

[文章编号] 1007-385X(2007)01-0031-06

· 论 著 ·

肿瘤特异单链抗体库的构建及肿瘤血管特异性结合抗体的体内筛选

秦 玺¹, 田 媛¹, 胡宝成¹, 薛建红²(1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850; 2. 吉林大学第一医院检验科, 长春 130021)

[摘要] **目的:** 构建肿瘤组织特异的噬菌体呈现型单链抗体库, 用噬菌体体内筛选与肿瘤血管特异性结合的单链抗体, 为癌症的诊断和治疗奠定基础。**方法:** 取食道癌、胃癌、脑癌、肺癌、脊髓瘤患者肿瘤组织, 提取各肿瘤组织膜蛋白混合后免疫 BALB/c 小鼠, 取鼠脾脏淋巴细胞提取总 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, 在辅助噬菌体 M13KO7 的作用下, 获得重组噬菌体单链抗体库。以人宫颈癌 HeLa 细胞致瘤裸鼠为实验模型, 用所构建的单链抗体库进行了 4 轮特异抗体的体内筛选。挑取了 24 个 PCR 鉴定为阳性的单链抗体做免疫组化分析, 将在 HeLa 致瘤的组织切片上呈阳性染色、而在对照的肾组织切片上没有阳性染色的单链抗体进行序列测定。**结果:** 选用 7 株不同的肿瘤细胞系建立裸鼠致瘤模型, 以 HeLa 细胞致瘤裸鼠成瘤效果最好。用所构建的库容量为 1.6×10^6 的单链抗体库对肿瘤血管特异结合抗体进行体内筛选, 得到 1 株单链抗体 ScFv(V_H -linker- V_L), 命名为 ScFvH1。**结论:** 成功构建肿瘤特异单链抗体库, 并用此抗体库筛选到与肿瘤血管结合特异性较好的单链抗体, 为肿瘤的早期诊断和治疗提供了一条新的技术路线。

[关键词] 肿瘤血管; 单链抗体; 噬菌体展示; 体内筛选

[中图分类号] R730.3 **[文献标志码]** A

Construction of tumor targeting ScFv library and screening of tumor vessel-specific antibody by phage display *in vivo*

QIN Xi¹, TIAN Yuan¹, HU Bao-cheng¹, XUE Jian-hong²(1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Department of Laboratory, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain phage-displayed ScFv library targeting tumor tissues and to screen for antibodies specifically binding to tumor vessels using *in vivo* phage display, so as to lay a foundation for diagnosis and treatment of cancer. **Methods:** The membrane proteins were extracted from the specimens of esophageal carcinoma, stomach carcinoma, brain cancer, lung cancer, and spinal cord tumor. The recombinant phage-antibody system was used to construct a single-chain Fv fragment (ScFv) cDNA library from the total RNA of the BALB/c mice immunized with purified membrane protein. The specific primers of V_H and V_L were used to amplify the cDNA of V_H and V_L , respectively, which were then assembled into ScFv gene with a specially constructed linker DNA. The ScFv gene was ligated into the phagemid vector pCANTAB 5E and the ligated samples were transformed into competent *E. coli* TG1. The transformed cells were infected with M13KO7 helper phage to yield recombinant phage. Using the animal model of human cervical carcinoma (HeLa cells), sepecific phage-ScFvs were selected by phage displaying and panning *in vivo*. After four rounds, 24 phage-ScFvs, which were identified by PCR, were analyzed immunohistochemically. The ScFvs expressed in the tumor tissue slices and negative in control kidney tissue slices were sequenced. **Results:** Tomors-bearing animal models were established with 7 different kinds of carcinoma cell lines in BALB/c nude mice. It was found that inoculation with HeLa cells resulted in most satisfactory tumorigenesis in nude mice. A ScFv library of 1.6×10^6 was obtained and a tumor vessel specific phage-ScFv named ScFvH1 (V_H -linker- V_L) was selected from the library. **Conclusion:** A tumor targeting ScFv library has been successfully constructed and a tumor vessel-specific antibody has been identified from the library, which provides a new way

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30271458, 30370441, 30670616); 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2005CB522506)

[作者简介] 秦 玺(1981.3-), 男, 湖北宜昌人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤特异抗体库的构建及特异抗体的体内筛选研究

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

for the early diagnosis and therapy of cancer.

