

• 组织工程与细胞培养 •

PDGF-B 免疫原的制备及其腹水抗体对 HepG2 细胞增殖的影响

范修德^{1*}, 李娜^{2*}, 王西强³, 孙文刚⁴, 李倩⁴, 李汉超⁴, 王小云⁵, 贾皓⁵

- 1 西安交通大学第一附属医院感染性疾病科, 陕西 西安 710061
- 2 西安交通大学第一附属医院康复医学科, 陕西 西安 710061
- 3 西安交通大学第一附属医院心血管内科, 陕西 西安 710061
- 4 西安交通大学第一附属医院风湿免疫科, 陕西 西安 710061
- 5 西安交通大学第一附属医院消化内科, 陕西 西安 710061

范修德, 李娜, 王西强, 等. PDGF-B 免疫原的制备及其腹水抗体对 HepG2 细胞增殖的影响. 生物工程学报, 2018, 34(3): 396-406.

Fan XD, Li N, Wang XQ, et al. PDGF-B immunogen preparation and the suppressive effect of anti-PDGF-B ascite antibody on the proliferation of hepG2 cells. Chin J Biotech, 2018, 34(3): 396-406.

摘要: 观察利用融合表达载体 pET28-Trx 合成的人血小板源性生长因子 B (Human platelet-derived growth factor B, hPDGF-B) 免疫原的免疫原性, 及其诱导小鼠产生针对 hPDGF-B 的腹水抗体对人 HepG2 细胞增殖的抑制作用。本研究首先选择 hPDGF-B 的第 103-118 及 152-167 氨基酸序列作为抗原表位, 构建 pET28-Trx-重组原核表达载体, 表达并纯化获得 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 及 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白; 然后使用纯化后的重组蛋白免疫小鼠, 并给予腹腔注射 H22 肿瘤细胞制备腹水抗体, ELISA 法检测抗体滴度, Western blotting 法检测纯化腹水抗体与膜结合的 PDGF-B 结合能力; 最后通过 CCK8 实验检测外源性 PDGF-BB 和两种纯化腹水抗体对肝癌 HepG2 细胞增殖的作用。研究发现上述两种重组蛋白作为免疫原均可诱导小鼠产生高滴度的 PDGF-B 中和性抗体; 两种 hPDGF-B 纯化腹水抗体能明显抑制 PDGF-BB 对肝癌 HepG2 细胞增殖的促进作用。结果提示, Trx-PDGF-B 重组蛋白作为免疫原有望为 PDGF-B 疫苗的制备提供新的方法, 也为临床上肝癌的治疗提供了一种新的思路。

关键词: 肝细胞癌, PDGF-B, 多克隆抗体, 细胞因子疫苗

Received: August 17, 2017; **Accepted:** November 20, 2017

Supported by: Social Development Fund, Shaanxi Province, China (No. S2013SF3884).

Corresponding author: Ai Jia. Tel: +86-29-85323928; E-mail: jiaai0129@163.com

*These authors contributed equally to this study.

陕西省社会发展攻关项目 (No. S2013SF3884) 资助。

网络出版时间: 2017-12-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20171206.1850.002.html>

PDGF-B immunogen preparation and the suppressive effect of anti-PDGF-B ascite antibody on the proliferation of hepG2 cells

Xiude Fan^{1*}, Na Li^{2*}, Xiqiang Wang³, Wengang Sun⁴, Qian Li⁴, Hanchao Li⁴, Xiaoyun Wang⁵, and Ai Jia⁵

1 Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

2 Department of Rehabilitation, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

3 Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

4 Department of Rheumatism, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

5 Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, China

Abstract: To observe the immunogenicity of hPDGF-B immunogens that were synthesized with the fusional expression vector pET28-Trx and to test the suppressive effect of these specific antibodies induced by both of immunogens on proliferation of human HepG2 hepatoma cells. First, we chose 2 antigenic epitopes hPDGF-B Δ 103-118aa and hPDGF-B Δ 152-167aa from human PDGF-B and inserted these 2 coding regions into the empty vector plasmid pET28-Trx, separately. Second, mice were immunized with purified recombinant proteins to generate polyclonal antibody. Then we intraperitoneally injected mice bearing hepatoma 22 (H22) tumor cells to prepare antibody ascites. ELISA and Western blot were used to detect the titer and the utility of the antibody, respectively. Finally, HepG2 cells were exposed to PDGF-BB protein or anti-PDGF-B ascite antibody in different dilution concentrations groups and the proliferation of HepG2 cells was quantified by CCK8 assay. As the results, we identified mice that could produce high drop of neutralizing antibodies against hPDGF-B induced by both two recombinant proteins. Two anti-PDGF-B ascite antibodies could markedly inhibit the proliferation of HepG2 cells by blocking the stimulating effect of PDGF-BB protein. Our results suggest that Trx-PDGF-B recombinant protein as immunogen provides a new method for the preparation of PDGF-B vaccine, and also a new idea for the treatment of hepatocellular carcinoma in clinical practice.

