

## 抑癌蛋白 PTEN 的原核表达、抑癌活性研究和抗体制备

# Prokaryotic Expression of Functional PTEN in *Escherichia coli* and Preparation of Polyclonal Antibody

侯 鑫\* , 刘俊娥 , 扈廷茂

HOU Xin\* , LIU Jun-E and HU Ting-Mao

内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021

College of Life Sciences , Inner Mongolia University , Hohhot 010021 , China

**摘 要** PTEN 是具有蛋白质和酯类双重特异性磷酸酶活性的抑癌蛋白 , 在肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。鉴于原核表达 PTEN 蛋白并用于抑癌实验的研究尚未见报道 , 因此尝试利用大肠杆菌表达有活性的 PTEN 蛋白 , 检测其抑癌效果。利用本室克隆的 PTEN 基因 cDNA 和原核表达载体 pET-44a(+) 分别构建带 6 × His 和 Nus 标签的两种诱导型原核融合表达载体 pET-PTEN 和 pET-Nus-PTEN , 在不同的大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3) (简称为 BL) 和 Rosetta-gami(DE3) pLysS (简称为 RG) 中诱导表达。SDS-PAGE 和 Western blot 检测表明 : 在可溶性组分和包涵体中均含有目的蛋白 , 在 BL 中目的蛋白的表达量较高(18.7%) 而在 RG 中可溶性蛋白的比例较高(6.6%)。经纯化和包涵体蛋白复性处理后 , 重组融合蛋白经 Chariot 转运入小鼠实体瘤及人前列腺癌 DU-145 细胞。抑癌实验表明 : 与对照组相比 , 重组 PTEN 蛋白对小鼠实体瘤的生长抑制率为 58.76% ; 对癌细胞 DU-145 的生长抑制率可达 46.16% ; 并可导致明显的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞 , 其中在宿主 RG 中表达的重组蛋白抑癌效果明显高于 BL 宿主中表达的目的蛋白。证实原核系统中表达的重组 PTEN 蛋白具有抑癌活性 , 同时制备了 PTEN 的高效价腹水多抗 , 为深入研究 PTEN 蛋白在癌症治疗中的应用打下了良好的基础。

**关键词** PTEN , 原核表达 , 抑癌活性 , 多克隆抗体

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0058-07

**Abstract** PTEN , a dual-specificity phosphatase , exerts its tumor-suppressive effects through the inhibition of cell cycle progression and cell immigration , therefore could be an important candidate for tumor-suppression. As study on prokaryotic expression of PTEN and its anti-tumor functions has not been reported , the present study aims at an efficient expression of functional PTEN in *Escherichia coli* and the investigation of its tumor-suppression activity. PTEN cDNA cloned in our lab previously was recombined into prokaryotic expression vector pET-44a(+) to construct pET-PTEN (pEP) and pET-Nus-PTEN (pENP). PTEN was fused with 6 × His tag in pEP , and with Nus in pENP , which could be useful for a stable and soluble expression. The recombinant vectors were transformed into both BL21(DE3) (BL) and Rosetta-gami(DE3) pLysS (RG). The former is a normal expression host while the latter is optimized for expression of eukaryotic genes and folding of target proteins. On the induction of 0.5mmol/L IPTG , 55kD and 118kD specific protein bands were observed , corresponding to His-PTEN and Nus-PTEN fusion proteins , respectively. Western blot analysis showed the recombinant fusion proteins could react with PTEN

Received : July 26 , 2005 ; Accepted : October 26 , 2005 .

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China ( No. 30060059 ).

\* Corresponding author. Tel 86-471-4991483 ; E-mail : houxin2001@263.net

国家自然科学基金项目资助 (No. 30060059) .

polyclonal antibody. The recombinant PTEN was expressed both in soluble fraction and inclusion body. Higher expression levels of recombinant PTEN were obtained in BL( His-PTEN : 10.3% ; NusA-PTEN : 18.7% ), whereas the higher percentages of soluble recombinant proteins were observed in RG( His-PTEN : 4.7% ; Nus-PTEN : 6.6% ). The obtained recombinant fusion proteins were purified by affinity chromatography and were showed to be homogeneous in SDS-PAGE. In tumor-suppression experiments , His-PTEN was proved to have significant inhibition on growth of mice solid tumor with an inhibitory ratio of 58.76% , and on the proliferation of DU-145 tumor cells with an inhibitory ratio of 46.16% . The cell cycle progression of DU-145 tumor cells was also arrested from G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> to S phase. His-PTEN from RG was proved to have significantly higher tumor-suppression activity than that from BL , indicating that there may be some advantages for eukaryotic genes to be expressed in the former host. This is the report of functional recombinant PTEN expressed in *Escherichia coli* . Purified His-PTEN was used for immunizing Kunming mice , and ascitic polyclonal antibodies raised against His-PTEN were generated using sarcoma 180 cells. At 1 : 2000 dilution , the antibodies could interact with PTEN by western blot. The present study has laid a foundation for application of PTEN in cancer therapy .

