

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0206-05

羧肽酶 A1 及其活性中心基因的表达及活性分析

岳乔红, 苏明权, 杨 柳, 郝晓柯(第四军医大学西京医院检验科, 西安 710032)

[摘 要] 目的: 克隆羧肽酶 A1(carboxypeptidase A1, CPA1)全酶及其活性中心基因, 构建重组表达载体进行诱导表达, 分析表达产物活性。方法: RT-PCR 扩增 CPA1 全酶及活性中心基因, 测序分析后将目的基因克隆于表达载体 pGEX-4T-1, 测序证实插入方向正确后转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达目的基因后 SDS-PAGE 电泳分析。目的蛋白经变性、复性、纯化后 MTT 法和集落形成试验鉴定其活性。结果: 获得了人 CPA1 全酶及活性中心基因, 目的基因诱导表达后约 66 kD 及 46 kD 处可见新生蛋白带; 活性分析显示 CPA1 全酶和活性中心蛋白都具有一定的催化水解活性, 但后者对肿瘤细胞的杀伤效果较弱。结论: 能成功克隆了人 CPA1 全酶及其活性中心基因, 获得了二者的原核表达产物, 体外具有一定活性。可望以人羧肽酶 A1 全酶及其活性中心基因为新起点, 继续完善优化羧肽酶 A1 系统, 为抗体靶向治疗前列腺癌的临床应用奠定基础。

[关键词] 羧肽酶 A1; 活性中心; 原核表达; 活性分析

[中图分类号] R392.11 [文献标识码] A

The Expression of Human Carboxypeptidase A1 and Its Active Center Gene

YUE Qiao-hong, SU Ming-quan, YANG Liu, HAO Xiao-ke (Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] Objective: To clone human carboxypeptidase A1 and its active center gene as well as construct recombinant vector for expression before analysis their activities. Methods: CPA1 and CPA1_{active center} gene were amplified by RT-PCR from pancreas tissue, and then sequencing was carried out. The correct target genes were cloned into prokaryotic vector pGEX-4T-1 and transformed into *E. coli* BL21 before sequence analysis. After induced by IPTG, gene products were analyzed by SDS-PAGE. Target expressed proteins were denaturated, renaturated, purified and evaluated through MTT and agar colony form test. Results: Human carboxypeptidase A1 and its active center gene were cloned successfully. New expected protein band of Mr 66,000 and 46,000 appeared on SDS-PAGE after inducement. Both of the expressed proteins have catalytic activity *in vitro*, but the activity of the latter is inferior when applied to tumor cells. Conclusions: Human carboxypeptidase A1 and its active center gene were cloned successfully. Their prokaryotic expression products were obtained too. The expressed proteins have catalytic activity *in vitro*. A new prosperous beginning of further improvement for CPA1 therapy system has been established based on CPA1 and its active center gene in terms of ADEPT against prostate cancer to clinical application.

[Key words] carboxypeptidase A1; active center; prokaryotic expression; catalytic activity

抗体导向酶-前体药物疗法(antibody-directed enzyme prodrug therapy, ADEPT)自 1987 年问世以来, 受到很多研究者的关注, 目前国内外正处于研究和完善阶段。用于治疗结肠癌的羧肽酶 G2 系统已经进入了临床试验^[1], 其他 ADEPT 方案, 如 β -葡糖苷酸酶系统、青霉素酰胺酶系统、胞嘧啶脱氨酶系统等也都在进行研究和改进^[2-3]。本实验室进行 ADEPT 疗法的 CPA1 系统针对前列腺癌治疗的研究已经多年, 具有良好的

研究基础。我室合成的前体药物氨甲喋呤- α -苯丙氨酸(MTX- α -Phe)和甲氨喋呤- α -精氨酸(MTX- α -Arg)用于前列腺癌动物模型的体内试验, 抑瘤率达

[基金项目] 国家十五重大科技专项(2002AA2Z3109); 国家 863 项目 2001AA21532)

