

[ 文章编号 ] 1007-385X( 2002 )04-0257-04

## EGF-Ang 融合蛋白的构建、表达及活性研究

岳玉环<sup>1</sup>, 朱平<sup>1</sup>, 朱冬冬<sup>2</sup>, 张国利<sup>1</sup>, 李树民<sup>1</sup>, 李铁征<sup>3</sup>( 1. 解放军军需大学军事兽医研究所, 长春 130062; 2. 吉林大学中日联谊医院, 长春 130021; 3. 吉林亚泰集团生物制药公司, 长春 130118 )

[ 摘要 ] **目的:** 构建由人表皮生长因子( epidermal growth factor, EGF )和人血管生成素( angiogenin, Ang )组成的人源化的融合蛋白, 并检测其对肿瘤细胞的靶向杀伤能力。**方法:** 利用基因工程技术将 EGF 和 Ang 基因连接起来, 克隆到高效表达载体 pET28a( + )中, 构建重组表达质粒 pEGF-Ang, 并在大肠杆菌中表达该融合蛋白( EGF-Ang )。经 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换柱层析纯化后, 用 MTT 法检测复性蛋白的细胞毒性。**结果:** SDS-PAGE 和薄层扫描分析表明外源蛋白的表达量占菌体裂解蛋白总量的 18.6%。细胞活性检测表明 EGF-Ang 重组蛋白能明显地抑制 Hep2 细胞的生长, 而不影响 MA104 细胞的正常生长。**结论:** 融合蛋白 EGF-Ang 在体外对过度表达 EGFR 的 Hep2 细胞具有明显的杀伤作用。

[ 关键词 ] 表皮生长因子; 血管生成素; 融合蛋白; 细胞毒性

[ 中图分类号 ] Q786; Q511 [ 文献标识码 ] A

## Construction and Expression of the EGF-Ang Fusion Protein and Its Biological Activity

YUE Yu-huan, ZHU Ping, ZHU Dong-dong, ZHANG Guo-li, LI Shu-min, LI Tie-zheng ( The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China )

[ **Abstract** ] **Objective:** To construct a humanized fusion protein consisting of a EGF linked to a human angiogenin ( Ang ) and evaluate the potential of the construct( EGF-Ang ) to target and kill tumor cells. **Methods:** By using of genetic engineering techniques, we constructed a recombinant expressing plasmid pEGF-Ang, and expressed fusion protein accumulated in intracellular inclusion bodies. The recombinant EGF-Ang proteins were purified through DEAE-Sepharose FF chromatography in the denatured condition. After renaturing process, the cytotoxicity was measured with MTT colorimetric assay *in vitro*. **Results:** A novel fusion protein named EGF-Ang was constructed and expressed in *E. coli*. Analysis of SDS-PAGE and thin layer scanning results showed that amount of expressed fusion protein was 18.6% in total lysis protein of bacteria. Cytotoxicity analysis showed that the fusion proteins could inhibit the growth of Hep2 cells but had little influence on the growth of MA104 cells. **Conclusion:** EGF-Ang fusion protein had definitely cytotoxicity to Hep2 cells which over expressed EGFR *in vitro*.

[ **Key words** ] epidermal growth factor ( EGF ); angiogenin ( Ang ); fusion protein; cytotoxicity

\* 许多肿瘤的表面都并生有各种激素受体分子, 如表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR ), 在结肠癌、乳腺癌、喉癌等鳞癌细胞表面过度表达<sup>[1-2]</sup>。为此人们考虑可以利用这些受体的导向性通过相应的载体把毒性物质带入肿瘤细胞中, 选择性地杀伤靶细胞, 这就是导向药物治疗。随着分子生物学技术的发展, 导向药物的构建方式也在逐步进化。重组毒素则是将载体部分和毒性部分基因融合, 在基因水平上构建的导向药物, 具有分子小、毒性强、特异性强等优点。国内外学者已构建并表达了大量的重组毒素<sup>[3-4]</sup>, 有的已进入临床试验阶段, 如 DAB486IL-2,

DAB389-EGF 等。但这些重组毒素均为外源毒素, 具有很强的免疫原性, 长期使用会产生抗体, 影响长期治疗效果。为此我们设计构建了以表皮生长因子( epidermal growth factor, EGF )为载体, 以人血管生成素( angiogenin, Ang )为毒性成分的人源化重组蛋白, 并检测了其过度表达 EGFR 的喉癌细胞( Hep2 细胞)的毒性作用, 为进一步获得具有较低免疫原性的重组毒素奠定了基础。

\* [ 作者简介 ] 岳玉环( 1963- ), 满族, 女, 吉林四平人, 博士, 副研究员, 主要从事基因工程抗癌药物的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM105, BL21( DE3 )由本室保存, 含 Ang 基因片段的重组质粒 pETA<sup>[5]</sup>和含 EGF 基因片段的重组质粒 pEGF-40<sup>[4]</sup>由本室构建。

