

[文章编号] 1007-385X(2006)06-0435-07

· 论 著 ·

## 突变减毒志贺样毒素 I 真核表达载体的构建及其抗卵巢癌的活性

魏 枫,任秀宝,刘 虹,于津浦,付晓达,郝希山(天津医科大学附属肿瘤医院免疫学研究室,天津 300060)

**[摘要]** **目的:** 构建表达突变减毒的志贺样毒素 I (Shiga-like toxin 1, Stx1) 的真核表达载体,并考察其抗人卵巢癌细胞 SKOV3 的活性。**方法:** 重叠 PCR 法构建毒性为原毒素毒性 1/10 和 1/100 的突变减毒 Stx1 编码序列, T-A 克隆并测序后分别连入真核表达载体 pcDNA3.1。转染 SKOV3 细胞, RT-PCR 法检测 Stx1 mRNA 在 SKOV3 细胞中的表达, 观察突变减毒 Stx1 对 SKOV3 细胞周期的影响和致 SKOV3 细胞死亡的方式。使用 SKOV3 荷瘤裸鼠模型, 不同毒性突变减毒 Stx1 真核表达载体经脂质体包裹后肿瘤局部注射给药, 评价其体内抑瘤能力。**结果:** 突变减毒 Stx1 真核表达载体经酶切和测序鉴定与预期突变序列一致; RT-PCR 证实转染后的 SKOV3 细胞中存在目的 mRNA; 体外实验观察到该载体转染可以使人卵巢癌 SKOV3 细胞的细胞周期阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期, 转染后 SKOV3 细胞死亡的主要途径是坏死; 体内实验显示突变减毒 Stx1 真核表达载体可以抑制裸鼠体内 SKOV3 移植瘤的生长。**结论:** 通过重叠 PCR 方法获得 2 种突变减毒 Stx1 编码序列, 成功构建了相应的真核表达载体, 并证实该载体具有明显的抗卵巢癌活性。

**[关键词]** 志贺样毒素 I; 突变; 减毒; 真核表达; 卵巢癌

**[中图分类号]** R392.12 **[文献标志码]** A

## Construction of recombinant eukaryotic expression vectors carrying genes encoding attenuated Shiga-like toxin I mutant and their anti-oophoroma effect

WEI Feng, REN Xiu-bao, LIU Hong, YU Jin-pu, FU Xiao-da, HAO Xi-shan (Department of Immunology, Affiliated Cancer Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct recombinant eukaryotic expression vectors carrying genes encoding attenuated Shiga-like toxin 1 mutant and to study their anti-oophoroma effect *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The genes encoding attenuated Shiga-like toxin 1 mutant were amplified by overlap PCR and then cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1. The recombinant plasmids were transfected into SKOV3 cells and RT-PCR was used to determine the expression of Stx1 mRNA in SKOV3 cells. The influence of attenuated Stx1 on the cell cycle of SKOV3 cells and the mechanism by which Stx1 induces apoptosis of SKOV3 cells were observed. Then Stx1 with different cytotoxicities (after packed by liposome) were intratumorally injected into immunodeficient mice harboring SKOV3 to assess their anti-oophoroma effect *in vivo*. **Results:** It was shown that the genes encoding attenuated Stx1 mutant were successfully cloned into pcDNA3.1 and their mRNA expression in transfected SKOV3 cells was verified by RT-PCR. *In vitro* study showed that the constructed plasmid arrested SKOV3 cells at G<sub>2</sub>/M stage. The post-transfection death of SKOV3 cells was mainly through necrosis as assessed by flow cytometry. *In vivo* study showed that the constructed plasmid had a significant anti-oophoroma effect on the growth of SKOV3 tumor in immunodeficient mice. **Conclusion:** Two sequences encoding attenuated Stx1 mutant have been successfully constructed and expressed in eukaryotic expression system, which have been confirmed to have obvious anti-oophoroma effect *in vitro* and *in vivo*.

**[Key words]** Shiga-like toxin I (Stx1); mutation; attenuation; eukaryotic expression; oophoroma

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(6): 435-441]

志贺样毒素(Shiga-like toxins, SLTs)又称 Vero 毒素(Vero toxins, VTs),主要由肠出血性大肠杆菌等产生,分为 Stx1 和 Stx2 两种,是一种毒性极强的生物毒素,其中 Stx2 较 Stx1 毒性强约 100 倍<sup>[1]</sup>。SLTs 均由 1

