

· 论 著 ·

以 u-PA 为靶向分子的重组人 TRAIL 特异激活抗结肠癌的实验研究^{*}马 丹, 张朝军, 陈祖林, 杨 桦[△]

(第三军医大学新桥医院普通外科, 重庆 400037)

摘 要:目的 为更好发挥肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)杀伤肿瘤细胞的作用,构建一种新型的 TRAIL 融合蛋白,既方便其体外纯化又提高其靶向性。**方法** 通过构建由尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)特异裂解位点连接的 His 蛋白标签和 TRAIL 构成的融合蛋白,体外表达纯化后作用于结肠癌细胞,利用结肠癌细胞高表达 u-PA 活性的特点将融合蛋白裂解为抑瘤活性更强的 TRAIL 蛋白。**结果** 体外表达纯化的 TRAIL 融合蛋白被活性 u-PA 特异裂解去除 His 标签以后其抑瘤活性增强,肝毒性降低。**结论** 人工构建的 TRAIL 融合蛋白抑制结肠癌细胞生长具有高效性、靶向性。

关键词:尿纤溶酶原激活物;细胞凋亡;结肠肿瘤;肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)33-3992-03

The experimental study of the inhibitory effect of human recombinant sTRAIL targeting activated by u-PA on the colon cancer^{*}Ma Dan, Zhang Chaojun, Chen Zulin, Yang Hua[△]

(Department of General Surgery, Xinqiao Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To make better use of the antitumor effects of TNF related apoptosis inducing ligand(TRAIL), we construct a new fusion protein including TRAIL, for the sake of improving its purity and targeting to hepatocytes. **Methods** Fusion protein concluding His label protein and human recombinant TRAIL which linked by constructed specifically u-PA cleavage site. TRAIL protein was obtained by disintegrating from the fusion protein which had been purified. **Results** The purified His-rh-sTRAIL was demonstrated to be cleavable by u-PA and possess enhanced antitumor effect, it's toxicity to hepatocytes was reduced. **Conclusion** The fusion protein His-rhsTRAIL has antitumor effect on colon cancer cell with high efficiency, highly targeting and low-toxicity.

Key words: urinary plasminogen activator; apoptosis; colon neoplasms; TNF related apoptosis inducing ligand

结肠癌是常见的恶性肿瘤^[1-2],它的有效治疗是目前研究的热点和难点。抗肿瘤药物在肿瘤局部的靶向治疗是治疗肿瘤的有效途径^[1],它需要将抑瘤性和靶向性相结合。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员中的一员,与其相应的受体结合后能诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4],是高效的肿瘤杀伤因子。尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)是一种丝氨酸蛋白水解酶,与细胞膜上的 u-PA 受体(u-PA receptor, u-PAR)结合后,可被激活为有活性的双链酶,在局部发挥纤溶作用。u-PA 和 u-PAR 在正常组织表达水平很低,但在结肠癌等肿瘤明显过表达,与肿瘤的生长、浸润和转移密切相关^[5-6],是较特异的肿瘤靶向因子。本研究将 TRAIL 的抑瘤性和 u-PA 的靶向性结合起来,利用原核表达及纯化的带 u-PA 特异性酶切位点的重组融合蛋白 His-rhTRAIL 作用于 SW480 和 HT-29 结肠癌细胞株,观察其对结肠癌细胞生长的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞与细菌 HL-60 细胞株、SW480、HT-29 结肠癌细胞株购自中国科学院细胞研究所。大肠埃希菌 DH5 α 、BL2 菌株购自上海生物工程有限公司。

1.2 主要试剂 IMDM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司); Trizo RNA 提取纯化试剂(Invitrogen 公司); RT-PCR 二步法

试剂盒(Takara RNA PCR kit, code No: DRR019A); DNA 胶回收试剂盒(Roche 公司); pGEM-T 载体、质粒抽提试剂盒(Promega 公司); T4 DNA 连接酶(Omega 公司); 抗 TRAIL 抗体和抗-His 抗体(Santa cruz 公司); 功能性 u-PA 蛋白(北京义翘神州生物公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HL-60 细胞传代培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 传代 48 h 后收集细胞; SW480 和 HT-29 结肠癌细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中, 传代培养于 6 孔培养板(每孔 5×10^5 细胞), 48 h 后进行实验。

