

• 生物技术与方法 •

抗 GPC3 单链抗体细菌外膜囊泡的制备及其肝细胞癌靶向性的鉴定

杨邦亚^{1,2}, 邓雨霏^{1,2}, 马官荣^{1,2}, 方廖琼¹, 白晋^{1,2*}

1 重庆医科大学 生物医学工程学院 超声医学工程国家重点实验室, 重庆 400016

2 重庆医科大学 重庆市生物医学工程学重点实验室, 重庆 400016

杨邦亚, 邓雨霏, 马官荣, 方廖琼, 白晋. 抗 GPC3 单链抗体细菌外膜囊泡的制备及其肝细胞癌靶向性的鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2258-2269.

YANG Bangya, DENG Yufei, MA Guanrong, FANG Liaoqiong, BAI Jin. Preparation of bacterial outer membrane vesicles with anti-GPC3 single-chain antibody and identification of their targeting effects on hepatocellular carcinoma[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2258-2269.

摘要: 本研究旨在制备抗磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3)单链抗体的细菌外膜囊泡 (outer membrane vesicles, OMVs), 分析其在体内外对 Hep G2 肝癌细胞及组织的靶向效果。通过合成 *Hbp-hGC 33-scFv* 基因并连接至 pET28a 表达载体, 构建重组表达质粒 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv; 采用免疫印迹法检测原核表达的融合蛋白 Hbp-hGC 33-scFv, 确定其最适诱导条件; 采用超滤浓缩法收集重组表达菌株分泌的外膜囊泡(Hbp-hGC 33-OMVs)并进行表征; 采用免疫电镜技术分析 Hbp-hGC 33-scFv 在细菌及 Hbp-hGC 33-OMVs 的定位情况; 采用免疫荧光法观察其与 Hep G2 细胞的结合效果。建立 Hep G2 荷瘤小鼠模型, 通过活体荧光成像系统观察 Hbp-hGC 33-OMVs 在小鼠肿瘤部位的靶向滞留情况。结果显示, 融合蛋白的实际分子量为 175.3 kDa, 最佳诱导条件为在 $OD_{600}=0.5$ 时加入 0.5 mmol/L IPTG 于 16 °C 低温诱导过夜。Hbp-hGC 33-OMVs 平均粒径为(112.3±4.6) nm, 具有不规则球形结构, 表达外膜囊泡标记蛋白 OmpC、OmpA 和融合蛋白 Hbp-hGC 33-scFv。与野生型 wtOMVs 相比, Hbp-hGC 33-OMVs 组对 Hep G2 细胞的结合效果更强($P=0.008$)。活体成像显示, Hbp-hGC 33-OMVs 组能快速精准地靶向肿瘤部位。抗 GPC3 单链抗体细菌外膜囊泡的成功制备为肝细胞癌的特异性靶向治疗奠定了实验基础。

关键词: 磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3; 单链抗体; 细菌外膜囊泡; 肝细胞癌; 靶向治疗

*Corresponding author. E-mail: sajinbai@cqmu.edu.cn

Received: 2024-01-24; Accepted: 2024-03-25; Published online: 2024-03-28

Preparation of bacterial outer membrane vesicles with anti-GPC3 single-chain antibody and identification of their targeting effects on hepatocellular carcinoma

YANG Bangya^{1,2}, DENG Yufei^{1,2}, MA Guanrong^{1,2}, FANG Liaoqiong¹, BAI Jin^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Ultrasound in Medicine and Engineering, College of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Chongqing Key Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This study aims to prepare bacterial outer membrane vesicles (OMVs) with anti-glypican-3 (GPC3) single-chain antibody and analyze their targeting effects on Hep G2 hepatocellular carcinoma (HCC) cells and tissue. The recombinant plasmid pET28a-Hbp-hGC 33-scFv was constructed by ligating *Hbp-hGC 33-scFv* to pET28a. Western blotting was employed to determine the prokaryotic expression of the fusion protein Hbp-hGC 33-scFv, on the basis of which the optimal induction conditions were determined. Hbp-hGC 33-OMVs secreted from the recombinant expressing strains were collected by ultrafiltration concentration and then characterized. The localization of Hbp-hGC 33-scFv in bacteria and Hbp-hGC 33-OMVs was analyzed by immune electron microscopy. The binding of Hbp-hGC 33-scFv to Hep G2 cells was observed by immunofluorescence. The Hep G2 tumor-bearing mouse model was established, and the targeted retention of Hbp-hGC 33-OMVs in the tumor site of mice was observed by a fluorescence imaging system *in vivo*. The results showed that the actual molecular weight of the fusion protein was 175.3 kDa, and the optimal induction conditions were as follows: $OD_{600}=0.5$, IPTG added at a final concentration of 0.5 mmol/L, and overnight induction at 16 °C. The prepared Hbp-hGC 33-OMVs were irregular spherical structures with an average particle size of (112.3 ± 4.6) nm, expressing OmpC, OmpA, and the fusion protein Hbp-hGC 33-scFv. The Hbp-hGC 33-OMVs prepared in this study demonstrated stronger ability of binding to Hep G2 cells than the wild-type OMVs ($P=0.008$). All the data indicated that Hbp-hGC 33-OMVs with anti-GPC3 single-chain antibody were successfully prepared and could be used for research on the targeted therapy of hepatocellular carcinoma.

Keywords: glypican-3 (GPC3); single-chain fragment variable (scFv); outer membrane vesicles (OMVs); hepatocellular carcinoma (HCC); targeted therapy

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率在全球范围内呈上升趋势。尽管近年来治疗手段有所改进,但肝细胞癌的预后仍然较差^[1-2]。磷脂酰肌

醇蛋白聚糖 3 (glypican-3, GPC3)是一种在肝细胞癌中高表达的糖蛋白,具有促进肿瘤生长、侵袭和转移的作用。越来越多的研究表明, GPC3 可以作为肝细胞癌的潜在治疗靶点^[3-5]。

抗 GPC3 抗体 hGC 33 是一种人源单克隆抗体, 它可以特异性地识别 GPC3 的 C 端区域^[6]。研究显示^[7-8], 将 hGC 33 单抗呈递于聚合物纳米颗粒或真核细胞纳米囊泡外部, 这些纳米载体可以有选择性地结合阳性表达 GPC3 的肝癌细胞, 实现对肿瘤细胞的靶向效应, 起到有效的肿瘤靶向治疗及免疫治疗作用。与单克隆抗体相比, 单链抗体(single-chain fragment variable, scFv)由抗体重链可变区(variable region of the heavy chain, VH)和轻链可变区(variable region of the light chain, VL)经柔性肽(linker)连接而成, 其结构稳定、分子片段小, 可以与功能性蛋白融合表达, 保留着识别结合特异性肿瘤相关抗原的重要功能^[9]。