**[基金项目]** 天津市卫生局科技基金(No. 05KY32)

**[作者简介]** 魏枫(1974-),男,天津人,博士研究生,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究

**[通讯作者]** 郝希山, E-mail: Xishan\_Hao@Yahoo.com

个相对分子质量约 32 000 的毒性亚基( A 亚基 )和 5 个约 7 700 的受体结合亚基( B 亚基 )组成。A 亚基为生物活性单位,在细胞内弗林蛋白酶的作用下,裂解为 A1 和 A2 两个片段。A1 在细胞质中通过阻止延伸因子-1 依赖的氨酰-tRNA 与核糖体结合而抑制蛋白质合成,引起细胞病变与死亡<sup>[2-3]</sup>。由于 SLTs 毒性极强,简单使用原型毒素进行肿瘤治疗存在很大安全隐患。有研究<sup>[4]</sup>报道,通过定点突变技术,识别出一些 Stx1 A 亚基上决定毒素活性的关键性氨基酸,相应碱基突变后可产生不同减毒活性的 Stx1 编码序列。现已发现<sup>[4]</sup>,在 Stx1 A 亚基上存在 3 个高度保守的区域,其中的 Glu167、Arg170、Trp203 等氨基酸残基均与 A 亚基的活性密切相关,相应基因编码序列上的单一突变就可能使 Stx1 的细胞毒性下降 2 000 倍,同时改变 2 处关键性氨基酸甚至可以使 Stx1 失去毒性。在前人研究的基础上,本研究构建突变后毒性为原型毒素毒性 1/10 和 1/100 的减毒 Stx1 编码序列,并克隆入真核表达载体,考察这两种突变减毒 Stx1 抗卵巢癌的活性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

携带 Stx1 编码序列的质粒 pcDNA3. 1-Stx1、携带绿色荧光蛋白编码序列的质粒 pcDNA3. 1-GFP 由本室保存;质粒 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;质粒 pcDNA3. 1( + )购自 Invitrogen 公司;感受态宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  购自博大泰克公司。ExTaq DNA 聚合酶,限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I, T4 DNA 连接酶、Oligo-(dT)<sub>15</sub> 购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;脂质体 Lipofectamine 2000、无血清培养基 Opti-MEM1、Superscript II 逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。人卵巢癌细胞系 SKOV3 由本室保存。SPF 级雌性 6 周龄 BALB/c nu/nu 裸小鼠 20 只,由北京大学医学部实验动物科学部提供,实验动物合格证号:SCXK(津)2002-0004。

1.2 突变减毒 Stx1 编码序列的构建

根据文献<sup>[4]</sup>设计突变引物,采用重叠 PCR 法,以携带原型 Stx1 编码序列的质粒 pcDNA3. 1-Stx1 为模板,PCR 构建毒性为原型毒素毒性 1/10、1/100 的突变减毒 Stx1 编码序列,分别命名为 Stx1D10、Stx1D100,引物序列见表 1。两组引物中,P1、P4 通用,P1 的 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点,含 Stx1 A 亚基起始码,P4 的 5'端引入 *Xho* I 酶切位点,含 Stx1 B 亚基终止码。重叠 PCR 如图 1 所示:(1) 分别用两对引物 P1、P2 和 P3、P4 扩增拟突变位点两侧的 Stx1 序列并分别克隆入 pMD18-T 质粒;(2) 用 P5 代替 P2,P6 代替 P4,再次扩

增 2 片段,P5、P6 均跨越拟突变的位点,与两侧的 Stx1 序列互补,而与拟突变位点对应的碱基则更换为突变后的碱基;(3) 上步的 PCR 产物纯化后互为引物,PCR 扩增 10 个循环,然后加入 P1、P4,PCR 扩增 20 个循环,

表 1 重叠 PCR 构建突变减毒 Stx1 编码序列的引物

Tab. 1 Primers for overlap PCR synthesizing the genes encoding attenuated Stx1 mutant

Primer name	Primer sequence( 5'-3' )
P1	TAGGGATCCATGAAGATAATTATTTTATAG
Stx1D10-P2	CCAGTTCAATGTAAGATCAACATC
Stx1D100-P2	GTAAGCTTCAGCTGTCACAGT
Stx1D10-P3	GGAAGGTTGAGTAGCGTC
Stx1D100-P3	TTTTCGCAAATACAGAG
P4	ATCCTCGAGCGTCAACGAAAAATAACT-TCGCTGAATCCCCCTCCATTATG
Stx1D10-P5	GACGCTACTCAACCTTCGGAAGTTCAATG-TAAGATCAACATC
Stx1D100-P5	CTCTGTATTTGCCGAAAATGTAAAGCT-TCAGCTGTCACAGT
Stx1D10-P6	GATGTTGATCTTACATTGAACTTCGGAAG-GTTGAGTAGCGTC
Stx1D100-P6	ACTGTGACAGCTGAAGCTTTACATTTTCG-GCAAATACAGAG

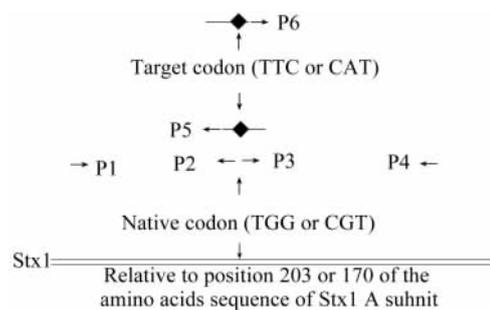


图 1 重叠 PCR 构建突变减毒 Stx1 编码序列 Stx1D10 和 Stx1D100 示意图

Fig. 1 Schematic representation of overlap PCR synthesizing attenuated Shiga-like toxin I mutant gene Stx1D10 and Stx1D100

