

肝癌生物标志物 SOAT1 单克隆抗体的制备及评估

曾冰洁^{1,2}, 蒋情^{1,3}, 张钰萍⁴, 徐叶^{1,2}, 刘如石^{1,2}, 王庆林^{1,2*}, 梁湘辉^{5*}

(1. 湖南师范大学 医学院 医学检验系, 中国湖南 长沙 410013; 2. “免疫诊断试剂”湖南省工程技术研究中心, 中国湖南 长沙 410013; 3. 涟源市第一中学, 中国湖南 娄底 417100; 4. 郴州市中医院 医学检验科, 中国湖南 郴州 423099; 5. 中南大学湘雅医院 检验科, 中国湖南 长沙 410008)

摘要: 肝癌是临床上一种常见的恶性肿瘤, 目前临床上仍缺乏特异有效的诊断标志物。有研究表明, 固醇 O-酰基转移酶 1 (sterol O-acyltransferase 1, SOAT1) 作为胆固醇代谢的关键酶, 与肝癌的发生发展密切相关。因此, SOAT1 在作为肝癌生物标志物方面具有巨大潜力。本研究从肝癌细胞 Huh-7 中获取 SOAT1 基因, 经原核表达、蛋白质纯化后, 以纯化的重组 SOAT1 蛋白作为抗原免疫小鼠, 利用杂交瘤等技术共获得 5 株 SOAT1 单克隆抗体细胞株, 分别命名为 1F3、1G3、1D6、2F8、4D11, 其中 4D11 能够识别肝癌细胞 Huh-7 及临床肝癌组织标本中的 SOAT1 蛋白; 最后, 将 4D11 送至生物公司进行测序, 获得该抗体可变区的氨基酸序列。本研究利用重组 SOAT1 蛋白成功制备了抗 SOAT1 的特异性单克隆抗体, 这不仅为后续应用 SOAT1 蛋白制备肝癌伴随诊断试剂盒提供了原材料, 而且还为建立基于 SOAT1 的肝癌诊断方法奠定了基础。

关键词: 肝癌; 固醇 O-酰基转移酶 1 (SOAT1); 单克隆抗体

中图分类号: Q51, R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2023)03-0267-08

Preparation and Evaluation of Monoclonal Antibody to SOAT1, a New Biomarker for Liver Cancer

ZENG Bingjie^{1,2}, JIANG Qing^{1,3}, ZHANG Yuping⁴, XU Ye^{1,2}, LIU Rushi^{1,2},
WANG Qinglin^{1,2*}, LIANG Xianghui^{5*}

(1. Department of Medical Laboratory, College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. Immunodiagnostic Reagents Engineering Research Center of Hunan Province, Hunan Normal University, Changsha 410013, Hunan, China; 3. Lianyuan No.1 Middle School, Loudi 417100, Hunan, China; 4. Clinical Laboratory, Chenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chenzhou 423099, Hunan, China; 5. Clinical Laboratory, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

Abstract: Liver cancer is a common malignant tumor in clinic. Studies have shown that sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1), a key enzyme in cholesterol metabolism, is closely related to the occurrence and development of liver cancer. Therefore, SOAT1 has great potential as a biomarker for the cancer. Herein, the gene encoding SOAT1 was obtained from the Huh-7 liver cancer cell line. After prokaryotic expression and protein purification, the purified recombinant SOAT1 protein was used as an antigen to immunize mice. A total of 5 anti-SOAT1 monoclonal antibody cell lines, named 1F3, 1G3, 1D6, 2F8 and 4D11, respectively, were obtained by using hybridoma and other technologies. Among them, 4D11 was able to recognize the SOAT1 protein in Huh-7 cells and clinical liver cancer tissue samples. Subsequently, 4D11 was sent to a biological company for sequencing, and the amino acid sequences of the antibody variable regions were obtained. In conclusion, an anti-SOAT1 monoclonal antibody was successfully prepared by recombinant SOAT1 protein, which would not only provide the raw materials for the subsequent application of SOAT1 protein in develo-

收稿日期: 2022-03-23; 修回日期: 2022-05-11; 网络首发日期: 2023-02-23

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2021JJ70145)

作者简介: 曾冰洁(1998—), 女, 湖南宁乡人, 硕士; 曾冰洁和蒋情对本文的贡献相同, 为本文共同第一作者; *通信作者: 梁湘辉(1974—), 男, 湖南涟源人, 硕士, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断学方面的工作, E-mail: liangxh901@csu.edu.cn; 王庆林(1966—), 男, 河北石家庄人, 博士, 教授, 主要从事临床检验诊断学方面的教学和科研工作, E-mail: wangqinglin68@yeah.net.

ping liver cancer companion diagnostic kits, but also lay a foundation for the establishment of SOAT1-based liver cancer diagnostic methods.

Key words: liver cancer; sterol *O*-acyltransferase 1 (SOAT1); monoclonal antibody

(*Life Science Research*, 2023, 27(3): 267–274)

肝癌是全球较为常见的恶性肿瘤,其病死率在所有癌症中位居第二^[1]。肝癌主要分为原发性肝癌和转移性肝癌。原发性肝癌的病灶来源于肝脏本身,包括肝细胞癌和胆管细胞癌等,其中肝细胞癌占原发性肝癌的 95%^[2];转移性肝癌则由其他组织来源的恶性肿瘤转移形成,如胃癌、大肠癌等。肝癌起病隐匿,初期症状并不明显,晚期才会出现腹胀、恶心、消瘦、梗阻性黄疸、不明原因的发热等临床症状^[3]。肝癌的危险因素众多,主要有肝炎病毒(包括乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒)感染、黄曲霉毒素接触、酗酒、肥胖和糖尿病等^[4]。目前,肝癌的临床诊断以病理学、影像学、血清生化检查及多种分子技术相关的检测手段^[5]为主,而早期肝癌的有效诊断方法仍比较缺乏。因此,寻找更为准确和早期的标志物及诊断方法迫在眉睫。

