

[文章编号] 1007-385X(2003)03-0161-05

单链抗体融合重构型人 caspase-3 蛋白的靶向抑瘤作用研究

张立红, 贾林涛, 于翠娟, 鲍 炜, 金 明, 赵 晶, 王成济, 杨安钢(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

[摘 要] 目的: 探讨分泌表达的抗 ErbB2 单链抗体与重构型人 caspase-3 融合蛋白对 ErbB2 抗原阳性肿瘤细胞的靶向杀伤作用。方法: 将重构型人 caspase-3 基因亚克隆入 pCMV-e23scFv-PE II -PE III 相应位点, 构建表达分泌型的抗 ErbB2 单链抗体与重构型人 caspase-3 融合蛋白基因的真核表达载体 pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3, 转染人 T 淋巴瘤细胞系 Jurkat, 筛选并建系, ELISA 检测培养上清中融合蛋白的分泌表达。用含有该融合蛋白的培养介质培养人宫颈癌细胞 HeLa、乳腺癌细胞 SKBr3 以及人卵巢癌细胞 SKOV3 等研究该蛋白对细胞生长的抑制作用; 将转染建系的 Jurkat 细胞尾静脉注射 SKBr3 荷瘤裸鼠研究其对肿瘤的抑制作用, 间接免疫荧光检测重构型人 caspase-3 蛋白在瘤体的靶向分布。结果: 融合蛋白基因可通过 Jurkat 细胞分泌表达并杀伤 ErbB2 抗原阳性的 SKBr3 和 SKOV3 细胞而对 ErbB2 抗原阴性的 HeLa 细胞生长无明显影响, 尾静脉注射该细胞可靶向抑制荷瘤裸鼠肿瘤生长。结论: 分泌表达的抗 ErbB2 单链抗体与重构型人 caspase-3 融合蛋白靶向诱导 ErbB2 抗原阳性肿瘤细胞死亡。

[关键词] 重构型人 caspase-3; ErbB2 抗原; 靶效应; HeLa; SKBr3; SKOV3

[中图分类号] Q255 [文献标识码] A

Targeted Tumor Suppression by a Secreted Fusion Protein Consisting of Anti-erbB2 Antibody and Reversed caspase-3 to Three Kinds of Cells

ZHANG Li-hong, JIA Lin-tao, YU Cui-juan, BAO Wei, JIN Ming, ZHAO Jing, WANG Cheng-ji, YANG An-gang (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the targeted killing effect to ErbB2 antigen positive cells due to the expression of a secreted fusion protein consisting of anti-erbB2 single chain antibody and reversed caspase-3 protein. **Methods:** pCMV-e-23scFv-PE II -revcasp-3 was constructed by sub cloning reversed caspase-3 gene to downstream of anti-erbB2 antibody and PE40 domain II genes in recombinant pCMV vector and transfect Jurkat cells. The cell lines secreted expressing fusion protein stable were selected. Fusion protein in mediate was detected by ELISA. Then such mediate was used to culture HeLa, SKBr3 and SKOV3 cells respectively and their survivals were compared through MTT. Finally Jurkat- pCMV-e-23scFv-PE II -revcasp-3 cells were administrated to BALB/c nude mice bearing SKBr3 tumor through their tail veins. **Results:** Fusion protein could be expressed by Jurkat cells stably and kill SKBr3 and SKOV3 cells which express ErbB2 antigen but had no influence on HeLa which does not expressed ErbB2 antigen. Administrating Jurkat- pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 cells could inhibit SKBr3 tumor *in vivo*. **Conclusions:** Secreted expression of the fusion protein consisting of anti-erbB2 antibody and reversed caspase-3 could targetedly induce ErbB2 antigen positive cells to death.

