

Onconase 研究与开发的最新进展

田 雪^{1,2} 王庆诚^{2*} 沈如凌² 徐殿胜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上海南方模式生物研究中心, 上海 201210)

摘要 Onconase是一种在北方豹蛙(*Rana pipiens*)卵母细胞和早期胚胎内存在的核糖核酸酶,是RNase A超家族中的一员,研究证实它在体内外对多种肿瘤均具显著杀伤作用。Onconase目前已经作为抗肿瘤药物上市,用于治疗恶性间皮瘤。Onconase结构独特,高度稳定。在临幊上,Onconase具有副反应较轻,免疫原性低和不易产生耐药性等优点。因此Onconase的研究在学术上和医学应用上均具重要意义。本文综述了Onconase的结构特点、催化专一性、细胞毒性、体内外抗肿瘤活性及其临幊应用的最新进展,并讨论了与其相关的一些重要问题。

关键词 Onconase; RNase; 抗肿瘤; 免疫毒素

1 引言

Onconase是存在于北方豹蛙的卵和早期胚胎中的一种核糖核酸酶。它对不少肿瘤细胞具有很强的细胞毒性,是迄今唯一一个已用于肿瘤临幊治疗的核糖核酸酶。Onconase研究的兴起是两个领域研究进展汇合的结果。首先它是核酸酶研究发展的产物。从四十年代起,以牛胰核糖核酸酶(RNase A)为代表的核糖核酸酶的结构、功能、催化机制和酶动力学等都得到了深入的研究。RNase A还成了各种生化新技术和新方法建立过程中的模型蛋白质,可以说RNase A是当今世界上研究得最透彻的蛋白质之一。与此同时,人们也企图尝试用核糖核酸酶抑制肿瘤的生长。早在50年代中后期,Ledoux等^[1]即尝试用RNase A治疗动物体内的肿瘤,未见任何疗效。其他人报告:只有将几毫克RNase A直接注射到肿瘤内,才有抗肿瘤活性^[2]。1972年,韩国的Yun等^[3]发表了RNase A治疗肿瘤的第一份临幊试验报告,共有23名病人参加试验,未见疗效。然而,将大量酶(每天每公斤体重给予3毫克以上)直接注入瘤内,可见肿瘤生长减慢甚至消失。尽管有这么一点点进展,人们仍普遍认为RNase A作为抗癌药物的潜力不大,对此的兴趣消退了一阵。

早在80年代末,Darzynkiewicz等^[4]从北方豹蛙(*Rana pipiens*)卵母细胞和早期胚胎中提取了蛋白P-30,并发现纯的蛋白P-30及其粗提物(Pannon)在体外能有效抑制人白血病细胞株HL-60、人髓下腺癌细胞株A-253和人结肠腺癌细胞株Colo320CM等的生长并杀死细胞,同时体内实验进一步证明了其抗肿瘤活性。1991年,Albelt等^[5]测出它的氨基酸全部序

列,并且根据oncology(肿瘤学)和ribonuclease(核糖核酸酶)两词,将其命名为Onconase。在部分文献中,Onconase也被称作Ranpirnase。Onconase的发现重新显现了核糖核酸酶作为抗癌药物的潜力。美国AlfaCell公司已完成Onconase治疗恶性间皮细胞瘤的III期临幊试验,欧盟、澳大利亚和美国已批准其作为非常见病药物在临床应用^[2]。

另一个推动Onconase研究的动力来自免疫毒素发展的需求。免疫毒素通常由两部分构成,一是弹头药物,一般使用对蛋白质生物合成具强烈抑制作用的植物毒蛋白,如蓖麻毒蛋白A链或细菌毒蛋白,又如去掉结合结构域的白喉毒素或绿脓杆菌外毒素。另一为导向配基,如对肿瘤有专一结合能力的单抗,生长因子或细胞激动素,如EGF或IL-2等。现有最有效的免疫毒素大多由细菌毒素构建,它们最大的优点在于依靠催化原理使细胞的蛋白质生物合成系统失效,只需几个活性的毒素分子进入胞浆,即足以杀死细胞。目前几个最成功的临幊试验证明,免疫毒素具有低剂量,低毒性,有的甚至显现惊人疗效^[6]。然而,由于所用细菌毒素的免疫原性太高,使其应用范围大多限于一部分白血病或淋巴瘤以及脑瘤等。对于大量病人所患的实体瘤则效果有限,主要是由于用药后不久,病人体内产生的中和抗体会抵消免疫毒素的药效。曾在免疫毒素研究中作出重大贡献的Youle^[7],早在90年代即注意到Onconase。他和Rybak

等^[8]不仅对 Onconase 作了不少机制研究, 还用低免疫原性的 Onconase 代替传统的毒蛋白作为弹头药物构建免疫毒素, 取得了很大进展。Onconase 本身具有选择性杀伤肿瘤的能力, 制成免疫毒素后, 有可能成为更专一、更有效的抗癌药物。由于导向配基的多样性, 制成免疫毒素后, Onconase 治疗肿瘤的适用范围将进一步扩大。

