

# 抗癌胚抗原免疫毒素生物学功能的研究

何丹<sup>1)</sup> 杨慧<sup>2)</sup> 晁开<sup>3)</sup> 林晴<sup>1)</sup> 黄华樑<sup>1)\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; (<sup>2)</sup>沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016;

(<sup>3)</sup>西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100)

**摘要** 为了研究免疫毒素发挥生物学作用的全过程, 构建了两种不同形式的基于假单胞菌外毒素 (*Pseudomonas* exotoxin A, PE) 的抗癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 免疫毒素 CEA (Fv)/PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv)/KDEL. 用流式细胞术经间接免疫荧光法测定免疫毒素的抗原结合活性. 免疫毒素的内化 (internalization) 通过间接免疫荧光标记的方法在激光共聚焦显微镜下进行检测, 采用流式细胞术进行免疫毒素内化的定量分析. 细胞凋亡采用 FITC-annexin V/PI 双荧光染色方法进行分析. 用噻唑蓝 (MTT) 法测定免疫毒素的靶细胞杀伤功能. 对两种形式的免疫毒素在各个功能阶段的性质进行研究和比较, 全面展现了免疫毒素发挥生物学功能的过程及各个生物作用过程之间的相互影响, 为详尽的机制研究和免疫毒素的进一步优化改造提供了重要的依据.

**关键词** 癌胚抗原 (CEA), 免疫毒素, 抗原结合活性, 内吞作用, 凋亡, 细胞毒性

**学科分类号** Q94

某些细菌和植物能产生强大的毒素蛋白, 如: 蓖麻毒素 (ricin)、假单胞菌外毒素 (*Pseudomonas* exotoxin A, PE)、白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 等, 使其能在有害的环境中生存或为其提供营养物质的来源. 这些毒素蛋白被用于与抗体或生长因子等靶向分子连接, 以杀伤表面带有特定抗原或受体的细胞, 这种新型的组合物被命名为免疫毒素 (immunotoxins, ITs)<sup>[1]</sup>. 免疫毒素因其具有靶向性和有效剂量小的特点 (通常几个毒素分子就足以杀死一个细胞) 被应用于自身免疫疾病, 移植排斥反应的治疗. 特别是由针对肿瘤细胞表面的肿瘤特异抗原 (TSA) 和肿瘤相关抗原 (TAA) 的抗体构建的免疫毒素, 更被广泛应用于肿瘤的靶向治疗<sup>[2]</sup>.

免疫毒素发挥对靶细胞的杀伤作用需要一系列生物学功能的实现, 主要包括: a. 免疫毒素中结合域 (通常为抗体、细胞因子等) 与靶细胞表面相应抗原或受体的结合 (binding); b. 免疫毒素的内化 (internalization); c. 免疫毒素胞内催化活性的发挥, 导致细胞的死亡. 构成免疫毒素的两大部分——抗体和毒素, 在免疫毒素杀伤靶细胞的过程发挥不同的重要功能. 靶向细胞的作用由特异性抗体和细胞因子完成, 免疫毒素在与相应的抗原或受体结合后, 引发受体介导的内吞作用 (receptor-mediated endocytosis). 毒素部分则是在免疫毒素进入内吞小体后, 经蛋白酶解为有催化活性的毒素结构域, 并释放到胞质后, 发挥细胞毒活性.

免疫毒素导致细胞死亡的机制, 包括抑制细胞的蛋白质合成和促进细胞凋亡. Morimoto<sup>[3]</sup> 和 Chang 等<sup>[4]</sup> 在对白喉毒素 (diphtheria toxin, DT) 的研究中发现, 毒素在抑制靶细胞蛋白质合成的同时, 在细胞程序性死亡即细胞凋亡过程中, 导致细胞 DNA 碎裂 (fragmentation) 现象的发生. Wick 等<sup>[5]</sup> 的研究发现, 假单胞菌外毒素虽然在氨基酸序列上与 DT 没有同源性, 但却表现出与 DT 类似的生物学功能, 也是通过抑制细胞的蛋白质合成和促进细胞的程序性死亡来达到杀伤细胞的作用. 这一类毒素引发的细胞凋亡, 是伴随或紧接着毒素的 ADP 核糖基化作用而发生的, 而又是独立于毒素抑制蛋白合成功能的另一事件. 近年来的研究发现, 由 PE 构建的免疫毒素能够激活细胞凋亡过程中的重要蛋白 caspase, 切割死亡底物 (death substract) PARP (poly (ADP)-ribose polymerase), 导致 DNA 碎裂, 引发细胞的凋亡<sup>[6]</sup>.

癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 是 1965 年 Gold 和 Freedman 首先从胎儿及结肠癌组织中发现的. CEA 属于非器官特异性肿瘤相关抗原, 分泌 CEA 的肿瘤大多位于空腔脏器, 如胃肠道、呼吸道、泌尿道等. 因此, 针对 CEA 的免疫毒素可用于对多种肿瘤的靶向治疗.

\* 通讯联系人.

Tel: 010-64857285, E-mail: hlhuang@genetics.ac.cn

收稿日期: 2003-10-23, 接受日期: 2003-11-28

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

质粒 pTMF 由本实验室构建, 从 pET2 1 a (+) (购自 Novagen 公司) 改造而来. 大肠杆菌宿主菌 BL21 (DE3) 购自 Novagen 公司. 抗 CEA 的单链抗体基因片段由本实验室合成、拼接而成, PE38 基因片段来自毒素表达载体 pMS8 - 38 f + T (Brinkmann 博士惠赠). *E. coli* 菌株 BL21 (DE3) - star, 细胞株 3T3 (小鼠成纤维细胞)、SW1116 (人结肠癌细胞) 和 CNE-2 (人鼻咽癌细胞) 为本室保存. 鼠抗 c-myc 单克隆抗体 9E10 腹水由本实验室制备. FITC 标记的羊抗鼠 Ig, FITC-Annexin V, PI 等流式细胞术所用试剂均购自 BD Pharmingen. 各种工具酶购自 TakaRa 公司. DNA 合成与测序由上海博亚 (BioAsia) 公司完成.

## 1.2 抗 CEA 免疫毒素的构建

分别构建了两种形式的抗 CEA 免疫毒素, 毒素部分分别为 PE 的两种截短修饰形式 PE38/KDEL、PE35/KDEL. PE38/KDEL 是 PE 分子的一种截短和改良形式, 能使毒素的生物学活性显著提高<sup>[7,8]</sup>. PE35/KDEL 是在 PE38/KDEL 的基础上将 253 ~ 279 位的氨基酸序列截去, 去掉了毒素中的二硫键, 使得毒素在进入细胞后不用经过胞内蛋白酶的作用而直接发挥催化活性, 使活性提高<sup>[9]</sup>. 在 CEA (Fv) /PE38/KDEL 中, 检测标签 c-myc 基因插入毒素 607 位氨基酸后, 并紧接 604 ~ 613 位氨基酸序列; 在 PE35/CEA (Fv) /KDEL 中, c-myc 位于抗体的 C 端, 并与单链抗体一同插入毒素 607 位氨基酸后并紧接 604 ~ 613 位氨基酸序列 (图 1). 通用表达载体 pTMF 由 pET28a (+) (Novagen) 改造而来.

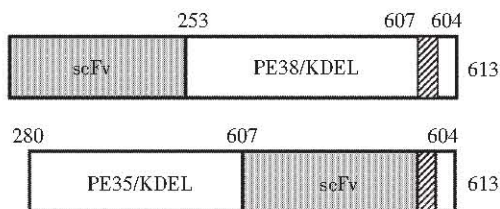


Fig. 1 Schematic of CEA (Fv) /PE38 /KDEL (up) and PE35/CEA (Fv) /KDEL (down)

□: Toxin; ■: Anti-CEA-scFv; ▨: c-myc.

## 1.3 免疫毒素的表达与纯化

以通用载体 pTMF 构建的免疫毒素表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行表达, 产物多以包涵体形式存在. 包涵体依次用洗涤液 1 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5), 洗涤液 2 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含 1 mmol/L EDTA, 2% Triton X-100) 和洗涤液 3 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含 2 mol/L 尿素) 洗涤. 洗涤后的包涵体以 5 g/L 的浓度在含 8 mol/L 尿素的变性液中变性. 将变性蛋白质以 1:100 的比例稀释到复性液中 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 含 0.5 mol/L arginine, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSH, and 1 mmol/L GSSG), 4℃ 放置 18 h. 将稀释产物透析到 20 mmol/L Tris-HCl-100 mmol/L 尿素 (pH 7.4) 溶液中, 4℃ 过夜. 蛋白质通过 DEAE-Sepharose 柱层析纯化, 目的蛋白经 0.3 mol/L NaCl 洗脱. 纯化后产物透析到 PBS (pH 7.4) 中备用. 蛋白质浓度 Bradford 法测定.