[Key words] reversed caspase-3; ErbB2; targeted effect; HeLa; SKBr3; SKOV3

* caspase(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶, cysteinyl aspartate-specific protease)是一类在细胞凋亡中起关键作用的蛋白酶家族^[1]。其中, caspase-3 是细胞凋亡最重要的执行分子, 它在细胞中通常以由 N 端原结构

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划) (2001AA 217101), 国家杰出青年科学基金(39925036) 及军队杰出中青年研究基金(98J009) 资助

[作者简介] 张立红(1972-), 女, 山西太原人, 讲师, 博士生, 主要从事肿瘤基因治疗方向研究

[通讯作者] 杨安钢

域、大亚基和小亚基组成的酶原的形式存在,在凋亡信号刺激下,酶原被上游 caspase 分子切割,原结构域被去除,大、小亚基游离并组装成有活性的 caspase-3 分子,特异性识别并切割一系列下游底物分子如 PARP 等,使细胞凋亡^[2]。caspase-3 的切割活化是不同细胞凋亡途径中共同的下游事件。一旦 caspase-3 活化,凋亡将不可逆转。Srinivasula 等^[3]则构建了一种重构型人 caspase-3 分子,这种大、小亚基顺序颠倒的 caspase-3 分子无需上游 caspase 分子切割活化即可自发折叠成具有活性的三维结构形式从而行使其促凋亡功能。

ErbB2(又称 neu 或 HER-2)为表皮生长因子受体超家族成员,是人类肿瘤中发生改变频率最高的癌基因之一。早期的临床研究结果表明,ErbB2 的基因表达水平和基因拷贝数目在几种人类肿瘤细胞中都有显著升高,特别是在乳腺癌、卵巢癌和胃癌中升高更为显著。因此,Batra 等^[4]构建了单链抗体 e23(Fv),它由针对肿瘤细胞膜表面表达的 ErbB2 抗原的高亲和力抗体的重链和轻链可变区连接而成,对 ErbB2 抗原有较高亲和力。Chen 等^[5]将一段信号肽、单链抗体 e23 以及绿脓杆菌外毒素 PE40 的转膜结构域(domain II)和效应域(domain III)基因进行融合,构建了以肿瘤细胞膜表面表达的 ErbB2 抗原作为靶分子的免疫毒素进行肿瘤基因治疗。

本文在 Chen 等^[5]的工作基础之上将 PE40 的效应域(domain III)基因替换为具有自发活性的重构型人 caspase-3 分子克隆入真核表达载体 pCMV,使其分泌表达,并研究了重组蛋白对 HeLa,SKBr3 以及 SKOV3 细胞的靶向杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

带有信号肽、单链抗体 e23 以及绿脓杆菌外毒素 PE40 的转膜结构域(domain II)和效应域(domain III)基因的 pCMV 载体(pCMV-e23scFv-PE II-PE III)为杨安钢教授构建;人乳腺癌细胞系 SKBr3、人卵巢癌细胞 SKOV3 为美国 Chen SY 教授惠赠;人淋巴瘤细胞系 Jurkat、人宫颈癌细胞 HeLa 为本室保存;限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 Promega 公司;Taq DNA 聚合酶、新生牛血清、DMEM 培养基、胰酶及脂质体 lipofectAMINETM2000 为 Gibco 公司产品;兔抗人活性型 caspase-3 多抗为 PharMinGen 公司产品;实验用 BALB/c 裸鼠由第四军医大学实验动物中心繁殖饲养。

1.2 重构型人 caspase-3 基因的克隆及真核表达载体的构建

重构型人 caspase-3 基因克隆见文献[6],将成功

克隆的重构型人 caspase-3 基因及 pCMV-e23scFv-PE II-PE III 以 Not I/Xba I 双酶切并连接,使之取代 PE40 的效应域 domain III 位于信号肽、单链抗体 e23scFv 及 PE40 的转膜结构域的下游,命名为 pCMV-e23scFv-PE II-revcasp-3,酶切鉴定并测序。

1.3 细胞转染及筛选

转染前 24 h 将适量 Jurkat 细胞重新接种于 6 孔板,待细胞生长至合适密度时,按照 lipofectAMINETM 2000 使用说明转染 pCMV-e23scFv-PE II-revcasp-3 及 pCMV 空载体。转染后 24 h 加入 G418(800 mg/L 培养液)进行筛选,约 2 周后大部分细胞死亡并有阳性克隆生长,换不含 G418 的完全培养液继续培养。

1.4 基因表达产物的检测

分别取转染 pCMV-e23scFv-PE II-revcasp-3 及 pCMV 空载体后筛选建系的获得的 Jurkat 细胞培养上清,PEG20000 浓缩后,用兔抗人活性型 caspase-3 多抗进行 ELISA 检测。

