

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2007 )03-0193-04

## 重组抗 HER2 ScFv/FDT/caspase-6 基因的构建、表达及其活性鉴定

任君琳<sup>1</sup>, 王涛<sup>2</sup>, 许彦鸣<sup>2</sup>, 孟艳玲<sup>1</sup>, 温伟红<sup>1</sup>, 张瑞<sup>2</sup>, 张巍<sup>1</sup>, 杨安钢<sup>1</sup>( 第四军医大学基础部<sup>1</sup>: 免疫学教研室, <sup>2</sup> 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710033 )

### Gene construction, expression and activity identification of recombinant anti-HER2 ScFv/FDT/caspase-6

REN Jun-Lin<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>, XU Yan-Ming<sup>2</sup>, MENG Yan-Ling<sup>1</sup>, WEN Wei-Hong<sup>1</sup>, ZHANG Rui<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, YANG An-Gang<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Immunology, <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China**【Abstract】** AIM : To construct the recombinant expression vector of anti-HER2 ScFv/FDT/caspase-6 and investigate its pro-apoptosis activity after transfected into gastric cancer SGC7901 cells.**METHODS :** Anti-HER2 ScFv ( e23sFv ) was attached to human recombinant caspase-6 ( RC6 ) gene by recombinant PCR , and the Furin recognition site of diphtheria toxin ( FDT ) served as the linker to construct e23sFv-FDT-RC6 recombinant gene. The recombinant gene was cloned into the vector pCMV , and the recombinant plasmid was transiently transfected into HER2 positive SGC7901 cells and HER2 negative HeLa cells via lipofectamine mediation. MTT assay was used to show how the cell living status was affected by the gene transfection. The pro-apoptotic activity of recombinant plasmid was detected by indirect immunofluorescent staining. **RESULTS :** Restriction endonuclease digestion and DNA sequencing proved that e23sFv-RC6 and e23sFv-FDT-RC6 genes had been cloned into vector pCMV. After transfection , the expression of fusion protein was found through Western Blot. MTT assays showed that the growth of SGC7901 cells was inhibited. Typical apoptotic changes of the SGC7901 cells transfected with pCMV-e23sFv-FDT-RC6 were seen by indirect immunofluorescent staining. **CONCLUSION :** The expression of recombinant anti-HER2 ScFv/FDT/caspase-6 gene can induce the apoptosis of HER2 positive SGC7901 cells.**【Keywords】** ScFv antibody ; caspase-6 ; apoptosis**【摘要】**目的 构建重组抗 HER2 ScFv/FDT/caspase-6 基因的表达载体 转染 SGC7901 胃癌细胞后观察其促凋亡作用. 方法 采用重组 PCR 法 将抗 HER2 的单链抗体( e23sFv )通过白喉毒素的 Furin 识别位点的编码序列( FDT )与人重构型 caspase-6( RC6 )基因重组 构建融合蛋白表达基因 e23sFv-FDT-RC6. 将所获得的重组基因克隆入真核表达载体 pCMV , 以脂质体法瞬时转染 HER2 阳性的 SGC7901 细胞和 HER2 阴性的 HeLa 细胞. MTT 法检测目的基因转染后细胞的增殖情况. 间接免疫荧光染色观察目的基因的表达对 SGC7901 细胞的促凋亡作用. 结果 把 e23sFv-RC6 e23sFv-FDT-RC6 基因克隆入真核表达载体 pCMV , 酶切鉴定和基因测序证明目的基因序列正确. 转染 SGC7901 和 HeLa 细胞后 , Western Blot 检测到目的蛋白的表达. MTT 实验观察到转染 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 的 SGC7901 细胞的增殖被明显抑制 , 间接免疫荧光染色可以观察到表达 e23sFv-FDT-RC6 融合蛋白的 SGC7901 细胞形态发生改变 部分细胞呈现典型凋亡特征. 结论 重组抗 HER2 ScFv/FDT/caspase-6 基因的表达可促进 HER2 阳性 SGC7901 胃癌细胞的凋亡.**【关键词】** ScFv 抗体 ; caspase-6 基因 细胞凋亡**【中图分类号】** Q786 **【文献标识码】** A

