

Onconase 对 B16 黑色素瘤细胞的体内外生长抑制作用

沈如凌^{1,2} 孙瑞林³ 王庆诚² 欧伶¹ 费俭^{2*}

(¹华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; ²上海南方模式生物科技发展有限公司, 上海 201203; ³中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200031)

摘要 Onconase (Onc)是一种从林蛙(*Rana pipiens*)卵细胞内提取的核酸酶, 实验证实其在体外和体内对多种肿瘤细胞都具有显著的杀伤效果。在大肠杆菌中表达纯化的重组 Onc 和天然提取蛋白质具有相似的活性, 通过测定该蛋白质对黑色素瘤 B16 细胞的 IC₅₀ 和建立荷瘤小鼠模型探讨了 Onc 体内外的抗肿瘤效果。实验结果表明: B16 细胞在体外对 Onc 敏感性较 K562 细胞低, 其 IC₅₀ 为 6.37 μmol/L; 但体内每次每只小鼠给予 5 mg/kg Onc 也可显著地抑制 B16 细胞的生长, 延长小鼠的生存时间。实验提供了一种简化高效获得具有天然活性 Onc 的方法, 同时通过 Onc 对低敏感性肿瘤黑色素瘤细胞的杀伤研究, 丰富了对 Onc 抗肿瘤作用的认识, 为治疗黑色素瘤提供了线索。

关键词 onconase; 黑色素瘤; 动物模型; 抗肿瘤

Onconase (又名: P30 protein, ranpirinase, 以下简称 Onc)最早是从林蛙(*Rana pipiens*)卵母细胞和早期胚胎中分离到的一种核酸酶, 属于 RNase A 超家族。Onc 是由 104 个氨基酸组成, 分子量为 11 817 Da, 其氨基酸序列和 RNase A 有 30% 的一致性^[1]。Onc 通过受体介导的胞吞作用进入细胞, 在人体或者哺乳动物细胞中, 因其对 RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor, RI)有很低的亲和性^[2], 使其可以逃避因 RI 引起的失活, 在胞浆内选择性地降解 tRNA, 抑制蛋白质合成进而引起细胞凋亡^[3]。实验证明 Onc 具有良好的抗肿瘤效果, 在体外可以显著抑制多种肿瘤细胞如人白血病细胞株 HL-60^[4]、人结肠癌细胞^[4]、小鼠肺癌 M109 细胞^[5]、人前列腺癌 DU145^[6]等的生长; 在体内动物模型上 Onc 可显著抑制肿瘤生长, 延长动物的生存时间^[5,6]。临床实验表明 Onc 具有相对低的毒性, 低的免疫原性^[7], 目前 Onc 作为一种治疗恶性间皮质瘤的药物已进入 III 期临床阶段^[8], 因而 Onc 是一种极具潜力的抗肿瘤药物。但目前临床实验中所用 Onc 为从蛙卵中提取纯化, 代价高得率低。我们在以前的工作中通过基因合成建立了 Onc 在大肠杆菌中的表达系统^[2], 本文进一步优化了表达产物的纯化方法并验证了产物在体内外抗肿瘤的活性, 证明 Onc 对相对低敏感性的肿瘤也有显著的治疗效果。

黑色素瘤是一种主要发生在皮肤的恶性肿瘤, 恶性程度高, 是皮肤癌的主要死亡原因之一。Onc 对

黑色素瘤是否有治疗作用尚不清楚, 本文通过体外培养小鼠黑色素瘤 B16 细胞和建立 B16 荷瘤小鼠的方法, 研究了在大肠杆菌中表达纯化的 Onc 对黑色素瘤在细胞和整体动物上的抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和动物 表达质粒 pOnc、BL21(DE3)菌株为本实验室收藏; B16 黑色素瘤细胞和 K562 人白血病细胞购自中科院上海生命科学研究院细胞库; C57/B6 小鼠由上海南方模式生物科技发展有限公司提供; RPMI 1640 和 DMEM 培养基购自 Gibico; MTT 购自 Promega; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Onc 制备和纯化 表达质粒 pOnc 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 TB 培养基(terrific broth media)中, 于 37 °C 培养至 A₆₀₀ = 2.0, 加 IPTG 浓度至 0.5 mmol/L, 诱导 3.5 h, 4 °C 离心收集菌体, 菌体经超声破碎离心后得包涵体。