Keywords: hepatocellular carcinoma (HCC), PDGF-B, polyclonal antibody, cytokine vaccine

肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性肝脏恶性肿瘤, 有较高的发病率和死亡率, 由于起病隐匿、病情发展迅速、较高的手术复发率和转移率等特点, 临床治疗效果并不理想^[1-2]。但是随着肿瘤发生发展过程中相关的分子和细胞机制逐渐被认识, 生长因子及其受体在肿瘤发生发展中的作用已引起人们的极大关注, 阻断生长因子与其受体的相互作用可能在肿瘤的治疗方面取得一定疗效^[3-4]。

血小板衍生生长因子 (Platelet-derived growth factor PDGF) 是 30 多年前从人的血小板中分离出来的肽类生长因子, 主要包括 4 种不同的多肽链: PDGF-A、B、C、D^[5]。四种 PDGF 多肽链通过二

硫键的连接形成同型或异型二聚体, 与血小板衍生生长因子受体 (Platelet-derived growth factor receptor PDGFR) 结合发挥相应的生物学效应^[6]。Doolittle 等发现 PDGF-B 链基因与猴肉瘤病毒的癌基因 v-sis 有 92% 的同源性, PDGF-B 与 p28V-sis 结构的相似性表明, PDGF-B 可能通过与膜上的受体结合, 激活相应的细胞内信号转导通路, 导致细胞发生癌变^[7]。在 5 种不同的二聚体亚型 PDGF-AA、PDGFAB、PDGF-BB、PDGF-CC 和 PDGF-DD 中, PDGF-BB 是肝间质细胞分泌的最主要的二聚体结构, 是唯一能与 3 种 PDGF 受体 PDGFR- $\alpha\alpha$ 、PDGFR- $\alpha\beta$ 及 PDGFR- $\beta\beta$ 均可结合分子, 也是目前与配体特异性结合位点研究最为

清楚的分子^[8]。正常肝脏仅表达少量的 PDGF-B, 但是在肝纤维化发生时 PDGF-B 的表达水平明显提高, 研究发现 PDGF-B 转基因小鼠在 6 个月内可以自发地发生肝纤维化, 而且 PDGF-B 的转基因小鼠在二乙基亚硝胺 (Diethylnitrosamine, DEN) 诱导下, 较非转基因小鼠更早发生 HCC, 而且肿瘤进展更快^[9]。这些研究均提示 PDGF-B 与肝癌的发生发展密切相关, 阻断 PDGF-B 可能在 HCC 的治疗方面取得一定疗效。

因此本课题组将 hPDGF-B 分子中与其生物学活性密切相关的关键结构域插入到融合表达载体 pET28-Trx 中, 构建符合读框的融合基因, 将表达并纯化的重组蛋白作为免疫原, 主动免疫小鼠, 诱导小鼠产生针对 hPDGF-B 的特异性抗体, 观察其对人 HepG2 细胞增殖的抑制作用, 为 PDGF-B 疫苗的构建及 HCC 治疗探索新的可行途径。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒、细胞及实验动物

E. coli BL21(DE3)、pGEM-T 载体、pET-28a(+) 质粒、pET-28a-Trx 质粒、人肝癌细胞系 HepG2 均为本实验室保存; 雄性昆明小鼠由西安交通大学医学院动物中心提供。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 (*Pst* I、*Bam*H I、*Xho* I 和 *Nde* I)、T4 DNA 连接酶、PCR 引物、质粒 DNA 试剂盒、胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全

佐剂、DMSO、CCK8、胰蛋白酶购自 Sigma 公司; 人重组细胞因子 PDGF-BB 购自 R&D 公司; pET28-PDGF-B 重组蛋白由本实验室前期构建并表达; His-tag 抗体购自 Abcam 公司; HRP 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自 EarthOx 公司。

1.3 引物设计

利用 Primer5 软件设计 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 编码序列引物, 引物序列见表 1。引物由 TaKaRa 公司合成。

1.4 统计学分析

应用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。所有计量资料数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验法; 采用单因素方差分析 (One Way ANOVA) 对多组样本均数进行比较。

1.5 hPDGF-B 免疫原的制备

1.5.1 hPDGF-B 抗原表位的预测

通过阅读文献和利用 B 细胞表位预测软件 (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html> 在线预测), 针对 hPDGF-B 与 PDGFR 作用的位点, 设计了两段 16 个氨基酸的短肽, 即 VFEISRRLIDRTNANF (16AA, 103 位到 118 位) 和 QVRKIEIVRKKPIFKK (16AA, 152 位到 167 位), 标记为 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167。

1.5.2 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 编码序列的克隆

采用 PCR 技术以正常人的基因组 cDNA 为模板分别扩增 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 编码序列, DNA 引物序列见表 1。其中 hPDGF-

表 1 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 编码序列的引物核苷酸序列表

Table 1 Primers used for expanding hPDGF-B Δ 103-118 and hPDGF-B Δ 152-167

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
hPDGF-B Δ 103-118 F	CCCTCGAGGTGTTTCGAGATCTCCCGGC	65
hPDGF-B Δ 103-118 R	CCCGGATCCGAAGTTGGCGTTGGTGCGG	65
hPDGF-B Δ 152-167 F	CCCTCGAGCAGGTGAGGTGAGAAAGATT	65
hPDGF-B Δ 152-167 R	CCCGGATCCCTTCTTAAAGATTGGCTTCTTC	65