### 0 引言

Caspase-6 是介导细胞凋亡的重要蛋白酶 , 其蛋白含有 3 个结构域 原结构域、大亚基和小亚基<sup>[1-3]</sup>. 大小亚基顺序进行重排的 caspase-6 分子即 Reversed caspase-6 ( RC6 ) 具有天然 caspase-6 的活性 , 且能在体外识别并切割 PARP 及 Lamin A 等底物<sup>[4-5]</sup>. HER2/neu 是表皮生长因子( epidermal growth factor , EGF )受体家族成员之一 , 其表达量与肿瘤的恶性程度及预后相关. HER2 是一种公认的肿瘤标志物 , 是抗肿瘤治疗的理想靶标<sup>[6-7]</sup>. 在我国 , 部分胃癌患者 HER2 特异性高表达. 我们将抗 HER2 的单链抗体 ( e23sFv ) 基因通过白喉毒素( Diphtheria toxin , DT ) 的 Furin 识别位点的编码序列( FDT ) 与人 RC6 基因重组 构建了融合蛋白表达基因 e23sFv-FDT-RC6 及不含 Furin 识别位点序列 e23sFv-RC6 的真核表达载体 , 并将其瞬时转染 SGC7901 细胞和 HeLa 细胞 , 观察其表达产物对转染细胞生长的影响.

收稿日期 2006-11-13 ; 接受日期 2006-12-15

基金项目 国家重点基础研究发展计划( 2004CB518805 ) ; 教育部长江学者和创新团队发展计划( IRT0459 ) ; 国家自然科学基金( 30370314 , 30400403 )

通讯作者 杨安钢. Tel ( 029 ) 84774528 Email agyang@fmmu.edu.cn  
作者简介 任君琳. 硕士生( 导师杨安钢 ). Tel ( 029 ) 84774531 Ext. 805 Email renjunlin@hotmail.com

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DH5 $\alpha$  感受态细菌,质粒 pCMV-e23sFv-PE II-RC6,胃癌细胞系 SGC7901,宫颈癌细胞系 HeLa 由本室保存;RPMI 1640,脂质体 Lipofectamine2000™及反转录试剂盒(Invitrogen 公司);兔抗人 active caspase-6 多克隆抗体(Abcam 公司);兔抗人 Lamin A 多克隆抗体(Cell Signaling 公司);HRP 标记的山羊抗兔 IgG,DAPI,羊抗兔-Cy3(武汉博士德公司);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 引物设计与合成** 根据 PCR 引物设计原理,经计算机及网络辅助分析,设计上、下游引物 w1, w2 和 w3,其中 w1 与 w3 配对能特异性扩增 FDT-RC6 约 880 bp 的基因, w2 与 w3 配对能特异性扩增 RC6 约 850 bp 的基因。3 条引物均由上海生工生物公司合成,序列如下 ①w1 5' TTT GCG GCC GCG AAA GCC GGC AAT AGA GTG AGG AGA TCT GTG GGC GCA GCC TCC GTT TAC 3' ②w2 5' TTT GCG GCC GCG AAA GCA GCC TCC GTT TAC 3' ③w3 5' TTT TCT AGA TTA ATC TAC TAC ATC CAA AGG AAT 3'。

**1.2.2 细胞转染** 将处于对数生长期的细胞,用 2.5 g/L 胰酶消化后,以  $5 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板中,继续培养 24 h。待汇合率达到 80% 后,吸出培养液,用不含血清的 RPMI 1640 将细胞冲洗 2 遍。取 3  $\mu$ g/孔的 pCMV, pCMV-e23sFv-FDT-RC6 和 pCMV-e23sFv-RC6 分别溶于 500  $\mu$ L RPMI 1640 培养液,称为 A1, A2, A3 液;将 3 份 6  $\mu$ L/孔的 Lipofectamine2000™分别溶于 500  $\mu$ L RPMI 1640 培养液,室温孵育 2 min,为 B1, B2, B3 液。将 A1 和 B1, A2 和 B2, A3 和 B3 两液分别混合,室温孵育 20 min,缓缓滴加至 6 孔板中,于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 条件下培养 8 h。吸弃转染液,加入 1 mL 含 100 mL/L 小牛血清的无抗生素的 RPMI 1640 培养液,继续培养。

