

# 增强型金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 突变体及其超抗原活性

张国俊<sup>1,2</sup>, 徐明恺<sup>1</sup>, 孙健<sup>1</sup>, 李洪义<sup>3</sup>, 杨宏丽<sup>3</sup>, 张惠文<sup>1</sup>, 张成刚<sup>1</sup>

1 中国科学院大学沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 沈阳协合生物制药股份有限公司, 辽宁 沈阳 110179

张国俊, 徐明恺, 孙健, 等. 增强型金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 突变体及其超抗原活性. 生物工程学报, 2013, 29(6): 803-813.

Zhang GJ, Xu MK, Sun J, et al. Enhanced SEC2 mutants and their superantigen activities. Chin J Biotech, 2013, 29(6): 803-813.

**摘要:**金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 (Staphylococcal enterotoxin C2, SEC2) 作为一种超级抗原蛋白, 极微量即可有效激活机体免疫系统, 这一特性可应用于对肿瘤和感染性疾病的辅助治疗。为了增强 SEC2 的超抗原活性, 应用 over-lap PCR 方法将 SEC2 中的 102~106 位 GKVTG 氨基酸残基分别突变为 WWH、WWT 和 WWP, 获得 3 种突变体 ST-1、ST-2 和 ST-3。三种突变体刺激小鼠淋巴细胞增殖活性和肿瘤细胞生长抑制活性与野生型 SEC2 相比均有显著提高。ST-1 和 ST-3 的致热活性与野生型 SEC2 相当, 而 ST-2 的致热活性明显高于野生型 SEC2。此外, 三种突变体体外刺激淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的水平也显著提高, 这可能是导致突变体具有较高肿瘤细胞生长抑制活性的原因。进一步实验发现, 三种突变体刺激下, 小鼠脾淋巴细胞 mV $\beta$ 8.2 基因的转录水平较野生型 SEC2 显著增加, 暗示突变体对 TCR mV $\beta$ 8.2 分子亲和力的提高, 可能是其超抗原活性增强的主要原因。

**关键词:**金黄色葡萄球菌肠毒素 C2, 超抗原活性, T 细胞受体 (T cell receptor, TCR), 致热活性, 细胞因子

**Received:** December 13, 2012; **Accepted:** March 11, 2013

**Supported by:** Significant Creation of New Drugs Foundation of China (No. 2012ZX09102301-013), Science & Technology Projects of Shenyang Foundation of China (Nos. F11-264-1-11, F12-152-9-00).

**Corresponding author:** Mingkai Xu. Tel: +86-24-83970380; Fax: +86-24-83970381; E-mail: mkxu@iae.ac.cn

国家科技重大专项重大新药创制项目 (No. 2012ZX09102301-013), 沈阳市科技计划项目 (Nos. F11-264-1-11, F12-152-9-00) 资助。

网络出版时间: 2013-05-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130515.1610.003.html>

## Enhanced SEC2 mutants and their superantigen activities

Guojun Zhang<sup>1,2</sup>, Mingkai Xu<sup>1</sup>, Jian Sun<sup>1</sup>, Hongyi Li<sup>3</sup>, Hongli Yang<sup>3</sup>, Huiwen Zhang<sup>1</sup>, and Chenggang Zhang<sup>1</sup>

1 Institute of Applied Ecology, University of Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, Liaoning, China

2 University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 Shenyang Xiehe Bio-pharmaceutical Co. Ltd, Shenyang 110179, Liaoning, China

**Abstract:** As a superantigen protein, Staphylococcal enterotoxin C2 (SEC2) activates the immune system effectively even in extremely low concentrations, and this property could be applied in adjuvant therapy against tumors and infectious diseases. In order to enhance the superantigen activity of SEC2, the residues at position 102–106 of native SEC2 were substituted for WWH, WWT and WWP by over-lap PCR, and three mutants named ST-1, ST-2 and ST-3 were obtained. Stimulating activity to murine lymphocytes proliferation and inhibiting activity to tumor cell growth of the three mutants were significantly improved compared with the native SEC2. Febrile activities of ST-1 and ST-3 were comparable with the native SEC2, but ST-2 showed markedly increased febrile activity than native SEC2. Moreover, the levels of IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  secreted by T cells stimulated with the three mutants were significantly improved, which might be the possible reason for enhanced tumor cell growth inhibition activities. Furthermore, mV $\beta$ 8.2 gene transcription levels of murine splenocytes stimulated by the three mutants were dramatically increased compared with native SEC2, suggesting their increased affinities to TCR mV $\beta$ 8.2 molecular, which might be the main reason for their enhanced superantigen activities.

