

文章编号:1000-5404(2013)18-1921-07

论著

VEGF受体单抗与Luffin双靶融合毒素的构建及其对非小细胞肺癌细胞的抑制作用

项颖¹, 黄德鸿¹, 唐显军¹, 王莉¹, 张曼¹, 张文军¹, 杨涛¹, 肖春燕¹, 王江红² (400030 重庆, 重庆市肿瘤研究所: 生物治疗、血液肿瘤科¹, 内镜诊疗中心²)

[摘要] 目的 构建含血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体单链抗体(KDRscFv)、尿激酶纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)裂解位点(uPAcs)、丝瓜毒素(luffin- β)与KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu)内质网滞留信号序列的双靶向融合毒素,并探讨其对非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)细胞的抑制作用。方法 全基因合成KDRscFv基因,RT-PCR法克隆luffin- β ,重叠PCR法将两基因融合,其连接部位与C端分别引入uPA裂解位点uPAcs与KDEL,形成融合基因KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL。将该融合基因克隆至原核表达载体pET-32a(+)中,转入大肠杆菌后,诱导其表达融合毒素蛋白Trx-EK-KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL(TEKPLK)并纯化TEKPLK。用肠激酶(enterokinase, EK)切割TEKPLK后,纯化与回收靶向融合毒素KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL(KPLK)。采用CCK-8(cell counting kit-8)、RT-PCR、Western blot等方法,体外检测靶向融合毒素KPLK经uPA酶裂解后释放Luffin- β 对NSCLC细胞的抑制作用。结果 成功诱导重组载体pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL表达相对分子质量约 7.5×10^4 含载体表达标签(Trx)的融合毒素蛋白TEKPLK, EK酶切该蛋白获得相对分子质量约 5.8×10^4 的靶向融合免疫毒素KPLK。CCK-8法检测表明, KPLK毒素的杀瘤活性成剂量-效应关系,其 IC_{50} 约为35 ng/mL; RT-PCR和Western blot检测结果显示, KPLK经uPA酶体外裂解后能释放细胞毒素小分子Luffin- β ,上调瘤细胞促凋亡基因caspase-3及其蛋白的表达。结论 成功构建了KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL融合基因及其原核表达载体,并获得相对分子质量约 5.8×10^4 的靶向融合毒素KPLK,该毒素经uPA酶体外裂解后能释放具杀瘤活性的Luffin- β 毒素小分子。

[关键词] KDRscFv; Luffin- β ; 尿激酶纤溶酶原激活剂; 重组融合毒素; 杀瘤活性

[中图分类号] R394.33; R73.362; R734.2

[文献标志码] A

Construction of double-targeting fused immunotoxin KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL and its cytotoxic effect on non-small-cell lung carcinoma cells

Xiang Ying¹, Huang Dehong¹, Tang Xianjun¹, Wang Li¹, Zhang Man¹, Zhang Wenjun¹, Yang Tao¹, Xiao Chunyan¹, Wang Jianghong² (¹Department of Biotherapy & Hematology, ²Center of Endoscopic Diagnosis & Treatment, Chongqing Cancer Institute, Chongqing, 400030, China)

[Abstract] **Objective** To construct a double-targeting fused immunotoxin KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL that containing a single-chain variable fragment (scFv) against vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor KDR, urokinase plasminogen activator(uPA) cleavage site (uPAcs), tandemly ligated luffin- β and KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu), which is a signal for retention of proteins in the endoplasmic reticulum, and to investigate its cytotoxic effect on non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cell line. **Methods** The complete sequence of KDR scFv gene was synthesized. And luffin- β gene was cloned through reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). KDR scFv gene was fused together with luffin- β gene by overlaying PCR. The uPAcs sequence was placed the linking position between KDRscFv and luffin- β gene, and the KDEL sequence was fused at the C-terminal of luffin- β gene. In doing so, the fused gene KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL was constructed and cloned into pET-32a(+) vector to form recombinant vector pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL. Subsequently, the recombinant vector pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL was transfected into *E. coli* BL21, and the fusion protein Trx-EK-KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL(TEKPLK) was expressed under induction, and then purified and digested through enterokinase (EK) to produce double-

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2011AC5188)

[通信作者] 王江红, E-mail: win16@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0903.016.html>(2013-04-25)

targeting fused immunotoxin KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL (KPLK). Cell count kit-8 (CCK-8), RT-PCR and Western blotting were employed to test the cytotoxic effect of KPLK cleaved by uPA for setting free immunotoxin luffin- β on H460 cells. **Results** After induction, recombinant vector pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL expressed the fusion protein TEKPLK, which contained the Trx tag of vector pET-32a(+), and its relative molecular mass was about 7.5×10^4 . The immunotoxin protein KPLK, with its relative molecular mass of about 5.8×10^4 , was produced by digesting fusion protein TEKPLK with EK. The results of CCK-8 revealed that immunotoxin KPLK exerted cytotoxic effect on H460 cells in a dose-effect manner. Its IC_{50} of anti-tumor was about 35 ng/mL. RT-PCR and Western blotting certified that immunotoxin luffin- β , which could upregulate the expression of caspase-3 gene and its protein in the tumor cells, was released from KPLK protein cleaved by uPA *in vitro*. **Conclusion** Fused gene KDRscFv-uPAcs-luffin- β -KDEL and its prokaryotic express vector are successfully constructed. Recombinant fusion immunotoxin KPLK (relative molecular mass about 5.8×10^4) is successfully prepared. The immunotoxin luffin- β , possessing cytotoxic effect on tumor cells, can be released from KPLK protein cleaved by uPA *in vitro*.

