

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0417-06

高亲和力抗 Met 人源基因工程抗体 scFv 的筛选与特性分析

朱进^{1,2}, 王辛¹, 焦永军¹, 冯振卿¹, 曹伯良¹, 管晓虹¹(1. 南京医科大学 卫生部抗体技术重点实验室, 南京 210029; 2. 南京军区 军事医学研究所, 南京 210002)

[摘要] **目的:**应用噬菌体展示技术制备抗 HGF 受体 Met 特异性、高亲和力的全人抗体 scFv 片段。**方法:**以从天然抗体库中筛选出的 Fab 基因可变区 VH 和 VL 为模板, 分别在 CDR 区引入有限突变和随机突变, 扩增出 scFv 基因库, 克隆于 pComb3XSS 中, 构建 scFv 次级突变抗体库, 筛选高亲和力克隆。**结果:**经 5 轮细胞筛选和 2 轮抗原固相筛选, 选取 60 个克隆进行 ELISA 检测, 选择较高亲和力的噬菌体抗体, 克隆于原核表达载体 pBAD-gIII/A 中, 经诱导表达、SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 在相对分子质量 30 000 处出现预期大小的蛋白条带。单链抗体经表达、变性与复性和 IMAC 亲和纯化后, 用于流式细胞术、免疫沉淀分析, 结果表明, scFv 能够与 S114 细胞表达 Met 的胞外区特异性结合, 其亲和常数 Kd 值为 4.76×10^{-8} mol/L, 与突变前抗体的亲和力(Kd 值为 5.24×10^{-6} mol/L)相比, 抗体的亲和力提高约 100 倍。竞争 ELISA 结果显示, 亲和力成熟后抗体的抗原结合表位未变。**结论:**经过 CDR 突变和抗体库筛选, 有效提高了抗体的亲和力, 该抗体有望成为临床肿瘤诊断或治疗的候选分子。

[关键词] 噬菌体抗体库; 抗 Met 单链抗体; 亲和力成熟; 抗肿瘤

[中图分类号] Q78 [文献标识码] A

Screening and characterization of high affinity human anti-Met recombinant antibody scFv

ZHU Jin^{1,2}, WANG Xin¹, JIAO Yong-jun¹, FENG Zhen-qing¹, CAO Bo-liang¹, GUAN Xiao-hong¹(1. Key Lab of Antibody Technique of Ministry of Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Military Medical Institute, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare human high affinity antibody fragment scFv that specifically binds to cell receptor Met by phage display technique. **Methods:** The variable regions were amplified from VH and VL of anti-Met Fab genes screened from the natural immune Fab antibody phage display library. The scFv genes were amplified by overlap PCR with different VH and VL library genes assembled by pairs of different CDR mutation primers. scFv DNA was purified and digested with SfiI and was then inserted into pComb3XSS. Positive phage-displayed antibodies with high affinity were selected on live cell lines. **Results:** After 5 cycles of cell screening and 2 cycles of antigen screening, 60 positive clones were subjected to ELISA. The selected high affinity scFv gene was cloned into pBAD/gIII for expression and was then studied by SDS-PAGE and Western blotting; a band was showed at about 30 000 as expected. To analyze the immunological characters of scFv for Met binding, flow cytometry and immunoprecipitation assays were carried out with S114, MKN45 and NIH3T3 cell lines. The results of flow cytometry and immunoprecipitation demonstrated scFv could bind to natural Met specifically on the surface of S114 and MKN45 cells (Kd = 4.763×10^{-8} mol/L), and the affinity was about 100 times higher than before mutation (Kd = 5.24×10^{-6} mol/L). The results of ELISA showed that there was no change in the binding site of antigen after maturation of the affinity. **Conclusion:** It is indicated that anti-Met scFv antibody fragment can recognize Met extracellular domain in natural conformation with relatively high affinity, and it may be a potential candidate for clinical diagnosis and therapy.

