

重组腺相关病毒载体表达抗表皮生长因子受体抗体对胰腺癌细胞株抑制作用的研究

万世奇 张太平 王天笑 郑莲芳 李方 李汇华

【摘要】 目的 构建能在体内长期表达抗表皮生长因子受体(EGFR)抗体的重组腺相关病毒(rAAV)载体,观察其对胰腺癌细胞株的抑制作用。**方法** 将抗人 EGFR 单链抗体可变区(SCFV)基因插入腺相关病毒载体的 Kpn I 和 Bgl II 位点,构建含抗 EGFR 单链抗体基因的重组腺相关病毒载体(rAAV-anti EGFR)。设立对照组(rAAV1-EGFP 组)和实验组(rAAV1-anti EGFR 组),观察抗 EGFR 单链抗体蛋白的表达情况。采用 Western blot 检测抗体蛋白的表达、CCK-8 法和流式细胞仪检测 6 种人胰腺癌细胞株(PCT-3、SW1990、Capan-1、ASPC-1、MiaPaCa-2 及 PANC-1 细胞)的抑制率和凋亡率。两组比较采用 *t* 检验。**结果** 抗 EGFR 单链抗体蛋白能在 6 种人胰腺癌细胞株中表达,对照组和实验组胰腺癌 ASPC-1 细胞抑制率分别为 $1.1\% \pm 2.4\%$ 和 $15.1\% \pm 3.5\%$, 两组比较,差异有统计学意义($t = 6.598, P < 0.05$)。对照组和实验组 PANC-1 细胞凋亡率分别为 $7.0\% \pm 3.0\%$ 和 $11.4\% \pm 2.5\%$, 两组比较,差异无统计学意义($t = 1.952, P > 0.05$);对照组和实验组 SW1990、ASPC-1、Capan-1、PCT-3、MiaPaCa-2 细胞凋亡率分别为 $1.1\% \pm 0.8\%$ 、 $1.5\% \pm 0.7\%$ 、 $1.7\% \pm 1.2\%$ 、 $1.1\% \pm 0.7\%$ 、 $2.2\% \pm 1.1\%$ 和 $17.6\% \pm 2.2\%$ 、 $46.9\% \pm 3.9\%$ 、 $20.0\% \pm 2.8\%$ 、 $12.1\% \pm 1.6\%$ 、 $31.1\% \pm 2.5\%$, 两组比较,差异均有统计学意义($t = 12.208, 19.846, 10.405, 10.909, 18.327, P < 0.05$)。**结论** 成功构建了携带抗 EGFR 单链抗体基因的 rAAV 载体,其表达的抗 EGFR 单链抗体蛋白对胰腺癌细胞株有明显的抑制作用。

【关键词】 胰腺肿瘤; 表皮生长因子受体; 重组腺相关病毒载体

Inhibition effect of anti-epidermal growth factor receptor antibody mediated by recombinant adeno-associated virus vector on pancreatic cancer cell lines WAN Shi-qi, ZHANG Tai-ping, WANG Tian-xiao, ZHENG Lian-fang, LI Fang, LI Hui-hua. Department of Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China Corresponding author: ZHANG Tai-ping, Email: tpingzhang@yahoo.com

