

抗肝癌 hdsFv 融合 RC-RNase 重组免疫毒素的表达、纯化及活性测定

付勇¹, 苏雪梅², 刘彦仿³, 杨守京³, 赵君³, 邹赛英¹

Expression, purification and functional detection of anti-HCC hdsFv fused with RC-RNase

FU Yong¹, SU Xue-mei², LIU Yan-fang³, YANG Shou-king³, ZHAO Jun³, ZUO Sai-ying¹

1. Department of Pathology, Urumqi General Hospital, Lanzhou Command Region PLA, Urumqi 830000 Xinjiang, 2. Department of Obstetrics and Gynecology; 3. Department of Pathology, Fourth Military Medical University

Abstract: **Objective** To obtain a new kind of anti-HCC recombinant immunotoxin, which has potentialities for clinical application, high specificity and increased stability. **Methods** The prokaryotic expression vector pTIH-hdsFv-RC-RNase was induced to express in *E. coli* by IPTG. The expressed product was purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography under native conditions and mildly refolded. The immunocytochemical staining and MTT colorimetry were used respectively to detect the specifically binding activity and killing effect of the recombinant immunotoxin. **Results** The fusion gene hdsFv-RC-RNase was induced to express effectively in soluble form in *E. coli*. The purity of the expressed product was near to homogeneity. The recombinant immunotoxin has the activity to bind specifically and kill obviously the HCC cells. The recombinant immunotoxin could maintain high stability after stored at 4 °C for 3 months. **Conclusion** The recombinant immunotoxin of anti-HCC hdsFv-RC-RNase was prepared successfully, which lay the foundation for the further research on its clinical application.

Key words: Hepatocellular carcinoma (HCC); Immunotoxin; dsFv; RC-RNase

摘要:目的 制备有临床应用前景的特异性高、稳定性强的新型抗肝癌重组免疫毒素。方法 利用 IPTG 诱导抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 重组免疫毒素在大肠杆菌中表达。表达产物经 Ni-NTA 亲和层析法纯化并复性,应用免疫细胞化学和 MTT 的方法分别检测其对肝癌细胞的特异性结合和杀伤活性。结果 重组免疫毒素以可溶性形式在大肠杆菌中获得表达。免疫细胞化学和细胞毒实验表明其能够特异性地结合并杀伤肝癌细胞,并且能够保持较强的稳定性。结论 我们抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 重组免疫毒素的成功制备,为其进一步的临床应用研究奠定了一定的实验基础。

关键词: 肝细胞癌;免疫毒素;二硫键稳定单链抗体;牛蛙核糖核酸酶

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)09-0626-03

0 引言

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)其早期诊断和治疗仍然是目前肝癌研究的热点。免疫毒素具有能够特异性杀伤肿瘤细胞的优点,在肿瘤导向治疗中显示出巨大的应用潜力。但是传统的免疫毒素分子量较大,穿透力差,难以大规模制备,特别是对实体肿瘤的治疗很难达到如血液系统肿瘤的疗效。基因重组免疫毒素能够有效解决上述问题,并在体外及动物实验中取得了良好效果^[1,2]。牛蛙核糖核酸酶(RC-RNase)分子量小,细胞毒性强,对肿

瘤细胞具有强大的杀伤作用,可作为重组免疫毒素的弹头物质^[3,4]。在本研究中,我们在大肠杆菌中表达并纯化了抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 重组免疫毒素,并对其生物学活性进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞系

抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 原核表达载体 pTIH-hdsFv-RC-RNase 为作者构建。*E. coli* BL21 (DE3) plyS 和人肝细胞癌细胞系 Hep G2 为本室保存。

1.1.2 主要试剂

IPTG 低分子量标准蛋白购自华美生物工程公司。精氨酸、EDTA、还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽、PMSF 购自上海生工生物工程公司。Ni-NTA Agarose 亲和柱层析填料购自 QIA GEN 公司。RP-

