文章编号:1000-5404(2005)13-1317-03

论著

基于增殖诱导配体新型抗肿瘤分子的构建及初步筛选

高全胜[1],黄复生[1],何凤田[2] (第三军医大学基础医学部:[1]病原生物学教研室,[2]生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提要:目的 构建针对 APRIL 的免疫抑制分子,并对其原核表达蛋白进行纯化及活性筛选。**方法** 将可溶性增殖诱导配体(sAPRIL)cDNA 进行突变并插入 TEL Th 表位序列,突变体用 pQE-80L/DH5α 原核表达系统进行表达,表达蛋白经 SDS-PAGE 鉴定、Ni-NTA 亲和层析纯化及 Western 印迹分析,最后检测纯化蛋白对 Raji 细胞增殖的影响。**结果** 成功构建并表达了 4 种 sAPRIL 突变体:C 端引入 HEL Th 表位的 sAPRIL 突变体(Ⅰ)、N 端引入 HEL Th 表位的 sAPRIL 突变体(Ⅱ)、C 端缺失 45 bp 序列并引入 HEL Th 表位的 sAPRIL 突变体(Ⅲ)、N 端缺失 45 bp 序列并引入 HEL Th 表位的 sAPRIL 突变体(Ⅳ)。SDS-PAGE 电泳、Western 印迹分析均检测到相应的特异蛋白带。用 Ni-NTA 系统成功纯化表达的突变体蛋白。细胞试验表明,突变体Ⅰ、Ⅱ纯化蛋白具有明显的促细胞增殖活性,而突变体Ⅲ、Ⅳ纯化蛋白没有促细胞增殖活性。**结论** 在 4 种 sAPRIL 突变体中初步筛选到不具有促细胞增殖活性的 APRIL 免疫抑制分子,为下一步确定该分子的免疫抑制功能奠定了物质基础。

关键词:sAPRIL;突变体;表达;免疫抑制
中图法分类号:R392.11;R394-33;R394.3 **文献标识码**:A

Construction and screening of anti-tumor molecule based on a proliferation-inducing ligand

GAO Quan-sheng[1], HUANG Fu-sheng[1], HE Feng-tian[2] ([1]Department of Pathogenic Biology, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct, express, purify and screen immunosuppressive molecule against human soluble APRIL (a proliferation-inducing ligand). **Methods** The cDNA of soluble APRIL (sAPRIL) was mutated and TEL Th epitope was added. Mutants was expressed by pQE-80L/DH5α system, identified by SDS-PAGE and Western blotting, purified by Ni-NTA resin. Their activity on stimulating the proliferation of Raji cell was detected. **Results** Four sAPRIL mutants were constructed and expressed as follows: HEL Th epitope was added at C end (Ⅰ); HEL Th epitope was added at N end (Ⅱ); the last 45-bp DNA was deleted at C end and HEL Th epitope was added (Ⅲ); the first 45-bp DNA was deleted at N end and HEL Th epitope was added (Ⅳ). Specific protein bands according to mutant Ⅰ - Ⅳ were detected by SDS-PAGE and Western blotting. Mutant protein was purified by Ni-NTA successfully. Mutants Ⅰ and Ⅱ promoted cell proliferation remarkably, and mutant Ⅲ and Ⅳ not. **Conclusion** Four sAPRIL mutants was constructed and expressed successfully. Immunosuppressive molecule against sAPRIL that can not promote cell proliferation was screened out, and it laid a foundation for further study on their immunosuppressive function.

Key words: sAPRIL; mutant; expression; immunosuppression

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)及其受体超家族参与机体多种生理和病理过程,能促进细胞的增殖、分化及凋亡等,在机体的防御、炎症反应、免疫调节等过程中也起重要作用。APRIL 也称为 TALL22 或 TRDL21,是 TNF 家族的新成员,1998 年首先由 Hahne 等[1]发现并克隆成功,其编码基因定位于染色体 17p1311。APRIL 在正常组织中表达很弱,而在多种肿瘤细胞系和肿瘤组织中却有高水平表达。它可通过