**Key words** PTEN , prokaryotic expression , tumor-suppression activity , polyclonal antibody

PTEN ( phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10 , PTEN )是 1997 年由 3 个独立的研究小组同时发现的新抑癌基因<sup>[1-3]</sup> ,编码 403 个氨基酸 ,蛋白大小约 55kD. PTEN 蛋白是至今为止发现的第一个具有蛋白质和酯类双重特异性磷酸酶活性的抑癌因子<sup>[1]</sup> . 国外学者的研究表明 PTEN 蛋白的多种生物学功能都与抑癌作用相关 ,如诱导细胞周期停滞<sup>[4,5]</sup>、增加 p53 蛋白的稳定性<sup>[6]</sup>、与细胞外基质发生相互作用从而抑制细胞的迁移<sup>[7]</sup>、抑制实体瘤内微血管的形成<sup>[8]</sup>等。目前国内的研究局限于癌变组织中 PTEN 突变的检测及 PTEN 真核表达载体对癌细胞的生长抑制作用方面<sup>[9]</sup> ,而 PTEN 的原核表达、重组 PTEN 蛋白抑癌活性的研究尚未见报道。

本研究利用本室克隆的 PTEN 基因 cDNA<sup>[10]</sup>和原核表达载体 pET-44a( + )分别构建带 6 × His 和 Nus 标签的两种诱导型原核融合表达载体 pET-PTEN 和 pET-Nus-PTEN ,在不同的大肠杆菌表达宿主 BL21( DE3 )( 以下简称为 BL )和 Rosetta-gami ( DE3 )pLysS( 以下简称为 RG )中诱导表达 ,检测重组 PTEN 融合蛋白对小鼠实体瘤生长、癌细胞周期和细胞增殖的影响 ,同时制备了其高效价多抗 ,为深入研究 PTEN 在肿瘤临床治疗中的应用价值和开展 PTEN 蛋白的生物学功能研究打下了基础。

由于肝癌细胞中 PTEN 蛋白的表达量显著降低<sup>[9]</sup> ,因此本研究用肝癌荷瘤小鼠检测外源 PTEN 蛋白对实体瘤生长的影响。DU-145 前列腺癌细胞系为 PTEN 基因 100% 突变的细胞系<sup>[1]</sup> ,本研究中用于检测 His-PTEN 融合蛋白对癌细胞生长和细胞周期的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂、菌种及质粒

原核表达载体 pET-44a( + )( 以下简称为 pET )、大肠杆菌 BL21( DE3 )、大肠杆菌 Rosetta-gami ( DE3 ) pLysS、包涵体蛋白纯化及复性试剂盒、HRP 标记二抗购自 Novagen 公司 ,蛋白转运营载体 Chariot 为 Active Motif 公司产品 ,6 × His 蛋白纯化试剂盒及细胞裂解液为 Pierce 公司产品 ,硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品 ,弗氏完全和不完全佐剂购自 Sigma 公司 ,蛋白质分子量标记为上海生工公司产品 ,商品化 PTEN 多克隆抗体购自福州迈新公司 ,实验动物 6 ~ 8 周龄昆明鼠由内蒙古大学实验动物中心提供 ,动物合格证号 SCXK( 蒙 )2002-0001 ,肝癌实体瘤小鼠由内蒙古医学院实验动物中心提供 ,实验用实体瘤小鼠由本室制作 ,DU-145 人前列腺癌细胞和 S180 腹水瘤细胞由本实验室冻存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、LA Taq DNA 聚合酶、λDNA/EcoT14 Marker 和胶回收试剂盒购自大连宝生物公司 ,其它试剂为国产分析纯。DNA 序列测定由上海生工公司完成。

### 1.2 原核融合表达载体的构建

含 PTEN 基因 cDNA 的质粒 pMD-PTEN 由本室构建和保存<sup>[10]</sup> ,用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pMD-PTEN ,回收目的片段后与经相同酶切的原核表达载体 pET 大片段连接 ,构建表达载体 pET-PTEN( 以下简称为 pEP ) ,其中融合标签 Nus 被切除 ,仅在 PTEN 基因 3' 端保留 6 × His 标签 ;用 *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切质粒 pMD-PTEN ,构建表达载体 pET-Nus-PTEN( 以下简称为 pENP ) ,其中 PTEN 基因位于融合标签 Nus 的下游 ,并保留了 6 × His 标签。本研究中的常规实验操作参照文献<sup>[1]</sup> 进行。