[基金项目] 江苏省卫生厅重大科技项目(No. wkj2004-2-12)

[作者简介] 朱进(1968-), 男, 江苏高邮人, 副研究员, 博士研究生, 主要从事基因工程抗体的研究

[通讯作者] 管晓虹, E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

[**Key words**] phage-displayed antibody library; anti-Met scFv fragment; affinity maturation; anti-tumor
[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(5): 417-422]

随着抗体工程技术的发展,抗体对疾病的治疗作用越来越为人们所重视,单抗已用于器官移植、肿瘤、心血管疾病等多种疾病的治疗,成为研发最活跃的生物药物之一,而以酪氨酸激酶为靶点的药物研发已成为国际抗肿瘤药物研究的热点^[1-3]。Met 是一类酪氨酸激酶受体,其唯一的配体是肝细胞生长因子/扩散因子(HGF/SF)。Met 不仅成为恶性肿瘤的标志物,而且已被确立为肿瘤治疗的靶向分子。抗人 Met 和 HGF/SF 的鼠源抗体分子已被制备,其中不少在体外实验和动物肿瘤模型中显示出较强的亲和力和阻断功能^[4-7],但由于鼠源单抗的异源性及其他一些药代动力学问题阻碍其在人体内的应用。为克服鼠源单克隆抗体分子量过大、免疫原性强等缺点,科研人员发展了嵌合抗体、人源化抗体等小分子抗体片段。但在实际工作中,构建的小分子抗体片段或人源化抗体的亲和力和特异性较低。为有效改善抗体的亲和力和特异性,近年来发展了一系列抗体体外成熟的方法和技术。由于抗体的亲和力和特异性主要是由抗体的可变区决定,因而进行抗体体外成熟时几乎都是对抗体的可变区进行突变。在抗体的可变区中,与抗原结合关系最紧密的是 6 个 CDR 区,而在 6 个 CDR 区中,HCDR3 和 LCDR3 不仅在抗原的结合方面贡献最大,而且其与抗体可变区其他部分的相互作用较其他 4 个 CDR 多,因而体外突变通常选择一个或多个 CDR 进行突变^[8,9]。

本研究以 Met 为靶标、以噬菌体抗体展示技术为平台,通过抗体重链与轻链互补决定区(CDR-H 和 CDR-L)基因的有限突变与随机突变,构建抗 Met 单链抗体的次级抗体库,筛选高亲和力的抗 Met 全人基因工程小分子抗体,为研制抗肿瘤药物、肿瘤的诊断和临床治疗提供新的选择。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株及细胞株

噬菌粒 pComb3XSS 和 pComb3XTT 由 Barbas laboratory, Scripps research institute 惠赠;pBAD-g III/A 和 XL1-Blue 购自 Invitrogen 公司, TOP10 F' 为 Stratagene 公司产品。S114 细胞为稳定表达人 Met 蛋白的 NIH3T3 转化细胞株; MKN45 为过表达 Met 的人脑胶质瘤细胞株。培养液为 DMEM 加入 10% FBS, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。

1.2 工具酶、酶标抗体和引物

Taq 酶、T4 DNA 连接酶为 Invitrogen 公司的产品,

Sfi I 内切酶为 Roche 公司产品。酶标抗体购自 Jackson Immunoresearch 公司,其他常规试剂均为 Invitrogen 和 Sigma 公司产品。所用引物由 Invitrogen 公司合成。

VL 基因库引物:Vk1: 5'-GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC C-3'; Vk2: 5'-GAAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT NNS NNS NNS AGT TTG CAA AGT GGG GT CCC ATC AAG-3'; Vk3: 5'-TCG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC CTG GCC AAA AGT WNN WNN WNN WNN WNN WNN CTG TTG ACA GTA GTA AGT TGC AAA ATC-3'; Vk4: 5'-GGA AGA TCT AGA GGA ACC TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC CTG 3';

VH 基因库引物:VH1: 5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC TCC TCT GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG 3'; VH2: 5'-GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AVT RVM WMY KMT ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT -3'; VH3 :5'- CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA DHT NNS DGG DMT DMT GGA AGT AHC AVV TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CG -3'; VH4: 5'-CG GCC CTT CAC GGA GTC TGC ATA GTA BBT GDT ACT TCC AKH AKH CCH WNN ADH TGC CAC CCA CTC CAG CCC CTT GCC TGG-3'; VH5: 5'-CGAT-GGGCCCTTGGTGGAGGC AGG GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA WNN WNN WNN WNN KYK CGC ACA GTA ATA CAC AGC CGT -3'; VH6: 5'-C CTG GCC GGC CTG GCC ACT AGT GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC AGG GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC-3'。

scFv 基因库引物:RSC-F: 5'-GAG GCG GAG GGC CCAG GCG GCC GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CC-3'; RSC-B: 5'-GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CGG CAG GGG AGA CGG TGA CCA GGG TGC C-3'。