## 1.4 免疫毒素与靶细胞的结合

采用间接荧光标记的方法, 运用流式细胞术检测抗 CEA 免疫毒素对靶细胞的结合活性. 10<sup>5</sup> 个 CNE-2 细胞分别与 10 mg/L 的免疫毒素 CEA (Fv) /PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) /KDEL 200 μl 于 4℃ 孵育 90 min, 未加样品的细胞作对照组, PBA (1% BSA-PBS) 洗 3 次. 加入按 1:1 000 稀释后的 9E10 腹水 200 μl, 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次. 加入 200 μl FITC-羊抗鼠 Ig (1 μg 每 10<sup>6</sup> 个细胞), 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次, 流式细胞仪检测. 洗涤步骤后的离心条件均为 500 g, 5min.

## 1.5 免疫毒素的内化实验

**1.5.1 共聚焦荧光显微实验:** 在 6 孔细胞培养板的孔内放置盖玻片, 按 10<sup>5</sup> 个细胞每孔将 CNE-2 细胞铺于孔内, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 过夜培养. 倾尽培养液, 在孔内分别加入 10 mg/L 免疫毒素 CEA (Fv) /PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) /KDEL 1 ml, 设立对照孔, 加入相同体积的 PBA. 于 37℃ 温育 2 h. PBA 洗 3 次后, 用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Gly-HCl, pH 2.8, 0.5 mol/L NaCl) 洗 3 次, 每次 10 min, 以除去细胞表面抗原结合的免疫毒素. PBA 洗 3 次后, 用 4% 多聚甲醛于室温固定 5 min, PBA 洗 3 次. 加入冰丙酮作用 30 s, PBA 洗 3 次. 加入按 1:1 000 稀释后的 9E10 腹水 1 ml, 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次. 加入 1 ml 按

1:500 稀释的 FITC-羊抗鼠 Ig, 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次. 将盖玻片从培养板中取出, 倒扣于滴加有封片剂 (90% 甘油, 10% PBS, 5 mmol/L 对苯二胺) 的载玻片上, 于共聚焦显微镜下进行观察.

**1.5.2 流式细胞术定量分析:**  $10^5$  个 CNE-2 细胞分别与 10 mg/L 免疫毒素 CEA (Fv) / PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) / KDEL 200  $\mu$ l 于 37℃ 孵育 90 min, 未加样品的细胞作对照组, PBA (1% BSA-PBS) 洗 3 次后, 用洗脱缓冲液 (50 mmol/L Gly-HCl, pH 2.8, 0.5 mol/L NaCl) 洗 3 次, 每次 10 min, PBA 洗 3 次. 加入 1 ml  $1 \times$  FACS™ 裂解液 (lysis solution), 室温放置 10 min, 离心除去上清, 用 0.5 ml  $1 \times$  FACS 破膜溶液 2 (permeabilizing solution 2) 重悬细胞, 于室温放置 10 min 后用 PBA 洗涤细胞. 加入按 1:1 000 稀释后的 9E10 腹水 200  $\mu$ l, 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次. 加入 200  $\mu$ l FITC-羊抗鼠 Ig ( $1 \mu$ g 每  $10^6$  个细胞), 4℃ 孵育 60 min, PBA 洗 3 次后, 细胞重悬于含 1% 多聚甲醛的 PBS 中, 流式细胞仪检测. 洗涤步骤后的离心条件均为 500 g, 5 min.

## 1.6 细胞凋亡测定

按每孔含  $5 \times 10^4$  个细胞将 CNE-2 细胞铺于 12 孔细胞培养板内, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 过夜培养. 在各孔中加入 1 ml 10 mg/L 免疫毒素 CEA (Fv) / PE38/KDEL, 对照孔中加入等体积 PBA. 从加样后 1.5 h 开始, 每隔 2 h 从培养板中收集细胞, 冷的 PBS 洗 2 次后, 加入 100  $\mu$ l 结合缓冲液 (10 mmol/L HEPES-NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>), 按 5  $\mu$ l 每  $10^5$  个细胞加入 FITC-annexin V 和 PI, 室温避光放置 15 min, 补加 400  $\mu$ l 结合缓冲液, 上机检测.