[**Key words**] KDRscFv; Luffin- β ; uPAcs; Recombinant fusion immunotoxin; cytotoxic effect on tumor cells

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Research of Chongqing (CSTC2011AC5188). Corresponding author: Wang Jianghong, E-mail: win16@sina.com

近年来,肿瘤的生物治疗因其高效、低毒、目标明确,成为继手术、放疗与化疗后的又一重要治疗手段。生物毒素是其重要内容之一,但因生物毒素不能特异性作用于靶细胞,而限制了其在临床的应用。既往研究者将特异性抗体与生物毒素分子偶联,或利用瘤细胞高表达特定蛋白或相应配体作靶标以研制重组免疫毒素,但因偶联分子的分子量增大,且其靶标仅有单一的靶分子,致其应用效果不够理想。因此,重组免疫毒素如何更好地发挥肿瘤靶向治疗作用与更强的肿瘤杀伤活性是该领域的重要研究工作之一^[1]。

丝瓜籽蛋白 Luffin 是存在于丝瓜籽中的一类单链核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs),其具有抗病毒活性,能抑制蛋白质的生物合成,是近年来备受关注的新型强效免疫毒素弹头小分子,具有较强的抗癌活性^[2-4]。尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)是一相对分子质量约 4.85×10^4 的糖蛋白。几乎所有的肿瘤组织细胞均高表达 uPA,而正常组织细胞中其表达极低。uPA 与肿瘤的生长、浸润与转移等的关系甚是密切,是很具吸引力的肿瘤标志物及重要的肿瘤治疗靶标^[5-8]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是调节肿瘤血管新生的重要因子。可通过阻断 VEGF 与其受体的相互作用,抑制肿瘤血管的新生,以抑制肿瘤的生长。KDR 是较为明确的 VEGF 受体之一,在微管形成中发挥重要的作用^[9]。

本实验拟构建含血管内皮生长因子受体单链抗体(KDRscFv)、uPA 裂解位点(uPAcs)与 KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu)驻留信号序列的丝瓜毒素分子 Luffin- β 的融

合基因表达载体,将该表达载体转化大肠埃希菌,诱导其表达融合毒素蛋白,酶切并纯化该蛋白,获得双靶毒素。该双靶毒素经 uPA 体外裂解后释放 Luffin- β 毒素小分子,体外检测其抗非小细胞肺癌细胞的活性,为今后药物治疗肿瘤的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pTA2、RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶、质粒抽提试剂盒、 T_4 DNA 连接酶及 Cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂盒等购自日本 Toyobo 公司;表达载体 pET-32a(+)、肠激酶(enterokinase, EK)购自上海捷瑞生物技术有限公司;蛋白纯化 Ni 柱及填料等购自美国 GE 公司;基因合成与测序由上海捷瑞生物技术有限公司完成;人非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞株购自中国科学院上海细胞所。

1.2 方法

1.2.1 pTA2/KDRscFv 重组载体的构建和鉴定 全基因合成 KDRscFv,合成时将其克隆入 pTA2 载体中,经酶切与测序鉴定,正确者命名为 pTA2/KDRscFv 载体。

1.2.2 pTA2/Luffin- β 重组载体的构建和鉴定 设计扩增 Luffin- β 基因引物,上游引物:5'-ATGAACAGATTCACATTTCTCTCT-3';下游引物:5'-GTGTTTTGTAGGAATACCATCGTCAA-3'。以植物丝瓜籽总 RNA 为模板,RT-PCR 法进行 Luffin- β 基因的全长编码序列扩增,并克隆入载体 pTA2,以酶切与测序进行鉴定,正确者命名为载体 pTA2/Luffin- β 。

1.2.3 重组 pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL 融合免疫毒素载体的构建与鉴定 设计构建 KDRscFv-uPAcs-Luffin- β -KDEL 融合基因引物,引物中引入 *Nco* I, *Hind* III 酶切位点及 KDEL 驻留信号序列,构建策略为(从 N 端至 C 端):*Nco*I \rightarrow KDRscfv \rightarrow SGRSA \rightarrow G4SG4 \rightarrow Luffin β \rightarrow KDEL \rightarrow *Hind* III, 具体如下。

P1: 5'-ACTTACCATGGCTCAGGTCCAACCTGCAAGAGAGTG-
GCCCAG-3'; P2: 5'-AGAGAGAAATGTGAATCTGTTCAT GCCAC
CGCCACCCGAGCCACCGCCACC TGCTGATCGTCCGCTCCGTTT-
GAT-3'; P3: 5'-atcaaacggAGCGGACGATCAGCAgggtggcggtgctcggg-
tggcggtggcatgaacagattcacatttctct-3'; P4: 5'-ACTTAAAGCTTTTA-
TAGCTCATCTTTGTGTTTTGTAGGAATACCATCGTCAA-3'。P1 中
ACTTA 为保护碱基, CCATGG 为 *Nco* I 酶切位点, CT 为人为加
入碱基(防止移码突变); P2 中 GCCACCGCCACCCGAGCCAC-
CGCCACC 为 linker 序列, TGCTGATCGTCCGCT 为 (AGCG-
GACGATCAGCA 的反向互补序列) 编码 uPA 切割位点; P3 中
AGCGGACGATCAGCA 编码 uPA 切割位点 (SGRSA), ggtggcggtg-
gctcgggtggcggtggc 编码 G4SG4; P4 中 AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位
点, TTA 为终止密码子, TAGCTCATCTTT 编码 KDEL 驻留信号
序列。