### 1.2 试剂

限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、IPTG、DL-2000 Marker( Takara 公司 ); T4 DNA 连接酶、DNA 纯化试剂盒、RNA 酶( Promega 公司 ); 引物合成及序列测定由大连宝生物公司完成。MTT 试剂盒( Sigma 公司 ); DEAE Sepharose FF( Amersham 公司 )。

### 1.3 EGF 基因片段的制备

根据已知的 EGF 基因序列设计 2 条引物, 两端分别含有 Nco I 和 BamH I 酶切位点。以质粒 pEGF-40 为模板, PCR 扩增 EGF 片段。扩增条件为: 98℃ 5 min 变性, 加 Taq 酶, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 cycles, 最后 72℃ 延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增的结果。

### 1.4 重组表达质粒的构建与鉴定

将 PCR 扩增的 EGF 基因片段和质粒 pETA 分别用 Nco I 和 Bam H I 双酶切, 低熔点胶分离后, 用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收纯化, 二者以一定比例混合, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 4℃ 连接过夜。连接产物按 CaCl<sub>2</sub> 法转化至受体菌 JM105 中, 平铺于含卡那霉素的琼脂平板上, 37℃ 倒置培养 12 ~ 16 h, 快速提取质粒, 经特异性酶切鉴定, 挑选出阳性重组质粒 pEGF-Ang, 对其进行酶切和序列测定以进一步验证重组表达质粒的构建是否正确。图 1 为重组质粒 pEGF-Ang 的构建思路。

### 1.5 重组蛋白的诱导表达及分析

将 pEGF-Ang 质粒转化至表达菌 BL21( DE3 )中, 挑取单个菌落接种于 5 ml LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导 3 h, 离心收集菌体。经超声裂解后, 12 000 g 离心 20 min 分别收集上清和沉淀。用 SDS-PAGE 检测表达产物的表达情况, 并用薄层扫描仪测定目的蛋白的表达量。

### 1.6 包涵体蛋白的提纯与复性

将发酵的菌体离心收集后, 用裂解缓冲液悬浮, 并用超声波破碎裂解细胞, 离心去掉上清, 沉淀用含 8 mol/L 脲素的裂解液溶解, 离心收集上清, 在 DEAE-Sepharose FF 柱上进行梯度分离, 收集洗脱峰, SDS 电泳检测。用透析法复性纯化的包涵体蛋白, 用紫外分光光度计测定波长为 260 nm, 280 nm 处的吸收值, 以

此计算蛋白浓度。蛋白浓度计算公式为:

$$\text{蛋白浓度( mg/ml )} = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$$

图 1 重组质粒 pEGF-Ang 的构建

Fig. 1 Construction of pEGF-Ang recombinant plasmid

### 1.7 表达蛋白的鉴定( Western blot )

将纯化的包涵体蛋白转印至硝酸纤维素膜上, 用 3% 的 BSA 封闭后, 与一抗结合, 洗涤后与二抗反应。其中, 抗原抗体反应中的第一抗体为兔抗人 Ang 多抗, 用 PBS 以 1: 500 稀释, 第二抗体为山羊抗兔 IgG/HRP, 用 PBS 以 1: 1000 稀释。DAB 显色。

### 1.8 复性蛋白的细胞毒性检测( MTT 法 )

用过度表达 EGFR 的 Hep2( 喉癌 ) 细胞和正常组织细胞 MA104( 猴肾细胞 ) 检测复性蛋白的细胞毒性。将培养好的 Hep2 和 MA104 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞浓度至  $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$  细胞/ml, 接种于 96 孔培养板中, 100 μl/ 孔, 24 h 后, 将纯化蛋白进行系列稀释, 过滤除菌后按每孔 0.1 ng, 1.0 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng 浓度梯度加入到生长好的 2 种细胞中, 每个梯度设 3 个平行孔。实验设阴性对照( 加等体积的空菌蛋白 ) 和空白对照( 只含培养基 )。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3 h 后每孔加入 2.5 mg/ml 的 MTT 溶液 30 μl, 继续培养 3 h, 弃上清, 加入 DMSO 100 μl, 振荡 5 min, 镜下观察孔中蓝色结晶全部溶解后, 测 OD<sub>570 nm</sub> 吸收值。

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增的 EGF 基因片段

从已有的重组质粒 pEGF-40 中 PCR 扩增出含有 Nco I 和 BamH I 酶切位点的 EGF 基因片段, 大小为 160 bp 左右, 与预期相符( 图略 )。