【Abstract】 Objective To construct a recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector containing a human anti-epidermal growth factor receptor (anti-EGFR) single-chain variable fragment antibody gene, and observe its inhibitory effects on pancreatic cancer cell lines. **Methods** Human anti-EGFR single-chain variable fragment antibody gene was inserted into the Kpn I and Bgl II sites to construct a rAAV-anti EGFR vector, and then rAAV1-EGFP group and rAAV1-anti EGFR group were established. The expression of anti-EGFR antibody was observed. Antibody expression was detected by Western blot, and the inhibition and apoptosis rates of human pancreatic cancer cell lines (PCT-3, SW1990, Capan-1, ASPC-1, MiaPaCa-2 and PANC-1 cells) were detected by CCK-8 assay and flow cytometry, respectively. All data were analyzed using the *t* test. **Results** The results of Western blot assay demonstrated that anti-EGFR antibody was expressed in 6 pancreatic cancer cell lines. The inhibition rates of rAAV1-EGFP and rAAV1-anti EGFR on pancreatic ASPC-1 cells were $1.1\% \pm 2.4\%$ and $15.1\% \pm 3.5\%$, respectively, with a significant difference between the 2 groups ($t = 6.598, P < 0.05$). The apoptosis rates of PANC-1 cells were $7.0\% \pm 3.0\%$ in the rAAV1-EGFP group and $11.4\% \pm 2.5\%$ in the rAAV1-anti EGFR group, with no significant difference between the 2 groups ($t = 1.952, P > 0.05$). The apoptosis rates of SW1990, ASPC-1, Capan-1, PCT-3, MiaPaCa-2 cells were $1.1\% \pm 0.8\%$, $1.5\% \pm 0.7\%$, $1.7\% \pm 1.2\%$, $1.1\% \pm 0.7\%$ and $2.2\% \pm 1.1\%$ in the rAAV1-EGFP group, and $17.6\% \pm 2.2\%$, $46.9\% \pm 3.9\%$, $20.0\% \pm 2.8\%$, $12.1\% \pm 1.6\%$ and $31.1\% \pm 2.5\%$ in the rAAV1-anti EGFR group, respectively, with significant differences between the 2 groups ($t = 12.208, 19.846, 10.405, 10.909, 18.327, P < 0.05$). **Conclusions** A rAAV-anti EGFR vector with human anti-EGFR single-chain variable fragment antibody gene was constructed. Anti-EGFR antibody has obvious inhibition effects on pancreatic cancer cell lines.

【Key words】 Pancreatic neoplasms; Epidermal growth factor receptor; Recombinant adeno-associated virus vector

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2011.04.013

基金项目: 国家自然科学基金(30571812)

作者单位: 100730 北京协和医院外科(万世奇、张太平、王天笑),核医学科(郑莲芳、李方),基础所病理科(李汇华)

通信作者: 张太平, Email: tpingzhang@yahoo.com

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是一种表达于多种细胞表面的跨膜受体酪氨酸激酶。在胰腺癌中,EGFR 可高度表达和异常活化,从而抑制细胞凋亡,促进细胞增殖、浸润和转移^[1]。目前,针对 EGFR 的靶向治疗已成为肿瘤治疗的热点之一。本研究通过利用噬菌体抗体库获得的抗人 EGFR 单链抗体可变区(single-chain variable-fragment, SCFV)基因插入到腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体上,将 EGFR 靶向治疗和 AAV 介导的基因治疗相结合,以期获得治疗胰腺癌的有效方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料

重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体质粒 pSNAV 及携带绿色荧光蛋白基因的 rAAV 载体(rAAV1-EGFP)均购自北京本元正阳基因技术有限公司;SCFV 抗体基因由上海生工生物工程技术有限公司合成并测序验证;人胚肾 293 细胞和 6 种人胰腺癌细胞株(PCT-3、SW1990、Capan-1、ASPC-1、MiaPaCa-2 及 PANC-1 细胞)由德国海德堡大学外科医院 Friess 教授惠赠;兔 c-myc(A-14) IgG 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;山羊抗兔 IgG-HRP 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;Annexin V-FITC 试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.2 载体构建和病毒包装

将 SCFV 抗体基因插入 pSNAV 质粒的多克隆位点 Kpn I 和 Bgl II 中,前面加上 Kozak 序列和 IG 信号肽序列,构建成含抗 EGFR 单链抗体基因的重组腺相关病毒载体(rAAV-anti EGFR),并通过酶切和测序鉴定。由北京本元正阳基因技术有限公司应用 AAV Max™ 系统将其包装为 I 型重组腺相关病毒载体(rAAV1-anti EGFR)。

1.3 Western blot 检测抗 EGFR 单链抗体蛋白的表达

设立对照组(rAAV1-EGFP 转染 PCT-3 细胞)和实验组(rAAV1-anti EGFR 分别转染人胚肾 293 细胞、PCT-3 细胞、ASPC-1 细胞、PANC-1 细胞、SW1990 细胞、MiaPaCa-2 细胞及 Capan-1 细胞)。将细胞接种于 6 孔培养板,培养 4 h,待细胞贴壁后,吸出培养基,PBS 洗涤 2~3 次,加入 2 ml 无血清和抗生素的 RPMI 1640 培养基。对照组和各实验组分别加入 2 μ l/孔 rAAV1-EGFP 和 2 μ l/孔 rAAV1-anti EGFR(滴度均为 1×10^{12} v. g/ml),培养 8 h 后,用单去污

