

重組第一類轉形生長因子與蓖麻毒素 A 融合蛋白質對人類癌症細胞之生長抑制效應

陳詩蕙 康淵琳 邱建智 方剛*

國立臺灣師範大學生物系

摘要

癌症細胞尤其是肺癌細胞大多表現高密度之上皮生長因子受體(epidermal growth factor receptor; EGFR), 而腫瘤細胞本身會分泌第一類轉形生長因子(transforming growth factor- α ; TGF- α), 當 TGF- α 與細胞本身或鄰近的 EGFR 緊密結合之後, 造成受體自體磷酸化之後引發細胞內連續訊號傳遞的發生, 而促使細胞的增生。若將 TGF- α 與蓖麻毒素 A (ricin A) 結合形成重組融合蛋白, 由 EGFR 選擇性結合, 進入細胞質後, 讓所連結的蓖麻毒素 A 進入核糖體, 使細胞蛋白質轉譯功能降低, 故能抑制腫瘤細胞的生長。本文以基因工程方式製作大量重組蛋白—TGF- α -蓖麻毒素 A。

實驗首先將 TGF- α 與蓖麻毒素 A 的基因選殖出來, 進行 DNA 重組, 經限制酵素切割及核酸定序確認有正確的序列之後, 植入大腸桿菌, 誘導大腸桿菌表現該重組基因後分泌融合蛋白到培養液中, 將重組蛋白萃取純化後, 用於細胞培養。使用人類上皮癌細胞 A431 細胞株, 以分別測試重組融合蛋白與蓖麻毒素 A 對癌細胞的抑制效應。

關鍵字: 人類癌症細胞、蓖麻毒素 A、第一類轉形生長因子、重組蛋白

緒言

癌症細胞多表現高密度之上皮生長因子受體 (Epidermal growth factor receptor; EGFR), EGFR 是由 1,186 個胺基酸所組成的細胞表面蛋白。而腫瘤細胞本身會分泌第一類轉形生長因子 (Transforming growth factor- α ; TGF- α), 當 TGF- α 與細胞本身或鄰近的 EGFR 緊密結合之後, 造成受體自體磷酸化, 而後引發細胞內連續訊號傳遞的發生, 進而促使細胞的增生, 而受質 TGF- α 則由 EGFR 攜入細胞, 最後在溶體中被解離 (Aaronson *et al.*, 1993; Massague and Pandiella, 1993)。

蓖麻毒素 (ricin) 是一種具有高細胞毒性

的植物蛋白, 它包含有兩種次單元體 (subunit): 蓖麻毒素 A (ricin A) 與蓖麻毒素 B (ricin B), 這兩種單元體分別是由 267 和 262 個胺基酸所組成。蓖麻毒素 A 藉與 60 S 核糖體次單元結合, 可以有效抑制真核生物的蛋白質合成。蓖麻毒素 B 則會與細胞膜表面的乳糖結構結合, 經由細胞的內吞作用 (endocytosis), 一併將蓖麻毒素 A 帶進細胞質中, 造成細胞生長的抑制 (Lord *et al.*, 1994)。

本論文則結合這兩種特性結合形成重組融合蛋白 TGF- α 與蓖麻毒素 A, 由 EGFR 攜入細胞質後, 使蓖麻毒素 A 與核糖體結合失去轉譯蛋白質的效用, 而能抑制腫瘤細胞的生長 (Davis and Chamberlin, 1996)。由於 TGF- α 取代次單元天然蓖麻毒素 B, 這種方

*通信作者 (corresponding author): 方剛 (Kang Fang), FAX: 886-2-29312904; E-mail: biofv033@sec.ntnu.edu.tw

式製造出來的共軛毒素提高抑制表現高密度 EGFR 癌細胞生長的專一性，且降低對其他低密度 EGFR 細胞-如正常細胞-之毒性，因而改進天然蓖麻毒素的缺點。

過去已有報導將 TGF- α 與蓖麻毒素 A 以傳統化學方式，利用雙硫鍵結合所製成之共軛物，經親和色層分析純化後，發現此共軛物對含大量 EGFR 的人類上皮癌細胞 A431 有顯著抑制生長的效應，其胞殺毒性 (cytotoxicity)(IC₅₀)約在 0.1 nM；但對正常肺組織細胞 MRC-5 無反應，顯示這種以化學鍵結合的共軛蛋白質的毒性與細胞表面 EGFR 的表現有相當密切關聯 (Fang, 1998)。

