

胞内抗体及其研究进展

洪美亚 曾冬云 龚兴国*

(浙江大学生物大分子与酶工程研究所, 杭州 310027)

摘要 胞内抗体是指在细胞内表达并被定位于亚细胞区室的一类新的工程抗体。目前胞内抗体的研究主要集中于 ScFv, ScFv 基因结构简单, 易导入细胞内表达且便于体外重组操作。胞内抗体作为一种新的基因治疗工具, 在肿瘤基因治疗、人艾滋病基因治疗的实验研究及潜在的临床治疗方面展示了广泛的应用前景。同时, 胞内抗体可以用作分析靶蛋白功能的研究工具, 是对传统的“基因剔除”转基因动物的一种有效补充。现从胞内抗体的设计及载体选择、肿瘤基因治疗、人艾滋病基因治疗等方面对胞内抗体的研究进展进行综述。

关键词 胞内抗体; 基因治疗; HIV-1; ScFv

随着抗体工程技术的发展以及对细胞内蛋白质运输信号的深入了解, 派生出了一项全新的可阻断细胞内重要靶蛋白的胞内抗体技术。胞内抗体 (intracellular antibody, intrabody) 是指在非淋巴细胞内表达并被定位于亚细胞区室 (如细胞核、细胞浆或某些细胞器), 特异性干扰或阻断靶分子的活性或加工、分泌过程, 从而发挥其生物学功能的一类新的工程抗体。它是靶向细胞内抗原, 具有特异性高、亲和力强的结合特性, 并能在特定的亚细胞中稳定表达的免疫球蛋白。胞内抗体已成为功能基因组学、蛋白质组学及基因治疗领域中广泛应用的实验工具。

1 胞内抗体的设计及载体选择

胞内抗体主要以 ScFv、Fab 两种形式存在。ScFv 抗体分子结构简单, 由抗体的重链可变区与轻链可变区通过一短肽 (GGGGS₃) 连接而成, 它基本保持了亲本抗体对抗原的亲和力。可变区基因不仅可通过提取某一特异性杂交瘤细胞 mRNA 后用 RT-PCR 获得, 而且噬菌体抗体库技术为其获取提供了丰富的源泉。由于 ScFv 基因结构简单, 便于体外重组操作, 当前已成为胞内抗体技术最常采用的抗体形式。Fab 包括重链的 V_H-C_H1 (Fd 段) 和完整轻链, 两者通过一个链间二硫键连接, 是完整抗体的三分之一。Fab 具有与抗体相同的抗原结合特性, 但是其重链和轻链必须在内核糖体入口位置同时表达才有实际应用价值。

针对不同的实验目的, 对 ScFv 蛋白的 N 端或 C 端进行一些修饰, 就可将 ScFv 人为地滞留于各个亚细胞区室中。将来源于 SV40 大 T 抗原的核定位信号 (NLS) 或 TAT 核仁前导序列信号同 C 末端连接, 可以制成核滞留型或核仁滞留型胞内抗体。在 N 端融合一段导肽或在 C 端引入一段内质网滞留信号 (KDEL), 可使 ScFv 滞留于内质网, 这在实际研究中比较常见。这是因为内质网是多种生物活性蛋白加工、分泌的通路, 将抗体滞留于内质网管腔或内膜上, 大大增加了抗体与靶蛋白相互作用的机会。

细胞内表达单链抗体的载体包括: 逆转录病毒载体、腺病毒载体及腺病毒相关病毒载体、单纯疱疹病毒载体和脂质体载体^[1]。其中腺病毒载体可携带 Fab 基因转入淋巴细胞, 使治疗基因导入复制和非复制细胞, 且消除了鼠源性逆转录病毒基因转化中潜在激活 HIV-1 的问题。通过改变载体调控结构、改进载体的包装技术, 可提高转化效率, 并使 ScFv 在宿主细胞内高效表达。