剂裂解液收集蛋白,进行 Western blot 实验,采用 c-myc 标签抗体检测 rAAV1-anti EGFR 的表达水平。

1.4 CCK-8 法检测胰腺癌 ASPC-1 细胞增殖情况

将 ASPC-1 细胞分为 4 组,分别是空白对照组、单纯培养基组、对照组(rAAV1-EGFP 组)和实验组(rAAV1-anti EGFR 组)。将细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,培养 4 h 后,PBS 洗涤 2~3 次,加入 200 μ l 无血清和抗生素的 RPMI 1640 培养基,对照组和实验组转染滴度同 Western blot 法。培养 8 h 后,更换为有血清和抗生素的 RPMI 1640 培养基,继续培养 16 h,PBS 洗涤 2~3 次,分别加入 100 μ l 有血清和抗生素的 RPMI 1640 培养基及 10 μ l CCK-8 试剂,孵育 2 h,于酶标仪上 450 nm 波长测定其吸光度(A)值,630 nm 作为参比波长,本实验重复 4 次。细胞抑制率 = $(1 - \frac{\text{实验组平均 A 值} - \text{空白对照组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值} - \text{空白对照组平均 A 值}}) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪检测胰腺癌细胞凋亡率

分别将 6 种人胰腺癌细胞株按 2×10^4 个/孔接种于 6 孔板,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,培养 4 h。每种细胞株均分为对照组(rAAV1-EGFP 组)和实验组(rAAV1-anti EGFR 组),转染滴度同 Western blot 法。培养 24 h。使用 BD 公司的 Annexin V-PE 和 7-AAD 试剂盒及 BD FACSAria 流式细胞仪分析细胞凋亡比例。每种细胞株凋亡试验均重复 3 次。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

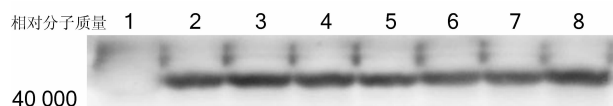
2.1 抗 EGFR 单链抗体蛋白在人胚肾 293 细胞及 6 种人胰腺癌细胞株中的表达

Western blot 检测结果显示,rAAV1-anti EGFR 转染人胚肾 293 细胞和 6 种人胰腺癌细胞株后,以上细胞株均能够有效表达抗 EGFR 单链抗体。将 SCFV 抗体基因序列输入 DNAMAN 4.0 软件,测算出目的蛋白的相对分子质量约为 42 000,与 Western blot 法检测结果符合。见图 1。

2.2 rAAV1-anti EGFR 对胰腺癌 ASPC-1 细胞增殖的影响

rAAV1-anti EGFR 对 ASPC-1 细胞的抑制率为 $15.1\% \pm 3.5\%$,rAAV1-EGFP 对 ASPC-1 细胞的抑制

率为 $1.1\% \pm 2.4\%$, 两者比较, 差异有统计学意义 ($t = 6.598, P < 0.05$)。



1: 对照细胞 (PCT-3 细胞); 2: 人胚肾 293 细胞; 3: PCT-3 细胞; 4: ASPC-1 细胞; 5: PANC-1 细胞; 6: SW1990 细胞; 7: MiaPaCa-2 细胞; 8: Capan-1 细胞

图 1 Western blot 法检测抗 EGFR 单链抗体蛋白表达情况

2.3 6 种人胰腺癌细胞株凋亡率的变化

6 种人胰腺癌细胞株转染 rAAV1-anti EGFR 后, 均发生凋亡, 除了 PANC-1 细胞以外, 其余实验组细胞凋亡率与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

3 讨论

3.1 关于 EGFR 的靶向治疗

EGFR 是 ErbB 家族中的一员, 其天然配体是表皮生长因子和转化生长因子 α 。当配体和受体结合后, 可启动下游信号传导通路, 主要包括 Ras-Raf-MAP-Kinase 和 PI3K-Akt 等信号传导通路, 调节细胞的分裂、存活、浸润、黏附和细胞修复等生物学行为^[2]。在多种上皮源性肿瘤中 (包括胰腺癌) 均发现 EGFR 高度表达及异常活化。EGFR 失控导致的恶性生物学行为包括: 促进细胞增殖和成熟、抑制细胞凋亡、促进细胞浸润和转移、促进血管形成等^[3]。因此, EGFR 已成为肿瘤靶向治疗中一个重要的靶点和热点^[4]。

