

· 肿瘤免疫学 ·

用于肿瘤血管靶向治疗的 RGD/tTF融合蛋白的表达及活性鉴定

杨桂旺 庄国洪 王阶平 李文珠 吴娜 颜江华 (福建省厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

中国图书分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-484X(2006)04-0327-04

[摘要] 目的:制备用于肿瘤血管靶向治疗的重组 RGD/tTF融合蛋白,并鉴定其生物学活性。方法:利用 PCR 技术构建 RGD 与 tTF 的融合基因,克隆至表达载体 pET22 b(+),在 *E. coli* BL21(DE3)中表达,镍亲和层析柱纯化。凝血实验和 F 活化实验鉴定融合蛋白中 tTF 的活性,间接 ELISA 分析 RGD 活性。结果:获得序列正确的 RGD/tTF/pET22 b(+)重组子,融合蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中高效表达。纯化后的融合蛋白具有活化 F₃、引起血液凝固的功能,且能与 ν_3 特异性结合。结论:成功构建 RGD/tTF/pET22 b(+)重组子,RGD/tTF 融合蛋白具有 TF 活性且与 ν_3 特异性结合,为进一步研究其体内特异性诱发肿瘤组织血管栓塞功能创造了条件。

[关键词] tTF; RGD; 融合蛋白; 血管栓塞

Expression and characterization of fusion protein RGD/tTF for targeting therapy of cancer

YANG Gui-Wang, ZHUANG Guo-Hong, WANG Jie-Ping, LI Wen-Zhu, WU Na, YAN Jiang-Hua School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

[Abstract] **Objective:** To express and purify a new fusion protein (RGD/tTF) for targeting therapy of cancer, and analyze its activities. **Methods:** The fused gene RGD/tTF was constructed by PCR, and then was inserted into vector pET22 b(+), expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The fusion protein was purified through Nickel-affinity chromatography column. The tTF activity of the fusion protein was analyzed by clotting assay and F₃ activation assay. The specific binding of RGD/tTF to ν_3 was analyzed by indirect ELISA. **Results:** The recombinant plasmid pET22 b(+)/RGD/tTF with correct sequence was obtained. The fusion protein was expressed with high yield in *E. coli* BL21 (DE3). The purified fusion protein could activate F₃ and cause blood coagulation, and bind to ν_3 specifically. **Conclusion:** The recombinant plasmid pET22 b(+)/RGD/tTF was constructed. The fusion protein retained TF activity and binding specificity to ν_3 , lays the foundation for studying the function of inducing thrombosis in tumor vasculature in vivo.

[Key words] tTF; RGD; Fusion protein; Thrombosis

组织因子 (TF) 是一种相对分子质量大小约为 47 000 的跨膜糖蛋白,由 295 个氨基酸组成,其中有 32 个是分泌的信号肽,成熟的 263 个氨基酸分为 3 个区域:胞外区 (1~219)、跨膜区 (220~242) 和胞质区 (243~263)^[1]。TF 分布于血管内皮外侧,既是 F₃ (凝血因子) 的细胞表面受体,又是 F_{3a} (激活的因子 a) 的辅因子,因此,TF 是凝血级联反应的始发因子^[2]。正常情况下内皮细胞屏障将循环血液与 TF 隔开,TF 仅在血管内皮损伤并暴露于血管腔时,才与 F₃ 或 F_{3a} 形成复合物,进而水解活化 F₃ (凝血因子) 或 F_{3a} (凝血因子),引起外源性凝血而使局部血液凝固。

研究证明仅含有 TF 胞外区的截短组织因子

(tTF, truncated tissue factor),仍保留与 F₃ 或 F_{3a} 结合并激活 F₃ 和 F_{3a} 的活性,但游离的 tTF 对 F₃ 的激活能力要比完整的跨膜 TF 低 5 个数量级,这是因为 TF-F_{3a} 复合物在带负电荷的磷脂膜表面能更有效地结合并激活 F₃ 和 F_{3a}^[3,4]。1997 年 Thope 等^[5]将抗肿瘤血管标志物的抗体和具有潜在凝血功能的 tTF 相结合,制备抗体与 tTF 的融合蛋白。动物实验证实该融合蛋白可以选择性地诱发肿瘤血管栓塞,进而导致肿瘤消退。这种利用 tTF 融合蛋白特异性诱发肿瘤血管栓塞的方法是一种新颖的抗肿瘤方法。整合素受体 ν_3 是肿瘤血管内皮细胞膜特异性标记物,在新生血管内皮细胞表面呈上调状态,而正常组织的血管含量极少^[6]。Ruoslahti 等^[7,8]利用噬菌体表面肽库展示技术成功地筛选出能与 ν_3 专一结合的肽 RGD-4C,并证实 RGD-4C 是一个良好的肿瘤血管靶向载体。本研究以 RGD-4C 作为靶向载体,通过基因工程技术构建新型的特异性诱发肿瘤组织血管栓塞的融合蛋白 RGD/tTF。

