

- 7 Chen CL, Lin JL, Lai LP, *et al.* Altered expression of FHL1, CARP, TSC - 22 and P311 provide insights into complex transcriptional regulation in pacing - induced atrial fibrillation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772(3):317 - 329
- 8 史强,魏英杰,张秀芳,等.大鼠心肌梗死后心肌中转化生长因子 β 诱导基因-22蛋白表达的变化规律及白细胞介素-6对其表达的诱导作用[J].*中国循环杂志*,2011,26(3):227 - 230
- 9 Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, *et al.* Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2):415 - 425
- 10 Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? [J]. *Circulation*, 2003, 108(11):1395 - 1403
- 11 Nakashiro K, Kawamata H, Hino S, *et al.* Down - regulation of TSC - 22 (transforming growth factor beta - stimulated clone 22) markedly enhances the growth of a human salivary gland cancer cell line *in vitro* and *in vivo*[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(3):549 - 555
- 12 Yu J, Ershler M, Yu L, *et al.* TSC - 22 contributes to hematopoietic precursor cell proliferation and repopulation and is epigenetically silenced in large granular lymphocyte leukemia[J]. *Blood*, 2009, 113(22):5558 - 5567

(收稿:2012-02-20)

(修回:2012-02-21)

JMJD6 参与调节肿瘤抑制因子 p53 的转录活性

张艳君 程谟斌 代 辉 沈翊琲 张 业

摘 要 目的 确定 JMJD6 与转录因子 p53 的相互作用,研究 JMJD6 对 p53 转录活性的影响,并通过鉴定 JMJD6 的赖氨酸羟化酶活性探讨其可能的作用机制。方法 免疫共沉淀技术和 GST pull - down 实验分析 JMJD6 和 p53 的相互作用及其作用区域;荧光素酶双报告基因系统检测 JMJD6 对 p53 靶基因启动子活性的影响;体外羟基化实验和质谱鉴定 JMJD6 的羟化酶活性。结果 JMJD6 与 p53 相互作用,并由 p53 的 C 端结构域介导;JMJD6 参与激活 p53 的转录活性;JMJD6 具有赖氨酸羟化酶活性,可以催化组蛋白 H4 发生羟基化。结论 赖氨酸羟化酶 JMJD6 可以结合肿瘤抑制因子 p53 并参与调节其转录活性。

关键词 p53; JMJD6; 赖氨酸羟基化

JMJD6 Regulates the Transcriptional Activity of p53. Zhang Yanjun, Cheng Mobin, Dai Hui, Shen Yufei, Zhang Ye. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To verify the interaction between JMJD6 and p53. To detect the effect of JMJD6 on transcriptional activity of p53. To identify the lysyl - hydroxylase activity of JMJD6. **Methods** The interaction between JMJD6 and p53 was examined by co - immunoprecipitation and GST pull - down assay. The effect of JMJD6 on p53 target gene promoter activity was detected by dual - luciferase reporter system. The lysyl - hydroxylase activity of JMJD6 was identified by hydroxylation assay *in vitro* and LC - MS analysis. **Results** JMJD6 interacted with p53 by p53 C terminal fragment. JMJD6 promoted the transcriptional activity of p53. JMJD6 was a lysyl - hydroxylase catalyzing hydroxylation of histone H4. **Conclusion** The lysyl - hydroxylase JMJD6 interacts with p53 and regulates its transcriptional activity.

Key words p53; JMJD6; Lysyl - hydroxylation

p53 蛋白作为一个重要的转录因子,可以调控多种基因的表达,它也是最早发现的肿瘤抑制因子之

一^[1]。有研究表明,在大约 50% 人类癌症中,p53 基因发生了突变。p53 作为一个转录因子,当细胞处于应激状态时,会以四聚体的形式紧密结合 DNA,通过激活一系列下游靶基因,发挥其调控 DNA 修复、调节细胞周期和细胞凋亡的功能^[2,3]。很多研究显示 p53 蛋白的激活是一个多级多因子参与的复杂调控机制,这其中 p53 的翻译后修饰发挥着至关重要的作用^[4]。对 p53 的去乙酰化、磷酸化、泛素化、sumo 化和甲基化、去甲基化修饰的研究也有众多报道。

