

融合蛋白lhFVII-LDM的制备及其对乳腺癌细胞的抑制作用

胡 莲 廖东升 吴传芳*

(四川大学生命科学院功能基因组实验室, 成都 610064)

摘要 该文主要研究了强化融合蛋白lhFVII-LDM对乳腺癌MDA-MB-231细胞的抑制作用。通过PCR和重叠PCR的方法构建了pET19b-lhFVII-LDP表达载体, 重组质粒转化BL21, 经IPTG诱导后表达并用Co²⁺亲和层析纯化lhFVII-LDP融合蛋白, Western blot检测融合蛋白的正确性, 再通过分子重组的方法将lhFVII-LDP与力达霉素(LDM)的活性发色团(AE)组装成为强化融合蛋白lhFVII-LDM。通过免疫共沉淀实验鉴定lhFVII-LDP与组织因子(TF)的特异性结合作用, 利用平板克隆形成实验观察lhFVII-LDM对细胞增殖的影响, 采用Hoechst33342染色检测lhFVII-LDM诱导MDA-MB-231细胞凋亡情况, 建立了人乳腺癌裸鼠肿瘤模型, 研究lhFVII-LDM对MDA-MB-231肿瘤生长的抑制作用。结果显示, lhFVII-LDM强化融合蛋白在体外能很好的诱导MDA-MB-231细胞凋亡, 动物实验结果表明, 强化融合蛋白对MDA-MB-231肿瘤的生长具有显著的抑制作用。

关键词 凝血因子VII; LDM; 肿瘤抑制; MDA-MB-231细胞; 表达纯化

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年增高, 传统的治疗方式不仅花费高, 而且易复发, 寻求新的治疗方法已成为人们的迫切需要。近年来, 分子靶向治疗已成为肿瘤治疗中的一个热点, 目前已经有多种分子靶向治疗药物应用于肿瘤的治疗^[1-2]。此外, 与传统化疗相比, 抗肿瘤靶向药物因其能够提高疗效且大幅度降低药物的毒副作用而在药物的研发领域受到广泛的关注。

组织因子(TF)是一种在正常组织血管内皮细胞不表达, 但在实体瘤新生血管内皮细胞和恶性肿瘤细胞表面特异性表达的细胞表面受体^[3-5], 因此, TF可以作为治疗肿瘤的有效靶点, 本文所研究的乳腺癌MDA-MB-231细胞就是高表达TF的细胞系^[6-7]。凝血因子VII (FVII)是TF的天然配体, 使用不同的实验方法测得它们相互作用的Kd值在10⁻⁸~10⁻¹¹ mol/L之间^[3]。凝血因子VII (FVII)由轻链(lhFVII, 20 kDa)和重链(hhFVII, 30 kDa)两部分组成, 并且研究证明TF与凝血因子VII (FVII)的结合只与lhFVII有关, 而hhFVII并不参与这一过程^[8]。力达霉素(LDM)是一种从我国湖北省潜江市土壤中分离得到的大分子抗肿瘤抗生素, LDM的分子由烯二炔的发色团(AE, 843 Da)和辅基蛋白(LDP, 10 500 Da)构成, 两者可进行拆分和重建。LDM的发色团能够结合到DNA的小沟上

导致双链DNA的断裂, 从而诱导细胞的凋亡^[9-13], 并且它是迄今为止报道过的对肿瘤细胞杀伤作用最强的大分子肽类抗肿瘤抗生素^[14]。但是由于LDM在杀死肿瘤细胞的同时对正常细胞或组织也有很强的毒害作用, 一般动物对LDM的耐受剂量只有0.05 mg/kg, 所以单独使用LDM治疗肿瘤会给机体带来严重的毒副作用, 因此, LDM被作为研制抗肿瘤靶向药物高效的“弹头”药物^[15]。

本文根据FVII和LDM的特点, 把具有强肿瘤细胞杀伤作用的“弹头”药物LDM和具有强靶向性的lhFVII联合起来, 制备以lhFVII为载体、LDM为“弹头”的肿瘤靶向药物lhFVII-LDM, 并研究其对TF高表达的乳腺癌MDA-MB-231细胞的体外杀伤作用以及体内抑瘤活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、细胞株和质粒 BALB/c裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 大肠杆菌