收稿日期:2005-08-01;修回日期:2005-09-08

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370810)

作者单位:1. 830000 兰州军区乌鲁木齐总医院病理科; 2. 妇产科; 3. 第四军医大学基础部病理学教研室

作者简介:付勇(1971-),男,博士,主治医师,主要从事肿瘤免疫毒素的导向治疗

MI1640 固体培养基购自 GIBCO 公司。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所;鼠抗 6 ×His 抗血清购自第四军医大学免疫教研室。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 及 DAB 显色剂购自 Dako 公司。

1.2 方法

1.2.1 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 融合蛋白诱导表达及纯化

将原核表达载体 p TIH-hdsFv-RC-RNase 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) plyS 中,涂板挑取单克隆 37 振荡培养过夜。取过夜菌以 2 %接种于培养液中,当 A₆₀₀ 达到 0.5 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 30 继续培养 4h。离心集菌体,冰浴条件下超声碎菌,离心,取上清液按 QIA GEN 公司产品操作过程在非变性条件下进行 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化。

1.2.2 纯化产物的复性

将抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 纯化产物在复性液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol/L EDTA, 0.25 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 精氨酸, 0.5 % NP-40, 0.4 mmol/L PMSF, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽) 4 透析 24h 后,然后经透析液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mol/L NaCl, 5 % 蔗糖) 透析 48 h, PEG-8000 沉淀法浓缩,核酸蛋白检测仪定量,4 储存备用。

1.2.3 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 抗原结合活性检测

将人肝癌细胞 Hep G2 在含 10 %胎牛血清的 RPMI1640 培养液常规传代培养,制备细胞爬片,用 4 甲醇:丙酮 (1/1) 固定液固定。细胞爬片经 80 % 甲醇-H₂O₂ (4ml 甲醇 + 1ml 蒸馏水 + 50 μl H₂O₂) 阻断内源性过氧化物酶,以 hdsFv-RC-RNase 为一抗,鼠抗 6 ×His 抗血清为二抗,以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为三抗,进行免疫细胞化学染色。以 PBS 为阴性对照,抗出血热病毒 1A8 单克隆抗体为无关抗体对照。

1.2.4 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 的杀伤活性检测

取人肝癌细胞 Hep G2 与正常肝细胞 HL02 按 1 ×10⁴/孔铺 96 孔板,100 μl/孔,用含 10 %胎牛血清的 RPMI1640 培养液 37 培养 24h 后弃去旧培养液,加入培养液作不同稀释的抗肝癌 hdsFv-RC-RNase,于 37 孵育 12h,洗涤 3 次后加入新培养液继续培养 48h。每孔加 5g/L 噻唑蓝 50μl 于 37 作用 4h。弃去反应混合物并加入 150μl 二甲基亚砷,振荡 10min,在酶标仪上测定 A₄₉₅ 值。由 A₄₉₅ 值计算细胞杀伤率。计算公式为:细胞杀伤率 (%) = (1-实验组 A₄₉₅/空白对照组 A₄₉₅) ×100 %。设立 PBS

为空白对照,hdsFv-E-tag 为替代对照。

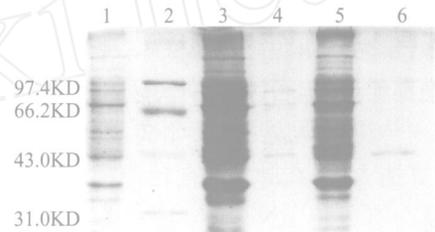
1.2.5 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 稳定性的检测

将纯化表达产物于 4 放置 3 个月后,按 1.2.3 和 1.2.4 的方法重复进行免疫细胞化学染色和杀伤活性检测,以测定长时间保存后表达产物活性的稳定性。

2 结果

2.1 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 融合蛋白的表达及纯化

经 0.1 mmol/L IPTG 在 30 诱导 4h,抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 融合蛋白以可溶性蛋白形式表达在细菌上清中。融合蛋白碳末端含有 6 ×His 标签蛋白,经 Ni-NTA Agarose 亲和层析法纯化后,蛋白纯度达到基本均一,见图 1。