### 1.3 重组融合蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

表达载体 pEP 和 pENP 均分别转化表达宿主 BL 和 RG 感受态细胞,筛选阳性克隆后按常规方法诱导, IPTG 终浓度为 0.5mmol/L, BL 于 28℃、RG 于 37℃诱导。诱导 4h 后裂解菌体, 15% SDS-PAGE 检测总蛋白、可溶性及包涵体组分。目的蛋白的 Western blot 鉴定参照文献 [11] 进行,兔源 PTEN 多抗按 1:1000 稀释,羊抗兔二抗按 1:2000 稀释。按照 His 蛋白纯化试剂盒纯化可溶性和包涵体蛋白组分,电泳检测纯化产物并用复性试剂盒进行包涵体蛋白复性(透析法)。

### 1.4 肝癌实体瘤小鼠的制作

取肿瘤生长旺盛的肝癌荷瘤小鼠,颈椎脱臼处死,无菌条件下取出瘤块,制成单细胞悬液,每只昆明小鼠右前肢皮下注射癌细胞悬液 0.5ml(浓度约  $2 \times 10^7$ /mL),小鼠第 5~7d 成瘤。

### 1.5 重组蛋白对实体瘤生长的影响

在小鼠带瘤生长至第 10 天时,将小鼠随机分 5 组,每组 20 只。对照组 2 组,其中空白对照组不注射任何溶液,Chariot 组于第 11~20 天每日注射与实验组等量的 Chariot 溶液;实验组分为 BL、RG1 和 RG2 组:BL 和 RG1 组分别注射来自宿主 BL 和 RG 的包涵体复性蛋白, RG2 组注射来自宿主 RG 的可溶性蛋白。以下功能实验的蛋白分组情况亦同。参照试剂盒说明书,以 Chariot 为转载体,在 11~20d 每日每只注射蛋白溶液 1ml(50  $\mu$ g/mL),于第 21 天用颈椎脱臼法处死小鼠,解剖剥离瘤块,称瘤重,按以下公式计算抑瘤率:肿瘤抑制率=(对照组瘤重-实验组瘤重)/对照组瘤重  $\times$  100%。实体瘤于 -80℃冻存,用于检测外源 PTEN 含量。

### 1.6 MTT 法检测 PTEN 融合蛋白对细胞生长的影响

用 DMEM/10% FBS 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 DU-145 细胞,贴壁长至 40% 融合后用 0.25% 胰蛋白酶消化,调整细胞浓度至  $2 \times 10^3$ /孔接种于 96 孔板,过夜培养。细胞分 5 组,空白对照组不做任何处理,Chariot 组仅用 Chariot 处理, BL 组和 RG1、RG2 组用 Chariot 分别转运来源于宿主 BL 和 RG 的不同浓度 His-PTEN 融合蛋白,分别于 24h、48h、72h 和 96h 后按 MTT 测定法,每孔加入 MTT (5.0  $\mu$ g/ $\mu$ L) 20 $\mu$ L, 37℃ 孵育 4h,弃上清,每孔加入 200 $\mu$ L DMSO,振荡 10min,在酶标仪(Labsystems, Wellscan MK3)上测 570 nm 处吸光度值,重复 3 次,计算平均值。按以下公式计算抑制率:细胞生长抑制率(IR%)=(1-实验组 A<sub>570</sub>值/对照组 A<sub>570</sub>值)  $\times$  100%。

### 1.7 流式细胞仪检测重组融合蛋白对细胞周期的影响

DU-145 细胞贴壁长至 40% 融合时分为 5 组,分组设置同上。实验组转运的蛋白浓度为 10.0  $\mu$ g/mL。处理后 72h 用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞后稀释成  $2 \times 10^6$ /mL 的细胞悬液, PBS 洗 2 次, 75% 乙醇悬浮并固定细胞,碘化丙啶(PI 5.0  $\mu$ g/mL)染色 30min,取  $1 \times 10^5$  个细胞在流式细胞仪(Coulter Elite)上测定 DNA 含量,利用 Multicycle 软件分析细胞周期分布。

### 1.8 PTEN 腹水多抗的制备

纯化的 His-PTEN 融合蛋白与等体积弗氏完全、不完全佐剂混合成油包水的乳剂,免疫昆明鼠,腹部皮下多点注射,剂量为每只每次 50 $\mu$ g,间隔 15~20d,共免疫 4 次,第 5 次采用腹腔直接注射加强免疫。免疫后 5d 测定血清的抗体效价。然后腹腔注射 S180 细胞,待小鼠腹腔膨胀、皮毛无光泽时,开始收集腹水。腹水抗体的效价测定采用间接 ELISA 法。

### 1.9 实体瘤中外源 PTEN 蛋白的检测

取第 21 天(即注射蛋白 10d 后)处死的小鼠实体瘤组织检测 PTEN 蛋白。将 30mg 实体瘤组织仔细切碎后用胰蛋白酶消化成单细胞悬液, PBS 洗涤 3 次,裂解细胞, Bradford 法测定蛋白浓度,按每个样品 80 $\mu$ g 上样电泳,经 Western blot 检测小鼠实体瘤中的 PTEN 蛋白。自制腹水一抗为 1:2000 稀释, HRP 标记羊抗鼠二抗为 1:3000 稀释。