B Δ 103-118 1F 和 hPDGF-B Δ 152-167 1F 的 5'端分别引入 *Pst* I 酶切位点, hPDGF-B Δ 103-118 1R 和 hPDGF-B Δ 152-167 1R 的 3'端分别引入 *Bam*H I 酶切位点。PCR 扩增产物长度均为 65 bp。

1.5.3 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 原核表达载体的构建

上述扩增产物即特异 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 基因片段经 PCR 产物回收试剂盒纯化, 与 pGEM-T 载体连接, 经克隆筛选、PCR 扩增及基因测序鉴定 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司)。挑选阳性克隆, pGEM-T/hPDGF-B Δ 103-118 和 pGEM-T/hPDGF-B Δ 152-167 以 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶切, 切胶纯化回收后, 与同样处理的 pET28-Trx 表达载体在 T4 DNA 连接酶的作用下, 转化 *E. coli* DH5 α 扩增, *Nde* I + *Xho* I 双酶切消化 4 h, 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳和基因测序, 检测两种重组质粒的正确性。

1.5.4 重组蛋白的原核表达及纯化

挑取 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 阳性 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细菌克隆, IPTG 诱导表达目的蛋白, SDS-PAGE 鉴定, 观察有无目的条带; 大量诱导表达的 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白和 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白分别通过 Ni-NTA 纯化, 纯化后蛋白分别简称为 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白和 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白。

1.6 hPDGF-B 抗体的制备及纯化

1.6.1 动物免疫

将 4 周龄的昆明种雄性小鼠 15 只, 随机分成 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白免疫组、6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白免疫组及对照组各 5 只; 将透析好的两种 hPDGF-B 重组蛋白分别与弗氏完全佐剂按 1:1 比例混合, 充分混匀至完全乳化, 腹腔注射相应蛋白混合物 0.2 mL,

对照组注射 PBS 溶液 0.2 mL; 2 周后, 将两种 hPDGF-B 重组蛋白分别与弗氏不完全佐剂按 1:1 比例混合, 完全乳化后每只小鼠注射 0.2 mL, 对照组注射 PBS 溶液 0.2 mL, 每 2 周免疫一次; 以后每隔 1 周通过断尾静脉采血的方法, 以 ELISA 法测定 hPDGF-B 抗体滴度。

1.6.2 ELISA 方法检测小鼠血清抗体效价

原核表达的 PDGF-B 重组蛋白定量后按 20 ng/孔包被 96 孔酶标板, 封闭后将上述鼠尾血清用 10% 的牛血清/PBST 稀释液按一定的比例稀释后, 第一孔稀释比为 1:200, 依次倍比稀释, 最后一孔为阴性对照, 以 HRP 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:5 000) 进行检测, 孵育后各孔依次加入底物 A 液和显色 B 液各 1 滴, 5 min 向各反应孔中加入终止 C 液 1 滴, 观察各孔颜色并记录抗体滴度。

1.6.3 hPDGF-B 多克隆抗体腹水的制备和纯化

注射小鼠 H22 肝癌细胞前, 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白免疫组及 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白免疫组的抗体滴度需达 1:8 000 以上; 用生理盐水稀释 H22 细胞浓度为 1×10^7 个/mL; 将 H22 细胞悬液按 0.5 mL/只的剂量注入免疫过的小鼠腹腔; 注入 H22 细胞后 7 d 左右, 小鼠体重逐渐停止增加, 腹腔明显膨隆, 行动迟缓, 皮毛无光泽, 对照组小鼠精神及一般状态均正常。取小鼠眼血后将小鼠处死抽取腹水, 获得 PDGF-B 多抗血清及多抗腹水, 间接 ELISA 检测小鼠抗体滴度, 而后用双层滤纸过滤腹水; 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 精确定量腹水体积; 采用辛酸硫酸铵法纯化腹水抗体, 取少量纯化后的抗体适当稀释后, ELISA 方法检测纯化腹水抗体效价 (方法同前)。

1.6.4 Western blotting 法验证纯化腹水抗体与 PDGF-B 的结合能力

收集的纯化腹水经过 ELISA 检测含有高滴度

的抗体, 还需验证其与 PDGF-B 的结合能力, 上样蛋白选择 pET28-PDGF-B 重组蛋白, 通过制样, 电泳, 转膜, 用 10% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 分别加入一抗 Anti-hPDGF-B Δ 103-118 纯化腹水抗体 (1:500), Anti-hPDGF-B Δ 152-167 纯化腹水抗体 (1:500) 及 His-tag 抗体 (1:1000), 4 °C 孵育过夜, 分别加入二抗山羊抗小鼠 IgG (1:10000) 于 37 °C 孵育 1 h, ECL 化学发光试剂盒显色, 采用超灵敏多功能成像仪 (美国 GE Amersham Imager 600; 型号 AI600) 采集蛋白条带图像。

