论著

文章编号:1000-5404(2007)13-1316-04

融合蛋白EGF-TCS的纯化及体外靶向杀伤肿瘤细胞的研究

李咏梅[1],陈金龙[2],杨海文[1],罗 仁[1] ([1]南方医科大学南方医院中医科,广州 510515;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

提 要:目的 在大肠杆菌中表达并纯化EGF-TCS融合蛋白,观察该融合蛋白对肿瘤细胞的靶向选择性杀伤作用。**方法** 将重组表达质粒PQE30/EGF-TCS转化至大肠杆菌M15中,表达该融合蛋白(EGF-TCS)。产物经Ni-NTA Agrose亲和层析柱纯化;用流式细胞仪检测肿瘤细胞株和正常肝LO2细胞株的EGFR表达量;进行细胞杀伤实验,验证EGF-TCS的选择性杀伤能力;用流式细胞仪检测细胞凋亡的方法进一步考察EGF-TCS的靶向选择性杀伤能力,并用电镜观察细胞形态。**结果** 重组表达质粒PQE30/EGF-TCS在大肠杆菌M15中获得稳定、高效的融合表达,表达上清柱纯化纯度达95%以上;肝癌BEL-7402细胞表面EGFR表达量最高(72.33%),正常肝LO2细胞表面EGFR表达量最低(5.51%),重组的融合蛋白对肿瘤细胞具有较大的杀伤能力(BEL-7402、MCF-7和BGC-823的IC_{50}分别为11.40、22.47、12.53 μg/ml),对正常细胞的杀伤能力微弱(IC_{50}为53.19 μg/ml)。**结论** 应用基因工程技术,成功构建了融合蛋白EGF-TCS,该融合蛋白可明显促进肿瘤细胞的凋亡。

关键词: 表皮生长因子;天花粉蛋白;纯化;靶向作用;凋亡

中图法分类号: R392-33; R730.51; R967 **文献标识码:** A

Purification of EGF-TCS recombinant fusion protein and its targeting action on human tumor cells *in vitro*

LI Yong-mei[1], CHEN Jin-long[2], YANG Hai-wen[1], LUO Ren[1] ([1]Department of Traditional Chinese Medicine, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515; [2]Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: Objective To express and purify EGF-TCS fusion protein and observe the targeted and selective killing effect on cancer cells of the fusion protein. **Methods** The recombinant expression plasmid PQE30/EGF-TCS was transformed to *E. coli.* M15 and the fusion protein (EGF-TCS) was expressed. Ni-NTA Agrose affinity chromatography was used to purify the protein, flow cytometry to detect EGFR expression rate in cancer cells (BEL-7402, MCF-7, BGC-823) and normal liver LO2 cells, and the killing test to verify selective killing ability of EGF-TCS; The cell apoptosis detection by flow cytometry and microscopic observation were used to confirm the selective killing ability of EGF-TCS. **Results** Recombinant expression plasmid PQE30/EGF-TCS was expressed in *E. coli.* M15 stably and effectively. The purity of EGF-TCS was over 95% by chromatography. EGFR expression rate was highest in hepatoma cells BEL-7402 (72.33%) and lowest in normal liver LO2 cells (5.51%). The killing ability of recombinant protein was more effective to cancer cells (IC_{50} of BEL-7402, MCF-7 and BGC-823 was 11.4, 22.47 and 12.53 μg/ml respectively) and was weak to normal cells (IC_{50} 53.19 μg/ml). **Conclusion** The recombinant protein EGF-TCS that induces apoptosis of cancer cells was successfully constructed by gene engineering technology.

