论著

文章编号:1000-5404(2009)24-2418-03

hEOLA1 抗体的制备及肿瘤组织中 EOLA1 的表达检测

梁自文[1],王清良[2],杨宗城[3],陈 兵[1],张忠辉[1] (第三军医大学西南医院:[1]内分泌科,[2]病理学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[3]全军烧伤研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 制备抗 EOLA1 多克隆抗体并检测其在肿瘤组织中的表达。**方法** 采用原核表达获得 EOLA1 蛋白,纯化后作为抗原免疫大白兔,获得兔抗人 EOLA1(hEOLA1)多抗血清,进行免疫组化检测人多肿瘤芯片上 EOLA1 的表达。**结果** 制备了高滴度的 hEOLA1 多克隆抗体,免疫组化显示 EOLA1 蛋白在肺癌、结肠癌、胃癌和肝癌仅表达于肿瘤间质,肿瘤细胞本身未见表达,而在胶质瘤和乳腺癌则呈广泛表达。**结论** EOLA1 可能在胶质瘤和乳腺癌的发生、发展方面起着重要作用。

关键词: EOLA1;原核表达;多克隆抗体;免疫组织化学;肿瘤

中图法分类号: R392-33;R392.7;R730.23 **文献标识码:** A

Preparation of anti-hEOLA1 antibody and detection of EOLA1 in tumor tissues

LIANG Zi-wen[1], WANG Qing-liang[2], YANG Zong-cheng[3], CHEN Bing[1], ZHANG Zhong-hui[1] ([1]Department of Endocrinology, [2]Institute of Pathology, [3]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To prepare the anti-endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1 (EOLA1) antibody and detect its expression in tumor tissues. **Methods** Purified EOLA1 protein produced by prokaryotic expression, was used to immunize white rabbit, and the anti-EOLA1 polyclonal antibodies were collected from the rabbit serum and identified by Western blotting. Then the antibodies were used for immunohistochemical assay in human poly tumor chip. **Results** The antibody we generated was of very high titer, and could be used for detection of EOLA1 protein by Western blotting. In immunohistochemical assay, EOLA1 protein was expressed only in the interstitial tissues of lung, colon, stomach and liver tumors. However, in glioma and mammary cancer EOLA1 protein was expressed in both the interstitial and tumor cells. **Conclusion** EOLA1 may be play a important role in the genesis and development of glioma and mammary cancer.

Key words: endothelial-overexpressed lipopolysaccharide-associated factor 1; prokaryotic expression; polyclonal antibodies; immunohistochemical assay; tumor

内皮高表达脂多糖相关因子1(endothelial-overexpressed lipopolysaccharide- associated factor 1, EOLA1)是本课题组在筛选人血管内皮细胞受内毒素刺激后差异表达基因中获得的1个功能未明基因,其表达蛋白EOLA1是一个胞内蛋白,在细胞内强制高表达EOLA1可以促进细胞增殖[1,2]。在分析EOLA1蛋白结构时,我们发现其氨基酸序列中包含多个酪氨酸酶2(PTK2)作用位点,表明EOLA1是酪氨酸激酶家族成员[3]。酪氨酸蛋白激酶受体介导着重要的信号通路,PTKs能激活大多数的信号通路,引起细胞的增殖、分化、迁移和代谢的改变等,在胚胎发育、代谢以及免疫系统中起着非常重要的作用[4]。研究表明,在遗传性的和散发性的肿瘤病例中,有超过一半的PTKs被发现有过表达或以突变的形式与恶性肿瘤相关[5]。

在对一些细胞系的检测中,发现EOLA1在一些肿

基金项目:国家自然科学基金(30200101,30371468)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200101, 30670838)

作者简介:梁自文,男,四川省彭州市人,博士,副教授,主要从事EOLA1基因功能和糖尿病足防治方面的研究。E-mail: liangzw@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2009-09-03;修回日期:2009-09-23