包涵体于 6 mol/L 盐酸胍溶液(含 65 mmol/L DTT)中完全变性后, 缓慢稀释到 20 mmol/L 醋酸溶

收稿日期: 2007-07-16 接受日期: 2007-08-31

上海市科学技术委员会重点项目资助(No.05DZ19322)

* 通讯作者。Tel: 021-65980334, Fax: 021-65981041, E-mail:

jfei124@126.com

液中,调节蛋白质浓度至0.1 mg/ml,在20 mmol/L 醋酸溶液中透析除去变性剂。透析后蛋白质溶液在复性缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0; 0.1 mol/L NaCl; 0.6 mmol/L GSH; 0.9 mmol/L GSSG)中4 °C复性48 h,离心除去沉淀,上清液于10 mmol/L NaHPO₄ 缓冲液(pH 6.0)透析。

透析后蛋白质溶液通过阳离子交换柱(SP Sepharose, Pharmacia), 10 mmol/L NaHPO₄ 缓冲液(pH 6.0)平衡, 1 mol/L NaCl 洗脱; 洗脱蛋白透析除盐后,通过FPLC强阳离子交换柱(Mono S™ HR 5/5, Pharmacia), 10 mmol/L NaHPO₄ 缓冲液(pH 6.0)平衡后, 0~0.5 mol/L NaCl 梯度洗脱, 收集蛋白质样品。15%SDS-PAGE 和 HPLC 鉴定样品纯度。

1.2.2 MTT 法细胞毒性检测 黑色素瘤 B16 细胞培养于含 10% 小牛血清, 青霉素(100 u/ml), 链霉素(100 µg/ml) RPMI 1640 (Gibico) 培养基中; 人白血病细胞 K562 培养于含 10% 小牛血清, 青霉素(100 u/ml), 链霉素(100 µg/ml) DMEM (Gibico) 培养基中。96 孔板, 每孔加 90 µl 培养液(5×10^4 个/ml), 5%CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 按设定的浓度梯度加 10 µl 蛋白质样品, 对照组加 PBS, 培养 72 h 后, MTT 法检测细胞存活率。

1.2.3 Onc 对荷瘤小鼠的肿瘤抑制效果检测 收集处于对数生长期的黑色素瘤细胞, 调节细胞密度为 4×10^6 个/ml, 取 200 µl, 用微量注射器接种于小鼠后腿右侧皮下, 一周后, 随机分为 3 组, 生理盐水组 5 只, 实验组(低剂量给药组和高剂量给药组)各 8 只。接种 B16 细胞后第 8 天开始腹腔注射给药, 生理盐水组每次每只注射 100 µl 生理盐水, 实验低剂量给药组每次每只注射 2.5 mg/kg Onc, 高剂量组每次每只注

射 5 mg/kg Onc, 每隔 2 天给药一次, 共 3 次。自给药起, 每 3 天用游标卡尺测量肿瘤长和宽一次, 按照公式肿瘤体积 $V = (D \times d^2)/2$ 计算肿瘤体积, 其中 D 为肿瘤长径, d 为肿瘤短径。

1.2.4 数据统计分析 肿瘤体积随时间生长曲线各组间用 Student's *t*-test 比较; 小鼠存活率时间曲线各组间用 Log-rank test 统计分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 Onc 的表达、纯化

经过诱导、表达、超声破碎菌体后, 1 L TB 培养基可得到约 200 mg 包涵体粗品, 随后, 经变复性和两步离子交换柱纯化可获得约 20 mg Onc (图 1 a), 经 HPLC 鉴定其纯度大于 95% (图 1 b)。

2.2 Onc 对 B16 和 K562 细胞的细胞毒性

由图 2 可见, 纯化获得的 Onc 对黑色素瘤细胞 B16 的细胞毒性 IC₅₀ 约为 6.37 µmol/L (75.3 µg/ml), 而对人白血病细胞 K562 的 IC₅₀ 约为 0.76 µmol/L (8.98 µg/ml), 在 K562 细胞上, 重组 Onc 的 IC₅₀ 与从蛙卵中纯化获得的蛋白质活性相近^[10]。

