

Anti-HER2-ScFv-GFP融合蛋白靶向结合体外乳腺癌细胞表面受体的研究

高国辉¹ 黄奇迪² 王金丹¹ 杨纪锋¹ 包兵兵¹ 胡孝渠^{2*}

(¹温州医学院生命科学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; ²温州医学院附属第一医院肿瘤外科, 温州 325035)

摘要 为了研究不同表达系统获得的携带绿色荧光抗HER2单链抗体(Anti-HER2-ScFv-GFP)是否既可靶向结合HER2阳性乳腺癌细胞表面, 也可通过观察绿色荧光变化直接判断抗体结合乳腺癌细胞表面后细胞的动态变化, 在前期成功构建两种表达系统的基础上, 利用Ni²⁺-NTA亲和层析法纯化来源于真核表达系统pFAST Bac to Bac HT A/Tn-5B1-4和原核表达系统pBAD His B/TOP10的融合蛋白Anti-HER2-ScFv-GFP, 设置HER2阳性细胞SKBR3为实验组、HER2阴性细胞MCF7为对照组, 分别与之混合24 h后, 1×PBS洗脱细胞3次, 激光共聚焦显微镜观察到两种不同表达系统获得的融合蛋白在HER2阳性细胞SKBR3表面分布均有绿色荧光, 真核表达的蛋白结合效率明显高于原核表达的蛋白, SKBR3结合高浓度的融合蛋白后细胞表现出皱缩, 绿色荧光明显增强, 而两种不同来源的融合蛋白与HER2阴性MCF7混合后均易被洗脱。GFP标准品与SKBR3混合后也容易被洗脱。实验表明构建的携带绿色荧光抗HER2单链抗体同时具有靶向结合和报告作用两方面的功能。

关键词 融合蛋白Anti-HER2-ScFv-GFP; 乳腺癌细胞表面受体; 靶向结合

目前, 特异性杀灭肿瘤细胞的肿瘤靶向生物治疗(targeted therapy)在癌症的治疗研究中受到了越来越多的关注^[1]。其中, 靶向HER2阳性肿瘤的单克隆抗体治疗方案是众多方案之一^[2-4]。单抗治疗具有靶点特异性高、副作用低和可携带化疗药物、毒素等优点, 但单克隆抗体的生产成本高, 分子较大而难以进入实体瘤内^[5]。而利用DNA重组技术制备的单链抗体片段不但具有抗体靶向性强、分子小较易穿透细胞外间隙到达深部肿瘤细胞的优点, 而且免疫原性较弱, 能降低人体的抗体反应, 由于这种抗体片段缺乏Fc段, 丧失完整抗体所具有的效应功能, 难以杀伤靶细胞^[6]。因此, 研制携带“弹头”分子如高效的“弹头”药物或放射性核素等的小型化单链抗体ScFv尤为重要。如何充分利用单链抗体片段的靶向功能, 将“弹头”分子如化疗药物等输送到靶点细胞进行靶向治疗或应用于临床分子病理诊断是目前研究的热点。

本研究利用前期工作中构建的真核表达系统pFAST Bac to Bac HT A/Tn-5B1-4和原核表达系统pBAD His B/TOP10表达获得的均携带绿色荧光的抗HER2单链抗体, 根据GFP在抗HER2单链抗体靶

向结合乳腺癌细胞表面中的指示作用, 分析抗HER2单链抗体携带“弹头”靶向结合乳腺癌HER2受体的能力, 为研究抗HER2单链抗体携带“弹头”与细胞结合后的动态变化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 表达载体质粒与肿瘤细胞株 鼠源性人抗HER2-ScFv片段由中山大学医学院宋尔卫教授课题组提供、pFAST Bac to Bac HT A/Anti-HER2-ScFv-GFP/Tn-5B1-4、pBAD His B/Anti-HER2-ScFv-GFP/TOP10均由本实验室构建、HER2阴性乳腺癌细胞株MCF7、HER2阳性乳腺癌细胞株SKBR3购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所。Tn-5B1-4细胞由浙江大学张传溪教授惠赠。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、Trypin-EDTA购自

收稿日期: 2010-12-30 接受日期: 2011-03-01

国家自然科学基金(No.30801118/C160403), 浙江省自然科学基金(No.Y207301)和温州市科技局(No.Y20090293, No.Y2003A138)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 0577-88078237, E-mail: drhxj@163.com