[作者简介] 岳乔红(1975-), 女, 新疆乌鲁木齐市人, 硕士, 主要从事肿瘤分子生物学的研究

[通讯作者] 郝晓柯, E-mail: haoxkg@163.com

87.6%^[4]。

但 CPA1 分子量大,在临床试验研究操作中存在一定困难。为此,我们以 CPA1 活性中心为突破点^[5],克隆并表达羧肽酶 A1(carboxypeptidase A1, CPA1)及其活性中心基因,并通过 CPA1 全酶及活性中心蛋白进行比较、分析,最终得到 CPA1 最小活性结构域,优化 CPA1 系统,使其真正用于前列腺癌的 ADEPT 治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21 为本室保存;前药甲氨喋呤- α -肽衍生物:MTX- α -Phe 及 MTX- α -Arg 为本实验室制备;人前列腺癌细胞株 PC-3m 购自北医病理教研室;甲氨喋呤(MTX)为上海华联有限公司产品(沪卫准字 H31021683);GST 亲和层析柱 GSTrap FF、载体 pGEX-4T-1 为 Pharmacia 产品;Bovine carboxypeptidase A type I 为 Sigma 公司产品;各种限制性内切酶、IPTG、X-gal 为 TaKaRa 公司产品。

1.2 RT-PCR 扩增 CPA1 及 CPA1_{active center} 基因

全酶基因扩增引物:P1:5' GGAATTCATGGAG-GACTTTGTGGGCATCAG 3', P2: 5' ACGTCGACGT-GTCAAAGGGTCAGCTCAGTAGG 3'; 活性中心基因扩增引物:P3: 5' GGAATTCATGATCGACACGGGCATC-CATTC 3', P4: 5' ACGTCGACCTCAAGTGTCCCGGAG CTCGAAGGTG 3'。分别用上述 2 组引物进行 PCR 扩增,循环参数为 95℃ 5 min 后,95℃ 变性 1 min,50℃ (活性中心为 48℃)退火 1.5 min(活性中心为 1 min),72℃ 延伸 1.5 min(活性中心为 1 min),经过 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

1.3 CPA1 及 CPA1_{active center} 基因的原核表达及表达产物的可溶性分析

分别回收目的片段,经胶回收纯化后,用 EcoR I 和 Sal I 分别进行双酶切,所获片段克隆到经同样双酶切的载体 pGEX-4T-1 中,得到的重组表达质粒转化 BL21 感受态细胞,经氨苄青霉素筛选,阳性克隆送上海生工生物工程公司测序。经序列分析后,所得正确的重组表达质粒命名为 pGEX-CPA1, pGEX-CPA1_{active center}。分别挑取单个经 pGEX-CPA1, pGEX-CPA1_{active center} 转化的 BL21 菌接种 LB 培养基(含 0.1 g/L 氨苄青霉素),37℃ 培养过夜后,按 1:25 接种新鲜 LB 培养基,37℃ 培养至 A_{600nm} 约为 0.6,经 IPTG 诱导 5 h 后,离心收菌,进行 SDS-PAGE 及 Western blot。用 CS-9000 薄层扫描仪蛋白条带分别进行扫描,确定菌体

总蛋白中目的蛋白的比例。

取 200 ml 诱导菌,离心收菌,加入 10 ml GTE 洗涤,沉淀用 5 ml STE 重悬,加 400 μ l 20 mg/ml 溶菌酶溶液,于室温放置 20 min;再加入 70 U/ml DNase I 和 100 mmol/L MgCl₂,至终浓度分别为 100 U/ml 和 8 mmol/L,室温放置至溶液变稀。12 000 r/min 离心 10 min,分别收集上清和沉淀。取适量沉淀,加入 50 μ l TritonX-100-STE 重悬,于 4℃ 放置 20 min,使膜蛋白溶解。各组分同前进行 SDS-PAGE。以明确重组蛋白的溶解性。

1.4 CPA1 及 CPA1_{active center} 包涵体蛋白的变性、复性及纯化

将离心收获的菌体重悬于 10 倍体积的缓冲液(50 mmol/L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.2)中,20 mg/ml 溶菌酶室温消化 30 min,冰浴条件下超声裂菌,然后 12 000 r/min 4℃ 离心 10 min,弃上清,沉淀即为包涵体粗品。用洗涤缓冲液 A(2 mmol/L 乙二醇双(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA),1 mg/ml 脱氧胆酸钠,20 mmol/L Tris, 0.2 mol/L NaCl)洗涤 1 次,再用洗涤缓冲液 B(1 mmol/L EGTA,0.25 mg/ml 脱氧胆酸钠,10 mmol/L Tris)洗涤 2 次。离心后的沉淀加入 1/10 原始培养液体积的溶解缓冲液(4 mol/L 尿素,0.1 mmol/L TE, 10 mmol/L β -巯基乙醇(β -ME)),4℃ 下缓慢搅拌 1 h 使之充分溶解,15 000 r/min 离心 15 min,收集上清。将此上清倒入透析袋中,对 500 ml 复性缓冲液 I(2 mol/L 尿素,2 mmol/L GSH,1 mmol/L GSSG,5 mmol/L EDTA,50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)进行透析过夜。次日取出透析袋,在 4℃ 下,再对 500 ml 复性缓冲液 II(5 mmol/L vEDTA,50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0)进行透析,每隔 4 小时换复性液 II,换 3 次后透析过夜。将透析液取出,15 000 r/min 离心 20 min。将上清用 0.22 μ m 的过滤器过滤除菌,进行蛋白纯化。用 Pharmacia 公司的 GSTrap FF 亲和层析柱按照说明书进行纯化。