**Keywords:** Staphylococcal enterotoxins C2, superantigen activity, T cell receptor (TCR), pyrogenic activity, cytokine

金黄色葡萄球菌肠毒素 (Staphylococcal enterotoxins, SEs) 是一类典型的细菌超抗原, 其一端结合到主要组织相容性复合体 II 类分子 (MHC II) 抗原结合槽的外侧, 另一端与 TCR (T cell receptor, TCR) 的 V $\beta$  链连接, 在抗原呈递细胞 (Antigen presenting cell, APC) 外形成 MHC II 类分子-Sag-TCR V $\beta$  复合物, 极低剂量即可活化 T 细胞<sup>[1-4]</sup>, 并释放大量炎症性因子<sup>[5]</sup>, 因而在肿瘤和感染性疾病治疗方面具有潜在应用价值<sup>[6-7]</sup>。

按照血清型的不同, 肠毒素可分为几十类。其中 C 型肠毒素 (SEC) 又可以进一步分为 C1、C2 和 C3 三种亚型, 三种亚型之间的氨基酸序列高度保守<sup>[8]</sup>。金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 (Staphylococcal enterotoxin C2, SEC2) 因为毒性

较低已经被应用于肿瘤的临床治疗, 并取得一定的治疗效果。但在临床应用中, 也暴露出活性较差、单独用药治疗效果欠佳等缺点。如能在保持低毒的前提下提高其活性将更具有临床治疗意义。而以基因工程技术对 SEC2 蛋白分子进行氨基酸理性定点改造, 则是实现该目的的重要手段。

多数种类的肠毒素分子中都存在着一个由 2 个 Cys 形成的含有十几个氨基酸残基的二硫环结构。在 SEC2 分子中, 二硫环结构对于 SEC2 的活性和稳定性都至关重要<sup>[9]</sup>。晶体学研究显示, 在 C 类肠毒素中, 二硫环内部的氨基酸残基可能介导了与 TCR V $\beta$  侧链的结合<sup>[10]</sup>。Peter 等发现在 SEC1 中, 当 102~106 位氨基酸被 WWT、WWP 和 WWH 取代后, 突变体与 TCR 结合能力提高 150 倍, 并伴随着 T 细胞激活能力的显著增强<sup>[11]</sup>。

而 SEC1 与 SEC2 的序列高度保守, 以上位点对 SEC2 具有怎样的影响, 该突变策略是否也适用于 SEC2, 活性改变的细胞学机制是什么, 这是我们在本研究中所要解决的问题。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL(DE3) 由本实验室保存; 质粒 pET-28a 表达载体为 Novagen 公司产品; 重组质粒 pET-28a-sec2 由本实验室研究人员构建; 野生型 SEC2 蛋白纯品由本实验室表达纯化<sup>[12]</sup>; 小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 购自中国科学院上海细胞库; 6~8 周 SPF 级 BABL/c 雌性小鼠和新西兰大白兔购自辽宁长生生物技术有限公司。

#### 1.1.2 试剂和工具酶

T4 DNA 连接酶、蛋白分子量 Marker、Pyrobest DNA 聚合酶、核酸限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 及 DL2000 DNA 分子量 Marker、RNAiso plus、PrimeScript 反转录试剂盒和 SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> II 等均购自 TaKaRa 大连公司; Ni-NTA 亲和层析柱为 Novagen 公司产品; 卡那霉素、异丙基硫代- $\beta$ -D 半乳糖苷 (IPTG)、二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 均为 Sigma 公司产品; RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清 (FBS) 购自 Hyclone 公司; 胰蛋白酶为 Gibico 公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胍购自 OXOID 公司、琼脂糖胶回收试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒购于北京博大泰克生物技术有限公司; 细胞因子检测试剂盒均购自北京达科为生物技术有限公司; 引物由上海生工生物工程技术服务

公司合成; DNA 测序由北京华大技术服务公司完成; 其他化学试剂均购自国药集团的分析纯试剂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变基因及其表达载体的构建

将含重组质粒 pET-28-sec2 的工程菌接种于含终浓度为 60  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜, 取适量菌液提取含有 sec2 DNA 片段的重组质粒 pET-28-sec2。以 pET-28-sec2 质粒为模板, 应用 over-lap PCR 技术构建突变基因 st-1、st-2 和 st-3, over-lap PCR 引物见表 1。突变体基因两端 PCR 扩增程序 1: 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 两片段产物混合, 4  $^{\circ}$ C 保存。突变体基因全长 PCR 扩增程序 2: 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 40 s, 50  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。将上述得到的突变基因片段经切胶纯化后用 *EcoR* I 和 *Xho* I 内切酶进行双酶切, 与经同样酶切处理的表达载体 pET-28a 进行过夜连接, 连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 用含 60  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 并将阳性克隆进行测序。

#### 1.2.2 突变蛋白的表达与纯化

接种测序正确的阳性克隆菌 *E. coli* BL21(DE3) 于 LB 液体培养基中 (含 60  $\mu$ g/mL 卡那霉素), 37  $^{\circ}$ C 振荡培养至菌液的  $OD_{600}$  达到 0.5。加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导物于 30  $^{\circ}$ C 继续培养 4 h。诱导表达结束后 5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 菌体用平衡缓冲液 (10 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L

表 1 构建 SEC2 突变蛋白 over-lap PCR 引物

Table 1 Primers for constructing SEC2 mutant protein by over-lap PCR

Amino acid substitution <sup>a</sup>		Primers <sup>b</sup> (5'-3')
SEC2-F		CGGAATTCGAGAGTCAACCAGA
SEC2-R		TCGCTCGAGTTATCCATTCTTTGTTG
ST-1R	GKVTG(102-106)→WWH	CAAGTTTTACCAT <b>GCCACC</b> ATACATTATCTTTGGATG
ST-1F		CATCCAAAGATAATGTAT <b>TGGTGGC</b> ATGGTAAAACCTGTATGTATGGAG
ST-2R	GKVTG(102-106)→WWT	CAAGTTTTACCT <b>GTCCACC</b> ATACATTATCTTTGGATG
ST-2F		CATCCAAAGATAATGTAT <b>TGGTGGAC</b> AGGTAACCTGTATGTATGGAG
ST-3R	GKVTG(102-106)→WWP	CAAGTTTTACCT <b>TGGCCACC</b> ATACATTATCTTTGGATG
ST-3F		CATCCAAAGATAATGTAT <b>TGGTGGCC</b> AGGTAACCTGTATGTATGGAG

<sup>a</sup> Specific amino acid substitution.

