

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0244-04

TGF-α 与绿脓杆菌外毒素融合蛋白的表达、纯化及对肿瘤细胞的杀伤作用

李 琤, 夏 辉, 马 洁 (中国医学科学院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

[摘 要] **目的:** 表达并纯化转化生长因子 α 与绿脓杆菌外毒素融合蛋白(TGFα-PE40), 探讨其对 EGF 受体(EGFR)阳性肿瘤细胞的靶向杀伤作用。**方法:** 用 pET28a 表达载体构建表达 TGFα-PE40 蛋白的重组体 pV28, IPTG 诱导其表达后, 提取包涵体蛋白并用 Ni 柱纯化, MTT 法观察复性融合蛋白对肿瘤细胞 A431 和 SK-OV3 的杀伤效用。**结果:** 成功构建基因重组质粒 pV28, 纯化后的包涵体蛋白中 TGFα-PE40 蛋白纯度达 98% 以上, 这种活性毒素蛋白对 EGFR 高表达的 A431 癌细胞抑制率为 50% (IC₅₀) 时所需蛋白浓度为 (0.86 ± 0.07) μg/ml, 低于 EGFR 低表达的 SK-OV3 癌细胞的 IC₅₀ (6.37 ± 2.18 μg/ml), 差异显著 (P < 0.05)。**结论:** 融合蛋白 TGFα-PE40 对肿瘤细胞的毒性与肿瘤细胞表面表达的 EGFR 数量成正相关, 可选择性杀伤肿瘤细胞。

[关键词] 绿脓杆菌外毒素; TGF-α; 融合蛋白; EGF 受体; 肿瘤

[中图分类号] R730.5 [文献标识码] A

Expression, Purification of Fusion Protein TGFα-PE40 and the Cytotoxicity of TGFα-PE40 on Tumor Cells

Li Zheng, Xia Hui, Ma Jie (Cancer Institute, PUMC, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To express and purify transforming growth factor α (TGFα)-pseudomonas exotoxin 40 and investigate its cytotoxic effect on cancer cells overexpressing epidermal growth factor (EGF) receptor. **Methods:** Recombinant plasmid pV28 was constructed by inserting the gene coding TGFα-PE40 into the vector pET28a Expression of fusion protein was conducted using the host BL21. Production of the recombinant protein was induced by IPTG, following extraction and purification of inclusion bodies with His-tag purification system. Cell viability assay (by MTT) was performed to determine the cytotoxic effect of TGFα-PE40 on cancer cells (A431 and SK-OV3). **Results:** Recombinant plasmid pV28, which expresses TGFα-PE40, was constructed successfully. Purity of TGFα-PE40 was about 98% after a purification procedure using His-tag column. Cytotoxic experiment showed that at a concentration of 0.86 ± 0.07 μg/ml, TGFα-PE40 could reduce 50% viability of A431, which has high expression of EGFR. Whereas the IC₅₀ for ovarian cancer cell SK-OV3, which expresses less EGFR, was 6.37 ± 2.18 μg/ml. There was a significant difference between these two groups (P < 0.05). **Conclusion:** The cytotoxicity ability of the fusion protein on tumor cells depends on the number of the EGFR presented on tumor cells.

[Key words] pseudomonas extoxin 40; TGF-α; fusion protein; EGF receptor; tumor

* 绿脓杆菌外毒素 A(pseudomonas exotoxin A, PE) 是一个 66 kD 的单链毒素蛋白, 它有 3 个结构域^[1], 其中 Ia 区负责细胞识别, 使 PE 与靶细胞结合; II 区是转位区, 使之能够进入细胞浆; III 区是活性区, 催化延长因子 2(elongation factor 2, EF2) ADP 核糖基化, 导致 EF2 失活, 阻碍蛋白合成, 最终导致细胞死亡^[2], Ib 区功能至今不明。如果将 Ia 区去除, 就产生了 40 kD 的蛋白 PE40^[3], 这种蛋白因为失去和细胞受体结合的能

力, 所以不具有细胞毒性, 但是利用基因工程手段对 PE40 基因进行修饰, 比如将转化生长因子 α(transforming growth factor type alpha, TGF-α), IL-2, IL-4, CD4