[**Key words**] tumor vessels; single chain variable fragment; phage display; *in vivo* selection

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(1):31-36]

癌症严重危害着人类健康。对于肿瘤,常规治疗手段(如手术、放疗、化疗)疗效和特异性不佳,不良反应大,病死率高。放疗化疗杀伤肿瘤细胞的同时,也造成正常细胞的不可逆损伤;另外,由于不能特异地识别肿瘤细胞,使一些肿瘤细胞逃逸,因此迫切需要寻找理想的治疗手段。1998年被美国FDA批准上市的人源化抗体 Herceptin 为乳腺癌的治疗提供了新的药物,并且由于它对实体瘤产生的显著疗效,也开创了肿瘤治疗的新时代^[1]。更多的实践表明,抗体可以成为理想的肿瘤诊断和治疗药物。本实验构建了一个人肿瘤组织单链抗体库,并通过噬菌体展示的方法在裸鼠体内对特异性结合肿瘤血管的抗体进行筛选,获得了1株靶向于肿瘤血管的特异单链抗体,为癌症的早期诊断和治疗研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料与主要试剂

4~6周龄雌性 BALB/c 小鼠和4~6周龄雌性裸鼠购自军事医学科学院实验动物中心[实验动物合格证号为 SCSK(军)2002-001]。食道癌、胃癌、肺癌、脑瘤、脊髓瘤组织块由307医院惠赠,人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-453 由本室叶棋浓教授惠赠,人前列腺癌细胞系 PC3、DU145 由本室周建光教授惠赠,人宫颈癌细胞系 HeLa、大肠杆菌 TG1、DH5 α 和 BL21(DE3)、噬菌体载体 pCANTAB 5E 及大肠杆菌表达载体 pTIG-Trx 和 pET-28a(+) 由本组保存。

弗氏完全和不完全佐剂均为 Sigma 公司产品。鼠 ScFv 构建试剂盒(包括扩增鼠抗体 V_H 与 V_L cDNA 的特异 PCR 引物及组装 ScFv cDNA 的 PCR 引物)为 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 连接酶及 Sfi I、Not I、EcoR I 和 Xho I 限制性内切酶均为大连宝生物(TaKaRa)公司产品。其他试剂按照 Pharmacia 公司 ScFv 构建试剂盒说明书配制。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 均为中杉金桥生物有限公司产品,抗 M13 兔多抗为本院三所八室馈赠,PCR 引物由奥科公司合成,DMEM 和 RPMI 1640 培养液购自 GIBCO 公司,小牛血清购自杭州四季青公司,优等胎牛血清购自

Hyclone 公司,PEG8 000 购自华美公司,Aprotinin 和 Leupeptin 购自思语伟业公司。

1.2 肿瘤组织膜蛋白的提取和动物免疫

参考文献[2]采用非离子型去污剂提取细胞膜蛋白。将混合膜蛋白免疫 BALB/c 小鼠,初次免疫辅以弗氏完全佐剂,第2、3、4次免疫辅以弗氏不完全佐剂,间隔分别为4、2、2周。采用腹腔注射,蛋白用量均为200~300 μ g/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。

1.3 小鼠脾淋巴细胞分离及总 RNA 提取

在 Hank 液中用镊子将脾脏夹碎,使其释放淋巴细胞。再加入到3 ml Ficoll 液中,以2 000 r/min 离心20 min。吸取中间乳白层,加 PBS 5 ml,1 500 r/min 离心5 min,收集沉淀即含脾淋巴细胞。收集3 \times 10⁶ 脾淋巴细胞,用总 RNA 试剂盒(QIAGEN)提取总 RNA。