2.3 Onc 对黑色素实体瘤的抑制效果

从肿瘤生长趋势(图 3)可得, 高剂量 Onc 给药明显抑制了黑色素瘤在小鼠体内的生长($P < 0.05$, Student's *t*-test), 而低剂量 Onc 对肿瘤的抑制在早期不明显, 在后期有一定的抑制效果。

由图 4 所示的小鼠存活率时间曲线可得, 高剂量 Onc 给药较生理盐水对照组显著性地延长了荷瘤小鼠的存活时间($P < 0.008$, Log-rank test), 生理盐水组小鼠接种肿瘤 17 天即出现死亡, 到 23 天死亡率达

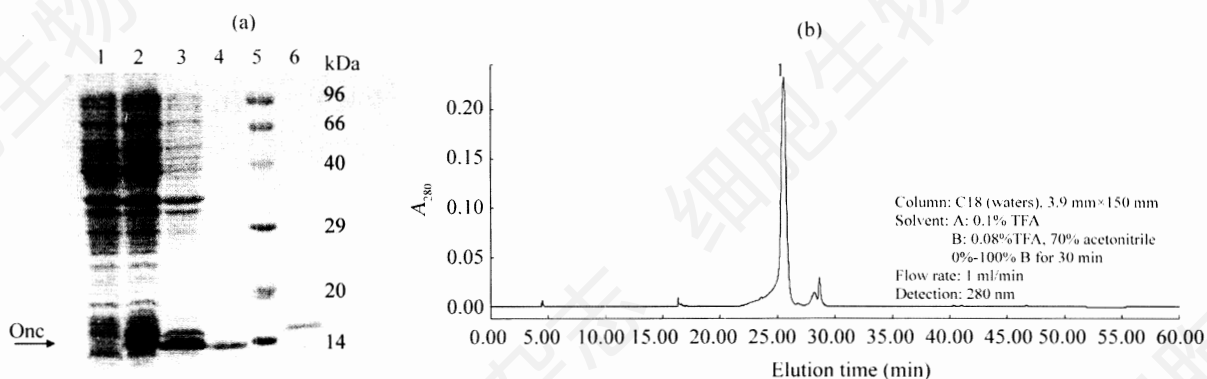


Fig.1 Expression and purification of Onc

(a) SDS-PAGE electrophoresis analysis. 1: total protein in bacteria without IPTG inducing; 2: total protein in bacteria with 0.5 mmol/L IPTG inducing for 3.5 h; 3: total inclusion body in bacteria induced by 0.5 mmol/L IPTG for 3.5 h; 4: purified Onc, 2 µg; 5: protein marker; 6: purified RNase A, 1.5 µg. (b) HPLC analysis of Onc purity.