收稿日期: 2011-04-15 接受日期: 2011-06-10

《重大新药创制》国家科技重大专项课题基金(No.2009ZX09103)资助项目

*通讯作者。Tel: 028-85418926, E-mail: wuchuanfang@gmail.com

菌株DH5 α , BL21由本实验室保存。pET19b质粒由本实验室保存, pET-VH-LDP质粒由中国医学科学院医药生物技术研究所以馈赠。乳腺癌细胞MDA-MB-231、正常人肝细胞L02均购自ATCC, 由本实验室保存和传代。

1.1.2 主要试剂 Taq酶、Pfu酶、T4 DNA连接酶及Nco I、Xho I等限制性内切酶均购自Fermentas公司。PCR产物胶回收试剂盒购自天根公司。质粒提取纯化试剂盒购自Omega公司。鼠抗人Factor VII单抗和鼠抗人TF单抗均购自R&D公司。HRP偶联的兔抗鼠IgG二抗为Southernbiotech公司产品。人的全长凝血因子VII cDNA购自广州复能基因有限公司

(NM_019616)。Hoechst33342和NBT细胞染色液均购自Sigma公司。Leibovitz's L-15和1640细胞培养基均购自Gibco公司。胎牛血清购自HyClone公司。Protein A Agarose购自Invitrogen。PD-10层析柱和Co²⁺亲和层析柱均购自GE公司。LDM蛋白由中国医学科学院医药生物技术研究所以馈赠。寡核苷酸引物合成及测序均由Invitrogen公司完成。其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的获取及融合基因的构建 根据lhFVII和LDP在GenBank中的序列设计PCR和重叠PCR引物(表1)。在lhFVII上游引物lhFVIIIF 5'末端引入

表 1 扩增融合基因的引物

Table 1 Primers for amplifying the fusion gene fragments

引物 Primers	序列 Sequences
lhFVIIIF	5'-TAA <u>CCA TGG</u> GCC ATC ATC ATC ATC ATC ACG CCA ACG CGT TCC TGG AGG AGC TGC G-3'
lhFVIIR	5'-CTG CCG CCG CCG CCG CTA CCA CCA CCA CCT CGG CCT TGG GGT-3'
LDPF	5'-GCG GCG GCG GCA GTG GTG GCG GTG GCT CTG CGC CCG CCT TCT CCG T-3'
LDPR	5'-TAT <u>CTC GAG TTA</u> GCC GAA GGT CAG AGC CAC GT-3'

注: 加下划线的序列是酶切位点, 斜体序列是组氨酸标签, 黑色加粗序列是连接肽序列, 加黑点序列是起始密码子或终止密码子。

Note: the underscores were the sites for restriction digest, the oblique sequences were the His-tag, the black-highlighted sequences were the linker, and the dotted sequences were start or termination codons.

Nco I酶切位点和一个组氨酸标签(His-tag), 在lhFVII下游引物lhFVIIR的5'末端引入连接肽(3 $\times$ G₄S), 以人的全长凝血因子VII cDNA为模板, 用上述引物扩增目的片段, 该目的片段只包括人的FVII的轻链即lhFVII。在LDP上游引物LDPF的5'末端引入连接肽, 下游引物LDPR的5'末端引入Xho I酶切位点, 以pET-VH-LDP质粒为模板, 用上述引物扩增LDP片段。以PCR扩增得到的lhFVII和LDP为模板, 用lhFVIIIF和LDPR引物, 通过重叠PCR扩增得到lhFVII-LDP片段。

1.2.2 pET19b-lhFVII-LDP重组质粒的构建 用Nco I和Xho I双酶切重叠PCR产物, 同时用相应的酶切pET19b质粒, 胶回收经双酶切后的融合基因片段和pET19b载体, 利用T4连接酶连接。将连接产物转化到DH5 α 感受态细胞中, 挑取阳性克隆, 提取质粒DNA, 酶切及测序鉴定, 从而获得pET19b-lhFVII-LDP重组质粒。

1.2.3 融合蛋白表达纯化及鉴定 将测序正确的

质粒pET19b-lhFVII-LDP转化BL21, 挑取单菌落接种至含氨苄青霉素(50 mg/L)的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养12 h后, 按1:5接种至新鲜的含氨苄青霉素(50 mg/L)的LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C培养, 分光光度计测量菌液吸光度 D_{600} 为0.6时, 加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 使其终浓度为0.1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C诱导6 h。收集菌液, 并以湿重5 mL/g的量重悬于buffer A (50 mmol/L 磷酸钠, 300 mmol/L NaCl, pH7.0), 超声波破碎(4 $^{\circ}$ C, 10次), 然后4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min离心30 min, 收集上清, 克隆时由于在氨基末端加入了一个His-tag标签, 所以, 利用Co²⁺亲和层析纯化, 12% SDS-PAGE及Western blot对纯化后的lhFVII-LDP融合蛋白进行分析。