兼并碱基代码: N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B = C/G/T, H = A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W = A/T, Y = C/T。

1.3 抗 Met scFv 抗体次级库的构建

根据实验室筛选出的全人抗 Met Fab 抗体重链和轻链基因的互补决定区序列,设计并合成数对寡核苷酸引物,分别在 CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L2 和 CDR-L3 引入有限突变和随机突变。通过不同引物的配对组合,VL1/VL3、VL2/VL4 在轻链可变区 CDR-L2、

CDR-L3 引进随机突变, *VH2/VH6*、*VH1/VH4* (*VH3/VH6*)、*VH1/VH5* 在重链可变区的 *CDR-H1*、*CDR-H2*、*CDR-H3* 引入有限突变或随机突变,合成高度多样性的重链可变区基因和轻链可变区基因,经重叠延伸 PCR,扩增并拼接合成 VH 和 VL 基因库。

重链与轻链可变区基因 *VH*、*VL* 为模板,用引物 R5F-F/R5C-B 经重叠延伸 PCR 合成 *scFv* 基因。*scFv* 基因和 pComb3XSS 载体分别经 *Sfi* I 酶切、纯化和连接后,重组表达质粒用电转化法导入感受态大肠杆菌 XL1-Blue 中。

1.4 抗 Met 特异性 scFv 的筛选

1.4.1 基于活细胞表面受体的抗 Met 抗体的筛选

以 NIH3T3 转化并稳定表达 *Met* 基因的细胞系 S114 为阳性靶分子进行筛库,以 NIH3T3 细胞作为阴性筛选细胞。将新鲜制备的、约 1×10^{11} 噬菌体抗体首先与 S114 的前体细胞 NIH3T3 (*Met*⁻) 相混合并孵育一定时间,去除抗体库中能够与 NIH3T3 相结合的非特异性抗体。孵育混合物的上清再与 S114 细胞 (*Met*⁺) 共同孵育,用完全培养液洗涤细胞 10 次。冻融并超声破碎细胞,胰酶消化被结合的噬菌体,感染大肠杆菌 XL1-blue,进行下一轮的扩增和筛选。

1.4.2 噬菌体抗体的固相筛选 将经过 NIH3T3/S114 细胞系 5 轮阴性/阳性细胞筛选并富集的噬菌体,进一步用固相抗原筛选。加入经细胞筛选的噬菌体抗体于 *Met* 抗原包被的免疫板中孵育,37 °C 1 h。用不同的洗涤试剂如 PBST 或 NH_4SCN 经过多次不同强度的洗涤,去除未结合或者亲和力比较弱的噬菌体,胰酶消化结合在抗原上的噬菌体,感染大肠杆菌 XL1-blue,进行下一步分析。

1.5 scFv 的表达

取 Phage ELISA 值最高的克隆,扩增 *scFv* 基因并克隆于 pBAD-g III/A 表达载体中,转化并构建 TOP10 表达工程菌,取单菌落过夜培养并经 L-阿拉伯糖诱导表达。比较不同的培养条件,如 SB 培养液和 LB 培养液、不同的诱导表达温度。SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表达结果。

1.6 scFv 的复性与纯化

诱导表达后的细菌,经超声破菌、洗涤后,用含有 8 mol/L 尿素的变性液处理过夜。将 5 ml 变性蛋白溶液加入到 245 ml 稀释用变性液中,搅拌混合。稀释后的变性蛋白溶液装入预先处理好的透析袋中,将透析袋放入一装有 5 L 复性液的烧杯中,4 °C 搅拌透析 5 h。将透析袋取出,放入另一装有 5 L 复性液的烧杯中,4 °C 搅拌透析 10 ~ 15 h。更换透析液,放入另一装有 5 L PBS 的烧杯中,4 °C 搅拌透析 10 ~ 15 h。将透析溶液