**1.2.3 Western Blot 检测** 将已处理的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电压分别为浓缩胶 80 V,分离胶为 150 V,100 V 转移 2 h 至 NC 膜上,将 NC 膜浸在封闭液(50 g/L 脱脂奶粉溶于 TBS)中,在室温下封闭 1 h,加入以封闭液 1:300 稀释的一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜;用 TBST(10 mmol/L Tris · HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mL/L Tween-20)洗膜,5 min  $\times$  3 次;加入以封闭液 1:1000 稀释 HRP 标记的二抗,室温下放置 1 h, TBST 洗膜,5 min  $\times$  3 次,加入发光液浸泡 NC 膜 5 min,暗室内压片,显影,定影,显现目的条带后及时以自来水冲洗终止反应。

**1.2.4 MTT 实验** 以  $1 \times 10^4$ /孔将细胞接种于 96 孔板中,每个实验组设 4 个复孔。继续培养 24 h,取 0.3  $\mu$ g/孔的 pCMV, pCMV-e23sFv-FDT-RC6 和 pCMV-e23sFv-RC6 分别溶于 50  $\mu$ L RPMI 1640 培养液,称为 A1, A2, A3 液;将 3 份 0.8  $\mu$ L/孔的 Lipofectamine2000™分别溶于 50  $\mu$ L RPMI 1640 培养液,室温孵育 2 min,为 B1, B2, B3 液。将 A1 和 B1, A2 和 B2, A3 和 B3 两液分别混合,室温孵育 20 min,缓缓滴加至 96 孔板中,培养 8 h 后吸弃转染液,加入 200  $\mu$ L 含 100 mL/L 小牛血清的无抗生素的 RPMI 1640 培养液,继续培养。分别于转染后 0, 24, 48, 72, 96 h,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 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  $\mu$ 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。

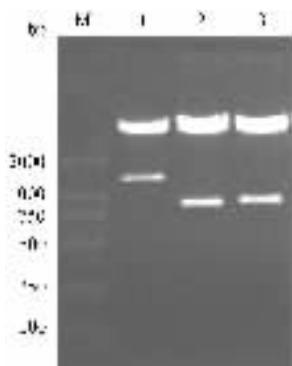
**1.2.5 间接免疫荧光染色** 制备细胞爬片,经转染 48 h 后,以 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 0.1 mL/L Triton X-100 处理 10 min。依次加入用 10 g/L BSA 1:500 稀释的兔抗人 Lamin A 多克隆抗体、羊抗兔-cy3 和 DAPI,以激光共聚焦显微镜观察并照相。

## 2 结果

**2.1 重组抗 HER2 ScFv/FDT/RC6 质粒的构建** 以 5 ng 的质粒 pCMV-e23sFv-PE II-RC6 为模板,用设计好的引物 w1, w2, w3 分别进行 PCR 扩增 FDT-RC6 和 RC6,以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,扩增出约 880 bp 和 850 bp 的片段,与预期理论值相符。胶回收目的片段,另取 1  $\mu$ g 的质粒 pCMV-e23sFv-PE II-RC6 用 *Not* I, *Xba* I 双酶切,回收约 6500 bp 左右的载体片段,用 T4 DNA ligase 连接两片段,连接产物转化、涂皿、过夜生长,挑取单克隆培养,质粒提取并以 *Not* I 和 *Xba* I 进行双酶切鉴定,切出了 880 bp 和 850 bp 左右的片段。经测序证实所构建的质粒正确,命名为 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 和 pCMV-e23sFv-RC6(图 1)。

### 2.2 重组蛋白在 SGC7901 和 HeLa 细胞中的表达

取新鲜接种的 SGC7901 和 HeLa 细胞,分别转染 pCMV 空载体, pCMV-e23sFv-RC6 和 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 36 h 后,Western Blot 检测细胞裂解液中目的蛋白的表达(一抗为兔抗人 active caspase-6 抗体,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG)。发现转染 pCMV-e23sFv-RC6 和 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 的 SGC7901 和 HeLa 细胞中均有目的蛋白的表达,分子质量约为  $6 \times 10^4$  ku(图 2)。



M DL2000 marker 1 pCMV-e23sFv-PE II-RC6 / Not I + Xba I 2 pCMV-e23sFv-RC6 / Not I + Xba I 3 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 / Not I + Xba I.