1.2.4 强化融合蛋白lhFVII-LDM的制备 取一定量的lhFVII-LDP融合蛋白溶于0.01 mol/L的PBS缓冲液(pH7.4)中, 加入5倍量的发色团(AE)-甲醇溶液(体积比为50:1), 混合振摇, 室温放置12 h, 将混合液进行PD-10层析, 以PBS为洗脱液, 监测280 nm和343 nm的光吸收值, 收集重组的强化融合蛋白

lhFVII-LDM。

1.2.5 细胞培养 MDA-MB-231细胞用含10%胎牛血清的Leibovitz's L-15培养基, 37 °C, 孵箱中培养, L02细胞用含10%胎牛血清的1640培养基, 37 °C, 5% CO₂孵箱中培养。

1.2.6 免疫共沉淀 取指数生长期的MDA-MB-231细胞计数, 使其终浓度为 1×10^5 /mL, 接种至6孔板中, 待细胞密度长至70%~80%时, 胰酶消化细胞, 收集细胞至1.5 mL离心管中, PBS洗3次后, 加入300 μ L裂解buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L EDTA, 0.5% NP-40, 1/2 000 PMSF, 1/500 DTT, 2.5 mmol/L CaCl₂)冰上裂解10 min, 每隔2 min置涡旋仪上涡旋10 s, 共涡旋5次, 14 000 r/min, 4 °C离心5 min后, 收取上清, 同时用同样的方法制备L02细胞总蛋白, 设置无TF的对照组, BCA为细胞总蛋白定量。取200 μ L总蛋白与50 μ g的lhFVII-LDP融合蛋白在4 °C垂直摇床上共孵育2 h。同时设置细胞总蛋白与PBS共孵育的阴性对照组, 加入10 μ g/mL的鼠抗TF因子单抗, 置4 °C垂直摇床上孵育过夜, 同时设置加入非免疫小鼠血清的阴性对照组。之后向混合物中加入10 μ L Protein A Agarose 珠子, 4 °C垂直摇床上共孵育2 h后, 3 000 r/min, 4 °C离心1 min, 吸弃上清加入800 μ L裂解液4 °C, 垂直摇床上旋转洗5 min后, 3 000 r/min, 4 °C离心1 min, 重复洗一次, 弃上清后加入60 μ L 1 $\times$ PLB, 75 °C煮5 min, 133 000 r/min, 4 °C离心5 min, 吸取上清至新的离心管中, 用鼠抗人Factor VII单抗作Western blot检测。

1.2.7 Hoechst33342荧光染色 取对数生长期的MDA-MB-231细胞计数, 使其终浓度为 1×10^5 /mL, 接种至6孔板中, 37 °C, 孵箱中培养12 h后, 分别向细胞中加入含0.9 nmol/L lhFVII-LDP、0.9 nmol/L LDM和0.9 nmol/L lhFVII-LDM的培养基(培养基中补加2.5 mmol/L CaCl₂), 同时设置不加蛋白的对照组。孵箱中培养4 h后弃去培养基, PBS洗3遍后加入新鲜培养基继续培养。24 h后弃去培养基, PBS洗3遍, 用含10 μ g/mL的Hoechst33342染液染细胞核, 荧光显微镜下观察细胞核形态。

1.2.8 克隆形成实验 分别取指数生长期的MDA-MB-231细胞和L02细胞, 0.25%胰酶消化后计数, 分别用相应的完全培养基稀释成500/mL, 取1 mL细胞

悬液接种至6孔板摇匀后分别置于相应孵箱中培养24 h后, 用相应完全培养基稀释lhFVII-LDM, 使其在培养基中的终浓度为0.1 nmol/L, 之后弃去6孔板中的培养基, 再分别加入含0.1 nmol/L lhFVII-LDM的完全培养基(补加2.5 mmol/L CaCl₂), 同时设置不加药物处理的对照组细胞, 置于相应孵箱中培养2 h后, 弃去含药物的培养基, PBS洗三次, 再加入新鲜的完全培养基, 置于相应孵箱中培养14天, 弃去培养液, 1.25 mg/mL的NBT过夜染色后扫描图片。