GIBCO公司, DMEM-高糖(含丙酮酸钠)培养基、RPMI-1640、PBS(10X)购自Hyclone公司, 昆虫细胞培养基NTM-FH insectmedium为Sigma公司产品。GFP标准品购于上海物竞化学试剂部, Ni^{2+} -NTA蛋白纯化柱购于Novagen公司。

1.2 方法

1.2.1 融合蛋白Anti-HER2-ScFv-GFP的纯化获得 根据两种系统表达产物均具有6×His的特点, 选择 Ni^{2+} -NTA亲和层析法。取20 ml含有表达产物的经过第三轮感染的Tn-5B1-4细胞培养液离心后收集细胞, 用100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)重悬, 冰浴中温和超声6次(每次2 min, 间隔10 s)破碎, 4 °C, 10 000 g离心5 min, 收集上清, 用 Ni^{2+} -NTA螯合层析柱室温结合1 h, 用洗涤缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L咪唑, pH8.0)洗涤5次后, 分别用含100 mmol/L、200 mmol/L、500 mmol/L的咪唑洗脱缓冲液洗脱, 蛋白核酸检测仪检测回收获得真核表达系统的携带绿色荧光的抗HER2单链抗体Anti-HER2-ScFv-GFP, 过0.45 μm 滤膜除菌待用。取200 ml诱导重组菌pBAD His B/Anti-HER2-ScFv-GFP/TOP10离心后收集菌体, 用100 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)重悬, 冰浴中温和超声6次(每次2 min, 间隔10 s)破碎菌体, 4 °C, 10 000 g离心5 min, 收集上清, 同上 Ni^{2+} -NTA螯合层析柱法获得原核表达系统的携带绿色荧光的抗HER2单链抗体Anti-HER2-ScFv-GFP, 过0.45 μm 滤膜除菌待用。考马斯亮蓝法分别测定两种不同来源的携带绿色荧光的抗HER2单链抗体蛋白浓度, 取合适体积的纯化融合蛋白样品Anti-HER2-ScFv-GFP, 使其测定值在标准曲线的直线范围内, 利用标准曲线或回归方程求出相当于标准蛋白质的量(μg), 以牛血清白蛋白(BSA)为标准品。

1.2.2 Western blot分析 被纯化蛋白样品经SDS-PAGE分离后电转移至PVDF膜, 以5 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h, 依次加入鼠抗6×His-Tag mAb(1:5 000稀释, 4 °C孵育过夜)为一抗, HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5 000稀释, 室温2 h)为二抗用化学发光试剂盒于暗室条件下感光显影, 分析蛋白质印迹结果。

1.2.3 细胞培养 用含10%胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的DMEM高糖培养基, 在37 °C、5% CO_2 的细胞培养箱中培养HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3和HER2阴性乳腺癌细胞MCF7。取对数生长的SKBR3和MCF7细胞, 以含0.25% EDTA

的胰酶消化制成单细胞悬液。

1.2.4 来源于真核表达系统的抗HER2单链抗体靶向结合SKBR3、MCF7对比 胰酶消化生长铺满的HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3、HER2阴性乳腺癌细胞MCF7, 重悬于无胎牛血清的RPMI-1640培养液, 分别滴入不同稀释度的经过滤膜除菌的Anti-HER2-ScFv-GFP融合蛋白样品(1:5、1:20、1:40), 调整细胞密度为 5×10^8 个/L, 以1 ml/孔加入6孔细胞培养玻璃板, 设复孔为阴性洗脱对照, 使Anti-HER2-ScFv与乳腺癌细胞SKBR3、MCF7细胞表面受体充分结合, 37 °C, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养2 h后, 添加胎牛血清含100 ml/L, 37 °C, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养24 h, 1×PBS洗3次。激光共聚焦显微镜下观察单链抗体与SKBR3、MCF7细胞表面受体结合情况、肿瘤细胞结合后的动态变化、绿色荧光分布特点。以相同浓度的GFP标准蛋白为阴性对照。

1.2.5 来源于原核表达系统的抗HER2单链抗体靶向结合SKBR3、MCF7对比 结合实验方法如1.2.4, 激光共聚焦显微镜观察来源于原核表达系统的抗HER2单链抗体与SKBR3、MCF7细胞表面受体结合情况、肿瘤细胞结合后的动态变化、绿色荧光分布特点。