2 胞内抗体与肿瘤基因治疗

经重组 DNA 技术及真核表达载体的构建, 可使胞内抗体在肿瘤细胞特定的亚细胞器中表达并且靶向抗原底物。目前研究较多的主要靶蛋白包括: 表皮生长因子受体超家族 (EGFR、ErbB-2、ErbB-3、ErbB-4)、白细胞介素 2 受体 (IL-2R)、Ras 蛋白、叶

收稿日期: 2005-09-19 接受日期: 2006-01-13

* 通讯作者。Tel: 0571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn

酸受体(FR)、抑癌蛋白 p53、Bcl-2 蛋白、c-Myb 蛋白以及 IV 型胶原酶等与肿瘤发生发展各个阶段密切相关的重要蛋白质。胞内抗体阻断靶蛋白主要有以下两种方式。

2.1 在分泌途径上阻断靶蛋白

IL-2R 是一种异源三聚体, 由 α 、 β 和 γ 链组成。它在许多 T 细胞和 B 细胞白血病细胞中均有过度表达, 尤其是在 T 细胞白血病病毒(HTLV-1)相关成人 T 细胞白血病中。研究发现内质网滞留型胞内抗体可通过在内质网中结合 IL-2R 从而有效阻断其向细胞表面的运输。Richardson 等^[2]构建了抗 IL-2R α 的 ScFv, 转入 Jurkat T 细胞中, 在细胞内表达的 ScFv Tac 完全抑制细胞表面的 IL-2R 表达, 其机制可能是在内质网中将表达的受体链降解。研究结果表明 ScFv 胞内抗体为考察 IL-2R 在 T 细胞活化、IL-2 信号转导和白血病细胞生长抑制研究提供了一个有价值的工具。

ErbB-2 跨膜蛋白是在肿瘤细胞表面过度表达的酪氨酸激酶受体, 通过细胞内抗体在内质网内可使 ErbB-2 的表面表达明显降低, 导致生长停滞和细胞向非转化型显性型逆转。由于受体酪氨酸激酶家族在调节细胞生长和分化中起重要作用, 它们也就成为抗癌治疗的新的靶标^[3]。Alvarez 等^[4]把抗 ErbB-2 的 ScFv-5R 亚克隆入逆转录病毒载体, 导入小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 中, 结果显示该抗体与 ErbB-2 结合并阻止了其通过内质网的转运, 表现为细胞中含磷酸酪氨酸的蛋白质密度降低和转化表型的逆转。Deshane 等^[5]报道了内质网靶向的针对 HER-2 细胞外结构域的胞内抗体的生物学作用, 研究结果显示胞内抗体抑制了细胞表面 HER-2 的表达和细胞增殖, 并诱导细胞凋亡, 对肿瘤细胞克隆生成具有较强抑制作用。利用带有抗 ErbB-2 的单链抗体基因的重组腺病毒, 可使腹腔内接种人类 ErbB-2 过度表达的卵巢癌小鼠的存活期得到显著延长, 为胞内抗体技术应用于临床基因治疗打下了基础。

恶性肿瘤细胞的侵袭转移与肿瘤细胞及其基质诱导产生的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)的水平呈正相关。IV 型胶原酶(包括 MMP-2 和 MMP-9)在人类前列腺癌、胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤细胞中均有高表达, 与肿瘤的侵袭、转移和恶性进展密切相关^[6-8]。构建编码可在内质网滞留的抗 IV 型胶原酶单链抗体的表达载体, 并通过脂质体转入人巨细胞肺癌 PG 细胞系内。

此 ScFv 可以在 PG 细胞内表达, 并能够特异性地与靶蛋白结合, 在蛋白质加工、分泌这一关键步骤抑制 MMPs 的活性, 从而抑制了肿瘤细胞体外侵袭和增殖, 在肿瘤基因治疗中具有重要的应用前景^[9]。