图1 重组质粒的酶切鉴定



1 :HeLa/ pCMV ; 2 :HeLa/ pCMV-e23sFv-FDT-RC6 ; 3 :HeLa/ pCMV-e23sFv-RC6 ; 4 :SGC7901/ pCMV ; 5 :SGC7901/ pCMV-e23sFv-FDT-RC6 ; 6 :SGC7901/pCMV-e23sFv-RC6.

图2 转染后重组蛋白的检测

2.3 重组蛋白对转染细胞增殖的影响 融合蛋白

e23sFv-RC6 和 e23sFv-FDT-RC6 的表达对 HER2 阴性 HeLa 细胞生长无影响. e23sFv-RC6 融合蛋白的表达对 HER2 阳性 SGC7901 细胞的生长无影响,而 e23sFv-FDT-RC6 融合蛋白的表达可以明显抑制该细胞的生长(图3).

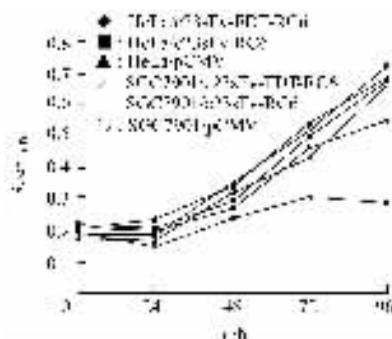


图3 重组基因转染 HeLa 细胞和 SGC7901 细胞后 MTT 测定曲线

2.4 重组蛋白对 SGC7901 细胞形态结构的影响  
转染 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 质粒的 SGC7901 细胞中部分细胞出现核固缩、核膜破裂等凋亡特征. 而转染 pCMV 空载体和 pCMV-e23sFv-RC6 质粒的细胞核膜完整 细胞形态正常(图4).

