论著

文章编号:1000-5404(2013)08-0774-05

Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合毒素的构建及其抗胃癌 SGC-7901 细胞的活性研究

李启英,项 颖,余维倩,王 莉,黄德鸿,唐显军,张 曼,张文军,杨 涛,肖春燕 (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所生物治疗、血液肿瘤科)

[摘要] **目的** 构建含尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator,uPA)裂解位点(uPAcs)和 KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu)驻留信号序列的丝瓜毒素(Luffin-β)基因的原核载体,表达并纯化其融合毒素蛋白 Luffin-β-KDEL-uPAcs(LKP),并探讨融合毒素蛋白 LKP 抗胃癌 SGC-7901 细胞的活性。**方法** RT-PCR 两步法克隆 Luffin-β 基因,引物延伸法构建 Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合基因并亚克隆至原核表达载体 pET-32a(+)中,诱导其表达融合蛋白 Trx-EK-Luffin-β-KDEL-uPAcs(TELKP)并纯化 TELKP,肠激酶(enterokinase,EK)切割 TELKP 后,纯化与回收目的毒素蛋白 LKP,SDS-PAGE 对 LKP 蛋白予以检测鉴定,高效液相色谱法(HPLC)对其进行纯度检测。采用 cell counting kit-8 (CCK-8)、RT-PCR、Western blot 等方法,体外检测毒素蛋白 LKP 经 uPA 酶裂解后释放 Luffin-β 的抗胃癌 SGC-7901 细胞的活性。**结果** 成功诱导重组载体 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 表达相对分子质量约 48.8×10^3 含载体表达标签(Trx)的融合免疫毒素 TELKP,EK 酶切该蛋白获含 290 个氨基酸,相对分子质量约 31.8×10^3 的目的蛋白 LKP。SDS-PAGE 检测鉴定表明,LKP 蛋白与预期大小一致,其纯度达 98.8%。CCK-8、RT-PCR、Western blot 等法检测显示,LKP 经 uPA 酶体外裂解可释放具杀瘤活性的 Luffin-β 小分子毒素。**结论** 成功克隆到 Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合基因,并将其构建于原核表达载体 pET-32a(+)中,且诱导该载体表达了相对分子质量约 31.8×10^3 的融合毒素 LKP。LKP 毒素经 uPA 酶体外裂解能释放具杀瘤活性的 Luffin-β 小分子毒素。

[关键词] Luffin-β;尿激酶纤溶酶原激活剂裂解位点;KDEL 驻留信号序列;融合毒素;杀瘤活性

[中图法分类号] R394-33;R73-362;R735.2 [文献标志码] A

Construction, expression and purification of prokaryotic fusion protein luffin-β-KDEL-uPAcs and its cytotoxic effect on gastric carcinoma cell line SGC-7901

Li Qiying, Xiang Ying, Yu Weiqian, Wang Li, Huang Dehong, Tang Xianjun, Zhang Man, Zhang Wenjun, Yang Tao, Xiao Chunyan (Department of Biotherapy & Heamoonclogy, Chongqing Cancer Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct a prokaryotic expression vector carrying a fusion gene containing tandemly ligated luffin-β, KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) and urokinase plasminogen activator cleavage site (uPAcs), to express and purify the fusion protein, and to investigate the cytotoxic effect of the fusion protein on gastric carcinoma cell line SGC-7901. **Methods** Luffin-β gene was cloned by two-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The fusion gene of luffin-β-KDEL-uPAcs was obtained by primer extension, and was inserted into pET-32a(+) vector to construct a recombinant vector pET-32a(+)/luffin-β-KDEL-uPAcs. The fusion protein Trx-EK-luffin-β-KDEL-uPAcs (TELKP) was expressed under induction, purified, and digested by enterokinase (EK) to obtain luffin-β-KDEL-uPAcs (LKP). The LKP protein was purified and its purity was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Cell counting kit-8 (CCK-8), RT-PCR and Western blotting were employed to detect the cytotoxic effect of LKP on gastric carcinoma cell line SGC-7901 after uPA cleavage. **Results** The recombinant vector pET-32a(+)/luffin-β-KDEL-uPAcs could successfully express the fusion protein TELKP (48.8×10^3), and the LKP protein (31.8×10^3) could be obtained by digesting the fusion protein TELKP with EK. The purity of the LKP protein was about 98.8%. The results of CCK-8, RT-PCR and Western blotting revealed that immunotoxin luffin-β, which had cytotoxic effect on tumor cells, could be released from the LKP protein cleaved by uPA *in vitro*. **Conclusion** The fusion gene luffin-β-KDEL-uPAcs and its prokaryotic expression vector are successfully constructed.