Key words: epidermal growth factor; Trichosanthin; purification; target action; apoptosis

免疫毒素是免疫学研究的热点之一,被称为"生物导弹",近年来利用基因工程技术构建了不同用途的免疫毒素[1-3]。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)过表达于多种肿瘤组织[4,5],与肿瘤的发生、发展有密切关系,使用EGF做为导向的免疫毒素可以靶向杀死肿瘤细胞。天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)对肿瘤细胞具有明显的细胞毒

作者简介:李咏梅(1970-),女,辽宁省大连市人,博士研究生,主治医师,主要从事免疫毒素方面的研究。电话:13189092737, E-mail: Lmx2007@163.com

通讯作者:罗 仁,E-mail: luoren41671@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-11-21;修回日期:2007-03-13

作用[6]，本研究在前期研究工作的基础上，构建 EGF-TCS 表达载体，表达、纯化 EGF-TCS 融合蛋白；测定正常肝细胞、肝癌、乳腺、胃腺癌细胞的 EGF 受体的数量和 EGF-TCS 对正常肝细胞、肝癌、乳腺、胃腺癌细胞的杀伤能力，为下一步在临床中应用免疫毒素靶向杀伤肿瘤细胞奠定基础。

1　材料与方法

1.1　菌种及主要试剂

表达菌 M15 购自鼎国生物技术有限公司；各种限制性内切酶、工具酶、蛋白分子量标准及试剂盒购自宝生物工程（大连）有限公司；其余试剂为国产分析纯。

1.2　EGF -TCS 的表达和纯化

将鉴定的重组质粒转化至 M15，挑单菌落接种于含 Amp 50 μg/ml LB 培养基中，37 ℃ 200 r/min 摇床培养 8 h。而后取该培养物按 1∶25 的比例接种于 5 ml LB 培养基中，37 ℃ 250 r/min 振荡培养至吸光度值为 0.6 时，加入 IPTG 诱导表达（终浓度为 1 mmol/L）3 h，取样做 SDS-PAGE 分析。IPTG 诱导大肠杆菌表达 TCS 3 h，超声波破碎菌体，离心后取上清液，用 Ni-NTA Agrose 亲和纯化，纯化的样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.3　细胞株及细胞培养

正常肝 LO2 细胞、肝癌 BEL-7402 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养、传代，乳腺癌 MCF-7 细胞和胃腺癌 BGC-823 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM（高糖）培养基培养、传代。所有细胞均采取贴壁细胞培养法，在 5% CO_2、37 ℃孵箱中培养，均由陈金龙博士（军事医学科学院放射医学研究所）惠赠。

1.4　流式细胞仪检测细胞表面的 EGFR 表达

常规消化细胞，用 PBS 洗细胞 3 次，将细胞沉淀重悬于 50 μl 的 PBS 中，加入 EGF 1 μl，对照（BEL-7402 细胞）加等体积 PBS，4 ℃孵育 30 min，期间间歇摇晃细胞，用含 1% 血清的 PBS 洗细胞 3 次，将细胞沉淀重悬于 50 μl 的 PBS 中，加入抗 EGF 抗体 5 μl，4 ℃孵育 40 min，，将细胞沉淀重悬于 50 μl 的 PBS 中，加入 FITC 标记的二抗 10 μl，4 ℃孵育 30 min，用含 1% 血清的 PBS 洗细胞 3 次，将细胞沉淀重悬于 250 μl 的 PBS 中，加入等体积 250 μl 的 4% 的多聚甲醛，混匀，保存于 4 ℃，待流式检测用。流式数据分析以 Cell Quest 软件获取与分析，将流式细胞仪的侧向角散射（SSC）设置为线性放大，单色绿荧光（FL1）的检测信号设置为对数放大，以 SSC/FITC-EGF 双参数设门，分别检测各管中细胞的侧向角散射及荧光强度，每测试管分析门内 10 000 个细胞。数据分析时，以阴性对照细胞确定阴性界限。