目前, 已开发出一些针对 EGFR 的单克隆抗体, 主要有 C225、ABX-EGF、EMD72000、RH3、MDX-447 等。其中很多在体内实验中具有抗肿瘤作用, 与放、化疗联合应用能提高其疗效^[5]。但是, 此类抗体最大的问题是, 它们多属人鼠嵌合的抗体, 具有一定的免疫原性, 很多患者可产生抗抗体, 从而降低其效应。而且, 单克隆抗体属外源性蛋白制剂, 费用昂贵, 半衰期短, 需重复注射才能发挥其抑制 EGFR 的作

用, 中断治疗将导致肿瘤的再生长。本研究应用基因治疗手段, 构建携带抗 EGFR 单链抗体的重组腺相关病毒载体, 能有效避免这些缺点。

3.2 AAV 载体的安全性及器官靶向性

基因治疗载体的安全性和器官靶向性长期以来备受关注, 例如逆转录病毒载体随机插入宿主细胞的染色体, 用于基因治疗时, 存在着破坏人体正常基因功能, 激活原癌基因诱发肿瘤形成的危险性。腺病毒载体存在着表达时间短, 诱发机体免疫反应等缺点, 反复使用会产生中和抗体, 降低治疗效果。许多学者对此进行了大量的探索, 并不断将病毒载体进行改造, 降低其免疫原性, 增加感染组织的特异性 (器官靶向性)。AAV 是一种细小病毒属的单链 DNA 病毒, 需要其他病毒 (如腺病毒) 基因产物的辅助才能进行复制。与其他病毒基因治疗载体比较, AAV 载体具有相对安全、长期稳定表达目的基因和不会诱发严重的细胞免疫反应等优点^[6]。rAAV 载体所携带的目的基因可以在脑、肝、肺、肌肉、角膜和胰腺等组织中长期表达, 其包装能力约为 4.7 kb, 如果包装全抗体, 则会超出 AAV 的包装能力, 影响病毒载体的制备。本研究选用抗人 EGFR 单链抗体基因, 完全避免了鼠源性蛋白的免疫原性, 大大降低其被自身免疫系统攻击的可能性, 而且单链抗体基因片段较短, 符合 AAV 的包装容量, 持续表达的抗体穿透力强, 更能有效地发挥作用^[7]。本研究结果显示, rAAV 表达的抗 EGFR 单链抗体能够诱发胰腺癌细胞株的凋亡, 从而抑制其生长。

3.3 载体构建及表达蛋白的检测

本研究在载体构建中, 在目的基因前加入了 Kozak 序列和信号肽, 其目的在于利用 Kozak 序列提高转录和翻译的效率, 利用信号肽用于促进外源蛋白的分泌。在蛋白合成过程中, 前体物质多肽靠 Kozak 序列与膜结合, 形成膜结合型多核糖体, 多肽链与其合成相平行地通过膜, 并在通过膜时, 由膜上的肽酶将信号肽切掉。本研究将外源基因导入细胞, 用以表达外源蛋白—抗 EGFR 抗体, 利用信号肽

表 1 对照组和实验组 6 种人胰腺癌细胞株的凋亡率 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	PANC-1	SW1990	ASPC-1	Capan-1	PCT-3	MiaPaCa-2
对照组	7.0 ± 3.0	1.1 ± 0.8	1.5 ± 0.7	1.7 ± 1.2	1.1 ± 0.7	2.2 ± 1.1
实验组	11.4 ± 2.5	17.6 ± 2.2	46.9 ± 3.9	20.0 ± 2.8	12.1 ± 1.6	31.1 ± 2.5
t 值	1.952	12.208	19.846	10.405	10.909	18.327
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: 对照组为 rAAV1-EGFP 组; 实验组为 rAAV1-anti EGFR 组