1.4 ScFv DNA 的构建

1.4.1 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,以此链为模板,PCR 扩增 V_H 和 V_L cDNA。反应条件为94 $^{\circ}$ C 热变性5 min,94 $^{\circ}$ C 热变性1 min、55 $^{\circ}$ C 退火1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸1 min,进行30个循环,最后72 $^{\circ}$ C 再延伸7 min。使用胶回收试剂盒电泳纯化 PCR 所得 V_H 和 V_L 产物。

1.4.2 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 $^{\circ}$ C 1 min,63 $^{\circ}$ C 4 min),使形成 ScFv DNA。再加入限制性内切酶位点引物(RS Primer Mix),进行 PCR 反应(30个循环:94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min),使聚合的 ScFv 扩增,并在5'端引入 Sfi I 酶切位点,3'端引入 Not I 酶切位点。

1.4.3 重组噬菌体抗体 ScFv cDNA 文库的构建

将 ScFv DNA 连到噬菌粒载体 pCANTAB 5E 上,电转化大肠杆菌 TG1,涂于含100 μ g/ml 氨苄西林(A)和2%葡萄糖(G)的 SOBAG 平皿上,30 $^{\circ}$ C 培养,据克隆数计算库容量。设置阳性对照500 ng pUC19 质粒;阴性对照载体自连产物10 μ l。加入适量的2 \times YT 培养液,刮下菌落,加甘油至15%~30%,保存于-70 $^{\circ}$ C。取部分菌液用2 \times YT-AG 稀释至 D₆₀₀ = 0.3,37 $^{\circ}$ C 摇1 h,加入辅助噬菌体

M13K07 至 4×10^9 PFU, 37 °C 再摇 1 h, 离心弃上清; 用 $2 \times$ YT-AK 培养液重悬菌体沉淀, 37 °C 过夜培养, 离心, 收上清, 加入 1/5 体积的 20% PEG 8 000 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。

1.4.4 噬菌体抗体库重组率鉴定 从 SOBAG 平板上随机挑取单菌落, 用 pCANTAB 5E 载体上引物 Hu1 和 Hu2 进行 PCR 扩增, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测相应扩增条带, 测定抗体库的重组率。

1.5 裸鼠荷瘤模型的建立

人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-453 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 人前列腺癌细胞系 PC3 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 人前列腺癌细胞系 DU145 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 人宫颈癌细胞系 HeLa 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 均在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

将 28 只 4~6 周龄雌性裸鼠随机分为 7 组。收集上述 7 种细胞, 用无血清 DMEM 培养液重悬, 分别对 7 组裸鼠臀部皮下注射, 每只裸鼠注射细胞量均为 $1 \times 10^7/200 \mu\text{l}$ 。每 2 d 观测各组成瘤情况。

1.6 肿瘤血管特异性结合单链抗体的体内筛选

取裸鼠 5 只, 同上方法以 HeLa 细胞皮下致瘤。按说明书上要求制备 M13K07 及噬菌体单链抗体, 取 100 μl 制备单链抗体尾静脉注射成瘤裸鼠; 40 min 后处死裸鼠, 取相应器官(心、肝、脾、肺、肾)以及肿瘤组织, 称重; 用 1 ml 冰冷的 1% BSA/1640-PI 将组织和器官清洗 2 遍; 组织匀浆后再次清洗; 用 0.1 mol/L HCl-Glycine(pH 2.2)/BSA(1 mg/ml) 洗脱结合噬菌体单链抗体, 1 mol/L Tris(pH 8.8) 中和; 5 000 r/min 离心 5 min, 收集上清; 重复洗脱 3 次以得到全部结合的噬菌体单链抗体。滴定每一轮洗脱物(同时设各个器官作对照)。取肿瘤组织的所有洗脱物感染对数期的 TG1, 重新制备重组噬菌体。如此反复注射、洗脱、再感染共进行 4 轮体内筛选。