<sup>b</sup> The primers were designed for special amino acid substitution. The sequences of mutant nucleotides are indicated in boldface.

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) 重悬后进行超声波破碎。破碎产物于 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清, 并上样到 Ni 离子亲和层析柱 (平衡缓冲液预处理), 以 50 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液清洗杂蛋白, 50~250 mmol/L 咪唑的平衡缓冲液梯度洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白峰组分, 洗脱液于透析液 (PBS: 137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 4.3 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) 中充分透析除盐, 获得纯化蛋白, 以 15% SDS-PAGE 分析其纯度。纯化的突变蛋白按照 Super-Bradford 蛋白定量试剂盒测定方法测定蛋白浓度。过滤除菌后保存于-70 °C 待用。

### 1.2.3 突变蛋白体外刺激小鼠淋巴细胞增殖活性测定

无菌条件下取 6~8 周雌性 BABL/c 小鼠脾脏剪碎研磨过 200 目细胞筛, 红细胞裂解液裂解去除红细胞, 用无血清 RPMI 1640 清洗获得纯的小鼠脾淋巴细胞。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞浓度, 以 1×10<sup>6</sup> cells/孔加入 96

孔细胞培养板中。再加入经梯度稀释后的 ST-1、ST-2 和 ST-3 及野生型 SEC2 蛋白, 使终浓度分别为 10 ng/mL、100 ng/mL 和 1 000 ng/mL。每孔终体积为 200 μL, 血清浓度为 10%。每个浓度设 3 个复孔, 以 RPMI 1640 培养基作阴性对照。

将上述培养板置于细胞培养箱以 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 h。待培养时间结束后, 向各细胞培养孔中加入 30 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h。1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 120 μL DMSO 并在室温振荡 10 min 溶解结晶颗粒。通过酶标仪以测定波长 570 nm 和参比波长 630 nm 测定各实验孔的吸光值 (OD)。以增殖指数 (Proliferation index, PI) 表示刺激小鼠脾淋巴细胞增殖能力, PI=实验组吸光值/阴性对照组吸光值。

### 1.2.4 突变蛋白体外抗肿瘤活性测定

将小鼠脾淋巴细胞以 5×10<sup>5</sup> cells/孔加到 96 孔细胞培养板中, Hepa1-6 肿瘤细胞以 2.5×10<sup>5</sup> cells/孔加入各孔, ST-1、ST-2 和 ST-3 突

变蛋白和野生型 SEC2 均以终浓 10 ng/mL、100 ng/mL 和 1 000 ng/mL 加入各孔至终体积为 200  $\mu$ L。同时设淋巴细胞本底释放孔 (加与实验孔等量的淋巴细胞和蛋白样品), 肿瘤细胞对照孔 (仅加 Hepa1-6 肿瘤细胞) 及空白对照孔 (仅加 RPMI 1640)。以牛血清白蛋白 (BSA) 为阴性对照, 每样设 3 个重复。细胞于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中培养 72 h 后, 向各实验孔加入 30  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液并继续培养 4 h 后, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 每孔加入 120  $\mu$ L DMSO 并在室温振荡 10 min 溶解结晶颗粒。通过酶标仪以测定波长 570 nm 和参比波长 630 nm 测定各实验孔的吸光值 (OD)。各蛋白的抑瘤水平用抑瘤率表示。

抑瘤率 (Tumor growth inhibition %) =  $100 - [(\text{实验孔} - \text{淋巴细胞本底释放孔}) / (\text{肿瘤细胞对照孔} - \text{空白对照孔})] \times 100$ 。

### 1.2.5 突变蛋白体内致热活性的检测

将新西兰大白兔固定于测温仪上, 对其体温进行 4 h 连续监测。监测期间筛选温度波动范围在 38.6  $^{\circ}$ C~39.5  $^{\circ}$ C 之间的实验动物用于致热活性的检测。对试验动物分组, 每组 3 只, 按照 10  $\mu$ g/kg 体重的剂量通过耳缘静脉注射实验动物, 无菌 PBS 作为阴性对照。用直肠温度测量仪连续监测给药之后至 4 h 试验动物的温度变化, 最终体温变化差值以测定温度减去初始温度值表示, 变化差值超过 0.5  $^{\circ}$ C 被认为有发烧效应<sup>[13]</sup>。

### 1.2.6 突变蛋白体外刺激小鼠 T 细胞 TCR mV $\beta$ 8.2 基因的表达变化

按上述方法培养细胞 48 h, 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 重悬于 1 mL RNAiso plus 中提取总 RNA。以 0.5  $\mu$ g RNA 为模板按 PrimeScript

