

抗 HER2-hTNF- α 新型免疫毒素的 制备及功能研究

蒋琳^{1,2)} 冯静³⁾ 吴文芳^{1)*} 杨东玲³⁾ 阎锡蕴^{3)*}

¹⁾中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110015; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039;

³⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 HER2/neu 基因在肿瘤中的过度表达使其成为许多肿瘤的标志分子. 为了增加过度表达 HER2/neu 的肿瘤细胞对肿瘤坏死因子 (TNF) 的敏感性和提高 HER2/neu 抗体的肿瘤杀伤效应, 将抗 HER2/neu 单链抗体 C6.5 与人肿瘤坏死因子 hTNF- α 融合, 构建了 scFvC6.5-hTNF- α 融合蛋白, 完成了重组蛋白在大肠杆菌中的表达, 产率为 400 μ g/L 菌液. 经过亲和层析和柱复性, 融合蛋白的纯度达 95% 以上. ELISA 试验表明, scFvC6.5-hTNF- α 能够特异结合 HER2/neu 阳性卵巢癌细胞 SKOV-3 和乳腺癌细胞 MCF-7, 而不结合 HER2/neu 阴性的黑色素瘤细胞 A375. MTT 试验表明, scFvC6.5-hTNF- α 能够选择性地杀伤 SKOV-3 和 MCF-7 细胞, 而不影响 A375 细胞的生长. 这种肿瘤细胞特异性杀伤作用提示该免疫毒素具有肿瘤靶向治疗的潜在应用价值.

关键词 抗 HER2/neu 单链抗体, 人肿瘤坏死因子, 免疫毒素

学科分类号 Q819

Her2/neu 是具有酪氨酸蛋白激酶活性的癌基因, 编码一种分子质量 185 ku 的单链跨膜糖蛋白激酶, 称之为 p185 或 HER2/neu. 这种蛋白质与表皮生长因子受体高度同源, 属于表皮生长因子家族成员之一^[1]. HER2/neu 过度表达在人类多种肿瘤组织中, 如胃癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌等^[2-6], 已经成为这些肿瘤的靶分子. 抗 HER2/neu 人源化单克隆抗体药物 Herceptin 已经通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准进入临床应用^[7]. 许多研究表明 Herceptin 与放疗或化疗药物联合使用, 能够显著增加肿瘤细胞对放疗和化疗药物的敏感性^[8].

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是迄今发现的抗肿瘤作用最强的细胞因子, 它通过与细胞表面 TNF- α 受体结合, 诱导肿瘤细胞凋亡^[9]. 但体内外及临床试验发现, 大多数表达 HER2/neu 的癌细胞对于 TNF- α 引导的肿瘤细胞杀伤效应不敏感, 相关的作用机理研究已有许多报道^[10-12]. 尽管目前尚没有统一的定论, 但已经探索了一些用来增强 HER2/neu 阳性细胞对 TNF- α 敏感性的方法, 如将 TNF- α 与化疗药物^[13]、蛋白质合成抑制剂^[14]、IFN- γ ^[15]、抗 HER2/neu 抗体^[16]等联合使用或构建成免疫毒素^[17]都能不同程度提高 TNF- α 的治疗效果. 尤其是 TNF- α 相关的免疫毒素得到了较大的发展, 研究发现, 所构建的单链抗

体——TNF- α 免疫毒素对肿瘤具有明显的抑制作用^[18,19]. 为了研究抗 HER2-TNF- α 免疫毒素对不同程度表达 HER2/neu 的癌细胞的生物效应, 我们构建了一个由人源化抗 HER2/neu 单链抗体 (scFvC6.5) 和人肿瘤坏死因子 (human tumor necrosis factor- α , hTNF- α) 组成的新型免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α , 并鉴定了其免疫特异性和生物活性. 结果显示, 重组免疫毒素能够特异识别和杀伤 HER2/neu⁺ 阳性卵巢癌细胞 SKOV-3 和乳腺癌细胞 MCF-7, 对 HER2/neu⁻ 阴性黑色素瘤细胞 A375 没有影响. 提示它在抗 HER2/neu 过度表达的肿瘤靶向治疗中具有潜在的应用价值.

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种及试剂

抗 HER2/neu scFvC6.5 cDNA^[20] 为美国 Weiner 博士 (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) 所赠; hTNF- α cDNA 为军事医学科学院生物工程研究所周晓巍教授所赠; 表达载体 pET28a 和大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 为中国科学院生物物理研究

*通讯联系人.