Onconase 是一个独特的酶, 并具重要的临床应用价值。本文将就人们最为关注的一些问题, 对 Onconase 做一个简明的介绍和讨论。

2 Onconase 如何杀死细胞?

Onconase 的抗肿瘤作用和它的核酸酶活性直接相关, Onconase 通过降解胞质内 tRNA 从而使靶细胞启动 caspase 依赖的凋亡途径^[9,10], 其降解 RNA 的主要作用位点为 UG、GG 以及位于 tRNA 可变环或 D 形镜臂的 UGG^[11]。Onconase 被突变或被甲基化修饰后, 其酶活性和细胞毒性都同时下降或被抑制^[7,9]。Onconase 被碘代乙酸烷化后, 其衍生物只残留有 2% 的核酸酶活力, 也未表现出细胞毒性^[12]。这说明 Onconase 降解 RNA 的催化活性是其细胞毒性的必要条件。然而, Onconase 的细胞毒性并非仅仅取决于其催化活性, 而与多种因素有关。哺乳动物中核酸酶通过化学修饰增加其正电荷后, 只剩下 1.5% 的催化活性, 却仍具有细胞毒性; 而未被修饰的核酸酶具有 100% 催化活性却无毒性作用^[13]。

Onconase 的活性中心位于 N 端的 α 融合螺旋和两组 “V” 字型交叉的 β 折叠构成的凹槽中, Lys9、His10、Lys31、His97、Phe98 都是酶活性中心的组成部分。Onconase 的 N 端没有游离氨基, 而是由去除起始的 Met 后新生的氨基与第二个残基 Gln 形成的焦谷氨酰胺。其 N 端的焦谷氨酰胺通过氢键和 Lys9 相互作用, 也是酶活性中心的组成部分。N 端带 Met 的重组 Onconase 酶活性只有天然 Onconase 的 1%^[14]。将 Lys9 或 Lys31 突变为 Ala, 酶活力会降低 1 000 倍^[13]。在细胞内, Onconase 表现为选择性的降解 tRNA, 而 rRNA 几乎观察不到降解, 但如果经体外将 rRNA 提纯, 并除去蛋白质后, Onconase 对 tRNA 和 rRNA 的降解没有选择性^[15]。所以在细胞内, 有可能是结合在 rRNA 上的蛋白质保护了 rRNA 不被 Onconase 降解。

目前认为, Onconase 首先与细胞表面结合, 然后与细胞膜发生相互作用, 通过胞吞进入胞质溶胶, 降

解胞内 RNA 进而诱导细胞凋亡^[16,17]。

Onconase(Onc)进细胞的第一步是 Onc- 胞膜之间相互作用, 包括 Onc 与内在受体、膜上脂双层以及离子转运通道之间的作用。细胞膜表面具有带负电的糖类物质可以直接与带正电的 Onconase 结合, 这种结合并不专一。已知 Onc 在质膜上有受体样的结合位点, 尽管具体结合位点并不明确^[18]。

Onconase 进细胞的第二步是通过胞吞或转运方式实现内化。这一胞吞途径不需要内质网的运输, 也不受发动蛋白介导, 依赖于笼形蛋白, 主要受内涵体的调控^[19], 通过循环利用内涵体由内涵体内腔转移到胞质溶胶^[20]。酸性小体也是其进细胞的必要方式。这种机制需要胞质 ATP 水解提供能量, 不需要分子伴侣。

Saxena 等^[21]将 RNases 微量注射进入细胞浆, 显现的细胞毒性比将 RNases 加在细胞培养液中时大很多。这说明, Onconase 必须到达胞浆才能发挥细胞毒性作用, 其内吞是其细胞毒性的限制因素。Wu 等^[7]用同位素¹²⁵I 标记的方法研究 Onconase 和 9L 细胞(神经胶质瘤细胞)的结合, 用 Scatchard 作图法测得两个 K_d (解离常数), 分别为 6.2×10^{-8} M 和 2.5×10^{-7} M, 其中低亲和性 K_d 值和 Onconase 对 9L 细胞的 IC₅₀ 非常吻合。每个细胞上每种亲和性位点分别可结合 3×10^5 Onconase 分子。此外, Onconase 穿过细胞膜的途径与温度相关, 并且需要能量分子的参与, 这些都是受体介导内吞的特征, 然而细胞表面与 Onconase 结合的特定受体迄今尚未找到。Hiaqis 和 Raines^[20]用荧光跟踪技术发现, Onconase 内吞途径与经典的笼形蛋白(clathrin)和发动蛋白(dynamin)相关型受体介导内吞途径不同。Onconase 在细胞内的浓度和胞外的浓度成正比, 没有饱和性。升高内吞小泡和溶酶体的 pH 值对 Onconase 的毒性并没有明显影响。破坏高尔基体结构的药物 Retinoic Acid 和 Monensin 能增加细胞对 Onconase 的敏感性^[19]。因此目前认为, Onconase 通过与细胞膜非特异性的结合, 以能量依赖型内吞方式进入内吞小泡, 一部分 Onconase 由内吞小泡进入胞质, 一部分 Onconase 通过内吞小泡和高尔基体融合而进入高尔基体。