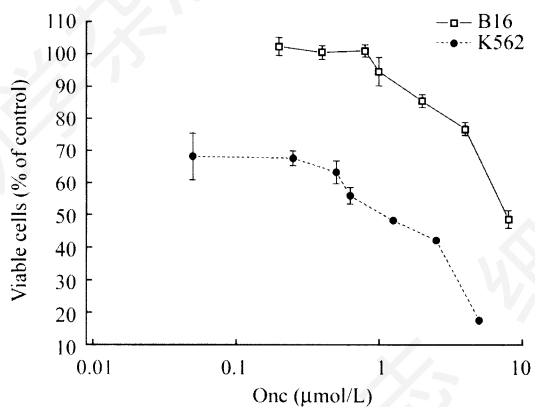


Fig.2 Cytotoxicity of Onc on B16 and K562 cells

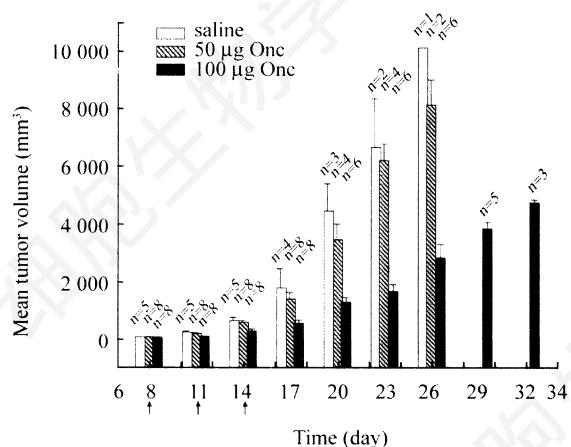


Fig.3 The development of B16 tumor size in different treatment groups

After inoculating i.p. with B16 cells in the 1st day, mice began to be treated i.p. with Onc from the 8th day. The saline group ($n=5$ /group) was given 100 μ l/injection saline per time as the negative control. The low-dose group ($n=8$ /group) was given 50 μ g/injection Onc per time. The high-does group ($n=8$ /group) was given 100 μ g/injection Onc per time. The injection was performed 3 times that indicated by arrow in the figure. The $P<0.05$ is considered as statistically significance, Student's t -test.

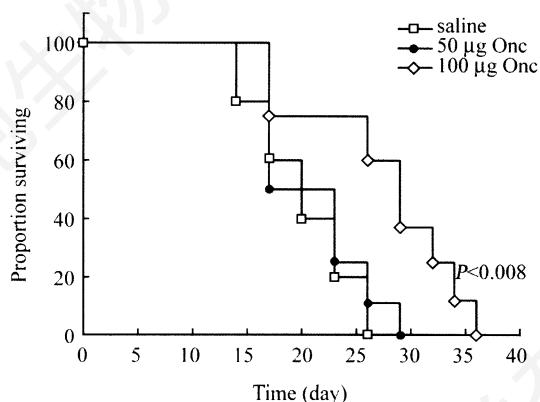


Fig.4 proportion surviving-time curves of mice

60%, 而高剂量组小鼠接种肿瘤 20 天出现死亡, 到 60% 死亡率时需要 32 天; 高剂量 Onc 给药组小鼠平均存活时间为 30 天, 生理盐水组小鼠平均存活时间为 23 天, 高剂量给药组较生理组存活时间延长 30%。在低剂量下, 荷瘤小鼠的存活率与生理盐水组相比无显著性改善。

3 讨论

尽管 Onc 杀细胞的具体机制仍不清楚, 但作为第一个进入 III 期临床的抗肿瘤核糖核酸酶药物, Onc 因其良好的体内体外抗肿瘤效果, 一直为人们所关注。但是, 目前发表的体内数据仍然有限, 同时蛙卵中提取纯化的方式也限制了产量和应用。本文利用在大肠杆菌中表达纯化获得的 Onc, 在细胞和荷瘤小鼠模型上探讨了 Onc 对黑色素瘤的抗肿瘤效果。

因蛙卵提取代价高产量低, 不同的实验室采用不同的基因工程方法对 Onc 进行了表达, Boix 等^[10]在大肠杆菌中表达了 23 位由蛋氨酸突变为亮氨酸的 (M23L)-Onc, 结果发现其抗肿瘤效果较天然蛋白低; Eugenio 等^[11]在大肠杆菌中表达了 Onc, 但因天然 Onc 在 N 端的特殊结构, 必须将表达的 Onc 第一位的蛋氨酸去掉, 增加了流程; 我们实验室^[9]利用 pET22b(+) 质粒上的 pelB 信号肽在大肠杆菌中表达 Onc 的融合蛋白, 通过优化条件可将 Onc N 端前的信号肽切去, 使其具有和天然蛋白相同的 N 端, 通过变复性获得了具有天然活性的蛋白质, 本文在此基础上进一步优化了纯化条件, 通过两步离子交换柱层析即可获得纯度大于 95% 的 Onc, 终产率超过 10%, 相较于其他方法, 简化了纯化步骤, 提高了产率。