## 1.7 细胞杀伤实验

稀释生长良好、表达 CEA 的肿瘤细胞 CNE-2、SW1116 及不表达 CEA 的小鼠成纤维细胞 3T3 于  $10^5$  个/ml, 每孔 200  $\mu$ l 铺 96 孔细胞培养板, 置 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养. 在细胞接近铺满孔底表面时, 加入不同浓度的免疫毒素 CEA (Fv) / PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) / KDEL, 继续培养 48 h. 加入终浓度为 0.5 g/L 噻唑蓝 (MTT) 溶液温育 4 h, 倾尽培养液. 附着于培养孔壁上的氧化态 MTT 紫色结晶以二甲基亚砜 (DMSO) 充分溶解, 570 nm 测定吸光度值. 每种细胞均设死

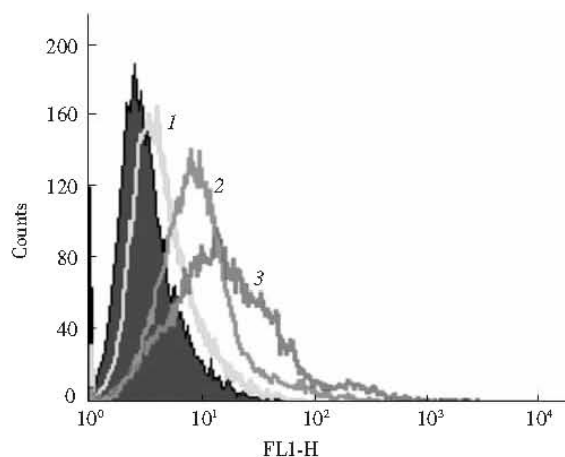
细胞和活细胞对照, 其他步骤同上. 肿瘤细胞杀伤率由下列公式计算得出:

$$\text{肿瘤细胞杀伤率}(\%) = \left( 1 - \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{死细胞}}}{A_{\text{活细胞对照}} - A_{\text{死细胞对照}}} \right) \times 100\%$$

## 2 结 果

### 2.1 细胞结合实验

免疫毒素 CEA (Fv) / PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) / KDEL 均与靶细胞 CNE-2 有较好的特异性结合, CEA (Fv) / PE38/KDEL 的结合活性高于 PE35/CEA (Fv) / KDEL (图 2).



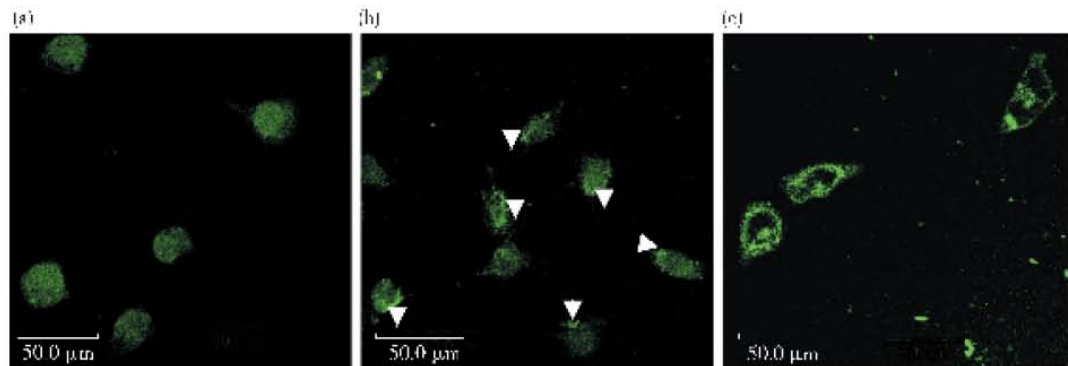
**Fig. 2 FACS analysis of the cell binding activity of CEA (Fv) / PE38 / KDEL and PE35 / CEA (Fv) / KDEL**

■: Auto fluorescence; 1: Negative control; 2: PE35/CEA (Fv) / KDEL; 3: CEA (Fv) / PE38/KDEL.

### 2.2 内化作用

**2.2.1 共聚焦显微观察:** 内化实验结果表明, 免疫毒素 CEA (Fv) / PE38/KDEL 和 PE35/CEA (Fv) / KDEL 在与细胞表面抗原结合后, 均能引起受体介导的内吞作用, 经 2 h 作用后, 靶细胞内均有不同程度的免疫毒素聚集 (图 3). CEA (Fv) / PE38/KDEL 的内化作用明显强于 PE35/CEA (Fv) / KDEL, 内化的免疫毒素均匀分布于整个细胞内, 而 PE35/CEA (Fv) / KDEL 的内化仅在细胞的局部有零星分布 (图 3b 中白色箭头所示).





**Fig. 3** Detection of immunotoxin internalizing by indirect immunofluorescence in optical confocal microscopy  
(a) Negative control; (b) PE35/CEA (Fv) / KDEL (the white arrows indicate the internalized immunotoxins); (c) CEA (Fv) /PE38/ KDEL.