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2011AC5188)

[通信作者] 项 颖,E-mail:1324339678@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130121.0927.002.html(2013-01-21)

Recombinant fusion protein LKP (31.8×10^3) is successfully prepared. The immunotoxin luffin-β, which possesses cytotoxic effect on tumor cells, could be released from the LKP protein cleaved by uPA *in vitro*.

[**Key words**] luffin-β; urokinase plasminogen activator; KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu); fusion protein; cytotoxic effect

Supported by the Tackling Project of Sci&Tech Research of Chongqing (CSTC2011AC5188). Corresponding author: Xiang Ying, E-mail: 1324339678@qq.com

肿瘤生物治疗近年来迅猛发展,因其高效低毒、目标明确而成为继手术及放、化疗以来的又一重要治疗策略。生物毒素是肿瘤生物治疗重要内容之一,但因生物毒素对靶细胞的作用不具特异性,限制了其在临床的广泛应用。多年来,有研究者尝试将特异性抗体与生物毒素分子偶联开发第二代免疫毒素,但由于偶联分子的相对分子质量增大,其应用效果亦不太理想,因此,开发具细胞靶向性小分子毒素是未来免疫毒素研究的主要方向之一。

尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator,uPA)是一含 431 氨基酸残基,相对分子质量为(50~60)$\times 10^3$的糖蛋白。几乎所有的肿瘤组织细胞明显高表达 uPA 及其 uPAR,而正常组织细胞两者表达极低。uPA 与肿瘤细胞的生长、浸润及转移等密切相关,因此,它是极具吸引力的肿瘤标志物和重要的肿瘤治疗靶标[1]。

本实验拟构建含尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator,uPA)裂解位点的丝瓜毒素分子(Luffin-β)融合基因表达载体,将该表达载体转入大肠杆菌,诱导其表达目的毒素蛋白,并纯化该毒素蛋白。体外检测该毒素蛋白经 uPA 酶裂解后释放 Luffin-β 毒素小分子的抗胃癌 SGC-7901 细胞的活性。本文在于利用 uPA 的靶向作用,将目的毒素蛋白携带至肿瘤组织局部,经瘤细胞高表达 uPA 的裂解,释放具杀瘤活性的毒素小分子,利于瘤细胞摄取,以发挥其对瘤细胞的杀伤作用,为肿瘤的治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RT-PCR 试剂、克隆载体 pTA2、限制性内切酶、高保真聚合酶、T_4 DNA 连接酶、质粒抽提及 cell counting kit-8(CCK-8)等试剂购自 TOYOBO 公司;蛋白纯化 Ni 柱及填料等购自 GE 公司;表达载体 pET-32a(+)、大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)表达菌、EK 酶等购自上海捷瑞生物工程有限公司;人胃癌 SGC-7901 细胞购自武汉大学细胞库;测序由上海捷瑞公司完成。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pTA2/Luffin-β 的构建和鉴定 自行设计扩增 Luffin-β 基因引物,序列如下:上游:5′-ATGAACAGATTCACATTTCTCTCT-3′;下游:5′-GTGTTTTGTAGGAATACCATCGTCAA-3′。RT-PCR 法,以植物西瓜籽总 RNA 为模板扩增 Luffin-β 基因的全长编码序列,克隆入载体 pTA2,采用酶切与测序鉴定,正确者命名为 pTA2/Luffin-β。

1.2.2 重组 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合免疫毒素载体的构建和鉴定 自行设计构建 Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合基因引物,其中引入 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切位点及 KDEL(Lys-Asp-Glu-Leu)驻留信号序列,构建策略:*Nco* Ⅰ + Luffin-β-KDEL-uPAcs + *Xho* Ⅰ,具体如下:P1:5′-CATgCCATGGCTATGAACAGATTCACATTTCTCTCT-3′,P2:5′-CCgCTCGAGTTATGCTGATCGTCCGCTTAGCTCATCTTTGTGTTTTGTAGGAATACCATCGTC-3′。P1 中 CCATGG 为 *Nco* Ⅰ酶切位点,CT 为人为加入碱基(防止移码突变);P2 中 CTCGAG 为 *Xho* Ⅰ酶切位点,TTA 为终止密码子,TGCTGATCGTCCGCT 编码 uPA 切割位点(SGRSA),TAGCTCATCTTT 编码 KDEL 序列。

