

[文章编号] 1007-385X(2005)02-0120-04

EGF-PE35KDEL 嵌合毒素对 HeLa 细胞的毒性作用

李树民¹, 李咏梅², 冯书章¹, 郭学军¹, 孙 洋¹, 朱 平¹(1. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; 2. 南方医科大学, 广州 510515)

[摘 要] **目的:** 构建由人表皮生长因子和绿脓杆菌外毒素 A 组成的融合蛋白, 并检测其对肿瘤细胞的杀伤能力。**方法:** 利用基因工程技术连接 EGF 和 PE35KDEL 基因, 克隆到表达载体 pET28a 中, 将其转化至 BL21(DE3), 在 BL21(DE3) 以可溶的形式表达 EGF-PE35KDEL 嵌合毒素, 经 DEAE-Sepharose FF 阴离子交换等层析后, 纯度达到 95%。结晶紫检测 EGF-PE35KDEL 对肿瘤细胞的活性。**结果:** SDS-PAGE 和薄层扫描分析外源蛋白的表达量占菌体蛋白的 20%。细胞活性检测证明 EGF-PE35KDEL 能够抑制 HeLa 细胞的生长, IC₅₀ 为 0.07 μg/ml。**结论:** EGF-PE35KDEL 嵌合毒素对体外表达 EGFR 的 HeLa 细胞有杀伤作用。

[关键词] 表皮生长因子; 绿脓杆菌外毒素; 嵌和毒素; 细胞毒性

[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Cytotoxicity of EGF-PE35KDEL Chimeric Toxin on HeLa Cell

LI Shu-min¹, LI Yong-mei², FENG Shu-zhang¹, GUO Xue-jun¹, SUN Yang¹, ZHU Ping¹(1. Institute of Animal Science, The Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China; 2. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a chimeric toxin consisting of a EGF linked to PE35KDEL and evaluate the potential of the EGF-PE35KDEL to target and kill tumor cells. **Methods:** By using of genetic engineering techniques, a recombinant expressing plasmid pET28a-EGF-PE35KDEL was constructed, the new obtained plasmid pET28a-EGF-PE35KDEL was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for proposed protein expression. EGF-PE35KDEL was purified by DEAE-Sepharose FF chromatography, cytotoxicity EGF-PE35KDEL on HeLa cell growth was analyzed with crystal violet staining. **Results:** The recombinant plasmid pet28a-EGF-PE35KDEL was constructed and expressed in *E. coli*. The recombinant EGF-PE35KDEL protein was expressed as a soluble protein and was up to 20% of the total protein in *E. coli* BL21(DE3). With the two purification procedure, the EGF-PE35KDEL is about 95% pure. The IC₅₀ of EGF-PE35KDEL on HeLa cell is 0.07 μg/ml. **Conclusion:** Chimeric toxin EGF-PE35KDEL had cytotoxicity to HeLa cells which over expressed EGFR *in vitro*.

[Key words] epidermal growth factor; pseudomonas exotoxin; chimeric toxin; cytotoxicity

表皮生长因子受体是广泛存在于哺乳动物类细胞表面的膜受体,其细胞外区与表皮生长因子结合并传递信号,影响细胞的生长和分化。它的蛋白质激酶结构域和癌基因 v-erbB1 高度同源,很多种类的癌细胞膜表面上过度表达 EGFR,例如鳞状细胞癌、乳腺癌、表皮癌等。癌细胞过度表达 EGFR 可以成为控制癌细胞的靶点^[1]。EGF 由 53 个氨基酸组成,分子量 Mr 6 000,它可以竞争结合癌细胞表面受体,所以 EGF 很适合作为免疫毒素的配子,携带毒素,特异的杀伤癌细胞^[2-3]。

PEA 是 613 肽的单链毒素蛋白,分子量 66 kD, PEA 去掉细胞结合区(I 区)为 PE40,已经广泛用于免疫毒素,取得了很好的效果。在 PE40 的基础上去掉部分 II 区(253-279)和部分 I 区(365-380)即 PE35。在 PE 的 C 末端使用内质网滞留序列 KDEL 可以增强 PE 的细胞毒性。我们构建了重组质粒 pET28a-EGF-