### 2.2 重组表达质粒 pEGF-Ang 的构建

将构建的重组质粒用 Nco I 和 Xho I 酶切, 结果切

出了约 530 bp 相应大小的基因片段,说明重组质粒已构建成功,序列分析表明构建的重组质粒的核苷酸序列与阅读框架完全正确。pEGF-Ang 酶切鉴定结果(见图 2)。

图 2 重组质粒 PegF-Ang 的酶切鉴定

**Fig. 2 Restriction map of recombinant plasmid pEGF-Ang**  
 1: pEGF-Ang/BamH I + Xho I ;2: pEGF-Ang/Nco I + BamH I ;  
 3. pEGF-Ang/Nco I + Xho I ; M: DL-2000 marker

2.3 重组蛋白的表达

SDS-PAGE 分析表明,在全菌体表达及沉淀中的分子量约 20 kD 处均有一条明显的表达带(图 3),与理论值基本相符,而在菌体裂解上清以及空菌对照组中相应位置均未出现特异带,说明重组蛋白在该表达菌中以包涵体的形式存在。薄层扫描结果表明,重组蛋白占菌体裂解蛋白总量的 18.6%。

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

**Fig.3 SDS-PAGE profile of expressed product**

1: Induced somatic protein of BL21( DE3 )( negative control );  
 2. Protein marker; 3-4: Induced precipitation of BL21  
 ( DE3 )/pEGF-Ang; 5-6: Induced supernatant of BL21  
 ( DE3 )/pEGF-Ang; 7-8: Induced somatic protein of BL21  
 ( DE3 )/pEGF-Ang

2.4 重组蛋白的纯化及免疫印迹分析

经过 DEAE-Sepharose FF 柱纯化的 EGF-Ang 蛋白纯度达 85%(见图 4A)。紫外检测蛋白质浓度为 1.36 mg/ml。免疫印迹结果表明重组蛋白可与抗 Ang 抗体

发生反应(图 4B)。

图 4 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析及其 Western blot 鉴定  
**Fig. 4 SDS-PAGE profile of the purified proteins and Western blot**

1: Purified proteins; M: Protein marker; 2: Western blot

2.5 融合蛋白的细胞毒性作用

实验结果显示,EGF-Ang 重组蛋白对过度表达 EGFR 的喉癌细胞 Hep2 的生长有明显的抑制作用。随着蛋白浓度梯度的增加,EGF-Ang 重组蛋白对 Hep2 癌细胞生长的抑制作用明显增强,细胞的死亡率逐渐增大(表 1),而加入空菌蛋白的对照组细胞则生长正常(图 5)。实验结果还显示 EGF-Ang 重组蛋白对正常组织细胞 MA104 的生长没有明显的影响(表 1)。

图 5 EGF-Ang 融合蛋白对 Hep2 细胞的细胞毒性作用  
**Fig.5 Cytotoxicity of the EGF-Ang fusion protein to Hep2 cells**  
 ( 1: Control; 2: Test )

表 1 EGF-Ang 蛋白对两种细胞生长的抑制情况

**Tab.1 Inhibition of the EGF-Ang to Hep2 and MA104 cells**

Protein concentration	( ng )	0.1	1.0	10	50	100
Inhibition rate	Hep <sub>2</sub>	2.21	8.96	26.73	54.11	61.37
( % )	MA104	0.66	1.27	2.19	2.81	3.07

### 3 讨论

近十年来科学家们利用各种基因工程抗体和激素作为导向部分与一些毒性物质连接,制备出具有特异性杀伤肿瘤细胞的重组毒素。其中已有部分产品进入了临床试验,如 DAB486-IL-2, DAB389-EGF 等,而 DAB389-IL-2(商品名 ONTAK)已于 2000 年获得美国 FDA 批准,批量上市。但大多数重组毒素的毒性部分取自于植物或细菌的毒素,而植物或细菌毒素对人体具有较强的免疫原性,在临床应用中可导致严重的免疫反应。

最近的研究表明,人类的 RNA 酶在胞浆中具有抑制蛋白合成杀伤细胞的作用<sup>[6]</sup>。这种作用的机制还不太清楚。但利用 RNA 酶作为细胞毒性部分来制备低免疫原性的重组毒素的研究已取得一定的进展。人类血管生成素(angiogenin, Ang)<sup>[7]</sup>是一种由 123 个氨基酸组成的相对分子量为 144 kD 的小聚合多肽。它与 RNA 酶具有同源性,因而除了具有诱导新生血管生成和生长的作用外,还具有 RNA 酶的活性,当它进入细胞后,可有效地抑制蛋白质的合成,导致细胞的死亡。1992 年 Rybak 等<sup>[6]</sup>首次用 Ang 与抗转铁蛋白受体抗体相连构建了人源化免疫重组毒素,有效地抑制了表达人转铁蛋白受体的 K526 细胞的生长与蛋白质的合成,而对不表达此受体的细胞则无毒性,初步证明了人源化重组毒素的可行性。1997 年 Zewe 等<sup>[8]</sup>将 Ang 融合到抗转铁球蛋白受体的单链抗体上,其融合蛋白可抑制由黑色素瘤、肾癌和乳腺癌获得的 3 种人类肿瘤细胞系的蛋白质合成。2001 年 Huhn 等<sup>[9]</sup>的工作同样证明了 Ang 可以作为重组蛋白的毒性部分而取代对人体有较强免疫原性的细菌和植物毒素。

