

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0013-06

抗前列腺癌细胞特异抗体库的构建及特异结合抗体的筛选

田 媛, 秦 奎, 胡宝成, 黄翠芬 (军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

[摘 要] **目的:** 获得前列腺癌的噬菌体呈现型单链抗体库, 筛选与前列腺癌特异结合的抗体, 为前列腺癌的诊断和治疗奠定基础。**方法:** 用两种恶性程度较高的前列腺癌细胞 PC3, DU145 膜蛋白混合物免疫 Balb/c 小鼠。取脾脏提取总 RNA, 用 RT-PCR 分别扩增抗体重、轻链可变区基因(V_H 和 V_L), 经 Linker 连接形成 ScFv 基因片段, 将 ScFv 基因片段与噬菌粒载体 pCANTAB 5E 的连接产物转化大肠杆菌 TG1。用辅助噬菌体 M13KO7 进行超感染, 获得重组噬菌体抗体。以恶性程度低的前列腺癌细胞 LNCap 为对照, 用 PC3 细胞对重组噬菌体抗体库进行五轮筛选后, 随机挑取克隆, 经 phage-ELISA 筛选特异性结合 PC3 细胞的 ScFv。**结果:** 用所构建的库容量为 3.5×10^6 的单链抗体库筛选特异结合抗体, 得到一个与 PC3 细胞特异结合的噬菌体-单链抗体。**结论:** 本研究所构建的抗体库中可筛选到与前列腺癌细胞结合特异性较好的抗体, 可用于前列腺癌的诊断和治疗中。

[关键词] 噬菌体展示; 前列腺癌; 单链抗体库; 筛选

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

Construction of the Antibody Library and Selection of the Antibodies Specifically Binding to the Prostate Carcinoma Cells

TIAN Yuan, QIN Xi, HU Bao-cheng, HUANG Cui-fen (Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain phage-displayed ScFv library directly against prostate carcinoma cells, and select antibodies binding to prostate carcinoma cells specifically, so as to lay a foundation for developing diagnostic agents and clinical therapies of prostate carcinoma. **Methods:** Balb/c mice were immunized i. p. with purified membrane protein mixture of prostate carcinoma cells PC3, DU145. mRNA was isolated from the spleens of immunized mice, heavy and light chain genes (V_H and V_L) of antibody were amplified separately by RT-PCR and assembled into ScFv gene with a specially constructed linker DNA. , the ScFv gene was ligated into the phagemid vector pCANTAB 5E and the ligated sample was transformed into competent *E. coli* TG1. The transformed cells were infected with M13KO7 helper phage to yield recombinant phage. After five rounds of panning with PC3 cells, the positive clones were selected with the ELISA from the enriched phages. **Results:** A ScFv library of 3.5×10^6 was obtained and one phage-ScFv which can bind specifically PC3 cells was found. **Conclusions:** A prostate carcinoma specific antibody was identified , which paves a way for study of prostate carcinoma.

[Key words] phage display; prostate carcinoma; ScFv library; selection

前列腺癌是西方国家男性第二位常见恶性肿瘤, 我国前列腺癌发病率逐年上升^[1]。因前列腺位置隐蔽, 症状隐匿及缺乏特异性, 确诊时已有 60% ~ 80% 的病人有不同程度的转移, 因此早期诊断就显得尤为重要。本研究拟用噬菌体展示技术构建抗前列腺癌细胞特异单链抗体库, 并对其特异抗体进行筛选, 旨在寻找与前列腺癌特异结合的抗体, 为前列腺癌的早期诊断及治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株和菌株

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 30271458)