### 1.10 统计学分析

实验数据采用 *t* 检验,检验水准以  $P < 0.05$  为有显著差异。应用 SPSS 11.0 for Windows 软件包进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 原核表达载体的构建

具有 6 $\times$  His 标签的表达载体 pEP 和 Nus 融合标签的表达载体 pENP 的酶切和 PCR 鉴定见图 1,两种重组表达载体均经测序核实。

### 2.2 目的蛋白的诱导表达及纯化、鉴定

经 15% SDS-PAGE 检测,在 BL/pEP 和 RG/pEP 诱导产物中出现约 55kD 大小的特异蛋白条带, BL/pENP 和 RG/pENP 诱导产物中出现约 118kD 大小的特异蛋白条带(图 2),分别与 6 $\times$  His-PTEN 蛋白和 Nus-PTEN 融合蛋白的预期大小一致。蛋白表达量及可溶性组分和包涵体组分所占比例见表 1 和图 3。包涵体蛋白经纯化后可得到电泳均一的蛋白,可溶性组分经 2 次过柱纯化可得到电泳基本均一的目的蛋白(图 4)。

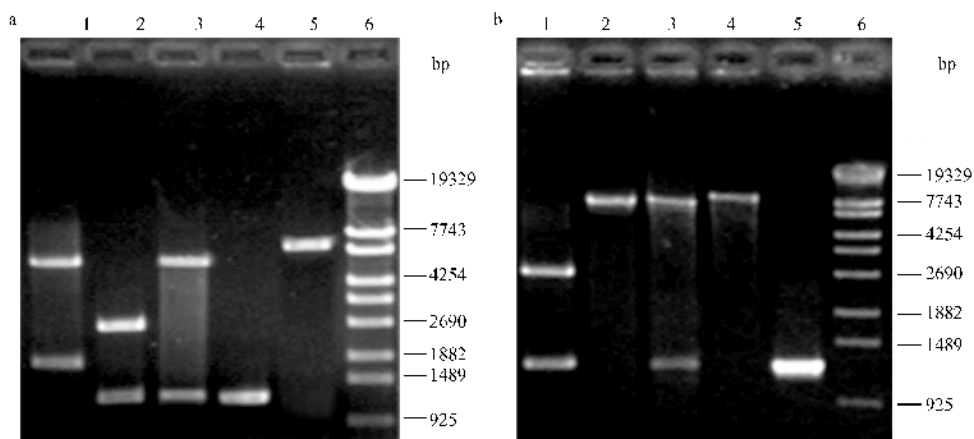


图 1 重组表达载体 pEP 和 pENP 的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 1 Restriction and PCR analysis of recombinant expression vector pEP and pENP

(a) restriction and PCR analysis of pEP. 1 : pET/*Nde* I + *Xho* I ; 2 : pMD-PTEN/*Nde* I + *Xho* I ; 3 : pEP/*Nde* I + *Xho* I ; 4 : PCR product of pEP ; 5 : pEP/*Nde* I ; 6 : λDNA/*Eco*T 14 marker. (b) restriction and PCR analysis of pENP. 1 : pMD-PTEN/*Eco*R I + *Sal* I ; 2 : pET/*Eco*R I + *Sal* I ; 3 : pENP/*Eco*R I + *Sal* I ; 4 : pENP/*Eco*R I ; 5 : PCR product of pENP ; 6 : λDNA/*Eco*T 14 marker.