以 pTA2/Luffin-β 为模板,PCR 法扩增含 *Nco* Ⅰ、*Xho* Ⅰ酶切位点的 Luffin-β-KDEL-uPAcs 片段(PCR 产物)。用限制性内切酶切割该 PCR 产物和 pET-32a(+)载体,回收含 Luffin-β-KDEL-uPAcs 片段和 pET-32a(+)骨架片段,纯化后连接,经酶切与测序鉴定,正确者命名为 pET32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 融合毒素载体。

1.2.3 融合毒素的诱导表达与纯化 测序正确的 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 重组载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)表达菌。次日挑选 3 个克隆,分别置螺纹管(内盛 5 mL LB 培养基)中培养(37 ℃,220 r/min 振摇)至对数生长期,添加 IPTG(0.4 mmol/L),于 30 ℃诱导,过夜。各管取培养物 1 mL,离心(14 000 r/min)1 min,弃上清,用 100 μL 蒸馏水重悬沉淀,添加 34 μL 4 × Loading buffer,混匀,入沸水浴 3~5 min,SDS-PAGE 检测融合毒素 Trx-EK-Luffin-β-KDEL-uPAcs(TELKP)的诱导表达情况。

表达菌经大量诱导后,4 ℃离心(6 000 r/min)15 min,弃上清,用 10 倍体积的 pH 7.3 的 PBS 重悬菌体,超声破碎(300 W,工作 10 s,间隙 10 s,15 次,重复 3 次)菌体。为防止蛋白降解,破菌时加入 DTT 与 PMSF。显微镜下检测破菌效果。破菌结束后,4 ℃离心(10 000 r/min)15 min,留取上清(以 0.45 μm 微孔滤膜过滤)与沉淀备用。

约 10 mL Ni^{2+} 填料装入金属螯合柱,经 His binding buffer 平衡后,将上清上样,收集穿透液,复平衡,分别用 5%、10% 和 100% 的缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠,0.5 mol/L NaCl,8 mol/L 尿素,0.5 mol/L 咪唑,pH 7.4)洗脱,100% 组分透析于 Tris(pH 9.0)缓冲液。SDS-PAGE 蛋白电泳检测融合毒素 TELKP 的可溶性。

1.2.4 融合毒素的酶切与纯度检测 向融合毒素 TELKP 溶液中加入适量 EK 酶,过夜酶切,留取 1~2 mL 未酶切蛋白作对照,15% SDS-PAGE 电泳检测酶切情况。酶切后的免疫毒素用 Pharmacia HiTrap SP Fast Flow column (26/20)阳离子交换柱洗脱纯化获得的目的蛋白 LKP,再用 SDS-PAGE 电泳检测 LKP

后,行 HPLC 分析,色谱柱:discovery(250 mm×4.6 mm,5 μm),归一法计算 LKP 纯度。

1.2.5 LKP 对胃癌 SGC-7901 细胞生长的影响 将 SGC-7901 细胞接种至 4 个 96 孔板(3 000 个细胞,150 μL/孔),5% CO_2,37 ℃及饱和湿度条件下培养 24 h,加入适量的 LKP 与适量的 uPA 酶,分别以单纯 LKP、单纯 uPA 酶作用的 SGC-7901 细胞及单纯 SGC-7901 细胞作对照,单纯培养基为空白对照,分别于 1、2、3、4 d 取出一 96 孔板,每孔加换新鲜培养液与 CCK-8,相同条件下继续培养 3 h,振荡混匀,酶标仪测定 450 nm 波长处光密度值,以时间为 X 轴,光密度值为 Y 轴绘制增殖曲线。

