

肺腺癌靶向性超氧化物歧化酶的 构建及功能分析*

卢 敏 龚兴国** 汪辰卉 郑 乐 郭建军 章申峰

(浙江大学生命科学院生物大分子与酶工程研究所, 杭州 310027)

摘要 临床上, 超氧化物歧化酶 (SOD) 的低肿瘤细胞定位能力限制了其在抗肿瘤领域的广泛应用, 这一直是国内外学者们试图解决的难点. 研究中, 以基因工程方法连接念珠藻 Fe-SOD (iron-superoxide dismutase) 基因和抗 SPC-A-1 肺腺癌 LC-1 ScFv (single chain Fv) 基因, 并融合表达获得了 SOD-ScFv 融合蛋白. 纯化后 SOD-ScFv 表现出 SOD 和 ScFv 的双重活性. SPC-A-1 肺腺癌细胞中, 融合蛋白的异硫氰酸荧光素 (FITC) 染色追踪和自由基含量分析表明, SOD-ScFv 具备识别 SPC-A-1 肺腺癌细胞、透膜并清除胞内自由基的功能, 最终达到抑制肿瘤细胞生长的目的. 研究提出的靶向抗肿瘤机制将克服临床上 SOD 无目标趋向性和难于进入实体瘤的两大应用局限性, 并提供了一种利用 LC-1 ScFv 来靶向投递抗肿瘤药物的思路.

关键词 Fe-SOD, 单链抗体(ScFv), 融合表达, 靶向治疗

学科分类号 Q786

超氧化物歧化酶 (SOD) 是普遍存在于生物体内的一种能清除超氧阴离子自由基的金属酶, 按其结合金属离子的不同, 可分为 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD 和 Ni-SOD 四种. 自由基癌变学说认为, 生物体内过剩的自由基产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 攻击生物有机体, 引起基因突变, 诱发癌变^[1]. SOD 可以通过清除以 O_2^- 为主的 ROS 等来抑制肿瘤细胞的生长^[2], 如 HT29 肿瘤细胞等. 然而临床上, SOD 作为肿瘤治疗药物具有两个较大的缺陷: a. 对靶细胞的亲和力低, 不能专一地结合到目标部位, 导致对癌细胞缺乏特异性作用; b. SOD 必须在实体瘤细胞内才能更好地发挥其生物学作用, 天然 SOD 由于其分子质量较大, 基本不能进入细胞内, 只有少量 SOD 能通过内吞或其他方式透膜^[3], 导致药用 SOD 的胞内作用弱. 为此, 早在 1980 年就有人把 SOD 埋入脂质体中制成脂质体 SOD (liposome-SOD, L-SOD), 依靠 L-SOD 的类脂质结构, SOD 能很好地附着在细胞膜上, 并逐步向细胞内渗透. 利用基因工程方法, Park 等^[4]把 9 个赖氨酸残基融合到 SOD 的 N 端, 获得 9Lys-SOD 融合蛋白, 它能有效地穿透大鼠的表皮细胞和皮下层的真皮细胞. 但以上改造后的 SOD 并不能主动识别目标部位 (肿瘤细胞等), 大部分 SOD 散乱分布到体内各种正常

组织和细胞. 为靶向定位 SOD 到目标部位, Oyanagui 等^[5]将 SOD 基因与编码具有肝素硫酸亲和能力的短肽基因相融合, 表达获得的肝素结合性 SOD(HB-SOD) 具有较强的血管内皮细胞趋向性. 但此类 SOD 也未能克服天然 SOD 难于穿透细胞膜的局限性.

单链抗体(ScFv)在保持抗原抗体结合特异性的同时具有较小的分子质量, 易于到达靶组织, 是较为理想的靶向分子. LC-1 型 ScFv, 它可以高效作用于所有 4 种病理类型的肺癌细胞 (肺腺癌细胞, 肺鳞状癌细胞, 肺大癌细胞和肺小癌细胞), 但不作用于正常细胞和组织^[6]. 同时, 它可以识别并结合到肺癌细胞表面相应抗原, 通过受体调节的内吞途径而透膜^[7].

这提示以 LC-1 ScFv 为靶标的 SOD 作为一种肺癌治疗药物, 可以克服以上临床应用中的两大局限性. 本研究构建了 Fe-SOD 和 LC-1 ScFv 的融合载体, 并融合表达获得了具双重活性的靶向 SOD. 理论上, 此靶标 SOD 可以在 LC-1 ScFv 的引导下专一地识别肺腺癌细胞表面抗原, 并以抗原-抗体-SOD 复合物的形式通过受体调节的内吞途径透膜,

*浙江省自然科学基金资助项目(396007).

** 通讯联系人.

Tel: 0571-87951537, E-mail: gongxg@zju.edu.cn

收稿日期: 2005-06-13, 接受日期: 2005-07-29

最终清除胞内 ROS, 抑制 SPC-A-1 肺腺癌细胞的生长.