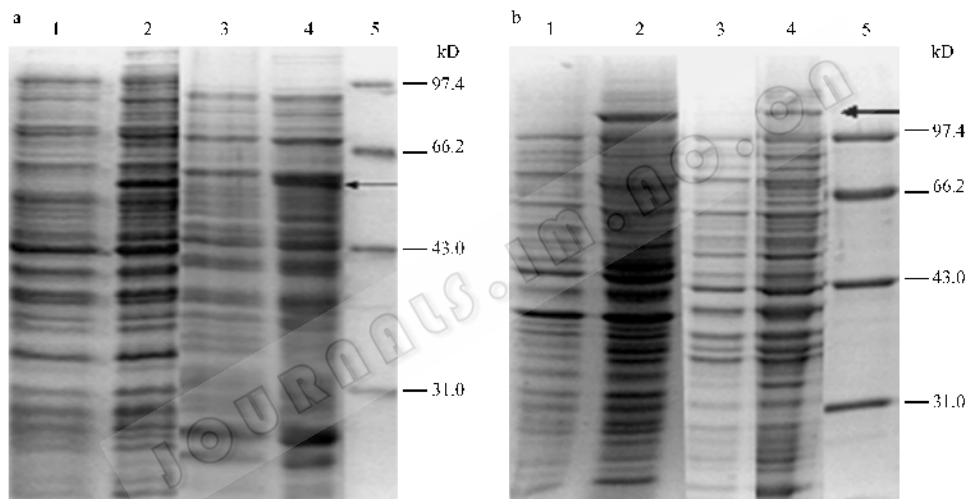


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed recombinant proteins

(a) total protein from BL/pEP and RG/pEP. 1 : BL/pEP before induction ; 2 : BL/pEP induced 4h ; 3 : RG/pEP before induction ; 4 : RG /pEP induced 4h ; 5 : marker. (b) total protein from BL/pENP and RG/pENP. 1 : BL/pENP before induction ; 2 : BL/pENP induced 4h ; 3 : RG/pENP before induction ; 4 : RG/pENP induced 4h ; 5 : marker.

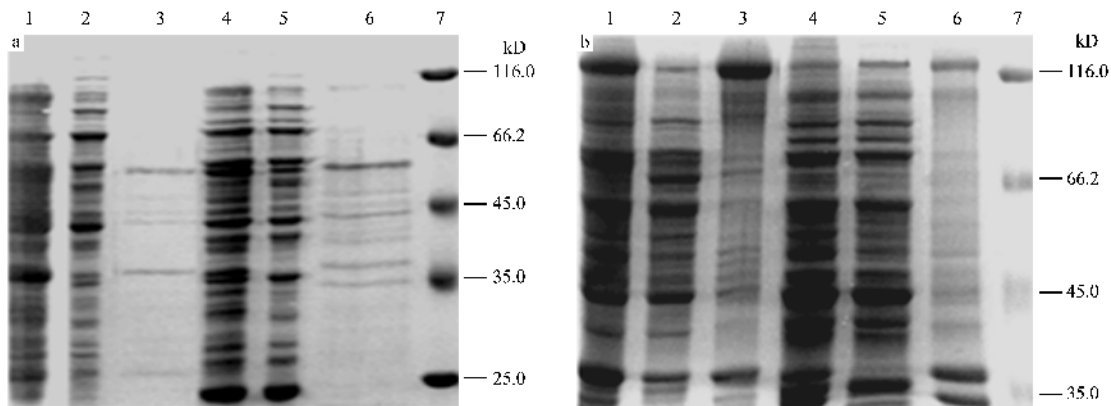


图 3 诱导产物可溶组分和包涵体粗提物的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of soluble and inclusion body fractions

(a) protein from BL/pEP and RG/pEP. 1 : total protein in BL/pEP ; 2 : soluble fraction in BL/pEP ; 3 : inclusion body in BL/pEP ; 4 : total protein in RG/pEP ; 5 : soluble fraction in RG/pEP ; 6 : inclusion body in RG/pEP ; 7 : marker. (b) protein from BL/pENP and RG/pENP. 1 : total protein in BL/pENP ; 2 : soluble fraction in BL/pENP ; 3 : inclusion body in BL/pENP ; 4 : total protein in RG/pENP ; 5 : soluble fraction in RG/pENP ; 6 : inclusion body in RG/pENP ; 7 : marker.

Western blot 检测表明:在各种诱导条件下表达的 2 种融合蛋白,其可溶性和包涵体组份均可与 PTEN 商品化多克隆抗体特异结合(见图 5),证实特异条带为 PTEN 融合蛋白。

表 1 不同宿主中重组 PTEN 融合蛋白的表达量

Table 1 Expression level of recombinant PTEN fusion proteins in different hosts

Recombinant protein	BL			RG		
	Total (%)	Soluble (%)	IB* (%)	Total (%)	Soluble (%)	IB* (%)
His-PTEN	10.3	2.5	7.8	7.9	4.7	3.2
Nus-PTEN	18.7	4.3	14.4	9.2	6.6	2.6

\* IB : Inclusion Body

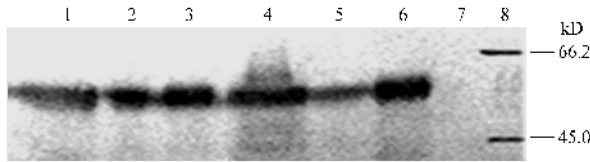


图 5 总蛋白、可溶性组分和包涵体蛋白的 Western blot

Fig. 5 Western blot of expressed total protein, soluble fraction and inclusion body

1~3: fractions from BL/pEP; 4~6: fractions from RG/pEP; 7: BL/pEP before induction; 8, 16: marker; 9~11: fractions from BL/pENP; 12~14: fractions from RG/pENP; 15: BL/pENP before induction.