吴文芳, Tel: 024-83970383, E-mail: w2fl@sina.com

阎锡蕴, Tel: 010-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2005-04-07, 接受日期: 2005-05-27

所阎锡蕴实验室保存; 限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司; TaqDNA Polymerase、dNTP 及 T4 DNA 连接酶均购自 Novagen 公司; PCR 产物回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; Chelating Sepharose Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞、抗体及免疫学试剂

黑色素瘤细胞 A375、乳腺癌细胞 MCF-7 及卵巢癌细胞 SKOV-3 为中国科学院生物物理研究所阎锡蕴实验室保存; 鼠抗人 TNF- α 抗体为军事医学科学院沈倍奋研究员所赠; 抗 6 \times His-Tag 抗体购自 Novagen 公司; HRP 标记的羊抗鼠抗体及其发光底物购自 Pierce 公司; 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠抗体购自北京中山生物技术有限公司; 碱性磷酸酶底物氮蓝四唑 /5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶 - 磷酸 (NBT/BCIP) 购自 Fluka 公司。

1.3 构建融合蛋白 scFvC6.5-hTNF- α 基因

为了获得 scFvC6.5-hTNF- α 融合基因, 我们设计并合成了 2 对引物: a. scFvC6.5 引物 1, 5' gggtttcatatgcaggtgcagctggtgc 3', 含 *Nde* I 酶切位点和引物 2, 5' atttgcggccgcacctaggacggctcagc 3' 含 *Not* I 酶切位点; b. hTNF- α 的引物 1, 5' atttgcggccgcaggtggaggcggatccgtcaggtcatcttcac 3' 含 *Not* I 酶切位点及 Gly₄Ser 连接肽基因(斜体字)和 hTNF- α 的引物 2, 5' aattctcagcagggcaataatcccaaag 3' 含 *Xho* I 酶切位点。

用上述引物分别 PCR 扩增 scFvC6.5 和 hTNF- α 基因, 条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s (scFvC6.5) 或 62 $^{\circ}$ C 退火 30 s (hTNF- α), 72 $^{\circ}$ C 延伸 4 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 扩增产物经琼脂糖电泳回收后, 用 *Nde* I 和 *Not* I 酶切 scFvC6.5 基因, 用 *Not* I 和 *Xho* I 酶切 hTNF- α 基因. 将 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切后的载体 pET28a 与 scFvC6.5 和 hTNF- α 酶切片段按照 1:3:3 的比例混合后, 加入 T4DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 过夜进行连接反应, 随后转化大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3). 卡那霉素平板筛选, 挑取阳性克隆, 接种于 5 ml LB (50 mg/L 卡那霉素) 培养基, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养过夜, 小量提取质粒, 进行酶切验证。

为了功能对照试验, 我们同时构建了 pET28a-scFvC6.5 和 pET28a-hTNF- α 表达载体及其工程菌。

1.4 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 的表达和纯化

将上述 3 种重组菌扩大培养于 500 ml LB 培养液(50 mg/L 卡那霉素)中, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 培养至 $A_{600} = 0.5$. 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导表达 4 h. 4 000 g 离心 20 min 收集菌体. PBS 洗涤菌体 1 次. 菌体经 50 ml 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3 重悬后, 超声破碎. 12 000 g 离心 30 min, 得到上清和沉淀. 对上清和沉淀分别进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及蛋白质印迹(Western blot) 鉴定, 发现目的蛋白主要以包涵体形式存在. 依次用 2.5 mol/L NaCl、0.05% Triton X-100 及 2 mol/L 尿素洗涤 scFvC6.5、hTNF- α 及 scFvC6.5-hTNF- α 的包涵体后, 10 000 r/min 离心 30 min, 洗涤后的包涵体按 2 g/L 溶解在变性液 (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3) 中, 4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜, 0.45 μ m 微膜过滤, 准备上样。

用金属螯合柱层析 (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC) 梯度复性法进行蛋白质的纯化及复性^[21]: 取 5 ml Chelating Sepharose 置于 20 ml 离心管中, 使用 0.1 mol/L NiSO₄ 将其饱和, 之后用变性液平衡. 加入 10 ml 溶解的包涵体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜. 将吸附了蛋白质的 Sepharose Fast Flow gel 装柱, 用变性液将基线洗平, 然后用 50 ml 的线性梯度, 逐步由含 8 mol/L 尿素的变性液过渡到复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3) 中. 之后用洗脱液 (0.5 mol/L 咪唑, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.3) 将复性后的蛋白质洗出柱子. 洗脱样品在透析液 (含 10% 甘油的 PBS 溶液) 中透析过夜. 保留各洗脱产物, 分取 10 μ l, 进行蛋白质印迹检测, 以鉴定蛋白质纯化情况, 其中一抗为抗 6 \times His-Tag 抗体, 二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体, 底物为 Supersignal 发光底物。