Altomare 和 Rybak 等^[22]用微点阵(microarray)技术分析了 Onconase 处理对恶性间皮瘤细胞中基因表达的影响, 发现 Onconase 能调节 155 种基因的表达。其中 2/3 基因表达被上调, 1/3 被下调。这些基因中, 有些会影响凋亡(IL-24 和 TNFAIP3), 转录(DDIT3、

MAFF、HDAC9 和 SNAPC1)、发炎和免疫反应(IL-6 和 COX-2)等。Onconase 处理的间皮细胞瘤 M35 对 Onconase 最敏感, ATF3(激活转录因子3)的表达最高, 而 M25 细胞对 Onconase 最不敏感, ATF3 的表达也最低。ATF3 的增加会抑制肿瘤细胞的生长^[23]。这项研究的结果对“Onconase 细胞毒性主要归因于 t-RNA 的降解”的说法冲击很大。造成 Onconase 细胞毒性的原因可能要复杂得多。如果完全归因于 t-RNA 的降解, 所有蛋白质的合成应该全都下降, 为何很多蛋白质的合成会增加? 因此一些科学家假设 Onconase 可能会调节 microRNA, Onconase 的细胞毒性可能部分地归因于它对 miRNA 的作用。上述微点阵分析工作还发现, 有九个与 Onconase 处理相关的基因影响由 RNA 聚合酶 II 启动子启动的转录。其中 CEBPB 是 miRNA-155 的靶, miRNA-155 在某些肿瘤内是上调的^[24]。在恶性间皮细胞瘤中, Onconase 会降低它的水平(KShogen 的未发表工作)^[22]。这方面的工作十分初步, 有待今后深化。

3 为什么 RNase A 细胞毒性极低, 而 Onconase 的细胞毒性很强?

RNase A 由 124 个氨基酸残基构成, 分子量(Mr)13.7 kDa; Onconase 由 104 个氨基酸残基构成, 分子量(Mr)11.82 kDa, 与 RNase A 在一级结构上有 30% 相似性, 在三级结构上也很相似(图 1)。两个酶同属 RNase A 超家族。两者的催化机制相仿。两者的细胞毒性都基于它们降解 RNA 的催化活性, 如用碘乙酸修饰它们的活性中心残基, 两者均会失去大部分细胞毒性^[13]。然而, RNase A 降解 RNA 的催化活性比

Onconase 高好几个数量级, 而它的细胞毒性却比 Onconase 低好几个数量级。为什么? 原因可能有几个。首先, 在哺乳动物细胞中存在相当量(大约细胞总蛋白的万分之一到千分之一)的 RNase 抑制剂蛋白(RI), RNase A 和它的超家族中大部分成员的细胞毒性会被它抑制, 而 Onconase 恰好不被 RI 抑制。实验证明, RI 能和 RNase A 以 1:1 的比率紧密结合, 抑制核酸酶的活性。其 Ki 达 5.9×10^{-14} mol/L, 抑制作用异常强烈^[25]。最近 Turcotte 等^[26]测得, 人 RI 在低离子强度条件下对人胰 RNase1 的抑制作用的 Ki 为 0.15×10^{-6} mol/L。这可能是两者细胞毒性相差悬殊的重要原因。

Onconase 较 RNase A 稳定得多, 可能是它的细胞毒性较高的第二个原因。

Onconase 的 N 端和 C 端结构都比较特殊, 对 Onconase 酶活性和稳定性影响很大。在去除起始的甲硫氨酸后, N 端第二个氨基酸谷氨酰胺在天然蛋白中自动环化为焦谷氨酰胺, 将 N 端封闭。C 末端的 Cys104 和 Cys90 形成一对二硫键将 C 末端封闭。另外, 分子内还有 3 对二硫键。这种特殊结构使其异常稳定, 相转换温度 Tm 高达 90°C, 并能抵抗蛋白酶的水解作用, 而 RNase A 的 Tm 仅为 60°C 左右。

最新研究表明, N 端的焦谷氨酰胺、位于第一个 α 螺旋和第一个 β 折叠间的疏水簇以及 C 端的二硫键是其稳定性的主要原因。如果将 Cys104 突变为 Ala, 则会破坏 Cys104 和 Cys90 之间的二硫键, Onconase 的热稳定性和抗蛋白酶水解能力均明显下降^[28,29]。

Monticello 和 D'Alessio^[30]用 siRNA 技术使 HeLa

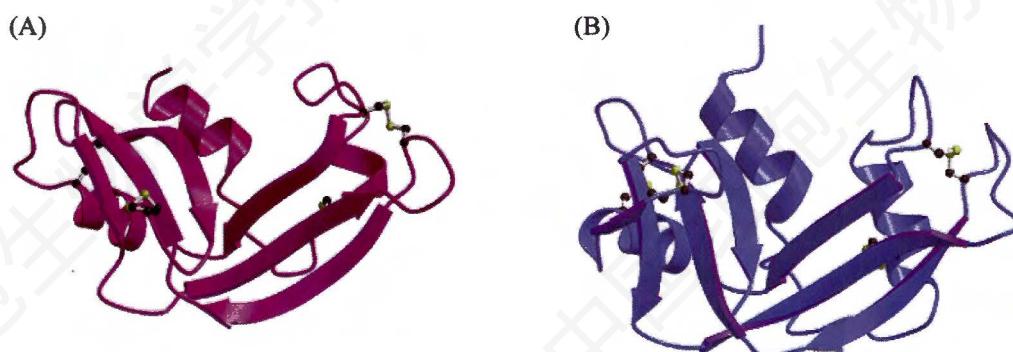


Fig.1 Three-dimensional structure of Onconase and RNase A

Three-dimensional structure of Onconase (A) and RNase A (B), which is a homologue of Onconase. This figure was copied from the paper, “Contribution of active-site residues to the function of Onconase, a ribonuclease with antitumoral activity”^[27] with the permission of Professor Ronald T Raines of University of Wisconsin at Madison.