由於純化 TGF- α 價格高昂，合成共軛毒素純化回收率低，且天然純化蓖麻毒素 A 經常含有殘餘蓖麻毒素 B，造成大量合成與正確鑑定的困難。爲了要改進這方面的缺點，利用基因工程合成重組共軛蛋白是未來作動物試驗一個可行的改進方向。針對這個主旨，本文則以表現載體製作大量 TGF- α -蓖麻毒素 A 重組蛋白，將 TGF- α 與 ricin A 共同組合在一個 open reading frame 內，利用表現質體的啟動子所引發表現的重組蛋白，於純化後，作更進一步研究之用。

本文以基因工程方式所製備的重組 TGF- α -蓖麻毒素 A 共軛毒素的主要方式是將 TGF- α 基因設定在 N 端，蓖麻毒素 A 基因設定在 C 端，中間相隔數個非相關胺基酸以作爲連接之用。因此預測融合蛋白應針對上皮生長因子受體穿入後，應發揮專一性胞殺的功能 (Shire *et al.*, 1990)。次將純化後的重組蛋白進行離體的毒性測試，所合成的重組蛋白也試驗於充分表現 EGFR 的人類癌細胞 A431，以評估其毒性。這項針對細胞白泌刺激效應所分泌的小分子生長因子設計的融合蛋白可以避免以往由化學合成免疫毒素

(immunotoxin)使用大量以化學方式有機合成分子所產生毒素的低效率、高成本及無法除去殘餘非專一毒素所產生的困擾。

材料與方法

反轉錄酶及聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcriptase and Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)

由人類非小細 H322 細胞所萃取 RNA (10 μ g)，加入 300 ng random primers (Promega, Madison, WI)，於 70°C 加熱 5 分鐘，在室溫下逐漸冷卻後，加入 6 μ l 5 \times RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM DTT)、3 μ l dNTP (2.5 mM)、20 U RNase inhibitor (Pharmacia; USA)、100 U M-MLV reverse transcriptase (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)，加二次水維持總體積至 30 μ l，置室溫 10 分鐘後，於 37°C 中反應一小時。取 4 μ l 反轉錄酶反應後混合物以 95°C 加熱 5 分鐘後，迅速置冰上冷卻。再加入 2.5 μ l 10 \times PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8; 1.2 mM MgCl₂; 500 mM KCl; 1% Triton X-100)、TGF- α sense primer (5'-ATACATATGGCTGC AGCAGTGGTG-3') 和 antisense primer (5'-GG GCATATGGATGATAAGGACAG C-3') 各 10 pmole、1 unit *Taq* polymerase (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)，加水維持體積至 25 μ l，以熱循環儀 (thermal cycler) 作 35 個循環。PCR 反應狀況：denaturing 95°C、1 分 30 秒；annealing 47°C、1 分 30 秒；extension 72°C、2 分 30 秒，最後再以 72°C 處理 10 分鐘。次以 0.6% polyacrylamide gel 分析放大 TGF- α 片段全長 260 bp。

萃取純化洋菜膠中的 DNA 片段及表現質體 pET23b-TGF α -ricin A 的構築

切下全長所放大 TGF- α 約 260 bp 洋菜膠 (agarose gel) 切片，加入 500 μ l GEX buffer (Promega, Madison, WI)，置於 60°C 下 10 分鐘，每 5 分鐘搖一次，使洋菜膠溶解。將溶液放至管柱，離心 13,000 rpm 30 秒。將濾液重新放入管柱，再濾一次。加 500 μ l Wash I buffer 至 column (Viogene)，離心 13,000 rpm 30 秒。加 700 μ l Wash II buffer 至 column，離心 13,000 rpm 5 秒，初步去掉濾液。離心 13,000 rpm 1 分鐘，去掉殘餘酒精。加 30 μ l TE buffer 或 H₂O。取 1 μ l pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI)，1 μ l 10 \times T4 DNA ligase buffer，1 μ l T4 DNA ligase，加入純化得之 260 bp TGF- α 片段，維持總體積 10 μ l，並置於 4°C。