1 材料和方法

1.1 材料

杂交瘤细胞株 LC-1 总 RNA 逆转录产物 cDNA 由美国耶鲁大学 CHEN Liang 博士惠赠; 念珠藻 (*Nostoc commune* CHEN), 质粒 pET-SOD, T-ScFv, pET-28a(+), 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3), SPC-A-1 肺腺癌细胞系, AGS 胃癌细胞系, HepG2 肝癌细胞系为本研究所保存; 质粒抽提试剂盒, ROS 检测试剂盒购自碧云天公司; CCK-8 细胞计数试剂盒购自上海同仁化学研究所; 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶购自上海生工生物工程有限公司; 羊抗鼠 IgM 酶标二抗购自杭州艾康生物技术有限公司; 小牛血清购自杭州四季清生物工程材料有限公司; RPMI1640 培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司; 其余试剂均为进口或国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 pET-SOD-ScFv 融合载体的构建. 以含念珠藻 Fe-SOD 的 pET-SOD 质粒为模板, SOD-*Nco*I (5' CATGCCATGGCATTGTACAGCTCCCACTACCCCTTG, 含 *Nco*I 位点) 和 SOD-*Sal*I (5' GC-GTCTGACTCCGCCTCCACCAGCTTTGGCCAAGT-TTTC, 含 *Sal*I 位点和连接 link-1: GGGG) 为引物扩增 SOD 基因. 以含 LC-1 ScFv 的 T-ScFv 质粒为模板, ScFv-*Sal*I (5' ACGCGTCGACGTCCAAC-TGCAGGAGTCAG G, 含 *Sal*I 位点) 和 ScFv-*Not*I (5' ATAAGAATGCGGCCGCCTATTTGATCTCGA-GCTTGGTC, 含 *Not*I 和 TAG 终止密码子) 为引物扩增 ScFv 基因. 以 *Nco*I, *Sal*I 酶切上述 SOD 基因, 以 *Sal*I, *Not*I 酶切上述 ScFv 基因, 并重组至经 *Nco*I, *Not*I 酶切的 pET-28a(+) 载体, 构建成 pET-SOD-ScFv 融合载体 (图 1), 并转化至感受态 BL21 (DE3), 测序.

1.2.2 SOD 和 SOD-ScFv 的表达和纯化. 1 L 含 50 mg/L 抗生素的 LB 培养基中, IPTG 诱导表达工程菌 pET-SOD 和 pET-SOD-ScFv. 摸索诱导时 A_{600} 值, 温度, 诱导剂 IPTG 浓度和 Fe^{3+} 离子浓度, 表达时间等对蛋白质表达量和表达形式的影响. 5 000 g 离心 10 min 收集菌体, 溶于 50 ml TE (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 8.0), 于 200 W, 超声波破碎菌液 10 min, 12 000 g 离心

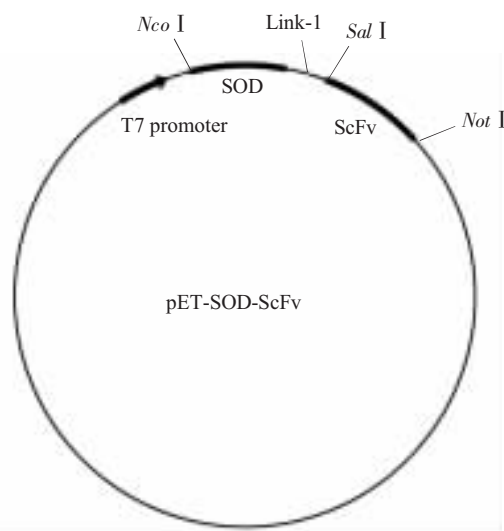


Fig. 1 The construction of pET-SOD-ScFv

30 min 收集上清和沉淀, 分别进行 10% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 分析表达结果. 工程菌 pET-SOD 超声波破碎获得沉淀 (SOD 包涵体) 分别用包涵体裂解液 I (1mmol/L EDTA, 5%甘油, 0.5% Triton X-100), 包涵体裂解液 II (包涵体裂解液 I 加 2 mol/L 尿素) 洗涤 2 次, 溶解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 0.3% SLS, 0.1 mmol/L 二硫苏糖醇) 溶解过夜. 将此变性液过 5 ml Ni^{2+} 树脂柱, 流速调整为 0.4 ml/min. 用 5 倍柱体积的咪唑浓度梯度 (0~500 mmol/L) 的洗脱缓冲液洗脱结合的蛋白质, 每份 3 ml 分管收集, 监测 A_{280} 值. 对含蛋白质洗脱峰收集管进行 10% SDS-PAGE, 分析目标蛋白分布. 工程菌 pET-SOD-ScFv 超声波破碎获得的沉淀以相同方法变性, 取 10 ml 变性液过 200 ml Sephadex-G100 分子筛柱, 流速控制在 0.2 ml/min, 以 2 倍柱体积的 TE 洗脱, 每份 4 ml 分管收集, 监测 A_{280} 值. 对含蛋白质洗脱峰收集管进行 10% SDS-PAGE, 分析目标蛋白分布. 4℃下, 以上纯化获得 SOD 和 SOD-ScFv 变性蛋白置于含 100 μ mol/L Fe^{3+} , 不含 SLS 的溶解缓冲液透析复性 72 h. 获得的蛋白质纯品以去离子水于 4℃下透析 24 h, 低温冻干, 液氮保存.