[基金项目] 国家自然科学基金(30171507)

[作者简介] 李 琤 (1975-), 女, 天津人, 实习研究员, 主要从事肿瘤的免疫治疗研究

[通讯作者] 马 洁, E-mail: jiem2000@yahoo.com

或抗体可变区与 PE40 5'端耦联,就能产生可以特异性识别和杀伤靶细胞的融合毒素^[4-8]。由于这种融合蛋白可以特异性的与细胞表面相应的受体或抗原结合,可以用来实现靶向治疗目的。

本研究利用高表达、易纯化的载体 pET28a 与 TGF α -PE40 进行重组、表达、纯化出有毒性的融合毒素,并观察了其在体外实验中对肿瘤细胞的杀伤作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞系和主要材料

卵巢癌细胞系 SK-OV3 由医科院肿瘤所张叔人教授惠赠;皮肤癌细胞系 A431 购自医科院基础所。含 TGF α -PE40 基因的重组菌 pVC33 购自美国 ATCC。携 T7RNA 聚合酶基因的大肠杆菌 BL21(λ DE3)及质粒 pET28a 由医科院肿瘤所刘芝华教授惠赠。限制性内切酶 BamH I, Nde I 及 T₄DNA 连接酶购自 Takara 公司。His-tag 蛋白纯化系统购自 Amersham Pharmacia 公司。PE、MTT、谷胱甘肽、IPTG 为 Sigma 产品。

1.2 融合蛋白表达质粒的构建及鉴定

提取重组菌中质粒 pVC33 并纯化,以 BamH I 和 Nde I 内切载体 pET28a 和 pVC33,回收 5.3 kb 的载体片段和 1.38 kb 的目的基因片段,用 T₄DNA 连接酶连接,命名为 pV28,转化 BL21 菌,卡那霉素抗性筛选,挑阳性菌落,扩增并提取质粒, BamH I 和 Nde I 双酶切鉴定(图 1)。

图 1 pV28 的基因重组示意图

Fig. 1 Schematic diagram of gene recombinant pV28

1.3 诱导重组体 pV28 的表达

挑单菌落制备 10 ml 过夜菌,1:50 接于 500 ml Kan⁺LB 中,37℃ 摇至 OD₆₀₀ ≈ 0.6 时,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导 4 h。

1.4 包涵体蛋白的提取及变性

4℃ 4 000 r/min 离心集菌 15 min,按 10 ml/g 沉淀加入 25 mmol/L TE,另按每克湿重菌体加入 80 μ l 10

mg/ml 溶菌酶,室温搅动 30 min 后超声破菌,4℃ 15 000 r/min 离心 15 min 后分别用 10 ml 0.5% TritonX-100、2 mol/L 尿素、25 mmol/L TE 洗涤沉淀,然后用 300 μ l 变性液(含 10 mmol/L PB pH = 8.3, 8 mol/L 尿素,4 mmol/L β 巯基乙醇)悬浮沉淀。

1.5 包涵体蛋白的纯化及复性

用含 8 mol/L 尿素的平衡缓冲液平衡 Ni 柱后将变性蛋白上柱,收集流出液,用含尿素的结合缓冲液洗柱,收集洗涤液,用 300 mmol/L 的洗脱液洗脱并收集蛋白质组份,将洗脱物逐滴加入复性液中(成分为 10 mmol/L PB pH = 8.3, 500 mmol/L GSH, 200 mmol/L GSSG),剧烈振荡后 10℃ 放置 14 ~ 16 h,然后对 10 mmol/L PB 透析并浓缩。以上各步骤留样进行 10% SDS-PAGE,鉴定 TGF α -PE40 蛋白表达及纯化情况。

1.6 TGF α -PE40 对肿瘤细胞的杀伤(MTT 法)

培养 A431,SK-OV3 细胞,调细胞浓度至 1×10^4 /孔,加入 96 孔板,孵育过夜后加入不同浓度的复性蛋白 TGF α -PE40(10 ng/ml,100 ng/ml,500 ng/ml,1 μ g/ml,5 μ g/ml,10 μ g/ml,20 μ g/ml,40 μ g/ml),阳性对照组按上述浓度加入 PE,空白对照加透析液 PB,37℃ 孵育 24 h,每孔加入 10 mg/ml MTT 20 μ l,4 h 后每孔加 100 μ l DMSO,酶标仪测定 OD₄₉₀ 值,比较 A431 和 SK-OV3 的 IC₅₀ 值。