質體 pET23b-TGF α -ricin A 的構築及轉型至 BL21-SI 表現系統

將 pGEM-T-TGF- α 用 *Nde*I 限制酶切割後，以電泳分離，將 246-bp TGF- α 片段自洋菜膠中純化出來。將已經為 *Nde*I 切割之 pET23b-ricin A 質體(未發表結果)，加入 *Nde*I 切割出 TGF- α 片段，利用 T4 DNA ligase 構築成 pET23b-ricin A-TGF α 基因重組質體。次將基因重組質體轉型至 TOP'10 勝任細胞，使用 LB 培養基(含 50 μ g/ml ampicillin)篩選菌落，並分別萃取質體，並以限制 *Nco*I-*Pvu*II、*Pvu*II-*Kpn*I 切割辨識 DNA，篩選正確純系後，抽取大量正確的純系 pET23b-TGF α -ricin A 質體。

將重組基因質體轉型至 BL21-SI 勝任細胞(GIBCO-BRL; Gaithersburg, MD)，使用 LBON (1% trypton; 0.5% yeast extract, 含 50 μ g/ml ampicillin)培養基篩選菌落，分別再用

限制 *Nde*I、*Nco*I-*Pvu*II 切割辨識，鑑定出所萃取出正確純系的質體。

大量製備 TGF α -ricinA 融合蛋白質

挑出正確質體菌落放入 1 ml LBON (含 50 μ g/ml ampicillin)，37°C 培養過夜後，加入 50 ml LBON (含 50 μ g/ml ampicillin)，於 37°C 培養至 OD₆₀₀ 到達 0.4 - 0.6，加入 0.3 M NaCl 誘導培養 6 小時，後離心 13,000 rpm 5 分鐘，分離菌體與上清液。將菌體加入 2 ml 預冷的 binding buffer，充分振盪後，移到 4 ml 養菌小管，置於 -78°C 冰箱 10 分鐘，俟菌液凝固後，以 polytron 利用 5,000 rpm 超音波處理冷凍細胞至萃取液成泡沫狀混濁，並將打碎的萃取液於 4°C 冰箱離心 10,000 rpm 20 分鐘，取上清液。

親和性親合性管柱純化融合蛋白質

加入 3 ml 滅菌水使管柱順利流通，讓含鎳離子樹脂完全混勻，取 1 ml 樹脂至管柱，利用重力充填，待 storage buffer 高度降至管柱內充填樹脂處，依序加 3 ml H₂O、5 ml charge buffer、3 ml binding buffer。至管柱，當 buffer 降到樹脂填充位置時，加入細胞萃取液，並將濾液重複過濾 2 次，收集第三次的濾液。加入 10 ml binding buffer 沖洗管柱，再加入 6 ml wash buffer 沖洗管柱。

西方墨點法

將蛋白質煮沸 5 分鐘，以 12% SDS-PAGE 電泳分離蛋白質。將膠體上的蛋白質轉漬到 nitrocellulose membrane 上，次將 membrane 浸泡在 blocking solution [10% 脫脂牛奶 in TBS-T (Tris-buffered saline plus 0.05% Tween-20)]後，過夜震盪。將 membrane 以 TBS-T 洗後，加適量的一級抗體(anti-TGF α ;

Oncogene Science, Deer Park, IL) 或 anti-Histidine antibody (Santa Cruz Biotechnology), 並置於室溫中 1-2 小時。次將 membrane 以 TBS-T 洗三次, 再浸入稀釋 1,000 倍的二級抗體(goat anti-mouse IgG)中, 於室溫中搖晃 1 小時。以 TBS-T 及 substrate buffer 清洗二次。加入受質[5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and nitro-blue tetrazolium mixture (BCIP/NBT)] 呈色後, 並以 0.1M EDTA 終止呈色。

細胞培養

人類上皮癌細胞 A431 培養於含 7% FBS (fetal bovin serum) 的 DMEM (GIBCO-BRL, Grand Islands, NY) 中, 置於含 5% CO₂ 的 37°C 恆溫箱內。先在 96-well plate 的每個 well 各放 10⁴ 個細胞, 及 200 μ l 培養液, 使細胞附著在盤壁。約 24 小時後細胞附著之後, 加入不同濃度(10⁻¹~10⁻⁶ μ M) 的重組融合蛋白 (包括 ricin A 及 TGF α -ricin A), 於培養第 4 天後測試胞殺作用。