The sequence encoding Stx1D10 was made by changing the codon TGG to TTC, resulting in the amino acid at position 203 of the A subunit changes from tryptophan to phenylalanine. The sequence encoding Stx1D100 was made by changing the codon CGT to CAT, resulting in arginine at position 170 of the A subunit was replaced by histidine

获得终产物突变减毒 Stx1 编码序列(反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 熄火 30 s,72 °C 延伸 1 min,10 个循环;94 °C 变性 30 s,58 °C 熄火 30 s,72 °C 延伸 1 min,20 个循环;72 °C 延伸 10 min。)

### 1.3 目的片段与 pMD18-T 载体连接、转化和鉴定

PCR 终产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并纯化回收,与 pMD18-T 载体于 4 °C 连接过夜,连接产物转化感受态菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,以含有氨苄青霉素及 X-Gal、IPTG 的 LB 琼脂平板筛选,挑取白色单菌落增菌后提取质粒。*Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定,各选取 1 个酶切鉴定正确的克隆送大连宝生物公司测序。最终获得的 2 个正确克隆的携带突变减毒 Stx1 编码序列的重组 T 载体分别命名为 Stx1D10/T 和 Stx1D100/T。

### 1.4 克隆入真核表达载体 pcDNA3.1

Stx1D10/T 和 Stx1D100/T 质粒 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,电泳回收约 1 250 bp 的目的片段,分别与同样双酶切回收的 pcDNA3.1 载体 4 °C 连接过夜。连接产物转化感受态菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,以含有氨苄青霉素的 LB 琼脂平板筛选,挑取白色单菌落增菌后提取质粒,*Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定。最终获得的 2 个正确克隆的重组真核表达载体分别命名为 pcDNA3.1-Stx1D10 和 pcDNA3.1-Stx1D100。

### 1.5 重组真核表达载体转染 SKOV3 细胞

常规培养 SKOV3 细胞,转染前 1d,将细胞转入 6 孔板内,每孔加入 2 ml 无抗生素的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,内含  $5 \times 10^5$  个细胞,使转染当日细胞达到 80% ~ 90% 互相接触。按照脂质体 Lipofectamine 2000 说明书进行操作,分别将重组真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 及 pcDNA3.1-GFP 转入 SKOV3 细胞,质粒用量 10  $\mu$ g/孔,转染后置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱,6 h 后更换培养液,培养至 48 h。倒置荧光显微镜下观察 pcDNA3.1-GFP 转染的 SKOV3 细胞绿色荧光的表达情况,对比暗视野和明视野观察到的细胞数,计算转染率。转染率计算公式:转染率 = 暗视野细胞数/明视野细胞数  $\times$  100%。

### 1.6 RT-PCR 检测转染后 SKOV3 Stx1 mRNA 表达

Trizol 法提取 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染后 48 h 的 SKOV3 细胞总 RNA,各取 1  $\mu$ g 总 RNA,使用 Superscript II 逆转录试剂盒,以 Oligo-(dT)<sub>15</sub> 为引物获取 cDNA 第一链。常规 PCR 扩增 Stx1 序列,引物为步骤 1.2 中 P1、P4。

### 1.7 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染致 SKOV3 细胞死亡的作用

同上法使用脂质体分别将 pcDNA3.1-Stx1、pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100、pcDNA3.1 转染

SKOV3 细胞,另设未转染 SKOV3 组作为对照,每组 3 个复孔。于转染后 24、48 h,倒置相差显微镜下观察不同组细胞形态学变化。转染后 48 h 收集 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100、pcDNA3.1 转染组细胞和未转染组细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml, FITC-Annexin V 和 PI 双染色,流式细胞仪检测 SKOV3 细胞坏死与凋亡。

### 1.8 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染对人卵巢癌 SKOV3 细胞周期的影响

同上法将 SKOV3 细胞转入 6 孔板,使用脂质体分别将 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100、pcDNA3.1 转染 SKOV3 细胞,质粒用量 1  $\mu$ g/孔,另设未转染 SKOV3 组作为对照,每组 3 个复孔。于处理后 24 h 收集 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100、pcDNA3.1 转染组细胞和未转染组细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /ml,80% 乙醇固定,4 °C 过夜,PI 染液染色,流式细胞仪测定各细胞周期所占百分比。