瘤细胞中高表达,如人结直肠腺癌 SW480,而在一些癌细胞中却检测不到,如肺癌细胞系 A549,提示 EOLA1 可能在某些肿瘤的发生中起重要作用[2]。为深入研究 EOLA1 在生理状态下的功能,我们制备了抗 EOLA1 多克隆抗体,并通过免疫组化实验检测其在不同肿瘤组织中的表达情况。

1　材料与方法

1.1　材料

PET-46EK/LIC 载体、His. Bind purification 试剂盒、His. Tag 单克隆抗体、Bugbuster 蛋白抽提试剂、His. Bind 纯化试剂盒和碱性磷酸酶酶标羊抗小鼠二抗(美国 Novagen 公司),Western blot marker(美国 Invitrogen 公司),弗氏完全佐剂和不完全佐剂(美国 Sigma 公司),NBT/BCIP 显色剂(上海华舜公司),成年雄性新西兰大白兔 2.8 kg,2 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,引物合成和测序由上海生工代理。人体多肿瘤组织芯片(包含人肺、肝、结肠、轩、胶质和乳朱癌性组织)由第三军医大学西南医院病理学研究所提供,S-P 免疫组化试剂盒购自中杉金桥公司。

1.2　重组质粒的构建及诱导表达

参照文献[6,7]的方法培养人脐静脉内皮细胞株 ECV304 细胞,进行 RT-PCR 反应获得 EOLA1 基因开放阅读框,将目的片段亚克隆入 PET-46EK/LIC 空质粒,转化到宿主表达菌 BL21(DE3)plysS 感受态细菌,经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达后取样本进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析目的蛋白表达。

1.3　EOLA1 蛋白大量表达和纯化

照上述步骤接种阳性菌落后加 IPTG 诱导摇菌培养 4 h,将菌液 10 000 × *g* 离心 10 min 收集菌体,确定湿质量。加 Bug-Buster 蛋白抽提试剂 48 ml 和 Benzonase 核酶 48 μl 复抽提,终产物电子天平称量,置冰上,加入 1 × Bind Buffer(含尿素 6 mol/L)1 h,使其完全常溶解,低温离心去除不溶杂质,0.45 μm 滤膜过滤后进行亲和层析。

1.4　EOLA1 蛋白复性

将亲和层析后获得的目的蛋白溶液 10 ml,溶解于 100 ml 的包涵体裂解液中,放入透析袋中,在逐级递减尿素浓度的透析液中反复透析,目的蛋白溶液在 4 ℃ 经 16 000 × *g* 离心 10 min 后收集上清,BCA 法测定蛋白浓度,取复性蛋白样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

1.5　抗 EOLA1 抗体的制备和纯化

将纯化的 200 μg 蛋白在低温状态下采用振荡的方法与 2 ml 弗氏完全佐剂充分混合,采用多点注射方法接种到 2 只新西兰大白兔;2 周后每只动物以半量抗原加不完全弗氏佐剂加强免疫,此后每半月继续免疫 1 次。第 2 次加强免疫后的第 7 天,开始监测血清抗体滴度,其后,每次免疫后的第 7 ~ 10 天取血测抗体滴度,兔耳缘取血,ELISA 法检测抗体滴度,当 ELISA 效价大于 10 万,并以免疫印迹检测其特异性后,兔颈动脉分离,取血,分离血清,分装冻存于 -80 ℃。

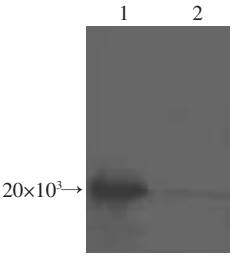
1.6　EOLA1 在肿瘤组织中的免疫组化

用本实验室制备并纯化的抗 EOLA1 抗体按照稀释度 1∶100 进行稀释后,标记多肿瘤组织芯片,进行免疫组化检测。

2　结果

2.1　抗 EOLA1 多克隆抗体制备与鉴定

将原核表达获得的 EOLA1 蛋白免疫大白兔,取得抗血清 30 ml,效价为 1∶102 400。提取 ECV304 细胞总蛋白,变性后上样电泳,用所制备的 EOLA1 多抗作为一抗孵育,能够检测到特异条带表达,从而证明了多抗制备成功(图 1)。