1.2.6 两种不同来源的抗HER2单链抗体靶向结合HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3效率对比 将不同来源的经纯化Anti-HER2-ScFv-GFP融合蛋白样品稀释至相同浓度, 均设置三个稀释度(1:5、1:20、1:40), 以HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3为结合对象, 胰酶消化生长铺满的HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3, 重悬于无胎牛血清的RPMI1640培养液, 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养2 h, 调整细胞密度为 5×10^8 个/L, 以1 ml/孔加入6孔细胞培养板, 每孔1 ml, 设复孔为阴性洗脱对照, 使Anti-HER2-ScFv与乳腺癌细胞SKBR3表面受体充分结合, 添加胎牛血清含100 ml/L, 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养24 h, 1×PBS洗3次。激光共聚焦显微镜观察两种来源的抗HER2单链抗体与SKBR3细胞表面受体结合情况。

2 结果

2.1 融合蛋白Anti-HER2-ScFv-GFP的纯化获得

Ni^{2+} -NTA蛋白纯化柱法分离纯化两种不同表达系统的携带绿色荧光蛋白的抗HER2单链抗体, 测定纯化蛋白浓度, 计算来源于pBAD His B/Anti-HER2-ScFv-GFP/TOP10的纯化样品蛋白质浓度约

为492.8 $\mu\text{g/ml}$, 来源于pFAST Bac to Bac HT A /Tn-5B1-4的纯化样品蛋白质浓度约为144.9 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 Western blot分析

以鼠抗6×His-Tag mAb(1:5 000稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜)为一抗, HRP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5 000稀释, 室温2 h)为二抗, 做蛋白质印迹分析, 结果在60 kDa左右有明显条带与预计相符合, 表明该融合蛋白在两种表达系统中成功表达, 如图1所示。

2.3 真核系统的融合蛋白结合HER2阳性细胞株SKBR3与HER2阴性细胞株MCF7对比

来源于真核表达系统的Anti-HER2-ScFv-GFP

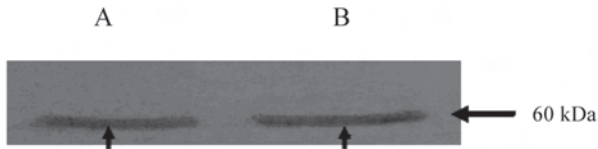


图1 蛋白质印迹分析结果

A: 来源于原核表达系统的目的融合蛋白蛋白质印迹分析结果; B: 来源于真核表达系统的目的融合蛋白蛋白质印迹分析结果。

Fig.1 The result of Western blot analysis

A: the aim fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP from prokaryotic expression system; B: the aim fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP from eukaryotic expression system.

融合蛋白样品分别与SKBR3、MCF7混合后, 用PBS反复洗脱如图2A和图2B所示, 用GFP标准品稀释液滴加到HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3混合后, 用PBS反复洗脱如图2C所示。结果来源于真核表达系统携带绿色荧光的抗HER2单链抗体可以成功与HER2阳性乳腺癌细胞表面结合, 融合蛋白浓度最高时, 细胞有皱缩变小现象, 细胞增殖缓慢, 浓度以1:40稀释的细胞表面绿色荧光分布清晰, 细胞变化不明显, 而同样浓度的该蛋白与HER2阴性的MCF7不能结合, GFP本身也不能与HER2阳性的乳腺癌细胞表面结合, 从而排除HER2阳性表面的绿色荧光是GFP自身结合在HER2阳性细胞表面的可能。

2.4 原核系统的融合蛋白结合HER2阳性细胞株SKBR3与HER2阴性细胞株MCF7对比

来源于原核表达系统的Anti-HER2-ScFv-GFP融合蛋白样品分别与SKBR3、MCF7混合后, 反复洗脱结果如图3A和图3B所示, 用GFP标准品稀释液滴加到HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3混合后, 反复洗脱结果如图3C所示。结果来源于原核表达系统的携带绿色荧光的抗HER2单链抗体可分布在HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3表面, 但细胞动态变化不明显, 而与HER2阴性的MCF7不能结合, GFP本身也