## 2.3 重组 His-PTEN 蛋白对小鼠实体瘤生长的影响

由于 Nus 标签大小约 63kD,可能影响 PTEN 蛋白的活性,因此本研究未检测 Nus-PTEN 融合蛋白的抑癌活性。BL 宿主中可溶性 His-PTEN 蛋白的含量很低,难以纯化出大量蛋白用于抑癌实验,因此本文检测了 BL 和 RG 中的包涵体复性蛋白及 RG 宿主中的可溶性 His-PTEN 蛋白的抑癌效果。

实验组小鼠连续 10d 注射 His-PTEN 蛋白后检测实体瘤的重量,结果表明:与对照组相比,来自宿主 BL 和 RG 的重组蛋白对小鼠实体瘤的抑制率分别为 31.07% 和 58.76%,实体瘤重量较对照组均有显著差异 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。以上结果初步说明宿

表 2 His-PTEN 重组融合蛋白对小鼠实体瘤生长的抑制效果

Table 2 Growth inhibition of recombinant His-PTEN fusion protein on mice solid tumors

Groups	Average weight of tumors (g)	Inhibitory ratio (%)
Negative control	1.77 ± 0.29	-
Chariot	1.75 ± 0.31	1.13
BL	1.22 ± 0.28**	31.07
RG1	0.78 ± 0.23**	55.93
RG2	0.73 ± 0.25**	58.76

\*\*  $P < 0.01$ . BL: Refolded His-PTEN in inclusion bodies from BL; RG1: Refolded His-PTEN in inclusion bodies from RG; RG2: soluble His-PTEN from RG.

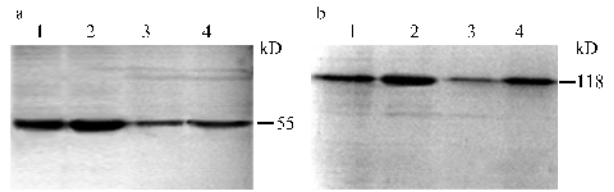
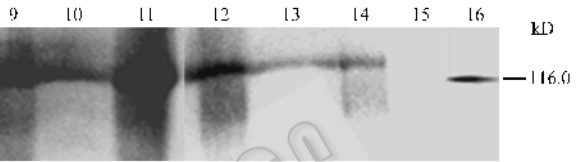


图 4 SDS-PAGE 检测纯化的重组蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

(a) purified recombinant protein from BL/pEP and RG/pEP. 1: soluble protein from BL/pEP; 2: inclusion body from BL/pEP; 3: soluble protein from RG/pEP; 4: inclusion body from RG/pEP. (b) purified recombinant protein from BL/pENP and RG/pENP. 1: soluble protein from BL/pENP; 2: inclusion body from BL/pENP; 3: soluble protein from RG/pENP; 4: inclusion body from RG/pENP.



主 BL 和 RG 中表达的重组融合蛋白经复性处理后都具实体瘤抑制效果,其中 RG 宿主中的蛋白抑癌效果更明显,推测 RG 宿主中表达的重组蛋白抑癌活性更高。

## 2.4 重组 His-PTEN 蛋白对癌细胞生长的影响

与对照组相比,来源于 BL 和 RG 的 His-PTEN 融合蛋白都可抑制前列腺癌细胞 DU-145 的生长 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。随蛋白浓度由 0.5 μg/mL 增至 10.0 μg/mL,细胞生长抑制率逐渐增加,最高达 46.16% 表现出明显的浓度依赖关系;其中源于 RG 的蛋白在浓度为 1.0 μg/mL 以上时抑制率已大于 15%,而源于 BL 的蛋白在浓度为 5.0 μg/mL 以上时才呈现显著抑制效果,提示宿主 RG 表达的重组蛋白具有更高的抑癌活性。His-PTEN 融合蛋白在作用时间内抑制率明显增加,呈现出一定的浓度、时间依赖效应,源于 RG 宿主的蛋白更为明显,但处理 72h 与 96h 后的生长抑制率无显著差异。

## 2.5 重组 His-PTEN 蛋白对癌细胞周期的影响

流式细胞仪检测 Chariot/6 × His-PTEN 处理的 DU-145 前列腺癌细胞,与对照组相比,DU-145 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分数明显增加 ( $P < 0.05$ ),表现为明显的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞,S 期细胞显著减少 ( $P < 0.05$ ),其中来源于 RG 宿主的蛋白作用效果更为显著(表 4)。

表 3 His-PTEN 重组融合蛋白对 DU-145 细胞的生长抑制率(%)

Table 3 Growth inhibitory ratio(%) of recombinant His-PTEN fusion protein on DU-145 cells

Time	Chariot	BL(μg/mL)				RG1(μg/mL)				RG2(μg/mL)			
		0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0	0.5	1.0	5.0	10.0
24 h	0.63	2.00	3.55	17.12	20.87	3.29	15.17	19.98	25.45	3.88	16.23	20.57	25.98
48 h	0.77	2.12	4.06	20.19	25.18	4.36	19.24	24.63	31.01	4.93	21.80	26.64	33.73
72 h	0.74	2.12	4.73	22.25	27.14	5.56	26.31	36.52	45.56	6.96	28.75	37.35	46.16
96 h	0.75	2.23	4.72	22.20	27.13	5.58	26.48	36.49	45.65	7.05	28.72	37.38	46.16

BL, RG1, RG2: same with table 2.