1.2.9 强化融合蛋白lhFVII-LDM对人乳腺癌细胞MDA-MB-231裸鼠移植瘤的生长抑制作用 取5~6周龄的雌性BALB/c裸鼠30只, 体重16~18 g, 将MDA-MB-231细胞消化成单细胞悬液后, 用PBS洗两遍并计数, 用2 mL PBS重悬细胞使其密度约为 $5 \times 10^7 \sim 7 \times 10^7$ /mL, 在每只裸鼠右侧腋窝皮下接种100 μ L该细胞悬液。待肿瘤块长至40~50 mm³时, 将裸鼠分成3组, 每组6只, 尾静脉注射, 并且七天后进行第二次注射。实验设置以下三组: PBS组、0.15 mg/kg lhFVII-LDM和0.3 mg/kg lhFVII-LDM。实验期间每3天测量一次肿瘤直径和体重, 并根据公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积(a: 肿瘤长径, b: 肿瘤短径)。根据肿瘤体积绘制肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率。

2 结果

2.1 pET19b-lhFVII-LDP重组质粒的构建

利用PCR和重叠PCR成功获得了lhFVII-LDP片段, 并且将该片段连接到pET19b载体上, 重组质粒测序结果与原始序列一致。说明成功构建了pET19b-lhFVII-LDP融合蛋白原核表达质粒。

2.2 lhFVII-LDP融合蛋白的表达纯化及鉴定

通过Co²⁺亲和层析纯化, 纯化到的融合蛋白经12%的SDS-PAGE分析显示, 还原条件下在分子量35 kDa处有一蛋白质条带(图1A)。Western blot结果表明, 该融合蛋白能和鼠抗人Factor VII单抗特异性结合, 形成一特异性的条带, 并且分子量大小与预测结果一致(图1B)。

2.3 强化融合蛋白lhFVII-LDM的制备

反应产物用PBS洗脱后显示有一个大峰在280 nm和343 nm处均有吸收, 其比值约为2.8:1。LDM纯品的D₂₈₀/D₃₄₃比值恒为2:1, 辅基蛋白LDP的特征吸收峰

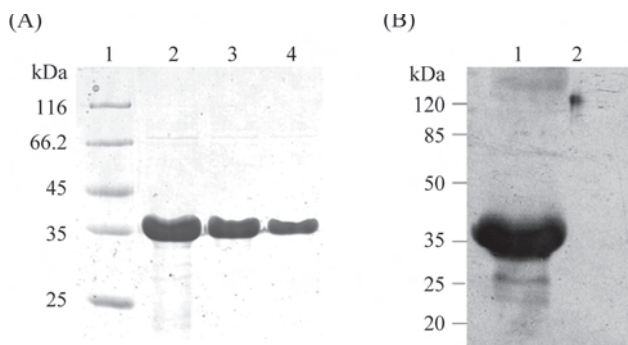


Fig.1 Analysis of the purified fusion protein by 12% SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

A: 1: 蛋白标准marker; 2~4: 纯化到的lhFVII-LDP蛋白; B: 1: lhFVII-LDP (用鼠抗人Factor VII单抗); 2: 空白对照(BL21总蛋白)。
A: 1: protein molecular standard marker; 2~4: the purified protein lhFVII-LDP; B: 1: lhFVII-LDP (with monoclonal mouse anti-human Factor VII antibody); 2: control (the total proteins of BL21).

图1 12% SDS-PAGE (A)和Western blot (B)分析纯化到的融合蛋白

Fig.1 Analysis of the purified fusion protein by 12% SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

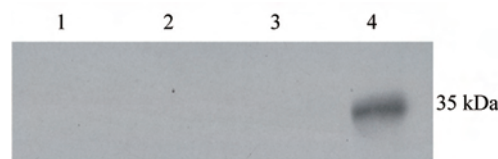
在280 nm, 发色团AE的特征吸收峰在343 nm, 所以推测融合蛋白lhFVII-LDP与发色团AE成功组装为强化融合蛋白lhFVII-LDM。

2.4 免疫共沉淀

本研究采用免疫共沉淀实验来检测lhFVII-LDP在体外与MDA-MB-231细胞表面TF的特异性结合。首先, 将细胞裂解液与融合蛋白lhFVII-LDP共孵育, 使之与TF相结合, 之后采用抗TF抗体进行免疫沉淀, 形成“TF-融合蛋白-抗TF抗体”的复合物, 再利用Protein A可以特异性的与抗体Fc段结合的特性, 将复合物沉淀下来, 之后再采用鼠抗人Factor VII单抗对lhFVII-LDP进行检测。实验结果显示(图2), lhFVII-LDP融合蛋白在体外可以与MDA-MB-231细胞表面的TF特异性的结合。