1.5 肿瘤细胞的体外毒性试验

1.5.1 MTT 试验

设如下试验组:(1) MTX;(2) MTX- α -Phe;(3) MTX- α -Phe + CPA1;(4) MTX- α -Phe + CPA1_{active center};(5) MTX- α -Phe + CPA1_{商品};(6) MTX- α -Arg;(7) MTX- α -Arg + CPA1;(8) MTX- α -Phe + CPA1_{商品};(9) MTX- α -Arg + CPA1_{active center};(10) CPA1_{active center} MTX, MTX- α -Phe, MTX- α -Phe 浓度分别为 0, 50, 100, 500, 1000 mg/L; CPA1_{商品}, CPA1 和 CPA1_{active center} 终浓度为 45 μ g/ml,每个浓度设 5 个复孔,分别培养 12, 24, 48 h。计算其杀伤率,绘制前体药物对前列腺癌细胞的杀伤曲

线。

1.5.2 集落形成试验

采用软琼脂培养法,同样设 10 个试验组,MTX, MTX- α -Phe, MTX- α -Arg 终浓度为 100 mg/L; CPA1_{商品}, CPA1 和 CPA1_{active center} 终浓度为 45 μ g/ml, 设 2 个复孔。计算细胞克隆形成率。

2 结果

2.1 CPA1 及 CPA1_{active center} 基因的克隆

经 PCR 扩增 CPA1 全酶及其活性中心基因, 扩增产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 出现约 1 200 bp 和 606 bp 的特异条带, 与预期结果大小相符(图 1, 2)。

图 1 CPA1 RT-PCR 结果

Fig.1 CPA1 RT-PCR products

M: DNA marker; 1-2: CPA1 RT-PCR products

图 2 CPA1_{active center} RT-PCR 结果

Fig.2 CPA1_{active center} RT-PCR products

M: DNA marker; 1-2: CPA1_{active center} RT-PCR products

2.2 CPA1 及 CPA1_{active center} 基因的原核表达及包涵体

蛋白的变复性研究

将 pGEX-4T-1 和 pGEX-CPA1(pGEX-CPA1_{active center}) 分别转化感受态大肠杆菌 BL21, SDS-PAGE 结果表明, pGEX-CPA1 转化的菌株在约 66 000 处出现一条新生蛋白条带, pGEX-CPA1_{active center} 在约 46 000 处出现一条新生蛋白条带, 均与预期结果一致(图 3)。将图 3 中 4、5 泳道的蛋白条带分别进行薄层扫描分析, 表达的融合蛋白 GST-CPA1, GST-CPA1_{active center} 占菌体总蛋白的 23.2% 和 27.1%。经 Western blot 进一步证实, 约在 66 kD 和 46 kD 分别有单一显色带(图 4)。pGEX-CPA1, pGEX-CPA1_{active center} 蛋白以不溶性包涵体的形式存在, 裂解后的菌体经过洗涤、溶解、透析复性及纯化, 进行 SDS-PAGE 鉴定(图 5)。

图 3 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expression

M: Protein standard marker; 1: CPA1 active center control protein (before inducing); 2: 26 000 GST protein (after inducing)
3-4: 46 000 fusion protein GST-CPA1 active center (after inducing); 5: 66 000 fusion protein GST-CPA1 (after inducing)

2.3 MTT 试验结果

各试验组对肿瘤细胞的杀伤曲线(图 6)表明, 前体药物 MTX- α -Phe 和 MTX- α -Arg 经 CPA1 水解后, 与 MTX 及经 CPA1_{商品} 水解后的活性相近; 前体药物经 CPA1_{active center} 水解后具有一定的活性, 但与 MTX 相差较大。集落形成试验结果: 前体药物 MTX- α -Phe 和 MTX- α -Arg 对前列腺癌细胞均无杀伤作用, 集落形成率分别为 88% 和 92% ($P > 0.05$), 而单加 CPA1_{active center} 的试验组的集落形成率为 93%; CPA1 与两组前体药物的试验组均有较强的细胞毒作用, 无细胞集落形成 ($P < 0.01$), 与 MTX 组、CPA1_{商品} 和两类前体药物的试验组的杀伤效果相近; CPA1_{active center} 和前体药物的试验组对