以 pTA2/KDRscfv 重组载体为模板, 用 P1 + P2 扩增 *Nco*I →
KDRscfv → SGRSA → G4SG4。也就是在 KDRscfv 的 C 端引入编
码 uPA 切割位点 (SGRSA) 的序列 TGCTGATCGTCCGCT 与 lin-
ker 序列 ggtggcggtgctcgggtggcggtggc (G4SG4)。以 pTA2/Luffin-β
重组载体为模板, 用 P3 + P4 扩增 G4SG4 → Luffinβ → KDEL →
Hind III。用这两种 PCR 产物为模板, 用 P1 + P2 + P3 + P4 扩增
KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 融合基因, 随后将此融合基因亚
克隆入载体 pET-32a(+) 中, 采用酶切与测序鉴定, 正确者命
名为表达载体 pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL。

1.2.4 融合免疫毒素的诱导表达与纯化 将测序正确的重
组载体 pET-32a(+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 转化至感
受态的大肠埃希菌 BL21 (DE3), 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
(Isopropyl-β-D-Thiogalactoside, IPTG) 诱导其表达融合免疫毒素
Trx-EK-KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL (TEKPLK)。SDS-PAGE
检 TEKPLK 的表达情况。

大量诱导表达菌, 超声破菌收集包涵体, 用 Binding Buffer
(20 mmol/L 磷酸钠, 0.5 mol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH = 7.4)
溶解包涵体后加入复性液 (0.05 mol/L Tris-HCl, pH = 8.5、
1 mmol/L EDTA、1 mmol/L 还原型胱苷谷肽、0.1 mmol/L 氧化
型胱苷谷肽、0.5 mol/L L-精氨酸、0.15 mol/L NaCl)。将溶解
后离心去除沉淀的蛋白液与复性液按 1:1 混合, 4 °C 放置 2 h 后
装入透析袋, 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH = 9.0) 进行 4 °C 透
析复性, 其间换液 4 次。

用 Q F. F 纯化填料装阴离子交换柱后, Elution Buffer
(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, pH = 9.0) 洗净柱。将复性
后的蛋白离心去除沉淀并过滤后上样, 上样结束后, 50 mmol/L
的 Tris-HCl (pH 9.0) 平衡柱, 3%、10%、20%、50% 及 100% 的
Elution Buffer 洗脱蛋白, 收集洗脱蛋白行电泳鉴定。

将 Ni²⁺ 填料装入金属螯合柱, 经 Binding buffer (20 mmol/L
磷酸钠, 0.5 mol/L NaCl, pH = 7.4) 平衡后, 将经 Q F. F 纯化穿
透的蛋白加入终浓度为 0.5 mol/L NaCl 后上样并收集穿透液,
Binding Buffer 复平衡, Elution Buffer 洗脱并收集, 取样行 SDS-
PAGE 蛋白电泳检测。

1.2.4 融合免疫毒素 TEKPLK 的酶切与纯度检测 向融合
免疫毒素 TEKPLK 溶液中加入适量肠激酶 (enterokinase, EK),
过夜酶切, 留取 1 ~ 2 mL 未酶切蛋白作对照用, SDS-PAGE 检测

酶切情况。酶切后的融合免疫毒素用 Pharmacia HiTrap SP Fast
Flow column (26/20) 阳离子交换柱洗脱并纯化, 获得靶向融合
免疫毒素 KPLK。KPLK 再经 SDS-PAGE 检测后, 行高效液相色谱
(high performance liquid chromatogram, HPLC) 检测, 色谱柱
参数 discovery (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 归一法计算 KPLK
纯度。

1.2.5 融合毒素 KPLK 经 uPA 体外裂解的杀瘤 IC₅₀ 检测
将 H460 细胞接种于 96 孔板, 每孔的 150 μL 完全培养基内含
3 000 个细胞, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度培养 48 h 后, 添加不同
浓度 (25、50、100、200 ng/mL) 的 KPLK 与适量的 uPA, 分别以仅
加 KPLK、uPA 酶及不处理的细胞作对照, 48 h 后, 加入 CCK-8
试剂, 相同条件下继续培养 4 h, 酶标仪测定 450 nm 波长处光
密度值 *D*(450), 并计算其 IC₅₀。