10 000 r/min,4 °C 离心 30 min,取上清。IMAC 亲和纯化,经洗脱和透析处理后,用于活性分析。

1.7 scFv 的免疫学特性分析

1.7.1 ELISA 分析 用羊抗人 IgG Fc 2 μg/ml 包板,4 °C 过夜,用封闭液 37 °C 封闭 1 h 后洗板,加入 Fc-Met 融合蛋白 4 °C 过夜。用封闭液 37 °C 封闭 1 h 后洗板,加入梯度稀释的 *scFv* 抗体,分别加入 1:1 000 稀释鼠抗 Myc 抗体和 HRP 标记的羊抗鼠抗体显色,酶标仪测 D_{450} 光密度值。

1.7.2 免疫沉淀 将 S114、MKN45 和 NIH3T3 细胞裂解液经冻融、超声和离心后,分别取 1 ml 上清液加入 10 μg 的 *scFv*,4 °C 旋转孵育 2 h,加入鼠抗 Myc 抗体和洗涤后的 rProtein G 50 μl,4 °C 旋转孵育过夜。样品经 PBST 两次洗涤后,加入 50 μl 的 2 × SDS-PAGE 上样缓冲液处理,Western blotting 检测。

1.7.3 流式细胞术分析 用 S114 和 NIH3T3 细胞在 4 °C 条件下 3% BSA 封闭 15 min,洗涤后加入 *scFv*/鼠抗 Myc 抗体,4 °C 孵育 30 min,加入 FITC 标记的羊抗鼠抗体,4 °C 孵育 30 min。细胞经 PBS 洗涤 2 次后,用流式细胞仪和测 CellQuest 分析软件分析 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)。

1.8 亲和力测定

参照 Beatty 等^[10]非竞争 ELISA 法测定抗体亲和力常数的方法,计算公式改良为 $K_{\text{aff}} = 1 / \{ 2 [\text{Ab}']_t - [\text{Ab}]_t \}$,分别用 2 个浓度的抗原检测梯度稀释抗体,测定光密度值。SPSS10.0 软件分别分析 2 种抗原浓度、抗体浓度的对数与光密度值之间的关系并拟合曲线。根据拟合的两条曲线,分别计算 1/2 最大 D 值时抗体的实际浓度 $[\text{Ab}]_t$ 和 $[\text{Ab}']_t$,根据 $K_{\text{aff}} = 1 / \{ 2 [\text{Ab}']_t - [\text{Ab}]_t \}$ 计算亲和常数。

1.9 竞争 ELISA 实验

以 *Met* 抗原包板,每孔加入 1 mg/ml 的 Fab 50 μl,再分别加入 1:1、1:2、1:10 和 1:50 稀释的 *scFv* (1 mg/ml),室温 1 h,洗涤后加入 HRP 标记的鼠抗人 Fab 抗体显色,酶标仪测 D_{450} 值。以未加入 *scFv* 的检测结果为对照,计算结合抑制率。

2 结果

2.1 抗 Met 次级抗体库的构建

scFv 基因合成成分两步进行。不同的引物配对,合成高度多样性的重链可变区基因和轻链可变区基因,经重叠延伸 PCR,扩增并拼接合成 *scFv* 基因。*scFv* 抗体基因和 pComb3XSS 载体分别用 *Sfi* I 酶切,经胶回收并定量后,16 °C 连接过夜,多次电转导入感受态大肠杆菌 XL1-blue,获得了库容为 9.83×10^8 的全人抗 *Met*

scFv 抗体库。

2.2 阳性噬菌体抗体克隆的筛选

经过 5 次 NIH3T3/S114 细胞筛选和 2 次固相筛选的噬菌体,感染大肠杆菌 XL1-Blue,随机挑取 60 个克隆,以 phage ELISA 进行鉴定,其中 46 个为阳性克隆,阳性率为 76.7%。选取 Phage ELISA 检测结果较高的阳性克隆,过夜培养后提取质粒并测序。DNA 序列分析结果表明,在 23 个正确序列中,有 4 种不同的序列,分别为 S1、S2、S3、S4。在 23 个克隆中,S1 为 18 个,S3 为 3 个,S2 和 S4 各 1 个。重复 Phage ELISA 结果表明,S1 的 D_{450} 值和滴度最高且较稳定,提示 S1 是亲和力较高的克隆。