1.7 hPDGF-B 抗体对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

1.7.1 PDGF-BB 对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

取对数生长期 HepG2 细胞, 以每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板, 每孔加 150 μ L, 周围孔则加入 PBS, 置于 37 °C、含 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养; 实验分组: ①无血清 DMEM 组; ②1 ng/mL PDGF-BB 组; ③2 ng/mL PDGF-BB 组; ④4 ng/mL PDGF-BB 组; ⑤8 ng/mL PDGF-BB 组; ⑥16 ng/mL PDGF-BB 组, 每组设 5 个复孔; 细胞接种 24 h 后, 按照分组分别加入不同培养基, 继续培养 48 h; 48 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 继续培养 1–2 h; 在酶标仪上测量各孔吸光度值, 测定波长 450 nm, 重复 CCK-8 实验 3 次, 记录结果并绘制细胞增殖曲线。

1.7.2 hPDGF-B 抗体对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

结合上一实验结果, PDGF-BB 浓度在 4 ng/mL 对 HepG2 细胞促增殖能力最强, 故 PDGF-BB 浓度定为 4 ng/mL; 取对数生长期 HepG2 细胞, 每孔 1×10^3 个细胞接种于 96 孔板中, 每孔加 150 μ L, 周围孔则加入 PBS, 置于 37 °C、含 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养; 实验分组: ①无血清 DMEM 组; ②4 ng/mL PDGF-BB 组: 培养液中加入 hPDGF-BB 4 ng/mL; ③Anti-hPDGF-B Δ 103-118

纯化腹水抗体组 (1:10 始, 4 倍系列稀释); ④PDGF-BB + Anti-hPDGF-B Δ 103-118 纯化腹水抗体组 (培养液中同时加入 PDGF-BB 4 ng/mL 和 3 种不同稀释度 (1:10 始, 4 倍系列稀释) 的小鼠 PDGF-B 纯化腹水抗体); ⑤Anti-hPDGF-B Δ 152-167 纯化腹水抗体组 (1:10 始, 4 倍系列稀释); ⑥PDGF-BB + Anti-hPDGF-B Δ 152-167 纯化腹水抗体组 (培养液中同时加入 PDGF-BB 4 ng/mL 和 3 种不同稀释度 (1:10 始, 4 倍系列稀释) 的小鼠 PDGF-B 纯化腹水抗体); ⑦3 种不同稀释度 (1:10 始, 4 倍系列稀释) Trx 抗体组, 每组设 5 个复孔; 细胞接种 24 h 后, 按照分组分别加入不同培养基, 继续培养 48 h; 48 h 后每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L, 继续培养 1–2 h; 在酶标仪上测量各孔吸光度值, 测定波长 450 nm, 重复 CCK-8 实验 3 次, 记录结果并绘制细胞增殖曲线。

2 结果与分析

2.1 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 原核表达载体的构建

采用 PCR 技术以正常人的基因组 cDNA 为模板分别克隆出 65 bp 的 hPDGF-B Δ 103-118 和 hPDGF-B Δ 152-167 编码序列 (图 1A), 重组质粒 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 经 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后, 消化产物经琼脂糖电泳可见 394 bp 酶切片段 (图 1B); 基因测序结果正确。

2.2 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 及 6 \times his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白的原核表达和纯化

重组质粒 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 以及对对照空质粒 pET28 转化入 BL21(DE3) 感受态细菌, 次日 LB 半固体平板生长菌落数较多, 挑取单克隆菌落在卡那霉素抗性 LB 液体培养基中大量扩增后加入

IPTG 诱导表达, 12% SDS-PAGE 可见约 16.3 kDa 的 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白和 16.4 kDa 的 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白表达条带; BL21(DE3)-pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 BL21(DE3)-pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 表达蛋白经 Ni-NTA 纯化后可见相同大小的重组蛋

白纯化条带 (图 2)。

2.3 ELISA 法测定血清 hPDGF-B 抗体滴度结果
分别用 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白和 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白免疫小鼠, 这两种重组蛋白免疫小鼠后抗体滴度很快就达到 1:8 000, 而且组间差异较小 (表 2 和表 3)。

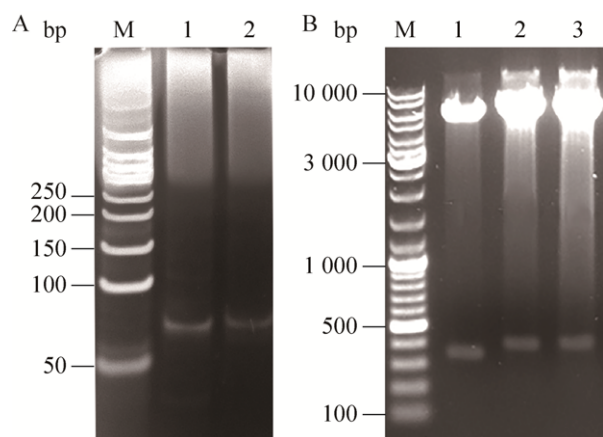


图 1 目的基因的扩增及重组质粒的 PCR 和酶切鉴定
Fig. 1 Amplification products of target genes and identification of the recombinant plasmids by PCR and restriction enzyme analysis. (A) Amplification products of hPDGF-B Δ 103-118 and hPDGF-B Δ 152-167 gene with PCR. M: 50 bp Ladder DNA marker; 1, 2: PDGF-B Δ 103-118 and hPDGF-B Δ 152-167 amplified fragments. (B) Identification of the recombinant plasmids pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118 and pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167 by PCR and restriction enzyme analysis. M: DNA ladder mix; 1-3: pET28-Trx, pET28-Trx-hPDGF-B Δ 103-118, pET28-Trx-hPDGF-B Δ 152-167.