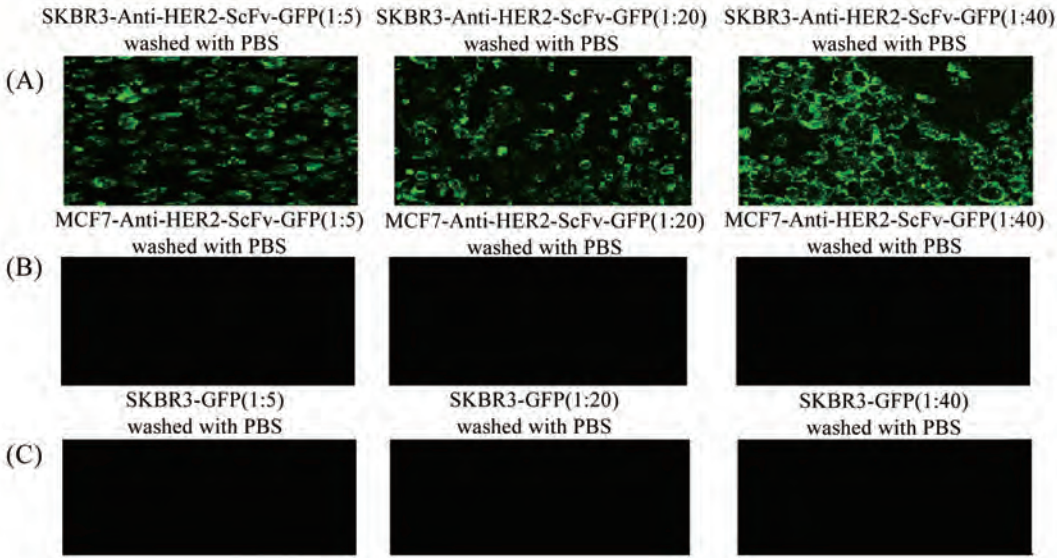


图2 真核系统表达的融合蛋白与乳腺癌细胞结合结果

A: 来源于真核表达系统的融合蛋白与HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3结合结果; B: 来源于真核表达系统的融合蛋白与HER2阴性的乳腺癌细胞MCF7结合结果; C: GFP标准品与HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3结合结果。

Fig.2 The binding result on the surface between the breast cancer cells and the fusion protein from eukaryotic expression system

A: the fusion protein from eukaryotic expression system bind the surface of HER2 positive breast cancer cell SKBR3; B: the fusion protein from eukaryotic expression system bind the surface of HER2 negative breast cancer cell MCF7; C: the standard protein GFP bind the surface of HER2 positive breast cancer cell SKBR3.

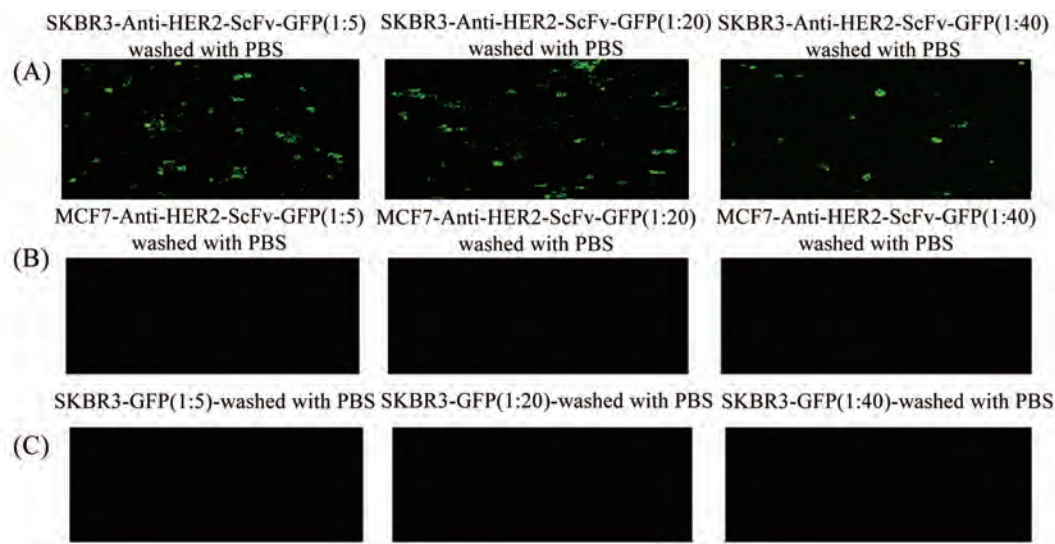


图3 原核系统表达的融合蛋白与乳腺癌细胞结合结果

A: 来源于原核表达系统的融合蛋白与HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3结合结果; B: 来源于原核表达系统的融合蛋白与HER2阴性的乳腺癌细胞MCF7结合结果; C: GFP标准品与HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3结合结果。