固醇 *O*-酰基转移酶(sterol *O*-acyltransferase, SOAT)又称脂酰辅酶 A-胆固醇酰基转移酶(acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase, ACAT),是一种定位于内质网膜,能催化胆固醇转化成胆固醇酯,并将其储存在胞质脂肪滴中的蛋白质^[6]。人体共存在两个 SOAT 编码基因,分别为 *ACAT1* 和 *ACAT2*。由 *ACAT1* 翻译而成的 SOAT1 主要表达于肾上腺、肾脏、卵巢和肝脏等;而由 *ACAT2* 翻译形成的 SOAT2 多表达于肠细胞^[7]。2019 年, Jiang 等^[8]发现在乙型肝炎病毒相关性早期肝细胞癌中, SOAT1 水平显著上调,且其高表达与肝癌预后不良密切相关。因此, SOAT1 有望成为诊断肝癌及判断预后的新标志物。

本研究从肝癌细胞 Huh-7 中获得 *SOAT1* 基因,构建 *SOAT1* 原核表达载体,并以纯化后的 *SOAT1* 蛋白作为免疫原免疫小鼠,通过细胞融合等技术制备了抗 *SOAT1* 单克隆抗体,这不仅为筛选抗 *SOAT1* 抗体提供了原材料,还为进一步建立基于 *SOAT1* 的早期肝癌检测方法提供了基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 Rosetta-gami B、质粒 pET-32a、肝癌

细胞 Huh-7 和小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/6 均由本实验室提供; DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自长沙贝博生物科技有限公司; *SOAT1* 上下游引物委托湖南擎科生物技术有限公司合成; 构建载体相关的 ExTaq 酶、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、DNA 标准品购自日本 Takara 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司; 蛋白质标准品购自美国 Bio-Rad 公司; 质粒小量抽提试剂盒、Protein G 柱及鼠来源抗 6×His-tag 单克隆抗体购自上海生工生物工程股份有限公司; 雄性 BALB/c 小鼠(6~8 周)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; 弗氏佐剂、HT 及 HAT 培养基均购自美国 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(GAM-IgG-HRP)由厦门大学夏宁邵教授惠赠; 山羊抗小鼠 IgG 抗体购自长沙艾碧维生物科技有限公司; 高敏 ECL 发光液购自莫纳(武汉)生物有限公司; 人正常心肌、人肝癌组织石蜡切片均由湘雅二医院病理科惠赠; DAB 显色试剂盒购自武汉赛维尔科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获取

采用 Trizol 法提取肝癌细胞 Huh-7 总 RNA,经逆转录获得 *SOAT1* cDNA。根据 GenBank 中 *SOAT1* 的编码序列(coding sequence, CDS),设计引物(F: 5'-CGGAATTCATGAAGGAAGTTGGCA-GTC-3'; R: 5'-CCGCTCGAGCTAAAACACGTAA-CGACAAG-3'),并分别加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点。利用上述引物对 *SOAT1* 基因进行 PCR 扩增,反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,对 PCR 产物进行胶回收并测定其浓度。

1.2.2 重组载体构建

将胶回收后的 PCR 产物和载体 pET-32a 分别进行 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,再次进行切胶回收。将纯化后的 PCR 产物及载体 pET-32a 进行连接,转化至大肠杆菌 Rosetta-gami B 中,挑取阳性克隆,PCR 鉴

定后送至湖南擎科生物技术有限公司测序。

1.2.3 SOAT1 重组蛋白诱导表达及鉴定

挑取阳性菌落转接至 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、230 r/min 摇床培养过夜。隔日, 将已活化菌种以 1 : 100 的比例接种, 37 °C、230 r/min 继续培养。当 OD_{600nm} 达 0.6 时, 添加 0.1% 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(isopropylthio-β-D-galactoside, IPTG)诱导 8~9 h, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 超声破碎法破碎细菌, 分别收集诱导前后菌液、超声混合物、离心后上清及沉淀, 采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析目的蛋白表达情况。与此同时, 以鼠来源抗 6×His-tag 单抗为一抗, 羊抗鼠抗体为二抗, 采用蛋白质印迹法(Western-blot)鉴定目的蛋白。

1.2.4 SOAT1 重组蛋白纯化

SOAT1 蛋白在菌体中主要以包涵体形式存在。将 SOAT1 包涵体充分洗涤后, 分别配置 20 倍体积于蛋白质的含有 6 mol/L、5 mol/L、4 mol/L、3 mol/L、2 mol/L 尿素的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS), 将蛋白质混合物转移至透析袋中, 按浓度从高到底透析, 每 3 h 更换一次。复性后, 离心收集上清, 采用镍柱亲和层析的方式纯化蛋白质。采用 SDS-PAGE 分析纯化后蛋白质的纯度并检测浓度。

1.2.5 小鼠免疫及血清抗体效价检测

采用纯化后的重组 SOAT1 蛋白作为抗原, 对 6~8 周雄性 BALB/c 小鼠进行免疫, 共五轮。前四轮均使用皮下多点注射, 每两周注射 1 次; 在第四轮免疫结束后 10 d, 以腹腔注射的方式进行第五轮免疫。每次免疫前取眼眶血, 包被 SOAT1 蛋白, 通过间接酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定小鼠血清抗体效价。

1.2.6 细胞融合

取已完成五轮免疫的小鼠脾脏, 充分研磨, 收集脾细胞。在进行细胞计数后, 将脾细胞和处于对数生长期的 Sp2/6 细胞以 5 : 1 到 10 : 1 的比例混合, 1 300 r/min 离心 5 min, 弃上清。将离心管置于 37 °C 温水中, 1 min 内缓慢滴加聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)溶液(每只小鼠 1 mL), 混匀, 静置 1 min。3 min 内加入 5 mL 预热的 DMEM 培养基, 定容、离心。用含滋养层细胞的 HAT 培养基重悬细胞, 根据脾细胞数量进行铺板。培养 10 d