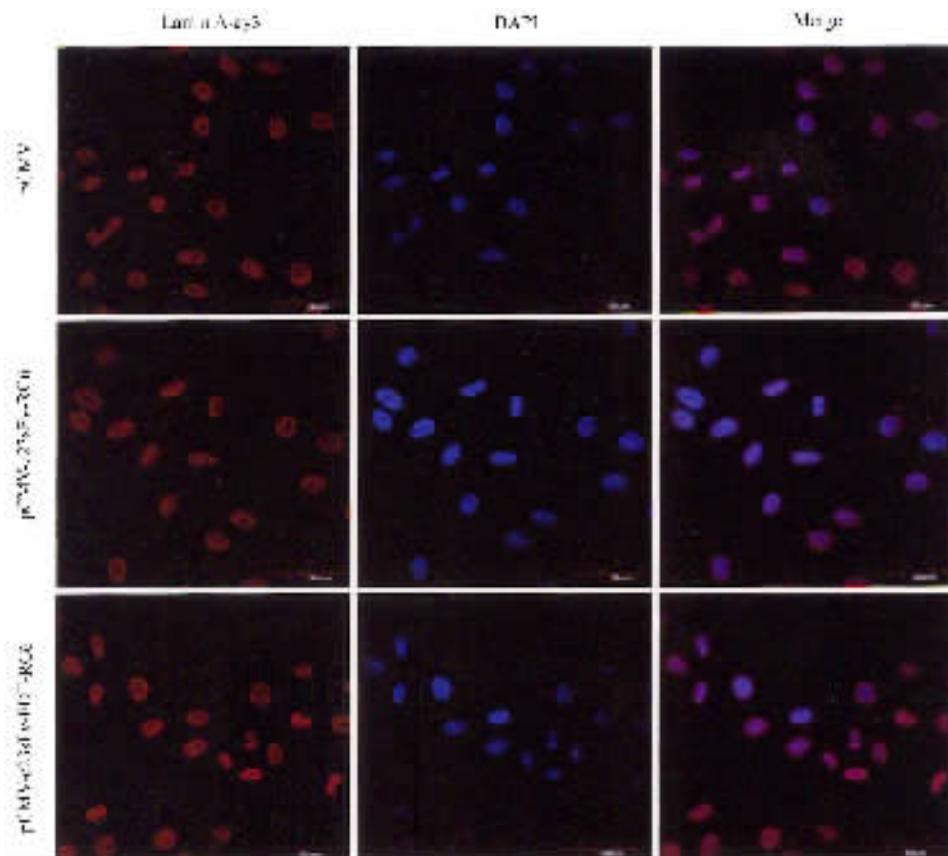


图4 转染后 SGC7901 细胞的间接免疫荧光染色 ×600

### 3 讨论

DT 是分子质量为  $5.48 \times 10^4$  ku 的外毒素,主要由毒性结构域 A 和受体结合的结合结构域 B 构成。A/B 两个结构域之间有 Furin 的酶切位点连接。毒素与受体结合后,经过胞吞作用内化入细胞形成内吞体,在内吞体内将 AB 切开,然后具有细胞毒作用的 A 结构域进入胞质,对细胞进行杀伤<sup>[8]</sup>。Furin 对各种毒素的切割效率差别很大,其对于 DT 的切割效率要比对绿脓杆菌外毒素(Pseudomonas exotoxin A, PE)高出 1 倍,且其切割不需要酸性环境<sup>[9-10]</sup>。Lamin 蛋白是构成细胞核核膜的主要成分之一,它对于维持正常细胞的功能有着重要意义。Lamin A 的切割可作为 caspase-6 活性检测的标志。

本室已经构建的以 HER2 为靶向的免疫促凋亡分子是由肿瘤表面抗原 HER2 的特异性单链抗体、PE 转膜结构域(253 ~ 364 氨基酸)及促凋亡分子 caspase-6 组成<sup>[11]</sup>。我们用 DT 中 Furin 识别序列的 10 个氨基酸组成的短肽替换 PE 转膜结构域(253 ~ 364 氨基酸),以 pCMV 空载体和不含 Furin 识别序列的 RC6 为阴性对照。将构建的重组分子转染 HER2 阳性 SGC7901 胃癌细胞,Western Blot 可以检测到转染 36 h 后目的蛋白的表达。MTT 法测定并绘制生长曲线,可以观察到重组蛋白的分泌表达对于 HER2 阴性 HeLa 细胞的增殖没有明显影响。对于 HER2 阳性 SGC7901 细胞,分泌表达的重组蛋白 e23sFv-FDT-RC6 可以靶向与 SGC7901 细胞结合并被内吞入细胞,在内吞体内 Furin 切割重组蛋白后免疫促凋亡分子 RC6 转位至细胞质,诱导细胞的凋亡。而无 Furin 识别序列的融合蛋白 e23sFv-RC6 则对细胞的生长增殖没有明显影响。通过间接免疫荧光染色观察到表达 e23sFv-FDT-RC6 融合蛋白的细胞部分出现细胞核的固缩等典型的凋亡特征。而对照组细胞形态及细胞核无明显变化,说明我们构建的 pCMV-e23sFv-FDT-RC6 具有促进 HER2 阳性 SGC7901 细胞凋亡的作用。相对于 pCMV-e23sFv-PE II-RC6, pCMV-

e23sFv-FDT-RC6 的转位结构域是由 10 个氨基酸组成,从而很大程度上降低了免疫促凋亡分子的分子量及免疫原性,为今后的临床应用提供了实验依据。

### 【参考文献】

- [1] Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(20):10964 - 10967.
- [2] Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(11):1028 - 1042.
- [3] Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis [J]. J Biol Chem, 2001, 276(10):7320 - 7326.
- [4] Srinivasula SM, Ahmad M, MacFarlane M, et al. Generation of constitutively active recombinant caspase-3 and -6 by rearrangement of their subunits [J]. J Biol Chem, 1998, 273(17):10107 - 10111.
- [5] Ruchaud S, Korfali N, Villa P, et al. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation [J]. EMBO J, 2002, 21(8):1967 - 1977.
- [6] Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001, 6(4):393 - 406.
- [7] Menard S, Fortis S, Castiglioni F, et al. HER2 as a prognostic factor in breast cancer [J]. Oncology, 2001, 61:67 - 72.
- [8] Schiavo G, Van der Goot FG. The bacterial toxin toolkit [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(7):530 - 537.
- [9] Thomas G. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(10):753 - 766.
- [10] Siegall CB, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, et al. Functional analysis of domains II, Ib, and III of Pseudomonas exotoxin [J]. J Biol Chem, 1989, 264(24):14256 - 14261.
- [11] 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.

编辑 王 睿