外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是细菌释放的一种纳米颗粒, 其直径在 20–250 nm 之间^[10]。这些囊泡携带了亲本细菌的周质、外膜蛋白以及重要的遗传物质, 因此与亲本细菌在功能上具有相似性^[11-12]。有研究表明^[13], 细菌能够在肿瘤缺氧区域滞留和繁殖, OMVs 也展现出类似的肿瘤靶区滞留效应。值得注意的是, OMVs 是不可复制的, 并且这种滞留效应是非特异性的。为了进一步探讨 OMVs 在肿瘤治疗中的应用, 本研究采用基因工程技术, 在原核系统中表达了融合蛋白 Hbp-hGC 33-scFv, 分离制备了呈递 Hbp-hGC 33-scFv 的外膜囊泡 Hbp-hGC 33-OMVs, 并探讨 Hbp-hGC 33-OMVs 对肝细胞癌 Hep G2 细胞的特异性靶向增强作用, 以及在肝细胞癌荷瘤小鼠模型中的潜在应用。期望这些研究能为肝细胞癌的精准靶向肿瘤免疫治疗提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

DMEM、胎牛血清、0.25%胰酶、抗 OmpC

多克隆抗体(ThermoFisher), 重组抗 GAPDH 抗体、Anti-Myc tag 抗体和山羊抗兔 IgG H&L (Abcam), 胶体金标记的羊抗兔 IgG (10 nm) (北京索莱宝科技有限公司), Myc 兔单抗(上海碧云天生物科技有限公司), 抗 OmpA 多克隆抗体(上海起发实验试剂有限公司)。

荧光多模式酶标仪(Tecan), 蛋白垂直电泳仪(北京韦克斯科技有限公司), 低温高速离心机(Eppendorf), 超速冷冻离心机(Beckman), Amicon ultra-15 100 kDa 超滤管(Millipore), 透射电子显微镜(Hitachi), NanoSight 纳米颗粒跟踪分析仪(Malvern), 小动物活体荧光成像系统(Berthold), 正倒置一体荧光显微镜(北京深蓝云生物科技有限公司)。

1.2 细菌和细胞培养

大肠杆菌 BL21(DE3)菌株购自武汉金开瑞生物技术有限公司。将 BL21(DE3)菌株接种于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素、0.2%葡萄糖的 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养。人源肝细胞癌 Hep G2 细胞系购自中国科学院细胞库, 使用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基, 在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞培养箱中培养。

1.3 实验小鼠

雌性 Balb/C 裸鼠, 6 周龄, 购自重庆医科大学实验动物中心。所有实验动物均饲养于相同的标准实验环境中, 温度、湿度适宜, 实验动物均在饲养 1 周后进行实验操作。动物实验方案均遵守重庆医科大学医学研究伦理委员会规定, 并获得伦理委员会批准(批准号: 2022161)。

1.4 原核表达质粒的构建及鉴定

在 NCBI 数据库中检索大肠杆菌血红蛋白酶(*Escherichia coli* autotransporter hemoglobin protease, Hbp)全长基因序列。通过文献[14]检索得到 hGC 33 的可变区序列, 轻链和重链可变区

序列经柔性肽 linker (GGGGS)₃ 连接, 并在 C 端引入 Myc-tag, hGC 33-scFv/Myc 单链抗体序列 (1-243 aa) 插入到 Hbp 的信号序列及乘客域序列之间, 最终得到 *Hbp-hGC 33-scFv/Myc* 融合基因序列。在 5'端和 3'端分别引入 *Xho* I 和 *Nco* I 酶切位点, 将合成基因片段插入 pET28a 表达质粒, 构建重组质粒 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv, 以双酶切法进行鉴定。重组质粒合成和测序分别由武汉金开瑞生物技术有限公司和生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.5 Hbp-hGC 33-scFv 原核表达

将含有 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞涂布于 LB 固体培养基(含 50 μg/mL 卡那霉素), 37 °C 过夜培养。挑取 4 个单克隆菌落分别接种于 10 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素和 0.2% 葡萄糖 LB 液体培养基中, 经不同时间点(2、4、6、8 h)扩增培养后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导剂, 16 °C 诱导 12 h, 诱导 Hbp-hGC 33-scFv 表达。以诱导的含 pET28a 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)作为蛋白表达的载体对照, Western blotting 检测 Hbp-hGC 33-scFv 表达情况。

1.6 Hbp-hGC 33-scFv 培养条件优化

诱导温度优化: 将含有 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)单克隆菌落接种于含 50 μg/mL 卡那霉素和 0.2% 葡萄糖的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 14 h。取 0.5 mL 细菌种子液接种于 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至菌体 $OD_{600}=0.5$ 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 诱导温度设置为 37、30、23、16 °C 诱导 Hbp-hGC 33-scFv 表达, 诱导 12 h。诱导结束后, 8 000×g、室温离心 5 min, 收集菌体进行十二烷基硫酸钠

(sodium dodecyl sulfate, SDS)裂解液裂解, 使用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒进行蛋白浓度检测, Western blotting 分析 Hbp-hGC 33-scFv 的最适诱导温度。

IPTG 诱导浓度优化: 将含有 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)单克隆菌落接种于含 50 μg/mL 卡那霉素和 0.2% 葡萄糖的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 14 h。取 0.5 mL 种子液接种于 10 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至菌体 $OD_{600}=0.5$ 时, 将培养温度降低至 16 °C, 同时加入不同终浓度(0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L)的 IPTG 诱导剂, 连续诱导 12 h。诱导结束后, 8 000×g、室温离心 5 min, 收集菌体进行 SDS 裂解液裂解后进行 Western blotting 分析。

1.7 Hbp-hGC 33-OMVs 的获取

采用差速离心法联合超滤浓缩法分离纯化 Hbp-hGC 33-OMVs^[15]。将含有 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)在 LB 培养基中培养菌体至 $OD_{600}=0.5$, 加入 0.5 mmol/L IPTG 低温 16 °C 过夜诱导。菌体培养液经 4 °C、5 000×g 离心 15 min, 收集离心后上清液依次通过 0.45、0.25 μm 滤膜进行过滤, 之后使用 100 kDa 超滤离心管对滤液进行超滤浓缩。将浓缩的上清液于 4 °C、150 000×g 超速离心 3 h。沉淀物再重复离心洗涤 1 次, 最后用 PBS 重悬沉淀于 -80 °C 保存备用。

