

蓖麻毒素 A 链 (RTA) 和 RTA-4D5 scFv 的穿膜改造探究

许嘉文

(华东理工大学鲁华生物技术研究所, 上海 200237)

摘要 随着抗体技术的成熟, 免疫毒素已成为抗肿瘤药物的研究热点。抗体可使免疫毒素具有靶向性, 使正常细胞免受伤害。本实验将 RTA 分别与单链抗体 4D5 scFv、内质网定位肽 KDEL、DEKKMP 及穿膜肽 Xentry 进行融合表达, 获得免疫毒素 RK3、R4K3、R4D、XR4D。通过 MTT 检测各免疫毒素对卵巢癌细胞 SK-OV-3 和正常细胞 H460 的影响, 判断 4D5 scFv、内质网定位肽及穿膜肽对免疫毒素靶向和杀伤性的影响。结果表明 4D5 scFv 能显著提升 RTA 对卵巢癌细胞的特异性, 内质网定位肽 KDEL 和 DEKKMP 能提高 RTA 的抗肿瘤活性, Xentry 可帮助 RTA 穿膜, 进一步提高免疫毒素的应用潜力。

关键词 重组免疫毒素; 蓖麻毒素; 单链抗体片段; 内质网定位; 肿瘤治疗

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-0745(2023)08-0010-03

1 文献综述

许多植物都可以产生被称为核糖体蛋白失活蛋白 (RIPs) 的蛋白毒素, RIPs 的主要功能是作为保护免受微生物入侵的工具^[1]。蓖麻毒素是二型核糖体蛋白失活蛋白的一种, 由二硫键连接的 A 链和 B 链组成。蓖麻毒素被细胞内吞后, 绝大多数内化的蓖麻毒素被转运回细胞表面, 剩余部分被运送到溶酶体并被降解, 最终只有很小一部分被运输到高尔基体网络^[2]。而蓖麻毒素 A 链需要穿过细胞膜, 通过逆向转运途径进入胞浆中才能发挥毒性, 导致细胞凋亡。因此蛋白毒素在胞内的定位是展现其细胞毒性的关键^[3]。研究人员在蛋白质末端添加短肽改善其穿膜或定位能力, 这种短肽被称为信号肽。

KDEL 是一种最常见的内质网定位肽, 由四个氨基酸残基组成, 通常存在于哺乳动物和植物细胞中, 一般只有在蛋白质的 C 端才能发挥蛋白质的内质网定位作用。而 DEKKMP 是 E3/19K 蛋白的 C 端末尾的 6 位残基, 同样也是一种内质网保留信号。如今更多的新型穿膜肽正在被发现, 其中一种很有潜力的穿膜肽来自乙型肝炎病毒 (HBV) 编码的 X 蛋白。Xentry 由 X 蛋白中的 7 个氨基酸残基组成, 序列为 LCLRPVG, 该短肽能够渗透多种癌细胞系, 包括 HepG2、H441、BT474^[4]。由于许多不同的细胞类型表达多配体蛋白聚糖, 特别是高水平表达多配体蛋白聚糖的上皮细胞, Xentry 可用于将药物递送至疾病治疗中的组织。^[5]

蓖麻毒素作为抗肿瘤药物, 已被研究人员广泛而深入地研究, 其抗肿瘤作用已在许多实验模型中得到证实, 如人肿瘤细胞移植到裸鼠体内的实验^[6], 但是蓖麻毒素自身对肿瘤细胞并没有特异性, 使用蓖麻毒素同样会杀伤正常细胞。为了解决蓖麻毒素对肿瘤细胞的特异性问题, 近年来蓖麻毒素和其 A 链被用于合成靶向性肿瘤治疗的免疫毒素, 并显示出良好的特异性抗癌活性^[7]。

本实验利用内质网定位信号肽, 使单链 A 链蓖麻毒素在没有 B 链的辅助下依旧能够高效逆向运输, 细胞内化蓖麻毒素后将蓖麻毒素快速引导至内质网, 从而增强细胞毒性。同时利用 4D5 scFv 对特定肿瘤细胞的高特异性, 减轻其对正常细胞的杀伤力。由于蓖麻毒素和 4D5 连接后蛋白分子量较大, 在细胞内化过程中不易被细胞摄入, 所以在蛋白中插入一段穿膜肽以辅助蛋白毒素的内化。通过以上改造, 希望构建的蛋白毒素能用于临床肿瘤治疗。

2 实验方法 (过程)

2.1 引物设计

使用 Snapgene 软件, 依据 PCR 和重叠 PCR 的原理设计引物。

2.2 质粒构建

2.2.1 PCR 反应

质粒 pET-28a-SUMO-RTA-KDEL (质粒 1)、pET-28a-

表 1 引物

引物名称	5' 端到 3' 端序列
S1primer	AACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCAT
Primer2	GTGCTCGAGTTACAGTTCATCCTTCAATTCATCTTTGAGCTCGTCCTTAACTGGC
Primer3	GTGCTCGAGTTACAGTTCATCCTTCAATTCATCTTTGAGCTCGTCCTTTTGTATCTCC
Primer4	GTGCTCGAGTTACGGCATCTTTTTTTCATCTTTGATCTCCACCTTGG
Primer5	GCCAACCGGACGCAGGCATAAACCCACCAATCTGTTCTCTG
Primer6	TTATGCCTGCGTCCGGTTGGCATGGTTCCTAACAGTATCCG