1.5 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测

将纯化蛋白分别进行 12% SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色. 另将电泳后的蛋白质转至硝酸纤维素膜, 用两套系统进行免疫印迹: a. 以鼠抗 6 \times His-Tag 抗体为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗, 底物为 Supersignal 发光底物, X 胶片曝光显示结果; b. 以鼠抗 hTNF- α 抗体为一抗, 以 AP 标记的羊抗鼠抗体为二抗, 底物为 NBT/BCIP。

1.6 ELISA 结合试验

ELISA 检测免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 、hTNF- α (对照) 和 scFvC6.5 (对照) 与细胞结合的特异性. 将 SKOV-3、MCF-7 和 A375 细胞分别培养

至对数期, 以每孔 5×10^4 接种于 96 孔细胞培养板中, 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养 12 h. 弃上清, 4°C 使用丙酮固定 15 min. $5\% \text{BSA/PBS}$ 溶液 $100 \mu\text{l}$ 37°C 封闭 2 h 后, 分别加入不同浓度纯化后的 scFvC6.5-hTNF- α $50 \mu\text{l}$ /孔, 37°C 孵育 2 h. PBS 洗 3 次, 加入鼠抗 $6 \times \text{His} \cdot \text{Tag}$ 抗体 $50 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 2 h. PBS 洗 3 次, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠抗体 $50 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 1 h. PBS 洗 3 次, 加入邻苯二胺(OPD) 底物 5 min, 加 $12.5\% \text{硫酸}$ $50 \mu\text{l}$ /孔中止反应. 置酶标仪测 492 nm 吸光度值. 加入 PBS 的一组为阴性对照. 每个样品设 3 个平行孔, 结果取 3 次重复试验的平均值.

1.7 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 的细胞毒性测定

MTT 法检测免疫毒素 hTNF- α (对照)、scFvC6.5(对照)和 scFvC6.5-hTNF- α 以及联合应用 scFvC6.5 和 hTNF- α (对照) 的细胞毒性作用. 在 96 孔细胞培养板中将 SKOV-3、MCF-7 和 A375 细胞培养至对数生长期, 分别加入不同浓度的待测样品 $50 \mu\text{l}$ /孔, 培养不同时间. 分别加入 MTT 至终浓度为 1 g/L , 孵育 2 h. 吸净培养液, 加入 $50 \mu\text{l}$

DMSO. 振荡 5 min, 置于酶标仪中测定 A_{570} 值. 加入含 $10\% \text{甘油}$ 的 PBS 的一组为阴性对照. 每组设 3 个平行, 结果取 3 次独立试验的平均值. 细胞死亡率%按下式计算:

$$\text{细胞死亡率}\% = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{试验组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2 结 果

2.1 构建免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α

为了使免疫毒素中的两个功能单位能够保持其天然构象和生物活性, 我们在 scFvC6.5 和 hTNF- α 之间设计了一段 Gly_4Ser 连接肽, 以保证融合蛋白的空间结构具有一定的柔韧性(图 1a). 将融合蛋白基因 scFvC6.5-hTNF- α , 2 个对照 scFvC6.5 和 hTNF- α 基因分别克隆到表达载体 pET28a, 获得 3 个重组质粒. 酶切后电泳分析重组质粒, 结果如图 1b 所示, pET28a 载体分别含 scFvC6.5-hTNF- α ($1\ 272 \text{ bp}$), scFvC6.5(780 bp)和 hTNF- α (471 bp)基因, 与其设计的基因片段大小相符. DNA 序列测定结果显示, scFvC6.5-Gly $_4$ Ser-hTNF- α 的 DNA 序列及读码框完全正确.

