

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0120-06

· 论 著 ·

肿瘤血管特异结合抗体 ScFvH1 的靶向性和抑瘤性

秦 玺¹, 马航航¹, 薛建红², 胡宝成¹(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: 检测从肿瘤特异单链抗体库中筛选到的肿瘤血管特异结合单链抗体 ScFvH1 的靶向性和抑瘤性, 探讨该抗体在癌症诊断和治疗中应用的可能性。**方法:** 将该单链抗体基因插入到含绿色荧光蛋白(EGFP)基因及带有硫氧还原蛋白(Trx)基因的原核表达载体 pET-28a(+)/EGFP 及 pTIG-Trx 中, 在大肠杆菌中进行表达, 并经镍柱(Ni-NTA)纯化。建立人宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠皮下移植瘤模型, 尾静脉注射纯化的单链抗体-EGFP 融合蛋白, 通过荧光显微镜观察肿瘤部位及其他器官中 EGFP 信号, 考察该单链抗体的靶向性; 同时在裸鼠致瘤部位注射纯化的单链抗体蛋白, 观察该单链抗体对肿瘤生长的抑制性。**结果:** 在大肠杆菌中表达了该单链抗体基因片段, 并使单链抗体-EGFP 融合蛋白得到了很好的表达, 经镍柱纯化后得到了电泳级的单一条带。靶向性实验结果显示, 单链抗体-EGFP 融合蛋白在肿瘤部位得到了富集, 而只注射 EGFP 蛋白的肿瘤组织中荧光很少, 并且在裸鼠肺部组织中没有观察到 EGFP 荧光信号。抑瘤性实验发现, 单链抗体处理组移植瘤生长速率与 PBS 组类似。**结论:** 从肿瘤特异单链抗体库中筛选到的肿瘤血管特异抗体 ScFvH1 具有较好的肿瘤血管靶向性, 而对肿瘤生长的抑制作用不明显, 为进一步研究抗体在肿瘤诊断和治疗中的应用奠定了基础。

[关键词] 肿瘤血管; 单链抗体; 靶向性; 抑瘤性**[中图分类号]** R730.23**[文献标志码]** A

Tumor vessel-specific antibody ScFvH1: Targeting efficiency and anti-tumor ability

QIN Xi¹, MA Hang-hang¹, XUE Jian-hong², HU Bao-cheng¹(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 investigate the targeting and anti-tumor ability of the tumor vessel-specific antibody ScFvH1 selected from phage-ScFv library, and to discuss the application of the antibody in clinical diagnosis and therapy of cancer. **Methods:** The ScFvH1 gene was inserted into pET-28a(+)/EGFP vector containing green fluorescent protein (GFP) gene and pTIG-Trx vector containing thioredoxin gene; the products were then expressed in *E. coli* and purified by using Ni-NTA. Tumor-bearing mice model was established by subcutaneous injection of cervical cancer cell line HeLa. The mice were injected with purified ScFv-EGFP fusion protein through vena caudalis and the GFP signals were observed by fluorescent microscope to evaluate the targeting ability of the antibody. Meanwhile, the mice model also received intra-tumoral injection of purified ScFv-EGFP fusion protein to evaluate the anti-tumor effect of the antibody. **Results:** Soluble ScFvH1 gene and ScFvH1-EGFP protein were successfully expressed in *E. coli*; a single band was showed in SDS-PAGE after the purification by Ni-NTA. We found that ScFvH1-EGFP fusion protein was enriched to tumor tissues, but there was only weak fluorescent signal when EGFP protein was injected. No EGFP signal was observed in the lung of tumor-bearing mice. Tumor inhibition experiment showed that the tumor growth in the antibody treatment group was similar to that of the PBS control group. **Conclusion:** The tumor vessel-specific antibody ScFvH1 selected from phage-ScFv library can specifically target tumor vessels, but it has no obvious inhibitory effect on tumor growth. Our findings pave a way for antibody in cancer diagnosis and treatment.