[作者简介] 田媛(1977-), 女, 博士研究生, 主要从事肿瘤特异抗体库的构建及特异抗体的筛选研究

[通讯作者] 胡宝成, E-mail: baocheng@ nic. bmi. ac. cn

前列腺癌细胞株 PC3, DU145, LNCap 由本室周建光教授提供。人宫颈癌细胞 HeLa, 大肠杆菌 TG1、Top10 为本室保存。

1.2 细胞培养

PC3, DU145 前列腺癌细胞培养条件: 含 10% 新生牛血清(NBS, 杭州四季青)的 RPMI-1640(Gibco/BRL) 培养基; LNCap 前列腺癌细胞培养条件: 含 10% 胎牛血清(FBS, Hyclone)的 RPMI-1640(Gibco/BRL) 培养基。3 株细胞均为常规 37℃, 5% CO₂ 条件培养。

1.3 动物

4~6 周龄雌性 Balb/c 鼠, 购自本院实验动物中心。

1.4 主要试剂

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂均为美国 Sigma 公司产品; 鼠 ScFv 构建试剂盒为瑞典 Pharmacia 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品; Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Sfi I 和 Not I 限制性内切酶均为日本 TaKaRa 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 均为中山公司产品; 抗 M13 兔多抗为本院三所八室馈赠; RPMI-1640 培养基购自 GIBCO-BRL 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; PEG8000 购自华美公司; 淋巴细胞分离液购自天津市川页生化制品有限公司; 其它常用试剂按照 Pharmacia 公司 ScFv 构建试剂盒说明书配制。

1.5 PC3, DU145 细胞膜蛋白提取

用非离子型去污剂提取细胞膜蛋白, 以下操作全部在 4℃ 或冰浴中进行。首先收集培养细胞, 将细胞悬浮在冰冷的 PBS 中, 调整浓度至 5×10^6 /ml, 4℃, 1 800r/min 离心 5 min, 弃上清后, 再用冰冷的 PBS 洗涤 1 次。重新用含蛋白酶抑制剂的 Triton X-100 裂解缓冲液悬浮细胞, 细胞浓度为 10^8 /ml, 将细胞悬液在 4℃ 或冰浴中放置 30~40 min, 不时轻轻的振摇悬液。将全部裂解物转移到 1.5 ml 的离心管中, 4℃, 10 000 × g 离心 15 min。小心吸取和保留上清液, 即为细胞膜蛋白混合物。

1.6 Balb/c 鼠免疫

用上述所提膜蛋白免疫 Balb/c 鼠, 初次免疫辅以弗氏完全佐剂, 第 2, 3, 4, 5 次免疫辅以弗氏不完全佐剂, 免疫时间间隔分别为 4, 2, 2, 2 周。各次免疫均采用腹腔注射, 每次免疫用蛋白量均为 200~300 μg/只。末次免疫后 3 d 摘眼球取血, ELISA 检测血清效价, 处死小鼠, 取脾脏。

1.7 免疫小鼠脾细胞总 RNA 的提取

将血清效价滴度较高的小鼠脾脏破碎, 用鼠淋巴

细胞分离液分离淋巴细胞, 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。

1.8 单链抗体可变区片段(single-chain antibody fragment V-region, ScFv) DNA 的构建

1.8.1 RT-PCR 扩增 V_H 和 V_L cDNA

按 ScFv 构建试剂盒说明, 以总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 第一链, 以第一链为模板, PCR 扩增 V_H 和 V_L cDNA, (30 个循环: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min)。

1.8.2 ScFv DNA 的构建及扩增

按 ScFv 构建试剂盒要求, 将 V_H、V_L 和 Linker 引物等摩尔混合后, 经 PCR 进行聚合和填充反应(7 个循环: 94℃ 1 min, 63℃ 4 min), 使 V_H 和 V_L 与 Linker DNA 连接到一起, 形成 ScFv DNA。然后再加入限制性内切酶位点引物, 进行 PCR 反应(30 个循环: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min), 使聚合的 ScFv 得到扩增并在 5' 端引入 Sfi I 限制性内切酶酶切位点, 3' 端引入 Not I 限制性内切酶酶切位点。

