

重组豹蛙酶的制备及其生物学特性分析

汪楠¹, 唐小军¹, 熊四平¹, 郑峰², 张慧林³, 高畅¹, 李文杰¹, 董华³, 朱进^{1,2*}

(¹南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室, 病理学系, 江苏南京 210029; ²南京军区军事医学研究所, 江苏南京 210002; ³南京医科大学附属妇幼保健院妇产科, 江苏南京 210024)

[摘要] 目的:通过构建豹蛙酶原核表达载体 pCold II-Rap, 表达、纯化豹蛙酶并研究其生物学活性。方法:合成豹蛙酶全基因序列, 克隆于原核表达载体 pCold II 中, 鉴定正确后转化至大肠杆菌 BL21, 用 SDS-PAGE 和 Western blot 验证豹蛙酶的表达; 大量表达重组豹蛙酶融合蛋白(Rap-His), 通过 MTT 法分析 Rap-His 对乳腺癌细胞增殖的影响。结果:成功构建了 pCold II-Rap 原核表达载体, 经优化表达、纯化的条件, 获得纯度较高的 Rap-His; MTT 法检测结果表明, 该融合蛋白在 320、160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的抑制率在加药后 4 d 达到 93.49%。结论:本研究制备的重组 Rap-His 融合蛋白能够抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖。这为进一步与肿瘤特异抗体偶联, 构建肿瘤特异性靶向药物的研究奠定了基础。

[关键词] 豹蛙酶; 融合蛋白; 细胞增殖抑制

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)08-1034-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130802

Preparation and characterization of recombinant ranpirinase

Wang Nan¹, Tang Xiaojun¹, Xiong Siping¹, Zheng Feng², Zhang Huilin³, Gao Chang¹, Li Wenjie¹, Dong Hua³, Zhu Jin^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029; ²Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002; ³Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Maternity and Child Health Hospital of NJMU, Nanjing 210024, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a prokaryotic expression vector pCold-II-Rap and to optimize the expression conditions of ranpirinase (Rap) protein and to determine the protein activity. **Methods:** Recombinant pCold-II-Rap vector was constructed, and positive clone was selected and transformed into *E.coli*.BL21. The recombinant protein expression was induced by IPTG. The Rap recombinant protein was purified, and detected by SDS-PAGE and Western blot. The RNase activity of Rap was analyzed by MTT. **Results:** The results showed that the purified ranpirinase was obtained by optimizing conditions of expression and purification, and degradation of tRNA could be detected by ranpirinase *in vitro*. The fusion protein can inhibit the proliferation of breast cancer cell MDA-MB-231, the inhibition ratios were 93.49% at the 4th day. **Conclusion:** The recombinant ranpirinase would be applied as a potential therapeutic drug, which could conjugated with a tumor specific antibody or antibody fragment.

[Key words] ranpirinase; fusion protein; inhibition of cell proliferation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8): 1034-1038]

20 世纪 80 年代, 科学家首次从北极豹蛙的卵母细胞和早期胚胎中分离得到豹蛙酶(ranpirinase, onconase)。豹蛙酶是最小的核糖核酸酶 A (RNase

A) 超家族成员^[1], 含有 104 个氨基酸残基。与 RNase A 活性相比, 豹蛙酶的酶活性要低, 但是豹蛙酶可以不受核糖核酸酶抑制剂(RI)影响, 从而成为理想的肿瘤杀伤因子。美国的 Alfaeell 公司开展了豹蛙酶对乳腺癌、胰腺癌、肾癌、非小细胞肺癌、恶性间皮瘤等的临床研究, 结果发现其对恶性间皮瘤疗效显著, 且不良反应小^[2]。乳腺癌是威胁女性健康的主要恶性肿瘤之一, 目前临床上常用曲妥珠单抗单

[基金项目] 南京市科技发展项目(ZKX12025)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zjsimmons@yahoo.com.cn