2.2 在细胞质和细胞核中阻断靶蛋白

在细胞质中表达胞内抗体一般通过简单地删去免疫球蛋白的前导序列来完成。ras- 原癌基因 p21^{ras} 是一膜相关蛋白质, 在细胞生长和分化过程中具有关键性功能。突变型的 ras 基因广泛存在于许多人类肿瘤中, 其蛋白质产物 p21^{ras} 是细胞浆中一种鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 主要与细胞的增殖、分化有关。用细胞内捕获技术分离能与 Ras 蛋白相结合的胞内抗体, 将可溶性较大的 ScFv 核心结构突变成标准核心结构, 实验表明即使功能域中无二硫键连接, 核心结构还是胞内抗体发挥功能的区域。通过将轻、重链可变区的抗原互补决定簇插入核心结构后, 改建后 ScFv 与 Ras 蛋白呈现高亲和力并且明显抑制 Ras 介导 NIH-3T3 细胞的转化^[10]。

原癌基因 c-myb 的表达是癌转化的重要因素。在 c-Myb 癌蛋白阳性细胞——K562 的细胞质和细胞核内表达抗体, 导致对 c-Myb 癌蛋白的功能性剔除^[11], 为研究 c-myb 诱导的癌转化分子机制和 c-myb 依赖性疾病的基因治疗提供了新思路。

3 胞内抗体与人艾滋病基因治疗

胞内抗体自一开始便被认为有望在艾滋病的基因治疗中有广泛地应用前景, 它作用于病毒结构蛋白、调节蛋白、酶蛋白, 并在特定细胞器与靶结构结合并抑制病毒生活周期不同阶段的功能, 而这些靶结构都是 HIV-1 病毒生存、繁殖的必需结构。目前, 抗 HIV-1 胞内抗体研究处于体外试验阶段, 临床基因治疗的报道较少。

3.1 抗包膜糖蛋白胞内抗体

HIV-1 包膜糖蛋白是作为 gp160 前体合成的, 并在高尔基复合体内分裂为成熟的 gp120/41 蛋白^[12]。gp120 与未感染细胞的 CD4 受体的相互作用不仅对病毒感染而且对 CD4⁺ T 细胞耗竭、功能失调和 CD4 介导的细胞信号破坏都有重要作用, 这将有助于 AIDS 的发病机制的研究^[13]。胞内抗体 sFv105 可以在内质网结合 gp160 前体从而阻止其向细胞表面的转运, 导致病毒颗粒不具备感染力。在 HIV-1 感染的细胞内, 胞内抗体 Fab105 与 gp160 前体结合并抑制其加工整合, 产生弱或无感染力的病毒颗粒。此

外, 分泌到细胞外的 Fab105 可以中和胞外游离的病毒颗粒, 保护未被感染的周围细胞。

3.2 抗 Tat 胞内抗体

Tat 是 HIV-1 的一关键反式激活蛋白, 是一种小分子 HIV-1 长末端序列重复序列(LTR)转录激活因子, 它通过与转录延伸因子的亚单位 *cyclinT1* 作用, 然后共同结合到转录激活反应元件 RNA 上, 从而激活病毒转录。针对 Tat 外显子 1 和 2, 构建两种抗 Tat ScFv。ScFvTat1 能阻断 Tat 的反式活化和质-核转运, 而 ScFvTat2 作用较弱。因此有研究认为外显子 1 对 Tat 反式激活是必需的, 而 2 是非必需的。在稳定表达抗人 *cyclinT1* 的 Jurkat T 细胞几乎可完全抑制低剂量 HIV-1 病毒的攻击, 在稳定表达抗人 *cyclinT1*SupT1 细胞中可抑制 74%~88% 高剂量 HIV-1 病毒的攻击, 这两种抗体都没观察到对细胞的毒性作用^[14]。由于针对 Tat 的体液和细胞免疫反应在人和猴中能延缓疾病发展, 有人认为 Tat 是控制病毒复制和阻止疾病发展的最理想的靶蛋白^[15]。目前, 针对 Tat 的 HIV 基因治疗正处于临床试验阶段。