2 结 果

2.1 基因重组鉴定

pVC33 中的 TGF α -PE40 基因片段与表达载体 pET28a 重组后,得到约 6.7 kb 的重组体 pV28,用 BamH I 和 Nde I 双酶切该重组体可得到约 1.4 kb 的目的片段和 5.3 kb 的载体片段,证明目的基因 TGF α -PE40 已与 pET28a 载体相连(图 2)。

2.2 TGF α -PE40 蛋白表达与 Ni 柱纯化

如(图 3) SDS-PAGE 可见,经 IPTG 诱导后, BL21 菌可以表达 51 kD 的 TGF α -PE40 蛋白,未经 IPTG 诱导的菌则无此蛋白表达。诱导的 BL21 经溶菌酶和超声破菌后离心,上清中未见目的蛋白条带,而沉淀经洗涤变性粗纯后,目的条带的蛋白纯度占 70% 以上,说明目的蛋白存在于包涵体中。因 pET28a 载体表达的目的蛋白带有多个 His(组氨酸)的尾序列,所以可与 Ni 柱结合得到纯化,纯化后的 TGF α -PE40 蛋白纯度达 98% 以上。取 0.5 μ l,1 μ l,2 μ l 洗脱蛋白与 2 μ g 标准 BSA 一起电泳,经考马斯亮蓝染色扫描定量,知纯化后的蛋白浓度为 3 mg/ml。

2.3 体外杀伤肿瘤细胞(MTT)

由图 4(A)可见,TGF α -PE40 对皮肤癌细胞 A431

的最大抑制率为 71% , IC₅₀(对细胞抑制率达 50% 时所需的蛋白浓度)为 0.86 ± 0.07 μg/ml, PE 对 A431 的 IC₅₀为 2.01 ± 0.58 μg/ml,明显高于 TGFα-PE40 组, *P* < 0.05。由图(4B)可以看出, TGFα-PE40 对卵巢癌细胞 SK-OV3 的最高抑制率为 64% , IC₅₀为 6.37 ± 2.18 μg/ml, PE 对 SK-OV3 的 IC₅₀为 3.63 ± 1.41 μg/ml,对 SK-OV3 2 组无明显差别(*P* > 0.05)。TGFα-PE40 对 A431 的 IC₅₀明显低于 SK-OV3(*P* < 0.05)。

明,采用 pET28a 作为表达载体比 pVC33 原载体 pAR2156 表达效率更高(数据未列),并且使用 pET28a 可以为表达的目的蛋白加上多组氨酸(His)尾序列,适合于 Ni 柱的亲层析纯化,这种纯化方法比离子交换层析具有更强的特异性,易于达到更好的纯化效果。

图 2 BamH I /Nde I 双酶切 pV28 电泳图

Fig.2 Electrophoresis map of restriction enzyme digestion analysis of pV28

1: DNA marker; 2~3: BamHI/NdeI restriction fragments of pV28

图 3 TGFα-PE40 的 10% SDS-PAGE 蛋白电泳图
Fig.3 SDS-PAGE analysis of TGFα-PE40 before and after purification by Ni-sepharose column

1: Total protein before IPTG induction; 2: Total protein after IPTG induction; 3: Denatured inclusion body protein of TGFα-PE40; 4~5: Purification protein of TGFα-PE40; 6: Marker; 7: Flow through sample from Ni column; 8: Elution sample from Ni column

3 讨论

本研究切割 pVC33 质粒上的 TGFα-PE40 基因片段,与表达载体 pET28a 进行重组,构建了可以表达融合毒素 TGFα-PE40 的重组质粒 pV28。实验结果表