1.2.3 SOD 活性测定. 将纯化后 SOD 蛋白和 SOD-ScFv 融合蛋白溶于一定体积 PBS (pH=7.8), 用邻苯三酚自氧化法^[8]测定融合蛋白在 325 nm 处的自氧化抑制率. 控制邻苯三酚自氧化速率约 0.07/min, 抑制率约 50%, 计算蛋白质比活力.

1.2.4 ELISA 抗原结合能力测定. 以 5×10^4 个 / 孔

的 SPC-A-1 肺腺癌细胞悬于不含血清的 RPMI1640 培养液于 96 孔板, 将 LC-1 抗体 (0.01 g/L) 和各种浓度 SOD-ScFv (0, 0.1, 0.01, 0.001 g/L) 37℃ 温育 1.5 h, 羊抗鼠酶标二抗标记, 加入邻苯二胺溶液, 于暗处显色 15 min 后, 以 4 mol/L 硫酸终止反应, ELISA 仪测定 490 nm 的吸光度. 根据公式抑制率 IR (inhibitory rate) = $(1 - A_{\text{sample}} / A_{\text{positive control}}) \times 100\%$, 计算 SOD-ScFv 对 0.01 g/L LC-1 抗体的抑制率. 同时, 以 PBS 代替 LC-1 抗体做空白对照.

1.2.5 SOD-ScFv 透膜能力测定. 根据文献报道, 以异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 SOD 和 SOD-ScFv 蛋白, 方法基本同 Lindsay 等^[9]的方法: 0.1 μmol/L SOD 和 SOD-ScFv 溶于 10 ml 100 mmol/L pH 9.0 的碳酸盐缓冲液, 分别加入 10 μl 溶于 DMSO 的 FITC (控制蛋白质和 FITC 摩尔比约 1:3), 混匀, 室温暗处放置 12 h. 4℃ 下, 标记样品在 pH 8.0 PBS 中透析 72 h, 中间换液 6 次. 混合液过 200 ml Sephadex-G25 柱, 流速控制在 0.2 ml/min, 以 1.5 倍柱体积的 pH 8.0 PBS 洗脱, 收集第一个荧光洗脱峰, 进行 10% SDS-PAGE 分析. 10 μmol/L 纯品 FITC-SOD 和 FITC-SOD-ScFv 置于紫外分光光度计下, 测量 A_{495} 和 A_{280} , 根据公式 $F/P = 2.87 A_{495} / (A_{280} - 0.35 A_{495})$ 计算 F/P 值, 比较 FITC 结合效果. 在 RPMI1640 中, 接种 SPC-A-1 肺腺癌细胞 1.8 ml (5×10^5 个/ml) 于 6 孔板, 37℃, 5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h. 加 FITC-SOD-ScFv 至 0.2 μmol/L, (对照组加 PBS, FITC-SOD 至 0.2 μmol/L), 混匀, 继续培养 30 min, PBS 洗涤细胞 3 次除去胞外荧光物质, 于激光共聚焦显微镜 (LSM 510, Zeiss, 德国) 相同参数下 (参数设置为 488 nm 激发波长, 500~550 nm 发射波长, pinhole 为 1 000), 检测细胞内 FITC 荧光.

1.2.6 SOD-ScFv 胞内 ROS 清除能力测定. 为观测透膜后 SOD-ScFv 的 ROS 清除能力, 我们用过量 DCFH-DA (2',7'-二乙酰二氯荧光素) 对胞内 ROS 进行染色. DCFH-DA 本身没有荧光, 它自由透膜后被胞内 ROS 氧化成 DCF (2',7'-二氯荧光素), DCF 不能透膜, 并在 488 nm 下受激发, 在 525 nm 波长发出绿色荧光. 在 RPMI1640 中, 接种 SPC-A-1 肺腺癌细胞 1.8 ml (5×10^5 个/ml) 于 6 孔板, 37℃, 5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h. 加入 SOD-ScFv 融合蛋白至 0.2 μmol/L (对照组分别加 PBS, SOD 至 0.2 μmol/L), 混匀, 再培养 30 min. 以无血清 RPMI1640 培养液洗涤细胞 3 次, 按

ROS 检测试剂盒所示, 加入 10 μmol/L DCFH-DA 0.5 ml, 继续培养 20 min, 胰酶消化贴壁细胞, 以 PBS 洗涤细胞 3 次, 收集细胞. 置于流式细胞仪 (Becton Dickinson FAC sort, 美国) 于相同参数下, 比较每组中 10^4 个细胞的平均荧光强度.