肿瘤细胞的杀伤效果较弱,形成少量细胞集落,集落形成率分别为 23% (MTX- α -Phe + CPA1_{active center}) 和 19% (MTX- α -Arg + CPA1_{active center})。

图 4 CPA1, CPA1 active center 蛋白的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of CPA1, CPA1 active center protein

1: pGEX-CPA1 active center protein; 2: pGEX-CPA1 protein

图 5 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified protein

M: Protein standard marker; 1: 20 000 purified protein CPA1 active center; 2: 40 000 purified protein CPA1; 3: 46 000 fusion protein GST-CPA1 active center; 4: 66 000 fusion protein GST-CPA1

3 讨论

在进行 CPA1 系统的研究过程中我们发现将其用于临床还存在一些问题,由于 CPA1 基因序列较长,与抗精浆蛋白单链抗体构建成融合基因后,由于分子量较大,表达困难,较难得到有活性且具备一定量的融合蛋白,对今后的临床试验研究造成一定困难。我们根

据文献报道,以计算机模拟的、分子量为 606 bp 的 CPA1 活性中心为突破点,希望通过实验研究,获得有活性的 CPA1 最小活性结构域,从而解决这一问题。

本研究的主要目的是获得 CPA1 全酶及其活性中心蛋白,并对其进行初步的活性分析。通过试验,成功地获得了 CPA1 全酶及其活性中心蛋白,但均以无活性的包涵体形式存在。我们参考了有关文献^[6],并结合试验条件,进行了包涵体的复性研究。透析复性、纯化后,经 SDS-PAGE 分析,CPA1 和 CPA1_{active center} 蛋白复性产物分别在 Mr 40 000 和 20 000 处分别有单一的蛋白质条带。进一步进行 CPA1 和 CPA1_{active center} 蛋白活性的初步鉴定表明,CPA1 具有较好的催化水解活性,其与前体药物作用后,对肿瘤细胞的杀伤效果较好,与 MTX 杀伤效果相近;CPA1_{active center} 具有一定的活性,但对肿瘤细胞的杀伤效果较弱。这可能与 CPA1_{active center} 基因克隆时所选择的序列缺少维持其空间结构的辅助氨基酸及对其表达产物进行变性、复性所造成的降解有一定的关系。

图 6 前体药物对前列腺癌细胞的杀伤曲线

Fig. 6 Cytotoxicity of prodrug to prostate cancer cell

A: MTX; B: Prodrug + CPA1_{商品}; C: Prodrug + CPA1; D: Prodrug + CPA1_{active center}; E: CPA1_{active center}; M: MTX- α -Phe or MTX- α -Arg

从本试验的结果来看,以 CPA1_{active center} 为出发点进行 CPA1 系统的试验研究是可行的。下一步的研究包括:① CPA1_{active center} 包涵体蛋白经变性、复性和纯化后损失较多,需进一步提高表达量,促进可溶性表达;优化变性、复性和纯化工艺。②以 CPA1_{active center} 基因为基础,分段延伸两端的基因片段,进行扩增、克隆、表达、活性分析;或选择某些碱基位点进行突变,以提高活性中心的酶活性,从而最终确定出 CPA1 最小活性结构域。

本试验对 CPA1 和 CPA1_{active center} 蛋白进行了初步分析,为下一步获得有活性的 CPA1 最小活性结构域,优化抗人精浆蛋白单链抗体/CPA1 融合蛋白系统,将

CPA1 融合蛋白真正用于前列腺癌的治疗奠定基础。

[参考文献]

[1] Francis RJ, Sharma SK, Springer C, *et al.* A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours [J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(6): 600-607.

[2] Haisma HJ, Sernee MF, Hooijberg E, *et al.* Construction and characterization of a fusion protein of single-chain anti-CD20 antibody and human beta-glucuronidase for antibody-directed enzyme prodrug therapy[J]. *Blood*, 1998, 92(1): 184-190.

[3] Vruthula VM, Kerr DE, Siemers NO, *et al.* Cephalo sporin prodrugs of paclitaxel for immunologically specific activation by L49-sFv-beta-Lactamase fusion protein[J]. *Bioorg Med Chem Lett*,

2003, 13(3): 539-542.