[Key words] tumor vessels; single chain variable fragment; targeting; tumor suppression

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 120-125]

癌症严重危害着人类健康, 有效诊断和治疗的研究已变得越来越紧迫。噬菌体展示技术是上世纪 80 年代发展起来的新兴技术, 已被证实是研究蛋白质抗原表位相互作用的最方便和有效的方法, 其快速高效的高通量筛选特性备受研究人员的青睐, 在

[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)资助项目(No. 2005CB522506)

[作者简介] 秦 玺(1981-), 男, 湖北宜昌市人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤靶向性治疗的研究

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

世界范围内得到了很快的普及与推广。噬菌体展示技术的体内筛选(*in vivo* phage display)方法于1996年首次报道^[1],近年来已被用来鉴定作用于不同组织血管内皮细胞的噬菌体结合肽,诸如肺、皮肤、胰腺、肠、子宫、肾上腺、视网膜等器官的噬菌体结合肽。噬菌体体内筛选技术也已用来分离选择性结合肿瘤血管的肽^[2-5]。Arap 等^[6]用噬菌体肽库对患者进行体内筛选,鉴定了归巢于特异组织,如骨髓、皮肤、脂肪、肌肉、前列腺等的肽基序。该研究为人类血管的多样性及复杂性研究提供强有力的证据,为肿瘤靶向药物治疗的发展赋予了希望。

本课题组采用噬菌体展示体内筛选的方法,已经筛选到了一株与肿瘤血管结合特异性较好的单链抗体 ScFvH1^[7]。本研究首先将该单链抗体在大肠杆菌中进行了表达及纯化,然后对该单链抗体进行了功能的初步检测,包括对肿瘤血管靶向性及对肿瘤生长抑制性的测定,为癌症的早期诊断和治疗研究提供新的技术方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和细胞

人宫颈癌细胞系 HeLa、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)、大肠杆菌表达载体 pTIG-Trx 和 pET-28a(+)由本组保存。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: SC-SK(军)2002-001]。

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶均为大连宝生物(TaKaRa)公司产品。辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 为中杉金桥生物有限公司产品。鼠抗 E-tag 单克隆抗体购自 Amersham 公司。PCR 引物由奥科公司合成。DMEM 培养液购自 GIBCO 公司。小牛血清购自杭州四季青公司。Ni-NTA 树脂购自 QIAGEN 公司。Aprotinin 和 Leupeptin 购自思语伟业公司。DAB 购自百奥康公司。肿瘤血管特异性结合抗体 ScFvH1 为本实验室前期筛选获得^[7]。

1.2 细胞培养

人宫颈癌细胞系 HeLa 用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.3 裸鼠致瘤

待 HeLa 细胞生长状态良好并长至 80% ~ 90% 饱和后,收集细胞,无血清 DMEM 培养液重悬,裸鼠皮下注射,注射量为 200 μ l(含细胞 1×10^7 个)。接种 9 只,成瘤后待用。

1.4 重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 的构建及融合蛋

白的表达纯化

1.4.1 pTIG-Trx-ScFvH1 重组质粒的构建及融合蛋白诱导表达 设计引物分别以 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点代替 ScFvH1 的 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点,并将其插入到大肠杆菌表达载体 pTIG-Trx 中。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选转化子,做 PCR 鉴定和酶切鉴定。结果阳性的质粒转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)。将此 BL21(DE3)菌接入带有氨苄西林的 LB 培养液中,于 18 $^{\circ}$ C 诱导 24 h。收集菌体,重悬后超声,取上清,即为细菌胞质组分。

1.4.2 Ni-NTA 柱纯化 pTIG-Trx-ScFvH1/BL21 胞质蛋白 按照厂家提供的操作说明将上述胞质蛋白溶液用 Ni-NTA 柱纯化,纯化单链抗体装入透析袋,置 PBS 缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 透析 24 h,其间换液 4 次。将透析后的溶液经 PEG8 000 浓缩,保存于 -70 $^{\circ}$ C。

1.4.3 Western blotting 检测 ScFvH1 的表达 重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 已引入 E-tag 序列,故可用抗 E-tag 抗体检测融合蛋白 ScFvH1-E-tag 是否正确表达。将重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 转化大肠杆菌 BL21(DE3)后,低温诱导,收集菌体,超声破碎,10% SDS-PAGE 分离,转 PVDF 膜,鼠抗 E-tag 单抗为一抗,HRP 标记兔抗鼠 IgG 为二抗,常规 Western blotting, ECL 系统使 X 线胶片感光,获显色条带。