后, 更换成 HT 培养基。

1.2.7 杂交瘤细胞筛选和克隆化培养

当融合细胞出现较大细胞团时, 包被 SOAT1 蛋白, 采用间接 ELISA 法筛选阳性克隆。将筛选出来的阳性孔扩大培养, 待细胞密度达到 60%, 通过有限稀释法进行亚克隆。

1.2.8 单克隆抗体大量制备及纯化

取 9 周雄性 BALB/c 小鼠, 腹腔注射石蜡油 450~600 μL/只。10~15 d 后, 收集对数生长期杂交瘤细胞并调整至 2×10⁶ mL⁻¹, 以同样的方式注射小鼠, 剂量为 500 μL/只。7 d 后收集腹水, 并通过辛酸硫酸铵沉淀和 Protein G 柱亲和层析进行纯化。

1.2.9 抗体亚型鉴定

收集阳性杂交瘤细胞株的上清, 以抗 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgGAM 抗体作为第二抗体, 其中抗 IgGAM 抗体为阳性对照, 通过间接 ELISA 鉴定各株抗体亚型。

1.2.10 抗体效价测定

采用间接 ELISA 检测抗体效价。将纯化后的各株抗体稀释至同一质量浓度(0.5 mg/mL), 随后梯度稀释至 1 : 409 600, 分析 OD 值, 对抗体效价进行评价。

1.2.11 Western-blot 鉴定肝癌细胞中 SOAT1 的表达

培养肝癌细胞 Huh-7, 提取总蛋白质, 经 SDS-PAGE 后, 转膜, 封闭, TBST 洗涤。将获得的 5 株单抗 1 : 500 稀释后作为一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日, TBST 洗涤后, 加入 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体作为二抗孵育, 再次 TBST 洗涤后, ECL 显色观察抗体结合效果。

1.2.12 免疫组织化学鉴定

组织切片经烤片、脱蜡、水化、柠檬酸钠抗原修复、3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶后, 加入 1 : 200 稀释的已纯化的 SOAT1 抗体, 4 °C 孵育过夜; 次日, PBST 洗涤, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 再次 PBST 洗涤后, DAB 显色, 用蒸馏水终止显色。经苏木素复染细胞核、饱和碳酸锂返蓝、梯度乙醇脱水、二甲苯透明等系列操作后, 采用中性树脂封片, 于显微镜下观察抗体结合情况。

1.2.13 抗体可变区分析

提取 4D11 杂交瘤细胞 RNA, 送至金斯瑞生物科技股份有限公司测序。

2 结果

2.1 目的基因的获取及重组载体的构建

提取肝癌细胞 Huh-7 总 RNA, 电泳后发现, RNA 在琼脂糖凝胶上呈现明显的三条带, 分别是 28S、18S 和 5S (图 1A), 且条带明亮清晰, 表明提取的 RNA 可用于后续逆转录实验。以逆转录产物 cDNA 为模板进行 PCR, PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 1 500 bp 附近有明显条带, 提示 SOAT1 基因可能扩增成功。对 PCR 产物和载体 pET-32a 进行酶切连接后, 将重组载体转化至大肠杆菌感受态细胞中, 随机挑取菌落进行 PCR, 筛选阳性克隆。菌落 PCR 产物的电泳结果显示, 所挑菌落均在 1 500 bp 位置出现特异性条带(图 1B), 初步确定重组载体转化成功。提取菌内质粒并测序, 结果显示, 重组载体序列基本正确, 未明显发生突变, 可用于后续实验。

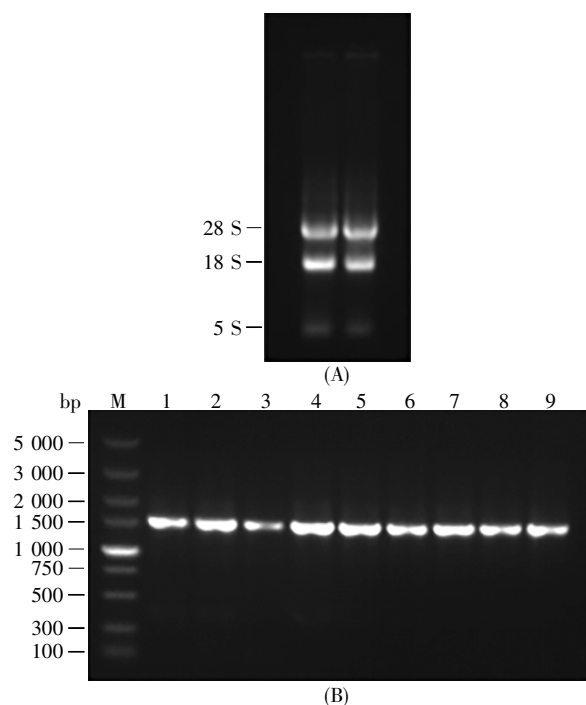


图 1 目的基因的获取及重组载体的构建

(A) 肝癌细胞 Huh-7 总 RNA 电泳图; (B) 阳性克隆菌落 PCR 电泳图。M: DNA 分子量标准; 1~9: 阳性菌落 PCR 产物。

Fig.1 Target gene acquisition and recombinant vector construction

(A) Electrophoresis of total RNA isolated from Huh-7 cells; (B) Electrophoresis of PCR products from positive clones. M: DNA molecular mass standard; 1~9: PCR products from positive colonies.