反转录试剂盒说明书反转录为 cDNA。ABI7000 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems) 检测小鼠 TCR mV $\beta$ 8.2 基因的表达水平, 扩增引物:  $\beta$ -actin forward (5'-TACCACTGGCATCGTGATG GACT-3') 和  $\beta$ -actin reverse (5'-TCCTTCTGCAT CCTGCGGCAAT-3')<sup>[14]</sup>; mV $\beta$ 8.2 forward (5'-CA TTATTCATATGGTGCTGGC-3') 和 mV $\beta$ 8.2 reverse (5'-GCCAGAAGGTAGCAGAGACCC-3') (Sempowski Lab 2006), 反应体系按照 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II 反应液配制说明配制。检测样品做 3 个重复, 且至少 3 次独立重复实验。扩增程序为: 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 数据分析通过待测基因与内参基因 Ct 值的差值来计算基因表达差异, 即基因表达水平变化倍数 =  $2^{-[(\text{干预后待测基因} - \text{干预后参照基因}) - (\text{干预前待测基因} - \text{干预前参照基因})]}$ 。

### 1.2.7 突变蛋白体外刺激小鼠 T 细胞分泌细胞因子水平

含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整小鼠脾淋巴细胞, 以  $1 \times 10^7$  cells/mL 加入 24 孔细胞培养板中, 再分别加入 ST-1、ST-2 和 ST-3 及野生型 SEC2 蛋白, 使终浓度为 1 000 ng/mL, 每孔终体积为 1 mL。每种突变体设 3 个复孔, 以 RPMI 1640 培养基作阴性对照。细胞于 37  $^{\circ}$ C、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 48 h, 1 000 r/min 离心 10 min, 收集细胞培养上清, ELISA 方法测定 IL-2、TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  的表达量。ELISA 操作步骤按照北京达科为生物技术有限公司小鼠细胞因子检测试剂盒操作说明操作。

### 1.2.8 统计分析

结果采用平均值  $\pm$  标准误差表示, 每个样品至少 3 次重复实验, 每个试验至少 3 次独立重复

实验。采用  $t$  检验进行数据统计分析。

## 2 结果

### 2.1 SEC2 突变蛋白的构建及表达纯化

通过 over-lap PCR 扩增, 获得分别编码 ST-1、ST-2 和 ST-3 的突变基因 st-1、st-2 和 st-3。经酶切后与表达载体 pET-28 相连, 构建成含有突变基因的重组表达质粒 pET-28-st-1、pET-28-st-2、pET-28-st-3。经转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, 并对阳性克隆进行 DNA 测序验证, 证明表达载体构建成功。突变蛋白表达工程菌经破碎、亲和层析纯化后获得突变蛋白纯品, 经 15% 的 SDS-PAGE 电泳检测纯度达到 95% 以上 (图 1), 可用于后续实验。

### 2.2 SEC2 突变蛋白刺激小鼠淋巴细胞的增殖活性

通过 MTT 法检测野生型 SEC2 以及 ST-1、ST-2 和 ST-3 突变蛋白刺激小鼠脾淋巴细胞的增

殖活性。作为一种超抗原, 微量 SEC2 即可有效激活淋巴细胞群, 导致淋巴细胞大量增殖, 实验结果表明, 3 种突变蛋白和野生型 SEC2 都可剂量依赖性地刺激小鼠淋巴细胞的增殖, 且 ST-1、ST-2 和 ST-3 的刺激活性与野生型 SEC2 相比有显著升高 ( $P < 0.05$ ), 说明 SEC2 蛋白分子中第 102~106 位氨基酸的定向替换确实显著增强了其淋巴细胞的激活能力。在低剂量下, ST-1 的活性优于 ST-2 和 ST-3 ( $P < 0.05$ ); 中高剂量下, 3 种突变蛋白之间的活性无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 SEC2 突变蛋白体外抑瘤活性

超抗原激活 T 细胞后, 可在体内或体外对肿瘤细胞产生间接杀伤作用。本研究以小鼠脾淋巴细胞作效应细胞, 以小鼠肝癌细胞 Hepa1-6 作为靶细胞, 分析突变蛋白在体外激活 T 细胞产生肿瘤细胞抑制作用的能力。结果表明, 与阴性对照相比, 微量 (10 ng/mL) 的野生型 SEC2 及其突变蛋白即可诱导淋巴细胞产生明显的肿瘤细胞

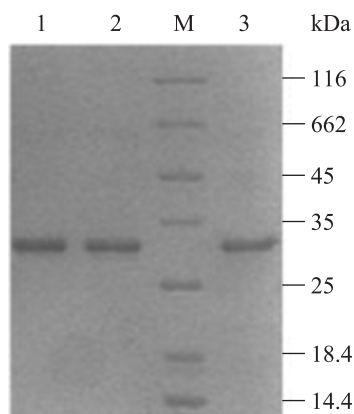


图 1 SDS-PAGE 电泳检测 SEC2 突变蛋白的表达及纯化

Fig. 1 Expression and purification of SEC2 mutants analyzed by SDS-PAGE. 1: ST-1; 2: ST-2; 3: ST-3; M: protein marker.