药或者曲妥珠单抗联合化疗进行治疗。而上述药物的作用都局限在蛋白水平,容易产生耐药性,也会带来不良反应如腹泻、呕吐、皮疹等。因为豹蛙酶独特的杀伤肿瘤细胞机制,进入肿瘤细胞后降解细胞内 tRNA,具有不良反应较少,免疫原性低和不易产生耐药性等优点。自然界中只有北极豹蛙中含有豹蛙酶,无法进行大规模的提取纯化,可采用基因工程的方法让豹蛙酶在工程菌中高效表达,但这种方法也存在着不能在工程菌中表达出有活性的豹蛙酶等问题。

本研究拟构建重组豹蛙酶原核表达载体,优化表达条件并大量表达及纯化豹蛙酶蛋白,验证其功能活性,为进一步将重组豹蛙酶与相关肿瘤特异性抗体的偶联奠定基础,为进一步研发抗体靶向药物作铺垫。

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pCold II 由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存,T 克隆载体 (TaKaRa 公司,大连),*E.coli* BL21(DE3)(Invitrogen 公司,美国)。

乳腺癌细胞 MDA-MB-231 由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存,细胞置于 DMEM 完全培养液 (含 10% 小牛血清,pH7.2~7.4),在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养,隔天换液 1 次。

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I (TaKaRa 公司,大连);T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA Polymerase (NEB 公司,美国);胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID 公司,美国)。Histrap HP Column(GE 公司,美国);超滤管 (10 K)、硝酸纤维膜(Millipore 公司,美国);D-37520 型台式高速冷冻离心机 (Heraeus 公司,美国);Universal Hood II 凝胶成像系统、核酸电泳仪、MINI Protein 3 CELL 蛋白电泳仪、MINI Trans-Blot cell 转印电泳仪(BIO-RAD 公司,美国);AKTA Purifier 100 型蛋白纯化仪(通用电气公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 重组 pCold II-Rap 原核表达载体的制备

Rap 基因合成及引物设计:参考 GenBank 中序列 (GenBank No. D1137475.1),在序列两端加上酶切位点 *Bam*H I 和 *Xba* I,委托上海英骏生物技术有限公司合成,并重组于通用载体 pMD-18T Vector 上,命名为 T-Rap。合成的基因序列如下:5'-GGATCCCCA-GGACTGGCTGACTTTCCAGAAAAACATATCACT-AACACTCGTGACGTTGACTGCGACAACATCCTCT-

CTGCAAAGGTATCATCGCTTCTAAAAACGTTCTG-ACTACTTCTGAATTCTACCTGTCTGACTGCCAAGT-TACTTCTCGTCCGTGCAAATACAACTGAAAAAA-TCTACTAACAAATTCTGCGTFACTTGCGAAAACCA-GGCTCCGGTTCATTTTCGTTGGTGTGTTGTTCTTGCTC-TAGA-3'。设计并合成 Rap 基因的鉴定引物,RAP1:5'-GCGGATCCCAGGACTGGCTGACTTTCC-3';RAP2:5'-GCTCTAGAGCAAGAACCAACACC-3'。

原核表达载体的构建:将合成的 T-Rap 和原核表达载体 pCold II 用 *Bam*H I、*Xba* I 进行酶切,酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,按照说明书切胶回收 Rap 目的基因及酶切后的 pCold II 载体,用 T4 连接酶在 16℃ 过夜连接 Rap 基因及 pCold II 载体,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌中,通过双酶切及测序鉴定 pCold II-Rap 是否构建成功。

1.2.2 重组豹蛙酶的小量表达及鉴定

重组豹蛙酶表达:将 pCold II-Rap 重组表达载体转化到感受态 *E.coli* BL21(DE3) 中,涂布于 LB 琼脂培养平板 (含 100 mg/L 氨苄抗性),于细菌培养箱内 37℃ 培养过夜。挑取单个菌落接种于 2 ml LB 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄抗性)中,37℃ 过夜培养。次日按照 1:100 比例稀释后加入到 2 ml LB 培养基中振荡培养,至菌液 *D*(600 nm) 值为 0.7 左右时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,16℃,220 r/min 培养过夜,诱导目的蛋白的表达。16 h 后,于 4℃ 以 12 000 r/m 离心 15 min,收集沉淀。PBS 重悬收集细菌,超声破碎细菌,4℃,12 000 r/m 离心 15 min,分别收集上清和沉淀。