2.2 SOAT1 重组蛋白的表达及鉴定

将测序基本正确的重组载体诱导表达, 超声

破碎后, 进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, 沉淀样品在 50 kD 处出现明显蛋白质条带(图 2A), 这初步说明重组蛋白质表达成功且主要以包涵体形式存在于菌体中。为进一步确定该条带是我们所需的目的蛋白, 采用抗 6×His-tag 作为一抗进行 Western-blot 验证。验证结果表明, 抗 His 抗体能够识别所表达蛋白质且位置符合预期(图 2B)。综上所述, 经 IPTG 诱导后, 菌株成功表达带 His 标签的 SOAT1 重组蛋白。

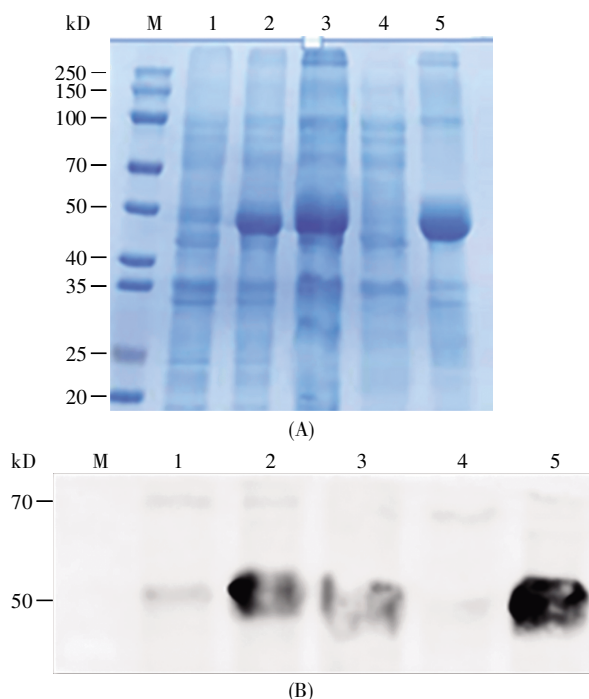


图 2 重组蛋白质的表达及鉴定

(A) SDS-PAGE; (B) Western-blot。M: 预染蛋白质分子量标准; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 超声后的悬液; 4: 超声后的上清; 5: 超声后的沉淀。

Fig.2 Expression and identification of the recombinant protein

(A) SDS-PAGE; (B) Western-blot. M: Prestained standard protein marker; 1: Before induction; 2: After induction; 3: Suspension after ultrasound; 4: Supernatant after ultrasound; 5: Precipitant after ultrasound.

2.3 SOAT1 重组蛋白纯化

通过梯度浓度尿素对蛋白质包涵体进行缓慢复性, SDS-PAGE 分析表明, 在 8 mol/L、6 mol/L、4 mol/L 尿素溶解条件下, 50 kD 处可见明显条带(图 3A), 这说明包涵体最低可被 4 mol/L 尿素溶解。在后续镍柱亲和层析中, SOAT1 重组蛋白主要在 20 mmol/L、30 mmol/L 和 50 mmol/L 咪唑中被洗脱下来(图 3B), 且纯度较高, 可用于下一步小鼠免疫。

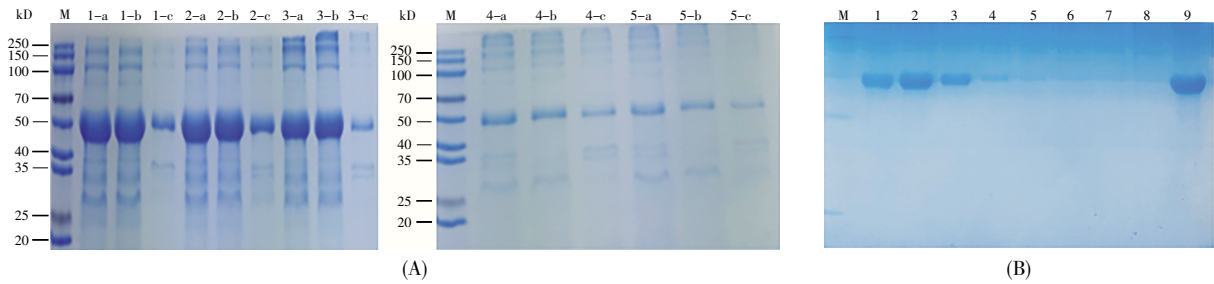


图 3 SOAT1 重组蛋白的纯化

(A) 不同浓度尿素中重组蛋白质的溶解情况。M: 预染蛋白质分子量标准, 1~5: 8 mol/L、6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、1 mol/L 尿素浓度, a~c: 蛋白质悬液、悬液离心后的沉淀和悬液离心后的上清; (B) 重组蛋白质的纯度鉴定。M: 预染蛋白质分子量标准, 1~8: 20 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、70 mmol/L、90 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑洗脱液, 9: 挂柱流穿液。

Fig.3 Purification of the recombinant SOAT1 protein

(A) Recombinant protein dissolution in different concentrations of urea. M: Prestained standard protein marker; 1~5: Urea concentrations 8 mol/L, 6 mol/L, 4 mol/L, 2 mol/L and 1 mol/L, respectively; a~c: Protein suspension, precipitant and supernatant, respectively; (B) Recombinant protein purity identification. M: Prestained standard protein marker; 1~8: Imidazole eluent concentrations 20 mmol/L, 30 mmol/L, 50 mmol/L, 70 mmol/L, 90 mmol/L, 100 mmol/L, 200 mmol/L and 300 mmol/L, respectively; 9: The flow-through.

2.4 免疫小鼠血清抗体效价检测

小鼠进行免疫后, 用重组 SOAT1 蛋白检测血清抗体效价。以初次免疫前的检测值作为阴性对照, 以大于 2.1 倍阴性对照(即 $P/N \geq 2.1$)的 OD 值作为阳性。结果显示, 经四轮免疫, 小鼠血清抗体在 1 : 3 200 000 稀释后仍可被检测出, 说明该抗体已达到制备单克隆抗体的要求(图 4)。