1.5 分泌表达的融合蛋白对 ErbB2 抗原阳性细胞的体外杀伤作用

将 1×10^3 HeLa,SKBr3 以及 SKOV3 等细胞接种于 96 孔板($n=3$),加入 200 μ l 转染 pCMV-e23scFv-PE II-revcasp-3 或 pCMV 空载体后筛选建系的获得的 Jurkat 细胞培养上清,分别于 1~6 d 用 MTT(噻唑蓝)法检测细胞的存活情况。

1.6 裸鼠体内抑瘤性实验

选取 18 g 左右裸鼠共 10 只,在右后肢的皮下分别接种 1×10^6 SKBr3 细胞,3 周后形成直径 5 mm 左右瘤块。将裸鼠随机分为 2 组($n=5$),尾静脉注射 Jurkat-pCMV-e23scFv-PE II-revcasp-3(实验组)和 Jurkat-pCMV 空载体(对照组)各 1×10^5 ,定期测量肿瘤体积(肿瘤体积 = $1/2 \times$ 肿瘤最大径 \times 肿瘤最小径²)变化情况,19 d 后处死裸鼠称取裸鼠以及肿瘤重量。

1.7 基因表达产物在肿瘤中的特异分布

取对照组和治疗组裸鼠肿瘤切片进行间接免疫荧光染色检测重构型 caspase-3 蛋白的表达。

2 结果

2.1 重构型人 caspase-3 基因的克隆及真核表达载体的构建

将成功克隆的重构型人 caspase-3 基因亚克隆入 pCMV 载体的相应位点,使之取代了使之取代 PE40 的效应域 domain III 而与载体上原有的信号肽、抗体 e-23scFv 及 PE40 的转膜结构域连接,共同编码一个 N 端带有抗 ErbB2 抗体的重构型人 caspase-3 分泌蛋白,命名为 immrevcasp-3。利用信号肽上游酶切位点 Hind

III/Xba II 及 PE40 的转膜结构域的下游酶切位点 Not I/Xba I 分别进行酶切鉴定结果正确(图 1)。测序结果表明,4 个基因序列完全正确。

2.2 immrevcasp-3 分泌型细胞系的建立

pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 及 pCMV 空载体转染 Jurkat 细胞, G418 筛选, 3 周后得到阳性混合克隆, 分别命名为 Jurkat-pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 及 Jurkat-pCMV, 上述细胞株生长状态良好, 呈标准的 S 形生长曲线。

离心收集上述 2 种细胞株的培养上清, 用兔抗人活性型 caspase-3 多抗进行 ELISA 检测, 结果显示 pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 转染组染色结果呈阳性, 且显色深度与样品稀释倍数成反比(图 2), pCMV 空载体转染组则呈阴性结果。

2.3 immrevcasp-3 蛋白对 SKBr3 的体外杀伤作用

将 1×10^3 HeLa, SKBr3 以及 SKOV3 等细胞接种于 96 孔板($n=3$), 加入 200 μ l 转染 pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 或 pCMV 空载体后筛选建系的获得的 Jurkat 细胞培养上清, 分别于 1~6 d 用 MTT(噻唑蓝)法检测细胞的存活情况。

图 2 ELISA 检测 Jurkat- pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 分泌的 immrevcasp-3

Fig. 2 Detection of immrevcasp-3 in the mediate by ELISA

A: Jurkat cells transfected with pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3; B: Jurkat cells transfected with pCMV

由图可见, 在加入 Jurkat- pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 培养上清之后, 和 Jurkat-pCMV 培养上清比较, SKBr3, SKOV3 细胞的生长受到了明显抑制, 到第 3 天之后, 大量细胞被 Jurkat 细胞分泌的 immrevcasp-3 蛋白杀伤, 细胞数量持续减少(图 3)。而 HeLa 细胞的生长则基本不受培养介质的影响, 生长状况良好, 细胞持续增殖。

2.4 immrevcasp-3 蛋白可抑制裸鼠体内肿瘤生长

给荷瘤裸鼠尾静脉注射 Jurkat-pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3(实验组)和 Jurkat-pCMV(对照组)细胞之后观察发现, 和 Jurkat-pCMV 空载体对照相比, 实验组裸鼠肿瘤生长速度明显放慢(图 4), 到第 19 天处死裸鼠时对照组肿瘤体积为 (875.79 ± 17.82) mm³, 平均瘤重 (0.37 ± 0.03) g; 而实验组肿瘤体积为 $(268.20 \pm$

图 1 pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 Hind III/Xba II 及 Not I Xba I 双酶切鉴定结果