EGF 是人体内一种小的内源蛋白,具有较小的免疫原性,可以与细胞表面受体结合而内化,而且,EGFR 的

过表达与癌症病人的预后不良有关<sup>[1-2]</sup>。由 EGFR 介导的 EGF 的靶向能力与 TGF- $\alpha$  一样高效,因此一个 EGF 融合蛋白可以被内化并在胞质内执行它的功能。为构建一种免疫原性小而又容易侵入的靶向疗法,我们将 EGF 与 Ang 进行了基因融合。实验结果显示,构建的 EGF-Ang 融合蛋白在体外对癌细胞确实具有细胞毒性。本项研究结果为进一步构建具有较低免疫原性的人源化靶向抗癌药物奠定了坚实的基础。

### [参考文献]

[1] Lelle RJ, Talavera F, Gretz H, et al. Epidermal growth factor receptor expression in three different human endometrial cancer cell lines[J]. Cancer, 1993, 72(2): 519-525.

[2] Osborne CK, Coronado-Heinsohn E. Targeting the epidermal growth factor receptor in breast cancer cell lines with a recombinant ligand fusion toxin[J]. Cancer J Sci Am, 1996, 2(3): 175-180.

[3] Ako Kihara, Ira Pastan. Small chimeric toxins containing only transforming growth factor  $\alpha$  and domain III of Pseudomonas Exotoxin with good antitumor activity in mice[J]. Cancer Res, 1994, 54(5): 5154-5159.

[4] 任小燕, 孟锐奇, 朱冬冬, 等. 人表皮生长因子-PE40 重组毒素的构建[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(3): 182-183.

[5] 岳玉环, 姜力, 许崇波, 等. 人血管生成素基因的克隆与表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2001, 14(3): 136-138.

[6] Rybak SM, Hoogenboom HR, Meade HM, et al. Humanization of immunotoxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 3165-3169.

[7] Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells[J]. Biochemistry, 1985, 24: 5480-5486.

[8] Zewe M, Rybak SM, Little M, et al. Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion[J]. Immunotechnology, 1997, 3(2): 127-136.

[9] Huhn M, Sasse S, Tur MK, et al. Human angiogenin fused to human CD30 ligand (Ang-CD30L) exhibits specific cytotoxicity against CD30-positive lymphoma[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8737-8742.

[收稿日期] 2002-05-27

[修回日期] 2002-07-20

## 《肿瘤防治研究》征订启事

《肿瘤防治研究》杂志是由中华人民共和国卫生部主管,是我国最早创刊的全国性肿瘤专业学术刊物。创刊之初,当时的中国科学院院长郭沫若专门为刊物题写了刊名,并沿用至今。创办近 30 年来,共发表各类稿件 4700 余篇,从这一系列的报道中,可以清楚地看出我国肿瘤工作 30 年的发展脉络。作为老牌刊物,历届办刊人坚持以“百花齐放、百家争鸣”为办刊宗旨,从严治学,为杂志成为我国肿瘤学术界的一个重要论坛打下坚实的基础。

新世纪,面对我国加入 WTO 所带来的挑战以及网络媒体的冲击,我们更多看到的是发展的机遇。目前,该刊已初步实现了编辑手段和期刊载体的现代化,纸质媒体、光盘版、网络版同步发行,并被国内多家大型数据库收录,杂志的读者跨越洲界,以几何级数在拓展,本刊发表的文章也打破了地域界限以向全世界传播,作者的智力创作可以更快地得到世界公认,期刊和作者的知名度也在大幅提升。

2003 年,请新老朋友一如既往地保持您对本刊的关爱,我们将在办刊的过程中体现更多的人文关怀,为您事业的成功尽一份绵薄之力,以求得刊物和您的共同进步。

刊号: 1000-8575/CN42-1241/R, 邮发代号: 38-70, 定价: 6.00 元/期, 刊期: 双月刊(逢双月 5 号出版)

如错过邮局订阅,可直接向本刊编辑部订阅。

通讯地址: 武昌卓刀泉南路 16 号《肿瘤防治研究》编辑部, 邮政编码: 430079, 电话: 027-87393126, 传真: 027-87396522