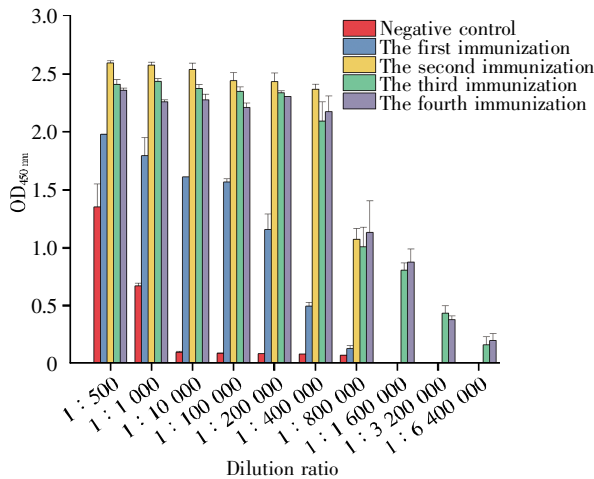


图 4 免疫小鼠血清抗体效价检测

Fig.4 Detection of antibody titers in sera of immunized mice

2.5 单克隆抗体的纯化与鉴定

结果显示: Protein G 柱纯化后的抗体泳道出现 3 条带, 分别是 24 kD 的轻链、55/70 kD 的重链和 100 kD 的重链聚合物; 此外, 未纯化的腹水泳道有杂蛋白条带出现, 辛酸硫酸铵沉淀纯化和 Protein G 柱纯化后的泳道杂蛋白明显减少, 且

Protein G 柱纯化后的抗体泳道目的蛋白更为明显(图 5)。这说明纯化后单克隆抗体的纯度和浓度显著提高, 基本达到后续实验要求。经过纯化后, 最终共获得 5 株抗 SOAT1 单克隆抗体, 分别命名为 1F3、1G3、1D6、2F8、4D11。采用 BCA 法测定并计算所得单克隆抗体的质量浓度, 结果如下: 1F3 为 0.55 mg/mL; 1G3 为 0.55 mg/mL; 1D6 为 0.57 mg/mL; 2F8 为 0.56 mg/mL; 4D11 为 0.75 mg/mL。

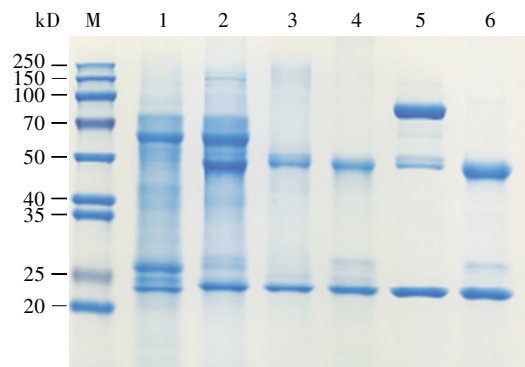


图 5 单克隆抗体的纯化结果

M: 预染蛋白质分子量标准; 1: 纯化前未煮沸的腹水; 2: 纯化前煮沸的腹水; 3: 辛酸硫酸铵沉淀纯化后未煮沸的腹水; 4: 辛酸硫酸铵沉淀纯化后煮沸的腹水; 5: Protein G 柱纯化后未煮沸的单克隆抗体; 6: Protein G 柱纯化后煮沸的单克隆抗体。

Fig.5 Purification results of monoclonal antibodies

M: Prestained standard protein marker; 1: Unboiled ascites before purification; 2: Boiled ascites before purification; 3: Unboiled ascites after purification by bitter-ammonium sulfate precipitation; 4: Boiled ascites after purification by bitter-ammonium sulfate precipitation; 5: Unboiled purified monoclonal antibody; 6: Boiled purified monoclonal antibody.

2.6 单克隆抗体亚型鉴定

利用间接 ELISA 法, 对筛选得到的杂交瘤细胞稳定分泌的抗体进行亚型鉴定, 结果显示: 1F3 是 IgG2a 型, 其余 4 株单抗均是 IgG1 型(图 6)。