細胞活性測試

將 96-well 培養盤內所生長細胞, 吸去上層 100 μ l 的培養液後, 加入 20 μ l MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (5 mg/ml, Sigma; St. Louis, MO)。並置於 37°C 恆溫箱 4 小時後, 加入 120 μ l stop solution (0.05 N HCl in isopropanol), 混合均勻。再測 590nm 的吸光度, 並以 630 nm 吸光值當作背景。以不含藥物蛋白培養盤所得到讀數視為 100%, 將其餘含不同濃度重組蛋白培養盤所得到讀數轉換為百分比。

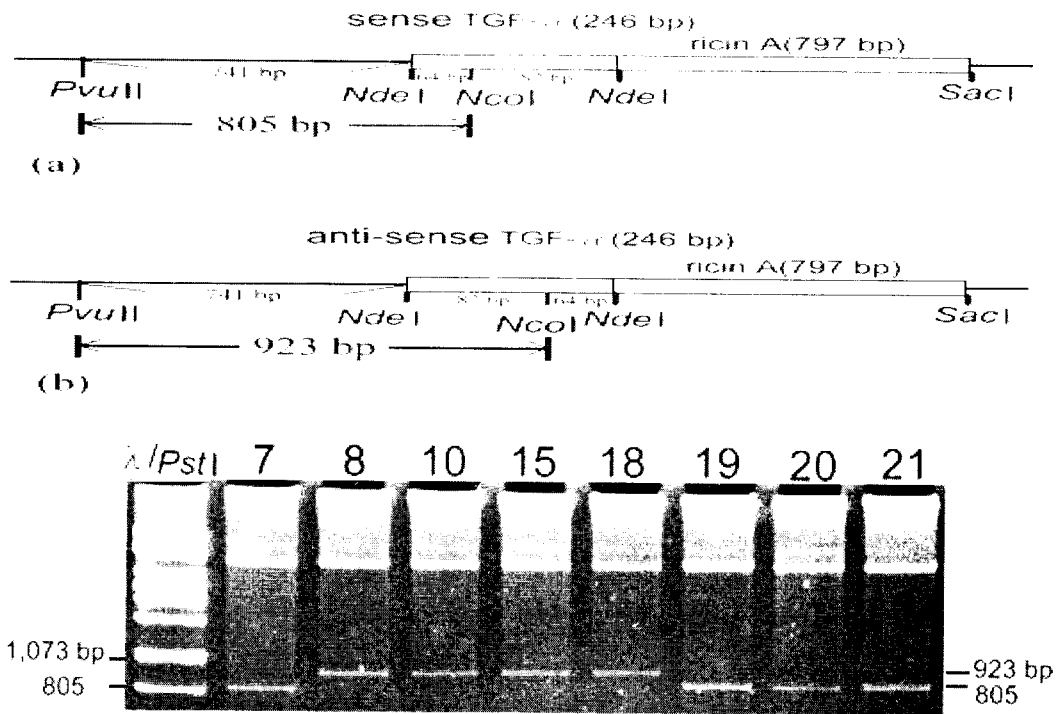
結 果

質體 pGEM-T-TGF α 的構築與確認

自肺癌細胞 H322 所萃取出 RNA, 經過 RT-PCR 的反應製造 TGF- α 基因片段, 將放大的 cDNA 片段(260 bp), 經 0.9% 洋菜膠體電泳分離、淘選及純化出之後, 再嵌入 pGEM-T 載體中。TGF- α 片段與載體結合後, 再由轉型作用送進 TOP 10 大腸桿菌中之後篩選。將所有抗藥菌落以限制酶 *EcoRI* 切割之後, 發現有十個菌落含正確大小 TGF- α 基因。為進一步確定篩選到正確而且含正確方向基因質體, 次以限制酶 *NcoI* 切割, 以辨認質體是否以正向插入 TGF- α 基因。實驗結果顯示, 其中有三個質體切割出 203 bp 的片段。該片段分別是由在載體以及由 TGF- α 基因的 *NcoI* 切點上切割所造成。由限制酶 *NcoI* 切割的圖譜顯示, 三個菌落含正確質體而且是以正向(sense)植入載體(pGEM-T-TGF α)之內的。