### 1.9 SKOV3 荷瘤鼠模型的建立和突变减毒 Stx1 真核表达载体体内抑瘤实验

SPF 级雌性 6 周龄 BALB/c nu/nu 裸小鼠 20 只,每只小鼠左侧腹股沟皮下注射 SKOV3 细胞  $2 \times 10^6$ ,10 d 后均成瘤。随机分 4 组,每组 5 只。第 1、2、3 组分别使用 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 或 pcDNA3.1 空载体经脂质体包裹后肿瘤局部注射给药,第 4 组仅注射等量生理盐水。质粒每次用量为 5  $\mu$ g/只,每周 2 次,持续 4 周。4 周后无痛苦处死小鼠,剥离皮下移植瘤组织称重,比较不同处理组间瘤重差异。

剥离的移植瘤标本用 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu$ m 厚连续切片,H-E 染色行普通病理组织学观察。

### 1.10 统计学处理

研究资料以 SPSS11.5 统计分析软件进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 法, $P < 0.05$  表明有显著性差异。

## 2 结 果

### 2.1 突变减毒 Stx1 编码序列的构建与鉴定

电泳结果显示所扩增的 2 个片段均约 1 250 bp,与预期的突变减毒 Stx1 编码序列片段大小相符。重组 T 载体 Stx1D10/T 和 Stx1D100/T 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后,电泳显示酶切产物为约 1 250 bp 的目的条带及与 pMD18-T 大小相符的约 2.7 kb 的载体条带(图 2)。测序证实成功克隆了突变减毒 Stx1 编码序列。

### 2.2 重组真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10 和 pcDNA3.1-Stx1D100 的鉴定

pcDNA3.1-Stx1D10 和 pcDNA3.1-Stx1D100 经

*Bam*H I、*Xho* I 双酶切后,电泳显示酶切产物为约 1 250 bp 的目的条带及与 pcDNA3.1 空载体酶切片大小相符的约 5.4 kb 的条带(图 3)。

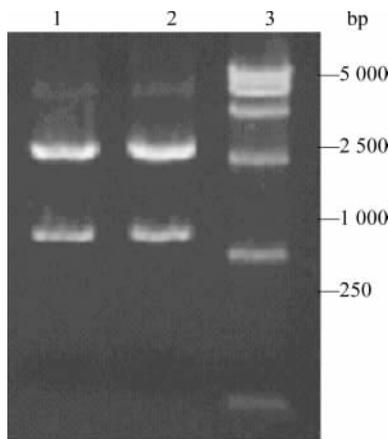


图 2 重组 T 载体 Stx1D10/T 和 Stx1D100/T 双酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of recombinant plasmids  
Stx1D10/T and Stx1D100/T

1: Stx1D10/T digested with *Bam*H I, *Xho* I; 2: Stx1D100/T digested with *Bam*H I, *Xho* I; 3: DNA marker DL15000

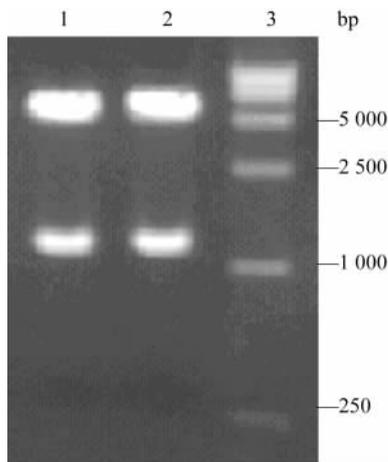


图 3 重组真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10 和 pcDNA3.1-Stx1D100 的双酶切鉴定  
Fig. 3 Identification of recombinant plasmids pcDNA3.1-Stx1D10 and pcDNA3.1-Stx1D100

1: pcDNA3.1-Stx1D10 digested with *Bam*H I, *Xho* I; 2: pcDNA3.1-Stx1D100 digested with *Bam*H I, *Xho* I; 3: DNA marker DL15000

### 2.3 突变减毒 Stx1 在 SKOV3 细胞中的表达

pcDNA3.1-GFP 转染 SKOV3 细胞的转染率可达到约 60%。因突变减毒 Stx1 真核表达载体未携带报告基因,故以大小相当的 pcDNA3.1-GFP 转染率作为突变减毒 Stx1 真核表达载体转染率。经 RT-PCR 检测,

从转染 48 h 后的 SKOV3 细胞总 RNA 中扩增出了约 1 250bp 的目的条带(图 4)。

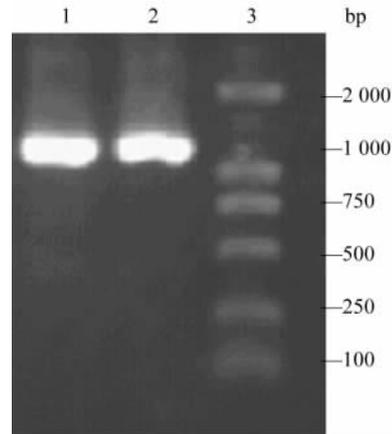


图 4 电泳检测 RT-PCR 扩增产物 Stx1D10 和 Stx1D100  
Fig. 4 Analysis of RT-PCR products Stx1D10 and Stx1D100 by agarose gel electrophoresis