细胞的胞浆 RNase 抑制蛋白(cRI)的表达静默, 结果使原本具有细胞毒性的 RNase, 如牛精管 RNase 变得更强, 而原本无毒的 RNase, 如 RNase A 仍然不显毒性。他们没有对上述发现作出明确的解释, 但至少说明 RNase A 超家族中许多成员细胞毒性低不能完全归因于 cRI 的抑制作用。

Turcotte 等^[31]最近发现, Onconase 的细胞毒性主要由正电荷在酶分子表面的分布而不是其总值决定的。在酶催化活性和构象稳定性基本相似的情况下, 具有相同净电荷, 但其分布不同的 Onconase 变种的细胞毒性可能相差十倍之多, 然而它们的内吞最多相差一倍。分子的正电荷肯定在膜转位过程中具重要作用, 但上述内吞速率不大的差别不足以解释细胞毒性很大的不同。作者也没有提到他们的电荷分布决定细胞毒性的理论是否适用于解释 Onconase 与 RNase A 细胞毒性的巨大差异。这个问题相当复杂, 有待今后深入研究。

4 为什么 Onconase 对肿瘤细胞具选择性杀伤能力?

肿瘤细胞所带的负电荷往往比正常细胞多, 而 Onconase 是个带很强正电的酶, 可能有更多的 Onconase 分子被肿瘤细胞结合和内吞。然而如前所述, 电荷对细胞毒性的影响是个相当复杂的问题, 似乎不足以成为决定 Onconase 选择性细胞毒性的主要原因。同时迄今未发现有专门结合 Onconase 的受体存在, Onconase 与细胞的结合也不具明显的专一性。虽然研究得还不很清楚, 目前普遍认为, 肿瘤细胞和正常细胞所处细胞周期上的差别, 可能是 Onconase 能选择性杀伤肿瘤细胞的主要原因。

虽然对一些细节问题各家认识不尽相同, 目前认为 Onconase 是通过降解胞内 tRNA, 抑制蛋白质正常合成过程, 将细胞周期阻断在 G₁ 期, 然后伴随着核酸内切酶, 脱门蛋白酶, 丝氨酸蛋白酶和转谷氨酰胺酶的激活从而诱发细胞凋亡^[32]。

Michaelis 等^[33]发现, Onconase 将成神经瘤细胞周期阻断在 G₁ 期, 并诱导不依赖于半胱天冬酶的细胞凋亡, 从而抑制肿瘤的生长。Smith 等^[12]发现, Onconase 和 RNase A 在对成纤维细胞 NIH/3T3 毒性机制上存在差别, Onconase 介导的细胞凋亡与细胞周期有很大相关性, 处于后 G₁/S 期和 S 期的细胞更敏感。也有人提出^[34], Onconase 通过特异性诱导恶性间皮瘤细胞编程性凋亡进而杀死肿瘤。

Onconase 在临床试验中未见其对骨髓细胞造成损伤, 也未见明显的毛发脱落。这些快速生长的细胞为什么对 Onconase 的作用不敏感? 迄今未有答案。

5 改变核酸酶结构对它们的催化活性与细胞毒性的影响

早在 1955 年 Ledoux^[1]已尝试将毫克量 RNase A 注入肿瘤内, 以观察其细胞毒性。然而剂量小一点即无效果^[35]。因此一般认为 RNase A 没有细胞毒性^[36]。此后研究发现, 在哺乳动物细胞内广泛存在核酸酶的抑制蛋白 Ribonuclease Inhibitor(RI)^[37]。这是 RNase A 和它的超家族大部分成员缺乏细胞毒性的主要原因。RI 有很强的保守性, 猪 RI(pRI) 和人 RI(hRI) 氨基酸序列有 77% 的相似性。在动物细胞中 RI 的含量比较高, 占细胞质总蛋白的 0.01%~0.1%。上文提到, RI 能和 RNase A 以 1:1 的比率紧密结合, 抑制核酸酶的活性。其 K_i 达 5.9×10^{-14} mol/L, 抑制作用异常强烈^[25]。通过分析 hRI-RNase A 复合物的空间结构, 发现 RI 是一个马蹄形蛋白, 其外圈是多个 α 螺旋, 内圈是多个 β 折叠, 且两者线性平行, 在这个结构中, RNase A 和 RI 的相互作用点包括了 RNase A 酶活中心的氨基酸(Lys41), 也包括了处在 RNase A 表面环状结构处的氨基酸(Gly88)^[38]。同时将 Lys41、Gly88 突变为 Arg, RNase A 和 RI 的结合会减弱 20 倍, 而对细胞的毒性却增加 3×10^4 倍^[13]。将 RNase A 直接注射入蛙卵细胞, 发现蛙卵细胞对 RNase A 也是敏感的^[39]。所以是动物细胞内 RI 的存在抑制了 RNase A 的活性。然而, RI 对 Onconase 却没有明显的抑制作用^[40], Onconase 和 RI 结合常数很低, Onconase-RI 的 K_d 是 RNase A-RI K_d 的 10^7 倍^[7]。因此, 胞内的 RI 含量也在很大程度上决定了细胞对 RNase 的敏感度。