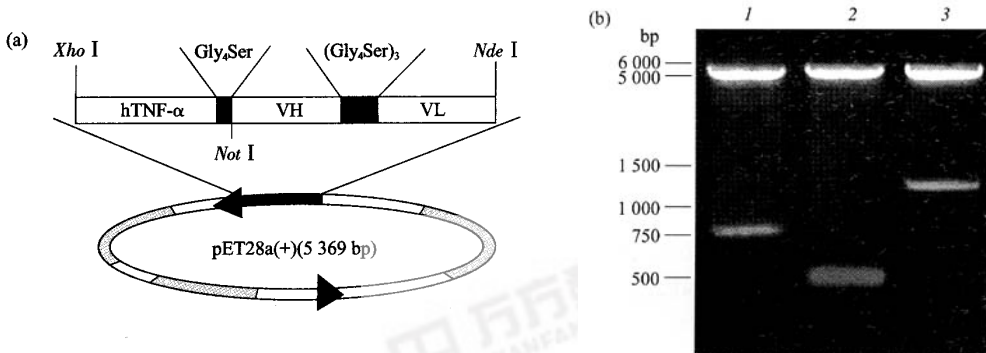


Fig.1 The construction of fusion gene

(a) Schematic of the pET28a-scFvC6.5-TNF- α vector. (b) The restriction maps of three recombinant vectors analysed by electrophoresis. 1: pET28a-scFvC6.5 digested by *Nde* I /*Not* I; 2: pET28a-h TNF- α digested by *Not* I /*Xho* I; 3: pET28a-scFvC6.5-hTNF- α digested by *Nde* I /*Xho* I.

2.2 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 表达、纯化及鉴定

转化后的 3 个工程菌株经 IPTG 诱导后, 分别表达 scFvC6.5、hTNF- α 及 scFvC6.5-hTNF- α 融合蛋白. 表达量分别是 scFvC6.5-hTNF- α 为 $400 \mu\text{g/L}$, scFvC6.5 和 hTNF- α 为 $800 \mu\text{g/L}$. 由于重组蛋白主要以包涵体的形式存在, 我们在分离和变性包涵体之后, 采用金属镍螯合亲和层析梯度复性法, 将重组蛋白的复性和纯化一步完成. 纯化后的 scFvC6.5、hTNF- α 及 scFvC6.5-hTNF- α 经过

SDS-PAGE 分离和 BIO-RAD 凝胶成像仪软件分析, 蛋白质纯度达到 95% 以上. 分子质量分别约为 hTNF- α 17 ku 、scFvC6.5 26 ku 和 scFvC6.5-hTNF- α 43 ku (图 2a). 免疫印迹实验结果表明, 这 3 种重组蛋白均能够被抗 His-Tag 抗体识别(图 2b), 其中 hTNF- α 及 scFvC6.5-hTNF- α 能够被抗 hTNF- α 抗体识别, 而 scFvC6.5 蛋白不与抗 hTNF- α 抗体结合(图 2c), 说明 3 种重组蛋白都获得了正确表达.



Fig.2 SDS-PAGE and Western-blot analysis of three recombinant proteins

(a) SDS-PAGE shows the purity of hTNF-α (lane 1), scFvC6.5 (lane 2), and scFvC6.5-hTNF-α (lane 3). Lane 4 indicates protein standard marker. (b) The purified proteins with His-tag are stained by anti-His antibody. (c) The purified fusion proteins stained by anti-hTNF-α antibody.

2.3 免疫毒素特异性鉴定

为了鉴定免疫毒素 scFvC6.5-hTNF-α 的肿瘤细胞靶向特异性, 我们选择 3 种不同程度表达 HER2/neu 的细胞株, 即黑色素瘤 A375 细胞不表达 HER2/neu, 乳腺癌 MCF-7 细胞中度表达及卵巢癌 SKOV-3 细胞高表达 HER2/neu. ELISA 实验表明, 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF-α 结合卵巢癌 SKOV-3 细胞的活性最高, 而且随着剂量的增高而加强, 结合乳腺癌 MCF-7 细胞的能力较弱, 几乎

不结合黑色素瘤 A375 细胞(图 3a). 这说明融合蛋白 scFvC6.5-hTNF-α 保持了原有 scFvC6.5 的免疫特性, 能够区分 HER2/neu 阳性和阴性细胞.

进一步比较了免疫毒素 scFvC6.5-hTNF-α 与 hTNF-α 或 scFvC6.5 对靶细胞 SKOV-3 的结合活性. 结果如图 3b 所示, 融合蛋白 scFvC6.5-hTNF-α 结合活性明显高于 scFvC6.5 和 hTNF-α 蛋白, 这可能是由于融合蛋白中的抗体结合 SKOV-3 细胞表面的 HER2/neu, 而 TNF-α 与其受体结合所致.