1.2.6 融合毒素 KPLK 对非小细胞肺癌细胞生长的影响-增殖
曲线绘制 将 H460 细胞接种至 96 孔板, 每孔的 150 μL 完
全培养基内含 3 000 个细胞, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度培养
24 h 后, 分别在一孔中同时加入 KPLK (100 ng/mL) 与 uPA 酶
(200 ng/mL), 另一孔中同时加入 KPLK (100 ng/mL) 与 PAI-1
(uPA 酶抑制剂, 100 ng/mL, Pepprotech, USA); 分别以单纯的
KPLK (100 ng/mL)、单纯的 uPA 酶 (200 ng/mL)、单纯的 PAI-1
(100 ng/mL) 作用的 H460 细胞作对照及未处理的 H460 细胞
作空白对照, 单纯培养液为空白对照, 分别于 1、2、3、4 d 取出
96 孔板, 拍照后, 每孔加换新鲜培养基与 CCK-8 (10 μL/孔), 相
同条件下继续培养 4 h, 振荡 30 s 混匀, 酶标仪测定 450 nm 波
长处光密度值 [*D*(450)], 以光密度值为 Y 轴, 时间为 X 轴绘制
增殖曲线。该实验重复 3 次。

1.2.7 KPLK 对 H460 细胞促凋亡基因 caspase-3 表达的影响
分别根据人 caspase-3 与 GAPDH 基因序列, 设计其特异性
扩增引物。caspase-3 上游: 5'-TCCTGAGATGGGTTTATGTA-3',
下游: 5'-TCTTTAGAAACATCAGCATCA-3'; GAPDH 上游: 5'-
AGGGCTGCTTTAACTCTGGTA-3', 下游: 5'-GCTGATGATCTT-
GAGGCTGT-3'。采用 RT-PCR 法, 以 KPLK (50 ng/mL) 与 uPA
酶 (100 ng/mL) 作用的 H460 细胞的总 RNA 为模板检测
caspase-3 基因的表达情况, 分别以单纯 KPLK (50 ng/mL)、单
纯 uPA 酶 (100 ng/mL) 作用的 H460 细胞及未处理的 H460 细
胞的相同检测作对照, 同时检测的 GAPDH 基因作内参。反转
录 (RT) 反应条件: 30 °C 反应 10 min 与 42 °C 反应 30 min 合成
第 1 链 cDNA; 99 °C 反应 5 min 以灭活逆转录酶; 5 °C 冷却
5 min, 1 个循环。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变
性 45 s, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C
延伸 10 min。反应结束后取 PCR 反应液 (5 ~ 10 μL) 行电泳检
测, GoldView™ 染色确认 PCR 产物。

1.2.8 KPLK 对 H460 细胞促凋亡蛋白 caspase-3 表达的影响
采用 Western blot 技术, 分别将 1.2.7 的各組细胞总蛋白
转移至硝酸纤维素膜, 浸泡于含 caspase-3 兔多抗 (1:500) 封闭液
中, 4 °C 过夜孵育, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗
(1:300), 室温孵育 1 h, 25 °C, 与化学发光底物结合 5 ~ 10 min,
保存图片。β-actin (43 × 10³) 作内参。

1.3 统计学分析

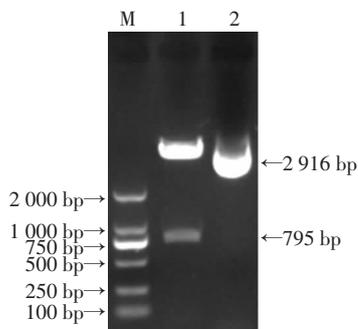
采用 SPSS 11.0 统计软件。组间差异行多因素方差分析,

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 pTA2/KDRscFv 重组载体的构建和鉴定

全基因合成 KDRscFv 并克隆入 pTA2 载体中形成重组载体 pTA2/KDRscFv, 经 *Bam*H I 与 *Xho* I 酶切, 电泳分别显示 2 916 bp 的 pTA2 骨架片段与 795 bp 含 729 bp (KDRscFv) 的目的片段(图 1)。测序证实, 所合成的 KDRscFv 完全正确。

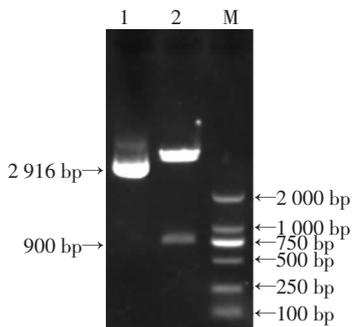


M: DNA 标准 (DL 2 000); 1: pTA2/KDRscFv; 2: *Bam*H I 与 *Xho* I 酶切 pTA2/KDRscFv

图 1 重组 pTA2/KDRscFv 载体的酶切分析

2.2 pTA2/Luffin-β 载体的构建与鉴定

重组 pTA2/Luffin-β 经 *Bam*H I 与 *Xho* I 酶切, 电泳分别显示 2 916 bp 的 pTA2 骨架片段与 900 bp 含 834 bp (Luffin-β) 的目的片段(图 2)。测序证实, 所克隆到的 Luffin-β 与 GenBank 发布的序列完全一致。



1: pTA2/Luffin-β; 2: *Bam*H I 与 *Xho* I 酶切 pTA2/Luffin-β; M: DNA 标准 (DL 2 000)