Onconase 的一级结构与 RNase A 有 30% 相似性, 三级结构和催化机制也很相似, 但 Onconase 降解 RNA 的能力远低于 RNase A, 而 RNase A 的细胞毒性远低于 Onconase。基于 RNase 细胞毒性与其催化活性有相关性, 因此不难设想, 如果一个 RNase 具有 RNase A 那样的高催化活性, 又像 Onconase 那样不受 RI 的抑制, 一定会具有非常强的抗肿瘤细胞活性。然而将 RNase A 或 RNase1 的结构改得接近于 Onconase, RI 对其的抑制变小了, 但其催化活性也相应降低了。反之也然。虽然这类工作做了不少, 但迄今还没有得到细胞毒性远远胜过 Onconase 的 RNase 新变种^[39]。其中比较成功的是美国 Quin-

tessence Bioscience 公司的 RNaseQBI-139, 它是在 Wisconsin 大学的 Ronald T Raines 教授工作的基础上发展出来的人胰 RNase 1 的一个变种。它对肿瘤细胞的毒性稍强于 Onconase, 但它是人源的, 几乎没有免疫原性。RNase QBI-139 和一系列类似的产品将可能成为 Onconase 重要的竞争对手。

6 Onconase 在肿瘤治疗上的应用

6.1 体外抗肿瘤活性

体外实验证明, Onconase 对淋巴瘤细胞、肺癌细胞、肝癌细胞都有很好的杀伤作用。不同生长状态的细胞对 Onconase 毒性的敏感度不同, 实验显示^[12], Onconase 对处在指数生长期的 NIH/3T3 细胞的毒性是处在非指数生长期的 2.5 倍, NIH/3T3 细胞被激活增殖信号通路后对 Onconase 的毒性更敏感, 而肿瘤细胞一般都是增殖异常的细胞, 因此就导致肿瘤细胞对 Onconase 毒性更敏感。

体内实验证明^[41], Onconase 可以有效靶向并抑制恶性间皮瘤的生长, 而且, 它对多种肿瘤都有很好的治疗效果。在针对小鼠 M109 肺癌治疗的实验中^[42], Onconase 能明显延长实验组小鼠的存活时间, 每周注射 Onconase 40 微克 / 只, 实验组小鼠 18 只中有 6 只存活时间超过 220 天。在针对小鼠 A549 非小细胞型肺癌治疗的实验中^[43], 多次小剂量体内注射 Onconase 明显抑制肿瘤生长, 并加快肿瘤细胞凋亡速率。

6.2 临床试验

Onconase 是第一个进入抗癌临床试验的核糖核酸酶, 它具有很低的免疫原性, 可以反复用药多次。Onconase 副反应不大, 主要为肾毒性^[44], 绝大多数病人能耐受, 停药后可以逆转, 对骨髓没什么伤害。迄今尚未发现病人因 Onconase 而死亡。根据临床报告显示, 绝大多数病人对 Onconase 显示出免疫耐受, 在低浓度下, Onconase 不影响植物血球凝集素(PHA)刺激的有丝分裂, 但却显著提高活化诱导的凋亡频率。临床试验显示^[45]: Onconase 的免疫原性和过敏原性确实很低。参加临床试验的病人中, 有人总计用药达 109 次, 可见“中和抗体阻断 Onconase 作用”的问题在临幊上并不严重。

Onconase 在细胞中具有良好的稳定性, 药物体内半衰期为 3h。Onconase 对肿瘤的杀伤作用不受 p53 状态或 P-gp 表达的影响, 因此 Onconase 具有抗多重耐药性的能力, 这是 Onconase 优于其它化疗药物的又一特点。

ALFACELL 公司对不能手术切除恶性间皮瘤的患者进行的 III 期临床试验结果显示, 用 Onconase 治疗的病人, 平均生存期为 11.3 个月, 一年生存率为 46.2%, 两年生存率为 34.3%。而用化疗药中最有效的阿霉素治疗的病人, 平均生存期为 9.1 个月, 一年生存率为 34.5%, 两年生存率为 10.7%^[45]。

目前, 美国 ALFACELL 公司对 Onconase 进行的 III 期临床试验已经完成。Onconase 已被美国、欧盟和澳大利亚当局批准作为治疗非常见病药物投放市场, 供治疗恶性间皮瘤用。恶性间皮瘤多由接触石棉引起, 大部分病人的肿瘤无法用手术切除, 一般活不过一年。相关实验显示, Onconase 单独或与阿霉素等化疗药共用有很好的疗效, 可以显著延长一部分病人的生存时间。ALFACELL 公司对 Onconase 与阿霉素协同作用的研究也已进入 III 期临床, 数据显示用 Onconase 和阿霉素联合治疗, 平均生存期比单用阿霉素长两个月。另外, 由于体内外实验均显示 Onconase 对多种实体瘤均有明显的抑制作用, ALFACELL 公司也相继对非小细胞型肺癌、乳腺癌和肾细胞癌展开一系列临床研究, 其中对非小细胞型肺癌(NSCLC)的治疗已进入 I 期临床试验。