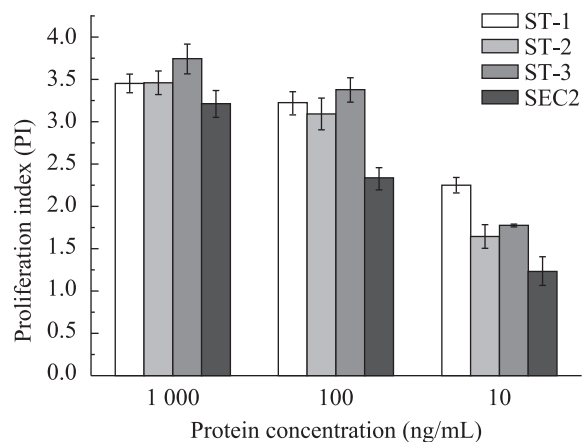


图 2 SEC2 及其突变蛋白体外刺激 T 淋巴细胞增殖活性

Fig. 2 Assay of murine T-cell proliferation stimulated by wild-type SEC2 and its mutants.

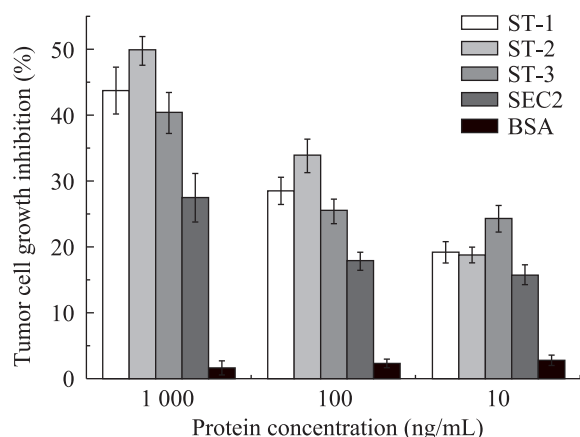


图3 SEC2及其突变蛋白的抑瘤活性

Fig. 3 Effects of SEC2 and mutant proteins on the inhibition of tumor cell growth.

生长抑制作用。在低剂量下, ST-3 的抑瘤能力显著高于野生型 SEC2, 而 ST-1 和 ST-2 与野生型 SEC2 无显著差异 ( $P>0.05$ )。在中高剂量下, 3 种突变蛋白的活性均显著高于野生型 SEC2 ( $P<0.05$ )。其中, ST-2 蛋白具有相对最好的抑瘤活性, 其中剂下其抑瘤活性是野生型 SEC2 的 1.90 倍。上述实验结果说明 ST-1、ST-2 和 ST-3 突变蛋白不仅具有增强的淋巴细胞刺激活性, 还诱导了增强的肿瘤细胞生长抑制活性。

#### 2.4 SEC2 突变蛋白体内致热活性检测

SEC2 作为一种细菌外毒素, 大剂量时会引发休克毒性, 诱使体温升高是其毒性表现之一。为了分析 SEC2 增强型突变体其提高的免疫激活能力, 是否伴随着毒性的增加, 本研究以新西兰大白兔致热模型对突变体的毒性进行分析。实验结果显示, PBS 阴性对照组试验动物体温在整个监测时间段内均无明显变化 ( $P>0.05$ )。与此相比, 给药组动物体温均随监测时间延长, 呈现显著上升的趋势 ( $P<0.05$ ), 并都出现致热效应。

其中, ST-2 突变蛋白引起的致热活性与野生型 SEC2 相比有显著提高 ( $P<0.01$ ), 而 ST-1 和 ST-3 突变蛋白的致热活性与野生型相比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。

上述结果表明, 尽管 3 个突变体的淋巴细胞刺激活性都显著高于野生型 SEC2, 且三者之间无显著差异, 但其致热毒性的变化却并不与之一致。ST-2 突变蛋白的毒性显著高于野生型和其他突变蛋白, 暗示 SEC2 的超抗原活性和毒性并不完全关联。

#### 2.5 突变蛋白体外刺激小鼠淋巴细胞分泌细胞因子水平检测

为了在细胞因子水平上解释突变蛋白超抗原活性增强的机制, 本研究以 ELISA 方法分别检测了突变蛋白体外刺激小鼠淋巴细胞分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的水平。结果发现, 突变蛋白刺激小鼠脾淋巴细胞后, IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的分泌水平都显著高于野生型 SEC2 ( $P<0.05$ ), 而 ST-1、ST-2 和 ST-3 之间没有显著差异 ( $P>0.05$ )。

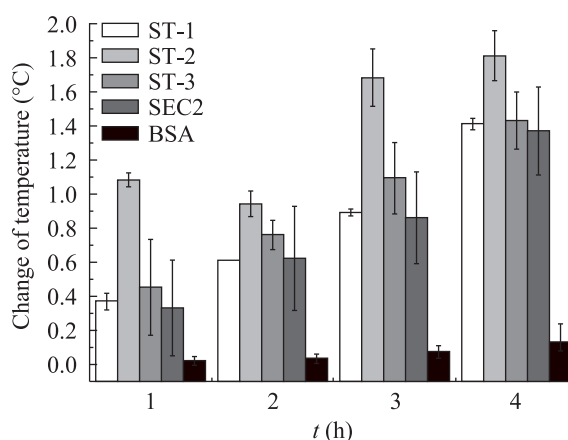


图4 SEC2及其突变蛋白体内致热活性

Fig. 4 Pyrogenicity of wild type SEC2 and the mutants *in vivo*.