重組基因 pET23b-TGF α -ricin A 的構築與確認

實驗的設計是將 TGF- α 基因設在重組質體 N 端, ricin A 基因設定在 C 端 (圖一), 並在重組質體利用中間相隔數個非相關胺基酸以作為連接之用。先前本實驗室已經建立質體 pET23b-ricin A。重組基因建構方式是由限制酶 *NdeI* 切割將封閉質體 pET23b-ricin A 打開之後, 再與 pGEM-T-TGF α 質體經限制酶 *NdeI* 所切割下 TGF- α 片段進行接合反應, 以製備重組質體 pET23b-TGF α -ricin A。將結合之後重組質體 pET23b-TGF α -ricin A 轉型至大腸桿菌 TOP 10 後, 為正確篩選所選殖融合基因是否含有正確方向 TGF- α 片段, 可以利用限制酶 *NcoI*-*PvuII* 切割作辨識。實驗結果顯示, 八個抗藥 clone 中, 有四個可由 *NcoI*-*PvuII* 切出 805 bp 大小片段; 另外四個



圖一、(上圖)正向(a)與逆向(b)插入 TGF- α 基因的限制 圖譜。(a)圖顯示有插入 sense-TGF α 後由 *Nco* I-*Pvu* II 切出 805 bp 的片段，(b)圖顯示 *Nco* I-*Pvu* II 切出 923 bp 的片段是由於插入 antisense-TGF α 片段。

(下圖) *Nco* I-*Pvu* II 切出四個 clone 805 bp 為 sense-TGF α 及四個 clone 923 bp 為 antisense-TGF α 。

Figure 1. (Top) *Nco*I-*Pvu*II fragment of 805 or 923 bp is expected obtained from sense (a) or antisense (b) construct, respectively.

(Bottom) Four clones with sense TGF- α insert (805 bp) were obtained.

可以切出 923 bp 的片段。這兩種片段都是利用 pET23b 上的 *Pvu*II 切點及 TGF- α 基因上 *Nco*I 切點所切下造成的。但只有 sense 方向 TGF α 才會切出 805 bp 的片段，而 923 bp 的片段則是由於 antisense 方向 TGF α 所造成 (圖一)。為了排除 TGF- α 基因重複插入兩次以 dimer 的形式出現的菌落，四個正向 TGF- α clone，續以限制酶 *Pvu*II-*Kpn*I 再進一步確認選殖的正確性。實驗是利用限制酶 *Pvu*II 及 *Kpn*I 分別是源自載體 pET23b 及 ricin A 上的唯一切點，在 pET23b-TGF α -ricin A 質體切割時，會產生 1,467 bp 大小的片段。倘若有重複 TGF- α 插入 *Nde*I 切點，則此 band 分子量會增加。實驗結果顯示所選取的一個 clone 由 double digestion 切出正確 1,467bp 大小，並且分別由兩種方向確定序列之後，確