2.5 Hoechst33342荧光染色

用Hoechst33342对MDA-MB-231细胞进行活细胞荧光染色。结果显示(图3), 对照组细胞核均匀, 0.9 nmol/L lhFVII-LDM实验组细胞核固缩、核染色质浓缩, 而且出现明显的凋亡小体, 其细胞凋亡程度明显比同浓度的LDM要强很多, 说明在体外强化融合蛋白lhFVII-LDM能与MDA-MB-231细胞表面TF特异性结合并且能很好地诱导细胞凋亡。



1: PBS/MDA-MB-231细胞总蛋白/鼠抗TF单抗; 2: lhFVII-LDP/MDA-MB-231细胞总蛋白/小鼠非免疫血清; 3: lhFVII-LDP/L02细胞总蛋白/鼠抗TF单抗; 4: lhFVII-LDP/MDA-MB-231细胞总蛋白TF/鼠抗TF单抗。

1: PBS/the total protein of MDA-MB-231 cell/monoclonal mouse anti-human TF antibody; 2: lhFVII-LDP/the total protein of MDA-MB-231 cell/mouse preimmune serum; 3: lhFVII-LDP/the total protein of L02 cell/monoclonal mouse anti-human TF antibody; 4: lhFVII-LDP/the total protein of MDA-MB-231 cell/monoclonal mouse anti-human TF antibody.

图2 免疫共沉淀法鉴定lhFVII-LDP融合蛋白与TF结合的特异性

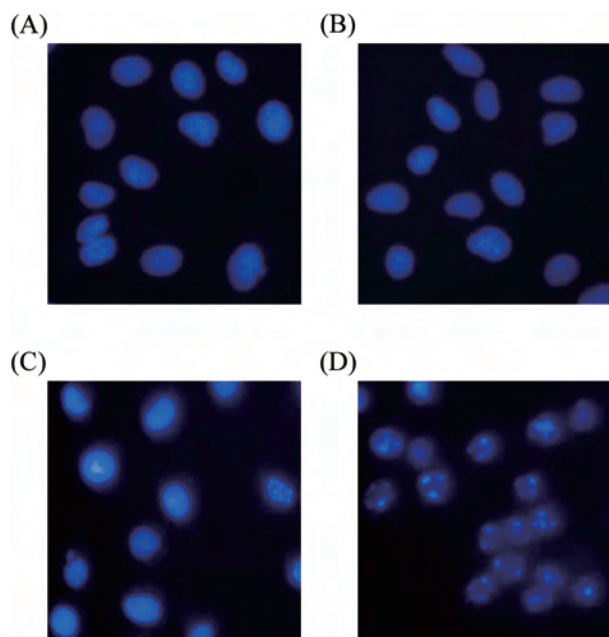
Fig.2 The specific binding of lhFVII-LDP protein with TF verified by co-immunoprecipitation assay

2.6 克隆形成

本文根据MDA-MB-231细胞高表达TF受体而L02细胞不表达TF受体的这一特点, 设计了平板克隆形成实验来检测lhFVII-LDM对TF表达量不同的细胞增殖能力的影响。实验结果显示(图4), 相同浓度的lhFVII-LDM对MDA-MB-231细胞的增殖抑制作用(图4D)比对L02细胞的作用强(图4B), 从而进一步说明lhFVII-LDM能与细胞表面的TF特异性结合, 达到杀伤肿瘤细胞的作用。

2.7 强化融合蛋白lhFVII-LDM对人乳腺癌MDA-MB-231裸鼠移植瘤的生长抑制作用

肿瘤生长曲线(图5)显示, 0.15 mg/kg、0.3 mg/kg两个剂量的强化融合蛋白lhFVII-LDM对乳腺癌MDA-MB-231裸鼠移植瘤生长都有抑制作用, 而且随着强化融合蛋白剂量的增加, 其抑瘤率也显著增大, 分别为44.5%和79%, 裸鼠体重变化曲线(图6)显示, PBS组小鼠体重只下降了0.9%, 0.15 mg/kg和0.3 mg/kg的lhFVII-LDM两个剂量组也只分别下降了0.9%和1.3%。体内实验表明, 强化融合蛋白lhFVII-LDM不仅可以提高动物对LDM的耐受剂量, 而且可以很好地抑制MDA-MB-231肿瘤的生长, 并且对机体的毒副作用也不大, 是具有很好前景的肿瘤靶向药物。