1: RT-PCR product (Stx1D10); 2: RT-PCR product (Stx1D100); 3: DNA marker DL2000

### 2.4 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染致 SKOV3 细胞死亡的作用

原型 Stx1 真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1 及突变减毒 Stx1 真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10、pcDNA3.1-Stx1D100 转染 24 h 后,倒置相差显微镜下观察,可见大量 SKOV3 细胞肿胀、变圆,胞内出现空泡,部分细胞脱壁浮起(图 5)。以 pcDNA3.1-Stx1 转染组表现最为显著,pcDNA3.1-Stx1D10 转染组病变亦较 pcDNA3.1-Stx1D100 组明显。pcDNA3.1 空载体转染组有少量细胞出现轻微的上述表现,考虑与脂质体的影响有关。48 h 时,原型 Stx1 及突变减毒 Stx1 真核表达载体转染组病变细胞明显增多,3 组均可见大量细胞肿胀浮起,部分细胞结构已破坏,其中 pcDNA3.1-Stx1 转染组大量细胞已破坏,未能进行流式细胞仪检测。

转染 48 h 时,Annexin V 联合 PI 双染法流式细胞仪检测显示(图 6),突变减毒 Stx1 真核表达载体转染主要导致 SKOV3 细胞坏死。pcDNA3.1-Stx1D10 转染组、pcDNA3.1-Stx1D100 转染组、pcDNA3.1 空载体转染组、未转染组坏死率分别为(62.62 ± 11.41)%、(35.55 ± 9.68)%、(0.89 ± 0.12)%、(0.30 ± 0.07)%。组间比较,空载体转染组和未转染组坏死率差异无显著性( $P > 0.05$ ),其余各组间坏死率差异均有显著性( $P < 0.01$ )。

### 2.5 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染对人卵巢癌 SKOV3 细胞周期的影响

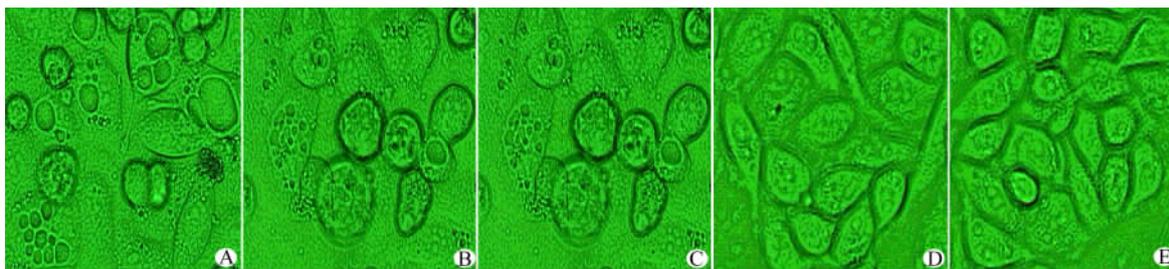


图 5 突变减毒 Stx1 真核表达载体转染 24 h 后光镜下观察 SKOV3 细胞的形态变化( ×400 )

Fig 5. Viability of SKOV3 cells analyzed by bright field microscopy 24 hours after transfection( ×400 )

Vacuoles appeared in the cytoplasm of Stx1 mutant genes transfected SKOV3 cells. The cells became swollen and were spherical in shape. Some cells detached from culture plates. A: pcDNA3.1-Stx1 transfected SKOV3 cells showing strongest cytotoxicity; B: pcDNA3.1-Stx1D10 transfected SKOV3 cells showing a moderate cytotoxicity; C: pcDNA3.1-Stx1D100 transfected SKOV3 cells showing slight cytotoxicity; D: pcDNA3.1 transfected SKOV3 cells showing no apparent cytotoxicity; E: SKOV3 cells cultured with growth medium also showing no apparent cytotoxicity

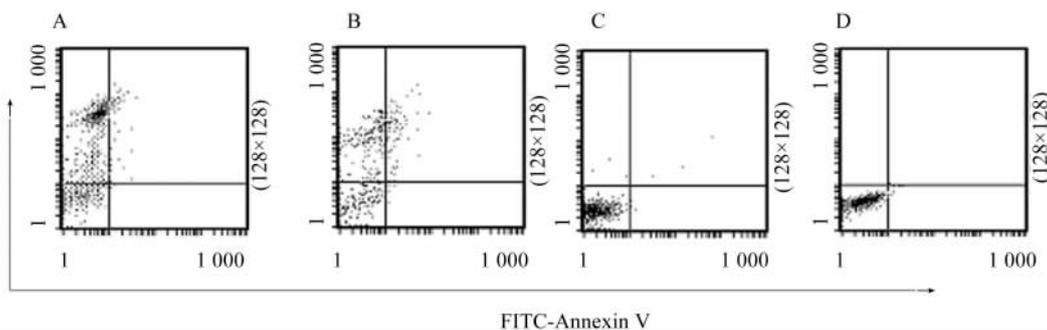


图 6 转染 48 h 流式细胞仪检测 SKOV3 细胞的坏死与凋亡

Fig. 6 Necroses and apoptoses of SKOV3 cells 48 hours after transfection by FCM

A: pcDNA3.1-Stx1D10 transfected SKOV3 cells; B: pcDNA3.1-Stx1D100 transfected SKOV3 cells; C: pcDNA3.1 transfected SKOV3 cells; D: Medium alone