1.2.6 LKP 对人胃癌 SGC-7901 细胞促凋亡基因 Bax 表达的影响 根据人 Bax 及 β-actin 基因编码序列,分别设计其特异性扩增引物。Bax 上游:5′-ACGGCAACTTCAACTGGGG-3′,下游:5′-GTGGGGGTGAGGAGGCTTG-3′;β-actin 上游:5′-GCGG-GAAATCGTGCGTGAC-3′,下游:5′-AGCATTTGCGGTGGACGA-3′。采用 RT-PCR 法,以 LKP(50 ng/mL)与 uPA 酶(100 ng/mL)共同作用的 SGC-7901 细胞的总 RNA 为模板检测 Bax 基因的表达情况,分别以单纯 LKP(50 ng/mL)、单纯 uPA 酶(100 ng/mL)作用的 SGC-7901 细胞及单纯 SGC-7901 细胞的相同检测作对照,同时扩增的 β-actin 基因作内参。反转录(RT)反应条件:30 ℃ 10 min;42 ℃ 30 min;99 ℃ 5 min;5 ℃ 5 min, 1 个循环。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 45 s, 56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min, 共 28 个循环,72 ℃延伸 10 min。反应结束后,取 PCR 产物(5~10 μL)行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,确认 PCR 产物。

1.2.7 LKP 对人胃癌 SGC-7901 细胞促凋亡蛋白 Bax 表达的影响 采用 Western blot 技术,分别将 1.2.6 的各组细胞总蛋白转移至硝酸纤维膜,浸泡于含 Bax 羊多抗(1∶400)封闭液,4 ℃过夜,加辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗(1∶500),室温孵育 1 h,25 ℃,与化学发光底物结合 5~10 min,保存图片。以未处理的同种细胞的相应检测作对照,β-actin 作内参照。

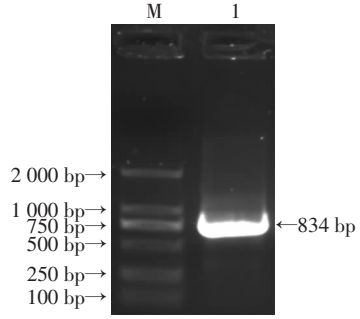
1.3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析,用 Microsoft Excel 作图,确定组间差异,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 Luffin-β 基因的克隆

RT-PCR 法扩增到 834 bp 的 Luffin-β 基因全长编码片段(图 1)。

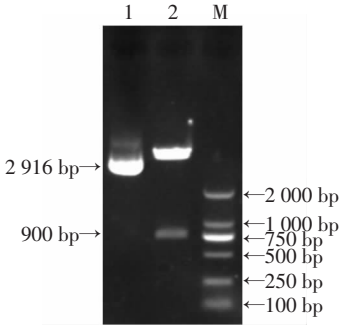


M:DNA 标准(DL 2000);1:Luffin-β

图 1 人 Luffin-β 基因 PCR 产物的电泳结果

2.2 pTA2/Luffin-β 载体的构建与鉴定

重组 pTA2/Luffin-β 经 *Bam*H Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分别显示 2 916 bp 的 pTA2 骨架片段与 900 bp 含 834 bp(Luffin-β)的目的片段(图 2)。测序证实,所克隆到的 Luffin-β 与 GenBank 发布的序列完全一致。

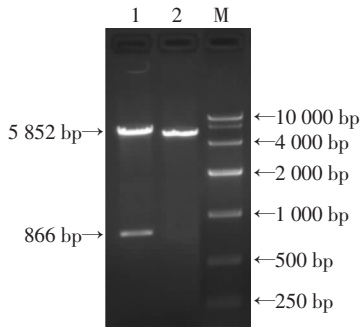


1:pTA2/Luffin-β;2:*Bam*H Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切 pTA2/Luffin-β;M:DNA 标准(DL 2000)

图 2 重组 pTA2/Luffin-β 载体的酶切结果

2.3 重组表达载体 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 的构建与鉴定

表达载体 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 经 *Nco* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳显示 5 852 bp 的 pET-32a 骨架片段与 866 bp 的 Luffin-β-KDEL-uPAcs 目的片段(图 3)。测序证实,携带融合基因 Luffin-β-KDEL-uPAcs 的 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 重组原核表达载体得以成功构建。



1:*Nco* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs;2:pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs;M:DNA 标准(DL 10000)

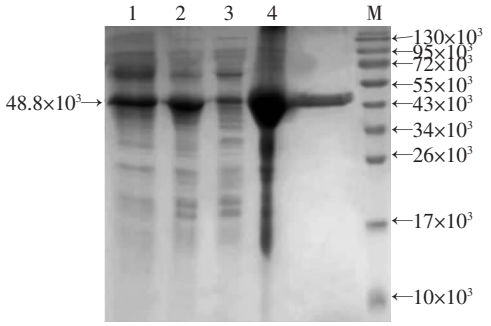
图 3 重组原核表达载体 pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 的酶切结果