1.9 重组噬菌体抗体 ScFv 文库的构建

用 Sfi I 和 Not I 酶切 ScFv DNA, 纯化后连入用相同酶切的噬菌粒载体 pCANTAB 5E 上, 连接产物电转化大肠杆菌 TG1, 将转化物涂于含 100 μg/ml 氨苄(A) 和 2% 葡萄糖(G) 的 SOBAG 平皿上, 30℃ 培养至长出克隆, 据长出的克隆数计算库容量。在每个平皿中加入适量的 2 × YT 培养基, 刮下菌落, 加甘油至 15%~30%, 保存于 -70℃。取部分菌液用 2 × YT-AG 稀释至 A₆₀₀ = 0.3, 37℃ 摇 1 h, 加入辅助噬菌体 M13K07 至终浓度 4×10^9 pfu, 37℃ 再摇 1 h, 离心弃上清, 用 2 × YT-AK 培养基重悬菌体沉淀, 37℃ 过夜培养, 离心, 收上清, 加入 1/5 体积的 20% PEG8000 和 2.5 mol/L NaCl 沉淀噬菌体, 将沉淀物溶解后过滤除菌。通过转导大肠杆菌 TG1, 计算氨苄抗性菌落数来滴定重组噬菌体的量。

1.10 以 PC3 细胞亲和筛选重组噬菌体-ScFv 文库

将 PC3 和 LNCap 细胞各加入细胞板上的 2 孔, 待铺满后用 3% BSA-PBS 封闭 2 h, 在 LNCap 细胞孔中加入 5×10^{11} cfu 重组噬菌体, 37℃ 孵育 2 h, 吸出噬菌体加入 PC3 细胞孔中, 37℃ 再孵育 2 h, 用 PBS 充分洗涤后以 0.1 mol/L HCl-Glycine 洗脱噬菌体, 1 mol/L Tris (pH8.0) 中和, 洗脱液感染对数期的 TG1, 菌液涂布 SOBAG 平板, 30℃ 培养, 重新制备重组噬菌体。如此反复结合、洗脱、再感染五轮。

1.11 Phage-ELISA 方法检测与靶细胞结合的重组噬菌体

分别以 PC3 和 LNCap 细胞作靶标, 从第四轮、第

五轮富集的重组噬菌体中挑选若干个噬菌体为一抗, HRP-标山羊抗 M13 IgG 为二抗, ABTS 为底物进行 ELISA。

1.12 噬菌体-单链抗体的特异性检测

用 LNCap, PC3, HeLa 细胞铺于 96 孔板, 37℃ 培养 36 h。将阳性 phage-ScFv 浓缩后倍比稀释并作为一抗, HRP-标山羊抗 M13 IgG 为二抗, ABTS 为底物进行 ELISA。

1.13 Western 印迹检测可溶性 ScFv 表达

因为 pCANTAB 5E 载体上带有 E tag 标签, 并位于 ScFv 基因的下游, 在适当的宿主菌中可以表达出融合蛋白, 故可用抗 E tag 抗体进行检测。将过夜菌 Top10 以 1:100 转接到 10 ml 新鲜 LB 培养基中, 37℃ 培养至 $A_{600} = 0.3 \sim 0.5$, 取 400 μl 到一新管中, 并加入 2 μl P-9 phage-ScFv (经筛选能够特异结合 PC3 细胞的阳性 phage-ScFv), 37℃ 摇育 30 min, 涂布含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄 (A) 和 2% 葡萄糖 (G) 的 LB-AG 平板, 30℃ 过夜培养。挑取 LB-AG 平板上的单克隆 30℃ 培养过夜, 再 1:100 转接到 10 ml 新鲜 LB-AG 培养基中, 30℃ 摇育 1 h, 1 500r/min 室温离心 10 min, 用含 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄 (A) 和 10^{-3} mol/L IPTG (I) 的 10 ml LB-AI 30℃ 诱导表达 4 h 后, 将菌体超声破碎。用 12% SDS-PAGE 分离, 然后转 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉-PBS 于 4℃ 封闭过夜。用 anti-E-tag-HRP 抗体(溶于 5% 脱脂奶粉-PBS 中)为一抗, 一抗的稀释度为 1:2 000, 室温孵育 2 h, TBST (0.02 mol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween20) 洗 4 遍, 用 ECL 显色系统使 X 光胶片感光, 获得显色条带。以未诱导表达的大肠杆菌 Top10 做阴性对照。