[作者简介] 李树民(1968-), 朝鲜族, 男, 黑龙江肇东人, 博士, 助理研究员, 主要从事靶向抗癌药物研究

[通讯作者] 冯书章, 博士, 研究员, E-mail: shuzhangf@yahoo.com

PE35KDEL,使 EGF-PE35KDEL 在 BL21(DE3)中获得了表达^[4],并检定了对 HeLa 细胞的毒性作用,为获得高活性低免疫原性的免疫毒素奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株及试剂

大肠杆菌 BL21(DE3)和 EGF-pet28a, PE38 基因由本室岳玉环博士提供。鼠抗 PE 单克隆抗体由董冰惠赠。IPTG、Taq 酶、Nco I、Nde I、EcoR I 等内切酶和羊抗鼠 IgG(碱性磷酸酶标记)购自大连宝生物公司,蛋白预染 Mark 购自 Hyclone。

1.2 PCR 修饰与扩增 PE35KDEL

用 PCR 法从 PE38 中扩增 PE35KDEL 基因,采用的引物为 F Primer 5' ggaattccatattggctgggaacaactg3'; R Primer 5' gcaattctacagttcatcttctggcggtttgccggg3'

PCR 程序为: 94℃ 变性 4 min, 扩增参数: 94℃ 50 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s 共 30 个循环, 72℃ 延伸 5 min。

1.3 表达载体的构建

PCR 产物用乙醇沉淀后用 Nde I 和 EcoR I 内切酶酶切,回收酶切后的 PE35KDEL 的片段。用 Nde I 和 EcoR I 内切酶酶切 EGF-pET28a, 酶切后的产物经凝胶电泳回收试剂盒回收。将酶切后的 PE35 KDEL-DNA 片段和 pET28a EGF 片段用 T4DNA 连接酶连接,连接产物转化至 BL21(DE3)感受态细胞, LB 琼脂培养基 37℃ 培养(含卡那霉素, 50 μg/ml), 挑菌落液体培养扩增,提取质粒做酶切及测序鉴定。

1.4 EGF-PE35KDEL 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将筛选出的重组质粒菌种过夜活化培养, 1: 50 接种于 LB 培养基(含卡那霉素, 50 μg/ml)中, 37℃ 培养至对数生长期, OD 值等于 0.6, 加入 IPTG, 使其浓度达到 1 mmol/L, 诱导表达目的蛋白。3 h 后, 离心收菌, 做 SDS-PAGE 分析。

1.5 EGF-PE35KDEL 的纯化

将培养的菌离心收集, 裂解液悬浮, 超声裂解细胞, 收集上清, 用 55% 硫酸铵沉淀, 去上清, Tris 溶解, 脱盐, 在 DEAE-Sepharose FF 进行阶段洗脱。收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测。将含目的蛋白样品用制备电泳分离, SDS-PAGE 检测。KODAK 1D 软件检测蛋白的纯度。

1.6 EGF-PE35KDEL 蛋白纯品的鉴定

纯化后的样品和未诱导的工程菌进行 SDS-PAGE。电泳胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗(鼠抗 PEA 阳性血清, 1: 500 稀释), 漂洗后加入二抗(山羊抗小鼠 IgG, 1: 1 000 稀释), 显色。

1.7 细胞毒性的检测

0.5%胰蛋白酶消化 HeLa 细胞, 计数并加入 96 孔细胞培养板孔内, 使每孔含 2 万个细胞。EGF-PE35KDEL 样品过滤除菌, 调成 20 μg/ml, 加入各细胞孔中, 每孔为 20 μl, 5% CO₂, 37℃ 条件下培养 72 h, 各孔中分别加入 100 μl 染色试剂, 常温作用 15 min, 倒掉染色液, 冲洗, 甩干, 加入脱色液 50 μl。于 590 nm 波长下 ELISA 检测仪测定吸光值, 使用 Emax 软件计算重组毒素对肿瘤细胞的 IC₅₀。