1.8 Hbp-hGC 33-OMVs 表征

使用透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察 Hbp-hGC 33-OMVs 的形态和大小。采用纳米粒度仪(nano-particle size analyzer, NTA)对 Hbp-hGC 33-OMVs 粒径进行检测。采用 Western blotting 检测外膜囊泡标志蛋白 OmpA、OmpC 及 Myc 标记的 Hbp-hGC 33-scFv 的表达。

1.9 免疫金电镜标记的细菌细胞和 Hbp-hGC 33-OMVs

将含有 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)在 LB 培养基中培养菌体至 $OD_{600}=0.5$, 加入 0.5 mmol/L IPTG 低温 16 °C 过夜诱导。先以 2 000 r/min、4 °C 离心 5 min 收集细菌沉淀, 使用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 转移到新的 1.5 mL 离心管。再 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 去除上清液。细菌沉淀使用 4%戊二醛固定 24 h 后进行切片。镍网切片处理: 先使用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 使用 1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液封闭 2 h, 接着使用抗 Myc 抗体(1:500)稀释液进行孵育, 并用 10 nm 胶体金标记的羊抗兔 IgG (1:100)进行检测。免疫金标记的细菌细胞在透射电子显微镜上成像。

Hbp-hGC 33-OMVs 在 4 °C、150 000×g、3 h 条件下离心 2 次后, 采用 3%半凝固琼脂包埋新鲜制备的囊泡沉淀并进行切片, 镍网切片的免疫处理方法同上。

1.10 免疫荧光检测 OMVs 体外结合效应

使用 PKH26 外泌体绿色荧光标记染料对野生型外膜囊泡(wild-type outer membrane vesicles, wtOMVs)、Hbp-hGC 33-OMVs 进行染色, 具体染色步骤参照其说明书。采用 PBS 重悬已标记的 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs, -80 °C 避光储存。

胰酶消化人肝癌细胞 Hep G2, 以 2×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 分为 2 组, 每组 3 个孔, 分别是对照组 wtOMVs 及实验组 Hbp-hGC 33-OMVs, 37 °C 培养 24 h 后向 2 组中各加入含有标记完成的 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs 的 DMEM 完全培养基, 共培养 24 h; 弃去培养基, 加入 1 mL/孔的 4%多聚甲醛固定 10 min。采用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-

phenylindole, DAPI)对细胞核进行染色, 荧光倒置显微镜观察 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs 与 Hep G2 细胞的结合情况。

1.11 OMVs 在荷瘤小鼠模型中的靶向性评估

使用 Cy7 荧光染料对 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs 进行染色, 具体染色步骤参见说明书。标记后的 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs 采用 PBS 重悬, 于 -80 °C 避光保存备用。

在 7 周龄的 Balb/C 裸鼠背部皮下注射 100 μ L 的 5×10^5 个/mL 的 Hep G2 细胞, 2 周后待肿瘤体积约为 100 mm³, 提示 Hep G2 荷瘤小鼠模型建立成功。将标记后的 wtOMVs、Hbp-hGC 33-OMVs 经尾静脉注射到荷瘤小鼠体内。在注射前、注射后 1、3、6、12 h 等不同时间点将小鼠放入小动物活体成像仪中进行荧光成像观察。

1.12 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

按 1:4 将定量的蛋白样品与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(SDS-PAGE sample loading buffer, 5×)混匀, 沸水变性 8 min。10% SDS-PAGE 凝胶分离, 蛋白量每孔 10 μ g, 电泳条件为 80 V 20 min 和 120 V 40 min, 进行考马斯亮蓝染色或转膜至 0.45 μ m 聚偏二氟乙烯(hydrophobic polyvinylidene fluoride, PVDF)印迹膜进行 Western blotting 分析, 转膜条件为 300 mA 3 h。使用 5% BSA 封闭液封闭 PVDF 印迹膜 1 h, 然后分别使用 Myc (1:5 000)、GAPDH (1:20 000)、OmpC (1:2 000)、OmpA (1:50 000)一抗孵育过夜。然后使用羊抗兔 IgG H&L (1:10 000)二抗稀释液室温孵育 2 h, 最后超敏增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液显影拍照。

1.13 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.0 统计软件, 通过单因素方差分析比较组间差异。实验结果以均值 \pm

标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 载体的构建

Hbp-hGC 33-scFv 由 4 901 bp 的核苷酸序列编码, hGC 33-scFv 序列由 hGC 33 的重链可变区 VHk 和轻链可变区 VL_a 经连接肽(linker)串联

组成, 在 hGC 33-scFv 和 Hbp 乘客域(passenger domain)两片段之间插入 Myc 标签序列(EQKLISEEDL)。这一策略旨在便于后续实现融合蛋白在宿主细胞中的有效诱导表达和准确鉴定。将合成的 *Hbp-hGC 33-scFv/Myc* 编码序列插入到 pET28a 表达载体酶切位点 *Nco* I 和 *Xho* I 之间, 构建了重组表达载体 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv (图 1)。

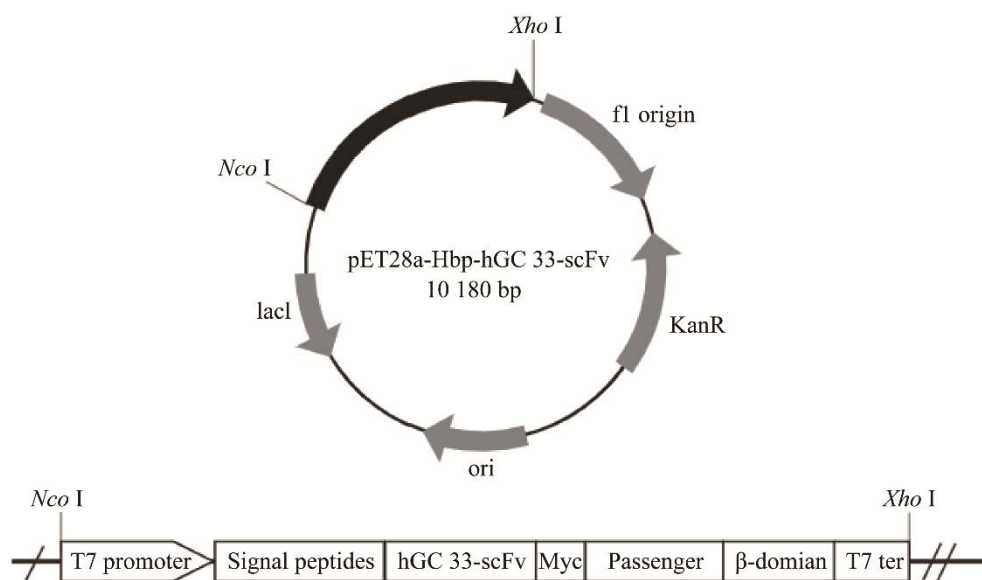


图 1 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 质粒构建

Figure 1 Construction of pET28a-Hbp-HGC 33-scFv plasmid.