图 4 TGFα-PE40 及 PE 对肿瘤细胞 A431 和 SK-OV3 的杀伤效用

Fig.4 Cytotoxicity of TGFα-PE40 and PE on tumor cells A431 or SK-OV3

A: A431; B: SK-OV3

pV28 在大肠杆菌 BL21 中表达的蛋白仅存在于包涵体中,菌液上清中未发现目的蛋白的存在,这种包涵体蛋白需经变性和复性过程才具备生物学活性,但复性之后进行的各种操作都会使蛋白活性受到影响,因此采用粗纯之后的变性包涵体蛋白装柱纯化,此时蛋白尚不具活性,并且此时蛋白未折叠形成三级结构,组氨酸尾序列暴露在外,更易与 Ni 柱结合,提高了纯化效率。纯化后再进行复性透析,更好的保存了 TGFα-PE40 蛋白的生物学活性。

TGFα-PE40 杀伤肿瘤细胞的基础是 TGF-α 和多数肿瘤细胞表面高表达的 EGF 受体(EGFR)可以特异性结合^[9],然后将 PE40 毒素导入肿瘤细胞进行蛋白合成抑制,最终杀死肿瘤细胞。EGFR 是 TGF-α 的特异性配体,它在许多癌细胞表面呈现高表达状态,如肺癌,乳腺癌,膀胱癌,胰腺癌以及神经系统恶性肿瘤等等^[10-14]。有人尝试将 A431 的 EGFR 封闭,A431 的致

瘤性就下降,说明过表达的 EGFR 可以充当癌基因^[15]。在人体正常组织中,只有肝脏有较多 EGFR 存在,致使这种毒素在系统应用时须严格考虑其剂量限制性^[16]。

TGF α -PE40 介导的细胞毒作用大概分几个步骤进行^[17]: 1) TGF- α 融合毒素与肿瘤细胞表面高表达的 EGFR 结合; 2) 整个毒素分子转位进入胞浆中的披网格蛋白小泡 (clathrin-coated vesides); 3) 毒素分子裂解为转位区 (Domain II) 和蛋白合成抑制区 (Domain III); 4) Domain III 使肿瘤细胞胞浆中的延长因子 2 (EF2) 发生 ADP 核糖基化, 阻断胞内蛋白质合成, 杀死肿瘤细胞。这种毒素对缺乏 EGFR 的肿瘤细胞无效。

本实验中采用了两种 EGFR 数量差别较大的肿瘤细胞, 每个 A431 细胞表面 EGFR 为 3×10^6 ^[18], 而每个 SK-OV3 细胞 EGFR $< 2 \times 10^5$ ^[19]。在细胞数相同的条件下, 抑制 50% 细胞蛋白合成 (IC_{50}) 时, A431 需 TGF α -PE40 浓度为 $0.86 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$, 而 SK-OV3 则需浓度为 $6.37 \pm 2.18 \mu\text{g/ml}$, 前者明显低于后者 ($P < 0.05$)。这一结果说明 TGF α -PE40 对靶细胞蛋白质的抑制作用依赖于细胞表面 EGFR 分子数, 当肿瘤细胞表面有较高 EGFR 表达时, 结合 TGF α -PE40 能力强, 对该毒素的药物敏感性高; 而较低表达 EGFR 的细胞对 TGF α -PE40 的毒性反应较弱。PE 对 A431 的 IC_{50} 高于 TGF α -PE40 ($P < 0.05$), 而 PE 与 TGF α -PE40 对 SK-OV3 的 IC_{50} 却无显著性差异 ($P > 0.05$), 考虑是由于 PE 对 EGFR 较多细胞的非特异性杀伤较 TGF α -PE40 的靶向性杀伤作用低, 但对 EGFR 较少的细胞这种靶向性作用就不明显。总之, 利用 TGF α -PE40 融合毒素可选择性的杀伤肿瘤细胞, 克服 PE 的非特异性杀伤引起的副作用, 起到靶向治疗, 减少对正常细胞损害的目的。

本研究利用重组质粒表达并纯化出了有活性的 TGF α -PE40 融合蛋白, 并进一步证实肿瘤细胞对该毒素的敏感性与肿瘤细胞表面 EGFR 的数量成正相关。TGF α -PE40 可以应用于肿瘤的靶向治疗领域, 这一结果为进一步的动物实验、临床试验提供了前提, 也为进一步研制特异性更强的单链抗体-PE40 等不同形式的融合毒素进行肿瘤杀伤开辟了道路。