1.2.7 SOD-ScFv 靶向杀伤能力测定. 将 SPC-A-1 肺腺癌细胞 (同时以 AGS 胃癌细胞, HepG2 肝癌细胞做对照) 接种 90 μl (5×10^5 个/ml) 于 96 孔板, 37℃, 5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h. 按设定的浓度梯度 (0.2, 0.5, 1, 2 μmol/L) 加融合蛋白 10 μl (对照组加 PBS, 相同梯度浓度 SOD), 混匀, 继续培养 48 h. 按 CCK-8 试剂盒^[10]所示, 每孔加入 CCK-8 试剂 10 μl, 混匀, 继续培养 1 h, 450 nm 下测定吸收吸光度, 进行细胞计数.

1.2.8 SOD-ScFv 对 SPC-A-1 肺腺癌细胞生长状态的影响. 按上述靶向杀伤能力测定方法分别以 PBS, 0.2 μmol/L 终浓度 SOD 和相同浓度 SOD-ScFv 刺激细胞 48 h, 于激光共聚焦显微镜下观察细胞形态. 以胰酶消化 PBS 组和 SOD-ScFv 组贴壁细胞, 1 000 g 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗涤细胞 3 次, 加入冰预冷的 70% 乙醇, 4℃ 固定 1 h, 弃去固定液, PBS 洗涤 2 次, 1 ml PI 染液 4℃ 避光染色 30 min. 置于流式细胞仪分析细胞周期分布.

2 结 果

2.1 pET-SOD-ScFv 载体的构建

研究在 SOD 和 ScFv 基因序列之间加上了柔性小侧链的甘氨酸连接肽 (Link-1: GGGG), 以最大可能减小 SOD 与 ScFv 的空间干扰, 以保证两者活性. 测序结果表明 (图 2), pET-SOD-ScFv 目标载体已构建成功.

2.2 SOD 和 SOD-ScFv 的表达和纯化

目标载体诱导表达时, 我们发现在培养基中加入一定浓度 Fe^{3+} , 在一定程度上提高目标蛋白的表达量, 而对蛋白质的表达形式没有影响: SOD 和 SOD-ScFv 蛋白全部以包涵体形式表达. 表达条件的正交分析表明: pET-SOD 载体在 1 L LB 培养基中, 37℃ 培养至 $A_{600} = 0.5$ 时, 0.5 mmol/L IPTG (异丙基-β-D-硫代半乳糖苷) 和 200 μmol/L Fe^{3+} 下诱导表达 5 h, SOD 获得高效表达, 其分子质量约 28 ku, 约占全菌蛋白的 66% (图 3a). pET-SOD-ScFv 载体在 1 L LB 培养基中, 30℃ 培养至 $A_{600} = 0.4$ 时, 0.5 mmol/L IPTG, 300 μmol/L Fe^{3+} 条件下诱导表达 3 h, SOD-ScFv 获得高效表达, 其分子质量约

为证明 SOD-ScFv 在 ScFv 靶向下的透膜能力, 我们使用 FITC 对 SOD-ScFv 进行化学标记, FITC 标记后蛋白质在 488 nm 下受激发, 能在 525 nm 下发出绿色荧光。纯化后 FITC-SOD 的 F/P 值为 3.90, FITC-SOD-ScFv 的 F/P 值为 3.04, 一般来说 F/P 值

越高，表明目标蛋白分子上结合的 FITC 越多，这表明 SOD 具有更多的适合于 FITC 结合赖氨酸残基的空间结构. 我们将获得的 FITC-SOD-ScFv 与肿瘤细胞共培养，通过观察胞内是否含有 FITC 荧光来确定其透膜能力. 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 SOD-ScFv

与 SPC-A-1 肺腺癌细胞共培养 30 min 后，我们在细胞内明显观察到绿色荧光，荧光散乱分布于胞内各个部位 (图 5c)，而 PBS 组和 SOD 对照组却没有观察到明显荧光 (图 5a, 5b)，表明 SOD-ScFv 具有一定的透膜能力.

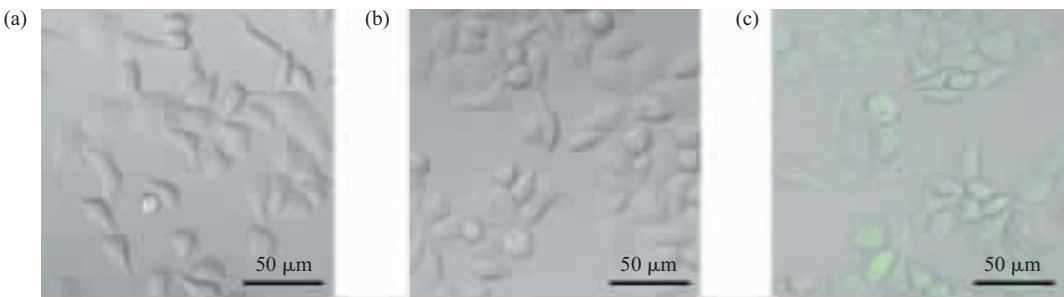


Fig. 5 Fluorescent SPC-A-1 cells after incubating in protein with FITC

(a) SPC-A-1 cells incubated with PBS (Control). (b) B SPC-A-1 cells incubated with FITC-SOD (0.2 $\mu\text{mol/L}$) .
(c) SPC-A-1 cells incubated with FITC-SOD-ScFv (0.2 $\mu\text{mol/L}$)