1; Uninduced; 2; Low molecular protein marker; 3; Total protein of induced; 4; Supernatant of induced; 5; Precipitation of induced; 6; Purified product

图 1 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 的表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

2.2 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 抗原结合活性

免疫细胞化学染色。结果显示,反应阳性的棕黄色颗粒特异性地定位于肝癌细胞的细胞膜上,少数存在于细胞浆中,见图 2,这一结果与亲本抗体的实验结果相一致,而阴性对照及无关抗体对照结果均呈阴性,说明 hdsFv-RC-RNase 具有亲本抗体的特异性和亲和性。

2.3 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 的杀伤活性

MTT 检测结果显示 hdsFv-RC-RNase 对肝癌细胞具有明确的杀伤活性,IC₅₀ 为 6.8 μg/L,且随着免疫毒素浓度增加,杀伤率逐渐提高,而正常肝细胞 HL02 的生长则不受影响,初步说明 hdsFv-RC-RNase 对肝癌细胞具有一定的杀伤作用,见图 3。

2.4 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 的稳定性

纯化的 hdsFv-RC-RNase 稳定性检测结果显示,hdsFv-RC-RNase 仍能保持其生物学活性无明显下降,表明免疫毒素确实具有较强稳定性。

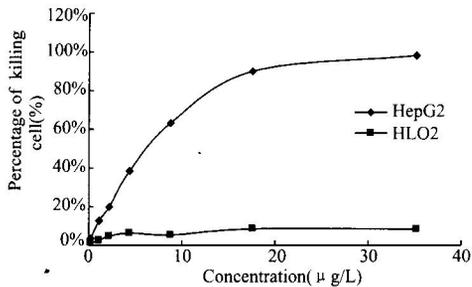


图3 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 免疫毒素的杀伤活性检测

3 讨论

RC-RNase 属于核糖核酸酶 (Ribonuclease, RNase) 超家族^[5,6]。许多研究表明, RNase 超家族不仅具有催化功能, 而且具有细胞毒性, 表现出强大的抗肿瘤作用。由于它们能够特异性杀灭恶性肿瘤细胞, 因此有望成为一类新型的抗肿瘤药物^[7,8]。细胞毒性 RNase 分子量小, 且它们中的一些成员来自于人体, 作为重组免疫毒素的弹头物质制备基因重组免疫毒素, 不但可增强杀伤恶性肿瘤细胞的活性, 而且与传统植物或细菌毒素免疫毒素相比, 免疫源性低, 穿透力强, 在肿瘤导向治疗中显示出巨大的应用前景。有人将 RNase-A 与表皮生长因子融合制备的重组免疫毒素, 经体外细胞毒实验证实对表达表皮生长因子受体的肿瘤细胞具有特异性杀伤作用^[9]。Deonarain 等^[10]研究表明制备 BS-RNase 单链重组免疫毒素不但可显著增强抗肿瘤效果, 而且大大降低毒副作用。

近二十年来, 抗体的研究经历了多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体三个阶段的发展过程, 其中基因工程抗体 scFv 具有分子量小, 特异性强, 亲和性高等优点是目下较为理想的免疫毒素的载体。通过二硫键稳定制备的 dsFv 比 scFv 稳定性强, 表达产量高, 在动物实验中 dsFv 免疫毒素表现出更好的抗肿瘤活性^[11,12]。在多年研究中, 我们先后制备了特异性强、亲和力高的抗肝癌单克隆抗体^[13], 通过基因工程改造后获得的鼠 scFv 基本保持亲本抗体的特异性和亲和性, 荷瘤裸鼠实验证明, 鼠 scFv 免疫毒素对肝癌具有明确的导向治疗作用^[14]。为了降低免疫源性和增强稳定性, 经人源化和二硫键稳定制备了 hdsFv, 4 放置 3 个月活性基本保持不变^[15]。在过去研究基础上, 我们构建并表达了抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 免疫毒素, 通过在表达质粒中引入硫氧还蛋白基因和 6 × His 基因, 实现了免疫毒素在大肠杆菌中的可溶性表达, 经过简单复性及亲和层析纯化等步骤, 获得了对肝癌细胞具有特异