JMJD6 是 JMJC 结构域家族成员。现已发现具有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171239);教育部博士点基金项目资助(20111106110024)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系、医学分子生物学国家重点实验室(注:张艳君、程谟斌为并列第一作者)

通讯作者:代辉,电子信箱:daihui15@tom.com;沈翊琲,电子信箱:yfshen@pumc.edu.cn;张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn

JMJC 结构域的蛋白多具有组蛋白去甲基化酶活性^[5]。他们以亚铁离子和 α -酮戊二酸为辅助因子,可以催化赖氨酸残基上单甲基、双甲基和三甲基发生去甲基化^[6]。关于 JMJD6 的功能先后有不同报道。2004 年首先发现 JMJD6 具有组蛋白精氨酸去甲基化酶活性,但随后发现 JMJD6 具有赖氨酸羟化酶活性而非精氨酸去甲基化酶活性,它参与 RNA 的剪接,并倾向于结合单链 RNA^[7~10]。目前关于 JMJD6 对 p53 活性的影响尚未有报道,本文旨在分析两者的相互作用,研究 JMJD6 对 p53 靶基因转录活性的影响,并通过鉴定 JMJD6 的赖氨酸羟化酶活性探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1. 材料:(1)质粒及细胞:大肠杆菌 DH5 α 、BL21 菌种由本课题组提供。HEK293T 细胞和 MCF7 细胞为本组保存。H1299 细胞由中科院生物物理所袁增强老师惠赠。质粒 pcDNA6-FLAG-p53 及 pCMV-Tag2B-p53 各删切片段的表达质粒由本课题组保存。POZ-JMJD6 真核表达质粒由基础所梅品超老师提供。14 $\times$ p53-luciferase 报告基因质粒由医科院基础所李雷博士提供。(2)试剂及材料:细胞培养基 DMEM 购自 GIBCOBRL 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司。FLAG 抗体、FLAG-EZview 珠子购自 Sigma 公司,c-Myc 抗体购自 Santa cruz 公司,二抗辣根过氧化物酶标记的抗小鼠和抗兔 IgG 购自 MBL 公司,Glutathione sepharose 4B 珠子购自 GE 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司,T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司,Vigofect 转染试剂购自威格拉斯公司,IPTG 购自 amresco 公司,双报告荧光检测试剂购于 PROMEGA 公司。生物素标记的组蛋白 H4 肽段(氨基酸 1~23)在中科亚光公司合成。

2. 方法:(1)细胞培养:HEK293T 细胞和 H1299 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),培养条件为 5% CO₂,37℃。MCF7 细胞培养于 DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素),培养条件为 5% CO₂,37℃。(2)质粒构建:1) pCMV-3Tag-7-JMJD6 真核表达质粒构建:以 POZ-JMJD6 质粒为模板,设计引物扩增 JMJD6 片段,经 Hind III 和 Sa II 双酶切;载体 pCMV-3Tag-7 经 Hind III 和 Sa II 双酶切后连接。上游引物:5'-GCG AAGCTT AACACAAGAG-CAAGAAGCG-3';下游引物:5'-GCG GTCGAC TCAGGGGT-GAGCCCGGCCT-3'。2) pcDNA6-FLAG-JMJD6 真核表达质粒构建:pCMV-3Tag-7-JMJD6 经 Hind III 和 Sa II 双酶切获得 JMJD6 目的片段,将 Sal I 黏性末端补齐;载体 pcDNA6-FLAG 经 Hind III 和 EcoR V 双酶切后连接。质粒经 Hind III 和 Xho I 双酶切鉴定,电泳可见约 1.2kb 片段。3) pGEX4T2-p53 原核表达质粒构建:pcDNA6-FLAG-p53 经 BamH I 和 Xho I 双酶切获得 p53 目的片段,载体 pGEX4T2 经 BamH I 和 Xho I 双酶切后连接。4) pGEX4T1-p53 删切片段原核表达