2.2 Hbp-hGC 33-scFv 的原核表达

四株基因工程菌经 2、4、6、8 h 扩增培养, 再加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达后, Western blotting 结果显示(图 2), 目的蛋白为带有 Myc 标签的 Hbp-hGC 33-scFv 蛋白, 约为 175.3 kDa, 与理论分子量大小相符, 表明重组蛋白 Hbp-hGC 33-scFv 原核表达诱导成功。

2.3 Hbp-hGC 33-scFv 最适诱导表达条件的优化

离心收集 37、30、23、16 °C 诱导 12 h 的基因工程菌菌体, 菌体裂解后蛋白上清液经 Western

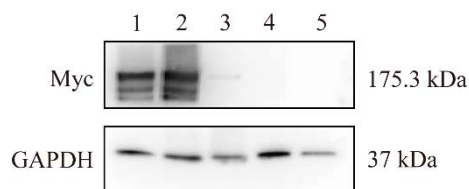


图 2 Hbp-hGC 33-scFv 原核表达

Figure 2 Bacterial expression of Hbp-hGC 33-scFv protein. Expression level analysis of Hbp-hGC 33-scFv of *Escherichia coli* with various bacterial culture time (2–8 h) by Western blotting. Lane 1: 2 h; Lane 2: 4 h ($OD_{600}=0.5$); Lane 3: 6 h; Lane 4: 8 h; Lane 5: Negative control.

blotting 分析, 与 37 °C 诱导 12 h 相比, 30、23、16 °C 诱导 12 h 时, Hbp-hGC 33-scFv 蛋白表达量明显增加(图 3A)。

当细菌培养至 $OD_{600}=0.5$ 时, 加入不同浓度的 IPTG 诱导剂。Western blotting 结果显示, 融合蛋白 Hbp-hGC 33-scFv 均表达, 这提示 IPTG 具备高效的诱导能力。考虑到过高浓度的 IPTG 对细菌具有毒性作用, 我们将 0.5 mmol/L 确定为 Hbp-hGC 33-scFv 后续实验的诱导浓度(图 3B)。

2.4 Hbp-hGC 33-scFv 的细胞外膜显示

利用 Myc 兔单克隆抗体作为一抗, 并在第二抗体上标记了 10 nm 胶体金颗粒, TEM 观察 Hbp-hGC 33-scFv 在大肠杆菌中的亚细胞定位。横切面结果如图 4 所示。相对于对照组诱导含 pET28a 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)(图 4B), 实验组含 pET28a-Hbp-hGC 33-scFv 载体的大肠杆菌 BL21(DE3)的细胞外膜上分布着 10 nm 胶体

金颗粒(图 4A)。

2.5 Hbp-hGC 33-OMVs 表征

对 Hbp-hGC 33-OMVs 进行了特征鉴定, TEM 结果(图 5A)显示, Hbp-hGC 33-OMVs 呈纳米级不规则圆形结构。NTA 结果(图 5B)显示, Hbp-hGC 33-OMVs 的平均粒径为 (112.3 ± 4.6) nm, 平均浓度为 $(1.16 \times 10^9 \pm 3.98 \times 10^7)$ particles/mL。SDS-PAGE 和 Western blotting 结果显示(图 5C、5D), 外膜囊泡标记蛋白 OmpA、OmpC 均表达, 分子量分别为 35 kDa 和 38 kDa。且检测到 Myc 抗体标记的融合蛋白 Hbp-hGC 33-scFv 在 Hbp-hGC 33-OMVs 中也表达, 与预期结果一致。最后, 免疫电镜结果(图 5E)显示, 标记 Hbp-hGC 33-scFv 的第二抗体 10 nm 胶体金颗粒呈递于 Hbp-hGC 33-OMVs 外膜表面。这些结果提示 Hbp-hGC 33-OMVs 已被成功分离提取。

2.6 OMVs 对 Hep G2 细胞的体外结合效应

将红色荧光标记的 Hbp-hGC 33-OMVs、wtOMVs 与 Hep G2 作用 24 h 后, 结果如图 6 所示, 2 组囊泡均对 Hep G2 细胞有靶向性, 定位于细胞质及细胞膜; 相较于 wtOMVs 组, Hbp-hGC 33-OMVs 组对 Hep G2 细胞的靶向性结合更强($P < 0.05$)。

2.7 活体荧光成像验证 OMVs 的体内靶向性

选取成瘤效果好的 Hep G2 荷瘤小鼠, 经尾静脉分组分别注射 200 μ L 的 Hbp-hGC 33-OMVs、wtOMVs, 以未注射前的荷瘤小鼠作为对照。使用小动物活体成像系统分别进行活体成像, 结果如图 7 所示。与 wtOMVs 组相比, 注射后 1 h, Hbp-hGC 33-OMVs 组能快速准确定位到小鼠皮下肿瘤部位。随着时间增加, 肿瘤靶区的荧光强度降低。

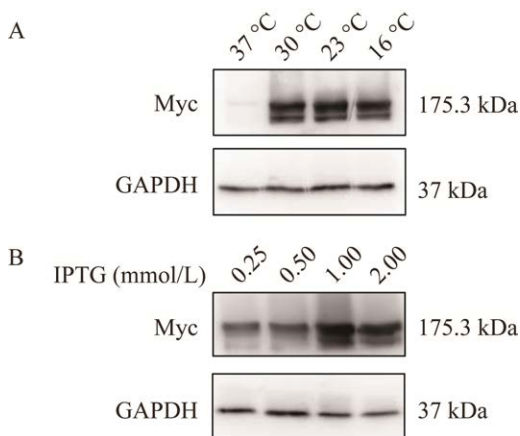


图 3 Hbp-hGC 33-scFv 诱导表达条件优化

Figure 3 Optimization of induction expression conditions for Hbp-hGC 33-scFv protein. A: Optimization of an optimal induction temperature (16–37 °C) for Hbp-hGC 33-scFv protein. B: Optimization of an optimal IPTG concentration (0.25–2.00 mmol/L) for Hbp-hGC 33-scFv protein.