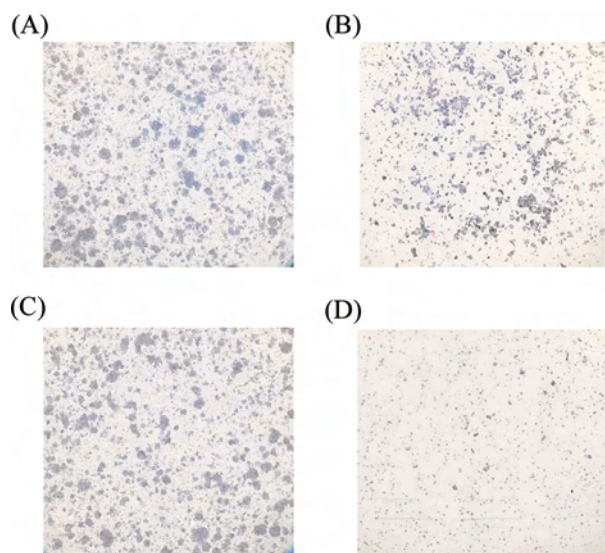


A: 对照组(PBS); B: 0.9 nmol/L lhFVII-LDM; C: 0.9 nmol/L LDM; D: 0.9 nmol/L lhFVII-LDM。

A: control (PBS); B: 0.9 nmol/L lhFVII-LDM; C: 0.9 nmol/L LDM; D: 0.9 nmol/L lhFVII-LDM.

图3 MDA-MB-231细胞经过lhFVII-LDM处理后的细胞凋亡检测(400×)

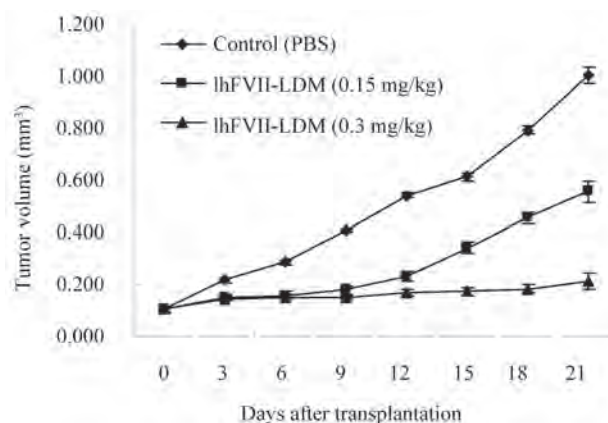
Fig.3 Apoptosis detection of MDA-MB-231 treated with lhFVII-LDM (400×)



A: L02细胞(PBS); B: L02细胞(0.1 nmol/L lhFVII-LDM); C: MDA-MB-231细胞(PBS); D: MDA-MB-231细胞(0.1 nmol/L lhFVII-LDM)。

图4 强化融合蛋白对L02细胞和MDA-MB-231细胞的增殖抑制作用

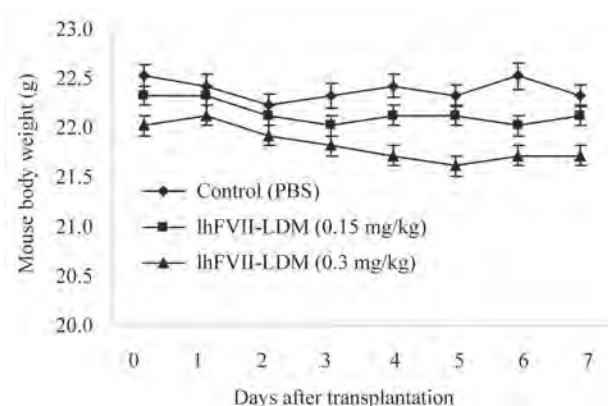
Fig.4 The inhibitory effect of energized fusion protein on the proliferation of L02 cell and MDA-MB-231 cell



MDA-MB-231肿瘤在裸鼠体内长至50 mm³时,将裸鼠分成3组(每组6只),尾静脉分别注射PBS(对照组)、0.15 mg/kg的lhFVII-LDM和0.3 mg/kg的lhFVII-LDM,一周以后再进行第二次注射。每3天测量一次肿瘤的长径和短径并且计算肿瘤的体积。肿瘤的平均体积大小如图所示,误差线显示的是标准方差。

When the MDA-MB-231 xenografts in nude mice grown to about 50 mm³, the mice were divided into 3 groups ($n=6$) and were injected with PBS (control), lhFVII-LDM (0.15 mg/kg, 0.3 mg/kg), respectively. One week later, the mice were given the injections again. The tumors were measured in two perpendicular directions and the volumes were calculated every 3 days. The average size of the tumors on each day is shown, the error bars show the mean value $\pm$ SE.