2.4 融合免疫毒素 TELKP 的诱导表达与纯化

pET-32a(+)/Luffin-β-KDEL-uPAcs 转化表达菌,IPTG 诱导,表达产物经 SDS-PAGE 检测,在相对分子质量约 48.8×10^3 处有融合免疫毒素带 TELKP 显现,表达量约 52%(图 4)。TELKP 经金属螯合 Ni^{2+} 柱纯化后,用 Elution Buffer 进行洗脱。

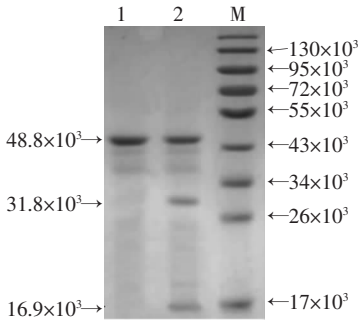
2.5 融合免疫毒素 TELKP 的酶切与纯度检测

融合免疫毒素 TELKP 经 EK 酶过夜酶切,SDS-PAGE 电泳检测显示,切下相对分子质量约 31.8×10^3 的目的蛋白 LKP 与 16.9×10^3 的标签蛋白(图 5)。HPLC 分析,目的蛋白 LKP 纯度达 98.8%。



1:未诱导;2:诱导;3:细菌裂解上清;4:细菌裂解沉淀;M:蛋白标准

图 4　融合免疫毒素 TELKP 的诱导表达与纯化后电泳结果

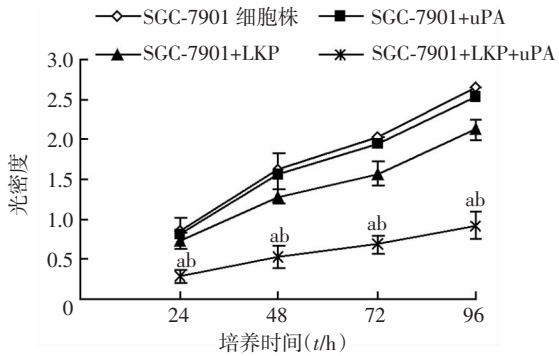


1:TELKP;2:EK 酶切 TELKP;M:蛋白标准

图 5　融合免疫毒素 TELKP 酶切结果

2.6　LKP 毒素对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响

LKP 毒素经 uPA 酶体外裂解释放具杀瘤活性的 Luffin-β 分子,对人胃癌 SGC-7901 细胞生长具明显的杀伤作用,与对照细胞和 uPA 酶处理的细胞比较差异有统计学意义($P<0.01$),LKP 毒素经 uPA 酶裂解后肿瘤杀伤能力显著增强,在处理后培养 2~4 d,与 LKP 毒素单独处理的细胞比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 6)。

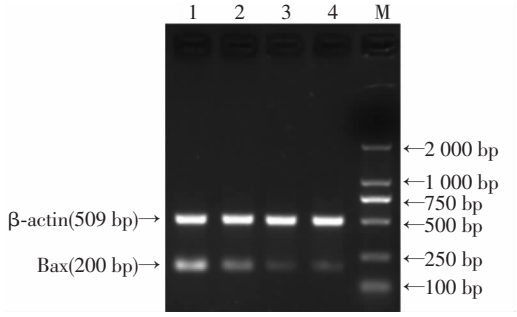


a:$P<0.01$,与 SGC-7901 细胞株和 uPA 酶处理的细胞比较;b:$P<0.05$,与 LKP 毒素单独处理的细胞比较

图 6　融合毒素 LKP 对胃癌 SGC-7901 细胞生长的影响

2.7　LKP 对胃癌 SGC-7901 细胞促凋亡基因 Bax 表达的影响

RT-PCR 检测显示,以 LKP 与 uPA 酶作用的胃癌 SGC-7901 细胞总 RNA 为模板能检测到 Bax 基因的较强表达,以单纯 LKP 作用的胃癌 SGC-7901 细胞总 RNA 为模板能检测到 Bax 基因的较弱表达,单纯 uPA 酶作用的胃癌 SGC-7901 细胞及单纯胃癌 SGC-7901 细胞的总 RNA 为模板所检测到的 Bax 基因的表达最弱(图 7)。提示 LKP 可致胃癌 SGC-7901 细胞凋亡。