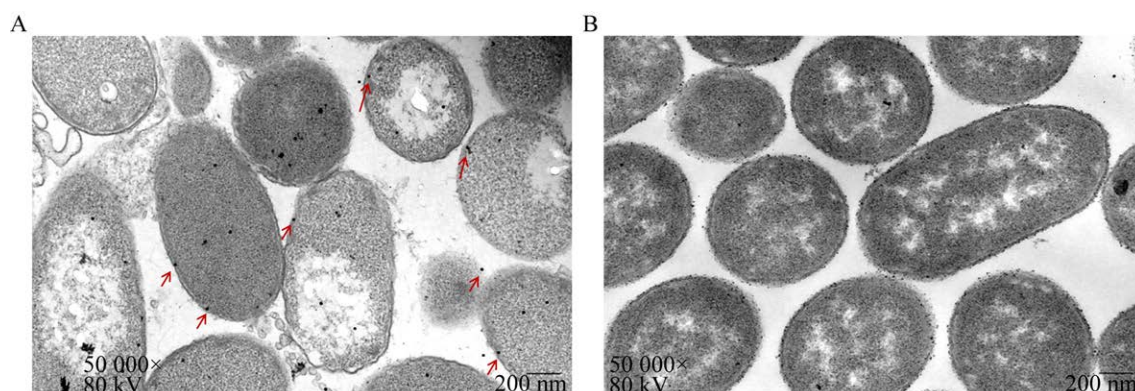


图 4 Hbp-hGC 33-scFv 亚细胞定位的免疫电镜分析(横切面)

Figure 4 Immuno-electron microscope analysis of the subcellular localization of Hbp-hGC 33-scFv (cross section). A: Positive clones after induction with 0.5 mmol/L IPTG at 16 °C for 12 h. B: Negative group. Arrows indicate 10 nm colloidal gold particles. Scale bar: 200 nm.

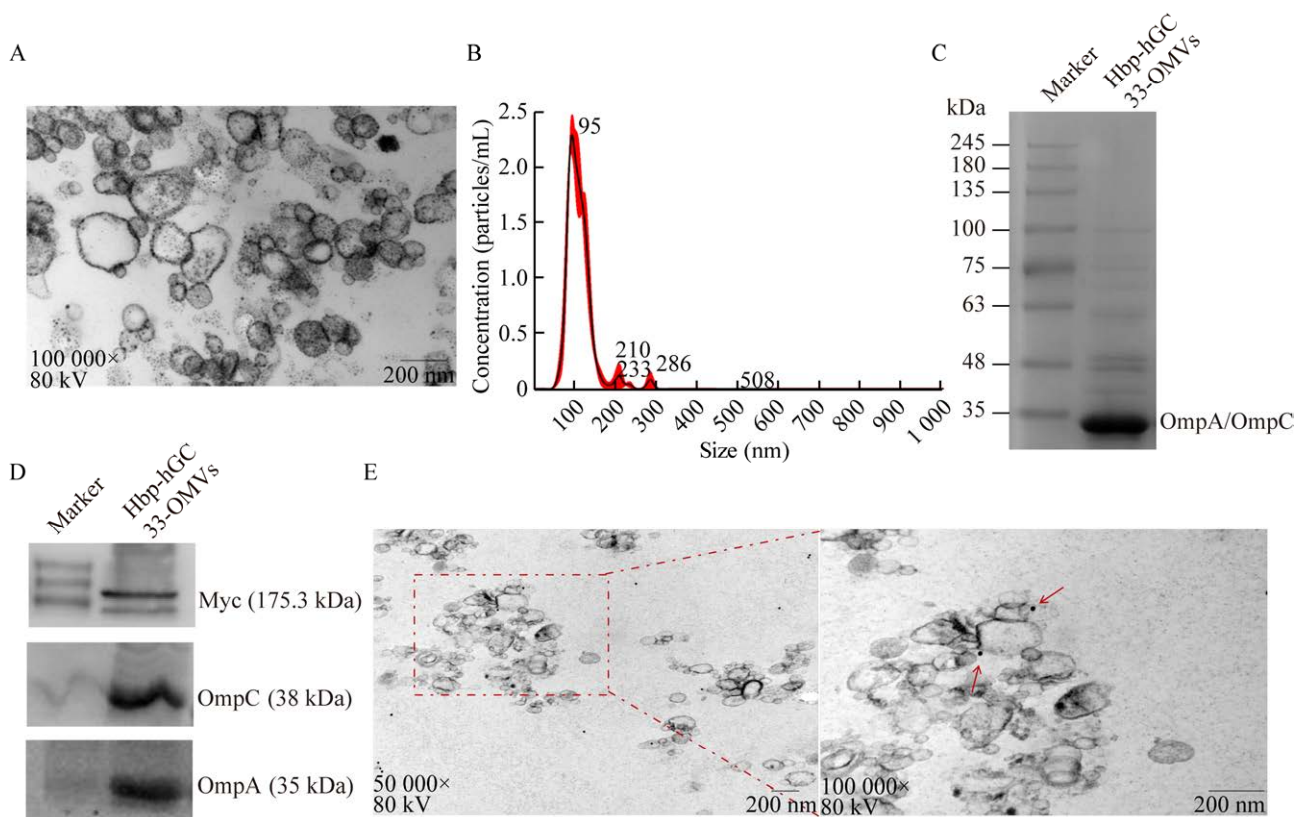


图 5 Hbp-hGC 33-OMVs 表征

Figure 5 Characterization of the Hbp-hGC 33-OMVs. A: Transmission electron microscope analysis of Hbp-hGC 33-OMVs. B: Nano-particle size distribution of Hbp-hGC 33-OMVs. C: Detection of outer membrane marker proteins (OmpA and OmpC) in Hbp-hGC 33-OMVs by SDS-PAGE. D: Western blotting to detect the expression of OmpA and OmpC in Hbp-hGC 33-OMVs. E: Expression of Hbp-hGC 33-scFv in Hbp-hGC 33-OMVs by immuno-electron microscope. Arrows point to 10 nm colloidal gold particles. Scale bar: 200 nm.