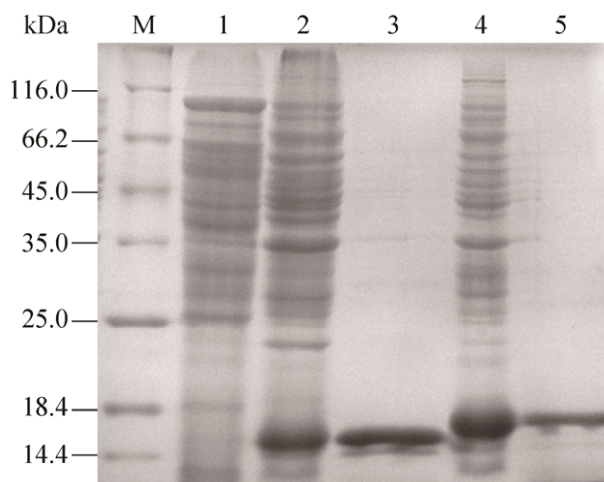


图 2 SDS-PAGE 分析纯化前后的 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 及 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed and purified 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 and 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 proteins. M: unstained protein marker; 1: pET28-*E. coli* BL21(DE3); 2: pET28-Trx-PDGF103-118-*E. coli* BL21(DE3); 3: pET28-Trx-PDGF103-118 (purified by Ni-NTA); 4: pET28-Trx-PDGF152-167-*E. coli* BL21(DE3); 5: pET28-Trx-PDGF152-167 (purified by Ni-NTA).

表 2 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 重组蛋白免疫小鼠血清抗体滴度 (pET28-PDGF-B 重组蛋白包板)

Table 2 pET28-PDGF-B recombinant protein detected antibody titers in 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 mice antisera

Groups	Number	First immunization	Second immunity	Third immunization
6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 recombinant protein group	1	1:800	1:3 200	1:12 800
	2	1:800	1:3 200	1:12 800
	3	1:800	1:6 400	1:25 600
	4	1:400	1:3 200	1:12 800
	5	1:200	1:3 200	1:6 400

表 3 6×his Trx-hPDGF-BA152-167 重组蛋白免疫小鼠血清抗体滴度 (pET28-PDGF-B 重组蛋白包板)

Table 3 pET28-PDGF-B recombinant protein detected antibody titers in 6×his Trx-hPDGF-BA152-167 mice antisera

Groups	Number	First immunization	Second immunity	Third immunization
6×his	1	1:200	1:6 400	1:25 600
	2	1:800	1:1 600	1:6 400
Trx-hPDGF-BA152-167 recombinant protein group	3	1:200	1:6 400	1:25 600
	4	1:400	1:3 200	1:12 800
	5	1:400	1:1 600	1:25 600

2.4 成功制备并纯化 hPDGF-B 腹水抗体

2.4.1 ELISA 法测定 hPDGF-B 纯化前后腹水抗体滴度结果。

纯化后 Anti-hPDGFΔ103-118 组和 Anti-hPDGFΔ152-167 组腹水抗体滴度均达到 1:16 000 及以上, 具有较为理想的抗体滴度 (表 4)。

2.4.2 Western blotting 验证 hPDGF-B 纯化腹水抗体结果

Western blotting 法检测发现, 两种 hPDGF-B 纯化腹水抗体 (1:500) 均能和 pET28-PDGF-B 重组蛋白发生反应, 在 33 kDa 处可见 PDGF-B 重组蛋白条带。纯化后的 hPDGF-B 腹水抗体可以与膜结合 PDGF-B 结合, 可用于下游实验 (图 3)。

2.5 PDGF-BB 对肝癌 HepG2 细胞增殖的促进作用

CCK-8 实验结果显示, PDGF-BB 对 HepG2 细胞增殖有促进作用, PDGF-BB 各浓度组与对照组相比, 细胞体外生长速度明显加快 ($P<0.05$)。增殖曲线显示 PDGF-BB 促细胞增殖的作用与生长因子浓度呈峰形状相关, 4 ng/mL 浓度时作用最强 (图 4)。

表 4 纯化前后 Anti-hPDGFΔ103-118 组和 Anti-hPDGFΔ152-167 组腹水抗体滴度 (pET28-PDGF-B 重组蛋白包板)

Table 4 pET28-PDGF-B recombinant protein detected ascite antibody titers of Anti-hPDGFΔ103-118 and Anti-hPDGFΔ152-167 groups before and after purification