1.7 肿瘤血管特异性结合单链抗体的免疫组织化学鉴定

将最后一轮筛选的洗脱物稀释后涂布于 SOBAG 平板; 从平板上挑取若干单克隆进行 PCR 鉴定。方法同 1.4.4; PCR 阳性的克隆制备成在噬菌体表面展示的单链抗体, 用一抗总量为 1×10^{11} PFU 左右, 所用二抗为抗 M13 的兔多抗, 采用 DAB 染色进行免疫组织化学分析^[34]。

1.8 DNA 序列分析

用质粒提取试剂盒提取免疫组织化学分析阳性的单链抗体质粒, 进行序列分析(由上海英骏生物技术有限公司完成)。

2 结果

2.1 肿瘤组织特异性单链抗体库的构建

2.1.1 免疫的 BALB/c 小鼠血清 IgG 效价测定 经 4 轮免疫后, BALB/c 小鼠血清抗食道癌、胃癌、肺癌、脑瘤、脊髓瘤组织膜蛋白混合物的效价由免疫前的 1:80 上升到 1:82 240, 提高了 1 028 倍。

2.1.2 *ScFv* cDNA 的构建 PCR 扩增 V_H 和 V_L cDNA, 分别获得大小为 320 bp 和 340 bp 的片段(图略)。将 V_H 、 V_L 和 Linker 引物等摩尔混合后, 经 PCR 形成 *ScFv* cDNA, 获得大小为 750 bp 的片段(图 1)。

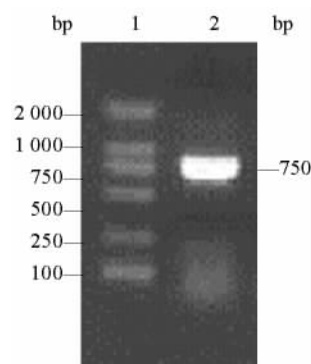


图 1 *ScFv* cDNA PCR 产物

Fig. 1 PCR products of *ScFv* gene

1: DNA marker DL2 000; 2: 750 bp PCR product of *ScFv* gene

2.1.3 重组噬菌体抗体 *ScFv* 文库的构建 PCR 组装的鼠抗体 *ScFv* cDNA 经琼脂糖凝胶电泳纯化回收, 用 *Sfi* I 及 *Not* I 酶切, 利用 T4 连接酶与相应双酶切的 pCANTAB 5E 载体连接, 重组质粒电击转化感受态大肠杆菌 TG1, 菌液涂布 SOBAG 平板, 平板上长出约 2.3×10^6 个菌落。随机挑选 40 个单菌落进行 PCR 鉴定, 其中有 28 个阳性片段, 阳性率 70% (图 2)。因此, 构建的 *ScFv* 表达文库的库容量大约是 1.6×10^6 。

2.2 裸鼠荷瘤模型的建立

用前列腺癌细胞 DU145、PC3, 乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-435、MDA-MB-453 进行裸鼠致瘤, 发现大多细胞的成瘤性均不太好, 只有 MDA-MB-453 细胞成瘤性稍好, 但周期较长, 且荷瘤裸鼠较易死亡。用宫颈癌 HeLa 细胞进行裸鼠致瘤, 2~3 周即可成瘤, 成瘤率可达 100%。本实

验采用此裸鼠致瘤模型。

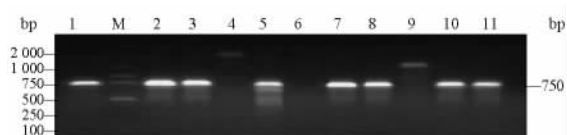


图2 PCR 鉴定 ScFv 文库阳性率

Fig. 2 Characterization of ScFv library by PCR

1 - 11: Different clones; M: DNA marker DL2000

2.3 肿瘤血管特异性结合单链抗体的体内富集

按照方法 1.6 的操作步骤进行肿瘤血管特异性结合单链抗体的体内筛选,经过 4 轮体内筛选后,与肿瘤血管特异性结合的重组噬菌体得到了富集,各轮体内筛选结果如表 1 所示,表中可见肿瘤血管特异性结合的重组噬菌体被富集了 37 倍。