1.3.2 带 His 标签肽和 u-PA 解位点序列的 His-rhsTRAIL 原核表达质粒构建 以 Trizol RNA 提取试剂提取 HL-60 细胞总 RNA, RT-PCR 二步法试剂盒扩增人 TRAIL 分子 95~281 核苷酸片段(即 rhsTRAIL)。上游引物: 5'-GAT GAC CTC TGA GGA AAC CAT TTC TAC AGT TC -3'; 下游引物: 5'-GTT AGT GGT GAT GGT GAT GGT GTG CCG ATC GTC CCG AGC CAA CTA AAA AGG C -3'。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, DNA 胶回收试剂盒回收纯化, 克隆至 pGEM-T 载体, 转化大肠埃希菌 DH5 α , 蓝白筛选, 扩增、提取质粒, 经 PstI 与 BbvII 酶切鉴定, 选取正向插入质粒测序。

1.3.3 rhsTRAIL 融合蛋白的表达与纯化 取测序正确的 pGEM-T- His- rhsTRAIL 质粒转化大肠埃希菌 BL21, 饱和培

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81071978); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2009BB5326)。 作者简介: 马丹(1973~), 主治医师, 讲师, 博士, 主要从事胃肠道黏膜屏障功能及胃肠道肿瘤防治的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: hwbyang@126.com。

养后以 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(sopropyl-β-D-1-thiogalactopy ranoside,IPTG)诱导培养 4 h。收集细菌在裂解液(50 mmol/L 磷酸钠,pH 8. 0,300 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,5 mmol/L DTT)中超声破碎,裂解上清通过镍金属螯合(Ni-NTA)柱纯化,以含 50 mmol/L 咪唑的裂解液洗脱,磷酸缓冲液(含 10 mmol/L β-巯基乙醇)中透析。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)初步分析蛋白纯度,蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定。

1.3.4 u-PA 体外裂解 His-TRAIL 重构融合蛋白 取纯化的 His-TRAIL 重构融合蛋白与功能性 u-PA 在 37 ℃ 孵育 3 h,通过 Ni-NTA 层析去除完整 sTRAIL 融合蛋白和 His 标签肽,BCA(bicinchoninic acid)蛋白检测试剂测定蛋白水平,低温冷冻干燥后保存备用。同时取部分样品行 SDS-PAGE,将蛋白分两组转移到尼龙膜(NC)上,分别与抗-His 抗体[1:200 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释]和抗 sTRAIL 抗体(1:200 PBS 稀释),4 ℃ 孵育过夜,辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase,HRP)标记羊抗鼠二抗(1:1 000)室温孵育 1 h,化学发光试剂盒显色。

1.3.5 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT) 实验观察 His-TRAIL 重构融合蛋白对结肠癌细胞株 SW480 和 HT-29 细胞生长的影响 取培养的对数生长期 SW480 和 HT-29 结肠癌细胞 5×10⁴/mL 接种于 96 孔培养板中,每孔 0.2 mL,1 组加入抗 u-PA 抗体 50 μg 和完整 His-TRAIL 重构融合蛋白 200 μg(组 1),另 1 组加入 u-PA 体外裂解后去除 His 标签的 TRAIL 重构融合蛋白 200 μg(组 2),第 3 组加入完整 His-TRAI 重构融合蛋白 200 μg(组 3),另设空白对照组(组 4),每组各设 3 个复孔。置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中,分别培养 1、2、3、4 d,实验终止前 4 h 每孔加入 20 μL MTT 液,上机前除去培养液,每孔加 200 μL 二甲基亚砷,在酶标仪(570 nm 波长)上测量吸光度(OD)值,计算细胞生长抑制率。计算方法为:抑制率=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

1.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行数据统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