Fig.3 The binding result on the surface between the breast cancer cells and the fusion protein from prokaryotic expression system

A: the fusion protein from prokaryotic expression system bind the surface of HER2 positive breast cancer cell SKBR3; B: the fusion protein from prokaryotic expression system bind the surface of HER2 negative breast cancer cell MCF7; C: the standard protein GFP bind the surface of HER2 positive breast cancer cell SKBR3.

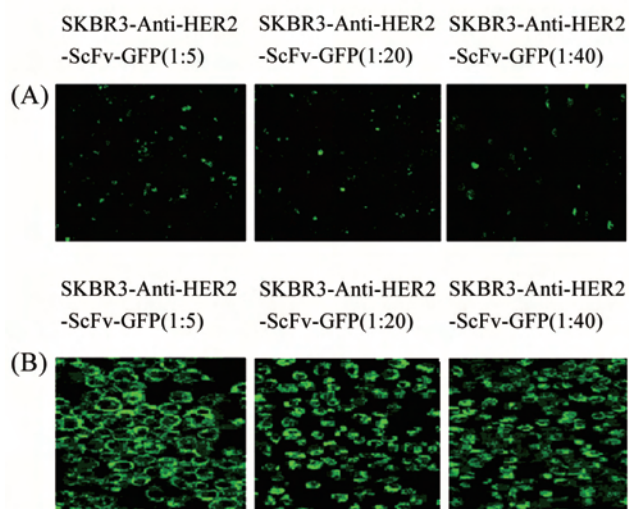


图4 两种不同表达系统获得的融合蛋白与乳腺癌SKBR3结合结果比较

A: 来源于原核表达系统的融合蛋白与SKBR3结合结果; B: 来源于真核表达系统的融合蛋白与SKBR3结合结果。

Fig.4 The comparison of the binding function on the surface of SKBR3 between the fusion protein from eukaryotic expression system and the fusion protein from prokaryotic expression system

A: the binding result of the fusion protein from prokaryotic expression system on the surface of SKBR3; B: the binding result of the fusion protein from eukaryotic expression system on the surface of SKBR3.

不能与HER2阳性的乳腺癌细胞表面结合, 从而排除HER2阳性表面的绿色荧光是GFP自身结合在HER2阳性细胞的表面。

2.5 真核系统的融合蛋白与原核系统的融合蛋白的结合效率对比

将分别来源于两种不同表达系统的融合蛋白稀释到相同浓度后做1:5、1:20、1:40的稀释后与HER2阳性乳腺癌细胞SKBR3混合后反复洗脱结果

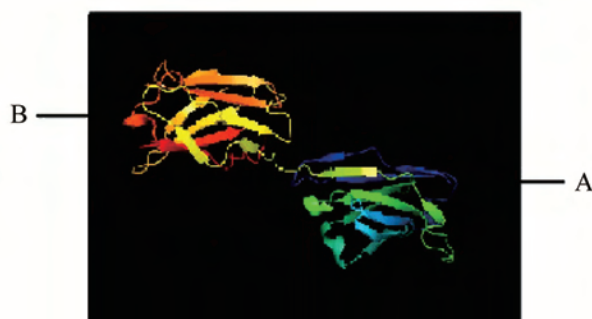


图5 融合蛋白的3D预测结构

A: 绿色荧光蛋白片段的短肽预测结构; B: Anti-HER2-ScFv片段的短肽预测结构。

Fig.5 The predicted 3D structure of the fusion protein

A: the predicted peptide fragment of green fluorescent protein; B: the predicted peptide fragment of Anti-HER2-ScFv containing VL and VH.