2.4 肿瘤血管特异性结合单链抗体的获得

挑选第 4 轮体内筛选后的单克隆重组噬菌体,对 268 个克隆进行 PCR 鉴定后,筛选到 24 个 PCR 阳性的重组噬菌体(图 3)。将 PCR 阳性的重组噬菌体扩增后与肿瘤组织切片和肾组织切片结合,免疫组化分析结果见图 4。选取肿瘤组织切片上呈阳性染色,而在对照肾组织切片上没有阳性染色的重组噬菌体进行重复验证,结果确定后,进行序列测定。

表 1 肿瘤及各对照组织特异性噬菌体抗体的筛选和富集

Tab. 1 Panning and enrichment of phage-ScFv in the tumors and other tissues

Tissues	Phage-ScFv (PFU · g ⁻¹ , × 10 ⁻⁵)				Enrichment times
	Round 1	Round 2	Round 3	Round 4	
Tumor	0.427 8	0.600 0	6.813 6	15.918 5	37.210
Heart	19.453 6	13.844 4	8.250 9	5.352 5	0.275
Liver	62.368 4	10.171 6	7.158 4	6.770 3	0.109
Spleen	9.085 3	6.678 5	4.471 4	4.075 2	0.449
Lung	38.413 0	9.350 5	9.212 2	8.903 4	0.232
Kindey	16.257 0	5.189 1	12.919 2	15.513 5	0.954



图3 第 4 轮筛选后重组噬菌体的 PCR 鉴定结果

Fig.3 PCR results of phage-ScFv after the fourth round

1 - 24: Different clones in SOBAG plates;

25: Positive control of ScFv (750 bp)

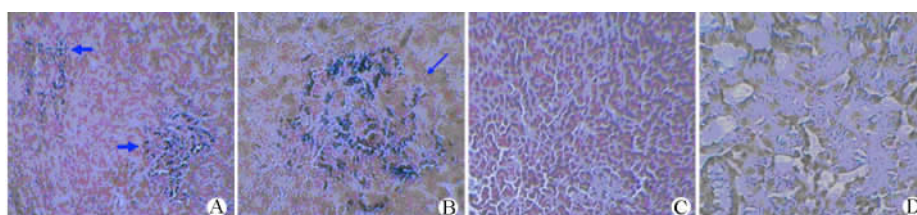


图 4 肿瘤血管特异性单链抗体的免疫组织化学分析(箭头所指为阳性染色部位)

Fig. 4 Immunohistochemistry analysis of tumor vessel-specified ScFv

A, B: The slices in tumors with ScFv as primary antibody(× 10); C: The slice of negative control in tumor without primary antibody(× 20); D: The slice of negative control in kidney (× 20) (Arrows represent the regions of positive staining)

2.5 ScFvH1 序列测定与分析

对免疫组化分析阳性的噬菌体单链抗体基因片段进行 DNA 序列测定后,获得 1 株序列正确的单链抗体,命名为 ScFvH1(图 5)。

ScFvH1 基因全长 729 bp,编码 243 个氨基酸残基,其中 V_H 基因编码 121 个氨基酸残基,位于单链抗体的 N 端;V_L 基因编码 107 个氨基酸残基,位于单链抗体的 C 端;V_H 和 V_L 基因通过(Gly₄ Ser)₃ 连接。经数据库查询,未发现任何已知单链抗体与 ScFvH1 序列相同。

3 讨论

本研究选用 Pharmacia 公司的鼠单链抗体库构建系统从免疫小鼠脾脏提取 RNA 来构建单链抗体噬菌体文库。此系统所应用的表达载体 pCANTAB 5E 是由 pUC19 衍生而来的噬菌粒载体,带有大肠杆菌及噬菌体 M13 两种复制起始原点,ScFv 基因的 5'端与 g3 的分泌信号融合,3'端通过 E-tag 的 DNA 片段与结构基因融合并保持同一阅读框,融合基因的表达受 Lac 启动子控制。E-tag 与 g3 基因之间有 1 个琥珀终止密码子,在琥珀终止密码子抑制表型