1.5 重组质粒 pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP 的构建及融合蛋白的表达纯化

1.5.1 重组质粒 pET-28a(+)-EGFP 的构建 将 EGFP(绿色荧光蛋白)基因插入到 pET-28a(+)载体的 *EcoR* I 和 *Sal* I 位点间,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切;同时对载体 pET-28a(+)进行同样双酶切,通过 DNA 电泳并使用胶回收试剂盒纯化回收质粒及 EGFP 片段,T4 DNA 连接酶连接质粒片段及 EGFP 片段,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,双酶切鉴定,获得 pET-28a(+)-EGFP 重组质粒。

1.5.2 重组质粒 pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP 的构建及融合蛋白诱导表达 设计引物分别以 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点代替 ScFvH1 的 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点重新扩增 ScFvH1,并将其插入到大肠杆菌表达载体 pET-28a(+)-EGFP 中。连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,挑选转化子,做 PCR 鉴定和酶切鉴定。结果阳性的质粒转化感受态 BL21(DE3)。

含有重组质粒 pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP 和 pET-28a(+)-EGFP 的细菌接入带有卡那霉素 50 μ g/ml 的 LB 培养液,30 $^{\circ}$ C 摇床培养至 D_{600} 为 0.4 ~ 0.6 时加入 IPTG 至 0.05 mmol/L,15 $^{\circ}$ C 诱导 36 h。细菌胞质组分的制备同 1.4.1。

1.5.3 Ni-NTA 柱纯化 pET-28a(+) -ScFvH1-EGFP 及 pET-28a(+) -EGFP 胞质蛋白 方法同 1.4.2。

1.5.4 Western blotting 检测 ScFvH1 的表达 具体过程同 1.4.3。

1.6 ScFvH1 肿瘤抑制性及靶向性的检测

1.6.1 裸鼠致瘤及抑瘤实验的分组 将 HeLa 细胞悬液 200 μl (含 1×10^7 个细胞) 皮下注射裸鼠。随机分 3 组, 每组 3 只, 第 2 天起分别在瘤周皮下注射 PBS、ScFvH1 和非相关抗体各 200 μl (后者各 200 μg), 隔天 1 次。第 20 天处死裸鼠。

1.6.2 ScFvH1 抑瘤性检测 观察裸鼠一般情况、生长及死亡情况。每隔 2 d 测量肿瘤体积 1 次, 计算瘤体积。瘤体积 = 短径² × 长径/2; 据此绘制肿瘤生长曲线。

1.6.3 ScFvH1 靶向性检测 将 6 只已成瘤裸鼠按肿瘤大小分为 3 个档次(即大、中、小), 每档 2 只, 每档中取 1 只放入同一组, 分为 2 组, 使每组中均有荷瘤大、中、小的裸鼠。一组尾静脉注射 ScFvH1-EGFP 纯化蛋白, 另一组尾静脉注射 EGFP 纯化蛋白。40 min 后处死裸鼠, 取肿瘤组织和作为对照的肺组织, 匀浆, 荧光显微镜下观察绿色荧光的强弱。

2 结果

2.1 重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 的鉴定和 ScFvH1 蛋白的可溶性表达

选取 PCR 扩增阳性的克隆, 提取质粒, 用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定重组质粒, 结果显示质粒能够切下大约 750 bp 大小的 DNA 片段, 即为构建成功的重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1。

将 pTIG-Trx-ScFvH1 转化感受态大肠杆菌 BL21, 培养诱导后, 收集 pTIG-Trx-ScFvH1/BL21 全菌蛋白, SDS-PAGE 分析, 在相对分子质量约 30 000 处出现明显的蛋白条带, 与预期的 ScFvH1 分子质量相符。挑选表达量较高的一个菌株, 优化诱导制备细菌胞质蛋白与包涵体, SDS-PAGE 分析, 胞质中可见 30 000 大小的蛋白表达带, 约占胞质总蛋白的 10% (图 1)。

2.2 Western blotting 检测 ScFvH1 的正确表达

Western blotting 分析结果显示, 在相对分子质量约 30 000 的位置出现特异条带, 说明重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 中 ScFvH1 读码框架正确, 且能可溶性表达(图 2)。

2.3 ScFvH1 蛋白的纯化

将转化了重组质粒 pTIG-Trx-ScFvH1 的 BL21 菌在 18 $^{\circ}\text{C}$ 、IPTG 为 0.05 mmol/L 的 LB 培养液中诱

导 24 h 后, 制备出细菌胞质组分, 经 Ni-NTA 柱亲和层析纯化后(图 3)透析、浓缩, 过滤除菌后测得蛋白浓度为 1.559 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