2.3 抗 Met scFv 抗体的表达及纯化

将经 DNA 测序的 scFv 基因克隆于 pBAD/gIII 中,不同浓度 L-arabinose 及不同温度诱导表达结果显示,诱导剂浓度与培养温度对 scFv 表达量影响不大。在不同的温度条件下,培养上清未见 scFv 蛋白,表达蛋白以包涵体存在,表达量占全菌蛋白的 20% 左右。包涵体经不同浓度的尿素变性、谷胱甘肽和精氨酸复性液复性,并经 IMAC 纯化,获得 scFv 蛋白,相对分子质量约为 30 000 (图 1)。

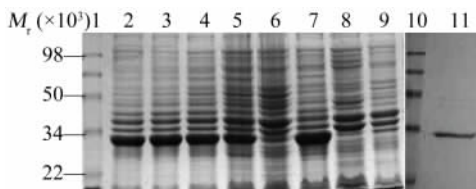


图 1 单链抗体在大肠杆菌 Top10 中的表达
Fig. 1 Single chain antibody expressed in *E. coli* TOP10 induced by different concentrations of L-arabinose and purified by IMAC

Lane 1, 10: Standard molecular weight marker; lane 2-5: Induced by 5%, 2%, 0.2% and 0.02% L-arabinose, respectively; lane 6: Sonicated supernatant of 0.2% L-arabinose bacteria; lane 7: The whole bacteria protein induced by 0.2% L-arabinose; Lane 8: Non-induced bacteria protein; Lane 9: *E. coli*. TOP10 only; lane 11: Purified scFv protein

2.4 抗 Met scFv 抗体的免疫学特性

ELISA 检测分析表明,当 scFv 稀释滴度从 10 000 增加到 160 000 倍时, D_{450} 值从 1.568 降低到 0.166 (Blank 0.145);免疫沉淀结果显示,scFv 能够结合 S114 和 MKN45 细胞中的 Met 前体蛋白(170 000)和 Met 功能蛋白(140 000)(图 2)。

FACS 分析结果显示,scFv 抗体能够与大量表达

Met 基因的 S114 细胞特异性结合,与阴性对照细胞 NIH3T3 细胞没有明显的结合(图 3);以上研究结果表明,scFv 分子具有与 Met 胞外区的天然构象结合的能力和特异性。

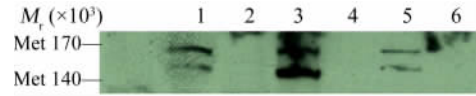


图 2 单链抗体的免疫沉淀和 Western blotting 分析
Fig. 2 Immunoprecipitation and Western blotting of S1

Met proteins from cell lysis were immunoprecipitated with S1 and detected by Western blotting. lane 1: S114 lysate as a positive control; Lane 2, 3 and 5: NIH3T3, MKN45 and S114 cell lysate immunoprecipitated with S1; lane 4 and 6: MKN45 and S114 cell lysate immunoprecipitated without S1

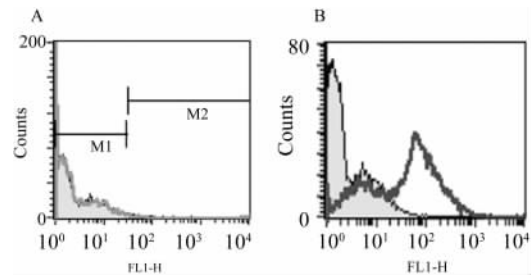


图 3 流式细胞术分析单链抗体的特异性

Fig. 3 Binding ability of scFv was tested by FACS analysis

A: NIH3T3 cells were incubated with S1, anti-myc antibody and FITC-conjugated anti-mouse antibody (white area), or without only S1 (grey area, lapped over the white area); B: S114 cells were incubated with S1, anti-myc antibody and FITC-conjugated anti-mouse antibody (white area), or without only S1 (grey area)

2.5 抗体的亲和力测定和结合位点

亲和力测定结果显示,scFv 的亲合常数 K_d 为 4.76×10^{-8} mol/L,与突变前抗体的亲和力 K_d 值 5.24×10^{-6} mol/L 相比,提高约 100 倍。竞争 ELISA 结果显示,当 scFv 1:50 稀释时,Fab 的结合抑制率为 11.93%;当 scFv 1:1 稀释时,Fab 的结合抑制率增加为 78.36%。该结果表明 scFv 和 Fab 的抗原结合位点相同(图 4)。