2.7 单克隆抗体效价测定

由图 7 可知, 1F3、2F8、4D11 的效价均达到 1 : 204 800; 1D6 和 1G3 的效价达到 1 : 102 400。

2.8 Western-blot 检测肝癌细胞中的 SOAT1

Western-blot 结果显示, 在 1 : 500 的稀释比下, 1D6 和 4D11 可以识别 Huh-7 细胞中的 SOAT1 蛋白(图 8)。

2.9 免疫组织化学鉴定肝癌组织中的 SOAT1

选取 4D11 用于免疫组织化学鉴定。结果显示, 4D11 可以识别肝癌组织切片中的 SOAT1 蛋

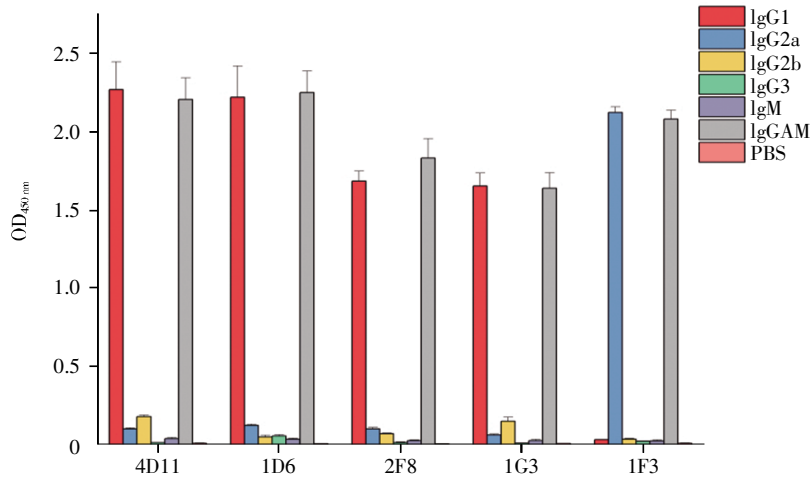


图 6 单克隆抗体亚型鉴定
Fig.6 Monoclonal antibody subtype identification

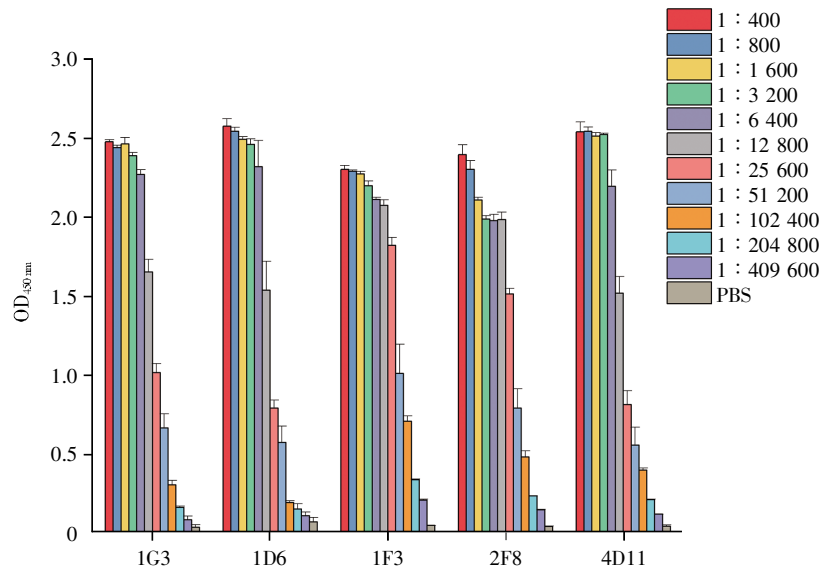


图 7 单克隆抗体效价
Fig.7 Titration of monoclonal antibodies

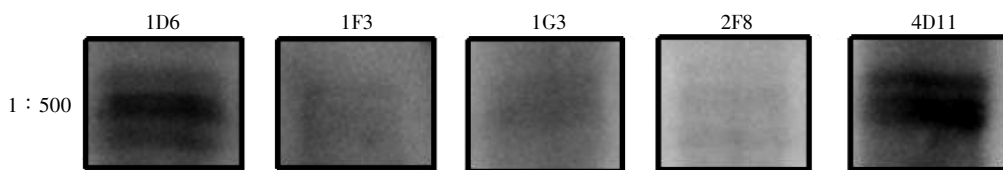


图 8 Western-blot 检测 Huh-7 细胞表达的 SOAT1
Fig.8 Western-blot detection of SOAT1 expressed in Huh-7 cells

白(图 9)。

2.10 单克隆抗体 4D11 可变区结构域测序

为了后续抗体功能研究工作的开展,对 4D11 可变区进行了测序,结果如图 10 所示。

3 讨论

肝癌作为一种常见的恶性肿瘤,其高死亡率及高侵袭性给患者及家庭带来巨大的医疗经济负担。因此,针对肝癌的早期筛查及早期诊断对改

善预后、延长患者生存期具有重大意义。甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是临床广泛使用的肝癌血清标志物,但其灵敏度和特异性较低,仅三分之一肝癌患者的 AFP 水平高于 100 ng/mL;而在无恶性肿瘤情况下,慢性肝病患者血清 AFP 也有所升高^[9]。近年来,脱- γ -羧基凝血酶原(des- γ -carboxy-prothrombin, DCP)也开始被用于早期肝癌的诊断,但样本量少,检测质量各异,仍需更多高质量研究进一步证明 DCP 在肝癌诊断中的可行性^[10]。

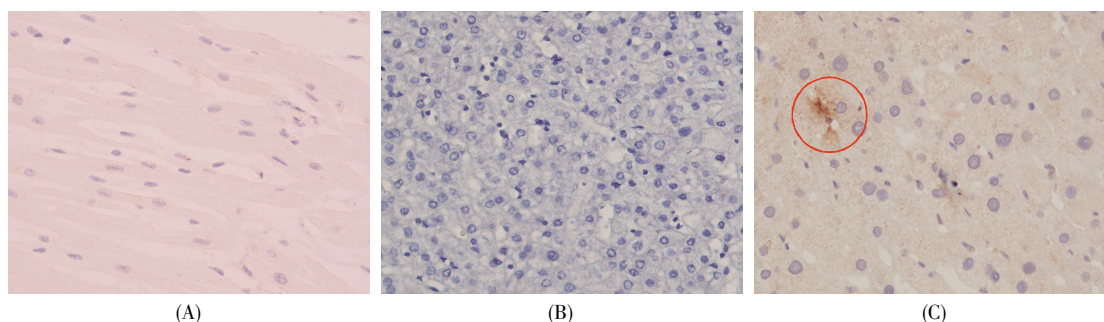


图 9 免疫组织化学检测肝癌组织中表达的 SOAT1 (400 \times)

(A) 人正常心肌组织; (B) 人正常肝脏组织; (C) 高分化肝细胞癌组织。红圈指示部分为免疫组织化学结果阳性区域。

Fig.9 Detection of SOAT1 expressed in liver cancer tissues by immunohistochemistry (400 \times)

(A) Normal myocardial tissue; (B) Normal liver tissue; (C) Well-differentiated hepatocellular carcinoma tissue. The red circle indicates the positive area in immunohistochemistry staining.

Heavy chain: DNA sequence (420 bp)

```
ATGAACTTCGGGTTTCAGCTTGATTTTCCTTGTCCTTGTTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGA
AGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTTGTGAAGCTGGAGGGTCCCTGAAACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGAAGCTTTGCCATGTCTTGGGTTCCGCAGA
CTCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCATCCATTAGTAGTGCGGTGCCATGTACTA
TCCAGACAGTGTTCAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGATAGTGCCGGGAACATCCTG
TACCTGGAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAT
GGACTTACTACGGTAGTAGCTACGGGGCTATGGACTCCTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
CACCGTCTCTCA
```

Heavy chain: Amino acids sequence (140 aa)

```
MNFGFSLIFLVLKGVQCEVKLVESGGGFVKPGGSLKLSAASGFTFRSFAMSWVRQTP
EKRLWVASISSGGAMYYPDSVQGRFTISRDSAGNILYLEMSSLRSEDAMYYCARWITYY
GSSYGAMDSWGQTSVTVSS
```

CDR sequence

```
---CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3--->
SFAMS...__ASISSGGAMYYPDSVQG...__WTYYGSSYGAMDS
```