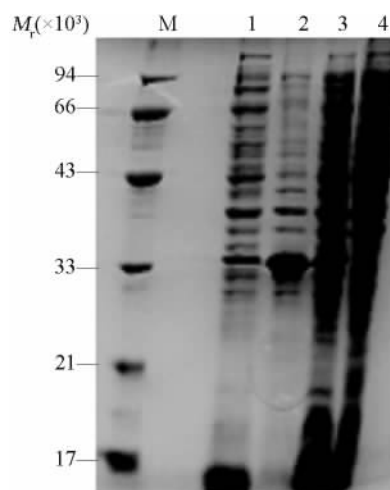


图 1 单链抗体 ScFvH1 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Expression levels of ScFvH1 in *E. coli* by SDS-PAGE

M: Marker; 1: Cytoplasmic proteins (pTIG-Trx-ScFvH1/BL21);
2: Inclusion body proteins (pTIG-Trx-ScFvH1/BL21);
3: Whole cell proteins (pTIG-Trx-ScFvH1/BL21);
4: Whole cell proteins (BL21, negative control)

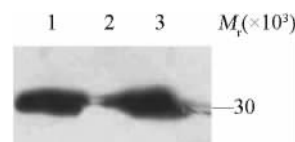


图 2 单链抗体 ScFvH1 在大肠杆菌中表达的 Western blotting 分析

Fig. 2 Analysis of expression product of ScFvH1 in *E. coli* by Western blotting

1. Supernatants (pTIG-Trx/ScFvH1/BL21); 2. Negative control (whole cell proteins in BL21); 3: Inclusion body (pTIG-Trx/ScFvH1/BL21)

2.4 ScFvH1 的抑瘤效果

将纯化抗体、非相关抗体及 PBS 对照分别注入接种肿瘤细胞的 3 组裸鼠瘤周皮下进行治疗。结果显示, PBS 组宫颈癌移植瘤持续生长, ScFvH1 组移植瘤生长速率与 PBS 组类似, 非相关抗体组移植瘤生长速率, 比 PBS 组和 ScFvH1 组都快(图 4)。结果说明单链抗体 ScFvH1 单独使用对宫颈癌移植瘤无抑制作用, 可能需要与毒素或其他药物联合使用。

2.5 重组质粒 pET-28a(+) -ScFvH1-EGFP 的构建 将构建的 pET-28a(+) -ScFvH1-EGFP 重组质

粒用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定,结果显示质粒能够切下大约 750 bp 大小 DNA 片段,证明成功构建重组质粒 pET-28a(+)- ScFvH1-EGFP。

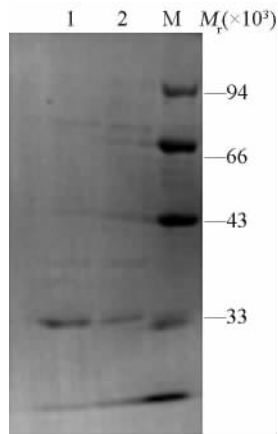


图 3 经 Ni-NTA 纯化后的 ScFvH1 蛋白
Fig. 3 Purified ScFvH1 protein by Ni-NTA
1~2: Purified samples; M: Marker

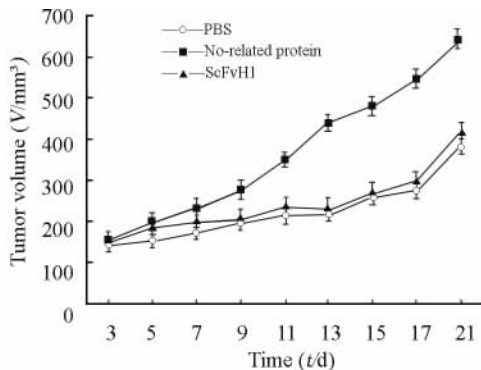


图 4 单链抗体 ScFvH1、非相关抗体和 PBS 对移植瘤生长的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effects of ScFvH1, non-related protein, and PBS on transplanted tumors

2.6 ScFvH1-EGFP 蛋白的可溶性表达

将重组质粒 pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP 转化感受态大肠杆菌 BL21,诱导 8 h 后,收集全菌蛋白进行 SDS-PAGE,在相对分子质量约为 60 000 处有明显的蛋白条带,与计算的 ScFvH1-EGFP 融合蛋白分子量相符。挑选表达量较高的一个菌株, IPTG 诱导 36 h 后,制备细菌胞质蛋白与包涵体,进行 SDS-PAGE 分析,胞质中可见 60 000 的蛋白表达带,约占胞质总蛋白的 10%。