Fig 1 Identification of pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 by Hind III/Xba I or Not I/Xba I cleavage

Lane1: Identification of pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 by Hind III/Xba II cleavage; Lane2: λ DNA/Hind III marker (up to down: 23 130 bp, 9 416 bp, 6 557 bp, 4 361 bp, 2 322 bp, 2 027 bp, 564 bp, 125 bp); Lane3: Identification of pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 by Not I/Xba I cleavage

8.66) mm³, 平均瘤重仅为 (0.11 ± 0.01) g, 明显小于对照组($P < 0.05$)。证明 immrevcasp-3 蛋白可靶向杀伤 ErbB2 抗原阳性的 SKBr3 细胞, 抑制肿瘤生长(表 1)。

2.5 通过对照组和实验组裸鼠肿瘤切片进行间接免疫荧光染色检测重构 caspase-3 蛋白的表达

结果显示和对照组比较, 实验组肿瘤用抗重构型 caspase-3 抗体进行间接免疫荧光染色发现有目标蛋白的靶向分布(图 5)。

3 讨论

在基因治疗研究中, 通过基因修饰细胞(如 T 淋巴细胞)使之分泌靶向识别肿瘤表面抗原的效应分子(如免疫毒素等)特异性地杀伤肿瘤细胞是靶向基因治疗的一个重要途径。由于免疫毒素可持续表达, 靶

向性好,可清除肉眼难以分辨的转移灶和微小病灶,近年来通过设计构建免疫毒素治疗肿瘤的方案很多。例如 Herrera 等^[7]用鼠抗人白细胞分化抗原单抗 HD37-dgRTA(针对 CD19)和 RFB4-dgRTA(针对 CD22)融合去糖基化的蓖麻毒素 A 链(deglycosylated ricin A chain, dgRTA)构建免疫毒素治疗人联合重症免疫缺陷(SCID)。Fracasso 等^[8]用 3 种抗前列腺特异性单克隆抗体 J591, PEQ226.5 和 PM2P079.1 交联天然或重组的蓖麻毒素 A 链(RTA)构建免疫毒素,作用于单层或

三维培养的复发性雄激素依赖的前列腺癌细胞株 LN-CaP,发现毒素分子可以很好抑制肿瘤细胞生长,杀死肿瘤细胞。Fan 等^[9]利用高亲和力的抗间皮素单链抗体融合毒素分子靶向治疗肺癌。Peipp 等^[10]用重组 CD7 特异性单链抗体介导毒素分子靶向诱导急性 T 细胞白血病细胞凋亡。Joshi 等^[11]利用成神经管细胞瘤表面的 IL-4 受体作为靶分子,用抗体融合环状突变的假单孢菌外毒素构建免疫毒素分子治疗成神经管细胞瘤等。

图 3 immrevcasp-3 蛋白对 3 种细胞的体外杀伤作用
Fig. 3 Inhibition of growth of HeLa, SKBr3 and SKOV3
 A: HeLa; B: SKBr3; C: SKOV3

图 4 治疗前后裸鼠肿瘤体积变化曲线
Fig. 4 Increasing curves of tumor volume

图 5 间接免疫荧光染色检测重构型 caspase-3 蛋白的表达
Fig. 5 Detection of reversed caspase-3 in the tumor
 A: Control group; B: Treatment group

表 1 immrevcasp-3 蛋白抑制对裸鼠体内肿瘤的抑制作用
Table. 1 The changes of tumor volume and weight

Groups	n	Tumor volume before therapy (mm ³)	Tumor volume after therapy (mm ³)	Tumor weight after therapy(g)
Control	5	105.35 ± 6.32	875.79 ± 17.82	0.37 ± 0.03
Therapy	5	108.42 ± 7.28	268.20 ± 8.66	0.11 ± 0.01

但是,由于免疫毒素中毒素分子为外源蛋白,长期分泌有可能产生机体免疫反应,使免疫毒素被中和,影响其继续发挥作用。我们在 Chen 等^[5]的工作基础上将 PE 中 domain III 替换为重构型人 caspase-3 分子,构建了一种新的肿瘤杀伤效应分子(immrevcasp-3),该分子保留了针对 ErbB2 抗原的单链抗体 e23scFv 以及