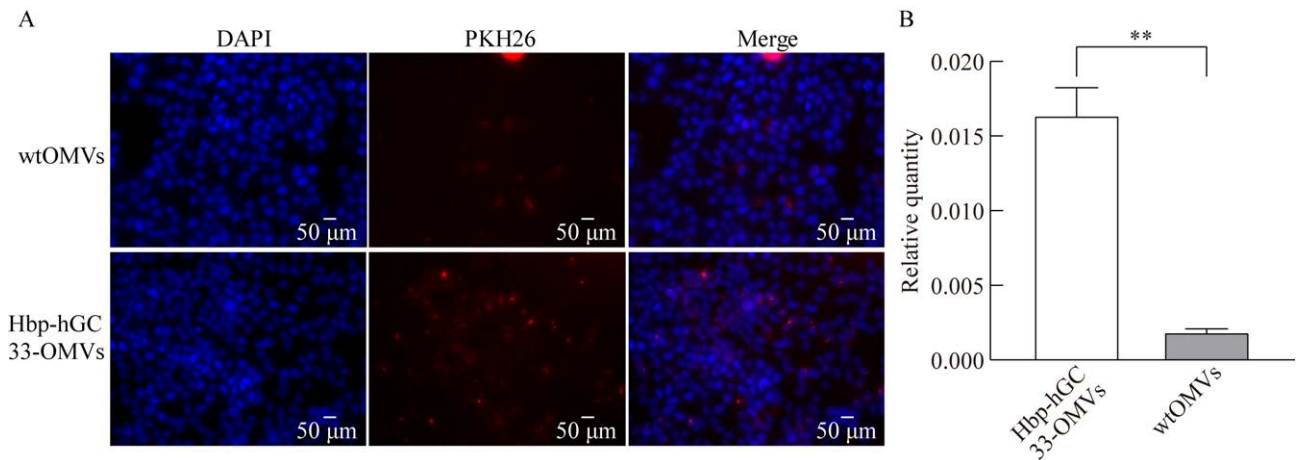


图 6 OMVs 对 Hep G2 细胞靶向结合的荧光实验分析

Figure 6 Fluorescence assay analysis of targeted binding by OMVs on Hep G2 cells. A: Observation on the binding of Hep G2 cells with wtOMVs and Hbp-hGC 33-OMVs. B: Analysis of the targeting binding efficiency of wtOMVs and Hbp-hGC 33-OMVs to Hep G2 cells. Hbp-hGC 33-OMVs have significantly enhanced targeting ability to Hep G2 cells compared with wtOMVs (**: $P < 0.05$). Red fluorescence indicates PKH26-labelled wtOMVs/Hbp-hGC 33-OMVs. Scale bar: 50 μm .

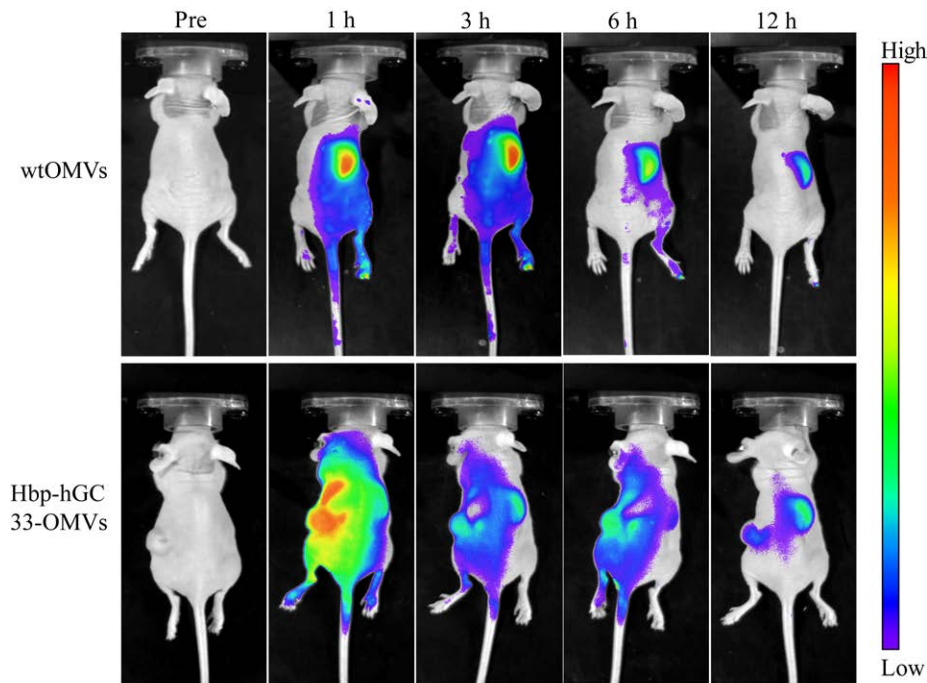


图 7 注射 OMVs 后小鼠活体荧光成像

Figure 7 Fluorescence imaging of mice after injection of OMVs *in vivo*.

3 讨论与结论

革兰氏阴性细菌衍生的外膜囊泡具有天然的抗肿瘤效应和不可自我复制等特点,因此

用于抗肿瘤免疫治疗研究,能够有效地抑制肿瘤生长^[13,16]。然而,由于 OMVs 是纳米级囊泡小体,它们可能会随血液循环进入其他健康的器官组织,对机体产生潜在危害^[10]。肝细胞

癌是一种病变速度快、患者死亡率高的恶性肿瘤疾病^[17]。GPC3 作为肝细胞癌的早期诊断和肿瘤特异性标志物,已经有多项研究发现某些抗体分子(如 hGC 33、HN3、YP7、HS20 等)可以识别并结合 GPC3,实现 HCC 的肿瘤免疫治疗^[18-20]。其中,抗 GPC3 抗体 hGC 33 已经完成了临床试验,展现出更安全、高效的治疗效果^[6,21]。然而,全长单克隆抗体的制备过程较为复杂,而单链抗体则具有制备过程简单、表达成本低廉的优势,并且具有与全长抗体相同的抗原亲和力^[9]。