6.3 Onconase 与放疗或化疗联合治疗肿瘤

除了前述的 Onconase 与阿霉素合用外, Onconase 与其它很多药物都有很好的协同作用。Onconase 与千金藤碱(Cepharanthine)^[46]的协同作用, 可以完全抑制人前髓白血病细胞 HL-60、人淋巴瘤细胞 U937、多发性骨髓瘤细胞 RPMI-8228 和前列腺癌细胞 DU145 的生长。而其与长春新碱(Vincristine)^[47]的协同作用, 在体内外均增强了对人结肠癌肿瘤细胞的毒性。

Kim 等^[48]将 Onconase 与放疗结合处理肺癌 A549, 在体外与体内均发现增强作用。作者认为 Onconase 对放疗效果的增强主要是由于它降低了肿瘤的氧耗率(QO_2), 而不是肿瘤内血流的增加。这些研究可能具有一定的临床实用价值。

6.4 由 Onconase 衍生的靶向抗癌药物

近年推出的创新抗癌药物中, 导向药物是其中非常重要的一大类型。许多医学和生命科学界的人士一直致力于研究利用特定的药物递送系统(drug delivery system, DDS), 通过将药物导向结合到肿瘤细胞上, 以便有效降低药物对正常组织的毒副作用, 并增强其对肿瘤细胞的杀伤作用。

导向药物由导向配体和肿瘤细胞杀伤剂两部分构成, 由化学交联或基因融合技术形成蛋白复合物或

融合蛋白。其中由蛋白毒素衍生的导向药物称为免疫毒素。

以 Onconase 为基础衍生而来的融合蛋白和蛋白复合物, 可以增强 Onconase 的细胞专一性及进入细胞的能力, 其对肿瘤细胞的杀伤力比 Onconase 强几十到几千倍, 并能杀死一些原来对 Onconase 并不敏感的肿瘤细胞。将 Onconase 和肿瘤特异性抗体偶联后, 对肿瘤特异性毒性进一步提高, 并且在小鼠模型上取得很好的抗肿瘤效果^[8]。将 Onconase 与抗 CD22 的鼠单克隆抗体 LL2 偶联制成 LL2-Onconase 免疫复合物, 连续 5 天每天给患有 Daudi 淋巴癌的小鼠, 静脉注射一次 100 μg/kg LL2-Onconase 可以使小鼠存活率达 100%, 并且可以耐受很高的剂量(达 400 μg/kg LL2-Onconase)。

我们实验室利用转铁蛋白作为导向载体, 用化学交联方法与 Onconase 偶联制成复合物 Onc-Tf。Onc-Tf 对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的细胞毒性比游离 ONC 的强 100 倍左右, 对小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 的细胞毒性比游离 Onconase 的强 2 000 倍(待发表)。

7 展望

Onconase 作为一种抗肿瘤核酸酶, 其细胞毒性的分子作用机理目前尚不是很清楚, 因此对其分子结构与功能关系以及其毒理的研究具有重要理论意义和应用价值。通过加深对其抗肿瘤机制的理解, 我们可以对其进行有目的的改造, 增加它的抗肿瘤效果。比如, 可以通过点突变改变其氨基酸残基以提高细胞毒性; 改变其分子结构, 使它的催化活性增强但又能逃逸 RI 的抑制; 也可以根据对其内吞途径的理解, 设计具有容易通过细胞膜、能逃逸溶酶体降解、肿瘤细胞特异性识别强等多种性能的抗肿瘤药物。

Onconase 目前已经上市用于恶性间皮质瘤的治疗, 对其它实体瘤的临床疗效也在进一步研究中。虽然 Onconase 的副反应很小, 但还是有一定肾毒性和过敏反应, 我们可以通过基因工程改造的方法进一步降低其免疫原性和副作用。Onconase 还可与其它化学抗癌药物或细胞抑制剂相结合, 进行肿瘤的临床治疗。

Onconase 是一个广谱的抗肿瘤药物, 能选择性地杀伤肿瘤、低毒、低免疫原性, 也是新一代免疫毒素比较理想的弹头药物, 相信它在肿瘤治疗等方面将会有更大的发展。同时, Onconase 作为第一个进入临床应用的 RNase, 为用低免疫原性的酶类药物治

疗肿瘤提供了一个范例, 今后可能会有更多的各种 RNases, 或其它人源的酶用于肿瘤治疗。

参考文献(References)