表 4 6 × His-PTEN 对 DU-145 细胞周期的影响

Table 4 Influence of 6 × His-PTEN on DU-145 cell cycle

Groups	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	G <sub>2</sub> /M(%)	S%
Negative control	52.23 ± 5.68	18.83 ± 2.07	28.94 ± 3.43
Chariot	52.56 ± 5.53	19.06 ± 2.07	28.38 ± 3.27
BL	59.87 ± 5.88*	18.34 ± 2.29	21.79 ± 3.21*
RG1	62.28 ± 6.09*	19.07 ± 1.98	18.65 ± 2.84*
RG2	63.22 ± 6.18*	18.42 ± 2.16	18.36 ± 2.66*

\* P < 0.05; BL, RG1, RG2: same with table 2.

## 2.6 实体瘤中外源 PTEN 的 Western blot 检测

采用间接 ELISA 法测定的腹水抗体效价为  $2 \times 10^4$ 。在自制腹水一抗按 1:2000 稀释,HRP 标记羊抗鼠二抗按 1:3000 稀释的条件下,小鼠实体瘤中外源 PTEN 的检测结果见图 6。其中阴性对照组和 Chariot 组小鼠的实体瘤中检测到微弱的阳性条带,而转运了外源 PTEN 蛋白的 BL 组和 RG1、RG2 组均获得强阳性条带,未转染外源 PTEN 的人前列腺癌细胞系 DU-145 未检测到任何条带。以上结果表明,以 Chariot 作为转运载体可以成功地将重组 PTEN 蛋白转运到细胞内;而且自制的腹水抗体能灵敏地检测内源性和重组的 PTEN 蛋白。由于肝癌实体瘤中 PTEN 蛋白的表达量显著降低<sup>[10]</sup>,所以在对照组小鼠中只检测到了微弱的阳性条带。

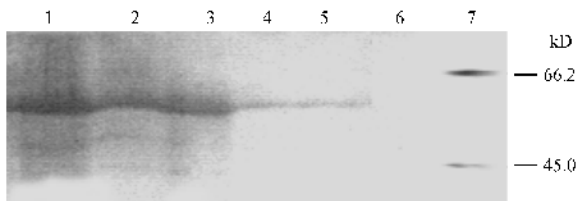


图 6 PTEN 腹水多抗检测实体瘤中外源 PTEN 蛋白的 Western blot

Fig. 6 Western blot analysis of recombinant PTEN in mice solid tumor with ascitic PTEN Ab

1: solid tumor from BL group; 2: solid tumor from RG1 group; 3: solid tumor from RG2 group; 4: solid tumor from Chariot group; 5: solid tumor from negative group; 6: DU-145 cells; 7: marker.

## 3 讨论

对于第一个克隆到的具有双重特异性磷酸酶活

性的抑癌基因 PTEN<sup>[11]</sup>,国际上对其生物学功能及抑癌效果的研究已经成为热点。虽然带有 PTEN 基因的真核载体对多种癌细胞的生长和迁移有明显的抑制作用<sup>[12]</sup>,但基因治疗的安全性、有效性、靶向性等问题制约了其临床应用<sup>[13]</sup>。鉴于未见 PTEN 蛋白活性依赖于糖基化修饰的报道,本研究尝试用大肠杆菌表达系统表达重组 PTEN 蛋白,并检测其抑癌活性,以期避开基因治疗的局限。