实验中发现, 通过大肠杆菌中表达纯化获得的 Onc 对 K562 细胞具有与天然 Onc 相似的 IC_{50} ^[11]; Onc 对 B16 细胞的 IC_{50} 为 75.3 μ g/ml 高于 K562 人白血病细胞 8.98 μ g/ml 近 10 倍, 更远远大于 DU145 人前列腺癌细胞 2 μ g/ml 和 H4IIE 大鼠肝癌细胞 5 μ g/ml^[9]的水平, 与这些细胞相比说明 B16 对 Onc 具有较低的敏感性, 但体内实验显示, 按每次每只小鼠注射 5 mg/kg Onc 给药共注射 3 次即可显著抑制肿瘤的生长, 同时可延长小鼠存活时间 30%, 说明即使针对黑色素瘤这种对 Onc 相对低敏感性的肿瘤, Onc 仍有较好的治疗效果, 这一结果为拓展 Onc 治疗肿瘤的范围提供了实验基础, 结合其他对 Onc 具有高敏感性肿瘤细胞体内试验结果, 丰富了我们 Onc 的抗肿瘤效果的认识。

黑色素瘤恶性程度高,目前主要采用切除病变组织,结合放疗、化疗等手段进行治疗,研究表明 Onc 与它莫西芬、长春新碱等化疗药物联用,可增加化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效果^[7,12],因此基于本文 Onc 体内实验数据及临床治疗结果,我们有理由相信,在治疗黑色素瘤的过程中化疗药物与 Onc 联用,可能会减少化疗药物的副作用,取得更好的效果。

总之,本文通过优化条件简化了大肠杆菌中表达纯化 Onc 的流程,提高了产率,同时通过 Onc 对黑色素瘤 B16 细胞的体内体外抗肿瘤效果研究发现, Onc 对于体外低敏感性的肿瘤细胞,在体内仍有显著的抗肿瘤效果,增加了我们对 Onc 抗肿瘤效果的认识,拓展了 Onc 的抗肿瘤谱,为人类黑色素瘤的治疗提供了

新的思路。

参考文献(References)

- [1] Ardeli W *et al.* *J Biol Chem*, 1991, **266**: 245
- [2] Boix E *et al.* *J Mol Biol*, 1996, **257**: 992
- [3] Lin JJ *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **204**: 156
- [4] Darzynkiewicz Z *et al.* *Cell Tissue Kinet*, 1988, **21**: 169
- [5] Mikulski SM *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1990, **82**: 151
- [6] Lee I *et al.* *J Surg Oncol*, 2000, **73**: 164
- [7] Mikulski SM *et al.* *Int J Oncol*, 1998, **13**: 633
- [8] Mikulski M *et al.* *J Clin Oncol*, 2002, **20**: 274
- [9] 许国峰等. *实验生物学报*, 2004, **37**: 227
- [10] Notomista E *et al.* *FEBS Lett*, 1999, **463**: 211
- [11] Kim BM *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**: 976
- [12] Rybak SM *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 1996, **88**: 747

Growth Inhibition Effect of Onconase on B16 Melanoma Cells *in Vivo* and *in Vitro*

Ru-Ling Shen^{1,2}, Rui-Lin Sun³, Qing-Cheng Wang², Ling Ou¹, Jian Fei^{2*}

¹State Key Laboratory Bioreactor Engineering of East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

²Shanghai Biomodel Organism Technological Development Company Ltd., Shanghai 201203, China;

³Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Onconase, a ribonuclease firstly extracted from oocytes of frog (*Rana pipiens*), displays significant anti-tumor effects against many kinds of tumor cell lines *in vivo* and *in vitro*. We have expressed and purified the recombinant Onc in *E.coli*. The recombinant protein has similar activity as its natural form previously reported. The IC₅₀ of the recombinant protein on B16 cell was tested and its anti-tumor activity was studied on the B16 melanoma animal model. The results showed that Onc has a pronounced effect on B16 cell (IC₅₀ = 6.37 μmol/L), and greatly inhibits the growth of tumor cells and retard the mice's death. The experiment offers an efficient simple method to produce the recombinant Onc protein with similar activity as the natural one, and enriches the knowledge of Onc for its anti-tumor role and provides some clues for melanoma therapy.

Key words onconase; melanoma; animal model; anti-tumor

Received: July 16, 2007 Accepted: August 31, 2007

This work was supported by the Key Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (No.05DZ19322)

*Corresponding author. Tel: 86-21-65980334; Fax, 86-21-65981041, E-mail: jfei124@126.com