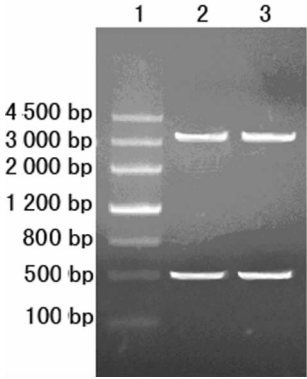
2.1 体外表达、纯化 His-TRAIL 重构融合蛋白

2.1.1 克隆 hrsTRAIL 鉴定 根据人重构融合蛋白 TRAIL cDNA 序列,利用 RT-PCR 方法从 HL-60 细胞株扩增重构融合蛋白 TRAIL 序列,通过下游引物在重构融合蛋白 TRAIL C 末端依次加上 u-PA 特异裂解序列 SGRSA 和 His 纯化标签,克隆重构融合蛋白 TRAIL 到原核表达载体 pGEM-T,酶切后产生 500 bp 和 3 100 bp 条带的为正向插入克隆,经测序证实序列正确,见图 1。

2.1.2 原核表达及纯化 His-TRAIL 重构融合蛋白 将 pGEM-T- His- TRAIL 质粒转化大肠埃希菌 BL21,IPTG 诱导培养后,以抗-TRAIL 抗体进行 Western blot 证实细菌裂解液中存在 His-TRAIL 蛋白。Ni-NTA 柱纯化系统初步纯化获得的重构融合蛋白 His-TRAIL,经 SDS-PAGE 鉴定,纯度为 96.8%,见图 2。

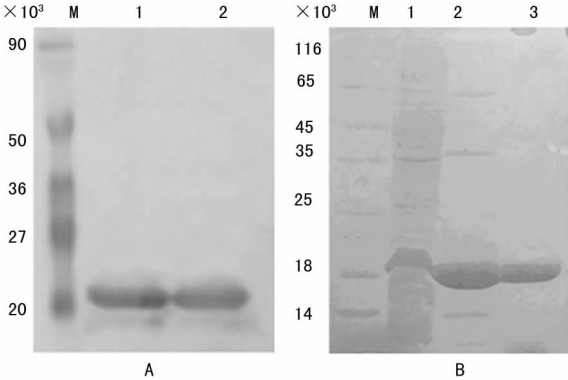
2.1.3 重构融合蛋白 His-TRAIL 蛋白 u-PA 体外裂解效率检测 Western blot 结果显示,经 u-PA 消化后抗 His 抗体可显示完整重构融合蛋白 His-TRAIL 蛋白(相对分子质量为 22 874),不能显示 u-PA 消化后重构融合蛋白 TRAIL 蛋白,

抗-TRAIL 抗体显示完整重构融合蛋白 His-TRAIL 蛋白和 u-PA 消化后 rhsTRAIL 蛋白(相对分子质量约 21 700)。功能性 u-PA 可去除重构融合蛋白 His-TRAIL 蛋白 His 标签,见图 3。



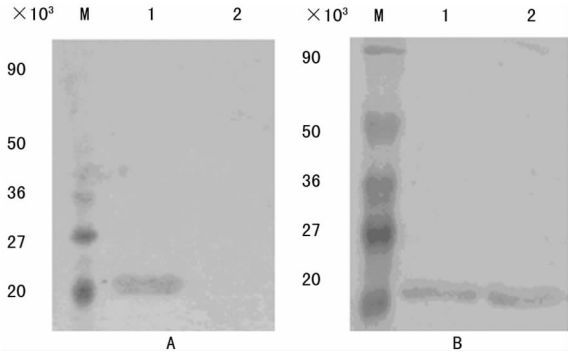
1: DNA 分子标记物;2、3: *Pst* I、*Bbv* II 酶切重组质粒 His-TRAIL。