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300314)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300314)
作者简介:高全胜(1970-),男,河北省衡水市人,博士研究生,讲师,主要从事病原生物免疫分子机制方面的研究。电话:(023)68772377
通讯作者:黄复生,电话:(023)68752244,E-mail: fshengh@mail.tmmu.com.cn,何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2005-01-06;**修回日期**:2005-03-17

膜结合型及可溶型两种形式促肿瘤细胞增殖，调节体液免疫，并参与T、B淋巴细胞的成熟和活化[2~4]。研究证实，APRIL的过表达在多种肿瘤细胞的增殖、存活及促肿瘤形成过程中有独特作用，因此，通过抑制APRIL的活性来达到抑制肿瘤逐渐成为研究热点[2~5]。本研究通过构建不同的sAPRIL突变体并引入TEL Th表位，原核表达并纯化突变体蛋白，通过细胞增殖实验筛选不具有天然sAPRIL活性的突变体，这些突变体可能在机体诱导产生针对sAPRIL的抗体，而自身又没有促进细胞的增殖活性，从而通过阻断APRIL信号通路达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与细胞株 大肠杆菌DH5α菌株、pQE-80L表达质粒、Raji细胞均由本室保存。

1.1.2 分子生物学试剂 *Taq* DNA聚合酶，限制性内切酶为New England公司产品；T4 DNA链接酶为Promega公司产品；PCR纯化试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒购自Qiagen公司；细胞培养液、FBS购自Gibco公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 sAPRIL突变体的构建 测序证实已经获得相应的sAPRIL突变体[6]。

1.2.2 sAPRIL突变体的表达及鉴定 将构建的重组突变表达载体转入DH5α菌株中进行诱导表达。诱导时，在接种2 h后按终浓度1 mmol/L加入IPTG，继续培养4 h。取诱导菌1 ml，12 000 r/min离心1 min收集菌体，加100 μl 1倍的SDS加样缓冲液，振荡混匀后100 ℃加热5~10 min。用15%的SDS-PAGE凝胶电泳鉴定表达结果。同时对表达蛋白进行Western印迹分析，一抗为1∶1 000稀释的小鼠抗人His抗体、二抗为1∶1 500稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG，最后经DAB显色。

1.2.3 sAPRIL突变体蛋白的纯化 按Qiagen公司Ni-NTA使用说明书进行。12%SDS-PAGE电泳确定纯化效果。对纯化蛋白采取逐步降低尿素浓度的方法透析除去尿素，使变性蛋白在此过程中自然复性。

1.2.4 sAPRIL突变体蛋白的活性检测

1.2.4.1 Raji细胞的培养 取液氮冻存的Raji细胞复苏，接种于含10% FBS的1640常规培养基中，另加100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素，5% CO_2、37 ℃恒温恒湿培养。每1~2天更换培养基。

1.2.4.2 细胞增殖实验(MTT) Raji细胞按2×10^3接种于96孔培养板，对照采用牛血清白蛋白，实验组分别加入sAPRIL、sAPRIL突变体Ⅰ、sAPRIL突变体Ⅱ、sAPRIL突变体Ⅲ和sAPRIL突变体Ⅳ使其终浓度分别为0.25、0.5、1.0、2.0 μg/ml。37 ℃、5% CO_2 培养48 h后，加入20 μl的MTT (5 mg/ml)，孵育4 h后，去除上清液，每孔加入150 μl的二甲亚砜，在酶标仪上测定D(490)比值。

1.3 统计学分析

测定结果用SPSS 11.0统计软件进行方差分析。

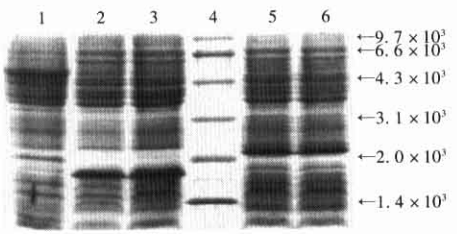
2 结果

2.1 sAPRIL突变体的构建

共构建了4种sAPRIL cDNA突变体，分别是C端引入HEL Th表位的sAPRIL突变体Ⅰ；N端引入HEL Th表位的sAPRIL突变体Ⅱ；C端缺失45 bp序列并引入HEL Th表位的sAPRIL突变体Ⅲ；N端缺失45 bp序列并引入HEL Th表位的sAPRIL突变体Ⅳ。所有突变体均插入pQE-80L原核表达载体，并经序列测定确认。