本课题受教育部出国留学人员启动基金资助

福建省厦门大学医学院抗癌研究中心,厦门 361005

作者简介:杨桂旺 (1981年-),男,硕士;

通讯作者:颜江华 (1963年-),男,副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤细胞分子生物学研究, E-mail: jhyan@xmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 BL21 (DE3)由本室保藏、质粒 pET22b(+)购自 Novagen公司、 α TF/pSK(+)质粒由美国南加州大学 Epstein教授惠赠。

1.1.2 工具酶及试剂 工具酶购自 NEB公司, DNA纯化试剂盒为 OMEGA公司产品, DNA序列分析由上海博亚公司完成。鼠抗 6 \times His mAb和 HRP标记的羊抗鼠 IgG购自上海生工公司, S2222为上海申海生化科技公司生产, ν_3 、F 和 F 购自 Sigma。

1.1.3 引物 由上海生工合成。根据 α TF cDNA序列设计扩增 α TF的引物 P1(上游引物): TCTGGCAC-TACAAACTACTGTGGC和 P2(下游引物): TTCTCT-GAATTCCCTTCTCC。根据文献[9]设计含有 RGD-4C的引物 P3: CATACCATGGGCTGCGATTGTCGCGGAGATTGCTTCTGCATGGCCCTGGTGCCTCGTGGTCTCTGGCACTACAAATAC(其中划线部分为 RGD-4C序列,波浪线部分为 α TF 5端序列)。根据 RGD/ α TF序列设计扩增 RGD/ α TF的引物 P4: CATACCAT-GGGCTGCGATTGTC和 P5: CTACCTCGAGTCTCT-GAATTCCCTTCTCC,分别引入内切酶位点 Nco 和 Xho。

1.2 方法

1.2.1 融合基因 RGD/ α TF的构建 以 α TF/pSK(+)为模板, P1和 P2为引物,常规 PCR扩增 α TF基因。在 PCR反应体系中加入 α TF基因产物和引物 P3(含 RGD-4C),退火融合得到 RGD/ α TF模板(94 预变性 4分钟,94 变性 30秒、72 退火延伸 1分钟,循环 5次);再加入引物 P4、P5扩增 RGD/ α TF融合基因并在 5和 3端分别引入 Nco 和 Xho 内切酶位点(94 变性 30秒、56 退火 30秒、72 延伸 45秒,循环 30次,72 延伸 5分钟)。1%琼脂糖凝胶鉴定、DNA胶纯化试剂盒回收纯化目的片段。

1.2.2 重组质粒的构建及转化 将纯化的 RGD/ α TF PCR产物及载体 pET22b(+)分别用 Nco 和 Xho 进行双酶切,胶分离纯化回收, T₄DNA连接酶于 16 连接过夜,连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3),以氨苄青霉素抗性初筛,挑单克隆用 pET22b(+)通用引物及 P4、P5分别进行菌液 PCR筛选,阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.2.3 融合蛋白的表达及纯化 挑含正确重组质粒 RGD/ α TF/pET22b(+)的单菌落 37 培养过夜,

按 1:100稀释至 2YT中扩大培养后,通过不同的诱导时间和 IPTG浓度优化其表达条件。在扩大培养至 OD₆₀₀ = 0.4~0.6时加 IPTG至终浓度 0.1 mmol/L诱导表达 6小时。由于 pET22b(+)表达的 RGD/ α TF融合蛋白 C端带有 6 \times His标签,故目的蛋白纯化方案参照 Amersham Pharmacia Biotech公司的镍柱蛋白纯化操作手册。纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE分析鉴定,并采用 0.01 mol/L PBS透析复性。