2 结果

2.1 免疫鼠血清 IgG ELISA 效价及脾脏总 RNA 浓度

经五轮免疫后, Balb/c 鼠血清抗 PC3, DU145 细胞膜蛋白混合物效价达到 1:51 200, 说明免疫的效果较好。提取的总 RNA 经紫外分光光度仪测定, A_{260} 为 0.421, A_{280} 为 0.220, $A_{260}/A_{280} = 1.9136$, 纯度较好, RNA 浓度为 0.505 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

2.2 ScFv DNA 的构建

按 ScFv 构建试剂盒说明, 以总 RNA 为模板, 反转录合成 cDNA 第一链, 以第一链为模板, PCR 扩增 V_H 和 V_L cDNA, 分别获得大小为 340 bp 和 320 bp 的片段 (图 1)。将 V_H , V_L 和 Linker 引物等摩尔混合后, 经 PCR 进行聚合和填充反应, 使 V_H 和 V_L 于与 Linker DNA 连接到一起, 形成 ScFv DNA, 获得大小为 750 bp 的片段 (图 2)。

2.3 重组噬菌体抗体 ScFv 文库的构建

将 Sfi I, Not I 酶切的 ScFv 基因与 pCANTAB 5E 载体片段的连接产物转化感受态的大肠杆菌 TG1, 菌液涂布 SOBAG 平板, 长出 4.3×10^6 个氨苄抗性菌落, 对随机挑取的 37 个单菌落进行 PCR 鉴定, 其中扩出 30 个阳性片段, 阳性率 81.1% (图 3), 因此构建的文库容量大约为 3.5×10^6 。

图 1 V_H , V_L PCR 产物纯化片段

Fig. 1 Purified PCR products of V_H and V_L genes

- 1: 320 bp purified PCR product of V_L gene;
- 2: 340 bp purified PCR product of V_H gene;
- 3: DNA marker DL2000

图 2 ScFv PCR 产物纯化片段

Fig. 2 Purified PCR products of ScFv gene

- 1: 750 bp purified PCR product of ScFv gene;
- 2: DNA marker DL2000

2.4 富集和筛选与 PC3 细胞结合的噬菌体-单链抗体

按照方法 1.10 和 1.11 进行, 结果见表 1。从表中可以看出, 经过五轮筛选, 与 PC3 细胞特异结合的噬菌

体得到了富集。挑选第五轮中与 PC3 细胞结合而不与 LNCap 细胞结合的克隆,进行 ELISA 测定。

图3 PCR 鉴定 ScFv 库中目的片段的插入率
Fig. 3 Characterization of ScFv library by PCR
1 ~ 19: Different clones; 20: DNA marker DL2000

表1 PC3 细胞特异性噬菌体抗体的筛选和富集
Tab. 1 Panning and enrichment of PC3 cell-positive phage-ScFv

| | Round 1 | Round 2 | Round 3 | Round 4 | Round 5 |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Input phage - ScFv(pfu) | 1×10^{11} |
| Elute phage - ScFv(pfu) | 3.2×10^5 | 1.25×10^6 | 2.6×10^6 | 3.45×10^6 | 3.26×10^6 |
| E. I. ▲ | 3.9 | 8.1 | 10.8 | 10.2 | |
| Number of tested clones | | | 21 | 42 | |
| Number of PC3 positive clones | | | 2 | 16 | |
| Number of LNCap positive clones | 3 | 21 | | | |

