的过表达,同时出现了细胞核固缩, Cyt c 释放到细胞质中等凋亡特征(图 4).

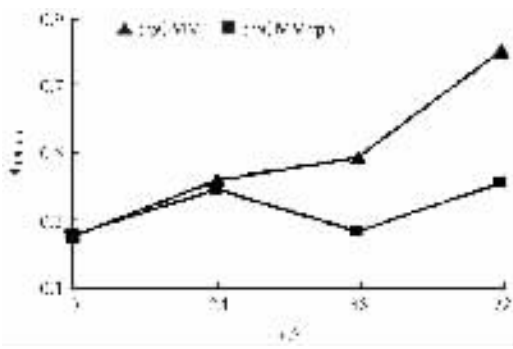


图3 MTT法检测 pCMV-rpb 转染后对 SKBr-3 细胞生长的影响

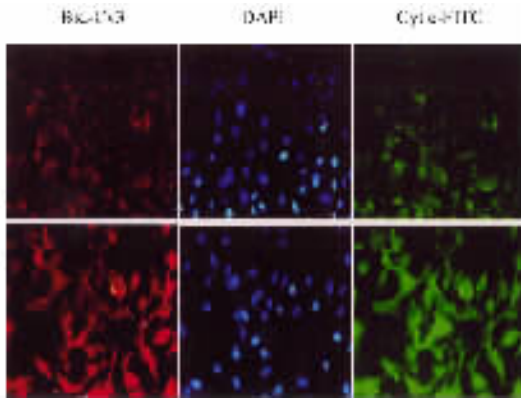


图4 间接免疫荧光染色检测细胞凋亡 $\times 400$

3 讨论

Bid 是只含有 BH3 结构域的促凋亡的 Bcl-2 家族蛋白,将 Bid 作为肿瘤杀伤效应分子具有优势,因为 Bid 是连接细胞凋亡内在和外在途径的关键分子, Bid 活化后可以同时激活数条凋亡通路,使多种效应分子(caspase-3, -6, -7 和 Cyt c)同时发挥作用^[8,9]。绿脓杆菌外毒素(*Pseudomonas* exotoxin, PE)是绿脓杆菌分泌的单链毒素,由 613 个氨基酸残基组成, M_r 约为 66×10^3 。它分为 I, II, III 结构域,分别负责受体识别、内吞体转位及催化功能。PE 的第 II 结构域(aa 253-364)具有转位功能,空间结构是由 6 个 α -螺旋构成。PE 分子经细胞内吞作用进入靶细胞后形成内吞体,内吞体环境的酸化是触发 PE 转位的主要因素,在内吞体的酸性环境下,内吞体中的 Furin 蛋白酶催化转位结构域 Arg²⁷⁹-Gly²⁸⁰ 肽键断裂,催化结构域进入胞质,使延长因子-2(EF-2)发生不可逆的 ADP-核糖基化失活,从而导致细胞死亡^[10]。

我们已经构建了以 HER2 为靶向的多种免疫促凋亡分子 Immuno-caspase-3, -6, 和 Immuno-Granzyme B, 它们由抗肿瘤表面抗原 HER2 的单链抗体, PE 转膜结构域(a. a 253-364)及不同的促凋亡分子组成^[5, 11-12]。由于 tBid 分子可以通过内在, 在两条途径

诱导细胞凋亡, 因而在本实验中我们用基因重组的方法把免疫促凋亡分子中的促凋亡效应分子替换为活化型的 Bcl-2 家族成员 bid 基因, 观察表达产物是否仍具有促凋亡作用。

我们观察到重组抗 HER2 ScFv /tBid 分子在转染的 HER2 阳性乳腺癌 SKBr-3 细胞中呈分泌性表达, 表达后能诱导 SKBr-3 细胞凋亡, 由于其凋亡诱导作用, 使细胞的生长受到明显的抑制, 为抗 HER2 ScFv /tBid 融合蛋白的实际应用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Wang K, Yin XM, Chao DT, et al. BID: A novel BH3 domain-only death agonist [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(22): 2859 - 2869.
- [2] Luo X, Budihardjo, Zou H, et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors [J]. *Cell*, 1998, 94(4): 481 - 490.
- [3] Salmon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene [J]. *Science*, 1987, 235: 177 - 182.
- [4] Brog A, Tandon AK, Sigurfaaon H, et al. HER2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 4332 - 4337.
- [5] Xu YM, Wang LF, Jia LT, et al. A caspase-6 and anti-human epidermal growth factor receptor-2(HER2) antibody chimeric molecule suppresses the growth of HER2-overexpressing tumors [J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 61 - 67.
- [6] 裴秀春, 于翠娟, 许彦鸣, 等. 截短型人 Bid 融合蛋白对 HeLa 细胞的促凋亡作用 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(21): 1963 - 1966.
- [7] 裴秀春, 于翠娟, 孟艳玲, 等. 截短型 bid 基因的克隆、表达及促凋亡作用的研究 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(1): 19 - 22.
- [8] Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathway [J]. *Cell Res*, 2000, 10: 161 - 167.
- [9] M. Degli Esposti. The roles of Bid [J]. *Apoptosis*, 2002, 7: 433 - 440.
- [10] Wedekind JE, Trame CB, Dorywalska M, et al. Refined crystallographic structure of pseudomonas aeruginosa exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity [J]. *J Mol Biol*, 2001, 314: 823 - 837.
- [11] Jia LT, Zhang LH, Yu CJ, et al. Sepecific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3 [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3257 - 3262.
- [12] Zhao J, Zhang LH, Jia LT, et al. Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing HER2-overexpressing tumor cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(20): 21343 - 21348.