1.5　EGF-TCS 对肿瘤细胞的选择性杀伤的检测

取对数生长期以上的 LO2、BEL-7402、MCF-7 和 BGC-823 细胞，用 0.5‰胰蛋白酶消化后细胞记数，用新鲜培养液配制成 1×10^5/ml，96 孔板各孔加 200 μl，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱内培养。纯化的 EGF-TCS 样品用 PBS 溶解，过滤除菌。24 h 后加等倍稀释的不同浓度的 EGF-TCS 样品（20 μl/孔），同一浓度设 3 个复孔，阴性对照孔加 20 μl 培养基。继续培养 72 h 后，每孔加 0.1% 的结晶紫溶液 100 μl，置室温 30 min 后，每孔加 100 μl 1% TritonX-100 脱色液，室温振荡 30 min 后，用 Wellscan MK2 全自动酶标仪测 570 nm 处吸光度值[D(570)]，按以下公式计算杀伤率：杀伤率(%) = [对照孔 D(570) - 实验孔 D(570)]/对照孔 D(570) × 100%，通过计算细胞生长的抑制百分率，用 Origin 6.0 软件计算出 IC_{50}（半数抑制浓度），并根据 IC_{50} 值计算出选择指数：选择指数 = IC_{50}（正常细胞）/IC_{50}（肿瘤细胞）。

1.6　EGF-TCS 选择性诱导细胞凋亡的流式检测

将细胞以 1×10^6 接种于 25 cm^2 培养瓶中，在含 10% 小牛血清的培养基中培养 24 h 后更换含 5 μg/ml EGF-TCS 的培养基继续培养 48 h。将细胞消化，PBS 洗 2 次后离心成丸，annexin V-FITC 和 PI 双染检测细胞凋亡，方法按试剂盒说明进行，染色过程简述如下：将细胞丸于 200 μl 结合缓冲液（10 mmol/L HEPES/NaOH，pH 7.4，140 mmol/L NaCl，5 mmol/L $CaCl_2$）中均匀悬浮，接着加 10 μl PI 和 10 μl Annexin V-FITC，室温避光孵育 30 min，再加 300 μl 结合缓冲液，立即用 FACSCalibur 流式细胞仪检测。每样至少检测 20 000 个细胞，Cell Questk 软件分析结果。

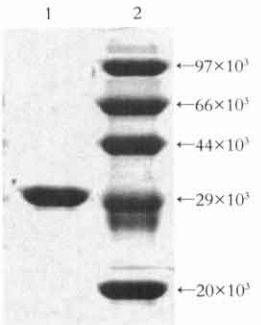
1.7　EGF-TCS 对 BEL-7402 细胞影响的电镜观察

将 BEL-7402 细胞以 1×10^6 接种于 75 cm^2 培养瓶中，培养 24 h 后，更换含不同浓度 EGF-TCS（0、10、30、100 μmol/L）的同一培养基，继续培养 48 h。用 PBS 洗 2 次细胞，刮取法收集细胞，PBS 洗 2 次后离心成细胞丸，立即于含 2.5% 戊二醛的 0.1 mol/L 二甲基胂酸钠中固定 1 h。0.1 mol/L PBS（pH 7.2）洗 3 次，再于含 0.1% 四氧锇酸的 PBS（pH 7.2）中固定 1 h。系列梯度乙醇脱水后，用 812 环氧树脂：乙醇（1∶1）渗透 1 h，于纯环氧树脂中渗透过夜。将细胞用新鲜环氧树脂包进模孔，60 ℃成熟 48 h，用 LKB 超薄切片机切成 70 nm 超薄切片。切片放入丙酮清洗后的 200 目铜网，用铀酸乙脂和枸橼酸铅染色后 JEOL 1200 Ex Ⅱ型透射电镜观察。