## 2.6 小鼠 TCR mV $\beta$ 8.2 基因的表达变化

C 型肠毒素可特异性地识别含有小鼠 TCR mV $\beta$ 8.2 分子侧链的 T 细胞,并激活小鼠 mV $\beta$ 8.2 基因的大量转录和翻译。为了分析 3 个突变蛋白对小鼠 TCR mV $\beta$ 8.2 分子侧链的识别能力,我们以 qRT-PCR 技术对突变蛋白刺激小鼠淋巴细胞后 TCR mV $\beta$ 8.2 基因的转录水平进行了分析。结果显示,小鼠淋巴细胞在经 ST-1、ST-2 和 ST-3 刺激后 mV $\beta$ 8.2 基因的转录水平显著高于野生型 SEC2。其中,ST-1 的刺激效果最明显,是野生

型 SEC2 的 1.57 倍。

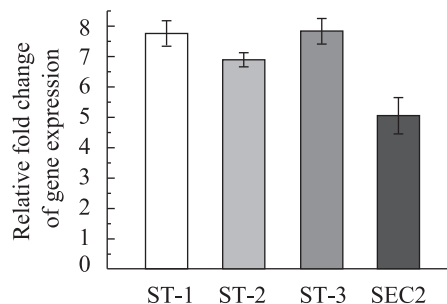


图 5 小鼠 TCR mV $\beta$ 8.2 基因的表达分析

Fig. 5 Analysis of murine TCR mV $\beta$ 8.2 gene expression.

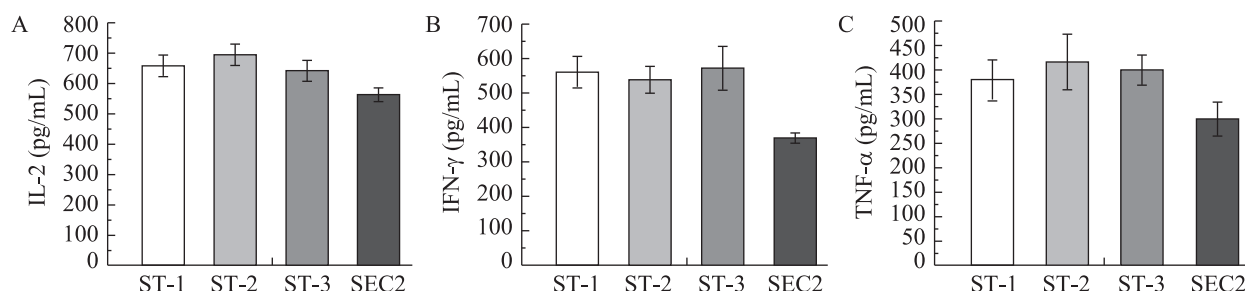


图 6 SEC2 和突变蛋白刺激小鼠 T 细胞分泌细胞因子的检测

Fig. 6 Test of cytokines secreted by murine T cells stimulated with SEC2 and mutant proteins. (A) IL-2. (B) IFN- $\gamma$ . (C) TNF- $\alpha$ .

## 3 讨论

金黄色葡萄球菌肠毒素作为一种超级抗原,极微量即可刺激大量 T 细胞增殖并使之产生细胞因子和细胞毒作用,提高机体免疫力,从而能够对肿瘤细胞产生极强的杀伤作用,故是一种很有应用前景的肿瘤免疫治疗药物<sup>[15-16]</sup>。

目前,国内已经将 SEC2 用于肿瘤的临床治疗,并证明具有一定疗效。在治疗过程中发现,尽管 SEC2 的毒性低,但因其超抗原活性弱于传统的 SEA 和 SEB,抗肿瘤效果有待进一步提

高<sup>[17]</sup>。因此,我们希望通过基因工程手段来对 SEC2 蛋白分子进行重构,在保持 SEC2 低毒性的前提下,获得超抗原活性高的 SEC2 突变蛋白作为抗肿瘤候选药。根据肠毒素发挥抗肿瘤作用的机制,我们可以通过提高 SEC2 与 MCH II 分子或 TCR 的识别和亲和能力来增加超抗原活性<sup>[11]</sup>。但是,提高对 MCH II 分子的亲和性将会增加对 MCH II 阳性的非肿瘤细胞的杀伤。因此,对 SEC2 分子中参与 TCR 识别和结合的功能区域进行改造以增强超抗原活性是可行的方法。

王小刚等将 SEC2 中参与形成二硫环结构的



Cys93 和 Cys110 突变为 Ala 或 Ser, 结果显示突变蛋白的超抗原活性有明显下降, 同时对胰蛋白酶的敏感性增强, 说明二硫环结构对于 SEC2 保持其超抗原活性和稳定性起着重要作用<sup>[9]</sup>。Andersen 等利用噬菌体展示技术对一系列的 SEC3 突变蛋白进行筛选, 其二硫环内 102~106 位氨基酸分别被 WWP、WWT 和 WWH 取代, 获得 3 种突变蛋白。3 种突变蛋白对 TCR mVβ8.2 的亲合性提高了约 150 倍, 且伴随着 T 细胞的刺激能力明显增强<sup>[11]</sup>, 证明其 TCR 结合能力强度与 T 细胞刺激能力成正比关系。而 SEC2 和 SEC3 的氨基酸序列高度同源, 且二硫环结构内氨基酸序列完全相同<sup>[18]</sup>。因此, 我们假设对 SEC2 的 102~106 位氨基进行同样替换也可以提高 TCR 的结合能力, 进而提升 SEC2 的超抗原活性。