Light chain: DNA sequence (399 bp)

```
ATGGAATCACAGACTCAGGTCCTCATGTCCCTGCTGTTCTGGGTATCTGGTACCTGTGG
GGACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGACAGCAGGAGAGAAGGTC
ACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAGCAGTGGAAATCAAAAAAATTACT
TGACCTGGTACCAGCAGAGACCAGGGCAGCCTCCTAAACTGTTGATCTAGGGCAGC
CACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTC
ACTCTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATG
ATTATACTTATCCGCTCACGTTCCGGTGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
```

Light chain: Amino acids sequence (133 aa)

```
MESQTQVLMSELLFVWSGTCGDIVMTQSPSSLVTAGEKVTMSCKSSQSLSSGNQKNYLT
WYQQRPGOPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFLTISSVQAEDLAVYYCQNDYTY
PLTFGAGTKLELK
```

CDR sequence

```
---CDR1---> <--CDR2--> <---CDR3--->
KSSQSLSSGNQKNYLT...__WASTRES...__QNDYTYPLT
```

图 10 4D11 可变区重轻链核苷酸及氨基酸序列

Fig.10 Nucleotide and amino acid sequences of light and heavy chains in variable region of 4D11

所以,开发一种新的具有高特异性及灵敏度的肝癌诊断标志物是当务之急。

近年来,脂质代谢的改变与癌症发生发展之间的关系受到众多学者的关注。有研究指出,脂肪细胞可通过增加肉碱棕榈酰基转移酶 1A (carnitine palmitoyltransferase 1A, CPT1A)和电子转运链复合蛋白的水平来驱动脂肪酸代谢,促进乳腺癌细胞的增殖及迁移,从而加速癌症的进展^[11]。此外,Wang 等^[12]发现,3 个脂质代谢相关基因在肝细胞癌中高表达,并与癌症预后紧密联系,可作为肝细胞癌的独立预后因素。胆固醇作为脂质代谢中的重要一员,参与了癌症发生发展的过程。有研究指出,添加胆固醇可逆转熊果酸抑制肝细胞癌生长的作用^[13]。而另一项关于 p53 抑制肝细胞癌生长的机制研究证明,p53 通过抑制甲羟戊酸途径,减少胞内胆固醇含量,从而发挥抑制肝细胞增殖的作用^[14]。

SOAT1 是一种调控细胞内胆固醇酯储存的关键酶,其高表达在神经胶质瘤、肾细胞癌、肾上腺皮质癌、乳腺癌等多种癌症中已被证明与不良预后相关^[15-18]。Ren 等^[19]通过分析 TCGA 数据库发现,SOAT1 在肝细胞癌及胆管癌中上调最为明显,且 SOAT1 的高表达与肝细胞癌患者的不良预后相关。与此同时,Chen 等^[20]通过免疫组织化学比较了肝癌及癌旁组织中 SOAT1 的表达情况,发现 SOAT1 在肝癌组织中的表达显著高于癌旁组织。由此推测,SOAT1 单独或与其他血清学标志物联合检测或可提高早期肝癌检出率。

运用原核表达系统进行蛋白质表达具有蛋白质不溶、构象不稳及低纯化率等缺点,而融合标签的使用,可增强目的蛋白的表达,提高蛋白质溶解度^[21]。本研究采用了两端带有 poly His 标签的 pET-32a 表达载体,该标签是目前使用最广的亲标签,不会对蛋白质的表达和折叠产生影响,且带 His 标签的重组蛋白质与 Ni(II)-亚硝基三乙酸(Ni²⁺-NTA)具有高亲和力,允许通过梯度浓度咪唑使结合重组蛋白质解离,从而达到纯化的效果。本实验所获得的重组蛋白质以包涵体的形式存在于胞质,难以溶解,所以我们先使用梯度变性剂尿素溶解包涵体,之后通过透析的方法去除变性剂,使目的蛋白恢复天然构象,最终得到可用于小鼠免疫的重组蛋白质。在进行 4 次免疫后,小鼠血清效价达 1 : 3 200 000,这说明重组 SOAT1 蛋白具有良好免疫原性。经细胞融合、亚

克隆试验,最终筛得 5 株抗 SOAT1 单克隆抗体,分别命名为 1F3、1G3、1D6、2F8、4D11。根据间接 ELISA 结果可知,5 株抗体均具有较高的效价亲和力。其中,4D11 能够在 Western-blot、免疫组织化学等试验中检测到 SOAT1 蛋白,这说明我们最终获得了一株能够特异识别肝癌细胞所表达的 SOAT1 蛋白的单克隆抗体。后续我们将利用该株抗体检测正常人及肝癌患者血清中的 SOAT1,进一步研究 SOAT1 作为肝癌新标志物的可行性。

参考文献(References):

- [1] 陈瑶,杨训俊,陈涵斌,等. SOAT1 在肝细胞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 温州医科大学学报(CHEN Yao, YANG Xunjun, CHEN Hanbin, *et al.* Expression of SOAT1 and its clinical significance in hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Wenzhou Medical University), 2021, 51(1): 35-39.
- [2] KULIK L, EL-SERAG H B. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2019, 156(2): 477-491.e1.
- [3] DIMITROULIS D, DAMASKOS C, VALSAMI S, *et al.* From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: an epidemic problem for both developed and developing world[J]. World Journal of Gastroenterology, 2017, 23(29): 5282-5294.
- [4] CABRERA R, NELSON D R. Review article: the management of hepatocellular carcinoma[J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2010, 31(4): 461-476.
- [5] RONOT M, PURCELL Y, VILGRAIN V. Hepatocellular carcinoma: current imaging modalities for diagnosis and prognosis[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2019, 64(4): 934-950.
- [6] LONG T, SUN Y Y, HASSAN A, *et al.* Structure of nevanimibe-bound tetrameric human ACAT1[J]. Nature, 2020, 581(7808): 339-343.
- [7] SAKASHITA N, MIYAZAKI A, TAKEYA M, *et al.* Localization of human acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) in macrophages and in various tissues[J]. The American Journal of Pathology, 2000, 156(1): 227-236.
- [8] JIANG Y, SUN A H, ZHAO Y, *et al.* Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma[J]. Nature, 2019, 567(7747): 257-261.
- [9] GRANDHI M S, KIM A K, RONNEKLEIV-KELLY S M, *et al.* Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment[J]. Surgical Oncology, 2016, 25(2): 74-85.
- [10] 德吉,杨丽,王一平. 脱- γ -羧基凝血酶原诊断原发性肝癌的系统评价[J]. 中国循证医学杂志(DE Ji, YANG Li, WANG Yiping. Des- γ -carboxy prothrombin in the diagnosis of primary hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine), 2020, 20(7): 798-808.
- [11] BALABAN S, SHEARER R F, LEE L S, *et al.* Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth: adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration[J]. Cancer & Metabolism, 2017, 5: 1.
- [12] WANG W J, ZHANG C, YU Q H, *et al.* Development of a novel lipid metabolism-based risk score model in hepatocellular carcinoma patients[J]. BioMed Central Gastroenterology, 2021, 21: 68.
- [13] KIM G H, KAN S Y, KANG H, *et al.* Ursolic acid suppresses cholesterol biosynthesis and exerts anti-cancer effects in hepatocellular carcinoma cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4767.