定取得正確的構築是僅含有一個 TGF- α 片段的質體 pET23b- TGF α -ricin A。

重組蛋白 TGF α -ricin A 之表現

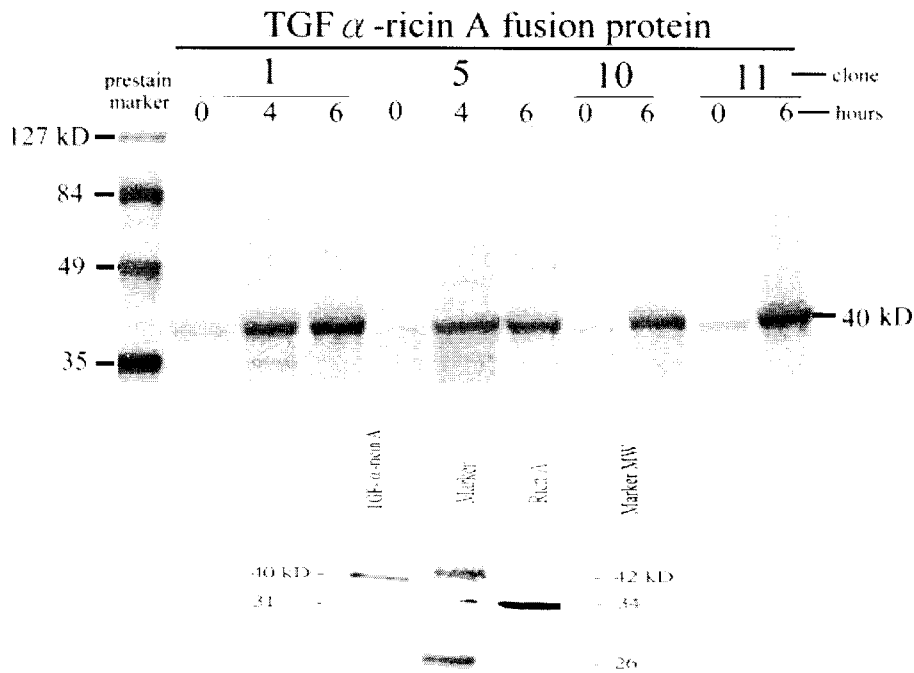
將正確的大腸桿菌 TOP10 菌落大量培養抽取純化出質體 pET23b-TGF α -ricin A 之後，將其轉型至表現系統 BL21-SI，使用含 50 μ g/ml ampicillin LBON，並培養基篩選菌落。由所有菌落中挑選 4 個正確 clone，將表現出融合蛋白 TGF α -ricin A，用 TGF- α 抗體以西方墨點法偵測融合蛋白的表現，實驗結果顯示該 4 個菌落在菌體部分皆表現出正確分子量 40 kD 之 TGF α -ricin A 融合蛋白 (圖二(上))。並將其中表現 TGF α -ricin A 融合蛋白質，以 TGF- α 抗體分析電泳分析，可看出 TGF α -ricin A 融合蛋白質的部分仍為主要成分。

Ricin A 蛋白質的表現與純化

將質體 pET23b-ricin A 轉型至細菌表現系統 BL21-SI，使用 LB 培養基篩選菌落。挑選 ricin A 表現量最多的 clone，經由大量表現，經含鎳離子樹脂親和色層分析分離後，再用 SDS-PAGE 電泳觀察結果 (圖二上)。用西方墨點法以 histidine 抗體偵測 ricin A (31 kD)與融合蛋白 TGF- α -ricin A (40 kD)皆顯示正確的分子量條紋 (圖二下)。

重組蛋白 TGF α -ricin A 對上皮癌細胞細胞株生長的影响

取表現大量 EGFR 人類上皮癌細胞 A431 記數出細胞濃度，加至含 7% FBS D-MEM 的 96-well 培養盤內。將 1×10^4 個細胞附著於 well 之後，加入不同濃度的純化融合蛋白作細胞測試，並且以含有空載體的細菌液作控制組，使用純化 TGF α -ricin A 及純化 ricin A 的測試濃度為 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ μ M 範圍，且兩者各作三個重複試驗。經過 4 天培養，使用 MTT 試劑染色存活細胞之後，測試 590 nm 的吸光



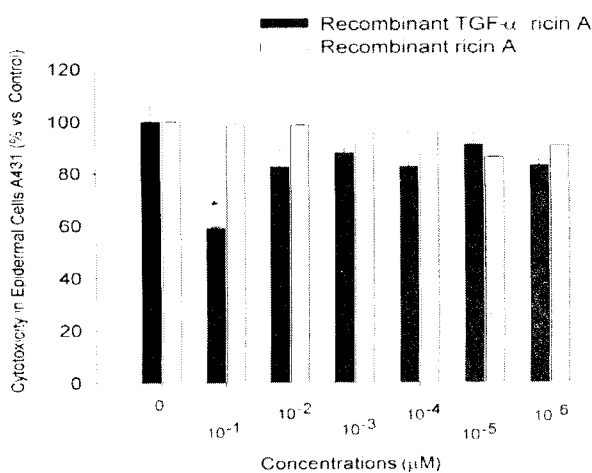
圖二、(上圖) 在 pET23b-TGF α -ricin A 轉型菌落中挑選四個正確 clone 後，誘導表現融合蛋白 TGF α -ricin A，以西方墨點法用 TGF- α 抗體偵測融合蛋白的正確性，結果顯示四個菌落皆表現正確分子量 40 kD 之 TGF α -ricin A 融合蛋白。

(下圖) 用西方墨點法以 Histidine 抗體偵測合成 ricin A 與融合蛋白 TGF- α -ricin A 皆顯示正確的分子量條紋。ricin A 片段為 31 kD；TGF- α -ricin A 片段為 40 kD。轉漬膜以一次抗體雜交後，再用二級抗體 alkaline-phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG 及受質 BCIP/NBT 染色。

Figure 2. (Top) Four clones with sense TGF- α were shown expressed recombinant protein. The expressed protein was confirmed with western blotting TGF- α antibody.