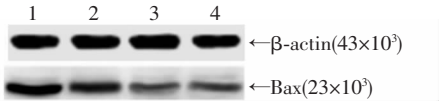


1:LKP 与 uPA 共同作用的 SGC-7901 细胞;2:LKP 作用的 SGC-7901 细胞;3:uPA 作用的 SGC-7901 细胞;4:SGC-7901 细胞;M:DNA 标准(DL 2000)

图 7　融合毒素 LKP 对胃癌 SGC-7901 细胞 Bax 基因 mRNA 表达的影响

2.8　融合免疫毒素 LKP 对胃癌 SGC-7901 细胞促凋亡蛋白 Bax 表达的影响

Western blot 结果显示,融合免疫毒素 LKP 与 uPA 酶作用的 SGC-7901 细胞检测在相对分子质量约 17×10^3 处出现较强 Bax 抗原染色带,单纯融合免疫毒素 LKP 作用的 SGC-7901 细胞在相同位置出现该条带则较弱,单纯 uPA 酶作用的 SGC-7901 细胞及单纯 SGC-7901 细胞在相同位置出现该条带则最弱(图 8),提示融合免疫毒素 LKP 可致 SGC-7901 细胞凋亡。



1:LKP 与 uPA 共同作用的 SGC-7901 细胞;2:LKP 作用的 SGC-7901 细胞;3:uPA 作用的 SGC-7901 细胞;4:SGC-7901 细胞

图 8　融合毒素对 LKP SGC-7901 细胞 Bax 蛋白表达的影响

3　讨论

免疫毒素是由靶向载体与毒素肽连接的具靶向杀伤效应的融合蛋白,这样的特异靶向功能使免疫毒素成为靶向治疗肿瘤的新手段。采用基因工程技术克隆重组,并在大肠杆菌中高效表达的免疫毒素,具免疫原性低、稳定性好、组织渗透性高、较强的肿瘤靶向性与易于细菌中大量制备等优点,使肿瘤的免疫毒素治疗成为可能。既往均利用瘤细胞高表达特定蛋白或相应配体作靶标以设计重组免疫毒素,但该类靶标导向性低,致疗效不佳。因此,如何使重组免疫毒素在肿瘤的生物治疗中发挥更好的靶向与更强的杀伤活性是该领域研究的重要内容之一。

丝瓜毒素(Luffin)是从丝瓜籽中分离到的Ⅰ型核糖体失活蛋白(ribosome inactivating protein, RIP),丝瓜 RIP 有多种类型,主要为 Luffin-α、Luffin-β、Luffin-Ss、Luffin-cylin、Luffin-P1[2-3],其中 Luffin-β 含 278 个

氨基酸，相对分子质量30.583×10³，等电点9.5，能特异水解真核细胞28s rRNA 4324位的腺嘌呤，使真核细胞核糖体60s大亚基失活，显著抑制其蛋白合成，属目前单链RIP中活性最高者之一，是近年备受关注的新型强效免疫毒素弹头小分子[4-6]，具较强抗瘤活性。

uPA是一相对分子质量(50～60)×10³，含431个氨基酸残基的丝氨酸蛋白水解酶。初始分泌出时，其为无活性的单链前体酶(pro-uPA)，当与其膜受体结合后，可使血浆酶活化为具活性的双链酶uPA。该活性的双链酶可反馈性催化与相应受体结合的血浆酶原变成血浆酶，这使得局部组织细胞膜上具活性的uPA增多。正常组织表达极低的uPA与uPAR，而两者明显高表达于几乎所有的肿瘤。uPA与多种肿瘤细胞的生长、浸润及转移等密切关联[7-9]，因此，它是极具吸引力的肿瘤标志物和重要的肿瘤治疗靶标。

目前，对RIP在细胞内如何转运尚不清楚，但对一些细菌来源的毒素分子，如假单胞菌外毒素与白喉毒素的转运较清楚，毒素内吞入胞后，主要通过逆向分泌途径有序的转运，先进入吞噬体，后沿内体、高尔基体、内质网，最后经内质网转位于胞浆发挥胞毒作用[10]。在转运的全过程中，最为关键的是从高尔基体向内质网的转运，此环节转运具多条途径，目前认为最经典的是依赖外壳蛋白Ⅰ(coat protein Ⅰ，COPⅠ)的途径。COPⅠ是一存在于高尔基体膜上的高分子复合蛋白，负责转运含KDEL序列或类似KDEL序列的毒素蛋白，由高尔基体逆向转运至内质网[10-11]。KDEL是一段内质网驻留信号肽序列，即Lys-Asp-Glu-Leu，高尔基体膜上有其相应受体，一旦入高尔基体，则与其受体结合，形成回流水泡被运回内质网(ER)。据此，已有研究者在某些RIP(如蓖麻毒素A链)分子C端末加上KDEL，发现其可增强其细胞毒性。