2.6 SOD-ScFv 胞内 ROS 清除能力测定

流式细胞仪测定结果表明：与 PBS 处理后的 SPC-A-1 肺腺癌细胞内 ROS 含量相比 (图 6a, 10^4 个癌细胞平均荧光强度为 22.56 道)，0.2 $\mu\text{mol/L}$

SOD-ScFv 处理以后的胞内 ROS 含量大大下降 (图 6c, 10^4 个癌细胞平均荧光强度为 7.83 道)，而 SOD 对照组却基本没有变化 (图 6b, 10^4 个癌细胞平均荧光强度为 22.17 道).

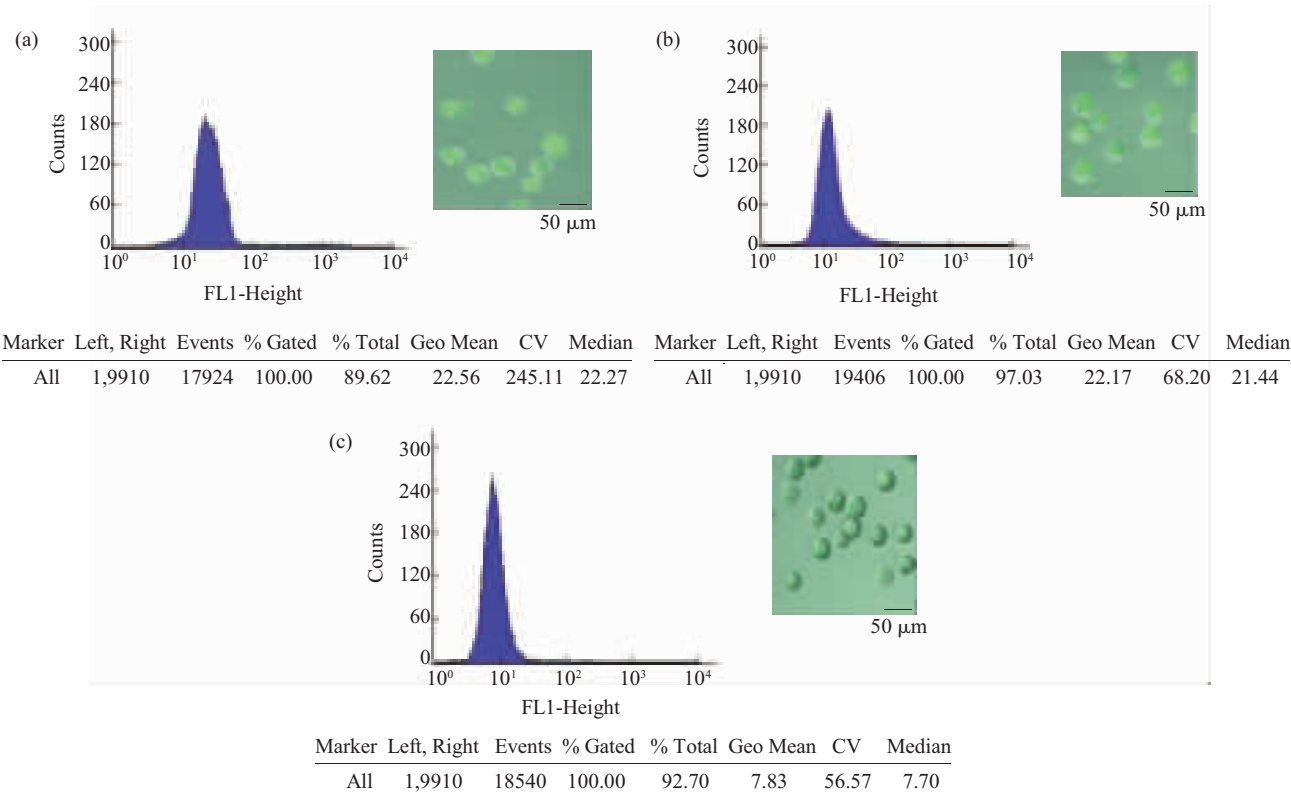


Fig. 6 Quantification of ROS in SPC-A-1 cells after incubated with different sample

(a) SPC-A-1 cells incubated with PBS (control). (b) SPC-A-1 incubated with SOD (0.2 $\mu\text{mol/L}$). (c) SPC-A-1 cells incubated with FITC-SOD-ScFv (0.2 $\mu\text{mol/L}$).