3.3 抗 Rev 胞内抗体

Rev 是 HIV-1 必需的另一调节蛋白, 它通过控制胞浆内的 RNA 种类来调节蛋白质的表达。它穿梭于感染细胞的核和胞浆之间并促进含有内含子的 HIV mRNAs 的核浆转运^[16]在病毒复制中发挥重要作用。Rev 缺乏导致仅早期调节蛋白的表达, 晚期调节蛋白和结构蛋白不能表达。抗 Rev 胞内抗体在 HeLa 细胞内表达, 与 Rev 结合并阻断了其向核内的转位, 病毒 mRNA 初始转录、加工、释放和合胞体形成被抑制, 最终导致病毒产生被抑制。

3.4 抗 Vif 胞内抗体

Vif 是 HIV-1 编码的与病毒复制和感染相关的重要蛋白质, 存在于胞浆中以一种不明的机制参与病毒的组装, 是体内决定 HIV-1 传染性的重要因素。Vif 与细胞膜、中间丝、HIV-1 Gag 和病毒 RNA 相互作用^[17,18]。Hassaine 等^[18]认为 Vif 能抵消酪氨酸激酶 Hck 的活性, 从而作为 HIV-1 复制的抑制剂。Concalves 等^[19]用逆转录病毒载体含抗 Vif 胞内抗体基因转染外周血核细胞, 显示对 HIV-1 病毒具有抗性。

4 胞内抗体作为研究分子功能的工具

细胞内抗体可以用作分析靶蛋白功能的研究工具, 是对传统的“基因剔除”转基因动物的一种有效补充。与基因剔除相比, 胞内抗体技术的优势

在于它可用于一些与细胞生长、分化必需的蛋白质的研究, 还可以同时对一种以上的蛋白质进行“剔除”。用细胞内抗体通过在胞内与 IL-2R 结合可有效阻断其在激活的 Jurkat T 细胞上的高表达, 而并不影响细胞表面其他分子, 如 CD2、CD4 和 CD8 的表达。利用这种方法可以研究 IL-2 信号转导及 IL-2R 过量表达对白血病细胞生长的影响^[20]。同样, 高亲和力 IL-2R 表达的抑制, 可为各种 T 细胞介导的异常反应引起的疾病, 如排异及某些自身免疫疾病的治疗提供新途径。胞内抗体也可抑制整合素(integrin)VLA-4 的成熟和功能。将抗 VLA-4 的单链抗体可变区基因 ScFv-195 导入人 RD 细胞和 Jurkat 细胞, 检测发现这些细胞表面 VLA-4 的表达分别下降 80% 和 65%~100%, 并且黏附和伸展功能受损^[21]。

5 展望

近年来的研究使胞内抗体的应用范围更加广泛。它主要应用在抑制病毒复制特别是 HIV-1 复制和肿瘤基因治疗方面, 现在已经拓展到中枢神经系统疾病、移植排斥和自身免疫疾病等领域。Huntington 舞蹈病(HD)是常染色体显性遗传的缓慢进行性基底节和大脑皮质的变性疾病, 临床以舞蹈、进行性痴呆、精神情感障碍为主要表现, 其特征是亨廷顿蛋白的 N 末端有多个谷氨酰胺, 诱导病理性的蛋白质间相互作用形成多聚体而致病。抗亨廷顿蛋白的 N 末端 17 个氨基酸多肽的胞内抗体可减少多聚体的形成, 有望用于该疾病的治疗^[22]。Miller 等^[23]首先发现了 htt 特异的胞内抗体(C4)选择性作用于可溶的 C 末端片段, C4 通过结合非团聚的 htt 降低了 C 末端 htt 片段的稳态水平。