研究者们常将大肠杆菌作为工程化外膜囊泡的表达载体,成功制备了多种功能性外膜囊泡用于实验研究^[22-23]。本研究将筛选的 *Hbp-hGC 33-scFv* 基因片段克隆至 pET28a 载体,构建了重组载体 pET28a-*Hbp-hGC 33-scFv*。利用 Myc 标签融合表达策略,成功进行了 *Hbp-hGC 33-scFv* 原核表达及最适诱导表达条件优化。Western blotting 结果表明, *Hbp-hGC 33-scFv* 在大肠杆菌和 *Hbp-hGC 33-OMVs* 中蛋白分子量为 175.3 kDa。由于细菌数量、诱导温度和 IPTG 浓度等是融合蛋白表达的重要影响因素^[24-26],为了提高 *Hbp-hGC 33-scFv* 的表达量,本研究对诱导温度和 IPTG 浓度进行了优化。实验结果表明,37 °C 时, *Hbp-hGC 33-scFv* 表达量低,30、23、16 °C 等温度下, *Hbp-hGC 33-scFv* 的原核表达量增加。考虑到低温状态下异源蛋白正确折叠率高,确定为诱导最适温度 16 °C。随后,在探究不同 IPTG 浓度对 *Hbp-hGC 33-scFv* 的诱导表达效果的影响时,除了直观的图像数据分析外,还深入开展了条带灰度值的统计学分析,灰度值分析结果显示,各浓度间的表达无显著统计学差异 ($P>0.05$)。然而,从图 3B 可以观察到 1.0 mmol/L 的浓度具有更高的诱导效率。考虑到 IPTG 对细菌的潜在毒性作用,我们当前选择了 0.5 mmol/L 作为实验研究的标准浓度^[27]。后续为进一步提

升研究的准确性和可靠性,我们将设计更为严谨的实验方案,进行更为详尽的数据分析,并广泛参考相关文献,以更全面地评估 IPTG 浓度对重组蛋白表达的影响。

抗 GPC3 单链抗体 hGC 33-scFv 在 OMVs 的外膜表面呈递对于肝细胞癌的靶向免疫治疗研究具有重要意义。免疫电镜技术是异源蛋白细胞外膜表达的经典检测方法之一^[28]。此技术利用电子显微镜观察第二抗体标记的胶体金颗粒位置,以此反映异源蛋白在细胞或囊泡中的定位,其优点在于操作简便、观察直观且成本较低。我们利用此方法对大肠杆菌及其衍生的 *Hbp-hGC 33-OMVs* 进行了 *Hbp-hGC 33-scFv* 的定位分析,并确认 *Hbp-hGC 33-scFv* 成功地加载到了大肠杆菌及 *Hbp-hGC 33-OMVs* 的外膜表面。这种加载方式是由自转运蛋白 Hbp 实现的。Hbp 由信号肽、分泌乘客结构域和 β -domain 结构域等部分组成,其 N 端的信号肽负责跨细胞内膜的易位,中心分泌乘客域作为蛋白质的功能部分,而 C 端的 β -domain 结构域则插入细胞外膜,促进乘客蛋白到细菌表面或介质中的易位。由于其相对简单的分泌机制和灵活的运输能力, Hbp 被广泛应用于融合蛋白的高效表达和正确折叠等方面^[29-30]。

本研究利用超滤浓缩技术制备了 *Hbp-hGC 33-OMVs*,作为肝细胞癌靶向治疗的载体。为了验证其靶向效应,我们采用免疫荧光实验和小动物活体成像技术进行了鉴定。在免疫荧光实验中,与 wtOMVs 相比,我们制备的 *Hbp-hGC 33-OMVs* 展现出对 Hep G2 肝癌细胞更强的结合能力。这种特异性结合能力表明 *Hbp-hGC 33-OMVs* 在肝癌细胞识别和结合方面具有优越性。为了进一步验证 OMVs 在体内的靶向效果,我们进行了小动物活体成像实验。结果显示,经尾静脉注射后, *Hbp-hGC*

33-OMVs 能够快速、精准地靶向肿瘤部位。这一结果证明了 Hbp-hGC 33-OMVs 在体内对肝细胞癌的特异性识别和定位能力。值得注意的是, 由于 OMVs 的不可复制性, 其在肿瘤部位的聚集时间相对较短, 不具备长时间滞留效应, 这可能是其靶向治疗的一个限制因素。因此, 未来的研究应关注如何通过改进制备工艺或联合其他治疗策略, 提高 OMVs 在肿瘤部位的滞留时间, 从而提高其对肝细胞癌的治疗效果。

综上所述, 本研究成功实现了 Hbp-hGC 33-scFv 的原核表达, 并对 Hbp-hGC 33-OMVs 的肝细胞癌靶向性进行了鉴定, 为 OMVs 在肝细胞癌抗肿瘤免疫治疗中的应用提供了实验基础。