2　结果

2.1　EGF-TCS 融合蛋白的纯化

图 1 可见，纯化后的融合蛋白经 12% 的 SDS-PAGE 显示，纯度超过 95%。

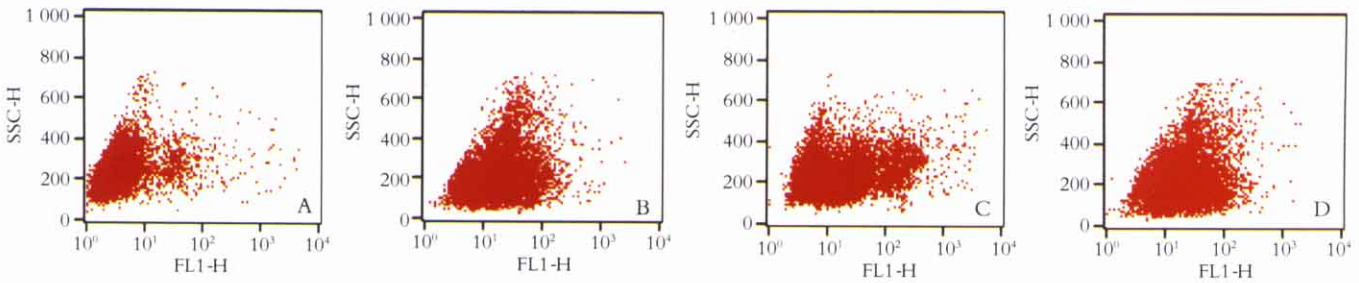


1：纯化后的重组蛋白 EGF-TCS；2：蛋白分子量标准

图 1　纯化产物的 SDS-PAGE 分析

2.2 流式细胞仪检测细胞表面的 EGFR 表达

如果细胞表面有 EGF 受体表达，则会被 FITC 标记的抗体标记上而发荧光，表面受体越多的细胞，在流式细胞仪中荧光更强，在横坐标 FL1-H（荧光强度）中越偏右，纵坐标 SSCH（侧向角散射度）表示细胞的颗粒度。本实验中，各种类细胞都观察1万个细胞中 EGF 受体表达阳性细胞占的细胞百分率，以此来代表细胞表面 EGF 受体的表达量。流式细胞仪检测结果显示，肿瘤细胞表面的 EGFR 的表达量（BEL-7402 细胞：72.33%，MCF-7 细胞：63.92%，BGC-823 细胞：70.41%）高于正常肝细胞 LO2 表面 EGFR 的表达量（5.51%），见图2。其中肝癌 BEL-7402 细胞表面 EGFR 表达量最高。



A：LO2 细胞；B：BEL-7402 细胞；C：MCF-7 细胞；D：BGC-823 细胞

图2 流式细胞仪检测 BEL-7402 和 LO2 等细胞表面 EGFR 的表达

2.3 EGF-TCS 对肿瘤细胞的选择性杀伤

EGF-TCS 对肿瘤细胞有较强的杀伤能力，最敏感的肿瘤细胞是人肝癌 BEL-7402 细胞，IC_{50} 为 11.40 μg/ml；对人乳腺癌 MCF-7 细胞及胃腺癌 BGC-823 细胞的 IC_{50} 分别为 13.75 μg/ml 和 15.36 μg/ml。EGF-TCS 对正常肝细胞也具有一定的毒性作用，但杀伤能力较低，IC_{50} 为 53.19 μg/ml。EGF-TCS 对肝癌 BEL-7402、乳腺癌 MCF-7 和 BGC-823 细胞的选择指数分别为：4.67，2.38 和 4.24（表1）。说明重组蛋白对肿瘤细胞具有靶向杀伤能力。