图 1 重组质粒 His-rhsTRAIL 的酶切鉴定



A: 重组质粒裂解液 TRAIL 表达的免疫学检测;M: 蛋白分子标记物;1、2: 重组质粒表达后 TRAIL 检测结果;B: 重组质粒纯化后 TRAIL 表达的免疫学检测;M: 蛋白分子标记物;1: 重组质粒表达后细胞沉淀;2: 90% 缓冲液洗脱后;3: 100% 缓冲液洗脱后。

图 2 重组质粒 His-hrsTRAIL 的免疫学检测



A: 重组蛋白经 u-PA 裂解后抗-His 抗体 Western blot 检测结果;B: 重组蛋白经 u-PA 裂解后抗-trail 抗体 Western blot 检测结果;M: 蛋白分子标记物;1: His-TRAIL 重构融合蛋白;2: His-TRAIL 重构融合蛋白经 u-PA 裂解后。

图 3 重组 His-TRAIL 蛋白的免疫学鉴定

2.2 His-TRAIL 重构融合蛋白对结肠癌细胞株 SW480 和 HT-29 细胞生长的影响 MTT 法结果显示,组 2、组 3 SW480 和 HT-29 细胞生长的抑制率明显高于组 1、组 4,差异有显著性($P<0.01$)。His-rhsTRAIL 蛋白在体外可以抑制上述两种结肠癌细胞的生长,见表 1。

表 1 His-TRAIL 重构融合蛋白对结肠癌细胞株 SW480 和 HT-29 细胞生长的抑制率($\bar{x}\pm s$, %)

组别	1 d		2 d		3 d		4 d	
	SW480	HT-29	SW480	HT-29	SW480	HT-29	SW480	HT-29
组 1	1.40±0.83	0.90±0.78	2.28±0.50	1.55±0.53	2.93±0.77	2.29±0.50	3.62±0.17	3.02±0.89
组 2	6.44±0.94 ^a	5.61±2.23 ^a	19.76±2.13 ^a	23.18±1.84 ^a	33.36±1.28 ^a	33.33±3.07 ^a	38.45±1.76 ^a	38.73±4.70 ^a
组 3	6.32±0.48 ^a	6.18±0.25 ^a	15.56±2.71 ^a	18.87±2.85 ^a	27.77±3.16 ^a	24.81±1.66 ^a	35.75±0.91 ^a	33.39±2.31 ^a
组 4	0.88±0.63	1.23±0.04	2.12±1.18	2.13±0.20	2.56±1.07	2.93±0.39	3.07±1.44	4.25±0.76

^a: $P<0.01$, 与组 4 比较。

3 讨 论

TRAIL 可促进肿瘤细胞凋亡, 而不影响正常细胞^[7]。TRAIL 是 TNF 超家族成员, 是 II 型跨膜蛋白, 免疫系统多种细胞如 NK 细胞、T 细胞、巨噬细胞和树突状细胞等都表达 TRAIL。TRAIL 受体是 I 型跨膜蛋白, 目前已知 5 种 TRAIL 受体, 分别是 TRAILR1、TRAILR2、TRAILR3、TRAILR4 和骨原壳蛋白(osteoprotegerin)。TRAILR1 和 TRAILR2 通过胞外半胱氨酸富集区以高亲和力与 TRAIL 结合, 通过胞内段死亡结构域(DD)激活外源性凋亡途径。而 TRAILR3、TRAILR4 与 TRAILR1、TRAILR2 相似, 但胞内段 DD 缺失, 因此能够结合 TRAIL 但不能使细胞凋亡。在人体中, TRAILR1、TRAILR2、TRAILR4 广泛表达, 而 TRAILR3 仅见于周围血和脾, TRAILR3、TRAILR4 受体在正常细胞的表达可起竞争性拮抗及调节 TRAILR1、TRAILR2 功能的作用^[8], 因此可保护正常细胞逃避 TRAIL 诱导的凋亡作用。

有研究表明 TRAIL 可有效诱导多种人肿瘤如白血病、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、肺癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌和甲状腺癌细胞凋亡, 对肿瘤细胞生长抑制具有剂量依赖性, 是一种高效的肿瘤杀伤因子^[7]。His 标签有利于重组 TRAIL 蛋白的纯化, 但带标签的 TRAIL 蛋白特异性较低, 无明显靶向性, 而且具有明显的细胞毒性, 尤其是肝毒性严重限制了其临床应用^[9], 因此, 如采用 His 标签纯化重组 TRAIL 蛋白, 必须解决其肝毒性问题。