PI 染色流式细胞仪检测结果见图 7。突变减毒 Stx1 真核表达载体转染 24 h 后的 SKOV3 细胞与对照组相比较,  $G_0/G_1$  期细胞比例相对减少, S 期细胞相对稳定,  $G_2/M$  期细胞相对增多。其中以 pcDNA3.1-Stx1D10 转染组变化最为显著, 其  $G_0/G_1$  期细胞比例从对照组水平(  $45.63 \pm 1.15$  )% 减少到(  $37.2 \pm 1.11$  )%,  $G_2/M$  期细胞从对照组的(  $21.63 \pm 1.66$  )% 上升到(  $29.47 \pm 2.25$  )%, 差异均有显著性(  $P < 0.05$  )。提示突变减毒 Stx1 真核表达载体转染导致 SKOV3 的细胞周期阻滞于  $G_2/M$  期。

## 2.6 突变减毒 Stx1 的体内抑瘤作用

各组荷瘤小鼠于治疗期间均未出现死亡, 各组小鼠体重无显著性差异。pcDNA3.1-Stx1D10 治疗组小鼠肿瘤生长缓慢, 其中 2 只小鼠的肿瘤分别于治疗第 3 周、第 4 周消退, 其余各组未见肿瘤消退。pcDNA3.1-Stx1D10 治疗组、pcDNA3.1-Stx1D100 治疗组、空载体对照组和生理盐水对照组瘤重分别为(  $0.0345 \pm$

$0.0256$  )g、(  $0.0861 \pm 0.0104$  )g、(  $0.1268 \pm 0.0433$  )g 和(  $0.1379 \pm 0.0581$  )g, 差异有显著性(  $P < 0.01$  )。组

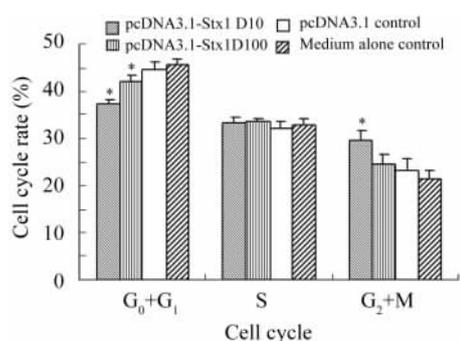


图 7 突变减毒 Stx1 真核表达载体 pcDNA3.1-Stx1D10 和 pcDNA3.1-Stx1D100 转染对 SKOV3 细胞周期的影响

Fig. 7 Effect upon cell cycle by pcDNA3.1-Stx1D10 or pcDNA3.1-Stx1D100 in vitro ( 48 h )

\*  $P < 0.05$ , compared with any control

间比较, pcDNA3.1-Stx1D10 治疗组瘤重与任意对照组瘤重差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 其余各组间瘤重差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.7 突变减毒 Stx1 作用后移植瘤组织病理形态改变

pcDNA3.1-Stx1D10 治疗组肿瘤石蜡切片 H-E 染色可见大片肿瘤组织坏死, 其间散在少量肿瘤细胞(图

8A); pcDNA3.1-Stx1D100 治疗组肿瘤石蜡切片 H-E 染色可见片状坏死组织与肿瘤细胞团块相间存在(图 8B); pcDNA3.1 空载体对照组与生理盐水对照组肿瘤石蜡切片 H-E 染色可见肿瘤细胞大量增生, 细胞大小、形态不一, 分裂旺盛, 核大深染(图 8C、8D)。

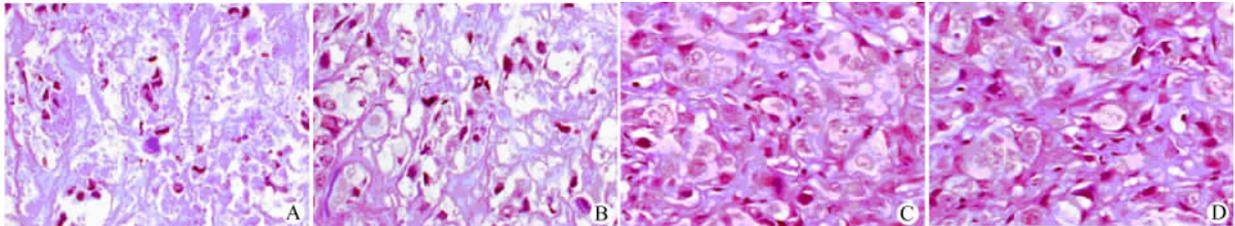


图 8 移植瘤标本石蜡切片 H-E 染色光镜下观察(  $\times 400$  )