研究结果显示突变体 ST-1、ST-2 和 ST-3 的小鼠脾淋巴细胞刺激增殖活性较野生型 SEC2 显著增强, 暗示 SEC2 与 SEC3 可能具有相同的 TCR 结合位点, 对 SEC2 的 102~106 位氨基酸进行相同的替换也可提高 SEC2 的超抗原活性。3 种突变蛋白刺激小鼠 TCR mVβ8.2 基因的转录水平显著提高, 进一步证明改造后的氨基酸位点能显著提高突变蛋白对 TCR 的亲合能力, 验证了我们前面的假设。

与超抗原活性的显著提升相对应, 3 种突变蛋白体外抑制肿瘤生长活性也显著提高。同时, 3 种突变蛋白体外刺激小鼠淋巴细胞分泌 IL-2、IFN-γ 和 TNF-α 细胞因子的能力要显著高于野生型, 这也部分解释了突变蛋白在体外诱导了更强的肿瘤细胞生长抑制活性的原因<sup>[19-21]</sup>。ST-1、ST-2 和 ST-3 突变蛋白刺激更多的含有 mVβ8.2

侧链的 T 细胞活化, 并诱导产生更高水平的炎症性细胞因子的释放, 增强了超抗原的细胞因子效应, 进而提高了肿瘤细胞生长抑制能力。

此外, 我们利用动物致热模型检测了突变蛋白的休克毒性。研究发现, 尽管三者的超抗原活性都显著高于野生型 SEC2, 但只有 ST-2 突变蛋白引起的致热活性要显著高于野生型 SEC2; 而 ST-1 和 ST-3 突变蛋白的致热活性与野生型无显著性差异。该结果再一次说明了由金黄色葡萄球菌肠毒素诱导的超抗原活性和休克毒性之间并不完全关联, 两者在一定程度上是可以分开的<sup>[22]</sup>。关于 ST-2 突变蛋白增强的致热毒性, 我们推测, 一方面, ST-2 可能诱发了某些内源性致热细胞因子的增强表达, 进而直接或间接刺激神经致热中枢产生致热效应, 致使动物体温升高<sup>[23]</sup>; 另一方面, ST-2 蛋白的 WWT 氨基酸的替换可能引起 SEC2 分子构象的强烈改变, 使 MCH II 结合位点暴露, 增强了抗原提呈作用, 致使试验动物体内免疫排斥增强, 最终表现出致热活性升高的体征。

本研究通过基因工程手段构建了 3 种 SEC2 突变体 ST-1、ST-2 和 ST-3, 3 种突变体显示出增强的超抗原活性, 其体外刺激小鼠脾淋巴细胞增殖能力和促进小鼠 TCR mVβ8.2 基因转录的水平显著高于野生型 SEC2, 说明二硫环内部氨基酸残基对 SEC2 的超抗原活性具有重要作用, 也暗示改造后的突变蛋白对小鼠 TCR 亲和力的提高。另外, SEC2 突变蛋白的超抗原活性与致热毒性的强弱并不完全关联。以上研究结果为我们在实际应用中开发和筛选低毒高效的肠毒素超抗原抗肿瘤候选药物奠定了一定的理论基础。