的大肠杆菌 TG1 中, 转录出的 mRNA 发生通读, 表达 ScFv 融合蛋白。

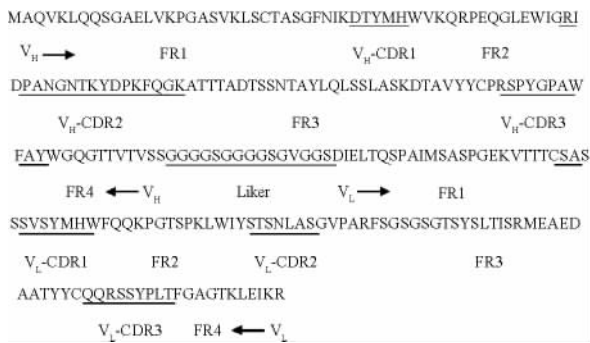


图 5 ScFvH1 的氨基酸残基序列

Fig. 5 Amino acid sequence of ScFvH1

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

M13K07 辅助噬菌体超感染后提供包装蛋白, 使重组 pCANTAB 5E 优先包装, 形成噬菌体颗粒。在穿膜成熟过程中, 内膜上融合蛋白通过 g3 蛋白的组装进入成熟噬菌体尾部, 表达出的单链抗体通过与 g3 蛋白 N 端融合而呈现于噬菌体表面, 形成噬菌体-单链抗体。每个成熟噬菌体表面有 3~5 个拷贝的 g3 蛋白。由于 M13K07 表达的游离 g3 蛋白在包装过程中与融合蛋白竞争, 每个噬菌体表面所呈现的单链抗体数目会比 g3 蛋白少。呈现于噬菌体表面的抗体通过特定抗原富集, 将与抗原结合的噬菌体-单链抗体与文库的其他重组噬菌体分开, 这些噬菌体-单链抗体重新感染大肠杆菌, 使编码特异性单链抗体基因得以放大, 从而起到富集效果^[5-10]。

最初本实验选用乳腺癌细胞 MDA-MB-453 对裸鼠致瘤, 用该细胞获得的裸鼠荷瘤模型进行体内筛选。由于该细胞致瘤效果不稳定, 裸鼠成瘤时间差异太大, 每轮筛选完后, 不得不将洗脱下来的单链抗体冻存于 -70 °C 冰箱内, 以等待下一只裸鼠成瘤后再进行下一轮筛选。但是, 在 4 轮筛选结束后, 对最终洗脱下的噬菌体单链抗体进行 PCR 鉴定后, 发现已经完全没有应该出现在 750 bp 位置的单链抗体片段条带, 这意味着噬菌体单链抗体基因已经全部或部分丢失。为了缩短筛选时间以及避免反复冻融所引起的基因丢失和基因突变, 本研究改用宫颈癌细胞 HeLa 对裸鼠致瘤。由于其 100% 成瘤, 并且裸鼠成瘤时间相差无几, 本研究在 4 轮体内筛选的过程中没有将中间洗脱物冻入冰箱, 而是一轮接一轮一直筛完, 平均每天 1 轮。并且在筛选过程中加入了 Aprotinin、Leupeptin、BSA、PMSF 等蛋白酶抑制