Groups	Anti-hPDGFΔ103-118 antibody group	Anti-hPDGFΔ152-167 antibody group
Non purified group	1:8 000	1:8 000
Purified group	1:16 000	1:32 000

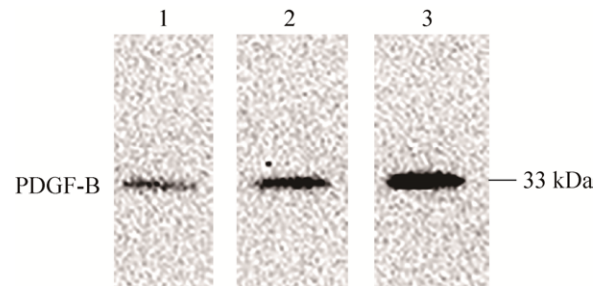


图 3 Western blotting 检测纯化后的 hPDGF-B 腹水抗体与 pET28-PDGF-B 重组蛋白的结合反应

Fig. 3 Western blotting analysis of purified hPDGF-B ascites antibody responses to pET28-PDGF-B proteins. 1: anti-hPDGFΔ103-118 antibody; 2: anti-hPDGFΔ152-167 antibody; 3: His tag antibody.

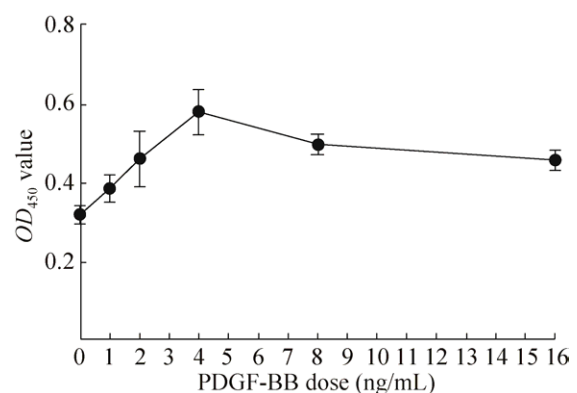


图 4 PDGF-BB 对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig. 4 Positive effect of PDGF-BB on HepG2 cells proliferation. Compared with the control group, the growth rate of the HepG2 cells was obviously accelerated in different PDGF-BB concentration groups ($P<0.05$).

2.6 hPDGF-B 腹水抗体对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用

CCK-8 检测结果发现, 4 ng/mL PDGF-BB 组和对对照组相比明显促 HepG2 细胞增殖, 同时两种

PDGF-B 纯化腹水抗体均能明显抑制 PDGF-BB 所诱导的细胞增殖, 随着抗体浓度的增加, 对细胞增殖的抑制作用越明显, 组间差异有显著的统计学意义 ($P<0.05$) (表 5)。

表 5 hPDGF-B 抗体对 HepG2 细胞增殖的影响

Table 5 Inhibitory effect of Anti-hPDGF-B antibodies on HepG2 cell proliferation

Groups	Concentration	Sample number	OD value (A)
Serum-free DMEM	0	5	0.318 3±0.026 0
PDGF-BB	4 ng/mL	5	0.554 9±0.028 6
Anti-hPDGF-B Δ 103-118 antibody	1:10 dilution	5	0.200 3±0.014 4 Δ
	1:40 dilution	5	0.234 3±0.018 4 Δ
	1:160 dilution	5	0.302 3±0.011 0
PDGF-BB + Anti-hPDGF-B Δ 103-118 antibody	1:10 dilution	5	0.300 3±0.019 0 $\Delta\Delta$
	1:40 dilution	5	0.335 1±0.019 8 $\Delta\Delta$
	1:160 dilution	5	0.497 4±0.009 0
Anti-hPDGF-B Δ 152-167 antibody	1:10 dilution	5	0.202 3±0.013 7 Δ
	1:40 dilution	5	0.212 5±0.002 0 Δ
	1:160 dilution	5	0.304 3±0.006 7
PDGF-BB + Anti-hPDGF-B Δ 152-167 antibody	1:10 dilution	5	0.292 3±0.010 1 $\Delta\Delta$
	1:40 dilution	5	0.339 1±0.012 1 $\Delta\Delta$
	1:160 dilution	5	0.466 2±0.014 8
Anti-Trx-antibody	1:10 dilution	5	0.313 1±0.023 7
	1:40 dilution	5	0.332 1±0.016 0
	1:160 dilution	5	0.326 3±0.025 4

Compared with serum-free medium group, $\Delta P<0.05$; compared with 4 ng/mL PDGF-BB group, $\Delta P<0.05$.