SUMO-RTA-4D5-KDEL (质粒 2) 由实验室保存, 用来作为本实验的 PCR 模板; 使用设计好的引物 S1primer, primer2 和质粒 1 进行 PCR, 获得 SUMO-RTA-KDEL3 (RK3) 片段; 使用设计好的引物 S1primer, primer3 和质粒 2 进行 PCR, 获得 SUMO-RTA-4D5-KDEL3 (R4K3) 片段; 使用设计好的引物 S1primer, primer4 和质粒 2 进行 PCR, 获得 SUMO-RTA-4D5-DEKKMP (R4D) 片段; 将上述 PCR 反应产物进行核酸电泳验证, 并使用 OMEGA 公司的 Cycle Pure 试剂盒回收 PCR 片段。

以质粒 2 为模板, 分别使用设计好的引物 S1primer, primer5 和 primer6, primer4 进行 PCR, 获得 SUMO-Xentry 和 Xentry-RTA-4D5-DEKKMP; 对 PCR 产物核酸电泳, 并用 OMEGA 公司的 Gel Extraction 试剂盒切胶回收目标片段。

以回收的 PCR 产物为重叠 PCR 模板, 加入 S1 primer, primer4, PCR 获得 SUMO-Xentry-RTA-4D5-DEKKMP (XR4D), 进行核酸电泳验证并用 OMEGA 公司的 Cycle Pure 试剂盒纯化。

2.2.2 PCR 产物的连接

将上述所有 PCR 产物和 pET-28a 用限制性核酸内切酶 Nco I 和 Xho I 在 37°C 下水浴酶切 2 小时。使用 T4 连接酶将回收的 PCR 酶切产物与酶切 pET-28a 质粒连接, 22°C, 4h 或 16°C 过夜。

2.3 重组质粒转化和验证

将由 PCR 连接的产物及 DH5 α 感受态细胞冰浴 10 min 使其融化。再将 10 μ L 的 PCR 连接产物加入 DH5 α , 并继续冰浴 30min。后迅速以 42°C 金属浴热激 90s, 并及时放回冰浴, 持续降温 2min。最后加入 1mL 的普通 LB 培养基, 于 37°C 孵育 1h。孵育完成后, 4000rpm 离心 90s, 弃去上清, 加入 150 μ L 的普通 LB 培养基重悬菌体, 然后将其涂布在含有卡那抗性的 LB 培养基平板上, 于 37°C 摇床倒置, 过夜培养。本实验采取菌落 PCR 以及核酸电泳验证转化结果, 将 PCR 产物进行核酸

电泳, 并观察电泳结果, 若电泳结果显示 PCR 产物大小与目的片段大小一致, 则表明重组质粒转化初步成功。将验证成功的菌液加入 0.5mL 的含有卡那霉素的 LB 培养基中后, 置于 37°C 摇床中培养 6h 并测序。使用试剂盒将测序正确的菌液培养并抽提质粒, 将质粒转化入 BL21 感受态细胞中, 获得重组表达菌株。

2.4 诱导蛋白表达

取 1.5 mL 菌液分别加入 3 个 200mL 卡那抗性的 LB 摇瓶中, 37°C 摇床中培养 4 小时, 加入 50 μ L 1M 的 IPTG 诱导, 放入 18°C 摇床中诱导表达, 诱导时间为 16h~20h 左右。

2.5 蛋白纯化

2.5.1 镍柱纯化

诱导表达结束后, 去除上清 LB 培养基, 加入 40mL PBS 缓冲液重悬菌体, 利用超声破碎仪进行细胞破碎, 并取上清倒入干净的离心管。将上清先通过 0.45 μ m 孔径的滤膜过滤, 然后将上清通过镍柱使其与镍柱结合。分别用 50mM、100mM、200mM 以及 500mM 浓度的咪唑溶液对镍柱洗脱, 并收集洗脱液。分别将上样流穿液和各浓度咪唑洗脱液取出 30 μ L, 加入 10 μ L 4 \times 蛋白上样缓冲液, 制成蛋白样。SDS-PAGE 电泳检验目标蛋白所在洗脱区间。

2.5.2 透析、浓缩、SUMO 酶切和再纯化

用 SUMO 蛋白酶对目的蛋白进行酶切, 以获得单独的 RK3、R4K3、R4D 和 XR4D 蛋白。蛋白透析液采用 20 mM 的 PBS 缓冲液, 将纯化的蛋白装在透析袋中用夹子夹好, 然后放在 PBS 缓冲液中进行透析。将蛋白通过 10kDa 的超滤膜浓缩至 10mL, 并加入 1mL 的 SUMO 酶 4°C 过夜酶切。酶切产物通过镍柱纯化, 并进行蛋白电泳检测纯化结果。