2.7 SOD-ScFv 靶向抑制能力测定

我们将 SOD-ScFv 与 SPC-A-1 肺腺癌细胞共培养 48 h, 通过检测最终癌细胞数量来确定其对癌细胞的杀伤能力. 相比于 0.2 $\mu\text{mol/L}$ SOD (1 100 U/mg) 对癌细胞 5.3% 的抑制率, 同浓度的 SOD-ScFv (650 U/mg) 对 SPC-A-1 肺腺癌细胞的抑制率为 48.4% ($IC_{50}=0.21 \mu\text{mol/L}$), 而对 AGS 胃癌和 HepG2 肝癌细胞, 却基本没有抑制作用 (图 7), 这表明了融合蛋白具有对 SPC-A-1 肺腺癌细胞的专一抑制能力.

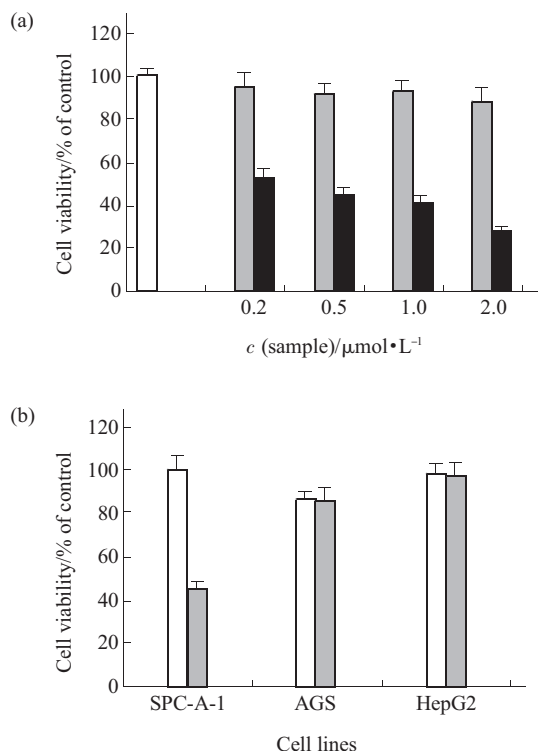


Fig. 7 Effect of SOD-ScFv on SPC-A-1 cells viability

(a) Effect of SOD-ScFv on cell viability of SPC-A-1 cells. $\square$: 48 h PBS; $\blacksquare$: 48 h SOD; $\blacksquare$: 48 h SOD-ScFv. (b) Effect of SOD-ScFv on cell viability of SPC-A-1 cells, AGS cells, HepG2 cells. $\square$: PBS; $\blacksquare$: 0.2 $\mu\text{mol/L}$ SOD-ScFv.

2.8 SPC-A-1 肺腺癌细胞受 SOD-ScFv 刺激后形态学观察

相比于正常 SPC-A-1 肺腺癌细胞的不规则形状, 较强的贴壁能力 (图 8 a), 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的融合蛋白刺激 48 h 以后, 细胞变圆, 贴壁能力明显下降, 少数细胞漂浮, 表明细胞生长状态受到很大影响 (图 8b).

细胞周期研究发现, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ SOD-ScFv 处理 SPC-A-1 肺腺癌细胞 48 h 后, G0/G1 期细胞含量达 65.99% (PBS 空白组和 SOD 对照组分别为

52.99%, 55.71%), S 期细胞含量达 24.87% (PBS 空白组和 SOD 对照组分别为 41.95%, 39.44%).

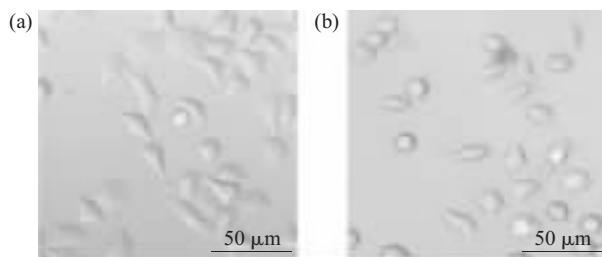


Fig. 8 Morphocytology of SPC-A-1 cells after incubated with SOD-ScFv and paraquat

(a) SPC-A-1 cells incubated with PBS (control). (b) SPC-A-1 cells incubated with SOD-ScFv (0.2 $\mu\text{mol/L}$).

3 讨 论

融合蛋白诱导表达过程中, 我们在培养基中加入一定量的 Fe^{3+} , 发现在一定程度上可以增加融合蛋白的表达量, 我们推测, 适量的 Fe^{3+} 有两个作用: a. 可以弥补对数生长期融合蛋白高效表达而消耗的大量 Fe^{3+} ; b. Fe^{3+} 在编码 Fe-SOD 过程中还可能起到催化基团的作用^[11].