图 2 重组 pTA2/Luffin-β 载体的酶切分析

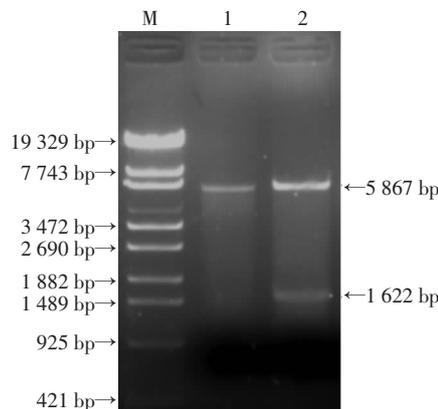
2.3 重组 pET-32a (+)/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 融合免疫毒素载体的构建与鉴定

重组载体 pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 经 *Nco* I 与 *Hind* III 酶切, 电泳检测(图 3)显示 5 867 bp 的 pET-32a 骨架片段和 1 622 bp 的 KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 目的片段, 测序结果显示重组载体 pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 得以成功构建。

2.4 融合毒素 TEKPLK 的诱导表达与纯化

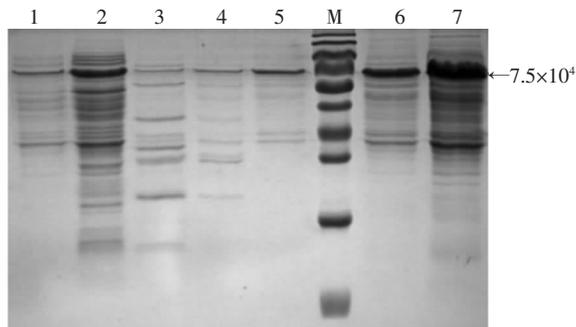
pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 转化表达菌, IPTG 诱导, 表达产物经 SDS-PAGE 检测, 在相对分子质量约 $7.5 \times$

10^4 处有融合蛋白带(融合毒素 TEKPLK)显现, 表达量约 30%。金属螯合 Ni^{2+} 柱纯化 TEKPLK, 并分别用 3%、10%、20%、50% 和 100% Elution Buffer 洗脱(图 4)。



M: DNA 标准; 1: pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL; 2: *Nco* I 与 *Hind* III 酶切 pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL

图 3 重组 pET-32a/KDRscFv-uPAcs-Luffin-β-KDEL 载体的酶切分析

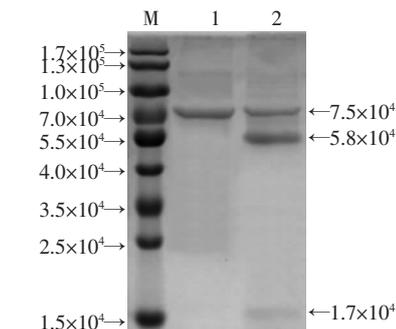


1: 100% 洗脱液; 2: 50% 洗脱液; 3: 20% 洗脱液; 4: 10% 洗脱液; 5: 3% 洗脱液; 6: 穿透液; 7: 上样液; M: 蛋白标准

图 4 融合毒素 TEKPLK 的诱导表达与纯化

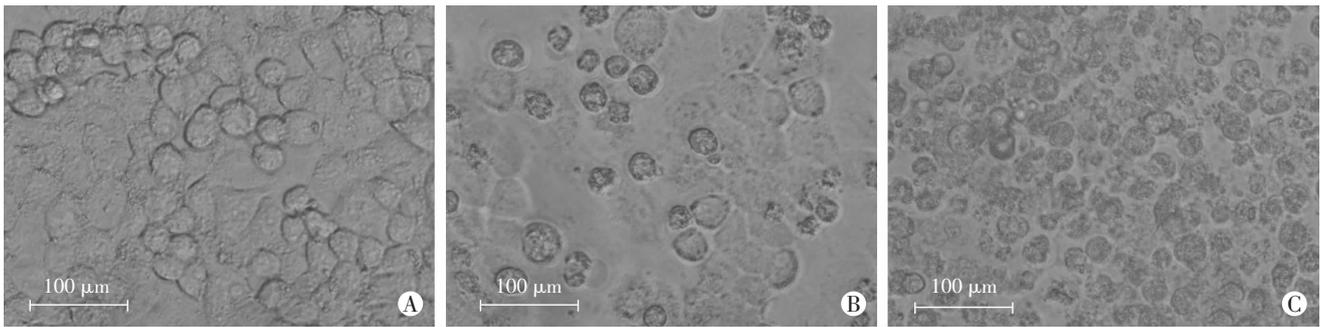
2.5 融合毒素 TEKPLK 的酶切、纯化与纯度检测

融合蛋白经 EK 酶过夜酶切, 分别切下相对分子质量约为 5.8×10^4 的融合毒素 KPLK 与相对分子质量 1.7×10^4 的 Trx-标签蛋白(图 5)。酶切后的蛋白再经金属螯合 Ni^{2+} 柱纯化, 获得 KPLK 目的蛋白, 该目的蛋白 KPLK 经 HPLC 分析, 其纯度达 99%。