2.6 蛋白抗肿瘤活性检测

采用 MTT 法检测目的蛋白对正常细胞及 SKOV3 肿

表2 不同蛋白对 H460 和 SKOV3 的细胞抑制率

蛋白名	H460 细胞 IC50 浓度 (nM)	SKOV3 细胞 IC50 浓度 (nM)
RK3	82.4	87.6
R4K3	未达到	6.2
R4D	未达到	8.3
XR4D	未达到	1.7
RTA	未达到	未达到

瘤细胞的毒性。先将 80% 铺板率的细胞消化，制成单个悬浮的细胞液，再用血球计数板计数 10 μ L 的细胞液。将细胞悬浮液稀释到每 1mL 含 1×10^5 个细胞，每孔 100 μ L 接种到 96 孔板上，在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的环境下培养 24h，让细胞贴壁。细胞贴壁后，去除孔板中的完全培养基，用维持培养基将蛋白稀释成不同浓度，加入孔板中培养 72h。每孔加入 10 μ L MTT 溶液，再培养 4h。弃去上清液，每孔加入 100 μ L 二甲亚砜，在酶标仪上振荡 5min，然后读取 490nm 处的吸光度。然后再弃去上清，每孔加入 100 μ L DMSO 溶液，在酶标仪上震荡 5min 后，使用酶标仪测定 490nm 处的吸光度。

3 实验结果与结论

由表 2 的实验结果可知，RK3 蛋白对 H460 细胞和 SKOV3 细胞有相似的抑制率，RK3 对正常细胞和肿瘤细胞均有一定的杀伤性且对正常细胞杀伤性略大于肿瘤细胞。R4K3 蛋白对正常细胞 H460 几乎没有杀伤性，但对 SKOV3 肿瘤细胞具有显著的抑制能力。

R4D 蛋白对正常细胞 H460 几乎没有杀伤性，但对 SKOV3 肿瘤细胞具有显著的抑制能力。与 R4K3 蛋白相比，R4D 蛋白对细胞的抑制能力基本相同。

XR4D 蛋白对正常细胞 H460 几乎没有杀伤性，但对 SKOV3 肿瘤细胞具有显著的抑制能力。与 R4K3 和 R4D 蛋白相比，R4D 蛋白对细胞的抑制能力基本相同，但达到最大抑制效果所需的蛋白浓度有所下降。

4D5 scFv 片段在提高蛋白毒素对肿瘤细胞的特异性方面有显著的功效。但同时由于 4D5 scFv 片段蛋白较大，可能是导致含有该片段的蛋白毒素相较于 RTA-KDEL 对肿瘤细胞杀伤性有所下降的原因。带有 Xentry 穿膜肽的蛋白毒素由于其穿膜能力较强，所以达到最大毒性所需要的蛋白浓度相较没有穿膜肽的蛋白毒素更低。带有 KDEL3 或 DEKKP 内质网保留信号肽的蛋白毒素在蛋白毒性上相较于没有内质网保留信号肽的 RTA 蛋白更强，说明内质网保留信号肽可以增强蓖麻毒素的细胞毒性。

4 展望

蓖麻毒素 A 链是免疫毒素的研究热点，本实验通过添加 4D5 scFv 片段提高了 RTA 蛋白对肿卵巢瘤细胞的特异性，通过添加内质网保留信号 KDEL、KDEL3、DEKKMP 提高了其蛋白毒性，通过添加 Xentry 穿膜肽降低了达到最大细胞抑制率所需的蛋白浓度。但是 DEKKMP 和 Xentry 的作用机理并没有进行深入探究，虽然已有文献对这两个信号肽做出机理的解释，但都并非是在 RTA 蛋白毒素方面的研究。在今后的实验中，可以尝试利用流式细胞仪测量细胞凋亡的早期和晚期比例，同时用激光共聚焦法观察 DEKKMP 和 Xentry 影响下的 RTA 蛋白在细胞中的分布，以进一步研究其作用机理。

参考文献:

- [1] Lord J M, Hartley M R, Roberts L M. Ribosome inactivating proteins of plants[J]. *Seminars in Cell Biology*, 1991, 02(01): 15.
- [2] Deurs V, Tnnessen T I, Petersen O W, et al. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex[J]. *Journal of Cell Biology*, 1986, 102(01): 37-47.
- [3] Deurs V, B. Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans-Golgi network[J]. *The Journal of Cell Biology*, 1988, 106(02): 253-267.
- [4] Montrose K, Yang Y, Sun X, et al. Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs[J]. *Rep*, 2013(03): 1661.
- [5] Laakkonen P, Vuorinen K. Homing peptides as targeted delivery vehicles[J]. *Integrative Biology*, 2010, 02(7-8): 326-337.
- [6] Olsnes S, Pihl A. Different Biological Properties of the two Constituent Peptide Chains of Ricin, a Toxic Protein Inhibiting Protein Synthesis[J]. *Biochemistry*, 1973, 12(16): 3121-3126.
- [7] Xin-Xin, Zhou, Feng, et al. Anti-cancer activity of anti-p185HER-2ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells[J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2010, 25(07): 1266-1275.