2.7 Western blotting 检测 ScFv H1-EGFP 的表达

Western blotting 分析结果显示,在相对分子质量约 60 000 的位置出现特异条带,而且用肉眼很容易

就可以观察到绿色的蛋白表达。说明 ScFvH1-EGFP 读码框架正确,且能可溶性表达(图 5)。

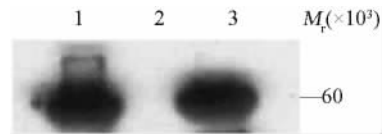


图 5 ScFvH1-EGFP 融合蛋白在大肠杆菌表达产物的 Western blotting 分析
Fig. 5 Analysis of ScFvH1-EGFP fusion protein expression in *E. coli* by Western blotting
1: Supernatants [pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP/BL21];
2: Negative control (whole cell proteins in BL21);
3: Inclusion body [pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP/BL21]

2.8 ScFvH1-EGFP 蛋白的纯化

将转化了重组质粒 pET-28a(+)-ScFvH1-EGFP 的 BL21 菌诱导 36 h 后,制备出细菌胞质组分,经 Ni-NTA 柱纯化后(图 6)透析、浓缩,过滤除菌后测定蛋白浓度为 0.886 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

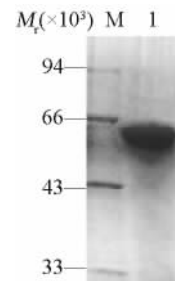


图 6 Ni-NTA 纯化的 ScFvH1-EGFP 融合蛋白
Fig. 6 Purified ScFvH1-EGFP fusion protein by Ni-NTA
M: Protein marker; 1: Purified samples

2.9 ScFvH1-EGFP 融合蛋白的肿瘤血管靶向性

取同样大小的移植瘤组织行靶向性实验,结果显示,融合蛋白 ScFvH1-EGFP 在肿瘤部位得到了富集,而在只注射 EGFP 蛋白的肿瘤组织中荧光却很少(图 7),并且在裸鼠肺部组织没有观察到荧光信号,说明 ScFvH1 抗体具有较好的肿瘤血管靶向性。

3 讨论

在前期研究中,本课题组选用多种肿瘤组织构建了一个肿瘤组织特异的噬菌体呈现型单链抗体库,并用噬菌体体内筛选方法筛选到了一株与肿瘤血管特异性结合的单链抗体 ScFvH1,该单链抗体基因全长 729 bp,编码 243 个氨基酸残基^[7]。但该单链抗体对肿瘤生长的抑制性及对肿瘤血管的靶向性

还不清楚,所以本研究首先对该单链抗体进行了表达纯化,然后对其进行了初步的功能研究。表达系统的选择除取决于小分子抗体类型、性质及其他因素,还要考虑目的产物的表达量和纯度的要求。原核表达系统可作为表达目的抗体(尤其是 Fab、Fv 和 ScFv 片段的)首选方法,大多数表达载体转入大肠杆菌,表达速度和产量均优于酵母菌,利用大肠杆菌表达小分子抗体具有规模大、速度快和成本低的优点。



图7 ScFvH1-EGFP 融合蛋白对
肿瘤血管的靶向性

Fig. 7 Tumor vessel-targeting ability of
ScFvH1-EGFP fusion protein

A: Fluorescence in tumor after injection of
ScFvH1-EGFP fusion protein; B: Fluorescence
in tumor after injection of EGFP protein

单链抗体在 *E. coli* 中高表达时往往形成包涵体^[8],因此探索重组蛋白在 *E. coli* 中的可溶性表达是抗体工程的一项重要任务。本研究选用质粒 pTIG-Trx 表达 ScFvH1, pTIG-Trx 由质粒 pET-22b(+)改造而来。pET-22b(+)是一个带有 T7 启动子的分泌型表达质粒,带有大肠杆菌 pelB 信号肽,具有氨苄抗性,在多克隆位点下游带有 His 标签。pTIG-Trx 是将 pET-22b(+)大肠杆菌信号肽序列 pelB 换成硫氧还原蛋白基因,利用硫氧还原蛋白造成的还原环境促进单链抗体以可溶性形式表达。ScFvH1 基因通过 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点连接到 pTIG-Trx 载体上,在低 IPTG 浓度、低诱导表达温度及长诱导时间的条件下,在硫氧还原蛋白造成的环境中,可溶性单链抗体明显增多。利用此表达载体已成功表达了特异性肝癌细胞结合单链抗体^[9]。抗体在 Ni-NTA 纯化后,尾静脉注射荷瘤裸鼠检测抗体对肿瘤生长的抑制性,但与对照组相比较,裸抗体对肿瘤并没有直接的抑瘤效果。而本课题组在用前列腺癌抗体库筛选获得的一株单链抗体^[10]测定裸抗体对肿瘤生长的抑制性时,观察到明显的抑瘤效果^[11]。