图5 lhFVII-LDM对MDA-MB-231裸鼠移植瘤生长的抑制
Fig.5 The growth inhibition of lhFVII-LDM to MDA-MB-231 xenografts in nude mice



裸鼠的处理如图4中所述,裸鼠每天的平均体重如图所示,误差线显示的是标准方差。

The mice were treated as described in Fig.4, the average weight of the mice on each day is shown, the error bars show the mean value $\pm$ SE.

图6 MDA-MB-231移植瘤裸鼠的体重

Fig.6 The body weight of the nude mice bearing MDA-MB-231 xenografts in the therapy experiment

3 讨论

近几十年来, 临床应用的肿瘤靶向药物主要有两类, 一是小分子靶向药物, 二是抗体靶向药物, 虽然抗体类靶向药物在临床应用上已经取得了令人瞩目的成绩, 但是由于抗体类药物本身客观存在的研发和生产成本较高、治疗费用较贵及人源化问题也使其发展面临许多挑战。因此, 配体—受体靶向药物因其靶向性强、毒副作用小等特点逐渐成为新药研发的热点^[16]。

Hu等^[17-18]的研究就已经证明FVII可以作为一个很好的肿瘤靶向治疗的配体。本实验就根据FVII的轻链lhFVII能单独和肿瘤细胞表面的TF结合的特点, 利用DNA重组和分子重组技术设计并制备了lhFVII-LDM强化融合蛋白。该药物具有以下几个特点: (1) lhFVII能特异性的将LDM带至肿瘤细胞内, 而对正常组织和细胞影响不大, 即降低了药物的毒副作用; (2) 选取lhFVII代替全长FVII作为配体, 使药物小型化的同时更有利于药物进入肿瘤细胞; (3) 利用大肠杆菌原核表达系统来表达纯化该蛋白, 降低了药物的成本。

目前, 我们已经成功地构建了融合蛋白原核表达质粒PET19b-lhFVII-LDP, 并且成功地诱导表达、纯化到了目的蛋白。在合作单位中国医学科学院医药生物技术研究所的帮助下, 高效地获得了强化融合蛋白lhFVII-LDM。实验证明, 在体外lhFVII-LDM强化融合蛋白能有效地诱导乳腺癌MDA-MB-231细胞的凋亡, 抑制MDA-MB-231细胞的增殖, 体内动物实验也显示该药物对MDA-MB-231肿瘤有良好的抑制作用, 并且抑瘤率可达到79%, 而且由于强化融合蛋白lhFVII-LDM能够特异识别肿瘤细胞表面的TF, 在肿瘤部位富集, 而与正常细胞的结合能力下降, 从而提高了动物对LDM的耐受剂量, 降低了毒副作用, 同时显著改善治疗效果, 是具有很好前景的配体—受体肿瘤靶向药物。但是, 在本实验中强化融合蛋白对机体正常组织和细胞的影响以及对其它肿瘤细胞的抑制作用等都还有待进一步的研究, 后续实验我们将着重在这些方面进行研究。

参考文献 (References)