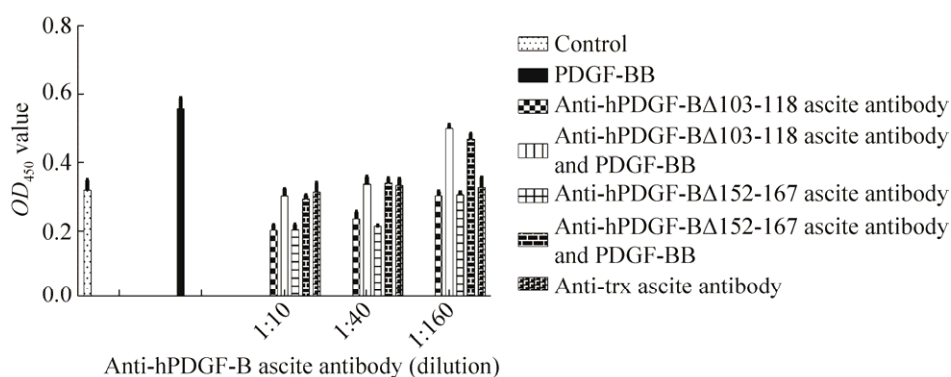


图 5 hPDGF-B 抗体对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig. 5 Inhibitory effect of Anti-hPDGF-B antibodies on HepG2 cell proliferation. Compared with serum-free medium group, the growth rate of the HepG2 cells was obviously inhibited in Anti-hPDGF-B Δ 103-118 antibody groups (1:10 dilution and 1:40 dilution) and Anti-hPDGF-B Δ 152-167 antibody groups (1:10 dilution and 1:40 dilution; $P<0.05$). Compared with 4 ng/mL PDGF-BB group, the growth rate of the HepG2 cells was obviously inhibited in PDGF-BB+Anti-hPDGF-B Δ 103-118 antibody groups (1:10 dilution and 1:40 dilution) and PDGF-BB+Anti-hPDGF-B Δ 152-167 antibody groups (1:10 dilution and 1:40 dilution; $P<0.05$).

3 讨论

肝细胞癌 (HCC)是最常见的原发性肝脏恶性肿瘤,由于起病隐匿、病情发展迅速、手术复发率和转移率高等特点,中晚期肝癌的治疗效果并不理想,故现在迫切需要探索新的有效治疗方法。

PDGF 作为已有 30 余年历史的肽类生长因子,最初发现其为一种重要的促有丝分裂因子,主要作用于成纤维细胞、平滑肌细胞、神经胶质细胞等。随着研究的深入,发现 PDGF 既参与重要的生理活动,如胚胎发育、免疫调节及组织修复等,同时又与多种疾病的发生密切相关,如肝纤维化、心肌过度纤维化、结肠癌、恶性胶质瘤、前列腺癌等^[10-11]。PDGF 及其受体的过度表达是肿瘤常见的特征之一,在皮肤癌、胃癌、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、前列腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞中均可检测到高表达水平的 PDGF 及其受体^[8]。研究发现 PDGF 与其受体结合后可使受体酪氨酸激酶激活,从而激活细胞内多条信号转导通路,主要通过自分泌的形式促进肿瘤细胞的生长,也可通过旁分泌的形式促进血管和淋巴管的生成,调控细胞外基质的生成和降解^[12-14]。目前认为 PDGF 可能主要通过 3 个方面促进肿瘤的发生和发展:肿瘤细胞自分泌刺激;刺激血管生成;肿瘤微环境的调控。近年来国内外研究发现 PDGF 在肝癌的发生、发展及转移过程可能发挥重要作用^[15-17],这提示我们 PDGF 及其受体可能作为肿瘤治疗的靶点。

肝癌的发生和发展与多种细胞因子有关,而且涉及多条信号通路,如何在疗效和毒副作用之间选择最佳的治疗方法是当前研究的热点。目前对于中晚期肝癌临床上尚缺乏安全、有效的治疗方法,虽然多靶点、多激酶抑制剂索拉非尼通过对酪氨酸激酶和丝氨酸/苏氨酸激酶的抑制作用

明显延长了晚期肝癌患者的生存期^[4],但是由于价格较高,而且在用药过程中存在较多的毒副作用,限制了其在临床上的应用。鉴于 PDGF 在肿瘤细胞自分泌刺激、促进血管生成及对调控肿瘤微环境的作用,我们认为有必要研究和开发高效、方便、安全、价廉的阻断 PDGF 的药物或手段。考虑到完全阻断 PDGF/PDGFR 信号通路技术难度较大,而且可能引起较多的毒副作用,仔细查阅文献发现 PDGF-B 相较于其他几种亚型结构研究最为清楚,而且在肝癌的发生和发展过程中发挥重要的作用,我们认为选择性地阻断 PDGF-B 有望达到理想效果。目前阻断 PDGF 信号转导的方法主要有基因沉默、DNA 适配子、PDGF 可溶性受体及受体后信号转导通路阻断剂等^[18-21],但是由于技术难度大,价格高昂、副作用大等缺点难以在临床推广使用。相较于上述几种阻断 PDGF 信号转导的方法,细胞因子疫苗通过基因工程改造过的大肠杆菌表达,刺激机体产生特异性 PDGF 抗体,不会整合到免疫动物基因组,也不会产生强烈的过敏反应;而且国内外动物实验发现细胞因子疫苗不会造成其他正常器官的损伤,因此 PDGF-B 疫苗有治疗高效、制作方法简单、使用方便、作用持久等无可比拟的优点,在肿瘤治疗中有良好的临床应用前景。