表1 不同浓度 EGF-TCS 对 BEL-7402 和 LO2 等细胞的细胞杀伤率 IC_{50} 和选择指数的影响

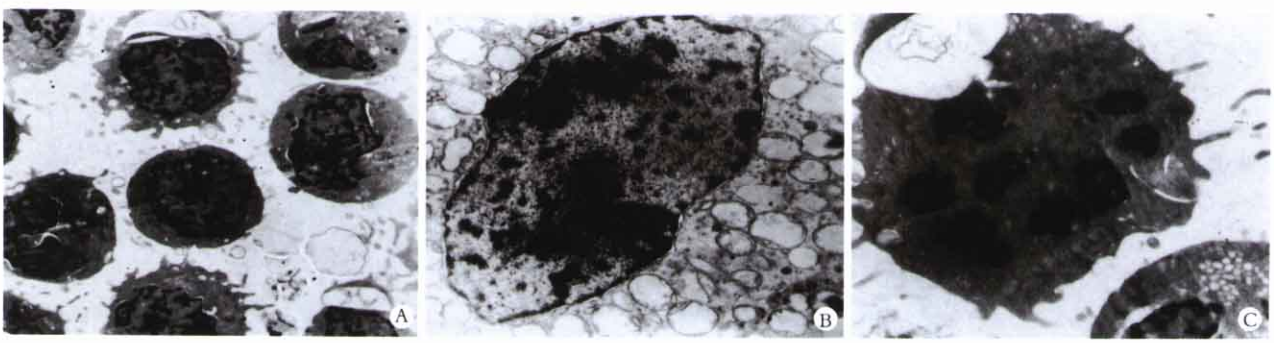
细胞	细胞杀伤率[$x \pm s$)%]					IC_{50}（μg/ml）	选择指数
	40 μg/ml	20 μg/ml	10 μg/ml	5 μg/ml	2.5 μg/ml		
LO2	36.58 ±4.65	29.65 ±5.21	10.32 ±1.45	4.21 ±0.64	1.25 ±0.09	53.19	1.19
BEL-7402	90.91 ±9.21	77.67 ±6.78	41.05 ±5.65	12.17 ±2.31	5.65 ±0.89	11.40	4.67
MCF-7	75.36 ±8.11	50.98 ±6.23	33.52 ±4.79	11.42 ±1.73	3.61 ±0.42	22.47	2.38
BGC-823	80.86 ±9.34	69.87 ±7.71	40.58 ±7.12	15.65 ±1.67	4.89 ±0.78	12.53	4.24

2.4 EGF-TCS 选择性诱导细胞凋亡的流式检测

流式细胞检测结果表明 EGF-TCS（5 μg/ml）有诱导 BEL-7402、MCF-7 和 BGC-823 细胞凋亡的作用，凋亡率分别为：37.21%、41.59%、52.57%；同样的剂量只能引起正常肝 LO2 细胞少量的凋亡，凋亡率为9.99%。

2.5 EGF-TCS 对 BEL-7402 细胞影响的电镜观察

电镜下可见：对照组（0 μmol/L）细胞核清晰完整，有丰富正常的线粒体及内质网；EGF-TCS 蛋白组（10、30、100 μmol/L）：出现细胞凋亡不同时期特征，染色质浓集，核不规则，可见空泡状内质网，凋亡小体，见图3。



A：10 μmol/L （×4 000）；B：30 μmol/L （×6 000）；C：100 μmol/L （×6 000）

图3 不同浓度 EGF-TCS 对 BEL-7402 细胞凋亡的电镜观察 （TEM）

3　讨论

对肿瘤的特异性治疗一直是医学工作者的梦想。20 世纪 80 年代，有人将一些毒素蛋白偶联到与肿瘤细胞有亲和结合的抗体上，产生了第一代的免疫毒素（immunotoxin）。免疫毒素的免疫原性和毒性，推动了免疫毒素从两个方面进行改造：弹头和毒素。弹头主要是抗体，包括肿瘤细胞表面过度表达的生长因子受体的配体。目前国内外已有数种抗肿瘤免疫毒素进入临床Ⅰ、Ⅱ期试验。基因重组免疫毒素分子量小，对实体瘤穿透力强，易于大量生产，在肿瘤的生物治疗中具有广泛的应用前景。大量研究表明，花粉蛋白是一种Ⅰ型单链核糖体失活蛋白（ribosome inactivating protein，RIP），可通过 N-糖苷酶活性使真核细胞核糖体失活。它是从我国传统中药葫芦科植物栝蒌的根块中提取的，研究表明 TCS 具有多种药理学活性，主要包括免疫调节、抗肿瘤、抗人免疫缺陷病毒等，天花粉蛋白只有 A 链没有与细胞结合的 B 链，单独的天花粉蛋白很难进入细胞，因此对完整细胞的毒性很低。把单链毒素和单克隆抗体偶联或与细胞因子连接后形成杂交分子，提高了其特异性，具有高效、低毒的特点[7-9]。近来研究表明，人表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）是一种刺激细胞增殖和分化的重要生长因子，在肿瘤细胞学研究中显示，许多恶性肿瘤如肾癌、胃癌、前列腺癌、肝癌、非小细胞肺癌、膀胱癌等均过度表达 EGFR。表面受体的数目远高于其周围正常组织，它的过度表达常与预后差、转移快和生存期短等有关。EGF 可以竞争结合癌细胞表面受体，所以 EGF 可以作为免疫毒素的配子，携带毒素特异的杀伤癌细胞[10,11]。因此近年来出现了一系列以 EGF 受体为靶点的抗肿瘤治疗策略，其中 EGF 受体介导的融合蛋白因小剂量用药和高选择性的优点而受到了人们的重视[12-15]。本实验结果证明，肿瘤细胞表面的 EGFR 的表达量与正常肝细胞 LO2 表面 EGFR 的表达量差异显著，其中肝癌 BEL-7402 细胞表面 EGFR 表达量最高。EGF-TCS 对肿瘤细胞有较强的杀伤能力，最敏感的肿瘤细胞是人肝癌 BEL-7402 细胞，IC_{50} 为 11.40 μg/ml，对正常肝细胞也具有一定的毒性作用，但杀伤能力较低，IC_{50} 为 53.19 μg/ml。结果与设计相符，证明 EGF-TCS 是一个较理想的靶向药物，为临床应用奠定了基础。我们今后还要对动物抑瘤实验作进一步研究。