性结合活性、稳定性强, 具有一定杀伤作用的抗肝癌重组免疫毒素。

(本文图 2 见第 700 页)

参考文献:

- [1] Hall PD, Willingham MC, Kreitman RJ, et al. DT388 GM-CSF, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin fused to human granulocyte macrophage colony stimulation factor, prolongs host survival in a SCID mouse model of acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 1999, 13(4): 629-633.
- [2] Kreitman RJ, Wilson WH, White JD, et al. Phase trial of recombinant immunotoxin anti-Tac (Fv)-PE38 (BL22) toward fresh malignant cells from patients with B-cell leukemias[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(4): 1476-1487.
- [3] Liao YD. A pyrimidine-guanine sequence specific ribonuclease from *Rana catesbeiana* (bullfrog) oocytes[J]. *Nucl Acids Res*, 1992, 20(6): 1371-1377.
- [4] Chang CF, Chen C, Chen YC, et al. The solution structure of a cytotoxic ribonuclease from the oocytes of *Rana catesbeiana* (bullfrog) [J]. *J Mol Biol*, 1998, 283(1): 231-244.
- [5] Huang HC, Wang SC, Leu YJ, et al. The *Rana catesbeiana* rcr gene encoding a cytotoxic ribonuclease. Tissue distribution, cloning, purification, cytotoxicity, and active residues for RNase[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(11): 6395-6401.
- [6] 付勇, 刘彦仿, 苏勤, 等. 编码牛蛙核糖核酸酶成熟蛋白基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. *肿瘤研究与临床*, 2003, 15(2): 78-81.
- [7] Matoušek J. Ribonucleases and their antitumor activity[J]. *Comp Biochem and Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 129(3): 175-191.
- [8] 付勇, 刘彦仿. 核糖核酸酶的抗肿瘤作用研究进展[J]. *国外医学·生理·病理科学与临床分册*, 2003, 23(1): 67-69.
- [9] Psarras K, Ueda M, Yamamura T, et al. Human pancreatic RNase-1-human epidermal growth factor fusion: an entirely human immunotoxin analog with cytotoxic properties against squamous cell carcinomas [J]. *Protein Eng*, 1998, 11(12): 1285-1292.
- [10] Deonarain MP, Epenetos AA. Design, characterization and anti-tumour cytotoxicity of a panel of recombinant, mammalian ribonuclease-based immunotoxins[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(4): 537-546.
- [11] Bilbao G, Contreras JL, Curiel DT. Genetically engineered intracellular single-chain antibodies in gene therapy[J]. *Mol Biotechnol*, 2002, 22(2): 191-211.
- [12] Niv R, Segal D, Reiter Y. Recombinant single-chain and disulfide-stabilized Fv immunotoxins for cancer therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 207(2): 255-268.
- [13] 胡川, 刘彦仿, 叶恒光, 等. Hab25 单克隆抗体在人体中的导向定位作用及其血药动力学[J]. *单克隆抗体通讯*, 1995, 11(1): 1-4.
- [14] 张静, 刘彦仿, 杨守京, 等. 鼠源化抗肝癌免疫毒素的导向研究[J]. *肝胆外科杂志*, 2003, 11(3): 223-226.
- [15] 赵君, 孙志伟, 刘彦仿, 等. 二硫键稳定的抗肝癌单链抗体-PE38 融合基因的构建、表达与功能检测[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(6): 585-587.