质粒构建:pCMV-Tag2B-p53- Δ C(1~313 氨基酸),pCMV-Tag2B-p53- Δ N(96~393 氨基酸),pCMV-Tag2B-p53-core(96~313 氨基酸),pCMV-Tag2B-p53-C(314~393 氨基酸),pCMV-Tag2B-p53- Δ C,- Δ N,-core,-C 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切获得目的片段,载体 pGEX4T1 经 EcoR I 和 Xho I 双酶切后分别连接。(3)原核蛋白表达纯化:GST-p53 各删切体质粒转化大肠杆菌 BL21 菌株,挑取单克隆 37℃ 进行大量培养,至 OD550 达到 0.7,加入终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导,16℃ 培养 20h,5000r/min 收集菌体。菌体用 BC500-10(20mmol/L Tris pH7.9,500mmol/L NaCl,1.5mmol/L MgCl₂,10% 甘油,0.5% TritonX-100)重悬。加入蛋白酶抑制剂(1mmol/L PMSF,1mmol/L DTT),混匀后超声 30s,10 次。最大转速离心收集上清,并加入 glutathione sepharose 4B 200 μ l,4℃ 过夜结合。收集 GST 珠子,分别用 BC500-10 和 BC100-10(20mmol/L Tris pH7.9,100mmol/L NaCl,1.5mmol/L MgCl₂,10% 甘油)洗涤 2 次和 3 次,并用终浓度为 10mmol/L 的还原型谷胱甘肽(50mmol/L Tris pH7.9)洗脱目的蛋白。10% SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白定量。(4)细胞转染:按威格拉斯公司 Vigofect 高效转染试剂说明书进行。(5)免疫共沉淀:将 pCMV-3Tag-7-JMJD6 质粒分别与 pcDNA6-FLAG 或 pcDNA6-FLAG-p53 质粒共转染 HEK293T 细胞,48h 后用冰预冷的 PBS 洗涤细胞 1 次,将细胞吹离瓶壁,悬浮于 PBS 中。3000r/min,4℃ 离心 3min。裂解缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH7.5,150mmol/L NaCl,2mmol/L EDTA,0.2% NP-40,1mmol/L DTT,1mmol/L PMSF,10 μ g/ml leupeptin,10 μ g/ml aprotinin)裂解细胞。将 500 μ g 蛋白裂解液稀释至 500 μ l 的裂解缓冲液中,加入 20 μ l protein A/G agarose 珠子和 1 μ g c-Myc 抗体,将抗体-蛋白混和物于 4℃ 旋转仪上混匀过夜。3000r/min,4℃ 离心 3min,去掉上清。用裂解缓冲液漂洗免疫沉淀复合物 5 次,收集沉淀,加入 1 $\times$ SDS 蛋白电泳上样缓冲液,煮沸 5min,免疫印记分析。(6)GST pull-down:将纯化的 GST 和 GST-p53 删切体蛋白 5 μ g 加入 20 μ l 50% glutathione sepharose 4B 珠子混悬液,轻柔混匀,4℃ 过夜。收集珠子,分别用 BC500-10 和 BC100-10 洗涤 2 次和 3 次。将 pCMV-3Tag-7-JMJD6 质粒转染 HEK293T 细胞,48h 后制备全细胞抽提物。检测蛋白浓度,取 500 μ g 蛋白,加入 RIPA-蛋白酶抑制剂至 500 μ l,加入 20 μ l 50% glutathione sepharose 4B-GST 混悬液,4℃ 条件下轻柔混匀持续 2h。500g,4℃ 离心 5min,弃上清,RIPA 洗涤珠子 5 次,弃上清,加入 40 μ l 1 $\times$ SDS 蛋白电泳上样缓冲液,100℃ 加热 5min。8% SDS-PAGE 凝胶电泳,免疫印迹检测。(7)荧光素酶双报告基因检测:将生长旺盛的 MCF7 细胞和 H1299 细胞用胰蛋白酶消化,铺至 24 孔板,24h 后转染报告基因质粒,内参照质粒 pRL-TK,及相应基因的过表达质粒。37℃、5% CO₂ 孵育 48h,弃去培养基,加入 100 μ l 细胞裂解液,室温 30min。取 10 μ l 检测荧光素酶及 Renilla 活性。(8)体外羟甲基化实验:生物素标记的组蛋白 H4 肽段(氨基酸 1~23)自中科