2 结 果

2.1 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳分析

从已有重组质粒 pET28a-PE38 扩增出 PE35KDEL 片段, 大小约为 1 000 bp, 与预期相符。

2.2 表达载体的构建

Nde I 和 EcoR I 内切酶酶切获得 2 个片段, 分别约为 5 600 bp 和 1 000 bp, 与预计长度相符。用 Nco I 和 EcoR I 酶切获得约为 5 400 bp 和 1 200 bp 的 2 个片段(图 1)。

图 1 表达载体鉴定

Fig. 1 Restriction map of expressed plasmid

1: DL2000; 2: pET28a-EGF-PE35KDEL Nde I + EcoR I
3: pET28a-EGF - PE35KDEL Nco I + EcoR I

2.3 EGF-PE35KDEL 的表达、纯化和鉴定

EGF-PE35KDEL 的表达产物的 SDS-PAGE 在 41 kD 处有一产物带与推测结果一致(图 2), 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 和 WESTERN-BLOT 鉴定结果(图 3, 4)。使用 KODAK1D 软件分析, 蛋白的纯度超过 95%。

2.4 嵌和毒素的细胞毒性作用

细胞毒性实验结果显示, EGF-PE35KDEL 嵌和毒素对表达 EGF 受体的 HeLa 细胞的生长有明显的抑制作用见图 5, 呈剂量依赖。使用 EMAX 分析软件分析 IC₅₀ 为 0.07 μg/ml。

3 讨 论

EGF-PE35KDEL 属于免疫毒素类抗肿瘤药物, 可

以杀伤过度表达 EGF 受体的肿瘤细胞。PE 由 3 个功能区构成,各区功能明确^[5]。去除 I 区的为 PE40,去除 I 区和部分 I_b区的为 PE38。PE40 和 PE38 已经被广泛应用于靶向毒素,如 EGF-PE40, EGF-PE38, IL2-PE40, EGF-PE38 等。PE35 是在 PE38 的基础上,缺失 253~279 氨基酸残基,保留 280-613 氨基酸残基。用内质网滞留序列 KDEL 代替 REDLK 序列会提高嵌合毒素的细胞毒作用。A Kihara 研究结果表明将 EGF-PE38C 末端的 REKLD 替换成 KDEL 对 HTB20, N-87MCF7 和 HepG2 细胞的活性明显增强^[6]。Seetharam S 的研究结果表明将 TGF-PE40 的 C 末端替换成 KDEL 或重复的 3 次的 KDEL 将明显的增强对肿瘤细胞的杀伤毒性^[7]。因此,我们构建的免疫毒素中使用了 PE35KDEL,成功的表达和纯化了 EGF-PE35KDEL,并检测了对 HeLa 细胞的毒性,实验证明 EGF-PE35KDEL 能有效的杀伤表达 EGF 受体的 HeLa 细胞。

图 2 表达产物 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE profile of expressed product

1: Marker; 2: BL21(DE3); 3: Induced BL21/pET28a EGF-PE35KDEL

图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 3 SDS-PAGE profile of the purified proteins

1 2 3: Purified protein; 4: Marker

我们选用结晶紫的方法测定药物对肿瘤细胞的抑

制结果,从本实验看,结晶紫法稳定性及重复性非常好。有资料报道,测定对 HELA 细胞的抑制实验结果是在加入药物 72 h 进行的,我们也是在 72 h 后测定的结果。由于我们没有 EGF-PE40 和 EGF-PE38 的纯品,所以我们无法知道使用 PE35KDEL 比使用 PE40 或 PE38 哪个活性更高一些。从已经有的报道看,使用 PE35 作为毒素弹头,与不同的导向连接,对不同的细胞的活性是不一样的。使用 LL2, B3 单克隆抗体用二硫键与 PE35 连接的免疫毒素对与 PE40, PE38 连接的免疫毒素对培养的肿瘤细胞的杀伤活性要高,但使用 Mab HB21 与 PE35 化学偶联的免疫毒素对 A431 细胞的活性却很低^[8]。EGF-PE35, EGF-PE40 和 EGF-PE38 细胞毒作用尚无比较报告,本实验对 PE35C 末端进行了突变,使末端的 REDLK 变成 KDEL,力求保持或超过与使用 PE40 或 PE38 作为毒素弹头免疫毒素的活性,为临床实验做准备。