**2.2.2 流式细胞术定量分析：**运用流式细胞术对两种免疫毒素的内化效率进行定量分析，结果见图 4。两种免疫毒素对 CNE-2 细胞都具有内化作用，CEA (Fv) /PE38/KDEL 的内化作用明显比 PE35/

CEA (Fv) /KDEL 强。

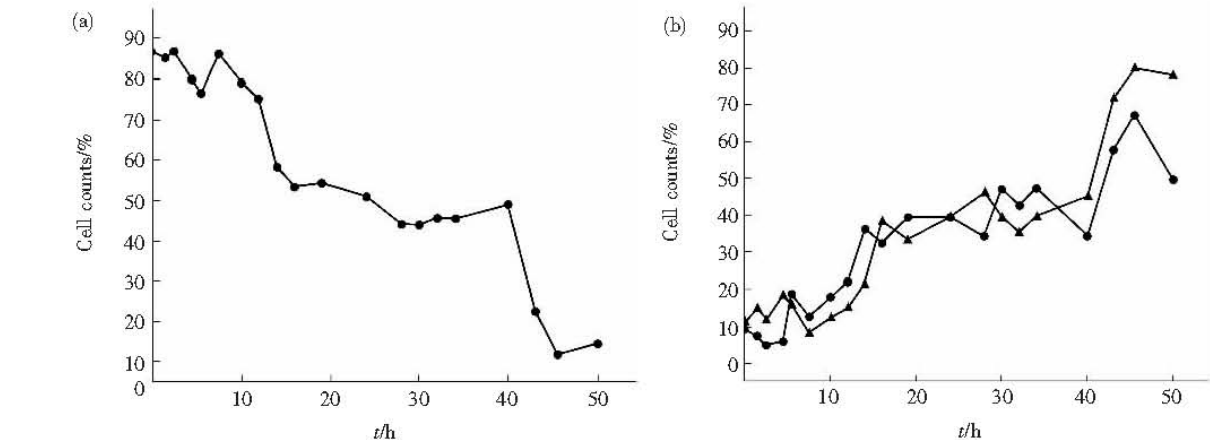
**2.3 细胞凋亡**

通过对加样后不同时间段的细胞取样测试，发现细胞在加样后 4.5 ~ 5.5 h 开始出现凋亡现象，细胞坏死的过程紧接着细胞凋亡的产生，40 h 后单独坏死的细胞数明显增加。在加样 45 h 左右杀伤作用达到最大，出现转折点。结合流式图像可以发现，从 5.5 h 的时间点开始，各个时间点都有新增的细胞进入凋亡阶段，肿瘤细胞的死亡随时间不断增加。处于各种状态的细胞数量随加样时间的变化情况见图 5。部分时间点的流式图像见图 6。

**2.4 细胞杀伤**

MTT 法测定体外细胞杀伤，结果见图 7。免疫毒素对表达 CEA 的肿瘤细胞 CNE-2 和 SW1116 均有显著的杀伤活力，对小鼠成纤维细胞 3T3 无明显杀伤作用。CEA (Fv) /PE38/KDEL 对靶细胞的杀伤活性明显高于 PE35/CEA (Fv) /KDEL 的杀伤活性。

**Fig. 4** Flow cytometry analysis of the internalization of the immunotoxins  
1: Negative control, MCF = 4. 15; 2: CEA (Fv) /PE38/KDEL, MCF = 17. 65; 3: PE35/CEA (Fv) /KDEL, MCF = 12. 45.



**Fig. 5** Apoptosis analysis of tumor cells treated with immunotoxins  
(a) Percent of living cells vs. treated time. ●—●: Living cells. (b) Percent of annexin V-positive and PI-positive cells vs. treated time. ●—●: Annexin V-positive; ▲—▲: PI-positive.