很多事实证明, 自由基在生物体内发挥重要生理作用的同时, 在一定条件下又成为损害生物机体的内在因子. 线粒体细胞色素 c (Cyt c) 接受 4 个电子生成水的过程中, 约有 1% 的电子泄漏, 经呼吸链旁路反应生产 ROS. Hennen 等^[12]发现, O_2^- 等 ROS 的产生受到鱼藤酮、抗霉素 A、氰化物影响, 暗示线粒体成为胞内 ROS 的主要来源. 图 6a 可以观察到胞内自由基主要集中在某些区域, 我们推测此区域即为线粒体周围区域. 大量研究表明病变癌细胞内含明显高于正常细胞的 ROS 含量和低于正常细胞的 SOD 活力, 这也是肿瘤细胞区别于正常细胞的一个明显特征. Pervaiza 等^[13]根据人黑素瘤 M14 细胞中的这两个现象分析推测, 肿瘤细胞在高 ROS 含量的环境中更适于生存. 体内试验表明, 具有艾氏腹水瘤的动物在接受 SOD 皮下注射后, 生存期显著延长. 这暗示, 如果人为提高肿瘤细胞胞内的外源 SOD 含量, 将抑制肿瘤细胞的生长, 表现在荷瘤动物上即可以延长其生存期. 我们研究发现, 在人为引入比活力为 650 U/mg SOD-ScFv 30 min 后, SPC-A-1 肺腺癌细胞内 ROS 含量明显下降 (图 6c), 在以后 48 h 内的生长速度大大降低, 形态学上, 细胞变圆, 贴壁能力明显下降, 部分细胞漂浮, 细胞生长状态也受到很大影响 (图 8b),

在细胞周期分布上, SOD-ScFv 处理后 G0/G1 期的细胞比例增加 13.00%, S 期的细胞比例减少 17.08%。这表明 SOD-ScFv 对癌细胞生长状态和生长速度有较大影响, 这可能与细胞周期的延迟及胞内低 ROS 水平有关。Yuki 等^[14]认为胞内 ROS 水平对于细胞从 G1 期到 S 期的转变至关重要, 因为 ROS 的水平和 PI3K/PKB, IL-3, GM-CSF 等蛋白激酶的表达水平相关, 它在肿瘤细胞内扮演着启动细胞生长、转化、成熟和凋亡等第二信使的作用^[15]。Malumbres 等^[16]研究发现, 肿瘤细胞 G1 期的阻滞、DNA 合成的减慢, 一般和 pRb 激酶、p16^{Ink4} 肿瘤抑制因子相关: pRb 作为一种周期蛋白 D1 依赖的 CDK4/6 激酶, 其磷酸化的抑制将阻止肿瘤细胞通过 G1 期。肺癌细胞 ROS 水平的下调, 将促使 p16^{Ink4} 蛋白的表达上调, 最终导致 G0/G1 期细胞的积累^[17]。

SOD 作为肿瘤治疗药物有两个较大的应用缺陷: 低肿瘤细胞定位能力和低透膜能力, 临床上只能用增加 SOD 的给药量来弥补这两个缺陷。研究中, 我们试图以 ScFv 为靶标修饰 SOD 来解决以上两个缺陷。我们将 FITC 荧光标记的 SOD-ScFv 与 SPC-A-1 肺腺癌细胞共培养, 30 min 后在肿瘤细胞内发现 FITC 荧光, 表明 SOD-ScFv 的透膜能力。我们还发现 SOD-ScFv 处理 1 h 后的 SPC-A-1 肺腺癌细胞生长速度明显下降, 而对 AGS 胃癌细胞, HepG2 肝癌细胞却没有明显作用, 表明 SOD-ScFv 对肺腺癌的专一识别能力。根据上述试验现象和 LC-1 ScFv 与其抗原的作用机理, 我们提出 SOD-ScFv 的靶向抗肿瘤机制: 融合蛋白中 LC-1 ScFv 对肺腺癌细胞表面抗原的识别能力, 可以促使外加 SOD 高浓度地聚集并结合到 SPC-A-1 肺腺癌细胞表面, 然后以抗原-抗体-SOD 复合物的形式通过受体调节的内吞方式被癌细胞内吞, 形成内吞小泡, 之后部分复合物从内吞小泡中逃逸到胞质, 随机扩散到线粒体周围, 并清除周围的 ROS, 胞内 ROS 含量的降低使 pRb 激酶磷酸化受到抑制, p16^{Ink4} 上调, 导致细胞停滞在 G0/G1 期, 最终影响了 SPC-A-1 肺腺癌细胞的生长状态和生长速度。目前, 如何使内吞复合物从内吞小泡中逃逸, 避免进入溶酶体而被降解, 是国内外研究的一个难点。研究发现某些小肽具有帮助内吞蛋白逃出内吞小泡的功能^[18]。另外, Retinoic acid 等可以通过将高尔基网膜的改变, 来干扰内吞小泡的胞内途径^[19]。以后, 我们将会把 SOD-ScFv 与这些小肽相偶联,