亚光公司合成,在 HEK293T 细胞中过表达 FLAG - JMJD6,按照 FLAG - EZview 珠子纯化方法获得 FLAG - JMJD6 蛋白。底物混合物体系如下:组蛋白 H4 肽段 (2μg),α - 酮戊二酸 (500μmol/L),抗坏血酸 (100μmol/L),溶于 Tris (50mmol/L, pH 7.5) 中。酶混合物体系如下:FeNH₄SO₄ (100μmol/L),FLAG - JMJD6 (0.5μg) 溶于 Tris (50mmol/L, pH 7.5) 中。将二者混合,置于 30℃ 反应 1h。反应产物用于 LC - MS 分析。

3. 统计学方法:本实验所有比较各组间数据用 *t* 检验,以

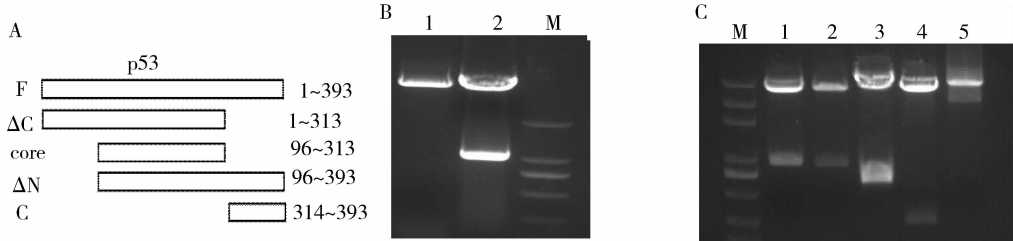


图 1 p53 各表达载体的酶切分析

A. p53 删切体示意图。B. pGEX4T2 - p53 表达质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切图谱:1. pGEX4T2;2. pGEX4T2 - p53;M:DL2000 分子质量标准。C. pGEX4T1 - p53 删切体表达质粒经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切图谱:1. pGEX4T1 - p53 - ΔC;2. pGEX4T1 - p53 - ΔN;3. pGEX4T1 - p53 - core;4. pGEX4T1 - p53 - C;5. pGEX4T1;M:分子质量标准

2. JMJD6 与 p53 的免疫共沉淀分析:将 pCMV - 3Tag7 - JMJD6 及 pCMV - 3Tag - 7 空载体分别与 pcDNA6 - FLAG - p53 共转染 HEK293T 细胞,48h 后收集细胞裂解液,用 c - Myc 标签抗体免疫沉淀,用 FLAG 标签抗体做免疫印迹,结果显示 JMJD6 蛋白和 p53 蛋白可以相互结合,见图 2。

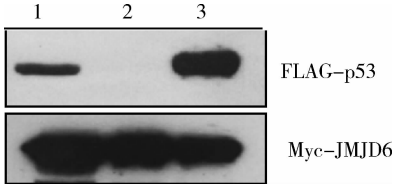


图 2 JMJD6 与 p53 的免疫共沉淀分析

1. 转染 pCMV - 3Tag7 - JMJD6 与 pcDNA6 - FLAG - p53 的细胞裂解液;2. pCMV - 3Tag - 7 与 pcDNA6 - FLAG - p53 共转染, c - Myc 抗体进行免疫沉淀;3. pCMV - 3Tag7 - JMJD6 与 pcDNA6 - FLAG - p53 共转染, c - Myc 抗体进行免疫沉淀

3. p53 及其删切体质粒的原核表达及纯化:在大肠杆菌中分别表达 GST - p53、GST - p53 - ΔC - ΔN、- core、- C 并纯化,通过 SDS - PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色显示全长及各删切体蛋白表达良好,见图 3。

4. JMJD6 与 p53 的 GST pull - down 分析:利用原核表达的 GST - p53 蛋白全长及各删切体与在 HEK293T 细胞中表达的 Myc - JMJD6 进行 GST pull - down 实验,结果显示, GST - p53、GST - p53 - ΔN、GST - p53 - C 可与 JMJD6 结合,而 GST - p53 - ΔC

P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 表达载体的构建和鉴定:pGEX4T2 - p53 质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,电泳可见约 1.2kb 片段。pGEX4T1 - p53 - ΔC, - ΔN, - core, - C 质粒经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,电泳可见相应大小的片段。JMJD6 和 p53 各表达载体经测序鉴定,证明构建成功,见图 1。