2.2 sAPRIL突变体的诱导表达

将构建的sAPRIL突变体转入致敏的DH5α大肠杆菌中进行诱导表达，15% SDS-PAGE电泳结果(图1)显示突变体Ⅰ~Ⅳ获得表达，大小与各突变体理论分子质量相符。



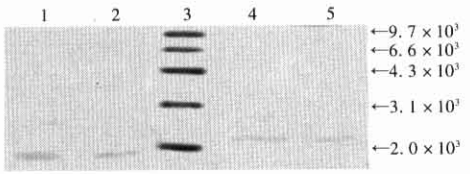
1: Negative control; 2, 3, 5, 6: Recombinants expressed the Mutant Ⅲ, Ⅳ, Ⅰ, Ⅱ; 4: Protein marker

图1 sAPRIL突变体表达产物的15%SDS-PAGE分析结果

Fig 1 The sAPRIL mutants expression by 15% SDS-PAGE

2.3 sAPRIL突变体表达蛋白的Western印迹分析

对表达的突变体Ⅰ~Ⅳ蛋白做进一步的Western印迹鉴定，见图2。可以看出，使用His抗体可特异地检测到sAPRIL突变体表达的蛋白带，说明sAPRIL突变体Ⅰ~Ⅳ得到成功表达。



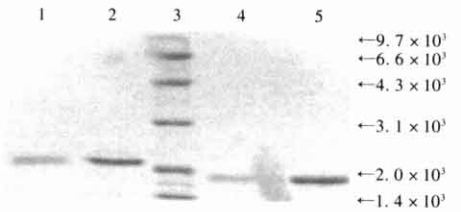
1, 2, 4, 5: Western blotting of mutant Ⅲ, Ⅳ, Ⅰ, Ⅱ; 3: Protein marker

图2 sAPRIL突变体表达产物的Western印迹分析

Fig 2 Western blot analysis of the sAPRIL mutant expression product

2.4 sAPRIL突变体表达蛋白的纯化

sAPRIL突变体在原核细胞中的表达形式主要是包含体，纯化时首先采用常规超声碎菌法制备目的蛋白的包含体，然后将制备的包含体用镍柱Ni-NTA介质进行亲和层析纯化(图3)。将含纯化蛋白的洗脱液透析后冷冻抽干，获得纯化后目的蛋白。



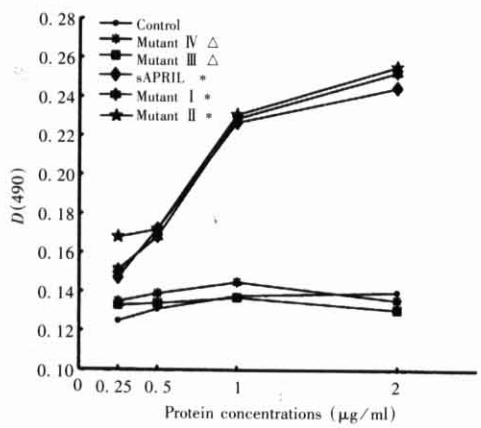
1,2,4,5: sAPRIL mutants Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ after purification; 3: Protein marker

图 3　sAPRIL 突变体蛋白的纯化

Fig 3　Purified sAPRIL mutant protein

2.5　sAPRIL 突变体表达蛋白的活性检测

从细胞增殖实验结果(图 4)可看出，与空白对照组(牛血清白蛋白)相比，sAPRIL，突变体Ⅰ和突变体Ⅱ具有明显促进 Raji 细胞增殖活性($P < 0.05$)，且成剂量依赖，而突变体Ⅲ和Ⅳ与 sAPRIL 相比无促进 Raji 细胞增殖活性的能力($P < 0.01$)揭示二者均丧失了 sAPRIL 的天然活性，可作为 sAPRIL 免疫抑制分子的候选。