- 1 Ledoux L. Action of ribonuclease on two solid tumours *in vivo*. *Nature* 1955; 176: 36-7.
- 2 Ardel W, Ardel BD. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 181-9.
- 3 Yun TK, Kim YK, Kim BS, Park HK, Park SS, Koh CS, et al. Clinical studies on the cancerolytic action of bovine pancreatic ribonuclease. *J Korean Cancer Res Assoc* 1972; 7: 23-481.
- 4 Darzynkiewicz Z, Carter SP, Mikulski SM, Ardel WJ, Shogen K. Cytostatic and cytotoxic effects of Pannon (P-30 Protein), a novel anticancer agent. *Cell Tissue Kinet* 1988; 21(3): 169-82.
- 5 Ardel W, Mikulski SM, Shogen K. Amino acid sequence of an anti-tumor protein from *Rana pipiens* oocytes and early embryos. Homology to pancreatic ribonucleases. *J Biol Chem* 1991; 266(1): 245-51.
- 6 Kreitman RJ. Recombinant immunotoxins containing truncated bacterial toxins for the treatment of hematologic malignancies. *Bio Drugs* 2009; 23:1-13.
- 7 Wu Y, Mikulski SM, Ardel W, Rybak SM, Youle RJ. A cytotoxic ribonuclease. Study of the mechanism of onconase cytotoxicity. *J Biol Chem* 1993; 268(14): 10686-93.
- 8 Newton DL, Hansen HJ, Mikulski SM, Goldenberg DM, Rybak SM. Potent and specific antitumor effects of an anti-CD22-targeted cytotoxic ribonuclease: potential for the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 97(2): 528-35.
- 9 Saxena SK, Sirdeshmukh R, Ardel W, Mikulski SM, Shogen K, Youle RJ. Entry into cells and selective degradation of tRNAs by a cytotoxic member of the RNase A family. *J Biol Chem* 2002; 277 (17): 15142-6.
- 10 Iordanov MS, Ryabinina OP, Wong J, Dinh TH, Newton DL, Rybak SM, et al. Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer Res* 2000; 60(7):1983-94.
- 11 Suhasini AN, Sirdeshmukh R. Transger RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *Biochemistry*, 2006; 28(18):12201-9.
- 12 Smith MR, Newton DL, Mikulski SM, Rybak SM. Cell cycle-related differences in susceptibility of NIH/3T3 cells to ribonucleases. *Exp Cell Res* 1999; 247(1): 220-32.
- 13 Bretscher LE, Abel RL, Raines RT. A ribonuclease: A variant with low catalytic activity but high cytotoxicity. *J Biol Chem* 2000; 275 (14): 9893-6.
- 14 Gorbatyuk VY, Tsai CK, Chang CF, Huang TH. Effect of N-terminal and Met23 mutations on the structure and dynamics of onconase. *J Biol Chem* 2004; 279 (7): 5772-80.
- 15 Ardel B, Ardel W, Darzynkiewicz Z. Cytotoxic ribonucleases and RNA interference (RNAi). *Cell Cycle* 2003; 2(1): 22-4.
- 16 Rodriguez M, Torrent G, Bosch M, Rayne F, Dubremetz JF, Ribo M, et al. Intracellular pathway of Onconase that enables its delivery to the cytosol. *J Cell Sci* 2007; 120(8): 1405-11.
- 17 Benito A, Ribo M, Vilanova M. On the track of antitumour