Fig. 8 H-E staining of paraffin sections of SKOV3 tumor under microscope(  $\times 400$  )

A: pcDNA3.1-Stx1D10 treated SKOV3 tumor showing large-area tumor necrosis; B: pcDNA3.1-Stx1D100 treated SKOV3 tumor showing small necrosis regions; C: pcDNA3.1 treated SKOV3 tumor showing no apparent necrosis; D: Normal sodium alone treated SKOV3 tumor showing no apparent necrosis

## 3 讨论

对 SLTs 的研究多集中在其致病机制、检测诊断或通过结合游离毒素阻止其穿越黏膜、制备单抗及减毒活疫苗来治疗预防出血性大肠杆菌感染等方面<sup>[5]</sup>。利用该毒素杀伤肿瘤细胞的研究则相对较少。SLTs 引起的细胞死亡, 包括坏死与细胞凋亡, 其机制复杂, 尚未完全阐明<sup>[6-8]</sup>。有研究发现, 不仅 A 亚基可以导致细胞坏死或诱导细胞凋亡, B 亚基也可能具有诱导凋亡的作用<sup>[9-10]</sup>。在已进行的体内实验中, Stx1 对于人膀胱癌细胞系 ECV304、肾癌细胞系 ACHN、宫颈癌细胞系 HeLa、表皮样癌细胞系 HEp2、肺癌细胞系 A549 及结肠癌细胞系 HT29 等均显示了较好的抗瘤活性<sup>[10-12]</sup>。

然而 SLTs 强大的毒性对其作为抗肿瘤药物进入临床试验造成很大障碍, 严重制约了其在基因工程药物方面的应用。本研究使用重叠 PCR 方法, 获得了定点突变后不同减毒活性的 Stx1 基因克隆, 以考察其体内外抗肿瘤能力。重叠 PCR 法较文献中所用的定点突变方法更为简便、快捷, 且重叠 PCR 构建第一步中, 拟突变位点两侧序列分别克隆入 T 载体后, 十分便于设计不同突变引物进行同一位点多种突变。

研究中观察到 1/10 和 1/100 毒性的突变减毒 Stx1 真核表达载体体外转染人卵巢癌细胞 SKOV3 后, 均可致 SKOV3 细胞死亡, 且 SKOV3 死亡的主要方式是坏死而不是凋亡。Nakagawa 等<sup>[9]</sup>曾使用原型毒素真核表达载体在宫颈癌细胞系 HeLa 中得到类似结论。

相对来讲, Stx1 诱导肿瘤细胞凋亡的报道更为多见<sup>[6-8]</sup>。诱导肿瘤细胞凋亡的主要优点在于不引起炎症反应, 但同时也可能会引起机体免疫抑制; 相反, 促使肿瘤细胞坏死则有利于诱导机体抗肿瘤免疫反应<sup>[13]</sup>。

突变减毒 Stx1 真核表达载体转染后, SKOV3  $G_2/M$  期细胞相对增多, S 期细胞相对稳定,  $G_0/G_1$  期细胞相对减少, 此结果可能与脂质体包裹转染这种转染方式有关。若使用纯化的 Stx1 蛋白, 则其对敏感细胞的细胞周期的影响与细胞膜上 Stx1 的受体状态有关,  $G_1$  期至 S 期的细胞对 Stx1 毒素更为敏感。

体内实验显示 1/10 毒性的突变减毒 Stx1 可有效抑制裸小鼠体内 SKOV3 移植瘤的生长。而 1/100 毒性的突变减毒 Stx1 虽然使裸小鼠体内 SKOV3 移植瘤生长得到一定的抑制, 但与对照组相比差异无显著性, 这可能与本研究中所采用的脂质体包裹瘤内注射的给药方法本身的转染效率较低有关, 若使用携带相同突变减毒 Stx1 编码序列的病毒载体有望进一步提高转染效率, 更好地发挥其抑瘤能力, 甚至更低毒性的突变减毒 Stx1 在使用病毒作载体时都可能会取得较好的疗效。现本室正在构建携带不同毒性突变减毒 Stx1 编码序列的腺病毒载体, 以深入考察突变减毒 Stx1 抗肿瘤能力。