*: $P < 0.05$, *vs* control; △: $P < 0.01$, *vs* sAPRIL

图 4　sAPRIL 突变体蛋白的活性检测

Fig 4　Activity assay of sAPRIL mutant protein

3　讨论

APRIL 在机体的防御、炎症反应、免疫调节等过程中也起重要作用。人 APRIL 在正常组织中表达很弱，并且仅见于前列腺、外周血淋巴细胞、单核 P 巨噬细胞、结肠、脾、胰腺等几个组织[1,5]。但其在多种肿瘤细胞和肿瘤组织，特别是消化道肿瘤(包括直肠、结肠、十二指肠、胃、食管肿瘤)中有高表达[2,5]。Hahne 等[1]检测发现结直肠癌细胞系 SW480、淋巴瘤细胞系 Raji、黑色素瘤细胞系 G36 等均有高水平的 APRIL 表达；在甲状腺癌、淋巴瘤、结肠腺癌等肿瘤组织中 APRIL 的表达均比相应的正常组织明显增加；后又比较了 48 种肿瘤及其临近的正常组织，也发现肿瘤组织中 APRIL 的表达水平显著升高。用 APRIL 的可溶性受体 BCMA 在体外可抑制 APRIL 的增殖作用，而注射到裸鼠体内可减缓肿瘤生长。当在 HT29 结肠癌荷瘤鼠中每周注射 1 次可溶性 BCMA 后，肿瘤细胞的生长明显被阻断。这些结果提示 APRIL 具有重要成瘤作用，它可能成为新的抗肿瘤靶点[7~9]。

本研究通过构建 sAPRIL 突变体并引入 TEL Th 表位，通过原核表达、分离、纯化以及活性鉴定，筛选丧失 sAPRIL 活性的突变体，这些突变体可能在机体诱导产生针对 sAPRIL 的抗体，而自身又没有促进细胞的增殖活性，从而阻断 APRIL 信号通路达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。实验中我们成功构建并表达了 sAPRIL 突变体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ，表达蛋白经 Western 印迹分析证实并纯化；细胞实验表明 sAPRIL 突变体Ⅰ和Ⅱ蛋白有明显的促细胞增殖活性，而 sAPRIL 突变体Ⅲ和Ⅳ蛋白没有促细胞增殖活性。初步表明我们找到了缺失 sAPRIL 功能的突变体，同时我们在突变体上插入了 TEL Th 表位，便于产生针对 sAPRIL 的抗体，这些工作为进一步抗肿瘤研究打下了基础，相关工作正在我室展开。

参考文献：

[1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, *et al*. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth[J]. J Exp Med, 1998, 188 (6): 1185 - 1190.

[2] Stohl W, Metyas S, Tan S M, *et al*. Inverse association between circulating APRIL levels and serological and clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(9): 1096 - 1103.

[3] Patel D R, Wallweber H J, Yin J, *et al*. Engineering an APRIL-specific B cell maturation antigen[J]. J Biol Chem, 2004, 279(16): 16727 - 16735.

[4] Deshayes F, Lapree G, Portier A, *et al*. Abnormal production of the TNF-homologue APRIL increases the proliferation of human malignant glioblastoma cell lines *via* a specific receptor[J]. Oncogene, 2004, 23(17): 3005 - 3012.

[5] Kolfschoten G M, Pradet Balade B, Hahne M, *et al*. TWE-PRIL: a fusion protein of TWEAK and APRIL[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(8): 1427 - 1432.

[6] 高全胜，黄复生，何凤田. 人可溶性增殖诱导配体 cDNA 突变体的设计与构建[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：948 - 850.

[7] Hatzoglou A, Roussel J, Bourgeade M F, *et al*. TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF)1, TRAF2, TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase[J]. J Immunol, 2000, 165(3): 1322 - 1330.

[8] Rennert P, Schneider P, Cachero T G, *et al*. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth[J]. J Exp Med, 2000, 192(11): 1677 - 1684.

[9] Medema J P, Planelles Carazo L, Hardenberg G, *et al*. The uncertain glory of APRIL[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(10): 1121 - 1125.

(编辑　刘洪娥)