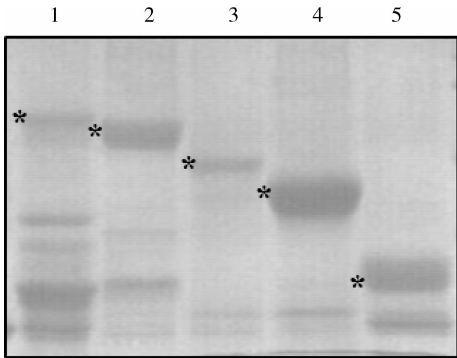


图 3 p53 及其删切体的 SDS - PAGE 分析

1. GST - p53;2. GST - p53 - ΔC;3. GST - p53 - ΔN;4. GST - p53 - core;5. GST - p53 - C

和 GST - p53 - core 不与 JMJD6 结合,说明 JMJD6 和 p53 蛋白可以在体外发生相互作用,p53 的 C 端结构域是 p53 结合 JMJD6 的重要位置,见图 4。

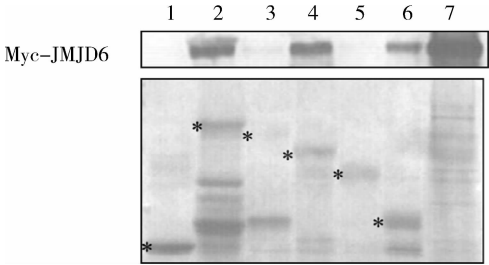


图 4 JMJD6 与 p53 的 GST pull - down 分析

1. GST;2. GST - p53;3. GST - p53 - ΔC;4. GST - p53 - ΔN;5. GST - p53 - core;6. GST - p53 - C;7. 转染 pCMV - 3Tag7 - JMJD6 的细胞裂解液

5. JMJD6 对 p53 靶基因启动子活性的影响:将细胞铺至 24 孔板,24h 后转染 $14 \times \text{p53} - \text{Luc}$ (包含 14 个串联的 p53 结合元件)报告基因质粒 $0.1 \mu\text{g}$,内参照质粒 pRL - TK $0.002 \mu\text{g}$ 及各组质粒,转染 48h 后检测,见图 5。

结果发现无论是在外源转染 p53 的 H1299 细胞中,还是在表达野生型 p53 的 MCF7 细胞中, JMJD6 均可以使 $14 \times \text{p53} - \text{Luc}$ 的荧光素酶活性提高 ($P < 0.05$),激活作用依赖于 p53 蛋白的存在,表明 JMJD6 能够促进 p53 的转录活性。

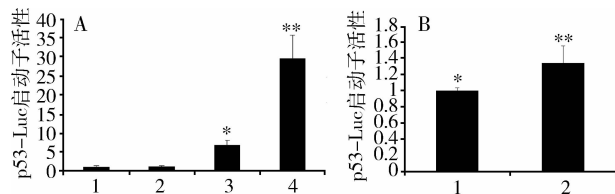


图5 JMJD6 对 p53 靶基因启动子活性的影响

A. H1299 细胞中 JMJD6 对 $14 \times \text{p53} - \text{Luc}$ 启动子活性的影响: 1. pCMV - 3Tag - 7 ($0.9 \mu\text{g}$) + pcDNA6 (0.1 ng); 2. pCMV - 3Tag - 7 - JMJD6 ($0.9 \mu\text{g}$) + pcDNA6 (0.1 ng); 3. pCMV - 3Tag - 7 ($0.9 \mu\text{g}$) + pcDNA6 - FLAG - p53 (0.1 ng); 4. pCMV - 3Tag - 7 - JMJD6 ($0.9 \mu\text{g}$) + pcDNA6 - FLAG - p53 (0.1 ng). B. MCF7 细胞中 JMJD6 对 $14 \times \text{p53} - \text{Luc}$ 启动子活性的影响: 1. pCMV - 3Tag - 7 ($0.9 \mu\text{g}$); 2. pCMV - 3Tag - 7 - JMJD6 ($0.9 \mu\text{g}$), ** 与 * 比较, $P < 0.05$

6. JMJD6 的体外羟甲基化实验:在 HEK293T 细胞中过表达 pcDNA6 - FLAG - JMJD6 质粒,利用 FLAG - EZview 珠子免疫沉淀获得了 FLAG - JMJD6 蛋白作为反应酶,以生物素标记的包含组蛋白 H4 的 N 端 23 个氨基酸的肽段作为底物,进行了体外羟甲基化反应。通过质谱鉴定反应产物,结果显示组蛋白 H4 有 16kDa 的质量迁移,说明 JMJD6 催化组蛋白 H4 发生了羟甲基化反应,具有羟甲基化酶活性。