3 讨论

HGF 受体(Met)在胃癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌和脑胶质瘤等多种肿瘤中过表达^[11-15],因此 Met 已成为肿瘤生物治疗的靶标,而人源抗 Met 基因工程抗体又成为较好的“导弹”。本

实验室从天然抗体库中筛选出抗 Met Fab 分子,但其亲和力较低。利用噬菌体抗体库技术进行抗体亲和力成熟是较成熟的方法之一,但抗体库的筛选策略直接影响筛选的结果。目前有固相筛选、液相筛选和活细胞筛选等方法,不同的方法各有优缺点,需要结合实验目标进行选择和优化组合。在本研究中,首先选用 Met 过表达细胞 S114 和阴性细胞 NIH3T3 进行 5 轮消减筛选,再用 Met 包被的免疫板筛选 2 轮。细胞筛选的优势是,细胞表面膜蛋白多经过翻译后修饰,具有特定的空间构象,筛选出的抗体能够高效、特异地结合靶标,可以直接用于体外或体内的研究。固相筛选可以提高筛选的特异性和筛选效率^[16]。实验结果表明,利用该方法获得的随机克隆的阳性率为 76.7%。

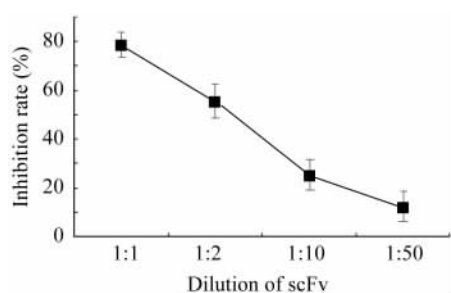


图4 scFv 和 Fab 的竞争 ELISA 检测

Fig. 4 Competitive ELISA detection of scFv and Fab

抗体筛选的洗涤强度对实验结果同样有着明显影响。洗涤强度过弱,出现较高的假阳性,超过 85% 的克隆含空载体或截短的抗体基因片段。因为噬菌粒较小的噬菌体,包装速度相对要快,外源蛋白的毒性也影响着噬菌体的增殖。在宽松的洗脱条件下,经过几轮扩增,这些非特异的噬菌体会迅速增加^[17-18]。

本研究中,采用酶联免疫、免疫沉淀、流式细胞术等方法,从多个方面验证该抗体的特异性。在 ELISA 检测中,采用真核表达的 Met 抗原包板,使筛选和鉴定抗原尽可能与细胞表面的抗原结构相一致;细胞筛选和固相筛选相结合,提高了筛选的效率。在 IP 和 FACS 中,用 S114 细胞(Met 转化的 NIH3T3 细胞)和 NIH3T3 细胞作对照研究,提高了实验的准确性。

基因工程抗体具有免疫原性弱、组织穿透能力强、便于大规模生产等优点,但抗体的亲和力仍然是人源基因工程抗体临床应用的瓶颈。但是 Weinstein 等^[19,20]人的研究认为过高的亲和力抗体导致位阻效应的产生,影响抗体的穿透力,尤其是针对实体瘤的抗体。抗体的亲和常数达到 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 才具有较好的临床应用价值。本研究中,抗体的亲和力 Kd 值从 5.24×10^{-6} mol/L 增加到 4.76×10^{-8} mol/L,提高约 100 倍,

同时保持与 Met 胞外区结构域的结合特异性。该抗体通过与偶联物如放射性核素、化疗药物、毒素、酶、细胞因子、超抗原、光敏剂、脂质体或纳米颗粒等结合,可以强化临床治疗效果^[21],从而为肿瘤的生物治疗提供较好的候选药物。

[参考文献]