诚然, 若要将突变减毒 Stx1 应用于肿瘤治疗, 还需要更多更深入的研究及相应的靶向性载体系统的建立。本研究为进一步开发以突变减毒 Stx1 为杀伤基因

的新型基因工程抗肿瘤药物奠定了实验基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: Molecular mechanisms and medical perspectives [ J ]. *EMBO J*, 2000, 19( 22 ):5943-5950.
- [ 2 ] Nakajima H, Kiyokawa N, Katagiri YU, *et al.* Kinetic analysis of binding between Shiga toxin and receptor glycolipid Gb3Cer by surface plasmon resonance [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, 276( 46 ): 42915-42922.
- [ 3 ] O'Loughlin EV, Robins-Browne RM. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells [ J ]. *Microbes Infect*, 2001, 3( 6 ):493-507.
- [ 4 ] Yamasaki S, Furutani M, Ito K, *et al.* Importance of arginine at position 170 of the a subunit of vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity [ J ]. *Microb Pathog*, 1991, 11( 1 ): 1-9.
- [ 5 ] Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, *et al.* Antibody therapy in the management of shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome [ J ]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17( 4 ): 926-941.
- [ 6 ] Harrison LM, Cherla RP, van den Hoogen C, *et al.* Comparative evaluation of apoptosis induced by Shiga toxin 1 and/or lipopolysaccharides in human monocytic and macrophage-like cells [ J ]. *Microb Pathog*, 2005, 38( 2-3 ): 63-76.
- [ 7 ] Narayanan S, Surendranath K, Bora N, *et al.* Ribosome inactivating proteins and apoptosis [ J ]. *FEBS Lett*, 2005, 579( 6 ): 1324-1331.
- [ 8 ] Cherla RP, Lee S-Y, Tesh VL. Shiga toxins and apoptosis [ J ]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 228( 2 ): 159-166.
- [ 9 ] Nakagawa I, Nakata M, Kawabata S, *et al.* Regulated expression of the Shiga toxin B gene induces apoptosis in mammalian fibroblastic cells [ J ]. *Mol Microbiol*, 1999, 33( 6 ): 1190-1199.
- [ 10 ] Kovbasnjuk O, Mourtazina R, Baibakov B, *et al.* The glycosphingolipid globotriaosylceramide in the metastatic transformation of colon cancer [ J ]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102( 52 ): 19087-19092.
- [ 11 ] Ishitoya S, Kurazono H, Nishiyama H, *et al.* Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice [ J ]. *J Urology*, 2004, 171( 3 ):1309-1313.
- [ 12 ] Nakayama K, Pergolizzi RG, Crystal RG. Gene transfer-mediated pre-mRNA segmental trans-splicing as a strategy to deliver intracellular toxins for cancer therapy [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 1 ): 254-263.
- [ 13 ] 吴克复, 马小彤, 宋玉华. 期望肿瘤细胞凋亡还是坏死 [ J ]. *中国实验血液学杂志*, 2005, 13( 6 ): 921-923.
- [ 收稿日期 ] 2006 - 10 - 08 [ 修回日期 ] 2006 - 11 - 10  
[ 本文编辑 ] 王 莹

· 科技动态 ·

## CXCR7: 一个与肿瘤发生有关的趋化因子 SDF-1 和 I-TAC 的新受体

研究表明 SDF-1( CXCL12 )能调控许多重要的生物过程,包括心脏与神经的发育、干细胞运动、血管形成、凋亡及肿瘤发生。历来认为,SDF-1 是通过 CXCR4 这个唯一的受体来调控这些不同的过程。本研究发现了 SDF-1 的一个新受体,称为 CXCR7。CXCR7 除了能与 SDF-1 高亲和力结合外,还能结合另外一个趋化因子 I-TAC( CXCL11 )。而以前的研究表明 I-TAC、Mig( CXCL9 )和 IP10( CXCL10 )三个趋化因子只能结合 CXCR3。CXCR7 表达于许多肿瘤细胞系、活化的内皮细胞以及胎肝细胞,别的细胞却很少表达。与别的趋化因子受体不同的是,当配体活化 CXCR7 后并不引起细胞钙流的变化,也不引起细胞迁移。

SDF-1 或 CXCR4 基因敲除小鼠在胚胎发育的第 15 ~ 18 天都表现出胚胎死亡,据此人们推断两者的结合是唯一的。但作者在研究 CXCR4 基因敲除小鼠的第 13 天胚胎时却意外地发现其胎肝细胞仍然能结合 SDF-1,作者通过一系列的研究鉴定出这个 SDF-1 的新结合位点是其基因早已克隆出的一直被当作孤儿受体的 RDC1 分子,并将其重新命名为 CXCR7。

进一步研究发现,CXCR7 主要表达于转化细胞表面,而大多数正常细胞表面不表达。Northern 分析还发现,尽管这些细胞表面不表达 CXCR7 分子,其细胞内却表达 CXCR7 mRNA。

在体外 CXCR7 具有促进细胞存活的作用,但对细胞增殖无影响,同时还能促进细胞黏附。据此作者推测,CXCR7 在肿瘤发生中可能具有一定作用,并以小鼠肿瘤模型进行了研究。作者从约 10 万个小分子化合物中筛选出了 2 个 CXCR7 拮抗剂,将表达 CXCR7 的肿瘤细胞接种至小鼠,同时给予拮抗剂处理。结果表明,接受了拮抗剂处理的小鼠肿瘤生长显著小于对照组小鼠肿瘤生长,这一结果提示 CXCR7 具有促进肿瘤生长的作用。

[ 刘 斌 摘译. Burns JM, Summers BC, Wang Y, *et al.* *J Exp Med*, 2006, 203( 9 ): 2201-2213 ]