1:原核表达产物; 2:提取培养 ECV304 总蛋白

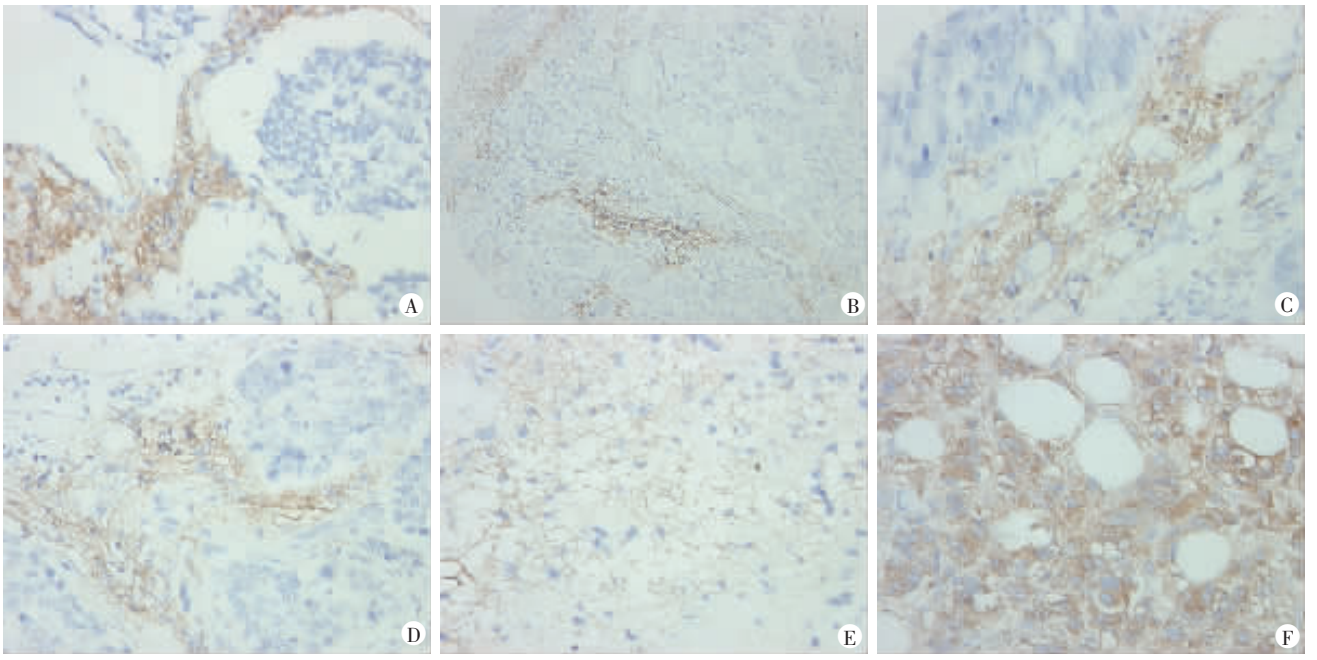
图 1　Western blot 检测 EOLA1 蛋白的表达

2.2　EOLA1 在肿瘤组织中的检测

用制备的抗 EOLA1 多抗作为一抗进行免疫组化,清楚地显示了 EOLA1 蛋白在各肿瘤组织的表达情况,在肺癌、结肠癌、胃癌和肝癌,仅表达于肿瘤间质,肿瘤细胞本身未见表达;在胶质瘤和乳腺癌,则呈广泛表达(图 2)。

3　讨论

EOLA1 是我们在克隆人脐静脉内皮细胞受内毒素刺激后差异表达基因中筛选到的一个功能未明基因,经过近几年来的系列研究,已经对 EOLA1 基因的特性有了基本认识,但对于 EOLA1 蛋白在细胞内发挥的作用仍然知之甚少。本课题组前期采用 Northern 杂交的方法检测到 EOLA1 蛋白在正常成人组织中广泛表达,特别是血液循环丰富的组织,但胸腺、肺完全没有表达,在结肠、小肠和外周白细胞仅有极弱的表达[2],表明 EOLA1 在正常人不同组织中以有活性的方式存在并参与了组织功能的完成。另外,我们也采用 Northern 杂交的方法检测了 EOLA1 在癌细胞系中的表达,结果显示在早幼粒白血病、HeLa 细胞、慢性骨髓性白血病系细胞有弱的表达,在成淋巴细胞瘤性白血