- [1] Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smart drugs: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy [J]. *Cancer cell*, 2002, 1(2): 117-123.
- [2] Fabbro D, Ruetz S, Buchdunger E, et al. Protein kinase as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs [J]. *Pharmacol Ther*, 2002, 93(2-3): 79-98.
- [3] 陈志南,邢金良,杨向民,等. 抗人肝癌单克隆抗体 HAB18 Fd 及轻链基因的克隆与鉴定 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2003, 10(2): 105-109.
- [4] Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, et al. MET, metastasis, motility and more [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(12): 915-925.
- [5] Kankuri E, Cholujova D, Comajova M, et al. Induction of hepatocyte growth factor/scatter factor by fibroblast clustering directly promotes tumor cell invasiveness [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9915-9922.
- [6] Casey JL, Napier MP, King DJ, et al. Tumor targeting of humanised cross-linked divalent-Fab' antibody fragments: A clinical Phase I/II study [J]. *Br J Cancer*, 2002, 86(9): 1401-1410.
- [7] Nabhan C, Dyer MJ, Rosen ST. Current status of monoclonal antibody therapy for chronic lymphocytic leukaemia [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2003, 17(22): 253-262.
- [8] Popkov M, Jendreyko N, McGavern DB, et al. Targeting tumor angiogenesis with adenovirus-delivered anti-Tie-2 intrabody [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3): 972-981.
- [9] Rothlisberger D, Honegger A, Pluchthun A. Domain interaction in the fragment: A comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability [J]. *J Mol Biol*, 2005, 347(4): 773-789.
- [10] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos WG. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay [J]. *J Immunol Methods*, 1987, 100(1-2): 173-179.
- [11] Zemlin M, Klinger M, Link J, et al. Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures [J]. *J Mol Biol*, 2003, 334(4): 733-749.
- [12] Hay RV, Cao B, Skinner RS, et al. Met5, a new monoclonal antibody for radioimmunoscintigraphy of met-expressing tumors [J]. *J Nucl Med*, 2003, 44(2): 178-183.
- [13] Shinomiya N, Vande Woude GF. Suppression of Met expression: A possible cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5085-5090.
- [14] Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphoring receptor: Cell signaling for invasion growth [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(4): 289-300.
- [15] Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, et al. Met provides essential signals for liver regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(29): 10608-10613.
- [16] Souriau C, Rothacker J, Hoogenboom HR, et al. Human antibody fragments specific for epidermal growth factor receptor selected from large non-immunised phage display libraries [J]. *Growth Factor*, 2004, 22(3): 185-194.

- [17] Sawyer C, Embleton J, Dean C. Methodology for selection of human antibodies to membrane proteins from a phage-display library [J]. J Immunol Methods, 1997, 204(2): 193-203.
- [18] Weiner LM, Carter P. Tunable antibodies [J]. Nature Biotech, 2005, 23(5): 556-557.
- [19] Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies [J]. Nat Rev Cancer, 2001, 1(2): 118-129.
- [20] van Osdol W, Fujimori K, Weinstein JN. An analysis of monoclonal

antibody distribution in microscopic tumor nodules: Consequences of a "binding site barrier" [J]. Cancer Res, 1991, 51(18): 4776-4784.

- [21] Smith KA, Nelson PN, Warren P, et al. Demystified recombinant antibodies [J]. J Clin Pathol, 2004, 57(9): 912-917.

[收稿日期] 2006-09-22

[修回日期] 2006-10-20

[本文编辑] 郁晓路

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0422-01

· 研究简报 ·

新城疫病毒 D90 毒株致肺癌 A549 细胞死亡的方式

Experiment on D90 oncolytic strain of newcastle disease virus to kill lung cancer cells *in vitro*

符芳¹, 杨宝峰², 宋纯², 李曦¹ (1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医国家重点实验室; 2. 哈尔滨医科大学, 哈尔滨 150001)

新城疫病毒(newcastle disease virus, NDV)属副黏病毒, 可以引起禽类的新城疫。新城疫病毒在人类癌细胞中的复制效率是在正常细胞中的 10 000 倍, 因此, NDV 可以选择性杀伤肿瘤细胞, 这提示人们可将它作为潜在的抗癌因子。目前, 已经应用于人癌症治疗的 NDV 毒株有 73-T、MTH-68 等溶癌毒株和 Mlster 等非溶癌毒株, 其中 NDV73-T 已经被证明可以在体外杀死人的多种肿瘤细胞, 同时在体外试验中, 该毒株被证明不会杀死正常的、增生性的白细胞或人的正常皮肤纤维原细胞, 但是在于人的肿瘤细胞具有明显的杀伤作用。本研究在新城疫病毒 D90 株明显抑制肺癌 A549 细胞生长并导致细胞死亡的基础上, 对其可能的致死作用方式进行了探讨。