图 4 纯化蛋白的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot of purified proteins

1: Purified protein EGF-PE35kdel; 2: Bacterium without induction; 3: Prestained protein marker

图 5 EGF-PE35KDEL 对 HeLa 细胞的毒性作用

Fig. 5 Cytotoxicity of the EGF-PE35KDEL to HeLa

A: Test; B: Control

[参 考 文 献]

- [1] Goldberg MR. Phase I clinical study of the recombinant oncotxin TP40 in superficial bladder [J]. Cancer Clin Cancer Res, 1995, 1(1): 57-61.
- [2] Huang S, Trujillo JM, Chakraharty S. Proliferation of human colon

- cancer cells: Role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha[J]. *Int J Cancer*, 1992, 52(6): 978-981.
- [3] Yang D, Kuan CT. Recombinant heregulin-Pseudomonas exotoxin fusion proteins: Interactions with the heregulin receptors and anti-tumor activity *in vivo*[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(4): 993-1004.
- [4] 李树民. EGF-PE35KDEL 的基因构建与表达[J]. 中国生物制品杂志, 2003, 16(2): 16-18.
- [5] Pastan I, FitzGerald D. Pseudomonas exotoxin: Chimeric toxins [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(26): 15157-15160.
- [6] Kihara A, Pastan I. Cytotoxic activity of chimeric toxins containing the epidermal growth factor-like domain of heregulins fused to PE38KDEL, a truncated recombinant form of Pseudomonas exotoxin[J]. *Cancer Res*. 1995, 55(1): 71-77.
- [7] Seetharam S, Chandhary VK, FitzGerald D, *et al*. Increased cytotoxic activity of Pseudomonas exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL[J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(26): 17376-17381.
- [8] Onda M. *In vitro* and *in vivo* cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(4): 1419-1424.
- [收稿日期] 2005 - 01 - 19 [修回日期] 2005 - 04 - 12
- [本文编辑] 韩 丹

· 科技动态 ·

TLR9 诱导产生的 I 型 IFN 对实验性大肠炎的抑制作用

细菌 DNA 及其来源的具有免疫刺激效应的寡聚核苷酸(ISS-ODN)(含有非甲基化 CpG 基序) 是 TLR9 的配体。ISS-ODN 能够刺激 Th1 型细胞因子的产生, 上调抗原提呈细胞表达共刺激分子, 增强宿主对入侵病原微生物的防御功能。ISS-ODN 能够防止或明显减轻 CD4⁺ T 细胞依赖和 CD4⁺ T 细胞非依赖实验性大肠炎的发生或炎症程度, 但这种保护作用是短暂的, 不具有免疫记忆效应, 表明 ISS-ODN 介导的抗实验性大肠炎效应是天然免疫应答。通过 T 细胞和 B 细胞缺陷的 SCID 和 RAG^{-/-} 小鼠, 发现 ISS-ODN 对 RAG^{-/-} 小鼠发生实验性大肠炎具有保护机制, 而这种效应主要是通过 ISS-ODN 活化 TLR9 信号通路产生的 I 型 IFN 来发挥作用。