1.2.4 融合蛋白 α TF部分的活性鉴定 凝血实验:参照 Haubitz等^[10]凝血实验方法并稍作修改,用 3.8%的柠檬酸钠处理新鲜小鼠血液,4 000 r/min离心,留血浆。凝血板每孔加血浆 30 μ l,分别加系列浓度的 RGD/ α TF和终浓度为 12.5 mmol/L的 CaCl₂,设只加 RGD/ α TF和只加 CaCl₂的空白对照,室温下记录从加入 CaCl₂至血浆开始出现不流动的时间。F 活化实验:Hische等^[11]发现,TF-F_a复合物活化 F 可以使 S2222(多肽对硝基苯胺复合物)分解为多肽和对硝基苯胺,后者在 405 nm有吸收峰,测吸光度可间接反映 TF水平。所以用 F 活化实验进一步鉴定融合蛋白 α TF部分的活性及其水平^[3]。在 Tris缓冲液中加入系列浓度的 RGD/ α TF或 BSA,加 100 nmol/L F_a,37 温育 10分钟,加 F 至终浓度 5 nmol/L,室温温育 10分钟,加入 100 mmol/L EDTA终止反应,加 2 mmol/L 生色底物 S2222,在 3分钟之内用酶标仪测 OD_{405 nm}。

1.2.5 RGD/ α TF与 ν_3 特异性结合实验 RGD/ α TF融合蛋白 C末端带 6 \times His标签,参照 Kessler等^[12]方法用间接 ELISA分析 RGD/ α TF与 ν_3 相结合的特异性。96孔板包被 ν_3 (5 μ g/ml, 50 μ l/孔)4 过夜,10%羊血清封闭,分别加入倍比稀释的 RGD/ α TF(6.25~200 μ g/ml),相应浓度的 α TF/His做对照,于 4 过夜。加入鼠抗 6 \times His mAb,37 温育 1小时,再加入 HRP标记的羊抗鼠 IgG,37 温育 30分钟, TMD显色后加 1 mol/L H₂SO₄终止反应,测定 OD_{405 nm}值。每步骤间用 PBST洗 5次,每次 3分钟。

2 结果

2.1 PCR扩增 RGD/ α TF 以质粒 α TF/pSK(+)为模板 PCR扩增获得大小为 657 bp的 α TF,再与含 RGD-4C的引物 P3退火融合,得到 RGD/ α TF模板,经 PCR扩增获得 RGD/ α TF产物,1%琼脂糖凝胶电泳分析,在 717 bp处见单一条带,其大小与理论计算值相一致,见图 1。

2.2 重组质粒的鉴定 氨苄青霉素抗性初筛,菌液 PCR阳性克隆送上海博亚公司测序,结果经核苷酸序列和蛋白编码分析获得一正确重组质粒克隆。

2.3 融合基因 RGD/tTF在 *E. coli* BL21 (DE3)中的表达 含有 RGD/tTF/pET22b (+)的 *E. coli* BL21 (DE3)扩大培养后,一系列诱导剂浓度诱导表达,发现终浓度达 0.1 mmol/L以后再增加 IPTG浓度不能明显增加目的蛋白表达量,见图 2。0.1 mmol/L IPTG于 37 诱导 6小时为最佳,更长时间不能明显增加目的蛋白量。12% SDS-PAGE分析显示在相对分子质量大小约 35 000处有一特异条带,与报道相一致,且目的蛋白主要以包含体形式存在,见图 3。

2.4 RGD/tTF活性鉴定

2.4.1 凝血实验 室温下从加入 $CaCl_2$ 到血浆开始出现不流动时的时间,见表 1。经柠檬酸钠处理过的血浆在仅加 12.5 mmol/L Ca^{2+} 或 6 μ mol/L RGD/tTF时 30分钟内基本不凝;而在有与对照相同浓度的 Ca^{2+} 存在时, RGD/tTF能有效的促进血浆凝固,且随 RGD/tTF浓度的增加凝血时间缩短,表明 RGD/tTF具有促凝活性。

2.4.2 F 活化实验 分别测 0.01、0.1、1和 10 μ mol/L融合蛋白和 BSA在 F 活化反应后的 $OD_{405\text{ nm}}$ 。结果融合蛋白在 1 μ mol/L以上时能有效活化 F 而增强 405 nm处吸收峰,而同浓度的 BSA没反应,见图 4。

2.4.3 RGD/tTF与 v_3 特异性结合分析 间接 ELISA检测 RGD/tTF与 v_3 相结合的特异性。实验结果表明纯化复性后的 RGD/tTF与 v_3 特异性结合程度与融合蛋白的剂量相关,但当到达饱和后结合程度基本不增加,而 tTF则不起反应,见图 5。