- ribonucleases. Mol Biosyst 2005; 1(4): 294-302.
- 18 Haigis MC, Kurten EL, Abel RL, Raines RT. KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. J Biol Chem 2002; 277(13): 11576-81.
- 19 Wu Y, Saxena SK, Ardel W, Gadina M, Mikulski SM, De Lorenzo C, et al. A study of the intracellular routing of cytotoxic ribonucleases. J Biol Chem 1995; 270(29): 17476-81.
- 20 Hiaqis MC, Raines RT. Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. J Cell Sci 2003; 116(2): 313-24.
- 21 Saxena SK, Rybak SM, Winkler G, Meade HM, McGraw P, Youle RJ, et al. Comparison of RNases and toxins upon injection into Xenopus oocytes. J Biol Chem 1991; 266: 21208-14.
- 22 Altomare DA, Rybak SM, Pei J, Maizel JV, Cheung M, Testa JR, et al. Onconase responsive gene in human mesothelioma cells: implications for an RNA damaging therapeutic agent. BMC Cancer 2010; 10: 34.
- 23 Fan F, Jin S, Amundson SA, Tong T, Fan w, Zhao H, et al. ATF3 induction following DNA damage is regulated by distinct signaling pathways and overexpression of ATF3 protein suppresses cells growth. Oncogene 2002; 21: 7488-96.
- 24 YingSY, Change DC, Linux SL. The microRNA(miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. Mol Biotech 2008; 38(3): 257-68.
- 25 Kobe B, Deisenhofer J. Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. J Mol Biol 1996; 264: 1028-43.
- 26 Turcotte RF, Raines RT. Interaction of onconase with the human ribonuclease inhibitor protein. Biochem Biophys Res Commun 2008; 377: 512-4.
- 27 Lee JE, Raines RT. Contribution of ative-site residues to the function of onconase, a ribonuclease with antitumoral activity. Biochem 2003; 42:11443-50.
- 28 Leland PA, Staniszewski KE, Kim B, Raines RT. A synapomorphic disulfide bond is critical for the conformational stability and cytotoxicity of an amphibian ribonuclease. FEBS Lett 2000; 477(3): 203-7.
- 29 Notomista E, Catanzano F, Graziano G, Dal Piaz F, Barone G, D'Alessio G, et al. Onconase: an unusually stable protein. Biochemistry 2000; 39(30): 8711-8.
- 30 Monti DM, D'Alessio G. Cytosolic RNase inhibitor only affects RNases with intrinsic cytotoxicity. J Biol Chem 2004; 79(38): 39195-8.
- 31 Turcotte RF, Lavis LD, Raines RT. Onconase cytotoxicity relies on the distribution of its positive charge. FEBS J 2009; 276: 4270-81.
- 32 Ardel W, Shogen K, Darzynkiewicz Z. Onconase and amphinase, the antitumor rionucleases from *Rana pipiens* oocytes. Curr Pharm Biotechnol 2008; 9(3): 215-25.
- 33 Michaelis M, Cinatl J, Anand P, Rothweiler F, Kotchetkov R, von Deimling A, et al. Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. Cancer Lett 2007; 250(1): 107-16.
- 34 Ramos-Nino ME, Vianale G, Sabo-Attwood T, Multi L, Porta C, Heintz N, et al. Human mesothelioma cells exhibit tumor cell-specific differences in phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT activity that predict the efficacy of Onconase. Mol Cancer Ther 2005; 4(5): 835-42.
- 35 De Lamirande G. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. Nature 1961; 192: 52-4.
- 36 Leland PA, Schultz LW, Kim BM, Raines RT. Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:10407-12.
- 37 Matousek J. Ribonucleases and their antitumor activity. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2001; 129(3): 175-91.
- 38 Abel RL, Haigis MC, Park C, Raines RT. Fluorescence assay for the binding of ribonuclease A to the ribonuclease inhibitor protein. Anal Biochem 2002; 306(1): 100-7.
- 39 Rybak SM, Saxena SK, Ackerman EJ, Youle RJ. Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. J Biol Chem 1991; 266(31): 21202-7.
- 40 Haigis MC, Kurten EL, Raines RT. Ribonuclease inhibitor as an intracellular sentry. Nucleic Acids Res 2003; 31(3): 1024-32.
- 41 Beck AK, Pass HI, Carbone M, Yang H. Ranpirnase as a potential antitumor ribonuclease treatment for mesothelioma and other malignancies. Future Oncol 2008; 4(3): 341-9.
- 42 Mikulski SM, Ardel W, Shogen K, Bernstein EH, Menduke H. Striking increase of survival of mice bearing M109 Madison carcinoma treated with a novel protein from amphibian embryos. J Natl Cancer Inst 1990; 82(2):151-3.
- 43 Lee I, Shogen K. Mechanisms of enhanced tumoricidal efficacy of multiple small dosages of ranpirnase, the novel cytotoxic ribonuclease, on lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2008; 62(2): 337-46.
- 44 Pablak N, Vogelzang NJ. Ranpirnase-an antitumour ribonuclease:its potential role in malignant mesothelioma. Expert Opin Biol Ther 2006; 6(4): 391-9.
- 45 Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ, McCachren S, Taub RN, Chun H, et al. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma. J Clin Oncol 2002; 20: 274-81.
- 46 Ita M, Halicka HD, Tanaka T, Kurose A, Ardel B, Shogen K, et al. Remarkable enhancement of cytotoxicity of onconase and cepharanthine when used in combination on various tumor cell lines. Cancer Biol Ther 2008; 7(7): 1104-8.
- 47 Rybak SM, Pearson JW, Fogler WE, Volker K, Spence SE, Newton DL, et al. Enhancement of vincristine cytotoxicity in drug-resistant cells by simultaneous treatment with Onconase, an antitumor ribonuclease. J Natl Cancer Inst 1996; 88(11): 747-53.
- 48 Kim DH, Kim EJ, Kalota A, Gewirtz AM, Glickson J, et al. Possible mechanisms of improved radiation response by cytotoxic RNase, Onconase, on A549 human lung cancer xenografts of nude mice. Adv Exp Med Biol 2007; 599: 53-9.

Latest Advances in the Research and Development of Onconase

Xue Tian^{1,2}, Qing-Cheng Wang^{2*}, Ru-Ling Shen², Dian-Sheng Xu¹, Jian Fei²

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

²Shanghai Research Center for Biomodel Organism, Shanghai 201210, China)

Abstract Onconase, a member of RNase A superfamily, is a ribonuclease originally purified from oocytes and early embryo of Northern leopard frog (*Rana pipiens*), which shows striking anti-tumor potential *in vitro* and *in vivo*. Onconase has been approved as an orphan drug applied for the treatment of malignant mesothelioma. Onconase has a unique structure and high stability. In clinics, it has shown mild side-effects, low immunogenicity and infrequent drug-resistance. Therefore, the research on Onconase possesses both important theoretical and clinically applied value. This paper reviews the latest advances of the studies on its structural characteristics, catalytic specificity, cytotoxicity, antitumor activity and clinical application. Meanwhile some important problems related to Onconase are discussed.

Key words Onconase; RNase; antitumor; immunotoxin

Received: September 3, 2009 Accepted: October 11, 2010

*Corresponding author. Tel: 86-21-50793648-82014, Fax: 86-21-58955923, E-mail: weiqunus@yahoo.com