于 RAG1^{-/-}, 野生型(WT) 和 SCID 小鼠体内应用 DSS 能够诱导实验性大肠炎的发生。DSS 联合 ISS-ODN 应用于 RAG1^{-/-}, WT 和 SCID 小鼠后, 发现 RAG1^{-/-}, WT 的大肠炎症状明显减轻, 而 SCID 小鼠没有减轻, 表明 ISS-ODN 具有抗实验性大肠炎的作用。DSS 联合 ISS-ODN 刺激 RAG1^{-/-} 小鼠脾细胞的培养上清应用于 SCID 小鼠, 大肠炎的炎症反应显著降低, 提示 ISS-ODN 的抗炎作用是通过可溶性因子在发挥作用。而同时应用 ISS-ODN 刺激 SCID 小鼠脾细胞或 TLR9 通路障碍的 MyD88^{-/-} 小鼠脾细胞培养上清, 不能明显减轻 SCID 小鼠大肠炎的炎症反应, 说明这种可溶性因子的产生依赖 TLR9 信号通路。为进一步确定可溶性因子的有效成分, 分别检测了 ISS-ODN 诱导的 RAG1^{-/-} 小鼠和 SCID 小鼠的脾细胞培养上清中的细胞因子水平, 发现二者的 IL-12, IL-6, IL-10 水平没有显著差异, 而 RAG1^{-/-} 小鼠脾细胞培养上清中 IFN- α/β , IFN- γ , RANTES 水平明显高于 SCID 小鼠。为进一步确证是否 I 型干扰素在减轻大肠炎中发挥作用, 应用 IFN- α/β 的中和性抗体可阻断 ISS-ODN 对大肠炎的抑制作用; 直接应用重组 IFN- β 对实验性大肠炎具有抑制作用; IFN- α/β R^{-/-} 小鼠对 DSS 造实验性大肠炎的敏感性增高, 以上证据表明 TLR9 激动剂抑制 ISS-ODN 对 DSS 造实验性大肠炎中的有效成分是 IFN- α/β 。在 DSS 造实验性大肠炎之前分别将 WT 和 IFN- α/β R^{-/-} 小鼠的骨髓来源巨噬细胞(BMDMs) 植入 WT 小鼠, 发现只有接受 WT-BMDMs 的小鼠其大肠炎症状明显减轻, 而接受 IFN- α/β R^{-/-} BMDMs 的小鼠大肠炎没有明显改变。另外, 在 DSS 诱导大肠炎前将 CFSE 标记的 WT-BMDMs 分别植入 WT 和 IFN- α/β R^{-/-} 小鼠, 用 ISS-ODN 诱导后, 发现二者大肠炎部位的 BMDMs 数目没有显著差别, 表明这种保护作用不是由于 BMDM 迁移量不同而引起的。在探讨 ISS-ODN 诱导 I 型 IFN 产生的信号机制中, DNA-PK 阻断剂 NU7026 可阻断 ISS-ODN 对大肠炎的抑制作用; 而且经 ISS-ODN 诱导的 SCID 小鼠的 DNA-PK, IRF-1, IRF-7, IRF-8 和 pSTAT1 活性明显降低, 提示 SCID 小鼠中 DNA-PK 激活受阻; 从而影响 IRF-1, IRF-7, IRF-8 的活化, 进而影响 IFN- α/β 的生成。ISS-ODN 不能活化 MyD88^{-/-} 小鼠的 DNA-PK, 提示 DNA-PK 激活受 MyD88 调控。综上, ISS-ODN 与 TLR9 结合后通过 MyD88 激活 DNA-PK, 然后激活 IRF-1, IRF-7 和 IRF-8, 进而诱导 IFN- α/β 生成而发挥抗炎作用。

以上研究表明, 细菌或其来源的 ISS-ODN 进入机体后, 触发了宿主体内免疫细胞表面的 TLR9, 进而诱导 IFN- α/β 产生, 抑制病原体引起的炎症反应, 达到保护机体的作用, 该机制有助于将来在临床上人为触发 TLR9 产生 IFN- α/β 来发挥其抗炎作用而治疗炎性肠病。

[龙浏成摘, 刘书逊审阅[英] / / *J Clin Invest*, 2005, 115: 695 - 702]