A:肺癌;B:肝癌;C:结肠癌;D:胃癌;E:胶质瘤;F:乳腺癌

图2 各肿瘤组织免疫组化检测结果(S-P×400)

病、结直肠腺癌系细胞有强的表达,而在肺癌细胞系和黑素瘤细胞系均无表达,提示 EOLA1 蛋白参与了相关癌细胞的发生、发展[2,3]。但是对 EOLA1 在人体组织中表达的方式和意义仍不清楚。其转录调控机制也仅有初步的认识[8,9]。

免疫组化是研究蛋白组织表达的常用方法[10]。因为 EOLA1 是一个新发现的蛋白,且氨基酸序列较短,相对分子质量小,因此,我们采用原核表达的方法,表达了纯净的 EOLA1 全蛋白,并以此作为抗原,免疫大白兔获得了高效价的抗 EOLA1 多抗,Western blot 检测结果证明制备的抗 EOLA1 多抗能特异检测细胞内 EOLA1 蛋白的表达。

用制备的抗 EOLA1 多抗作为一抗进行免疫组化,在制备的多肿瘤组织芯片上进行筛查,可快速显示 EOLA1 蛋白在不同肿瘤组织的表达情况,结果显示 EOLA1 蛋白在不同肿瘤组织呈显著差异的表达,其中,在肺癌、结肠癌、胃癌和肝癌,仅表达于系膜区,肿瘤细胞本身未见表达;而在乳腺癌系膜区和肿瘤细胞均大量表达。系膜区主要由结缔组织和小血管组成,包括成纤维细胞、内皮细胞和平滑肌细胞,EOLA1 基因在这些细胞呈非选择性大量表达,表明其与肿瘤组织的发展和迁移密切相关,而在肿瘤细胞呈选择性表达,提示 EOLA1 基因与某些肿瘤,如胶质瘤和乳腺癌的发生特定相关。目前,我们正在相应正常组织上进行检测 EOLA1 蛋白的表达的研究,以期进一步说明 EOLA1 蛋白与某些肿瘤发生的相关关系。

参考文献:

[1] 梁自文, 杨宗城, 罗向东, 等. 内皮活化相关新基因 EOLA1 的体外表达及亚细胞定位[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(18): 1617-1619.

[2] Liang Z, Yang Z. Identification and characterization of a novel gene EOLA1 stimulating ECV304 cell proliferation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(3): 798-802.

[3] 梁自文, 杨宗城, 陈 建, 等. 抑制 ECV304 细胞内 EOLA1 基因表达后效应观察[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(3): 293-297.

[4] 徐 方, 李颖华, 王银银, 等. hNOK 抗体的制备及肺癌组织中 NOK 的表达检测[J]. 生物工程学报, 2008, 24(3): 480-484.

[5] Greenman C, Stephens P, Smith R, *et al*. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes[J]. Nature, 2007, 446(7132): 153-158.

[6] Birbes H, Zeiller C, Komati H, *et al*. Phospholipase D protects ECV304 cells against TNFalpha-induced apoptosis[J]. FEBS Lett, 2006, 580(26): 6224-6232.

[7] 蔡 震, 梁自文, 罗向东, 等. 人内皮细胞高表达脂多糖相关因子1蛋白的纯化[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(5): 367-369.

[8] 梁自文, 杨宗城, 陈 建, 等. EOLA1 基因5′侧翼区的克隆及调控功能初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1001-1003.

[9] 梁自文, 周广举, 杨宗城, 等. EOLA1 基因启动子序列的鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(23): 2309-2311.

[10] 孙慧勤, 郭德玉, 章 容, 等. 后肾腺瘤临床病理及免疫组化观察分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2047-2050.

(编辑 王小宴)