剂和蛋白稳定剂, 以尽量避免展示在噬菌体表面的单链抗体降解。4 轮筛选后, 挑取了 268 个克隆进行 PCR 鉴定, 得到 24 个在 750 bp 处有条带的重组噬菌体, 并对这些阳性克隆进行了再次验证。本研究对这 24 个 PCR 阳性的重组噬菌体分别进行了序列分析和免疫组化分析。在进行免疫组化筛选特异噬菌体单链抗体的过程中, 为了使实验结果尽可能准确, 在选取对照组织时, 选用 4 轮筛选过程中富集倍数几乎不变的肾组织作为对照(而其他组织几乎不能富集, 见表 1)。在对这 24 个 PCR 阳性的重组噬菌体进行免疫组化鉴定后, 得到了 1 株在肿瘤组织上阳性染色而在肾组织上无阳性染色的噬菌体单链抗体, 并且序列分析结果证实其为一个新的具有正确单链抗体序列的基因, 只是在 Linker 处有一个氨基酸的突变(G 变成 V), 但对单链抗体的功能没有太大影响, 将其命名为 ScFvH1(该单链抗体上不含信号肽), 而其余的 23 个 PCR 阳性克隆经序列测定发现不具有正确的单链抗体序列(很多发生了突变或提前终止)。在体外实验中通过缩短筛选时间并且加入适当的蛋白酶抑制剂, 可以将单链抗体的突变率尽可能地降低, 而体内筛选时只得到 1 株免疫组化阳性并且序列正确的单链抗体, 可见单链抗体在体内条件下的突变是相当严重的。

一些实验室采用体内生物淘筛技术结合肽库的噬菌体展示技术来发现正常组织和恶性肿瘤血管上的特异受体及其配体^[6-7, 11-16]。用肽库进行体内筛选, 发现噬菌体选择性地结合于靶标器官, 即展示于噬菌体表面的肽与组织特异性的血管受体结合。目前, 已发现了特异结合于大鼠脑、肾、肺、皮肤、胰腺、肠、视网膜、子宫、肾上腺、肿瘤异种移植体等的不同肽基序^[6-7, 11, 14-16]。本研究使用体内筛选方法进行肿瘤血管特异结合抗体的筛选, 是将单链抗体库通过尾静脉注射到裸鼠体内, 单链抗体在血管内随血液移动到身体各部分, 并在肿瘤部位得到富集, 因此筛选出的应该是靶向于肿瘤血管的单链抗体^[6]。目前使用噬菌体展示技术的体内筛选方法大多数是用肽库进行的, 而使用抗体库的很少, 这可能是由于抗体更容易突变并且与肽相比更难于操作的原因。由于本研究使用的正置显微镜放大倍数不高(10~20 倍), 因而在观察免疫组化的实验结果时可能会有阳性染色结果因放大倍数不够而被忽略了, 而且在所有的免疫组化石蜡切片上都没有找到血管及其标志物, 但在随后的研究中经过初步的功能实验发现 ScFvH1 具有较好的肿瘤血管靶向性, 因此在以后的应用中可与药物偶联而用于肿瘤的治疗研究。

[参考文献]

- [1] Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries [J]. J Immunol Methods, 2004, 290: 29-49.
- [2] 沈关心, 周汝麟. 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] 杨海松, 罗 轲, 毛大华, 等. CerbB-2、P53、ER、PR 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 贵州医药, 2006, 30(3): 199-201.
- [4] 李 欣, 黄建萍, 丁 洁. 新的凋亡相关基因 PDCD5 在狼疮性肾炎患儿肾组织中的表达[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(10): 607-609.
- [5] 田 媛, 秦 玺, 胡宝成. 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[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(1): 13-18.
- [6] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries[J]. Nature, 1996, 380 (6572): 364-366.
- [7] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model[J]. Science, 1998, 279 (5349): 377-380.
- [8] Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, *et al.* A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: Generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer [J]. Cancer Gene Ther, 2000, 7 (4): 589-596.
- [9] Su JL, Lai KP, Chen CA, *et al.* A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor(gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4827-4835.
- [10] Marty C, Langer-Machova Z, Sigrist S, *et al.* Isolation and characterization of a scFv antibody specific for tumor endothelial marker 1 (TEM1), a new reagent for targeted tumor therapy[J]. Cancer Lett, 2006, 235(2): 298-308.
- [11] Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, *et al.* Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display[J]. J Clin Invest, 1998, 102(2): 430-437.
- [12] Essler M, Ruoslahti E. Molecular specialization of breast vasculature: A breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2252-2257.
- [13] Arap W, Haedicke W, Bernasconi M, *et al.* Targeting the prostate for destruction through a vascular address[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(3): 1527-1531.
- [14] Pasqualini R, Koivunen E, Ruoslahti E. Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands[J]. Nat Biotechnol, 1997, 15(6): 542-546.
- [15] Burg MA, Pasqualini R, Arap W, *et al.* NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature[J]. Cancer Res, 1999, 59(12): 2869-2874.
- [16] Koivunen E, Arap W, Valtanen H, *et al.* Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(8): 768-774.