PE40 的转膜结构域(domain II),而在 C 端连接了一种具有自发活性的 caspase-3 分子(revcasp-3)。实验证实这种新型分子可以由 Jurkat 细胞(ErbB2 抗原阴性)持续分泌而对细胞本身并无不良作用,含有此种蛋白的培养上清可导致 ErbB2 抗原阳性的乳腺癌细胞 SK-Br3 和卵巢癌细胞 SKOV3 死亡而对 ErbB2 抗原阴性的

Hela 细胞没有生长没有明显影响。将转染建系的 Jurkat- pCMV-e23scFv-PE II -revcasp-3 细胞尾静脉注射 SKBr3 荷瘤裸鼠后,重组蛋白分泌表达,并在裸鼠体内靶向识别并产生有活性的分子杀伤 SKBr3 细胞,延缓肿瘤生长。为进一步研究奠定基础。

与通常构建的免疫毒素不同,caspase-3 是不同细胞凋亡途径中共同的末端效应蛋白酶,是细胞凋亡的直接执行者,因此必将更有效地促进 ErbB2 抗原阳性肿瘤细胞死亡而不会损伤正常细胞。另外,immrev-casp-3 分子主要由人源化抗体 e23scFv 以及细胞自身蛋白 caspase-3 构成,即便长期分泌产生这种蛋白,也不致引起机体免疫反应,从而建立一种持续、高效、安全、特异的治疗方法,为肿瘤生物治疗探索一条新途径。

[参考文献]

[1] Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspase: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 383-424.

[2] Hengartner MO. Apoptosis: Corraling the corpses [J]. *Cell*, 2001, 104: 325-328.

[3] 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: 10107-10111.

[4] Batra JK, Kasprzyk PG, Bird RE, *et al.* Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 5867-5871.

[5] Chen SY, Yang AG, Chen JD, *et al.* Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells [J]. *Nature*, 1997, 385: 78-80.

[6] 张立红, 贾林涛, 陈广生, 等. 重构型 caspase-3 的表达及其对 SKBr3 细胞的凋亡诱导作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002(9), 4: 253-256.

[7] Herrera L, Yarbrough S, Ghetie V, *et al.* Treatment of SCID/human B cell precursor ALL with anti-CD19 and anti-CD22 immunotoxins [J]. *Leukemia*, 2003, 17(2): 334-338.

[8] Fracasso G, Bellisola G, Cingarlini S, *et al.* Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen [J]. *Prostate*, 2002, 53(1): 9-23.

[9] Fan D, Yano S, Shinohara H, *et al.* Targeted therapy against human lung cancer in nude mice by high-affinity recombinant antimesothelin single-chain Fv immunotoxin [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, 1(8): 595-600.

[10] Peipp M, Kupers H, Saul D, *et al.* A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2848-2855.

[11] Joshi BH, Leland P, Silber J, *et al.* IL-4 receptors on human medulloblastoma tumours serve as a sensitive target for a circularly permuted IL-4-*Pseudomonas* exotoxin fusion protein [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(2): 285-291.

[收稿日期] 2002 - 12 - 12

[修回日期] 2003 - 03 - 30

2004 港沪肝病会议征文报名启事

“2004 年港沪国际肝病学术会议——第 5 届上海国际肝癌肝炎会议、第 3 届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”将如期于 2004 年 2 月 14 - 17 日在香港会展中心召开。程思远、吴阶平两位原副委员长为名誉主席,中国工程院院士、复旦大学肝癌研究所所长汤钊猷教授和香港大学医学院院长林兆鑫教授为大会主席,并由国内吴孟超、姚光弼、李载平等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者 80 余人作专题报告。欢迎国内外从事肝病(肝炎、肝癌、肝纤维化、肝硬化、脂肪肝、肝移植)基础与临床研究的专家、学者参加大会(投稿与否不限)。参加会议者均可获得继续教育学分。为满足国内外代表参加这一高水平、高规格的国际肝病会议,大会决定国内代表会务费标准为人民币 800 元(境外代表为 500 美元)。报名表函索即寄。有关会议的详情,可查询 www.hepa2004.org 网站。为确保及时办理出境签证,国内投稿(请撰写中英文摘要)及报名须在 2003 年 10 月 15 日以前寄:上海市医学院路 136 号(200032)复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。

电 话:(021)64041990 转 2436(或 2136)分机

传 真:(021)64037181

电子信箱:qiusj68@zshospital.net

2004 年港沪国际肝病学术会议上海秘书处