REFERENCES

- [1] ZHOU FB, SHANG WT, YU XL, TIAN J. Glypican-3: a promising biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and treatment[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2018, 38(2): 741-767.
- [2] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [3] FENG MQ, HO M. Glypican-3 antibodies: a new therapeutic target for liver cancer[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(2): 377-382.
- [4] RODAKOWSKA E, WALCZAK-DRZEWIECKA A, BOROWIEC M, GORZKIEWICZ M, GRZESIK J, RATAJEWSKI M, ROZANSKI M, DASTYCH J, GINALSKI K, RYCHLEWSKI L. Recombinant immunotoxin targeting GPC3 is cytotoxic to H446 small cell lung cancer cells[J]. *Oncology Letters*, 2021, 21(3): 222.
- [5] XIA LJ, TENG Q, CHEN Q, ZHANG FC. Preparation and characterization of anti-GPC3 nanobody against hepatocellular carcinoma[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2020, 15: 2197-2205.
- [6] IKEDA M, OHKAWA S, OKUSAKA T, MITSUNAGA S, KOBAYASHI S, MORIZANE C, SUZUKI I, YAMAMOTO S, FURUSE J. Japanese phase I study of GC33, a humanized antibody against glypican-3 for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Science*, 2014, 105(4): 455-462.
- [7] LIU X, LIU C, ZHENG ZZ, CHEN SY, PANG X, XIANG XC, TANG JX, REN E, CHEN YZ, YOU M, WANG XY, CHEN XY, LUO WX, LIU G, XIA NS. Vesicular antibodies: a bioactive multifunctional combination platform for targeted therapeutic delivery and cancer immunotherapy[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(17): e1808294.
- [8] SHEN J, CAI WP, MA YF, XU RY, HUO Z, SONG L, QIU XY, ZHANG YC, LI AM, CAO WY, ZHOU SP, TANG XL. hGC33-modified and sorafenib-loaded nanoparticles have a synergistic anti-hepatoma effect by inhibiting Wnt signaling pathway[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2020, 15(1): 220.
- [9] 向新楚, 刘雪, 胡耀凯, 赵成君, 罗文新. 抗 GPC3 单链抗体的制备及其在肝细胞癌靶向检测中的应用[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(12): 2860-2867.
XIANG XC, LIU X, HU YK, ZHAO CJ, LUO WX. Preparation of anti-GPC3 single chain antibody for targeted detection of hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(12): 2860-2867 (in Chinese).
- [10] SCHWECHHEIMER C, KUEHN MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13: 605-619.
- [11] TOYOFUKU M, SCHILD S, KAPARAKIS-LIASKOS M, EBERL L. Composition and functions of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21: 415-430.
- [12] TOYOFUKU M, NOMURA N, EBERL L. Types and origins of bacterial membrane vesicles[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 13-24.
- [13] 王澜茜, 马官荣, 姜咏竹, 常秀林, 方廖琼, 白晋. 大肠埃希菌外膜囊泡对乳腺癌细胞增殖及荷瘤小鼠肿瘤生长的影响[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2023, 43(10): 1245-1254.
WANG LX, MA GR, JIANG YZ, CHANG XL, FANG LQ, BAI J. Effects of *Escherichia coli* outer membrane vesicles on proliferation of breast cancer cells and tumor growth of tumor-bearing mice[J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2023, 43(10): 1245-1254 (in Chinese).
- [14] NAKANO K, ISHIGURO T, KONISHI H, TANAKA M, SUGIMOTO M, SUGO I, IGAWA T, TSUNODA H, KINOSHITA Y, HABU K, ORITA T, TSUCHIYA M, HATTORI K, YAMADA-OKABE H. Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting

- and stability optimization[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2010, 21(10): 907-916.
- [15] LI Y, ZHAO RF, CHENG KM, ZHANG KY, WANG YZ, ZHANG YL, LI YJ, LIU GN, XU JC, XU JQ, ANDERSON GJ, SHI J, REN L, ZHAO X, NIE GJ. Bacterial outer membrane vesicles presenting programmed death 1 for improved cancer immunotherapy *via* immune activation and checkpoint inhibition[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(12): 16698-16711.
- [16] KIM OY, PARK HT, DINH NTH, CHOI SJ, LEE J, KIM JH, LEE SW, GHO YS. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 626.
- [17] NISHIDA T, KATAOKA H. Glypican 3-targeted therapy in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancers*, 2019, 11(9): 1339.
- [18] FENG MQ, GAO W, WANG RQ, CHEN WZ, MAN YG, FIGG WD, WANG XW, DIMITROV DS, HO M. Therapeutically targeting glypican-3 *via* a conformation-specific single-domain antibody in hepatocellular carcinoma[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(12): E1083-E1091.
- [19] HASHEMI YEGANEH H, HEIAT M, KIELISZEK M, ALAVIAN SM, REZAIE E. DT389-YP7, a recombinant immunotoxin against glypican-3 that inhibits hepatocellular cancer cells: an *in vitro* study[J]. *Toxins*, 2021, 13(11): 749.
- [20] GAO W, KIM H, HO M. Human monoclonal antibody targeting the heparan sulfate chains of glypican-3 inhibits HGF-mediated migration and motility of hepatocellular carcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0137664.
- [21] ZHU AX, GOLD PJ, EL-KHOUEIRY AB, ABRAMS TA, MORIKAWA H, OHISHI N, OHTOMO T, PHILIP PA. First-in-man phase I study of GC33, a novel recombinant humanized antibody against glypican-3, in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2013, 19(4): 920-928.
- [22] HUANG WW, SHU CY, HUA LQ, ZHAO YL, XIE HH, QI JL, GAO FL, GAO RY, CHEN YJ, ZHANG QS, LI WR, YUAN MC, YE C, MA YB. Modified bacterial outer membrane vesicles induce autoantibodies for tumor therapy[J]. *Acta Biomaterialia*, 2020, 108: 300-312.
- [23] WANG SJ, HUANG WW, LI K, YAO YF, YANG X, BAI HM, SUN WJ, LIU CB, MA YB. Engineered outer membrane vesicle is potent to elicit HPV16E7-specific cellular immunity in a mouse model of TC-1 graft tumor[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 6813-6825.
- [24] 蔺艳君, 董彬. β -防御素 130 在大肠杆菌中的串联表达、纯化及生物活性分析[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(6): 1088-1096.
- LIN YJ, DONG B. Tandem expression, purification and biological activity of recombinant multimeric β -defensin130 in *Escherichia coli*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(6): 1088-1096 (in Chinese).
- [25] HAYAT SMG, FARAHANI N, GOLICHENARI B, SAHEBKAR A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(6): 718-725.
- [26] 陈云雨, 牛夏忆, 李森, 李霓, 刘晓平. 大肠杆菌 Fts Z 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *生物工程学报*, 2019, 35(6): 1117-1125.
- CHEN YY, NIU XY, LI M, LI N, LIU XP. Bacterial expression, preparation and identification of polyclonal antibody against *Escherichia coli* FtsZ[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2019, 35(6): 1117-1125 (in Chinese).
- [27] van den BERG van SAPAROE A HB, HOUBEN D, de JONGE MI, JONG WSP, LUIRINK J. Display of recombinant proteins on bacterial outer membrane vesicles by using protein ligation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(8): e02567-17.
- [28] JONG WSP, SOPROVA Z, de PUNDER K, TEN HAGEN-JONGMAN CM, WAGNER S, WICKSTRÖM D, de GIER JW, ANDERSEN P, van der WEL NN, LUIRINK J. A structurally informed autotransporter platform for efficient heterologous protein secretion and display[J]. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 85.
- [29] van BLOOIS E, WINTER RT, KOLMAR H, FRAAIJE MW. Decorating microbes: surface display of proteins on *Escherichia coli*[J]. *Trends in Biotechnology*, 2011, 29(2): 79-86.
- [30] NICOLAY T, VANDERLEYDEN J, SPAEPEN S. Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 109-123.

(本文责编 郝丽芳)