## REFERENCES

- [1] White J, Fink PJ, Matis LA, et al. The V-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B of stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*, 1989, 56: 27–35.
- [2] Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, et al. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell*, 1990, 62: 1115–1121.
- [3] Herman A, Kappler J, Marrack P, et al. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol*, 1991, 9: 745–772.
- [4] Seth A, Stern L, Ottenhoff T, et al. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen *in vitro*. *Nature*, 1994, 369: 324–327.
- [5] Holzer U, Orlikowsky T, Zehre C, et al. T-cell stimulation and cytokine release induced by staphylococcal enterotoxin A (SEA) and the SEAD227A mutant. *Immunology*, 1997, 90: 74–80.
- [6] Dohlsten M, Sundstedt A, Björklund M, et al. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colo-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1993, 54: 482–488.
- [7] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*, 2000, 61(1): 1–10.
- [8] Chen TR, Hsiao MH, Chou CS, et al. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int J Food Microbiol*, 2001, 71(1): 63–70.
- [9] Wang XG, Xu MK, Cai YM, et al. Functional analysis of the disulphide loop mutant of staphylococcal enterotoxin C2. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 861–871.
- [10] Papageorgiou AC, Acharyal KR, Shapiro R. Crystal structure of the superantigen enterotoxin C2 from *Staphylococcus aureus* reveals a zinc-binding site. *Structure*, 1995, 3: 769–779.
- [11] Andersen PS, Geisler C, Buus S, et al. Role of the T cell receptor ligand affinity in T cell activation by bacterial superantigens. *J Biol Chem*, 2001, 276(36): 33452–33457.
- [12] Xu MK, Zhang CG, Zhou YF, et al. Gene cloning, soluble expression and bioactivity analysis of staphylococcal enterotoxin C2. *Prog Biochem Biophys*, 2005, 32(3): 275–281 (in Chinese). 徐明恺, 张成刚, 周亚凤, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 的基因克隆表达及其生物学活性. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(3): 275–281.
- [13] Xu MK, Wang XG, Cai YM, et al. An engineered superantigen SEC2 exhibits promising antitumor activity and low toxicity. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60: 705–713.
- [14] Tomasello E, Olcese L, Vely F, et al. Gene structure, expression pattern, and biological activity of mouse killer cell activating receptor-associated protein (KARAP)/DAP-12. *J Biol Chem*, 1998, 273(51): 34115–34119.
- [15] Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 399–415.
- [16] Kalland T, Hedlund G, Dohlsten M, et al. Staphylococcal enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 174: 81–92.
- [17] Chen TZ. The exploitation of HAS and its application in tumor therapy. *Prog Microbiol Immunol*, 2001, 29: 63–69 (in Chinese). 陈廷祚. 高聚生研发历程述评及其用于癌症治疗的理论基础. *微生物学免疫学进展*, 2001, 29(2): 63–69.
- [18] Leder L, Llera A, Lavoie PM, et al. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor  $\beta$  chain and major histocompatibility complex class II. *J Exp Med*, 1998, 187(6): 823–833.
- [19] Dohlsten M, Sundstedt A, Björklund M, et al. Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1993, 54(3): 482–488.

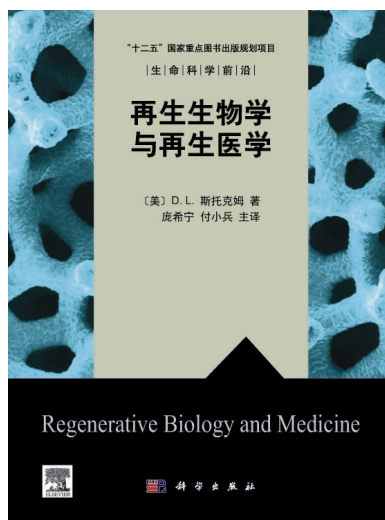
- [20] Chen TZ. Research progress of *Staphylococcus aureus* enterotoxin, superantigen and anti-tumor effect. *Prog Microbiol Immunol*, 2005, 33(3): 66–73 (in Chinese).  
陈廷祚. 金黄色葡萄球菌肠毒素、超级抗原及其抗肿瘤作用的研究进展. *微生物学免疫学进展*, 2005, 33(3): 66–73.
- [21] Litton MJ, Dohlsten M, Lando PA, et al. Antibody-targeted superantigen therapy induces tumor-infiltrating lymphocytes, excessive cytokine production, and apoptosis in human colon carcinoma. *Eur J Immunol*, 1996, 26(1): 1–9.
- [22] Wang XG, Zhang HW, Xu MK, et al. Biological characterization of the zinc site coordinating histidine residues of staphylococcal enterotoxin C2. *Microbiology*, 2009, 155: 680–686.
- [23] Grossman D, Lamphear JG, Mollick JA, et al. Dual roles for class II major histocompatibility complex molecules in staphylococcal enterotoxin-induced cytokine production and *in vivo* toxicity. *Infect Immun*, 1992, 60(12): 5190–5196.

(本文责编 郝丽芳)



## 科学出版社书讯

### 再生生物学与再生医学



**作者:** (美) 大卫·L.斯托克姆著; 庞希宁 (中国医科大学), 付小兵译

**ISBN:** 9787030367808

**定价:** 168

**开本:** 16 **装帧:** 平装 **页码:** 608

**初版时间:** 3/1/2013

**专业分类:** 01R-4301-0101

**读者对象:** 适合生物学、生物工程学、药学、细胞生物学及医学系的研究生和高年级本科生, 以及学术或临床型医学研究人员参考阅读。

#### 内容介绍

再生生物学和再生医学研究涵盖了组织、器官、肢体再生等领域, 包含了细胞移植、组织工程及残余组织的再生诱导等内容, 旨在探寻再生的机制并应用于恢复疾病后组织结构和功能的治疗策略。《再生生物学与再生医学》是第一本再生生物学与再生医学教材, 书中将再生生物学与再生医学整合, 内容系统性、条理性强, 为分子生物学和生命科学提供了一个全新的视角, 具有较高的参考价值。本书从多个角度向读者全面介绍了再生生物学和再生医学的进展。第 1 章概括介绍了再生生物学和再生医学这门学科。第 2 章介绍纤维化这一创伤或疾病导致的组织损伤反应。第 3~12 章介绍再生生物学和相应的特定组织的再生医学。第 13 章详细介绍了有关成体干细胞分化潜能的研究。第 14 章讨论了附肢再生的生物学特性, 介绍了两栖类和哺乳动物的附肢再生的研究。由于生物伦理学对于再生生物学研究的重要性, 所以第 15 章综述了生物学和生物伦理学所面临的问题, 以及发展完善再生医学所面临的挑战。