[参 考 文 献]

[1] Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, *et al.* Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83 (5): 1320-1324.
 [2] Hwang J, Fitzgerald DJ, Adhya S, *et al.* Functional domains of pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. Coli* [J]. Cell, 1987, 48 (1): 129-136.
 [3] Kondo T, Fitzgerald D, Chaudhary VK, *et al.* Activity of immunotoxins constructed with modified *Pseudomonas* exotoxin A lacking

the cell recognition domain [J]. J Biol Chem, 1988, 263 (19): 9470-9475.

- [4] Chaudhary VK, Fitzgerald DJ, Adhya S, *et al.* Activity of a recombinant fusion protein between transforming growth factor type alpha and *Pseudomonas* toxin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84 (13): 4538-4542.
 [5] Lorberboum-Galski H, Fitzgerald D, Chaudhary V, *et al.* Cytotoxic activity of an interleukin 2-*Pseudomonas* exotoxin chimeric protein produced in *E. coli* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85 (6): 1922-1926.
 [6] Ogata M, Chaudhary VK, Fitzgerald DJ, *et al.* Cytotoxic activity of a recombinant fusion protein between interleukin 4 and *Pseudomonas* exotoxin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86 (11): 4215-4219.
 [7] Chaudhary VK, Mizukami T, Fuerst TR, *et al.* Selective killing of HIV-infected cells by recombinant human CD4-*Pseudomonas* exotoxin hybrid protein [J]. Nature, 1988, 335 (6188): 369-372.
 [8] Brinkmann U, Pai LH, Fitzgerald DJ, *et al.* B3 (Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88 (19): 8616-8620.
 [9] Shoyab M, Plowman GD, McDonald VL, *et al.* Structure and function of human amphiregulin: A member of the epidermal growth factor family [J]. Science, 1989, 243 (4894 pt 1): 1074-1076.
 [10] Draoui M, Siegall CB, Fitzgerald D, *et al.* TGF alpha-PE40 inhibits non-small cell lung cancer growth [J]. Life Sci, 1994, 54 (7): 445-453.
 [11] Sainsbury JR, Farndon JR, Sherbet GV, *et al.* Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer [J]. Lancet, 1985, 1 (8425): 364-366.
 [12] Neal DE, Marsh C, Bennett MK, *et al.* Epidermal-growth-factor receptors in human bladder cancer: Comparison of invasive and superficial tumours [J]. Lancet, 1985 (8425), 1: 366-368.
 [13] Baldwin RL, Kobrin MS, Tran T, *et al.* Cytotoxic effects of TGF-alpha-pseudomonas exotoxin a fusion protein in human pancreatic carcinoma cells [J]. Pancreas, 1996, 13 (1): 16-21.
 [14] Libermann TA, Razon N, Bartal AD, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors [J]. Cancer Res, 1984, 44 (2): 753-760.
 [15] Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, *et al.* Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice [J]. Cancer Res, 1986, 46 (9): 4701-4705.
 [16] Pastan I, Fitzgerald D. Recombinant toxins for cancer treatment [J]. Science, 1991, 254 (5035): 1173-1177.
 [17] Phillips PC, Levow C, Catterall M, *et al.* Transforming growth factor- α -*Pseudomonas* exotoxin fusion protein (TGF-alpha-PE38) treatment of subcutaneous and intracranial human glioma and medulloblastoma xenografts in athymic mice [J]. Cancer Res, 1994, 54 (4): 1008-1015.
 [18] Siegall CB, Xu YH, Chaudhary VK, *et al.* Cytotoxic activities of a fusion protein comprised of TGF- α and *Pseudomonas* exotoxin [J]. FASEB J, 1989, 3 (14): 2647-2652.
 [19] Modjtahedi H, Komurasaki T, Toyoda H, *et al.* Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGF alpha, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of epiregulin to EGFR-expressing tumours [J]. Int J Cancer, 1998, 75 (2): 310-316.

[收稿日期] 2004 - 02 - 17

[修回日期] 2004 - 05 - 10