来引导外源蛋白分泌,这样既可避免因包涵体复性带来的困难,又可提高蛋白的分泌量。

蛋白的检测常用的方法有 Western blot 法、ELISA 法、免疫组织化学染色法等,由于目的蛋白抗 EGFR 单链抗体目前没有商品化的特异性抗体,且本身无恒定区序列,故只能选择抗 EGFR 单链抗体 C 端 8 个氨基酸的 c-myc tag 作为检测靶点,应用抗 c-myc 抗体作为一抗进行检测。细胞本身的某些蛋白中也含有可以和抗 c-myc 抗体结合的氨基酸序列,故应用 ELISA 法检测不具有特异性。Western blot 法可以通过条带的大小区分靶蛋白和非特异性蛋白。本研究结果显示,我们构建的病毒载体感染胰腺癌细胞株后,均能有效表达抗 EGFR 单链抗体,并且诱发其凋亡,除 PANC-1 细胞以外的实验组细胞凋亡率与对照组比较,差异均有统计学意义。出现这种情况的原因可能与不同细胞间的差异反应有关,其具体机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Kemona A, et al. Expression of EGF and EGFR strongly correlates with metastasis of pancreatic ductal carcinoma. *Anticancer Res*, 2008, 28(2B):1399-1404.
- [2] Stathopoulos GP, Androulakis N, Souglakos J, et al. Present treatment and future expectations in advanced pancreatic cancer. *Anticancer Res*, 2008, 28(2B):1303-1308.
- [3] Burris H 3rd, Rocha-Lima C. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Oncologist*, 2008, 13(3):289-298.
- [4] Papageorgio C, Perry MC. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer. *Cancer Invest*, 2007, 25(7):647-657.
- [5] 倪泉兴,李骥. 胰腺癌综合治疗的现状. *中华消化外科杂志*, 2009, 8(4):241-243.
- [6] Zhong L, Li B, Mah CS, et al. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(22):7827-7832.
- [7] Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(4):583-593.

(收稿日期: 2010-10-09)

(本文编辑: 陈敏)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊可直接用缩写的常用词汇

本刊将允许作者对下列比较熟悉的常用词汇直接用缩写,即在论文中第一次出现时,可以不标注中文:

AFP	甲胎蛋白	GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶	NK 细胞	自然杀伤细胞
Alb	白蛋白	GGT	γ -谷氨酰转移酶	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
ALP	碱性磷酸酶	HAV	甲型肝炎病毒	PaO ₂	动脉血氧分压
ALT	丙氨酸氨基转移酶	Hb	血红蛋白	PBS	磷酸盐缓冲液
AST	天冬氨酸氨基转移酶	HBV	乙型肝炎病毒	PCR	聚合酶链反应
AMP	腺苷一磷酸	HBeAg	乙型肝炎 e 抗原	PEI	经皮酒精局部注射疗法
ADP	腺苷二磷酸	HBsAg	乙型肝炎表面抗原	PET	正电子发射计算机断层扫描
ATP	腺苷三磷酸	HCV	丙型肝炎病毒	PLT	血小板
ARDS	急性呼吸窘迫综合征	HE	苏木素-伊红	PT	血浆凝血酶原时间
CEA	癌胚抗原	HEV	戊型肝炎病毒	PTC	经皮肝穿刺胆道造影
CT	X 线计算机断层摄影术	HIFU	高强度聚焦超声	PTCD	经皮经肝胆管引流
DAB	二氨基联苯胺	IBil	间接胆红素	RBC	红细胞
DAPI	4,6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸	ICG R15	吲哚菁绿 15 min 滞留率	RFA	射频消融
DBil	直接胆红素	IFN	干扰素	RT-PCR	逆转录-聚合酶链反应
DMSO	二甲基亚砜	IL	白细胞介素	TACE	经导管(肝)动脉栓塞化疗
ELISA	酶联免疫吸附测定	抗-HBe	乙型肝炎核心抗体	TBil	总胆红素
ENBD	内镜鼻胆管引流	抗-HBe	乙型肝炎 e 抗体	TC	总胆固醇
ERBD	内镜逆行胆管支架引流	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体	TG	甘油三酯
ERC	内镜逆行胆管造影	LC	腹腔镜胆囊切除术	TGF	转化生长因子
ERCP	内镜逆行胰胆管造影	LDH	乳酸脱氢酶	TNF	肿瘤坏死因子
EST	内镜乳头括约肌切开	MRCP	磁共振胆胰管造影	TP	总蛋白
EUS	内镜超声	MRI	磁共振成像	WBC	白细胞
FITC	异硫氰酸荧光素	MODS	多器官功能障碍综合征	VEGF	血管内皮生长因子
		MTT	四甲基偶氮唑蓝		