[收稿日期] 2006 - 10 - 10

[修回日期] 2007 - 01 - 09

[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

肿瘤来源的 COX-2 诱导 MSC 精氨酸酶 I 的产生

T 细胞的失能在肿瘤免疫逃逸过程中起重要作用,而髓样抑制细胞(MSCs)是引起 T 细胞的失能的关键因素之一。目前认为 MSCs 诱导的肿瘤免疫逃逸主要是通过抑制 T 细胞功能实现的,其中精氨酸代谢起关键性作用。研究表明肿瘤浸润部位的 MSCs 产生的精氨酸酶 I 可消耗 T 细胞周围的精氨酸,抑制 T 细胞 CD3 ζ 表达,从而抑制其功能。但是肿瘤浸润部位的 MSCs 的精氨酸酶 I 产生机制未知。

以往研究证实 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-13 可诱导精氨酸酶 I 的表达。本研究中作者首先发现在 3LL 肿瘤细胞,浸润淋巴细胞均不表达 IL-4, IL-13 的 mRNA。利用 Prkdscid 小鼠模型发现 MSCs 精氨酸酶 I 的表达与 T 细胞产生的细胞因子无关,将 3LL 肿瘤细胞培养上清培养 MSCs 或以 transwell 的形式与 MSCs 共培养,可诱导 MSCs 精氨酸酶 I 的表达,这说明精氨酸酶 I 的表达与 3LL 肿瘤细胞来源的可溶性细胞因子有关。利用核糖核酸酶保护分析实验发现 3LL 肿瘤细胞中仅表达 mCSF 和 VEGF 两种细胞因子的 mRNA,而不表达其他细胞因子 mRNA;体外实验证实 mCSF 和 VEGF 两种细胞因子不能诱导精氨酸酶 I 的表达。研究进一步发现 3LL 肿瘤细胞高表达 COX-1 和 COX-2,并伴随着大量前列腺素 E(PGE2)的分泌;体外实验证实 PGE2 可诱导 MSCs 和腹腔巨噬细胞中精氨酸酶 I 的产生;抑制 COX-2 的活性可阻断精氨酸酶 I 的表达,而抑制 COX-1 的活性对精氨酸酶 I 的表达无影响。这些结果说明 COX-2 来源的 PGE2 可诱导精氨酸酶 I 的表达。

PGE2 与不同受体结合偶联相应的 G 蛋白介导不同的生物学效应。目前发现 PGE2 受体有 4 种:EP1、EP2、EP3 和 EP4,肿瘤浸润部位的 MSCs 高表达 EP2、EP3 和 EP4。采用不同的 PGE2 类似物激活相应受体,结果发现只有单独激活 EP4 时可诱导精氨酸酶 I 的产生,这说明这种诱导效应是通过 PGE2-EP4 途径实现的。利用 COX-2 knockout 小鼠,作者发现 3LL 肿瘤细胞分泌的 PGE2 在诱导精氨酸酶 I 产生中起重要作用,而机体其他组织来源的 PGE2 所起的作用是微不足道。此外,利用 COX-2 抑制剂阻断精氨酸酶 I 产生可诱导出淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫,而这种抗肿瘤效应与抑制肿瘤的转移和血管生成无关。本研究为前列腺素诱导机体免疫失能开辟了一个新的途径,也为 COX-2 抑制剂治疗肿瘤提供了新的实验依据。

[王春梅 摘译, 李 楠 审阅. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, *et al.* J Exp Med, 2005, 202(7): 931-939.]