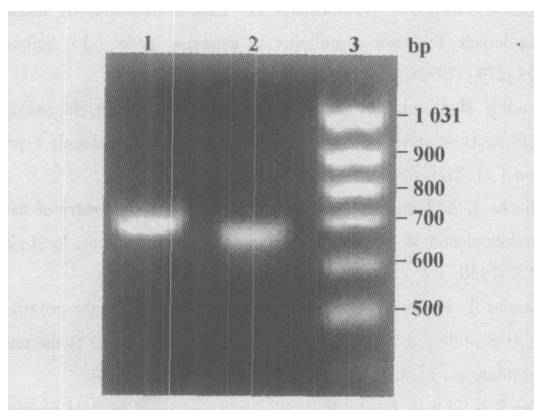


图 1 RGD/tTF PCR产物琼脂糖凝胶电泳分析
Fig. 1 Analysis of PCR product by agarose gel electrophoresis
Note: 1. PCR product of RGD/tTF (717 bp); 2. PCR product of tTF (657 bp); 3. DNA marker

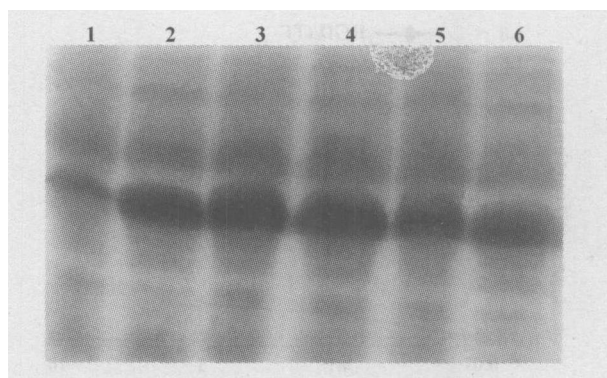


图 2 IPTG浓度梯度条件下融合蛋白表达的 SDS-PAGE分析

Fig. 2 Analysis of expression of fusion protein under IPTG induction of different concentrations by SDS-PAGE

Note: 1-6. Fusion protein induced with IPTG 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3 and 0.5 mmol/L respectively.

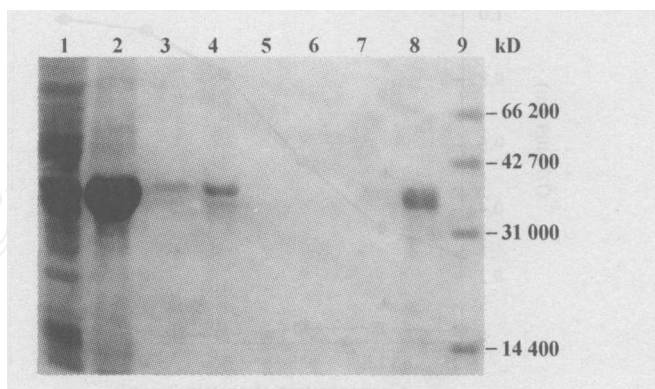


图 3 重组 RGD/tTF的 N柱纯化产物 SDS-PAGE分析

Fig. 3 Analysis of the product of purification through Nickel-affinity chromatography column by SDS-PAGE

Note: 1. Total soluble protein; 2. Total insoluble protein; 3. Protein that flowed off from the column; 4, 5. Sample washed from the column with Binding buffer; 6, 7. Sample washed from the column with Wash buffer; 8. Sample washed from the column with Elute buffer; 9. Protein marker

表 1 凝血时间

Tab. 1 Coagulation time

Concentration		Time (min)
RGD/tTF (μ mol/L)	$CaCl_2$ (mmol/L)	
0	0	>30
0	12.5	>30
0.75	12.5	>30
1.5	12.5	15.5
3	12.5	11.6
6	12.5	11.5
6	0	>30