M: 蛋白标准; 1: TEKPLK; 2: EK 酶切 TEKPLK

图 5 融合毒素 TEKPLK 的酶切分析



A: 正常人肺癌 NCI-H460 细胞; B: 25 ng/mL 的 KPLK 毒素; C: 100 ng/mL 的 KPLK 毒素

图6 KPLK 毒素经 uPA 体外裂解的杀瘤活性检测

2.6 融合毒素 KPLK 经 uPA 体外裂解的杀瘤效应观测

用倒置显微镜观察发现,与正常人肺癌 NCI-H460 细胞(图 6A)比较,25 ng/mL 的 KPLK 毒素经 50 ng/mL 的 uPA 酶体外裂解 48 h,少部分细胞贴壁能力降低,少部分细胞死亡(图 6B),而 100 ng/mL 的 KPLK 毒素经 200 ng/mL 的 uPA 酶体外裂解相同的时间后,大部分细胞贴壁能力降低、胞体变圆,大部分细胞死亡、崩裂(图 6C)。可见,KPLK 毒素经 uPA 酶体外裂解可释放具杀瘤活性的免疫毒素 Luffin-β 小分子,且其杀瘤活性呈明显的剂量-效应关系,其 IC₅₀ 为 35 ng/mL(表 1)。

表 1 KPLK 免疫毒素对 H460 细胞增殖的抑制作用

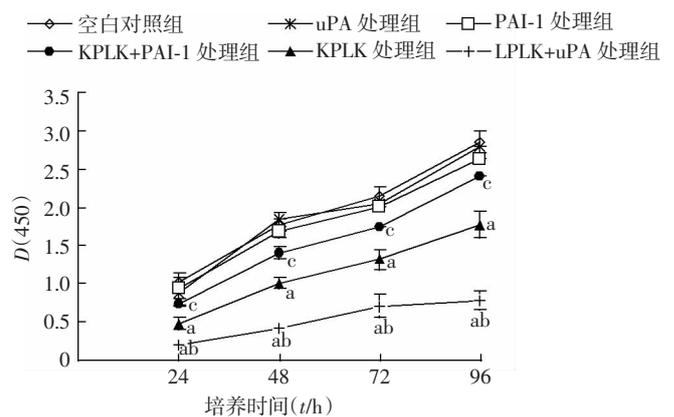
KPLK + uPA (ng/mL)	D(450) (n = 3, $\bar{x} \pm s$)	增殖率 (%)	抑制率 (%)
25 + 50	1.497 3 ± 0.301 2	78.92	21.08
50 + 100	0.340 7 ± 0.068 1	17.96	82.04
100 + 200	0.131 3 ± 0.023 6	6.92	93.08
200 + 400	0.051 3 ± 0.009 5	2.71	97.29

2.7 融合毒素 KPLK 对非小细胞肺癌细胞生长的影响

CCK-8 法检测表明,单纯的 KPLK 毒素及 KPLK 毒素与 PAI-1 共同作用均可抑制人肺癌 H460 细胞的生长、增殖,但后者弱于前者。KPLK 毒素经 uPA 酶体外完全裂解后对 H460 细胞生长、增殖的抑制作用最为明显($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见图 7。三者的杀瘤强弱依次为:KPLK + uPA > KPLK > KPLK + PAI-1。可见,KPLK 毒素可经 uPA 酶体外裂解释放具抑瘤活性的 Luffin-β 分子以杀伤肿瘤细胞。

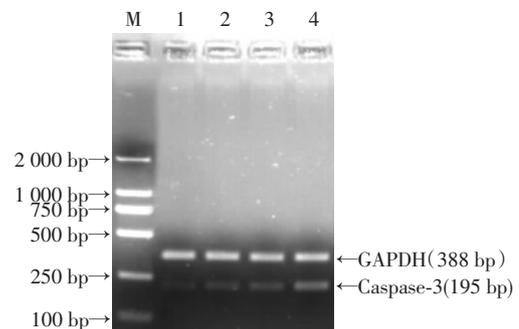
2.8 KPLK 对 H460 细胞促凋亡基因 caspase-3 表达的影响

RT-PCR 检测表明,以 KPLK 与 uPA 酶作用的 H460 细胞总 RNA 为模板能检测到 caspase-3 基因的较强表达,以单纯 KPLK 作用的 H460 细胞总 RNA 为模板能检测到 caspase-3 基因的较弱表达,单纯 uPA 酶作用的 H460 细胞及单纯 H460 细胞总 RNA 为模板所检测到的 caspase-3 基因的表达最弱(图 8)。提示 KPLK 可致 H460 细胞凋亡。



a: $P < 0.01$, 与各对照组比较; b: $P < 0.05$, 与 KPLK 处理组比较; c: $P < 0.05$, 与 uPA、PAI-1 处理组及未处理组比较

图 7 CCK-8 法检测 KPLK 对 H460 细胞增殖的影响



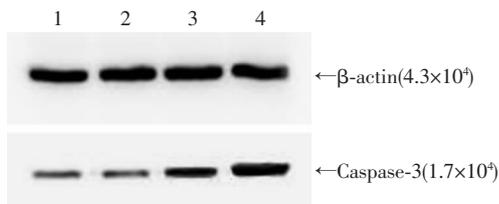
M: DNA 标准(DL 2000); 1: 空白对照组; 2: uPA 处理组; 3: KPLK 处理组; 4: KPLK + uPA 处理组

图 8 RT-PCR 检测融合毒素 KPLK 对 H460 细胞 caspase-3 基因 mRNA 表达的影响

2.9 KPLK 对 H460 细胞促凋亡蛋白 caspase-3 表达的影响

Western blot 结果显示,融合免疫毒素 KPLK 与 uPA 酶作用的 H460 细胞检测在约 17×10^3 处出现较强 caspase-3 抗原染色条带,单纯融合免疫毒素 KPLK 作用的 H460 细胞在相同位置出现该条带则较弱,单纯 uPA 酶作用的 H460 细胞及单纯 H460 细胞在相同位置出现该条带则最弱(图 9),提示融合免疫毒素