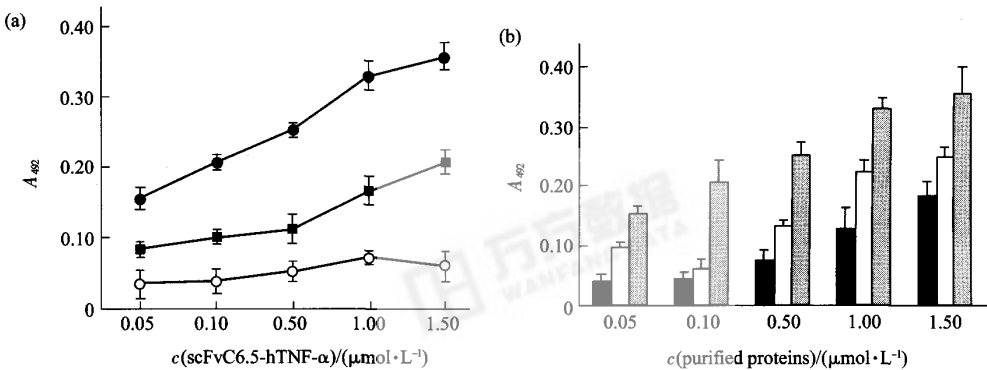


Fig.3 ELISA showing the specificity of the three recombinant proteins

(a) Binding activity of scFvC6.5-hTNF-α to SKOV-3, MCF-7 and A375 cell lines. ●—●: SKOV-3, ■—■: MCF-7, ○—○: A375. (b) Binding activity of scFvC6.5-hTNF-α, hTNF-α, and scFvC6.5 to SKOV-3 cell lines. ■—■: hTNF-α, □—□: scFvC6.5; ▨—▨: scFvC6.5-hTNF-α.

2.4 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF-α 的生物活性

为了鉴定免疫毒素 scFvC6.5-hTNF-α 的细胞效应和生物活性, 我们采用 MTT 法分别观察了 scFvC6.5-hTNF-α 在不同浓度和不同时间对 SKOV-3、MCF-7 和 A375 细胞生长的影响. 如图 4 所示, scFvC6.5-hTNF-α 对 HER2/neu 高表达细胞

SKOV-3 的生长具有显著的抑制作用, 并且为剂量依赖性. 在一定浓度下, scFvC6.5-hTNF-α 对 HER2/neu 中度表达的 MCF-7 细胞也存在明显的细胞毒效应, 而对 HER2/neu 表达阴性的细胞 A375 不敏感(图 4a). 当我们选择 1 μmol/L scFvC6.5-hTNF-α 作为固定剂量, 观察其在不同时间

间 (2~24 h)对细胞生长的影响时,发现 scFvC6.5-hTNF- α 对细胞生长的抑制作用自孵育后第 12 天开始加速,在第 24 h 时,SKOV-3 细胞死亡率接近 100%,MCF-7 细胞死亡率约 80%,而 HER2 表达阴性的细胞 A375 没有随着时间的延长产生明显的细胞毒现象(图 4b),说明 scFvC6.5-hTNF- α 对靶细胞的杀伤作用呈现时间依赖性。

另外,我们比较了融合毒素与单独应用 scFvC6.5 或 hTNF- α ,以及联合应用 scFvC6.5 和 hTNF- α ,对 HER/neu 不同表达水平的卵巢癌细胞

SKOV-3、乳腺癌细胞 MCF-7、恶性黑色素瘤细胞 A375 生长的影响,发现单独使用不同剂量 (0.01、0.1、1、2 $\mu\text{mol/L}$) 的抗体 scFvC6.5,对这 3 种细胞均不具有细胞杀伤作用,但可以抑制 HER/neu 表达的 SKOV-3 和 MCF-7 细胞的生长.单独使用 hTNF- α 与联合应用 scFvC6.5 和 hTNF- α 对 SKOV-3、MCF-7 和 A375 细胞都有抑制作用,但是两组的抑制率没有明显差异,细胞杀伤效应都明显低于融合毒素的作用(图 4c)。