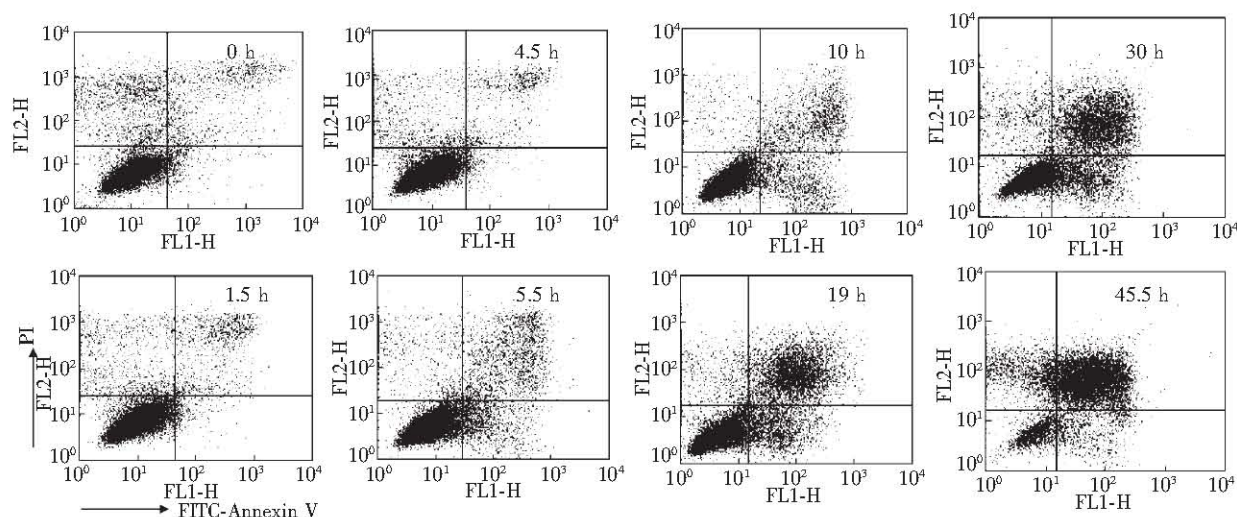


Fig. 6 FACS analysis of CNE-2 cells treated with CEA (Fv) /PE38/KDEL for different time and stained with FITC-annexin V and PI

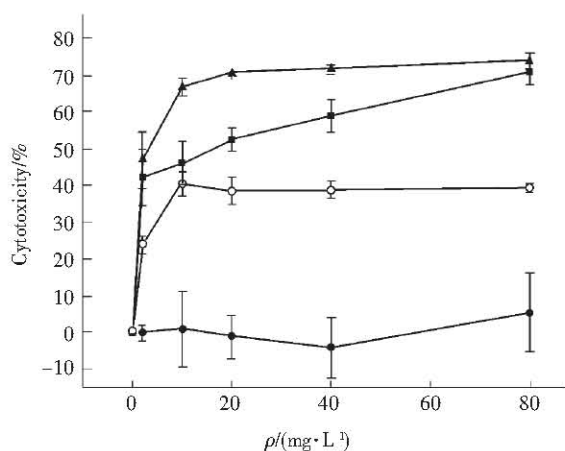


Fig. 7 Cytotoxicity of anti-CEA immunotoxins on cultured tumor cell lines

●—●: 3T3 #; ▲—▲: CNE-2 #; ■—■: SW1116 #; ○—○: CNE-2 \* . # Cells treated with CEA (Fv) /PE38/KDEL; \* Cells treated with PE35/CEA (Fv) /KDEL.

### 3 讨 论

PE35 是在 PE38 的基础上将毒素的 253 ~ 279 位氨基酸截去, 使毒素在进入细胞后不必经过蛋白酶的作用而直接发挥催化活性。通常进入细胞内的大量毒素分子只有大约 10% 被有效地酶解为活性形式, 因此以 PE35 构建的免疫毒素活性通常比 PE38 构建的免疫毒素活性高<sup>[10]</sup>。PE35 中不含任何二硫键, 给毒素的表达和生产带来了方便, 分子质量的减小可使毒素对机体的免疫原性进一步降

低。本实验中我们对两种形式的抗 CEA 免疫毒素的结合、内化、促凋亡和杀伤活性几个方面进行了研究和比较。

在实验中我们发现, PE35/CEA (Fv) /KDEL 的靶细胞结合能力稍低于 CEA (Fv) /PE38/KDEL。而 Mansfield 等<sup>[11]</sup>以化学偶联方式构建的免疫毒素 RFB4-PE35 保持了与单克隆抗体 RFB4 相同的抗原结合活性。据此我们推测, 在 CEA (Fv) /PE38/KDEL 中, 抗体片段 CEA (Fv) 处于毒素的 N 端, 抗体与毒素是两个相对独立的结构域, 在蛋白质折叠过程中以不同的速率进行单独折叠, 在与抗原结合时有足够的空间。而 PE35/CEA (Fv) /KDEL 的抗体片段处于毒素的内部不能进行充分的独立折叠, 与抗原结合的空间也相对较小, 因此造成抗原结合能力较低。

抗原-抗体或配体-受体的结合, 能否引发细胞内化作用是受多种因素影响的: 抗原或受体类型, 结合表位, 内化效率, 内吞小体内药物的释放, 抗原或受体与抗体或配体分离后有效地重新锚定于膜上。某些配体与细胞表面受体的结合能有效地促进其内化, 例如 EGF 受体, ErbB2 受体, 转铁蛋白 (transferring) 受体等。某些抗原抗体的结合也能引发抗体的内化, 但速率较慢, 例如神经细胞粘附分子 (NCAM), 前列腺特异性的膜抗原 (PSMA), 癌胚抗原 (CEA) 以及粘蛋白等; 而大量的抗体抗原结合却不能引发有效的抗体内化<sup>[12]</sup>。从内化实验中可以看出, CEA (Fv) /PE38/KDEL 和