本研究中首先在 BL 宿主中获得了 His-PTEN 蛋白,鉴于其表达量不高(10.3%)且可溶性组分比例低(2.5%),改用有利于提高表达量和增加可溶性的 Nus 标签与 PTEN 融合表达。结果表明,在 BL 宿主中表达的 Nus-PTEN 蛋白含量和可溶性都有所增加,但可溶性部分的比例仍较低,且抑癌实验的结果表明 BL 宿主中的重组 PTEN 蛋白的抑癌活性较低。最近国外学者用 Rosetta-gami 系列的表达宿主获得了在其它多种表达宿主中无法获得的有活性的重组蛋白<sup>[14]</sup>,该宿主提供硫氧还蛋白基因(*TrxB*)突变和谷胱甘肽还原酶基因(*gor*)突变,有利于重组蛋白在胞质中正确折叠和形成正确的二硫键,同时为含有稀有密码子的基因表达做了优化。为了增加可溶性蛋白的比例、提高重组 PTEN 蛋白的活性,我们尝试使用宿主 Rosetta-gami (DE3)pLysS 表达重组 PTEN 蛋白。结果表明:虽然该宿主中 PTEN 蛋白的表达量没有提高,但可溶性部分的比例明显增加,且 His-PTEN 蛋白的抑癌实验表明:来自 RG 宿主的 PTEN 蛋白的抑癌活性明显增加,说明该宿主在表达有活性的外源真核蛋白方面具有一定的优势。尽管该宿主针对稀有密码子做了优化,但相应的稀有密码子在 PTEN 基因中出现的频率低且未成串出现,因此该宿主未能明显提高目的蛋白的表达量。值得注意的是:在 37℃ 诱导 4h 后,RG 宿主中也产生了较多的包涵体蛋白,但该宿主中的包涵体蛋白经复性处理后,其抑癌活性和可溶性组分相似,显著高于来源于宿主 BL 的包涵体蛋白。可能原因如下:包涵体的形成是个复杂的过程,不同宿主中形成的包涵体

蛋白的结构可能不尽相同,复性所需条件和难易程度也不相同,来源于RG的重组PTEN蛋白在本研究所采用的复性条件(透析法)下可能更容易复性。

抑癌功能实验结果表明,来源于宿主BL的His-PTEN蛋白具有一定的实体瘤和癌细胞生长抑制效果,而来源于RG宿主的蛋白的抑制效果更明显,且其对癌细胞的生长抑制呈现很明显的浓度、时间依赖效应,其中的原因有待深入研究。

本研究中外源蛋白的表达量较低,鉴于RG宿主中的His-PTEN蛋白具有明显的抑癌效果,提示该蛋白在肿瘤临床治疗中可能具有广阔的应用前景。为提高表达量,本实验室已经利用大肠杆菌偏爱密码子改造了PTEN基因序列,基因全长合成的工作正在进行。

单克隆抗体的制备周期长且操作复杂,本研究中用小鼠制备腹水多抗的方法操作简便、所需抗原少、抗体产量较高且抗体效价高,为在一般实验条件下灵敏检测PTEN蛋白(包括内源性PTEN)奠定了实验基础。针对外源蛋白穿膜困难、易被降解等问题,本研究选用对细胞无明显毒性的多肽Chariot作为蛋白转载体<sup>[15]</sup>。Western blot和抑癌活性检测证实,PTEN重组蛋白经Chariot介导能有效地进入细胞内部发挥抑癌作用,从而为要求在细胞内部发挥作用的、分子量较大的重组蛋白药物的应用做了有意义的尝试。

## REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Li J, Yen C, Liaw D *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997, **275**(5308):1943-1947

[ 2 ] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA *et al.* Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997, **15**(4):356-362

[ 3 ] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*, 1997, **57**(11):2124-2129

[ 4 ] Persad S, Attwell S, Gray V *et al.* Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinaseB/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(7):3207-3212

[ 5 ] Iijima M, Huang YE, Luo HR. Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis. *J Biol Chem*, 2004, **279**(16):16606-16613

[ 6 ] Mayo LD, Seo YR, Jackson MW *et al.* Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J Biol Chem*, 2005, **280**(28):25953-25959

[ 7 ] Tamura M, Gu J, Takino T *et al.* Tumor suppressor PTEN inhibition of cell invasion, migration, and growth: differential involvement of focal adhesion kinase and p130cas. *Cancer Res*, 1999, **59**(2):442-449

[ 8 ] Huang J, Kontos CD. PTEN modulates vascular endothelial growth factor-mediated signaling and angiogenic effects. *J Biol Chem*, 2002, **277**(13):10760-10766

[ 9 ] Zhang LX(张利能), Yu Q(俞强), Wang LY(王丽影) *et al.* The effects of PTEN gene on migration and FAK phosphorylation of SMMC-7721 human hepatocarcinoma cell line. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2003, **35**(2):161-166

[ 10 ] Liu JH(刘俊娥), Hou X(侯鑫), Hu TM(扈廷茂). Cloning and sequencing of the human tumor suppressor gene PTEN by RT-PCR. *Acta Sci Natl Uni NeiMongol*(内蒙古大学学报), 2005, **36**(5):541-545

[ 11 ] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Beijing: Science Press(科学出版社) 2002

[ 12 ] Hang Y, Zheng YC, Cao Y *et al.* Suppression of gastric cancer growth by adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(15):2224-2229

[ 13 ] Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going. *J Natl Cancer Inst*, 1997, **89**(1):21-39

[ 14 ] Rizzi C, Frazzon J, Ely F *et al.* DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Expr Purif*, 2005, **40**(1):23-30

[ 15 ] Morris MC, Depollier J, Mery J *et al.* A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(12):1173-1176