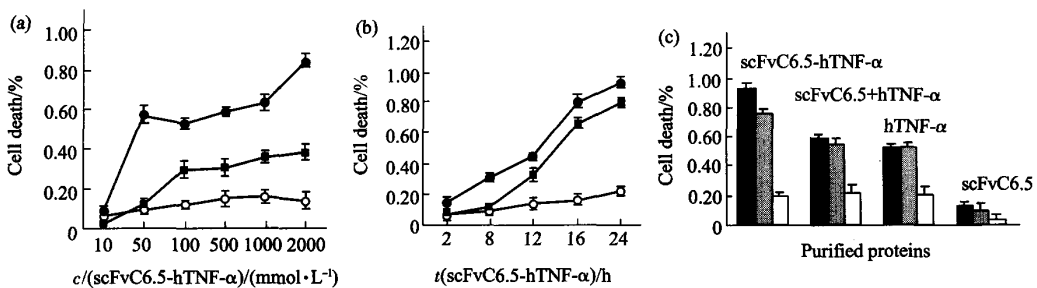


Fig.4 MTT assay showing the cytotoxicity of the recombinant proteins

(a) The scFvC6.5-hTNF- α effects the cell proliferation of SKOV-3, MCF-7 and A375 in a dose-dependent manner (14h). (b) The scFvC6.5-hTNF- α (1 $\mu\text{mol/L}$) effects the three cell proliferation in a time-dependent manner. ●—●: SKOV-3, ■—■: MCF-7, ○—○: A375. (c) The cytotoxicity of hTNF- α , scFvC6.5, scFvC6.5+hTNF- α (combined treatment with hTNF- α and scFvC6.5), scFvC6.5-hTNF- α on SKOV-3, MCF-7, and A375 cell lines. The three cell lines were incubated with 1.5 $\mu\text{mol/L}$ hTNF- α , scFvC6.5, scFvC6.5+hTNF- α (1:1), scFvC6.5-hTNF- α for 16 h respectively. ■—■: SKOV-3, ▨—▨: MCF-7, □—□: A375.

3 讨 论

虽然有些抗体本身具备识别和杀伤肿瘤细胞的双重功能,但是大多数抗体只具有识别功能而缺乏杀伤效应.为了增强抗体杀伤肿瘤细胞的效应,人们将抗体的识别功能与毒素的杀伤效应结合起来,发展出各种免疫毒素.最早用于免疫毒素的弹头多是细菌毒素(如绿脓外毒素^[22])和植物毒素(如蓖麻蛋白毒素^[23])等.尽管它们在体内外实验中都显示出不同的抗肿瘤效应,但是由于毒素蛋白均为外源性物质,在临床使用时容易引起机体的免疫排斥反应,另外,用化学偶联方法制备的免疫毒素还存在对实体瘤穿透力不足等问题^[24].为了克服这些缺陷,近年来主要是利用基因工程方法将抗体与人自身的细胞因子融合制备重组免疫毒素。

HER2/neu 是促使细胞发生恶性转化的癌基因,它在癌变细胞增殖及转移上起着关键作用^[25].有实验表明,HER2/neu 过度表达的癌细胞对 TNF- α 、

激素、化疗等药物的治疗不敏感,使肿瘤细胞逃逸宿主防御机制而促进肿瘤发生^[26].关于 HER2/neu 过度表达的肿瘤细胞对 TNF- α 耐药机制的解释有多种^[10-12],目前还没有定论.我们采用 TNF- α 作为效应因子,制备了靶向 HER2/neu 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α ,旨在提高 HER2/neu 过度表达的癌细胞对 TNF- α 的敏感性,增强 TNF- α 特异性和抗 HER2/neu 抗体的细胞杀伤效应.为了分析免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 的免疫特性和生物活性,我们同时制备了 scFvC6.5 和 hTNF- α 蛋白作为对照,选择 3 种不同程度表达 HER2/neu 的细胞作为观察对象.免疫特性鉴定结果表明,融合蛋白 scFvC6.5-hTNF- α 与靶细胞的结合活性随着细胞表面 HER/neu 表达量的增高而加强.它与过度表达 HER2/neu 的 SKOV-3 细胞的结合活性明显高于 HER2/neu 中度表达的 MCF-7 细胞,而不结合 HER2/neu 阴性细胞 A375.另外,我们还发现,scFvC6.5-hTNF- α 、scFvC6.5 和 hTNF- α 3 种重组

蛋白都识别 SKOV-3 细胞, 其中融合蛋白 scFvC6.5-hTNF- α 的结合活性明显高于 scFvC6.5 和 hTNF- α . 这可能是因为在 SKOV-3 细胞表面除了高表达 HER2/neu 之外, 还存在 TNF- α 受体^[15,27], 融合蛋白不仅结合 SKOV-3 细胞表面的 HER2/neu, 而且结合 TNF- α 受体. 说明融合蛋白不仅能够靶向 HER2/neu 过度表达的癌细胞, 而且可以增加 TNF- α 与其受体的结合.