并用联合给药 (如 Retinoic acid) 的方式来提高 SOD-ScFv 的靶向抗肺癌的效果。

实现 SOD 对肿瘤细胞的专一识别和透膜吸收能力一直是肿瘤治疗中的研究难点, 尚无通过增加细胞外源 SOD 含量来达到高效抗肿瘤的研究。研究中, 我们构建表达获得了具有双重活性的 SOD-ScFv 融合蛋白, 同时, 它能靶向识别 SPC-A-1 肺腺癌细胞并在短时间内透膜并清除胞内 ROS, 最终抑制了细胞的生长。因此, 这种 SOD 将具有更高的抗肿瘤药效和使用安全性。同时, 研究提出的在基因水平上以 ScFv 为靶标来修饰抗肿瘤药物的新思路, 将具有一定的现实意义。

参考文献

- Schwarz M, Kunz W, Furstenberger G, *et al.* On the role of superoxide anion radicals in skin tumour promotion. *Carcinogenesis*, 1984, **5** (12): 1663~1670
- Ying Z, Hannah J, Frederick E, *et al.* Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res*, 2002, **62** (4): 1205~1212
- Delanian S, Bravard A, Luccioni C, *et al.* Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage. *Radiother Oncol*, 2001, **58** (3): 325~331
- Park, J, Jin L H, Bahn J H, *et al.* 9-polylysine protein transduction domain: enhanced penetration efficiency of superoxide dismutase into mammalian cells and skin. *Mol Cells*, 2002, **13** (2): 202~208
- Oyanagui Y, Inoue M. Inhibition of carrageenan-induced paw edema by superoxide dismutase that binds to heparan sulfates on vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, 1991, **42** (5): 991~995
- Ge X R, Lin S J, Yu N X, *et al.* McAb LC-1 against human lung cancer. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1989, **22** (3): 359~365
- Xie W, Ge X R. Internalization of tumor associated antigen on human lung adenocarcinoma cell line SPC-A-1 by McAb LC-1. *Acta Biologicae Experimentalis Sinica*, 1996, **29** (3): 207~219
- Marklund S. Involvement of the superoxide anionradical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974, **47** (3): 469~474
- Lindsay M P, Tamas L, Appels R, *et al.* Direct evidence that the number and location of cysteine residues affect glutenin polymer structure. *J Cereal Sci*, 2000, **31** (13): 321~333
- Hideyuki T, Munetaka I, Fumio O, *et al.* A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Anal Commun*, 1999, **36** (2): 47~50
- Young C K, Anne J. Anderson, Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron- and manganese-superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. *Gene*, 1999, **239** (1): 129~135
- Hennet T, Peterhans E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells.

- Biochem J, 1993, **289** (2): 587~592
- 13 Pervaiza S, Hirpara J L, Clement M V. Superoxide anion inhibits drug-induced tumor cell death. FEBS letters, 1999, **459** (3): 343~348
- 14 Yuki S, Shoji K, Hajime K, *et al.* Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. J Biol Chem, 2002, **277** (11): 9614~9621
- 15 Suh Y A, Lassegue B, Shi J, *et al.* Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. Nature, 1999, **401** (6748): 79~82
- 16 Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. Nat Rev Cancer, 2001, **1** (3): 222~231
- 17 Cao M Y, Feng N P, Raed A, *et al.* NC381, a Novel anticancer agent, arrests the cell cycle in G0-G1 and inhibits lung tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. J Pharmacol ExTher, 2004, **308** (2): 538~546
- 18 Terra B, Potocky, Samuel H. Gellman, Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT~derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. J Biol Chem, 2003, **278** (50): 50188~50194
- 19 Wu Y N, Cheng T, Youle R J. Retinoic acid disrupts the Golgi apparatus and increases the cytosolic routing of specific protein toxins. J Cell Biol, 1994, **125** (4): 743~753

Construction and Functional Characterization of Lung Adenocarcinoma Targeting SOD *

LU Min, GONG Xing-Guo**, WANG Chen-Hui, ZHENG Le, GUO Jian-Jun, ZHANG Shen-Feng

(Institute of Biologic Macromolecule and Enzyme Engineering, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract In clinic, the low tumour-targeted ability of SOD is a critical shortage in its application, which is a difficulty for scientist at all time. For solving this problem, *Nostoc commune* CHEN iron-superoxide dismutase (Fe-SOD) and anti-lung adenocarcinoma LC-1 single chain Fv (ScFv) were fused, and the fusion protein named SOD-ScFv was expressed. After purification, fusion protein demonstrated both SOD and LC-1 antibody activities. The result of tracing of SOD-ScFv by FITC dyeing and quantification of ROS(reactive oxygen species) in SPC-A-1 (lung adenocarcinoma) cells showed that the fusion protein possessed the ability to recognize SPC-A-1 cells and eliminate the cellular ROS. The tumour-targeted theory put up in this research will overcome two applied disadvantages of SOD in clinic: it neither target the tumour cell nor permeates through the cell membrane. Also, the research provides a feasible idea that ScFv can be used to target the anticancer drug to tumour.

Key words Fe-SOD, single chain antibody (ScFv), fusion expression, target therapy

*This work was supported by a grant from The Zhejiang Natural Science Foundation of China (396007).

**Corresponding author . Tel: 86-571-87951537, E-mail: gongxg@zju.edu.cn

Received: June 13, 2005 Accepted: July 29, 2005