本实验通过 PDGF-B 重组蛋白主动免疫的方式,刺激机体产生 hPDGF-B 抗体,观察 hPDGF-B 抗体对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用,旨在探讨 PDGF-B 疫苗构建及阻断 PDGF/PDGFR 信号转导在 HCC 治疗中的可行性。实验中选用硫氧还蛋白融合蛋白表达体系作为原核表达载体,其在大肠杆菌中可高产量地表达可溶性目的蛋白质,即通过 pET28-Trx 空载质粒作为载体,向其中分别连入 2 段来自 PDGF-B 的关键编码序列,经原核表达纯化出两种重组蛋白 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 和 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167,通过

主动免疫小鼠成功制备并纯化出 2 种 PDGF-B 多克隆抗体, 纯化后的腹水抗体滴度可达 1 : 16 000 以上, 而且抗体能与膜结合的 PDGF-B 反应, 证实两种重组蛋白具有良好的免疫原性; 通过 CCK8 实验发现 2 种 PDGF-B 纯化腹水抗体 ($\geq 1 : 40$ 稀释度) 均可有效抑制 PDGF-BB 对 HepG2 细胞增殖的促进作用。上述实验结果表明 6×his Trx-hPDGF-B Δ 103-118 及 6×his Trx-hPDGF-B Δ 152-167 重组蛋白具有较高的免疫原性, 其作为免疫原均可以诱导小鼠产生高滴度的 PDGF-B 中和性抗体, 而且 PDGF-B 纯化腹水抗体具有良好的中和活性, 可有效抑制 PDGF-BB 对肝癌细胞增殖的促进作用, 这为利用不同表位组合构建 PDGF-B 疫苗提供了新的方法, 也为临床上 HCC 的治疗提供了一种新的思路。

REFERENCES

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Zhu PL, Yin C, Feng JL. Progress in comprehensive treatment of primary liver cancer. *J Clin Hepatol*, 2015, 31(6): 965–968 (in Chinese).
祝普利, 尹超, 冯建龙. 原发性肝癌综合治疗进展. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(6): 965–968.
- [3] Peng BG, Liang LJ, He Q, et al. Tumor vaccine against recurrence of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(5): 700–704.
- [4] Rimassa L, Santoro A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(6): 739–745.
- [5] Heldin CH, Eriksson U, Östman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 398(2): 284–290.
- [6] Coussens L, van Beveren C, Smith D, et al. Structural alteration of viral homologue of receptor proto-oncogene *fms* at carboxyl terminus. *Nature*, 1986, 320(6059): 277–280.
- [7] Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, et al. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science*, 1983, 221(4607): 275–277.
- [8] Lindahl P, Boström H, Karlsson L, et al. Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis//Desmoulière A, Tuchweber B, Eds. *Tissue Repair and Fibrosis*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1999: 27–33.
- [9] Maass T, Thieringer FR, Mann A, et al. Liver specific overexpression of platelet-derived growth factor-B accelerates liver cancer development in chemically induced liver carcinogenesis. *Int J Cancer*, 2011, 128(6): 1259–1268.
- [10] Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in the treatment of non-malignant diseases. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2014, 9(2): 69–79.
- [11] Heldin CH. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal*, 2013, 11: 97.
- [12] Heldin CH, Östman A, Rönstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1378(1): F79–F113.
- [13] McKinnon RD, Waldron S, Kiel ME. PDGF α -receptor signal strength controls an RTK rheostat that integrates phosphoinositol 3'-kinase and phospholipase C γ pathways during oligodendrocyte maturation. *J Neurosci*, 2005, 25(14): 3499–3508.
- [14] Monje P, Marinissen MJ, Gutkind JS. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(19): 7030–7043.
- [15] Shao Q, Guan Y, Yang ML, et al. Inhibitory effects of emodin on proliferation of HepG2 cells induced by PDGF. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2007, 14(7): 514–517 (in Chinese).
邵勤, 官阳, 杨木兰, 等. 大黄素抑制 PDGF 诱导的肝癌细胞增殖. *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(7): 514–517.
- [16] Wei T, Zhang LN, Lv Y, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor

- prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2014, 5(21): 10307–10317.
- [17] Shao Q. The expression and significance of PDGF in human hepatoma cell line[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007 (in Chinese).
邵勤. 血小板衍生生长因子在人肝癌细胞中的表达及意义[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [18] Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, et al. Antisense strategy against PDGF B-chain proves effective in preventing experimental liver fibrogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(2): 413–423.
- [19] Chen SW, Chen YX, Zhang XR, et al. Targeted inhibition of platelet-derived growth factor receptor- β subunit in hepatic stellate cells ameliorates hepatic fibrosis in rats. *Gene Ther*, 2008, 15(21): 1424–1435.
- [20] Ogawa S, Ochi T, Shimada H, et al. Anti-PDGF-B monoclonal antibody reduces liver fibrosis development. *Hepatol Res*, 2010, 40(11): 1128–1141.
- [21] Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, et al. Dominant-negative soluble PDGF- β receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest*, 2004, 84(6): 766–777.

(本文责编 陈宏宇)