基于KDEL的生物学特性、Luffin-β的抗肿瘤特性及uPA与肿瘤的密切关系，我们将三者进行有机地结合，在Luffin-β的C端连入KDEL驻留信号序列与uPA裂解位点(uPAcs：SGRSA)序列，使其分子构象发生改变，成为受KDEL肽与uPA裂解位点封闭的暂无活性或低活性的融合小分子，其从N端至C端的顺序为：Luffin-β→KDEL→uPAcs，我们成功构建了Luffin-β→KDEL→uPAcs融合基因，并将其亚克隆至pET-32a(+)原核表达载体中，经诱导，其表达相对分子质量约48.8×10³含载体标签(Trx)的融合毒素TELKP，EK酶切掉其标签蛋白获相对分子质量约31.8×10³的目的蛋白LKP，HPLC检测知，融合毒素LKP的纯度达98.8%。CCK-8、RT-PCR、Western blot等检测表明，uPA酶可体外裂解LKP释放具抑瘤活性的Luffin-β分子毒素，以抑制胃癌细胞生长、增殖，并诱导其凋亡，这为让带uPA裂解位点的无活性或低活性的Luffin-β在高表达uPA的在体肿瘤组织，其活性被释放而发挥局部杀伤肿瘤作用奠定了基础，为肿瘤的治疗提供了新的手段。进一步的研究将探讨融合毒素LKP的体内靶向抗瘤活性。

参考文献：

[1] 梁宇佳，缪殿南，闫国和，等. 含uPA裂解位点的人sTrail融合基因的构建及其原核蛋白表达与纯化[J]. 第三军医大学学报，2011，33(8)：789－792.

[2] Poma A, Marcozzi G, Cesare P, *et al*. Antiproliferative effect and apoptotic response *in vitro* of human melanoma cells to liposomes containing the ribosome-inactivating protein luffin[J]. Biochim Biophys Acta,1999,1472(1/2)：197－205.

[3] Poma A, Miranda M, Spano L. Differential response of human melanoma and Ehrlich ascites cells *in vitro* to the ribosome-inactivating protein luffin[J]. Melanoma Res, 1998, 8(5)：465－467.

[4] Ma C, Li Y, Li Z, *et al*. Synthesis and purification of a toxin-linked conjugate targeting epidermal growth factor receptor in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2012, 83(1)：1－7.

[5] Liu L, Wang R, He W, *et al*. Cloning and soluble expression of mature alpha-luffin from Luffa cylindrica and its antitumor activities *in vitro*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2010, 42(8)：585－592.

[6] Ma Q J, Li J H, Li H G, *et al*. Crystal structure of beta-luffin, a ribosome-inactivating protein, at 2.0 A resolution[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003, 59(Pt 8)：1366－1370.

[7] Dorn J, Harbeck N, Kates R, *et al*. Impact of expression differences of kallikrein-related peptidases and of uPA and PAI-1 between primary tumor and omentum metastasis in advanced ovarian cancer[J]. Ann Oncol, 2011, 22(4)：877－883.

[8] Markl B, Renk I, Oruzio D V, *et al*. Tumour budding, uPA and PAI-1 are associated with aggressive behaviour in colon cancer[J]. J Surg Oncol, 2010, 102(3)：235－241.

[9] Fong Y, Shen K H, Chiang T A, *et al*. Acacetin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions of human lung cancer cells through inactivating JNK signaling pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1[J]. J Food Sci, 2010, 75(1)：H30－H38.

[10] Chen A, Hu T, Mikoryak C, *et al*. Retrograde transport of protein toxins under conditions of COP Ⅰ dysfunction[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1589(2)：124－139.

[11] Llorente A, Lauvrak S U, van-Deurs B, *et al*. Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdlF) with a temperature-sensitive defect in epsilon-coatomer protein (epsilon-COP) [J]. J Biol Chem, 2003, 278(37)：35850－35855.

(**收稿**：2012-12-06；**修回**：2012-12-31)

(编辑　王　红)