- 1 Yamanaka T, Okamoto T, Ichinose Y, Oda S, Maehara Y. Methodological aspects of current problems in target-based anticancer drug development. *Int J Clin Oncol* 2006; 11(3): 167-75.
- 2 Geney R, Chen J, Ojima I. Recent advances in the new generation taxane anticancer agents. *Med Chem* 2005; 1(2): 125-39.
- 3 Head DM, Mettnews IT, Tones MA. Effect of divalent metal ions on the binding of tissue factor and activated factor VII. *Thrombais Res* 1997; 85(4): 327.
- 4 Bach R, Gentry R, Nemerson Y. Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: Induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry* 1986; 25(14): 4007-20.
- 5 Krishnaswamy S. The interaction of human factor VIIa with tissue factor. *J Biol Chem* 1992; 267(33): 23696-706.
- 6 Zhang N, Zhong R, Wang ZY, Deuel TF. Human breast cancer growth inhibited *in vivo* by a dominant negative pleiotrophin mutant. *J Biol Chem* 1997; 272(27): 16733-6.
- 7 郭艳丽. 两种不同乳腺癌细胞系组织因子表达与细胞转移力比较研究. *中国医师杂志* 2005; 7(9): 1187-8.
- 8 Toomey JR, Smith KJ, Stafford DW. Localization of the human tissue factor recognition determinant of human factor VIIa. *J Biol Chem* 1991; 26(29): 19198-202.
- 9 Xu YJ, Zhen YS, Goldberg IH. C1027 chromophore, a potent new enediyne antitumor antibiotic, induces sequence-specific double-strand DNA cleavage. *Biochemistry* 1994; 33(19): 5947-54.
- 10 McHugh MM, Gawron LS, Matsui S, Beerman TA. The antitumor enediyne C-1027 alters cell cycle progression and induces chromosomal aberrations and telomere dysfunction. *Cancer Res* 2005; 65(12): 5344-51.
- 11 Jiang B, Li DD, Zhen YS. Induction of apoptosis by enediyne antitumor antibiotic C1027 in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 208(1): 238-44.
- 12 Shao RG, Zhen YS. Relationship between the molecular composition of C1027, a new macromolecular antibiotic with enediyne chromophore and its antitumor activity. *Acta Pharm Sin* 1995; 30(5): 336-42.
- 13 Xin C, Ye S, Ming Y, Shenghua Z, Qingfang M, Hongxing G, *et al.* Efficient inhibition of B-cell lymphoma xenografts with a novel recombinant fusion protein: Anti-CD20Fab-LDM. *Gene Ther* 2010; 17(10): 1234-43.
- 14 Zhen YS, Ming XY, Yu B, Otani T, Saito H, Yamada Y. A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027 III antitumor activity. *Antibiot (Tokyo)* 1989; 42(8): 1294-8.
- 15 Chen Y, Shao R, Bartlam M, Li J, Jin L, Gao Y, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a macromolecular antitumor antibiotic, C1027. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2002; D58: 173-5.
- 16 甄永苏. 肿瘤的靶向治疗. *国外医学肿瘤学分册* 2002; 29(5): 323-6.
- 17 Hu Z, Sun Y, Garen A. Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(14): 8161-6.
- 18 Hu Z, Garen A. Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(16): 9221-5.

Preparation of Fusion Protein lhFVII-LDM and Its Inhibitory Effect on Breast Tumor

Hu Lian, Liao Dongsheng, Wu Chuanfang*

(Department of Functional Genome, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The aim of this text is to study the inhibitory effect of energized fusion protein lhFVII-LDM on MDA-MB-231 cell. The prokaryotic expression vector pET19b-*lhFVII-LDP*, composed of a light chain of human factor VII (lhFVII) and an apoprotein of LDM (LDP), was constructed through normal PCR and overlapping extension PCR. The recombinant vector was further transformed into *Escherichia coli* strain BL21 for expression under the induction of IPTG. Fusion protein was purified by Co²⁺ affinity chromatography. The identity of lhFVII-LDP was confirmed by Western blot assay and energized fusion protein lhFVII-LDM, composed of lhFVII-LDP and the active enediynes (AE), was obtained by molecular reconstitution. The specific binding activity of lhFVII-LDP with TF was verified by co-immunoprecipitation assay. Cloning form assay was used to detect the inhibitory effect of energized fusion protein on the proliferation of MDA-MB-231 cell. Apoptosis induced by lhFVII-LDM was detected by Hoechst33342. Moreover, nude mice model transplanted with human breast tumor was established to study the inhibitory effect of lhFVII-LDM on breast tumor. The results suggested that lhFVII-LDM could induce MDA-MB-231 cells apoptosis *in vitro*. The result of animal experiment showed that lhFVII-LDM had significant inhibitory effect on the growth of MDA-MB-231 tumor.

Key words factor VII; LDM; tumor suppression; MDA-MB-231 cell; expression and purification

Received: April 15, 2011 Accepted: June 10, 2011

This work was supported by the National Major Science and Technology Program Foundation for the Innovation on New Drugs (No.2009ZX09103)

*Corresponding author. Tel: 86-28-85418926, E-mail: wuchuanfang@gmail.com