▲ E. I. : Enrichment index

2.5 噬菌体-单链抗体的特异性检测结果

将 ELISA 筛选时与 PC3 细胞呈阳性反应而与 LNCap 细胞呈阴性反应的噬菌体-单链抗体浓缩后倍比稀释再做 ELISA, 发现此噬菌体-单链抗体(P-9)与 PC3 结合最小滴度为 2.7×10^5 cfu/ml, 而与 LNCap 结合最小滴度为 4.3×10^7 cfu/ml, 与 C4-2 结合最小滴度为 4.3×10^7 cfu/ml, 与 HeLa 结合最小滴度为 2.7×10^5 cfu/ml。(与 LNCap 细胞的结合滴度为噬菌体结合背景)。说明它与 PC3 细胞具有较强的结合特异性, 与恶性程度较低的 LNCap 细胞相比, 结合滴度高出 159 倍。而它与宫颈癌细胞 HeLa 也有较好的结合特异性, 因此该 ScFv 可能具有肿瘤特异性。

2.6 测序结果

对 PC3 亲和阳性的噬菌体-单链抗体的 cDNA 进行测序, 得到 1 条序列, 通过 Internet IgBLAST 比较, 确定其 V_H 是一种已知抗体的 V_H , 对磷酸胆碱有免疫应答, 属鼠抗体重链可变区基因 III(C) 亚组; 其 V_L 属鼠抗体 κ 轻链可变区基因家族 IV 组, 此单链抗体命名为 ScFv P-9, 序列结果如图(4)。

2.7 Western 印迹检测可溶性 ScFv 表达

按照 1.13 方法检测可溶性 ScFv 表达, 所用菌株为非抑制性菌 Top10。Top10 菌株不能破译噬菌粒载体上的琥珀密码子, 所以蛋白质翻译在琥珀密码子处停止, 从而只能产生 ScFv 与 E tag 的融合蛋白。从图(5)中可以看出, 在相对分子质量约 30 kD 的位置出现非常特异的条带, 说明 ScFvP-9 的读码框架正确, 且能可溶性表达。

3 讨论

以抗体作为介导分子进行肿瘤靶向治疗的研究, 一直是肿瘤生物治疗领域中的热点之一, 而体内的免疫源性反应和较弱的肿瘤穿透性却阻碍了单克隆抗体进入临床。以基因工程方法获得的小型抗肿瘤抗体具有如下优点: (1) 在制备过程中, 不再需要动物和大规模细胞培养, 从而使制备更为快速、经济。(2) 可提供稳定的遗传背景, 使遗传不稳定的杂交瘤得以挽救和保存, 还可避免因液氮遗漏等原因造成的杂交瘤丢失。(3) 容易进行基因水平上的控制和操作(包括对抗体基因进行测序、突变等)。同时, 也容易实现抗体基因与其它分子(如毒

素、细胞因子等)基因的融合。(4)对异源性抗体而言,因抗体分子小,用于在体内研究时不易产生抗体反应及过敏反应。(5)穿透力增强,容易进入肿瘤周围的微循环。(6)血循环及全身廓清除快,半衰期短,肾脏蓄积少。(7)无Fc段,不与具有Fc

受体的非靶细胞结合,利于影像学诊断^[3-6]。本研究利用抗体库技术筛选出一株前列腺癌细胞结合特异性较好的单链抗体,为前列腺癌的诊治奠定了基础。

```

MAQVQLQQSGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFT DYYMSWVRQPPGKALEWLG FIRN
VH                FR1                VH-CDR1                FR2
KANGYTTEYSASVKGRFTISRDNQSILYLQMNTRAE SATYYCAR PYYRYDGTFA
                VH-CDR2                FR3                VH-CDR3
YRGHYWGQCTTVTVSS CCGCGSGGGSGGGSDIELTQSPTTMAASPGEKITITC SAS
FR4      VH      Linker      VL      FR1
SSISSNYLHWYQKPGFSPKLLIY STSNLASGVPARFSCSGSGTYSYSLTISRMEAEDAA
VL-CDR1      FR2      VL-CDR2      FR3
TYYC QQRSSYPFTFGSGTKLEIK
                VL-CDR3      FR4      VL
    
```

图4 p-9 ScFv 的氨基酸序列

Fig. 4 Amino acid sequence of p-9 ScFv gene

V_H: Variable region of heavy chain; V_L: Variable region of light chain; CDR: Complementary determining region