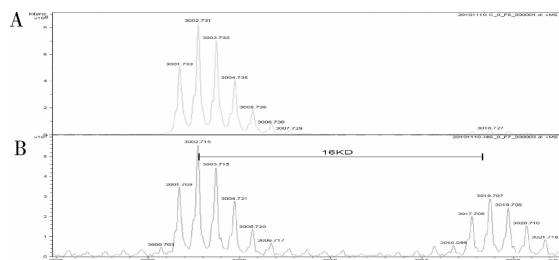


图6 JMJD6 羟甲基化反应的质谱分析

A. 未加入 FLAG - JMJD6 的反应产物;
B. 加入 FLAG - JMJD6 的反应产物

讨 论

组蛋白修饰和转录因子的翻译后修饰研究一直

备受关注^[11,12]。p53 蛋白作为一个重要的转录因子,是最早发现的肿瘤抑制因子之一^[1]。它参与调控 DNA 修复,调节细胞周期和细胞凋亡^[2,3]。很多研究显示 p53 蛋白的激活是一个多级多因子参与的复杂调控机制,这其中 p53 的翻译后修饰发挥着至关重要的作用^[4]。例如,细胞经过紫外(UV)或 γ 射线处理后,p53 的 C 端 6 个赖氨酸可以被 p300 乙酰化修饰,这是激活 p53 转录活性的重要标志之一^[13]。另有报道精氨酸甲基转移酶 PRMT1 介导的 p53 - 333、335、337 位精氨酸甲基化修饰也会影响 p53 的转录活性^[14]。除此之外,对 p53 的去乙酰化、磷酸化、泛素化、sumo 化和赖氨酸甲基化、去甲基化修饰的研究也有众多报道。

JMJD6 是组蛋白去甲基化酶家族成员之一,并具有赖氨酸羟甲基化酶活性,它参与 RNA 的剪接,并倾向于结合单链 RNA^[9,10]。本研究发现 JMJD6 可以与 p53 的 C 端结构域发生相互作用,并激活 p53 的转录活性。在体外羟甲基化 - 质谱分析中发现 JMJD6 可以催化生物素标记的组蛋白 H4 肽段发生羟甲基化反应,这提示 JMJD6 作为赖氨酸羟甲基化酶可能通过羟甲基化 p53 C 端结构域的赖氨酸调控 p53 的转录活性。另外在体外羟甲基化 - 质谱分析中同时发现标记组蛋白 H4 肽段的生物素同样可以被 JMJD6 羟甲基化,提示 JMJD6 可能不具有底物选择的特异性。

目前对 p53 的翻译后修饰(包括乙酰化、去乙酰化、磷酸化、泛素化、sumo 化、甲基化以及去甲基化)的研究已有众多报道。我们相信很多翻译后修饰相关酶类在这一过程中发挥着重要作用,这其中包括赖氨酸羟甲基化酶 JMJD6,可能通过修饰 p53 来调控其转录活性,从而参与到 DNA 修复,细胞周期和细胞凋亡的调控过程中。

参考文献

- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, *et al.* Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas[J]. Science, 1989,244 (4901): 217 - 221
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division[J]. Cell, 1997,88(3): 323 - 331
- Zhang Y, Wang JS, Chen LL, *et al.* Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation - induced apoptosis of Jurkat cells[J]. J Biol Chem, 2004,279(41): 42545 - 42551
- Kruse JP, Gu W. SnapShot: p53 posttranslational modifications[J]. Cell, 2008,133(5): 930 - 30 e1
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument - Bromage H, *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain - containing proteins[J]. Nature, 2006,439(7078): 811 - 816