新合成的 u-PA 以极低活性的单链状态存在, 当与其受体 u-PAR 结合后才转化成高活性的双链状态^[5], 除可裂解血浆纤溶酶原生成纤溶酶外, 还可裂解邻近的细胞外基质, 促进肿瘤细胞迁移^[6], u-PAR 正常情况下表达于肝、肾、肺、血管等多种组织器官^[10], 也表达于多种肿瘤如结肠癌细胞^[11], 是一种具有肿瘤特异性的靶向分子, 且具有酶活性。本研究将 TRAIL 的抑瘤性和 u-PA 的靶向性结合起来, 在 His 标签与 TRAIL 蛋白之间插入 5 个氨基酸的 u-PA 特异裂解序列 SGRSA, 构建了带可裂解 His 标签的 TRAIL 重构融合蛋白。由于 His 标签的引入, 改变了 TRAIL 重构融合蛋白的构象, 可能影响其功能, 实验结果显示在人工封闭 u-PA 后, 两种结肠癌细胞的生长基本不受其影响, 也就是说在结肠癌细胞表面的 u-PA 酶活性去除后融合蛋白 His-TRAIL 重构融合蛋白抗肿瘤活性基本消失。只有当 His-TRAIL 重构融合蛋白被外源性活性 u-PA 特异性裂解或被结肠癌细胞表面的活性 u-PA 特异性裂解去除 His 标签后, 其特异性抗肿瘤活性才能发挥出来^[12], 使 TRAIL 重构融合蛋白的抗肿瘤作用具有靶向性, 只在结肠癌细胞局部发挥抗肿瘤作用, 这可能有降低其肝毒性。另外, 引入 His 标签蛋白是一种常用的纯化蛋白的方法, 可以使 TRAIL 重构融合蛋白的纯化变得简便高效。本研究结果显示构建的 His-TRAIL 重构融合蛋白在体外可被功能性 u-PA 有效裂解, 能靶向性抑制高表达 u-PA 的结肠癌细胞生长, 对其深入研究可望拓展 TRAIL 重构融合蛋白的临床前景。

参考文献:

[1] Chung KY, Saltz LB. Antibody-based therapies for colorectal cancer[J]. Oncologist, 2005, 10(9): 701-709.

[2] Shi J, Zheng DX, Liu YX, et al. Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice[J]. Cancer Res, 2005, 65(5): 1687-1692.

[3] Younes M, Georgakis G, Rahmani M, et al. Functional expression of TRAIL receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in esophageal adenocarcinoma[J]. Euro J Cancer, 2006, 42(4): 542-527.

[4] Wang WB, Zhou YL, Heng DF, et al. Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL) and canstatin gene suppression therapy on breast tumor xenograft growth in mice[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 110(2): 283-295.

[5] Yang L, Avila H, Wang H, et al. Plasticity in urokinase-type plasminogen activator receptor(uPAR) display in colon cancer yields metastable subpopulations oscillating in cell surface uPAR density—implications in tumor progression[J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 7957-7967.

[6] Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(1): 23-36.

[7] Wajant H, Gerspach J, Pfizenmaier K. Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(1): 55-76.

[8] Clancy L, Mruk K, Archer K, et al. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4(TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(50): 18099-18104.

[9] Koschny R, Walczak H, Ganten TM. The promise of TRAIL-potential and risks of a novel anticancer therapy[J]. J Mol Med, 2007, 85(10): 923-935.

[10] Blasi F, Sidenius N. The urokinase receptor; Focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling[J]. FEBS Letters, 2010, 584(9): 1923-1930.

[11] Markl B, Renk I, Oruzio DV, 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.

[12] Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, et al. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions[J]. Nat Med, 2001, 7(4): 383-385.