[4] 郝晓柯, 施溥涛, 张盈华, 等. 前体药物甲氨喋呤- α -肽对前列腺癌动物模型治疗的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2000, 7(3): 195-198.

[5] Wei S, Segura S, Vendrell J, *et al.* Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family[J]. *J Biol Chem*, 2002, 17(277): 14954-14964.

[6] Winter J, Lilie H, Rudolph R. Renaturation of human proinsulin—a study on refolding and conversion to insulin[J]. *Anal Biochem*, 2002, 310(2): 148-155.

[收稿日期] 2005-02-14 [修回日期] 2005-07-08
 [本文编辑] 韩丹

· 科技动态 ·

BAFF 对外周血未成熟 B 淋巴细胞存活的作用

B 淋巴细胞成熟是一个高度的选择过程,需要精细的分化和存活信号。BAFF(TNF 家族的 B 细胞活化因子)能够结合 B 淋巴细胞,促进 BCR 介导的细胞增殖。阻断 BAFF 的作用时外周 B 细胞数目减少,而在 BAFF 转基因小鼠中则可检测到高水平的 Bcl-2。该研究主要探讨了 BAFF 在体外对脾脏未成熟移行 B 细胞(Transitional B lymphocyte)存活的作用。

将脾细胞与 BAFF 体外共培养 72 h 后,流式细胞分析表明,未加 BAFF 的脾细胞大部分死亡,而 BAFF 刺激的脾细胞在体外培养 72 小时后仍有较多存活。当应用 BAFF 的阻断血清时存活细胞显著降低。培养的脾细胞用抗 B220、抗 CD4、抗 CD8 抗体作染色进行流式细胞分析时发现 80% 的存活细胞为 B 细胞。进一步比较了 BAFF 对不同来源的 B 细胞存活能力的维持作用,表明 BAFF 体外主要促进脾脏 B 细胞亚群的存活。脾脏内存在多种 B 细胞亚群包括未成熟的移行 B 细胞。移行 B 细胞又可以分为 1 型(T1)和 2 型(T2)B 细胞 2 类,T1 表型为: IgMhi IgD- CD21lo CD23- L 选择素-, T2 表型为: IgMhi IgDhi CD21hi CD23+ L 选择素+。通过流式细胞术分析了 BAFF 对这两个 B 细胞亚群的不同作用,结果表明存活的 B 细胞为 IgMhigh 和 IgD+ 细胞,且高表达 B220 及 L 选择素,其 HSA 表达也高于成熟 B 细胞,说明存活的细胞为未成熟 B 细胞,再通过抗 IgM、抗 CD21 和抗 CD23 抗体染色表明这些细胞大部分为 T2 细胞,而未能观察到 T1 细胞的存活,同时也能观察到少量边缘区 B 细胞的存活。进一步将 T1 和 T2B 细胞纯化,然后体外 BAFF 共培养 t/loCD21intIgD+ 的具有成熟 B 细胞表型的细胞。尽管如此,与单独 BAFF 处理相比,成熟的 B 细胞数目要少,这表明仍有很多 BAFF 处理的 T2B 细胞在抗免疫球蛋白 μ 链刺激后死亡,只有少部分细胞能对分化信号有反应。T1 B 细胞不能在该培养系统中存活,同时也未观察到分化为边缘区 B 细胞的现象。这表明某些 T2B 细胞在 BCR 信号的触发下,BAFF 能诱导其成熟。对 BAFF 转基因小鼠 B 细胞的分析表明,各 B 细胞亚群的绝对数目均增加,但比较各亚群的比率发现 T2 和 MZ B 细胞增加尤为明显,同时 BAFF 转基因小鼠来源的脾细胞在正常培养基不加任何外源性因子的情况下能存活 72 h。

外周 B 细胞成熟的过程伴随着对未成熟 B 细胞的选择,该过程中 BCR 的信号尤为重要,这种信号可以消除自身反应的 B 细胞,而成熟过程中能够促进 B 细胞存活并分化成熟的阳性选择信号很可能就是 BAFF。BAFF 是 B 细胞成熟过程中关键的存活因子,该研究表明过度的 BAFF 所诱导的存活可能打破免疫耐受,所以未成熟 B 细胞分化为成熟 B 细胞的高度选择过程可能是自我耐受的结果,而这一过程很可能受 BAFF 的控制。

[李平摘 于益芝校[英] Marcel Batten, Joanna Groom, ...//J. Exp. Med, 2000, 192:1453-1465]