胞内抗体主要以 ScFv 的形式成功地抑制了胞内靶蛋白在特定细胞区室的功能。正如单克隆抗体开辟了人类疾病治疗的新纪元, 胞内抗体作为治疗和研究的抗体工具也存在广泛的前景。尽管胞内抗体对一些疑难疾病的治疗方面显示了良好的应用前景, 但它真正用于疾病治疗前还存在一些问题^[24]; 如抗靶分子的抗体基因如何到特定的组织细胞内; 载体的研究还需要长足的进展; 胞内抗体基因在细胞内能不能持久稳定的表达以达到足够的胞内浓度; 胞内抗体的毒性和免疫原性问题; 如何增加胞内抗体的正确折叠、保持生物活性、延长血中半衰期; 如何获得大量有治疗价值的胞内抗体等这些

问题还有待于进一步的研究和临床试验。

参考文献 (References)

- [1] Naldini L *et al. Science*, 1996, **272**: 263
- [2] Richardson JH *et al. Virology*, 1997, **237**: 209
- [3] Bellmunt J *et al. Crit Rev Oncol Hematol*, 2003, **46**(Suppl): S85
- [4] Alvarez RD *et al. Clin Cancer Res*, 2000, **6**: 3081
- [5] Deshane J *et al. J Clin Invest*, 1995, **96**: 2980
- [6] Koul D *et al. Oncogene*, 2001, **20**: 6669
- [7] Morini M *et al. Int J Cancer*, 2000, **87**: 336
- [8] Fishman DA *et al. Cancer Res*, 2001, **61**: 3194
- [9] 沈恩允等。癌症, 2004, **23**: 1005
- [10] Tanaka T *et al. EMBO J*, 2003, **22**: 1025
- [11] Kasono K *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **251**: 124
- [12] Marasco WA *et al. Hum Gene Ther*, 1998, **9**: 1627
- [13] Conti L *et al. Immunobiology*, 2004, **209**: 99
- [14] Bai J *et al. J Biol Chem*, 2003, **278**: 1433
- [15] Fanales-Belasio E *et al. DNA Cell Biol*, 2002, **21**: 599
- [16] Pollard VW *et al. Annu Rev Microbiol*, 1998, **52**: 491
- [17] Khan MA *et al. J Virol*, 2001, **75**: 7252
- [18] Hassaine G *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 16885
- [19] Concalves J *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 32036
- [20] Richardson JH *et al. Gene Ther*, 1998, **5**: 635
- [21] Yuan Q *et al. Biochem J*, 1996, **318**: 591
- [22] Murphy RC *et al. Brain Res Mol Brain Res*, 2004, **121**: 141
- [23] Miller TW *et al. Neurobiol Dis*, 2005, **19**: 47
- [24] Lobato MN *et al. Curr Mol Med*, 2004, **4**: 519

Intrabody and Its Latest Advances

Mei-Ya Hong, Dong-Yun Zeng, Xing-Guo Gong*

(Institute of Biomacromolecule and Enzymatic Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract As we all know, intrabody is a new engineering antibody which is expressed in cell and oriented in subcellular area. Due to ScFv gene's simple structure, it is amiable to expressed in cell and convenient for *in vitro* recombination operation. Accordingly current research on intrabody concentrate on ScFv. As a new gene therapy tool, intrabody brings forth extensive application foreground in the aspects of tumor gene therapy and human HIV gene therapy's experimental study and potential clinical therapy. At the same time, intrabody is also served as a study tool for analyse the function of target protein, and it's an effective complementarity to the traditional "gene knock-out" genetically modified animal. This article summarizes intrabody's latest research advances from its design and the selection of vector, tumor gene therapy and human HIV gene therapy.

Key words intrabody; gene therapy; HIV-1; ScFv

Received: September 19, 2005 Accepted: January 13, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-571-87953002, E-mail: gongxg@zju.edu.cn