KPLK 可致 H460 细胞凋亡。



1:空白对照组;2:uPA 处理组;3:KPLK 处理组;4:KPLK + uPA 处理组

图9 Western blot 检测融合免疫毒素 KPLK 对 H460 细胞 caspase-3 蛋白表达的影响

3 讨论

免疫毒素是以植物毒素或细菌毒素为毒性分子,以抗体或细胞因子为导向分子的一类蛋白,是一种新型的抗肿瘤导向性药物。既往研究者通过采用细胞因子、生长因子或抗体替代细菌或植物毒素蛋白的受体识别结构域的方法研究出了许多具有选择性杀伤肿瘤细胞的融合免疫毒素^[10],如白喉免疫毒素、假单胞菌外免疫毒素 A 及蓖麻免疫毒素等,这些融合毒素均显示了其肿瘤杀伤效应,并已被批准用于临床。但由于这些免疫毒素的特异性毒性不够强,致使其对正常的旁观者细胞也有副作用,即便是微量的摄入也会导致正常细胞组织的严重损伤。因此,增强融合免疫毒素的特异性(靶向性)杀瘤效应显得尤为重要。

核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs)是一类可使真核细胞核糖体失活而抑制蛋白质合成的植物毒素蛋白^[2-4],能专一水解真核细胞核糖体 28S RNA 中一保守的腺苷酸的 N-C 糖苷键,释放一腺嘌呤碱基使核糖体失活。因其具抗病毒活性和对蛋白质生物合成具有抑制作用而备受关注。Luffin- β 属目前单链 RIPs 中活性最高者之一。

uPA 是一相对分子质量约 4.85×10^4 ,含 431 个氨基酸残基的丝氨酸蛋白水解酶。自 1976 年发现癌细胞表达和分泌 uPA 以来,大量研究^[5-8]证实,uPA 明显高表达于几乎所有的肿瘤,而正常组织的表达却极低,uPA 系统与肿瘤的生长、浸润与转移密切相关。一些肿瘤相关的因子,如反义寡核苷酸、抗体、抑制剂及 uPA 的重组体或类似物等被作为靶标,用以干扰 uPA 在肿瘤的表达或阻断 uPA 的活性,以阻抑肿瘤的浸润与转移。然而,这些手段由于缺乏对肿瘤细胞的直接(靶向)杀伤作用,而仅能减慢肿瘤的进展^[11-13]。本实验的目的在于利用 uPA 的靶向作用,让带 uPA 裂解位点的重组 KDRscFv/Luffin- β 融合毒素到达高表达 uPA 的肿瘤局部,其将被裂解而释放具抗肿瘤血管新

生的 KDRscFv 与具杀瘤活性的 Luffin- β 毒素分子,发挥其直接抑瘤效应,以弥补既往的融合免疫毒素缺乏良好特异性(靶向性)抑瘤效应的不足。

采用一段适当的核苷酸序列将不同的目的基因进行连接,使其在适当的生物体内表达一单一肽链,此核苷酸序列称接头序列(Linker)。融合蛋白中的被连接成分能否分别形成正确的空间结构、更好的发挥生物学活性,与 Linker 密切相关。重组生成的融合蛋白要求插入融合蛋白中的 linker 不影响目的蛋白各自的功能。因此,Linker 设计与选择是基因融合能否成功的关键之一。我们采用 Linker 序列 GGTGGCGGTG-GCTCGGTTGGCGGTGGC 连接 uPA 裂解位点(uPacs)序列 SGRSA 与 Luffin- β 以构建融合基因,研制了与预期大小一致的毒素蛋白。本实验结果显示,该毒素蛋白能有效抑制肺癌细胞的生长、增殖,促使其凋亡,可见,我们采用了正确的 Linker 序列。

目前,RIPs 在细胞内如何转运尚不清楚,但一些细菌来源的毒素分子如假单胞菌外毒素与白喉毒素的转运已得到较好的诠释,毒素内吞入胞后,主要经逆向分泌途径有序的转运,先入吞噬体,后沿内体、高尔基体、内质网,最后转位于胞浆发挥胞毒作用^[14],在此过程中,最为关键的是从高尔基体向内质网的转运,此环节具多条途径,目前认为最经典的是依赖外壳蛋白 I (coat protein I, COPI)的途径。COPI 是一存在于高尔基体膜上的高分子复合蛋白,负责转运含 KDEL 序列或类似 KDEL 序列的毒素蛋白,由高尔基体逆向转运至内质网^[14-15]。KDEL 是一段内质网驻留信号肽序列,高尔基体膜上有其相应受体,一旦入高尔基体,则与其受体结合,形成回流水泡被运回内质网(ER)。据此,已有研究者在某些 RIP(如蓖麻毒素 A 链)分子 C 端加上 KDEL,发现可增强其细胞毒性。我们在融合毒素 KPLK 的构建设计时,在 Luffin- β 分子的 C 端也引入了 KDEL 序列。