[编辑:安 凤]

谷胱甘肽S-转移酶A1在肝癌中的异常表达

(正文见 623 页)

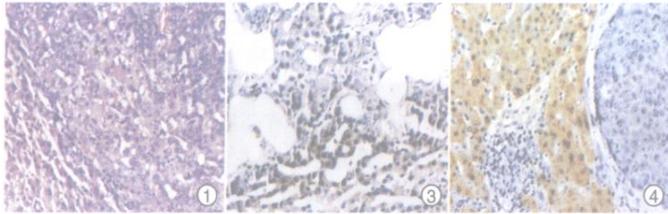


图1 树鼩肝癌组织 (HE × 200)
图3 树鼩肝细胞 GSTA1 阳性表达 (免疫组化染色 × 200)
图4 人肝细胞 GSTA1 阳性表达 (免疫组化染色 × 200)

DNA-PKcs 短发夹 RNA 载体的构建及其表达

(正文见 642 页)

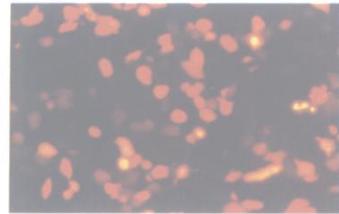


图1 A2780 细胞转染 pSIREN-DNA-PKcs shRNA 载体 48h 表达 (× 100)

抗肝癌 hdsFv 融合 RC-RNase 重组免疫毒素的表达、纯化及活性测定

(正文见 626 页)

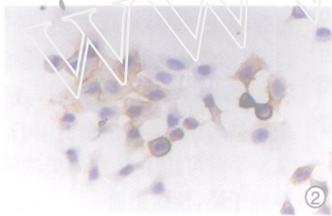


图2 抗肝癌 hdsFv-RC-RNase 的抗体结合活性免疫细胞化学检测

乳腺癌组织中骨桥蛋白和骨连接蛋白的表达及其临床病理意义

(正文见 653 页)

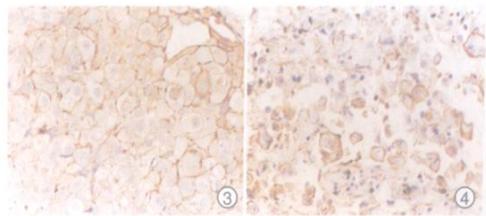


图3 乳腺癌细胞 OPN 高表达, 胞浆、胞膜呈棕黄色 (SP × 40)
图4 乳腺癌细胞 ON 高表达, 胞浆、胞膜呈棕黄色 (SP × 40)

黄芪增免散对围手术期食管癌组织 Langerhans 细胞的影响

(正文见 667 页)

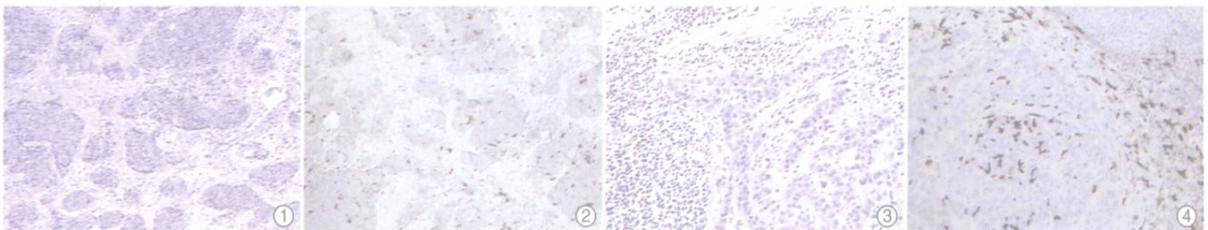


图1 对照组, 间质内淋巴细胞较少 (HE × 100)
图2 对照组 S-100 蛋白, LC 胞体较小, 胞突少而细长 (ABC × 100)
图3 服药组, 癌间质内淋巴细胞浸润较多, 呈灶状聚集 (HE × 200)
图4 服药组 S-100 蛋白, LC 胞体多较大, 分支较多, 短而细, 多呈丛状, 呈现胞突与癌细胞密切接触现象 (ABC × 200)