(Bottom) Both expressed recombinant protein ricin A and TGF α -ricin A were probed with Histidine antibody that appeared at 31 and 40 kD, respectively.

度，以含空基因質體細胞作控制，繪製出不同濃度下細胞存活率的柱狀圖。發現未純化重組融合蛋白質在 10^{-1} μM 對 A431 細胞生長有抑制效應 (圖三)，而且其統計上有顯著差異 ($p < 0.05$)，但是其抑制效果不若化學方式結合 TGF- α 與 ricin A 的共軛物為顯著 (Fang, 1998)。



圖三、利用表現大量 EGFR 人類上皮癌細胞 A431，讓 1×10^4 個細胞附著於 well 之後，加入不同濃度的未純化融合蛋白作細胞測試。使用純化 TGF α -ricin A 或 ricin A 的濃度由 10^{-1} ~ 10^{-6} μM ，且兩者各作三個重複試驗。經過 4 天培養，由 MTT 試劑染色存活細胞之後，測試 590 nm 的吸光度，並以含空基因質體細菌細胞萃取液作控制組培養盤所得到讀數視為 100% 的控制組，將其餘含不同濃度重組蛋白培養盤所得到讀數轉換為百分比。(Bar 代表標準誤差，* 代表 $p < 0.05$)

Figure 3. Cytotoxicity of the recombinant protein in EGFR-overexpressed human epithelial cells. A total of 1×10^4 cells was tested for cytotoxicity of the recombinant protein in the range of 10^{-1} to 10^{-6} μM after culturing for 4 days. The cells were then stained with MTT and the reading at 590 nm taken. The data were converted into percentages with proteins from cells of empty vectors as 100% control. (Bar stands for standard error in triplicate, * $p < 0.05$)

討 論

將受體配子與毒素做融合蛋白，過去有許多成功的例子。尤其使用 EGFR 配子與毒素做成的融合蛋白用在抑制癌細胞生長，有相當不錯的結果 (Davies and Chamberlin, 1996; Chandler *et al.*, 1998)，過去本實驗室也以化學雙硫鍵將 TGF- α 與 ricin A 結合成共軛蛋白，並且對大量表現 EGFR 細胞有明顯胞殺作用 (Fang, 1998)。

利用限制酶圖譜鑑定含正確方向的蛋白質表現質體 pET23b-TGF α -ricin A 僅含有一個 TGF- α 基因。由實驗結果顯示，有四個質體出現所預測正向應有的片段，而有另外四個質體出現反向的片段。在構築質體 pET23b-TGF α -ricin A 的過程中，因為 pET23b-ricin A 被 *Nde*I 打開封閉質體之後，易造成自行接合反應 (self-ligation)，因此使用 calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) 去除 5' 端磷酸根處理之後，再植入 TGF- α 片段。但是這種方式在轉型時，效率甚低，而且篩選不易。成功的接合反應是提高所插入 TGF- α 基因片段的濃度，再與打開的 pET23b-ricin A 競爭接合位置，然而此法也易造成重複插入 TGF- α 基因，為確定上述四個含正向 TGF- α 基因的質體是否含有重複插入片段，用雙重限制酶 *Pvu*II-*Kpn*I 切割 (double digestion) 再確認再用兩種方向訂序是極有必要的。限制酶 *Pvu*II 及 *Kpn*I 分別為載體 pET23b 及 ricin A 上的唯一切點，預期正向插入且只含單一 TGF- α 插入片段的質體會切出 1,467 bp 的片段，若有重複插入 TGF- α 片段的質體，則會切出 1,713 bp 的片段。由實驗結果顯示，四個正式菌落中，僅有一個質體出現重複插入的片段。將挑選得到正確 clone 定序後，將之轉譯成蛋白質，可以證明蛋白

質的表現序列無誤後，進而確定得到正確構築質體 pET23b-TGF α -ricin A，所轉譯的蛋白質是建構在一個 open reading frame 內，而 TGF- α 確實是在 N 端，ricin A 在 C 端，間隔五個非相關胺基酸，並且含六個 histidine 做親合性色層分析附著於鎳樹脂之用。