图5 p-9 ScFv 可溶性表达分析

Fig. 5 Analysis of Soluble p-9 ScFv expression

1: Induced with IPTG; 2: Non-induced

本研究先采用细胞膜蛋白混合物免疫小鼠,即先提取细胞膜蛋白,这样可以去除细胞胞浆内的杂质及细胞核,使得细胞膜抗原的有效浓度增加,从而使得所建抗体库更具针对性。同类实验还未见报道。

应用抗体库进行肿瘤特异性抗体的筛选,应使所构建的抗体库包括的抗体基因尽量反映体内实际情况。构建抗体库的诸多环节对抗体库质量都有影响,因此在构建抗体库时我们力求保证抗体库的多样性:(1)RT-PCR时,我们提取小鼠脾总RNA,可降低RNA

分解的几率;(2)由于噬菌粒载体 pCANTAB 5E 是我们自己制备的,故在与 ScFv DNA 连接之前,对载体进行了去磷酸化处理,减少载体自连几率;(3)制备高质量的感受态细胞,优化电转化参数,可以提高转化效率,增加库容量;结果得到一个库容为 4.3×10^6 的抗体库,其含目的片段的阳性率为 81.1%,这说明抗体库在构建过程中的质量是比较好的。

在富集单链抗体时采用了固相细胞筛选,而非单一抗原。由于细胞膜成分极其复杂,非特异性噬菌体抗体结合到细胞的几率更大,且膜表面抗原密度很低,给抗体筛选带来了一定困难,并很难获得针对某一抗原的单链抗体。但国外已有大量研究表明用复杂抗原筛选可以得到较好的结果^[7]。在固定细胞时采用了甲醇:丙酮(1:1)固定细胞,这一操作可能会影响细胞抗原的天然性状,使筛选的难度增加。今后可以考虑其他筛选方法,例如活细胞筛选或体内筛选等,更好的模拟抗原的天然构象。

虽然利用复杂抗原进行抗体库的筛选还存在一些问题,但因为其不可替代的优势使得这种方法仍具有很好的前景。

[参考文献]

[1] 孙杰. 前列腺癌的诊断及治疗进展[J]. 中国男科学杂志, 2002, 17(1): 58.
 [2] 沈关心, 周汝麟. 主编. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998. 390-391.

- [3] Goel A, Augustine S, Raranowska-Kortylewicz J, *et al.* Single-Dose versus fractionated radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using ^{131}I -labeled multivalent CC49 single-chain fvs[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(1): 175-184.
- [4] Khare PD, Shao-Xi L, Kuroki M, *et al.* Specifically targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing cell by a retroviral vector displaying single-chain variable fragmented antibody to CEA and carrying the gene for inducible nitric oxide synthase[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 370-375.
- [5] Schmidt M, McWatters A, White RA, *et al.* Synergistic interaction between an anti-p185HER-2 pseudomonas exotoxin fusion protein [ScFv(FRP5)-ETA] and ionizing radiation for inhibiting growth of ovarian cancer cells that overexpress HER-2[J]. *Gynecol Oncol*, 2001, 80(2): 145-155.
- [6] Mayer A, Tsiompanou E, O'Malley D, *et al.* Radioimmunoguided surgery in colorectal cancer using a genetically engineered anti-GFA single chain Fv antibody [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(5): 1711-1719.
- [7] Foy BD, Killeen GF, Frohn RH, *et al.* Characterization of a unique human single-chain antibody isolated by phage-display selection on membrane-bound mosquito midgut antigens[J]. *J Immunol Methods*, 2002, 261(1-2): 73-83
- [收稿日期] 2004 - 07 - 05 [修回日期] 2004 - 11 - 20
[本文编辑] 韩 丹,王 莹

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2005)01-0018-01

^{125}I 标记 Ki67 反义多肽核酸对裸鼠人肾癌移植瘤的抑制作用

郑骏年, 孙晓青, 陈家存, 吴 松, 李 望, 刘俊杰, 陈兴田(徐州医学院附属医院泌尿外科, 江苏 徐州 221002)