PE35/CEA (Fv) /KDEL 的内化作用均较缓慢且作用效果不强, 因此内化就成为限速步骤, 蛋白酶切的过程对活性的影响就被降低, PE35 的优势也就不能体现出来。由此可见, 不是所有抗体构建的 PE35 免疫毒素都具有高于 PE38 免疫毒素的活性。对于能快速有效内化的抗体来说, 蛋白酶解的过程对其发挥活性的影响作用增强, PE35 的优势才能得以充分的体现。基于 TGF $\alpha$  构建的免疫毒素 PE35/TGF $\alpha$ , 其半数作用浓度是由 PE40 构建的 TP40 的 15%<sup>[10]</sup>。

抑制蛋白质合成和促进细胞凋亡是免疫毒素杀伤细胞的两种机制。从我们对抗 CEA 免疫毒素内化和促细胞凋亡作用的分析可以看出, 抗 CEA 免疫毒素作用于靶细胞 CNE-2 2 h 后即有一定数量的内化, 而细胞出现凋亡和死亡现象却在作用 4.5 h 以后出现, 说明免疫毒素在进入细胞后需要一定的时间和过程方能启动细胞凋亡的发生。而新的凋亡和坏死细胞的增加基本保持在一个恒定的速率, 细胞的坏死紧接着细胞的凋亡而发生, 说明细胞从凋亡到坏死是一个相对较快的作用过程。在作用 20 h 以后, 死亡的细胞总数明显增加, 还有部分为 PI 单阳性的细胞, 说明免疫毒素杀伤细胞是蛋白质合成抑制的机制与细胞凋亡机制共同作用的结果。本实验中, 抗 CEA 免疫毒素对靶细胞 CNE-2 的杀伤作用中, 细胞凋亡的机制比较明显, 然而整个细胞杀伤作用又不完全依赖于细胞凋亡的发生, 这主要与靶细胞的种类和性质有关。对于一些对细胞凋亡存在保护机制的靶细胞, 免疫毒素的这种双重机制使其同样能发挥杀伤靶细胞的作用, 从而免疫毒素的应用范围扩大。

免疫毒素作为一种结构形式较为简单的靶向治疗药物被广泛应用于科研和治疗领域, 有些已经成为处方药物。然而并不是所有具有良好抗原结合活性的抗体都适合于构建免疫毒素。以 DT, PE, Ricin 等为基础构建的免疫毒素, 发挥细胞毒性的先决条件是免疫毒素能有效地进入细胞内部。尽管近年出现了一系列由通过膜作用的毒素构建而成的新型免疫毒素, 例如以蜂毒肽构建的免疫毒素<sup>[13]</sup>, 但对其应用的研究还处在初级阶段, 短时间内还无法替代经典的免疫毒素形式。因此, 在构建免疫毒素之前对抗体的特异性和内化性质的评价就显得尤为重要。Becerril 等<sup>[14]</sup>于 1999 年建立了用活细胞从噬菌体抗体库中筛选内化抗体的方法。然而要从大量的抗体中筛选出适合于构建免疫毒素的抗体无

疑是耗时耗力的一项工作。Kohls 等<sup>[15]</sup>用羊抗鼠多克隆抗体与肥皂草素 (saporin) 构建而成的次级免疫毒素 (second immunotoxin) Mab-ZAP 作为通用的筛选工具, 对于能有效内化的鼠单克隆抗体可进行快速而有效的选择。

通过我们的研究发现, 在以 PE 构建的免疫毒素发挥生物学功能的整个过程中, 内化作用仍是关键。本实验中构建的 PE35 免疫毒素与相应的 PE38 免疫毒素相比, 活性并未显著提高, 且有一定的降低。虽然 PE35 免疫毒素进入细胞后无需经过蛋白酶切的作用, 但由于内化作用的下降, 使得蛋白酶切不再成为活性发挥的限速步骤之一, 因而其活性并未得到相应的提高。而内化作用降低的原因主要是细胞结合作用的降低。因此在构建免疫毒素前应对候选抗体-抗原进行综合评价。选择高特异结合活性并能够有效内化的抗体是先决条件, 另外, 在构建免疫毒素中, 选择何种构建形式使抗体的抗原结合作用尽可能不受影响也是非常重要的。在此基础上进行毒素的进一步优化和改造就会得到活性大大提高的免疫毒素。