將質體 pET23b-TGF α -ricin A 轉型至 BL21-SI 表現系統，使用 LBON 培養基篩選菌落，再以 0.3 M NaCl 作誘導。所表現 TGF α -ricinA 融合蛋白，用西方墨點法以 TGF- α 抗體偵測融合蛋白的正確性，結果顯示該四個菌落在菌體部分皆表現正確分子量 TGF α -ricin A 融合蛋白。本實驗也將其中一個以 TGF α -ricin A 融合蛋白質的 clone 做大量培養，萃取細胞質成分後，以鎳離子樹脂親合性管柱分離得到純化的融合蛋白。將萃取細胞液經純化後以電泳分析，可看出 TGF α -ricin A 融合蛋白質的部分為主要成分，經 TGF- α 抗體雜交 western blot 顯示 40 kD 融合蛋白的確包含 TGF- α 基因片段產物，再由抗體雜交則訊息顯示確實是由 open reading frame 所轉譯的正確融合蛋白質。

經由大量表現 EGFR 人類上皮癌細胞 A431 細胞毒性測試的結果，並且以純化合成 ricin A 做控制組，發現未純化的重組 TGF α -ricin A 融合蛋白在高濃度下對細胞生長有抑制效應，但是由空質體控制組在相同濃度之下抑制作用並不明顯，估計可能是純化所以真正有功能融合蛋白質未如天然 ricinA 有醱化效應(Lord *et al.*, 1994)，造成融合蛋白在培養液或細胞質內穩定度低，使有效發揮效用蛋白濃度降低。未來應進一步改進考慮使用真核細胞載體如酵母菌載體等，讓合成蛋白經過修飾之後，由真核細胞強烈的啟動子，大量表現純化後，再做進一步細胞毒性測試。甚至也應該考慮將建構兩個

TGF- α copy 在 N 端，ricin A 在 C 端，將表現重新融合蛋白作純化之後，再作細胞毒性的測試。

參考文獻

- Aaronson, S. A. 1993. Growth factors and cancer. *Science* 254: 1146-1153.
- Chandler, L. A., B. A. Sosowski, J. R. McDonald, J. Price, S. L. Aukerman, A. Baird, G. Piece, and L. L. Houston. 1998. Targeting tumor cell via EGF receptors: selective toxicity of an HBEGF-toxin fusion protein. *Int. J. Cancer*. 78: 106-111.
- Davies, D. E. and S. G. Chamberlin. 1996. Targeting the epidermal growth factor receptor for therapy of carcinoma. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1101-1110.
- Fang K. 1998. A conjugate toxin containing transforming growth factor- α and ricin A specifically inhibits growth of A431 human epidermoid cancer cells. *Proc. National Science Council, Part B: Life Science*. 22: 76-82.
- Lord, J. M., L. M. Roberts, and J. D. Roberts. 1994. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* 8: 210-218.
- Massague, J., and A. Pandiella. 1993. Membrane-anchored growth factors. *Annu. Rev. Biochem.* 62: 515-541.
- Shire, D., B. J. P. Bourrie, C. Carillon, J.- M. Derocq, P. Dousset, X. Dumont, F. K. Jansen, M. Kaghad, R. Legoux, P. Delong, B. Pessegue, and Vidal H. 1990. Biologically active A-chain of the plant

toxin ricin expressed from a synthetic gene
in *Escherichia coli*. *Gene* 93: 183-188.

(接受日期：2001.1.25)

Growth Inhibition in Human Cancer Cells by Recombinant Transforming Growth Factor- α and Ricin A Fusion Protein

Shih-Hwei Chen, Yung-Lin Kang, Chien-Chih Chiou, Kang Fang*

Department of Biology, National Taiwan Normal University

Taipei, Taiwan

Abstract

Human cancer cells express epidermal growth factor receptors (EGFR) and natural ligand-transforming growth factor- α (TGF- α). In this work, recombinant construct comprises of TGF- α and ricin A was made in a hope that the expressed recombinant protein undergoes endocytosis and is expected to inhibit proliferation selectively in cells over-expressing EGFR.

The recombinant construct was established in this work and the expressed protein identified. The preliminary result showed that the expressed protein inhibited human epithelial carcinoma cell line, A431, also known overexpressing EGFR's.

Key words: Human cancer cells, Ricin A, Transforming growth factor- α , Recombinant protein