放射性核素反义治疗是近年来提出的一种新的肿瘤治疗策略, 它将反义技术抑制癌基因表达与放射性核素基因靶向照射有机结合, 从而提高治疗效果。我们既往研究发现 ^{125}I 标记肿瘤增殖基因 Ki67 反义多肽核酸(^{125}I -PNAs) 具有较强的体外抑制肾癌细胞增殖、促进凋亡作用。本研究通过建立裸鼠人肾癌移植瘤模型, 进一步观察其在体内对靶基因表达及肿瘤生长的抑制作用。

建立裸鼠人肾癌移植瘤模型, 待肿瘤长至 0.5 cm 大小时, 将荷瘤小鼠随机分成 4 组, 每组 12 只, 每天瘤体注射药物, 连续 4 d。 ^{125}I -PNAs 治疗组: 0.1 ml ^{125}I -PNAs (7.4 MBq /L, 10 nmol/L); PNAs 治疗组: 0.1 ml PNAs (10 nmol/L); ^{125}I -Na 治疗组: ^{125}I -Na (7.4 MBq /L); 对照组: 0.1 ml 培养基。药物处理后第 12 天处死小鼠, 取瘤组织测量肿瘤体积及抑瘤率, 采用免疫组化、Western 印迹技术检测 Ki67 表达, 免疫组化 TUNEL 法检测细胞凋亡。

结果发现, ^{125}I -PNAs, PNAs 均可明显抑制移植瘤生长 ($P < 0.01$); ^{125}I -PNAs 较之 PNAs 抑制作用更强 ($P < 0.01$); ^{125}I -Na 无明显抑制作用 ($P > 0.05$)。 ^{125}I -PNAs 抑瘤率 (70.9%), PNAs 抑瘤率 (54.8%) 与 ^{125}I -Na 抑瘤率 (13.2%) 比较差异亦有显著性 ($P < 0.01$); ^{125}I -PNAs, PNAs 均可明显抑制移植瘤 Ki67 表达 ($P < 0.01$), ^{125}I -PNAs 较之 PNAs 抑制作用更强 ($P < 0.01$), ^{125}I -Na 无明显抑制作用 ($P > 0.05$)。 ^{125}I -PNAs, PNAs 治疗组肿瘤细胞凋亡率明显升高 ($P <$

0.01); ^{125}I -PNAs 诱导凋亡作用明显大于 PNAs ($P < 0.01$)。

PNAs 是将相应碱基连接在 2-氨基乙基甘氨酸骨架上形成的第三代反义核酸, 这一结构使得 PNA 链既能与靶基因 mRNA 结合发挥反义治疗作用, 又能与靶基因 DNA 链紧密结合发挥反基因治疗作用。利用这一特征将 PNA 应用于放射性核素反义治疗, 在 ^{125}I -PNAs 与靶基因 DNA 结合后, ^{125}I 发出的 Auger 电子可直接破坏靶基因, ^{125}I 平均衰变一次可产生一个 DNA 断裂, 达到基因放射治疗肿瘤的目的。Ki67 基因是一细胞增殖相关基因, 所编码的 DNA 结合蛋白为肿瘤细胞增殖所必需, 在肿瘤增殖各期均有表达, 是一有希望的肿瘤治疗靶基因。本研究结果显示, ^{125}I -PNAs 较之 PNAs 具有更强的抑制移植瘤 Ki67 基因表达作用, 并可使肿瘤生长更为缓慢、凋亡显著增加, 有望应用于肾癌治疗。

[关键词] 肾肿瘤; 反义多肽核酸; 放射性核素碘 125; Ki67 基因

[中图分类号] R737.11 [文献标识码] D

[收稿日期] 2004 - 10 - 12 [修回日期] 2005 - 01 - 08
[本文编辑] 王 莹, 韩 丹

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科技发展基金项目 (H200153); 江苏省教育厅资助项目 (02KJD320030)