## 参 考 文 献

- 1 FitzGerald D J. Recombinant immunotoxins. In: Chamow S M, eds. Antibody Fusion Proteins. Hoboken: Wiley-Liss, Inc. 1999. 111 ~ 126
- 2 Kreitman R J. Immunotoxins in cancer therapy. Curr Opin Immunol, 1999, 11 (5): 570 ~ 578
- 3 Morimoto H, Bonavida B. Diphtheria toxin and *pseudomonas* A toxin-mediated apoptosis. J Immunol, 1992, 149 (6): 2089 ~ 2094
- 4 Chang M P, Baldwin R L, Bruce C, et al. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. Science, 1989, 246 (4934): 1165 ~ 1168
- 5 Wick M J, Iglewski B H. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. In: Moss J, eds. ADP Ribosylating Toxins and G Protein. Washington DC: American Society of Microbiologist, 1990. 31
- 6 Keppler-Hafkemeyer A, Brinkmann U, Pastan I. Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. Biochemistry, 1998, 37 (48): 16934 ~ 16942
- 7 Seetharam S, Chaudhary V K, FitzGerald D, et al. Increased cytotoxic activity of *Pseudomonas* exotoxin and two chimeric toxins ending in KDEL. J Biol Chem, 1992, 149 (6): 2089 ~ 2094
- 8 Brinkmann U, Pai L H, FitzGerald D J, et al. B3 (Fv) - PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (19): 8616 ~ 8620
- 9 Mansfield E, Pastan I, FitzGerald D J. Characterization of RFB4-*Pseudomonas* exotoxin A immunotoxins targeted to CD22 on B cell malignancies. Bioconjug Chem, 1996, 7 (5): 557 ~ 563
- 10 Pastan I H, FitzGerald D J. Recombinant *pseudomonas* exotoxin with increased activity. US patent, C07K 14/21, 5, 602, 095. 1997-02-11
- 11 Mansfield E, Amlot P, Pastan I, et al. Recombinant RFB4

- immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors. *Blood*, 1997, **90** (5): 2020 ~ 2026
- 12 Nielsen U B, Marks J D. Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display library. *PSTT*, 2000, **3** (8): 282 ~ 291
  - 13 Dunn R D, Weston K M, Longhurst T J, *et al.* Antigen binding and cytotoxic properties of a recombinant immunotoxin incorporating the lytic peptide, melittin. *Immunotechnology*, 1996, **2** (3): 229 ~ 240
  - 14 Becerril B, Poul M A, Marks J D. Toward selection of internalizing antibodies from phage libraries. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **255** (2): 386 ~ 393
  - 15 Kohls M D, Lappi D A. Mab-ZAP: A tool for evaluating antibody efficacy for use in an immunotoxin. *BioTechniques*, 2000, **28** (1): 162 ~ 165

## Biological Functions of Anti-CEA Immunotoxins

HE Dan<sup>1)</sup>, YANG Hui<sup>2)</sup>, CHAO Kai<sup>3)</sup>, LIN Qing<sup>1)</sup>, HUANG Hua-Liang<sup>1)\*</sup>

<sup>1)</sup> *Institute of Genetics and Developmental Biology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;*

<sup>2)</sup> *School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China;*

<sup>3)</sup> *College of Life Science, Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)*

**Abstract** In order to reveal the events during the course of killing target cells of immunotoxins, two forms of *Pseudomonas* exotoxin A based immunotoxins against carcinoembryonic antigen (CEA) were constructed and named CEA (Fv) /PE38/KDEL and PE35/CEA (Fv) /KDEL. Antigen binding activity of the immunotoxins were assessed by flow cytometry, internalization of immunotoxins was detected by optical confocal microscopy and flow cytometry quantitatively. Cell apoptosis and necrosis were analyzed by staining the cells with FITC-annexin V/PI. The MTT method was used to assay the cytotoxicity of the immunotoxins. The biological functions of the two forms of immunotoxins in the different functional phases were compared. And the interaction between different functional phases was analyzed. The results revealed the whole functional process from the cell binding to the cytotoxicity of the immunotoxins, which provided more details about the biological functions of immunotoxins and could be valuable in the mechanism research and the optimization of immunotoxins.

**Key words** carcinoembryonic antigen (CEA), immunotoxins, antigen binding activity, endocytosis, apoptosis, cytotoxicity

\* Corresponding author. Tel: 86-10-64857285, E-mail: hlhuang@genetics.ac.cn

Received: October 23, 2003      Accepted: November 28, 2003