我们进一步观察到单链抗体 scFvC6.5 本身对细胞没有杀伤效应, 免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 对细胞的杀伤效应明显高于单独使用 hTNF- α 的效应, 也高于联合应用 scFvC6.5 和 hTNF- α 对细胞的杀伤作用. 这说明免疫毒素增加了 HER2/neu 阳性肿瘤细胞对 hTNF- α 的敏感性. 另外, 发现免疫毒素 scFvC6.5-hTNF- α 对 SKOV-3 和 MCF-7 细胞具有显著杀伤效应, 对于 A375 细胞没有作用, 呈现出 HER2/neu 表达水平依赖的杀伤特异性. 而且我们观察到 scFvC6.5-hTNF- α 对过度表达 HER2/neu 的 SKOV-3 的杀伤效应大于其对低度表达 HER2/neu 的 MCF-7 细胞的效应. 这一现象不同于 Michael 等的报道, 抗 HER2/neu sFv23 与 hTNF- α 组成的免疫毒素对中度表达 HER2/neu 的乳腺癌细胞 SKBR-3(HP)的杀伤效应明显高于极度表达 HER2/neu 的乳腺癌细胞 SKBR-3(LP). 这有可能是因为不同实验室所用的抗体、细胞系和实验条件不同的原因.

有观点认为 HER2/neu 的过度表达影响了 TNF- α 与细胞表面 TNF- α 受体的结合^[10]; 另有观点认为 HER2/neu 的过度表达影响了凋亡信号的传导^[11,12]. 而抗 HER2-hTNF- α 免疫毒素对 TNF- α 耐药细胞的增敏作用可能是通过调低了 HER2/neu 的表达水平所致, 也可能是细胞表面结合 TNF- α 的浓度增高所致. 因此在已有工作的基础上, 我们有待进一步扩展 scFvC6.5-hTNF- α 对不同表达 HER2/neu 细胞的功能试验, 完善其细胞凋亡机理试验及动物体内试验.

参考文献

- 1 Yamamoto T, Akiyama T, Yokota J, *et al.* Expression of the c-ErbB-2 gene encoding a growth factor receptor. Princess Takamatsu Symp, 1986, 17: 203~210
- 2 Camilleri-Broet S, Hardy-Bessard A C, Le Tourneau A, *et al.* HER2 overexpression is an independent marker of poor prognosis of advanced primary ovarian carcinoma: a multicenter study of the gineco group. Ann Oncol, 2004, 15 (1): 104~112
- 3 Goebel S U, Iwamoto M, Raffeld M, *et al.* HER2/neu expression and gene amplification in gastrinomas: correlations with tumor biology, growth, and aggressiveness. Cancer Res, 2002, 62(13): 3702~3710
- 4 Essapen S, Thomas H, Green M, *et al.* The expression and prognostic significance of HER2 in colorectal cancer and its relationship with clinicopathological parameters. Int J Oncol, 2004, 24 (2): 241~248
- 5 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. Clin Cancer Res, 2004, 10 (1 Pt 1): 136~143
- 6 Kim Y S, Konoplev S N, Montemurro F, *et al.* HER2/neu overexpression as a poor prognostic factor for patients with metastatic breast cancer undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. Clin Cancer Res, 2001, 7 (12): 4008~4012
- 7 Miles D W. Update on HER2 as a target for cancer therapy: Herceptin in the clinical setting. Breast Cancer Res, 2001, 3 (6): 380~384
- 8 Moliterni A, Menard S, Valagussa P, *et al.* HER2 overexpression and doxorubicin in adjuvant chemotherapy for resectable breast cancer. J Clin Oncol, 2003, 21 (3): 458~462
- 9 Idriss H T, Naismith J H. TNF- α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(S). Microsc Res Tech, 2000, 50 (3): 184~195
- 10 Hudziak R M, Lewist G D, Shalaby M R, *et al.* Amplified expression of the HER2/ErbB2 oncogene induces resistance to tumor necrosis factor in NIH 3T3 cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85 (14): 5102~5106
- 11 Mutch D G, Powell C B, Kao M S, *et al.* Resistance to cytolysis by tumor necrosis factor alpha in malignant gynecological cell lines is associated with the expression of protein (s) that prevent the activation of phospholipase A2 by tumor necrosis factor alpha. Cancer Res, 1992, 52 (4): 866~872
- 12 Rintala-Maki N D, Abrasonis V, Burd M, *et al.* Genetic instability of RBM5/LUCA -15/H37 in MCF-7 breast carcinoma sublines may affect susceptibility to apoptosis. Cell Biochem Funct, 2004, 22 (5): 307~313
- 13 Bonavida B, Tsuchitani T, Zigelboim J, *et al.* Synergy is documented *in vitro* with low-dose recombinant tumor necrosis factor, cisplatin, and doxorubicin in ovarian cancer cells. Gynecol Oncol, 1990, 38 (3): 333~339
- 14 Massad L S, Mutch D G, Kao M S, *et al.* Inhibition of protein synthesis enhances the lytic effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in cell lines derived from gynecological malignancies. Cancer Immunol Immunother, 1991, 33 (3): 183~188
- 15 Kost E R, Mutch D G, Herzog T J. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha induce synergistic cytolytic effects in ovarian cancer cell lines-roles of the TR60 and TR80 tumor necrosis factor receptors. Gynecol Oncol, 1999, 72 (3): 392~401
- 16 Hudziak R M, Lewis G D, Winget M, *et al.* P185HER2 monoclonal

- antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol*, 1989, **9** (3): 1165~1172
- 17 Rosenblum M G, Horn S A, Cheung L H. A novel recombinant fusion toxin targeting HER2/neu-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int J Cancer*, 2000, **88**: 267~273
- 18 Cooke S P, Pedley R B, Boden R, *et al.* *In vivo* tumor delivery of a recombinant single chain Fv::tumor necrosis factor- α fusion correction of factor: a fusion protein. *Bioconjug Chem*, 2002, **13** (1): 7~15
- 19 Bauer S, Adrian N, Williamson B, *et al.* Targeted bioactivity of membrane-anchored TNF by an antibody-derived TNF fusion protein. *J Immunol*, 2004, **172** (6): 3930~3939
- 20 Schier R, Marks J D, Wolf E J, *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of a human anti-c-ErbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. *Immunotechnology*, 1995, **1** (1): 73~81
- 21 张志强, 林芸, 阎锡蕴. 抗肿瘤血管抗体 AA98 功能片段 V_{HK} 的腺浓度梯度柱复性. *生物化学与生物物理进展*, 2002, **29** (4): 645~650
Zhang Z Q, Lin Y, Yan X Y. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (4): 645~650
- 22 Jong M C, Scheffer G L, Broxterman H J, *et al.* Multidrug-resistant tumor cells remain sensitive to a recombinant interleukin-4-pseudomonas exotoxin, except when overexpressing the multidrug resistance protein MRP1. *Clin Cancer Res*, 2003, **9** (13): 5009~5017
- 23 Frankel A E, Burbage C, Fu T, *et al.* Characterization of a ricin fusion toxin targeted to the interleukin-2 receptor. *Protein Eng*, 1996, **9** (10): 913~919
- 24 Pennell C A, Erickson H A. Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunol Res*, 2002, **25** (2): 177~191
- 25 Olayioye M A, Neve R M, Lane H A, *et al.* The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*, 2000, **19** (13): 3159~3167
- 26 Lichtenstein A, Berenson J, Gera J F, *et al.* Resistance of human ovarian cancer cells to tumor necrosis factor and lymphokine-activated killer cells: correlation with expression of HER2/neu oncogenes. *Cancer Res*, 1990, **50** (22): 7364~7370
- 27 Kost E R, Herzog T J, Adler L M, *et al.* The role of tumor necrosis factor receptors in tumor necrosis factor- α -mediated cytolysis of ovarian cancer cell lines. *Am J Obstet Gynecol*, 1996, **174** (1 Pt 1): 145~153

Construction and Functional Study of a Novel Anti HER2/neu-hTNF- α Immunotoxin

JIANG Lin^{1,2}, FENG Jing³, WU Wen-Fang^{2*}, YANG Dong-Ling³, YAN Xi-Yun^{3*}

¹ Shenyang Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

² Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;

³ National Key Laboratory of Biomolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract HER2/neu is an attractive target for tumor therapy since its overexpression in a number of tumors. In order to enhance the cytotoxicity of anti-HER2/neu antibody, and the specificity of TNF- α for tumor cell, a fusion gene of antiHER2-hTNF- α was constructed. The recombinant fusion protein was produced in *E.coli*, and their refolding has done through affinity chromatography on a His-column. The ELISA assay showed that antiHER2-hTNF- α specifically bound to HER2/neu expressing SKOV-3 and MCF-7 cells, but it did not recognize the HER2/neu negative cells A375. *In vitro* study, it was found that antiHER2-hTNF- α inhibited the proliferation of SKOV-3 and MCF-7 cells, whereas it did not effect on the A375. These studies suggest that the recombinant antiHER2-hTNF- α immunotoxin has a potential application in HER2/neu expressing tumor therapy.

Key words anti-HER2/neu scFv C6.5, hTNF- α , immunotoxin

*Corresponding author.

WU Wen-Fang, Tel: 86-24-83970383, E-mail: w2fl@sina.com

YAN Xi-Yun, Tel: 86-10-64888583, E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

Received: April 7, 2005 Accepted: May 27, 2005