在检测 ScFvH1 的靶向性实验中,将绿色荧光蛋白基因 EGFP 与 ScFvH1 相连,在大肠杆菌中表达出融合蛋白,同时设纯绿色荧光蛋白 EGFP 做阴性对照。尾静脉注射荷瘤裸鼠 40 min 后,在荧光显微镜下观察肿瘤组织和对照组织匀浆液,表达 ScFvH1-EGFP 融合蛋白的实验组绿色明显多于只有 EGFP 蛋白的对照组,并且在作对照的肺组织匀浆液中未见绿色,说明筛选得到的单链抗体 ScFvH1 具有较好的肿瘤血管靶向性。

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,用来筛选血管特异结合肽^[12-16],而使用抗体库的很少^[17],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。由于本研究是以筛选特异靶向于肿瘤血管的抗体而进行的体内筛选,可以认为本研究获得了较好的结果。

[参 考 文 献]

- [1] Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries[J]. Nature, 1996, 380 (6572): 364-366.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Su JL, Lai KP, Chen CA, *et al.* A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor(gp 80) inhibits angiogenesis and tumor growth[J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4827-4835.
- [5] 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.
- [6] Arap W, Kolonin MG, Trepel M, *et al.* Steps toward mapping the human vasculature by phage display[J]. Nat Med, 2002, 8(2): 121-127.
- [7] 秦 玺,田 媛,胡宝成,等. 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[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(1): 31-36.
- [8] Sun ZW, Liu YF. The preliminary research on the killing activity of the anti-hepatoma ScFv fused to TNF α [J]. J Cell Mol Immunol, 2001, 17(1): 69-72.
- [9] 李 赏,胡宝成,绳纪坡等. 特异性肝癌细胞结合单链抗体的筛选及克隆表达[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): 144-147.
- [10] 田 媛,胡宝成,黄翠芬. 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.
- [11] 田 媛,秦 玺,胡宝成,等. 前列腺癌细胞结合单链抗体的克隆表达及其功能初步研究[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(2): 155-158.

- [12] Li XB, Schluesener HJ, Xu SQ. Molecular addresses of tumors: Selection by *in vivo* phage display[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006, 54(3):177-181.
- [13] Kelly KA, Nahrendorf M, Yu AM, *et al.* *In vivo* phage display selection yields atherosclerotic plaque targeted peptides for imaging [J]. Mol Imaging Biol, 2006, 8(4):201-207.
- [14] Pameijer CR, Navanjo A, Meechoovet B, *et al.* Conversion of a tumor-binding peptide identified by phage display to a functional chimeric T cell antigen receptor[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14(1): 91-97.
- [15] Lee SM, Lee EJ, Hong HY, *et al.* Targeting bladder tumor cells *in vivo* and in the urine with a peptide identified by phage display [J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(1): 11-19.
- [16] Newton JR, Kelly KA, Mahmood U, *et al.* *In vivo* selection of phage for the optical imaging of PC-3 human prostate carcinoma in mice[J]. Neoplasia, 2006, 8(9):772-780.
- [17] Robert R, Jacobin-Valat MJ, Daret D, *et al.* Identification of human scFvs targeting atherosclerotic lesions: Selection by single round *in vivo* phage display[J]. J Biol Chem, 2006, 281(52): 40135-40143.
- [收稿日期] 2006 - 12 - 11 [修回日期] 2007 - 02 - 20
- [本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