如图4A和图4B所示。两种不同表达系统获得的携带绿色荧光的抗HER2单链抗体均可与HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3表面结合,但是来源于真核的单链抗体明显结合SKBR3的效率要高,绿色荧光要强,细胞形态变化更加明显。

2.6 携带绿色荧光的抗HER2单链抗体三维结构与功能的预测

根据融合基因构建的设计思路和融合蛋白结合HER2阳性的乳腺癌细胞SKBR3的结合情况,针对真核表达载体pFAST Bac to Bac HT A起始密码子位置特点,利用ESyPred3D软件通过PyMOL预测来源于真核表达系统的携带绿色荧光抗HER2单链抗体成功融合,GFP多肽片段以稳定共价键作用连接在单链抗体的C端(图5A),抗HER2单链抗体的VH、VL肽段具有正确的三级结构(图5B),能够特异性与HER2阳性的乳腺癌细胞表面受体结合,其假想三维结构如图5所示。

3 讨论

由于传统抗肿瘤药物选择性低、毒性大,对肿瘤的治疗从传统细胞毒类药物转移到高效低毒的靶向性抗肿瘤药物是一种趋势^[7-10]。其中,HER2阳性的乳腺癌靶向性化学药物或抗体治疗的主要机理是通过结合乳腺癌细胞表面HER2,阻断表皮生长因子对HER2受体的激活,从而抑制蛋白酪氨酸激酶活性最终导致乳腺癌肿瘤细胞表面的HER2受体无法磷酸化而停止增殖^[11,12]。

目前,利用HER2在细胞膜表达的特点,以抗HER2单链抗体为导向系统,将效应分子药物有选择地输送到HER2阳性肿瘤细胞的研究越来越多。此研究思路是利用抗HER2单链抗体既可以封闭HER2信号通道,又能特异性发挥一定的杀伤作用。任君琳等^[13]将重组抗HER2 ScFv/tBid融合基因克隆入真核表达载体pCMV中,转染胃癌SGC7901细胞,并观察其对胃癌SGC7901细胞的促凋亡作用。通过间接荧光免疫染色技术观察染色细胞记数,发现细胞的增殖被明显抑制,结果表明该融合蛋白可以靶向结合胃癌SGC7901细胞并诱导细胞凋亡。Jia等^[14]构建了一种新型的靶向性促凋亡分子,该分子保留了抗HER2单链抗体以及PE40的转膜结构域,而在C端又连接了一种具有自发活性的caspase-3分子。结果表明这种分泌产生的融合蛋白能特异性识别HER2

阳性肿瘤细胞,并内化入肿瘤细胞发挥杀伤效应。此外,以抗HER2单链抗体作为导向系统靶向结合各种HER2阳性肿瘤细胞表面HER2受体并特异性杀死该肿瘤细胞的验证实验还有很多^[15,16]。这些研究中,一般在结果验证中,均采用间接免疫荧光染色法观察转染后的细胞形态,而融合基因在肿瘤细胞内的表达情况则采用流式细胞仪进行检测分析。

此外,对HER2基因表达状态的分子诊断临床上主要有免疫组化法(IHC)、荧光原位杂交法(fluorescence in situ hybridization, FISH)等。Tse等^[17]认为免疫组化法尽管应用最广泛,但方法间接,检测过程受干扰因素多,造成假阴性的频率高。FISH能直接和准确地判断HER2/*neu*基因是否存在扩增,但操作繁琐,需要配置专业的仪器设备^[18]。同时,两种诊断方法中均需染色观察实验结果,存在一定人为差异从而会影响结果的判断。

本研究利用不同表达系统表达获得携带绿色荧光的抗HER2单链抗体,其既利用了抗HER2 ScFv在抗HER2治疗中的靶向功能,又利用绿色荧光蛋白的报告作用,国内外均无相关报道。通过直接观察绿色荧光的显示情况,表明两种表达系统获得的融合蛋白抗HER2 ScFv-GFP与HER2阳性肿瘤细胞SKBR3均能特异性结合,靶向性明显,其靶向功能的判断通过利用绿色荧光蛋白的报告作用即可实现,结果验证过程中避免了间接免疫荧光染色法,排除了人为判断染色效果的差异,从临床分子诊断角度分析具有较重要的应用前景。高浓度携带绿色荧光的抗HER2单链抗体与HER2阳性肿瘤细胞结合后细胞变小皱缩等现象表明只含有重链和轻链可变区的单链抗体对肿瘤细胞的增殖具有一定的抑制作用,但杀伤性劣于靶向性,增强杀伤作用还有必要携带高效“弹头”药物一起协同作用。其中,绿色荧光对细胞受抑制现象有很强的报告作用,且此结果也可利用普通的荧光显微镜观察。分析认为,融合蛋白的两个融合片段抗HER2 ScFv与绿色荧光蛋白在融合并形成高级结构时,抗HER2 ScFv的活性域受到影响较小,因此,在抗HER2 ScFv片段后融合其他具有杀伤效应的“弹头”药物根据抗HER2 ScFv-GFP的靶向性与报告作用研究杀伤效应在靶向生物治疗方面也具有重要的研究价值。但是,将不同来源但浓度相同的抗HER2 ScFv-GFP与HER2阳性肿瘤细胞SKBR3结合结果比较,则表现出真核表达的