- 6 Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmJC – domain – containing proteins and histone demethylation[J]. *Nat Rev Genet*, 2006,7(9): 715 – 727
- 7 Chang B, Chen Y, Zhao Y, *et al.* JMJD6 is a histone arginine demethylase[J]. *Science*, 2007,318(5849): 444 – 447
- 8 Hahn P, Wegener I, Burrells A, *et al.* Analysis of Jmjd6 cellular localization and testing for its involvement in histone demethylation[J]. *PLoS One*, 2010,5(10): e13769
- 9 Webby CJ, Wolf A, Gromak N, *et al.* Jmjd6 catalyses lysyl – hydroxylation of U2AF65, a protein associated with RNA splicing[J]. *Science*, 2009,325(5936): 90 – 93
- 10 Hong X, Zang J, White J, *et al.* Interaction of JMJD6 with single – stranded RNA [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(33): 14568 – 14572
- 11 Zhao HY, Zhang YJ, Dai H, *et al.* CARM1 mediates modulation of Sox2[J]. *PLoS One*, 2011,6(10): e27026
- 12 Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications [J]. *Nature*, 2000,403(6765): 41 – 45
- 13 Gu W, Roeder RG. Activation of p53 sequence – specific DNA binding by acetylation of the p53 C – terminal domain[J]. *Cell*, 1997,90(4): 595 – 606
- 14 Jansson M, Durant ST, Cho EC, *et al.* Arginine methylation regulates the p53 response[J]. *Nat Cell Biol*, 2008,10(12): 1431 – 1439

(收稿:2012 – 02 – 27)

(修回:2012 – 03 – 01)

单抗药物组织交叉反应中不同免疫组织化学方法的比较性研究

林 志 吕建军 屈 哲 李珊珊 张 迪 杨艳伟 李 波

摘 要 **目的** 通过两种不同类型的单克隆抗体药物贝伐单抗和美罗华,探讨免疫组织化学常规二步法和直接法在人体组织交叉反应中的应用。**方法** 免疫组织化学常规二步法采用相应二抗,通过底物酶显色,显示单克隆抗体药物与相应组织的结合情况。直接法采用标记后的单克隆抗体药物,通过生物素 – 链霉卵白素系统放大后显色,显示单克隆抗体药物与相应组织的结合情况。**结果** 贝伐单抗采用直接法,其结果特异性和敏感性均高于常规二步法。美罗华直接法不能有效地显示该抗体与相应组织的结合,而常规二步法的结果特异性和敏感性均表现良好。**结论** 不同类型单克隆抗体适合不同的免疫组织化学方法,最佳的实验方法是在尽可能减少背景性染色的同时,采用最低的浓度即能显示单克隆抗体与人体组织的特异性结合。

关键词 单克隆抗体 组织交叉反应 免疫组织化学

Comparative Study of Different Immunohistochemistry Methods in Cross – reactivity of Monoclonal Antibody Drugs. Lin Zhi, Lü Jianjun, Qu Zhe, Li Shanshan, Zhang Di, Yang Yanwei, Li Bo. National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the application of conventional two – step and one – step immunohistochemistry methods in tissue cross – reactivity through two different monoclonal antibody drugs (bevacizumab and rituximab). **Methods** It showed the monoclonal antibody binding to the target tissues by conventional two – step method (indirect immunohistochemistry method) choosing appropriate secondary antibody or one – step method (direct immunohistochemistry method) choosing biotinylated antibody. **Results** In bevacizumab study, the result of one – step method was better than that of two – step method in specificity and sensibility. On the contrary, in rituximab study, it showed rituximab binding to B lymphocyte by two – step method other than by one – step method. **Conclusion** The different immunohistochemistry methods were fit on the different monoclonal antibodies. The best experiment method was to display the specifical binding of monoclonal antibodies in the lowest concentration simultaneously to minimize background staining.

Key words Monoclonal antibody; Cross – reactivity; Immunohistochemistry

单克隆抗体类药物作为一种新型的生物技术药物具有特定的免疫性。如果除了与适应证相关本身

特定的靶器官外,人体正常组织细胞中存在相同或相似的抗原决定簇,单克隆抗体类药物则可能会与非靶器官外的其他组织或细胞结合,从而产生严重的不良反应^[1]。因此单克隆抗体类药物的免疫交叉反应在药物临床前的安全性评价中非常重要。根据 FDA 的相关规定,抗体类药物的免疫交叉反应常常采用正常

基金项目:国家“十二五”科技重大专项基金资助项目 (2012ZX9302001)

作者单位:100050 北京,中国食品药品检定研究院

通讯作者:李波,研究员,电子信箱:libo@niecbp.org.cn