为增强融合免疫毒素的抑瘤靶向性与抑瘤活性,我们在 KDRscFv 与 Luffin- β 间引入 uPA 裂解位点(uPacs)序列 SGRSA(uPA 酶的最佳底物序列^[16])。在 Luffin- β 的 C 端引入 KDEL 驻留信号肽序列,成功构建了融合基因 KDRscFv-uPacs-Luffin- β -KDEL,并获得该融合基因表达的相对分子质量约 5.8×10^4 的靶向融合免疫毒素 KDRscFv-uPacs-Luffin- β -KDEL(KPLK),在体外,uPA 酶能裂解 KPLK 内的靶肽 SGRSA,使其释放 KDRscFv 与 Luffin- β 以发挥抑瘤效应。此融合毒素设计的目的在于利用 KDRscFv 与

uPA 的双重靶向作用,将融合毒素携带至高血管密度与高表达 uPA 的肿瘤组织局部,经瘤细胞高表达的 uPA 的切割,释放具抗肿瘤血管新生的 KDRscFv 与具杀瘤活性的小分子毒素 Luffin- β ,利于瘤细胞摄取,以发挥其对肿瘤的抑制效应。利用 KDEL 之目的在于,一方面是为了增强 Luffin- β 的杀瘤毒性,另一方面为了让 KPLK 在到达肿瘤组织局部前,其活性暂时被封闭,使其成为无活性或低活性的 KDRscFv 与 Luffin- β 。CCK-8 法检测表明,KPLK 毒素的杀瘤活性成剂量-效应关系,其 IC_{50} 约为 35 ng/mL,从增殖曲线可知,单纯的 KPLK 毒素可抑制人非小细胞肺癌 H460 细胞的生长、增殖,其原因可能是 H460 细胞表达的 uPA 裂解了部分 KPLK 毒素,使其释放了一定的具抑瘤活性的 Luffin- β 分子所致;在 uPA 抑制剂 PAI-1 存在的情况下,KPLK 毒素仍可抑制瘤细胞的生长、增殖,只是其程度较单纯的 KPLK 毒素弱,换言之,即便是 uPA 抑制剂 PAI-1 完全拮抗了 H460 细胞表达的 uPA,使 KPLK 不受任何 uPA 裂解,在此情况下,KPLK 也存在一定的抑瘤毒性,其原因可能是 KPLK 的毒性未被完全封闭所致;KPLK 毒素经 uPA 酶体外完全裂解后对 H460 细胞生长、增殖的抑制作用最为明显 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),其原因可能是此情况下具抑瘤活性的 Luffin- β 分子被完全释放所致。三者的杀瘤强弱依次为:KPLK + uPA > KPLK > KPLK + PAI-1。因此,下一步研究将探讨更好的 KPLK 活性封闭结构,并进行在体研究,探明 KPLK 的肿瘤新生血管抑制作用与抗癌效应。

参考文献:

- [1] Mathew M, Verma R S. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(8): 1359-1365.
- [2] Ma C, Li Y, Li Z, et al. Synthesis and purification of a toxin-linked conjugate targeting epidermal growth factor receptor in *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2012, 83(1): 1-7.
- [3] Liu L, Wang R, He W, et al. Cloning and soluble expression of mature alpha-luffin from *Luffa cylindrica* and its antitumor activities *in vitro* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(8): 585-592.
- [4] Ma Q J, Li J H, Li H G, et al. Crystal structure of beta-luffin, a ribosome-inactivating protein, at 2.0 Å resolution [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003, 59(Pt 8): 1366-1370.
- [5] Dorn J, Harbeck N, Kates R, et al. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer [J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(4): 877-883.
- [6] Markl B, Renk I, Oruzio D V, et al. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2010, 102(3): 235-241.
- [7] Fong Y, Shen K H, Chiang T A, et al. Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions of human lung cancer cells through inactivating JNK signaling pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1 [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(1): H30-H38.
- [8] 梁宇佳, 缪殿南, 闫国和, 等. 含 uPA 裂解位点的人 sTrail 融合基因的构建及其原核蛋白表达与纯化 [J]. *第三军医大学学报*, 2011, 33(8): 789-792.
- [9] Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor [J]. *Invest New Drugs*, 1999, 17(3): 195-212.
- [10] Kreitman R J. Immunotoxins in cancer therapy [J]. *Curr Opin Immunol*, 1999, 11(5): 570-578.
- [11] Dano K, Romer J, Nielsen B S, et al. Cancer invasion and tissue remodeling: cooperation of protease systems and cell types [J]. *APMIS*, 1999, 107(1): 120-127.
- [12] Andreassen P A, Egelund R, Petersen H H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(1): 25-40.
- [13] Schmitt M, Harbeck N, Thomssen C, et al. Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy [J]. *Thromb Haemost*, 1997, 78(1): 285-296.
- [14] Chen A, Hu T, Mikoryak C, et al. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1589(2): 124-139.
- [15] Llorente A, Lauvrak S U, van-Deurs B, et al. Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatomer protein (epsilon-COP) [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(37): 35850-35855.
- [16] Ke S H, Coombs G S, Tachias K, et al. Optimal subsite occupancy and design of a selective inhibitor of urokinase [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(33): 20456-20462.

(收稿:2013-03-07;修回:2013-04-12)

(编辑 王红)