蛋白结合效率明显高于原核表达的蛋白, 细胞变化较明显。从真核表达载体pFAST Bac to Bac HT A和原核表达载体pBAD His B自身的表达结构序列图谱分析, 两种表达载体从各自的起始密码子开始都没有设计信号肽序列, 融合基因在构建时也无插入信号肽序列, 故可认为两种表达系统均不是分泌性表达, 没有糖基化修饰。从Western blot分析结果看来源于两种表达系统的融合蛋白分子量相近, 但与配体的结合效率有明显差别, 推测两者的高级结构不同, 分析认为, pBAD His B核糖体结合位点(RBS)后的第一个翻译起始密码子与目的融合基因的起始密码子ATG之间的碱基数目多翻译出40个氨基酸左右, 其是由ATG、6×His、Xpress epitope、Enterokinase site构成, 而pFAST Bac to Bac HT A核糖体结合位点后的第一个翻译起始密码子ATG与目的融合基因的起始密码子之间的碱基数目多翻译出30个氨基酸, 其是由ATG、6×His、TEV site构成, 最终导致不同表达系统获得的融合蛋白抗HER2 ScFv-GFP一级结构有一定差异。此外, 由于原核表达系统的缺陷性对融合蛋白形成正确的高级结构有一定影响, 即使氨基酸序列相同, 原核系统表达的蛋白质往往与真核系统表达的蛋白质在高级结构上也有一定的差别, 且在免疫反应和与其他分子结合中更明显。两种不同来源的融合蛋白是否因为高级结构的差异而导致结合效率不同, 验证实验可通过测定晶体结构来进一步研究。在本实验中真核表达系统获得携带绿色荧光的抗HER2单链抗体在靶向性方面的应用价值明显高于原核表达系统来源的抗体。

本研究的成功使原来不可见的单链抗体结合乳腺癌细胞表面HER2受体现象在荧光蛋白的报告下能够变得可见。在分子病理诊断方面, 通过直接观察携带绿色荧光的抗HER2单链抗体在肿瘤细胞表面的分布从而判断HER2阳性水平。在肿瘤靶向治疗方面, 进一步使该类单链抗体与“弹头”药物相结合, 可直观分析癌细胞凋亡与单链抗体浓度变化的关系, 从而判断“弹头”药物的最佳浓度、药效等, 为靶向分子药理提供了新思路。

参考文献(References)