参考文献：

[1] Bang S, Nagata S, Onda M, *et al*. HA22 (R490A) is a recombinant immunotoxin with increased antitumor activity without an increase in animal toxicity [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(4): 1545-1550.

[2] Fracasso G, Bellisola G, Cingarlini S, *et al*. Anti-tumor effects of toxins targeted to the prostate specific membrane antigen[J]. Prostate, 2002, 53(1): 9-23.

[3] 胡川闽，郭建秀，李　鹏，等. 抗肝癌单链免疫毒素 HAb25(scFv)-PE40 的构建及其导向作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(22): 2209-2212.

[4] Onn A, Correa A M, Gilcrease M, *et al*. Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(1 Pt 1): 136-143.

[5] Hanke M, Farkas L M, Jakob M, *et al*. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: a component in chromaffin granules which promotes the survival of nigrostriatal dopaminergic neurones *in vitro* and *in vivo*[J]. Neuroscience, 2004, 124(4): 757-766.

[6] 王本祥. 现代中药药理与临床[M]. 天津：天津科技翻译出版公司，2004: 236.

[7] Shaw P C, Lee K M, Wong K B. Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties [J]. Toxicon, 2005, 45(6): 683-689.

[8] 白　莉，祝　蓉，陈智鸿，等. 靶向 EGFR 基因的 siRNA 表达载体构建及其生物学效应的研究[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(23): 2307-2310.

[9] Zhang C, Gong Y X, Ma H, *et al*. Reactive oxygen species involved in trichosanthin-induced apoptosis of human choriocarcinoma cells[J]. Biochem J, 2001, 355(Pt 3): 653-661.

[10] Krozely P. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: evolving role in the treatment of solid tumors[J]. Clin J Oncol Nurs, 2004, 8(2): 163-168.

[11] 张晓晶，王　甦，刘云鹏，等. EGFR 信号通路调控结肠癌 Caco-2 细胞侵袭转移的分子机制[J]. 第三军医大学学报，2006, 28(14): 1479-1482.

[12] 王承兴，曹　亚. 以 EGFR 及其突变体为靶的肿瘤治疗[J]. 国外医学：生理病理科学与临床分册，2000, 20(2): 137-140.

[13] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy[J]. Oncologist, 2002, 7(Suppl 4): 2-8.

[14] 王儒鹏，周丽娜，吴　军，等. 重组免疫毒素 hIL-2-Luffin P1 的构建及表达[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(9): 828-830.

[15] 王嘉毅. 原发性肝癌组织 EGFR 和 MMP9 表达与术后复发或转移的关系[J]. 郑州大学学报：医学版，2005, 40(5): 885-886.

（编辑　王　红）