将不同浓度的 D90(1.6×10^{10} 、 1.6×10^9 、 1.6×10^8 、 1.6×10^7 PFU/ml)接种肺癌 A549 细胞, 并通过吖啶橙染色、电镜观察及流式细胞仪检测, 进一步探讨其致死方式。吖啶橙染色后, 荧光显微镜下可见, 肺癌 A549 细胞的细胞核呈现均匀的黄绿色荧光, 周边细胞质呈现橘黄或橘红色晕圈; 经 NDV D90 作用的癌细胞则呈现明显的形态学变化: 细胞质与细胞核呈致密浓染的黄绿色, 亦有少数黄绿色碎片, 染色质浓缩到核边, 核碎裂, 有的细胞形成合胞体; 病毒作用 24 h 后, 电镜下观察, 病毒 1.6×10^{10} PFU/ml 作用下的细胞中发现了凋亡小体, 同时也看到了典型的坏死细胞。流式细胞仪的分析结果显示: 病毒(1.6×10^{10} PFU/ml)作用 24 h, 细胞的流式图第四象限出现 Annexin V⁺/PI⁺ 的单阳性细胞(早期凋亡细胞), 细胞凋亡率为 8.67%; 随着浓度的减小, 细胞凋亡率逐渐趋于正常细胞的凋亡水平; 同时 Annexin V⁺/PI⁺ 的双阳性的凋亡晚期细胞和死细胞数值与对照细胞相近; 作用 48 h, 各浓度作用下的 Annexin V⁺/PI⁺ 的双阳性的凋亡晚期细胞和死细胞迅速增加了 43% ~ 53% 不等, 凋亡细胞的量也有所增加, 但增加的量低于 10%。在流式细胞仪抑制凋亡基因 BCL-2 检测中, 对照细胞表达 BCL-2 基因的细胞所占百分比是 56.23%, D90 病毒不同浓度处理细胞表达 BCL-2 基因的细胞所占的百分比均低于 1.88%。同时接种 D90 毒株到

胎儿肝细胞, 发现对其无任何损伤作用。

溶癌毒株杀死癌细胞的机制是由溶癌毒株所产生的感染性病毒子代粒子, 其活性的 HN、F 蛋白能引起被感染细胞的原生质膜和邻近细胞原生质膜融合, 继而产生大的不可复制的融合细胞-合胞体。本实验通过吖啶橙染色, D90NDV 毒株作用的细胞呈现典型的凋亡特征, 同时还出现了合胞体。因此, 初步推断该毒株为溶癌毒株。

肿瘤的发生是由于 BCL-2 的高表达抑制了细胞的凋亡过程, 检测这个特异基因的表达水平也成为检测细胞凋亡的一种常用方法。它在人体多种形态的肿瘤中过度表达, 可抑制由多种刺激引起的细胞凋亡。本实验利用流式细胞仪检测 BCL-2 基因表达的结果与此相符, 因此进一步从基因的 mRNA 表达水平推断 D90 毒株于 24 h 诱导了细胞的凋亡。

通过电镜和流式细胞仪技术检测到了凋亡和坏死细胞, 并进行了定量, 进一步证实了新城疫 D90 毒株具有诱导凋亡的能力, 并伴有坏死。在 24 h 的时间段, 病毒的作用方式主要表现为凋亡; 在 48 h、72 h 时间段内, 病毒的作用方式主要表现为坏死。初步研究表明, 其致细胞死亡方式为早期凋亡及快速导致细胞死亡的坏死机制。安全性试验证明, 新城疫病毒 D90 株对胎儿肝细胞无任何损伤作用。综上所述, 新城疫病毒 D90 株能够以诱导凋亡和坏死的方式选择性地作用于肺癌 A549 细胞, 并且对胎儿肝细胞无损伤作用, 有望成为一种有效的抗肿瘤生物制剂。

[关键词] 新城疫病毒; D90 毒株; 凋亡

[中图分类号] R734.2

[文献标识码] D

[收稿日期] 2006-07-11

[修回日期] 2006-09-10

[本文编辑] 韩丹

[基金项目] 黑龙江省青年基金项目(No. QC06C081)

[作者简介] 符芳(1973-), 女, 汉族, 黑龙江省明水县人, 主要从事兽医预防学方面的研究

[通讯作者] 李曦, E-mail: lx2005@126.com