PI3K 在双链 RNA(dsRNA)-TLR3 信号传导途径中的新作用

双链 RNA(dsRNA)作为常见的病毒感染的副产物,能够被 TLR3 识别并介导机体对病毒感染的天然免疫应答。识别配体后的 TLR3 通过活化丝/苏氨酸激酶 TBK-1,进而磷酸化转录因子 IRF-3 的丝/苏氨酸残基,使其发生二聚化并转位入核,启动下游目的基因的转录和表达。PI3K 是细胞正常生长和存活过程中非常重要的一个分子,主要参与了细胞生长、分化、抗凋亡以及细胞骨架重新构建等重要的生理活动。2000 年 *Nature Immunol* 和 2003 年 *Eur J Immunol* 上各有一篇文章介绍了 PI3K 参与了 TLR2 以及 TLR4 的信号传导通路,参与了宿主的天然免疫应答。本研究着重探讨了 PI3K 在 dsRNA(采用 poly(I)·poly(C)作为刺激剂)诱导的 TLR3 信号传导通路中的作用。实验发现用 PI3K 的化学抑制剂 LY294002(LY)和 Wortmanin 均能明显抑制 dsRNA 活化的 TLR3 信号传导,下调了下游靶基因 *ISG561* 的转录和表达,从而证明了 PI3K 正向调节 dsRNA 引起的 TLR3 信号传导。293 细胞中分别转染了失活突变型 PI3K 和 Akt 后再用 dsRNA 刺激,下游调控基因 *ISG561* 的转录活性受明显抑制;只转染组成性活化的 PI3K(p110*)却不能诱导转录基因活性;以上实验表明了 PI3K 和 Akt 都参与了 dsRNA-TLR3 的信号传导,但仅活化 PI3K 并不足以诱导 *ISG561* 的转录活性。293-TLR3 细胞在受到 dsRNA 刺激以后,免疫印记结果表明 TLR3 的 Tyr 位点发生了磷酸化,并能够结合 PI3K 的 p85 调节性亚基,蛋白复合物中的 PI3K 保留了磷脂酶的活性。对 TLR3 胞内 TIR 功能域中 5 个 Tyr 位点分别和组合突变的研究结果表明,第 759 位 Tyr 在受到 dsRNA 刺激后发生磷酸化,在结合 PI3K 从而介导 TLR3 信号传导过程中发挥了最重要的作用;第 858 位 Tyr 也起到了重要的作用。自然凝胶电泳实验表明,dsRNA 刺激 Y759F TLR3 细胞后(Y759F TLR3B 不能结合并活化 PI3K),或者用 LY 预处理野生型 293-TLR3 后再刺激,都还能检测到 IRF3 二聚体的形成;核蛋白免疫杂交和荧光共聚焦实验也表明仍有 IRF3 的核转位情况发生;但是染色质免疫共沉淀实验表明,活化的 Y759F 细胞中因缺失 PI3K 活性而明显减弱了核内的 IRF3 结合共活化因子 CBP 和下游靶基因 *ISG561* 启动子的能力,从而大大降低了 *ISG561* 基因的转录和表达。作者进一步用二维凝胶电泳检测了 IRF-3 的磷酸化情况,发现虽然用 LY 预处理或者 Y759F TLR3 组受 dsRNA 刺激后 IRF-3 照样出现磷酸化,但总的磷酸化程度是较野生型组明显降低的,表现出了不完全磷酸化的情况;表明 LY 预处理后可能通过阻止 IRF-3 的 386 位丝氨酸的磷酸化,从而使 IRF-3 处于不完全磷酸化的状态。以上实验证实了 TLR3-PI3K 之间相互结合并不是 IRF3 形成二聚体和核转位所必须的,但却是 IRF3 的充分磷酸化和完全发挥其转录因子活性所必须的。

该研究完善了 dsRNA-TLR3 下游的信号通路,说明了活化的 TLR3 两个 Tyr 位点的磷酸化分别是活化 TBK1 和 PI3K 的;活化的 PI3K 作用于其底物激酶 Akt,从而促使 IRF-3 的完全磷酸化和发挥转录活性。当 PI3K 不能被募集到 TLR3 或者其活性被阻断的时候,dsRNA 刺激的细胞中 IRF3 只能部分磷酸化,并且丧失了结合下游靶基因启动子的能力。由此可见,PI3K-Akt 通路在 TLR3 介导的基因诱导中起到了一个必要的作用。该研究拓宽了 PI3K 在 TLRs 等介导天然免疫应答中的作用,也有助于人们更全面地了解 PI3K 的生理性作用。

[郑月娟 摘译,于益芝 审阅. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, *et al.* Nat Struct Mol Biol, 2004, 11(11): 1060-1067]