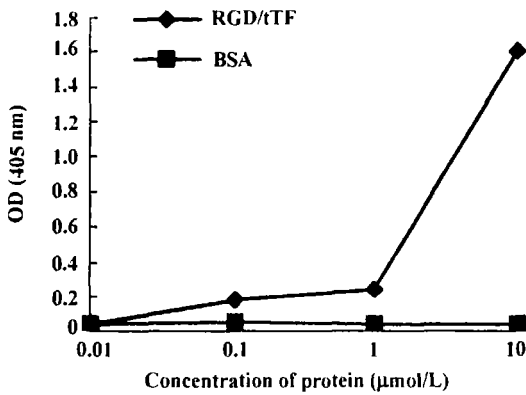


图 4 F 活化实验图

Fig. 4 F activation by RGD/tTF

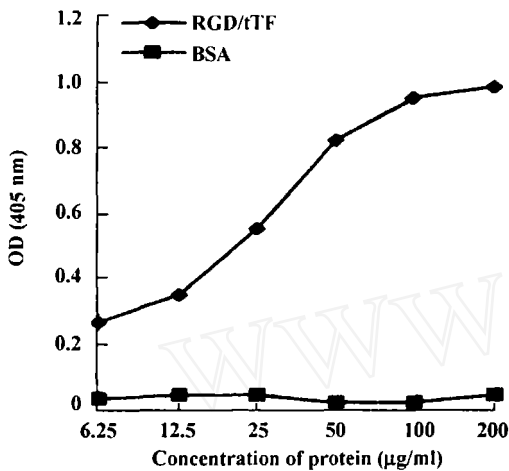


图 5 RGD/tTF与 v3 特异性结合实验

Fig. 5 The binding of RGD/tTF to v3

3 讨论

目前,用于诱发肿瘤组织血管栓塞靶向治疗的特异性载体不多,通常利用抗肿瘤血管标志物的抗体与 tTF构建融合蛋白,但这种方法弊端较多,如由于抗体的分子相对较大,容易造成空间位阻而影响 tTF与 F 和 F 的结合能力,进而降低诱发肿瘤血管栓塞的效率。为了避免这些弊端,我们将特异性结合肿瘤血管内皮细胞膜标记物——整合素受体 v3 的小肽 RGD-4C作为 tTF的特异性载体,利用基因工程技术成功获得 RGD/tTF/pET22(+)重组子,并在 E coli BL21 (DE3)中高效表达。

凝血实验中在有 Ca²⁺存在时,融合蛋白促进血浆凝固; F 活化实验敏感性高,为了避免内源性系统的干扰,我们采用商品化的 F 和 F 检测 RGD/tTF对 F 的活化能力,结果显示融合蛋白 1 μmol/L

以上时能有效活化 F 而增强 405 nm吸收峰,并且随着 RGD/tTF浓度的升高 RGD/tTF对 F 的活化能力增强,这与报道相符^[13]。这说明复性后的融合蛋白能正确折叠,具有 TF相似的活化 F 引起血液凝固的功能。RGD/tTF与 v3 结合实验表明, RGD/tTF能与 v3 特异性结合,且结合程度与 RGD/tTF浓度呈正相关。

融合蛋白 RGD/tTF能特异性结合于肿瘤血管内皮细胞整合素受体 v3,且保留有 TF活化 F 引起血液凝固的特性,为进一步研究其体内特异性诱发肿瘤组织血管栓塞的活性创造了条件。

4 参考文献

- 1 Spicer E K, Horton R, Bøen L *et al* Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987; 84: 5148-5152.
- 2 Davie E W, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation [J]. Biochemistry, 1991; 30: 10363-10370.
- 3 Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey J H *et al* Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and co-factor function [J]. J Biol Chem, 1991; 266: 2158-2166.
- 4 Krishnaswamy S, Field K A, Edgington T S *et al* Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X [J]. J Biol Chem, 1992; 267: 26110-26120.
- 5 Huang X M, Molema G, King S *et al* Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature [J]. Science, 1997; 275: 547-550.
- 6 Zetter B R. On target with tumor blood vessel markers [J]. Nat Biotechnol, 1997; 15: 1243-1244.
- 7 Pasqualini R, Ruoslahti E Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries[J]. Nature, 1996; 380: 364-366.
- 8 Rajotte D, Arap W, Hagedorn M *et al* Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display [J]. J Clin Invest, 1998; 102: 430-437.
- 9 Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model [J]. Science, 1998; 279: 377-380.
- 10 Haubitz M, Bunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression [J]. Transplant Proc, 2002; 34: 1124-1126.
- 11 Hische E A, Tutuarima J A, Helm H J. Spectrophotometry of tissue thromboplastin in cerebrospinal fluid [J]. Clin Chem, 1981; 27: 1427-1430.
- 12 Kessler T, Bieker R, Padro T *et al* Inhibition of tumor growth by RGD peptide-directed delivery of truncated tissue factor to the tumor vasculature [J]. Clin Cancer Res, 2005; 11: 6317-6324.
- 13 Gao B N, Li S Z, Thøpe P E A simple and rapid method for purifying the extracellular domain of human tissue factor[J]. Thromb Res, 1998; 91: 249-253.

[收稿 2005-08-09 修回 2005-11-07]

(编辑 许四平)