- [41] NISHIYA Y, SHIBATA K, SAITO S, *et al.* Drug–target identification from total cellular lysate by drug–induced conformational changes[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 385(2): 314–320.
- [42] KIM Y, SUGIHARA Y, KIM T Y, *et al.* Identification and validation of VEGFR2 kinase as a target of voacangine by a systematic combination of DARTS and MSI[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4): 508.
- [43] TIAN T, ZHANG C Q, LI J, *et al.* Proteomic exploration of endocytosis of framework nucleic acids[J]. *Small*, 2021, 17(23): e2100837.
- [44] MOLINA D M, JAFARI R, IGNATUSHCHENKO M, *et al.* Monitoring drug target engagement in cells and tissues using the cellular thermal shift assay[J]. *Science*, 2013, 341(6141): 84–87.
- [45] SAVITSKI M M, REINHARD F B M, FRANKEN H, *et al.* Tracking cancer drugs in living cells by thermal profiling of the proteome[J]. *Science*, 2014, 346(6205): 1255784.
- [46] FRASER J A, MADHUMALAR A, BLACKBURN E, *et al.* A novel p53 phosphorylation site within the MDM2 ubiquitination signal: II. A model in which phosphorylation at SER269 induces a mutant conformation to p53[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(48): 37773–37786.
- [47] 徐雨昕, 季静静, 张巧艳, 等. 细胞热迁移分析技术及其在靶标发现中的应用进展[J]. *药学服务与研究*(XU Yuxin, JI Jingjing, ZHANG Qiaoyan, *et al.* Cellular thermal shift assay technology and research progress in the application of target discovery[J]. *Pharmaceutical Care and Research*), 2021, 21(2): 122–127.
- [48] CEDER S, ERIKSSON S E, LIANG Y Y, *et al.* Mutant p53–reactivating compound APR–246 synergizes with asparaginase in inducing growth suppression in acute lymphoblastic leukemia cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2021, 12(7): 709.
- [49] DZIEKAN J M, YU H, CHEN D, *et al.* Identifying purine nucleoside phosphorylase as the target of quinine using cellular thermal shift assay[J]. *Science Translational Medicine*, 2019, 11(473): eaau3174.
- [50] SUN W D, DAI L Y, YU H, *et al.* Monitoring structural modulation of redox–sensitive proteins in cells with MS–CETSA[J]. *Redox Biology*, 2019, 24: 101168.
- [51] ZINN N, WERNER T, DOCE C, *et al.* Improved proteomics–based drug mechanism–of–action studies using 16–plex isobaric mass tags[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(3): 1792–1801.
- [52] CORPAS–LOPEZ V, MONIZ S, THOMAS M, *et al.* Pharmacological validation of *N*–myristoyltransferase as a drug target in *Leishmania donovani*[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(1): 111–122.
- [53] CARNERO CORRALES M A, ZINKEN S, KONSTANTINIDIS G, *et al.* Thermal proteome profiling identifies the membrane–bound purinergic receptor P2X4 as a target of the autophagy inhibitor indophagolin[J]. *Cell Chemical Biology*, 2021, 28(12): 1750–1757.e5.

(上接第 274 页)

- [14] MOON S H, HUANG C H, HOULIHAN S L, *et al.* p53 represses the mevalonate pathway to mediate tumor suppression[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 564–580.e19.
- [15] BEMLIH S, POIRIER M D, EL ANDALOUSSI A. Acyl–coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor avasimibe affect survival and proliferation of glioma tumor cell lines[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2010, 9(12): 1025–1032.
- [16] ANTALIS C J, ARNOLD T, RASOOL T, *et al.* High ACAT1 expression in estrogen receptor negative basal–like breast cancer cells is associated with LDL–induced proliferation[J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010, 122(3): 661–670.
- [17] CHEN L, PENG T C, LUO Y W, *et al.* ACAT1 and metabolism–related pathways are essential for the progression of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), as determined by co–expression network analysis[J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 957.
- [18] LACOMBE A M F, SOARES I C, MARIANI B M D P, *et al.* Sterol *O*–acyl transferase 1 as a prognostic marker of adrenocortical carcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(1): 247.
- [19] REN M L, XU H J, XIA H W, *et al.* Simultaneously targeting SOAT1 and CPT1A ameliorates hepatocellular carcinoma by disrupting lipid homeostasis[J]. *Cell Death Discovery*, 2021, 7(1): 125.
- [20] CHEN Y L, YANG X J, CHEN Y, *et al.* Impacts of the SOAT1 genetic variants and protein expression on HBV–related hepatocellular carcinoma[J]. *BioMed Central Cancer*, 2021, 21: 615.
- [21] WALLS D, LOUGHRAN S T. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2011, 681: 151–175.