- 1 Varmus H. The new era in cancer research. *Science* 2006; 312(5777): 1162-5.
- 2 Horton J. Her2 and trastuzumab in breast cancer. *Cancer Control* 2001; (8): 103-10.
- 3 Jackisch C. HER-2-positive metastatic breast cancer: optimizing trastuzumab-based therapy. *Oncologist* 2006; 11(Suppl 1): 34-41.
- 4 Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist* 2006; 11(Suppl1): 4-12.
- 5 Sparano, JA. Cardiac toxicity of trastuzumab (Herceptin): Implications for the design of adjuvant trials. *Semin Oncol* 2001; 1(Suppl 3): 20-7.
- 6 甄永苏. 抗体药物与肿瘤靶向治疗. *医学研究杂志* 2007; 36(2): 1-2.
- 7 Giovanella BC, Stehlin JS, Hinz HR, Kozielski AJ, Harris NJ, Vardeman DM, et al. Preclinical evaluation of the anticancer activity and toxicity of 9-nitro-20(S)-camptothecin (Rubitecan). *Int J Oncol* 2002; 20(1): 81-8.
- 8 Yoioi K, Thaker P H, Yazici S, Rebhun RR, Nam DH, He J, et al. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation by AEE788 reduced growth and metastasis of human colon carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3716-25.
- 9 Gerber HP, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65(3): 671-80.
- 10 Senderowicz AM. The cell cycle as a target for cancer therapy: Basic and clinical findings with the small molecule inhibitors flavopiridol and UCN-01. *Oncologist* 2002; 7(suppl 3): 12-9.
- 11 Kurebayashi J. Biological and clinical significance of HER2 overexpression in breast cancer. *Breast Cancer* 2001; 8(1): 45-51.
- 12 Stern DF. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: ErbB family receptor tyrosine kinases. *Breast Cancer Res* 2000; 2(3): 176-83.
- 13 任君琳, 王涛, 许彦鸣, 孟艳玲, 温伟红, 张瑞, 等. 重组抗 I-HER2 ScFv/FDT/caspase-6 基因的构建、表达及其活性鉴定. *第四军医大学学报* 2007; 28(3): 193-6.
- 14 Jia LT, Zhang LH, Yu CJ, Zhao J, Xu YM, Gui JH, et al. Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3. *Cancer Res* 2003; 63(12): 3257-62.
- 15 Afshar S, Olafsen T, Wu AM, Morrison SL. Characterization of an engineered human purine nucleoside phosphorylase fused to an anti-her2/neu single chain Fv for use in ADEPT. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28(147): 1-12.
- 16 Tsai YS, Shiau AL, Chen YF, Tsai HT, Tzai TS, Wu CL. Enhancement of antitumor activity of gammaretrovirus carrying IL-12 gene through genetic modification of envelope targeting HER2 receptor: a promising strategy for bladder cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2010; 17(1): 37-48.
- 17 Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, et al. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence *in situ* hybridization

- and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. Clin Chem 2005; 51(7): 1093-101.
- 18 Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, *et al.* Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and M LN64 in human breast cancer: Quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. Clin Chem 2005; 11(23): 8348-57.

The Study of the Targeting Selectivity and Binding the Surface of Breast Cancer Cells with the Fusion Protein Anti-HER2-ScFv-GFP *in vitro* Experiments

Guo-Hui Gao¹, Qi-Di Huang², Jin-Dan Wang¹, Ji-Feng Yang¹, Bing-Bing Bao¹, Xiao-Qu Hu^{2*}

(¹School of Life Sciences Wenzhou Medical College, Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China; ²Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

Abstract The goal of this study was to test the targeting binding efficiency of the fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP on the surface of breast cancer cells. We constructed the eukaryotic expression system pFAST Bac to Bac HT A/Anti-HER2-ScFv-GFP/Tn-5B1-4 and the prokaryotic system pBAD His B/Anti-HER2-ScFv-GFP/TOP10. And then the fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP was separated to get the purification with Ni²⁺-NTA argrose from the eukaryotic expression system pFAST Bac to Bac HT A/Tn-5B1-4 and the prokaryotic expression system pBAD His B/TOP10. Then we incubated SKBR3 (HER2⁺ cell) and MCF7(HER2⁻ cell) containing the purification of the fusion proteins in 24 h, eluted these cells with 1×PBS three times, examined the targeting binding efficiency of the fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP on the surface of breast cancer cells with laser confocal microscopy system. Consequently, apparent green fluorescence was detected in SKBR3 cells. Fusion proteins from eukaryotic expression system showed a higher binding efficiency than those from prokaryotic expression system. Incubation with high concentration fusion proteins induced shrinking in SKBR3 cell. In contrast, fusion proteins were readily eluted from the HER2 negative cell MCF7, without obvious fluorescence detected. The standard GFP was readily eluted from the HER2 positive cell SKBR3, too. Fusion protein (Anti-HER2-ScFv-GFP) from these two systems can all bind to the surface of SKBR3 cell, but proteins from eukaryotic system showed a higher binding capacity than those from prokaryotic system. This suggested that GFP can report the developing of the breast cancer cells SKBR3 with anti HER2 ScFv and engineer antibodies selected to co-target critical functional pairs of HER2 on the surface of SKBR3 *in vitro*.

Key words the fusion protein Anti-HER2-ScFv-GFP; HER2 of breast cancer cells; targeting selectivity

Received: December 30, 2010 Accepted: March 1, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30801118/C160403), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y207301) and Wenzhou Science and Technology Bureau (No.Y20090293, No.Y2003A138)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-577-88078237, E-mail: drhxj@163.com