SDS-PAGE 和 Western blot 分析:将收集的超声上清和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,在 300 mA 恒流条件下,将经过 SDS-PAGE 分离的蛋白凝胶电转移到 PVDF 膜上。转印后将膜用 5 ml 5% 脱脂奶粉缓冲液封闭 2 h。用 PBST 洗涤后,加入稀释的抗体工作液 (鼠抗 His 抗体,1:1 000)。37℃ 孵育 2 h 后,将膜用 PBST 洗涤 3 遍,再加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体 (1:1 000) 孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 遍,最后用 DAB 显色。

1.2.3 重组豹蛙酶纯化

重组豹蛙酶表达与纯化:将含有 pCold II-Rap *E.coli* BL21(DE3) 接种于 20 ml LB 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄抗性)中,37℃ 过夜培养。次日按照上述方法加入到 2 L LB 培养加入 IPTG 诱导表达。PBS 重悬收集细菌,超声破碎细菌,4℃,12 000 r/m 离心 15 min,分别收集超声上清和沉淀。超声上清

用 0.22 μm 的膜过滤后储存在 4℃ 备用。

将过滤后的超声上清用美国 GE 公司的 Histrap HP 柱进行纯化, 上样缓冲液为含有 200 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑, pH7.4 的磷酸缓冲液, 洗脱缓冲液分别为含有 25、50、100、200、400 及 500 mmol/L 咪唑的上样缓冲液, 收集不同咪唑浓度的洗脱液洗脱的蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.4 重组豹蛙酶对 tRNA 降解活性分析

在 40 μl 的体系中加入 2 μl tRNA、8 μl 纯化后的重组融合蛋白、30 μl buffer (60 mmol/L MgCl_2 、6 mmol/L CaCl_2 、3 \times 60 mmol/L HEPES, pH = 6.5) 37℃ 反应 4 h, 将上述体系中的重组蛋白替换为水和 Ribonuclease A 分别作为阴参和阳参。

1.2.5 豹蛙酶对肿瘤细胞增殖的影响

复苏乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 收集生长处于对数期的细胞, 调整细胞悬液浓度, 接种于 96 孔板, 每孔加细胞悬液 200 μl , 5 000~7 000 个/孔。置 37℃、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 使细胞贴壁。

将重组豹蛙酶倍比稀释, 浓度依次为 320、160、80、40、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。小心吸去上清, 加入稀释后的样品 200 μl , 分为 4 组, 分别于 24、48、72、96 h 后加入 20 μl MTT 溶液 (5 mg/ml), 继续培养 4 h 后吸掉上清, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min。在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔 (培养基、MTT、二甲基亚砜), 对照孔 (细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养基、MTT、二甲基亚砜), 每组设 3 个复孔。计算抑制率 (%) = [(对照-空白)-(给药-空白)] / (对照-空白) \times 100%。

2 结果

2.1 重组 pCold II-Rap 载体的酶切鉴定

将重组获得的 pCold II-Rap 载体进行双酶切验证, 目的片段为 300 bp, 与设计合成的 Rap 基因片段大小相符 (图 1)。

2.2 测序鉴定

含有重组 pCold II-Rap 载体的细菌单克隆经上海 Invitrogen 公司测序后, 证明重组质粒中插入片段与 GenBank 中的 Rap 基因序列完全一致。

2.3 重组豹蛙酶在大肠杆菌中表达鉴定

SDS-PAGE 结果显示, 诱导组 pCold II-Rap 载体菌液超声上清于 16 000 处出现特异性条带, 与预期的目的蛋白大小相符合, 对照组未见相应的蛋白条带, 表明表达的 Rap-His 融合蛋白为可溶性蛋白

(图 2)。超声上清经 Histrap HP 亲和柱纯化, 获得较高纯度的 Rap-His 融合蛋白。

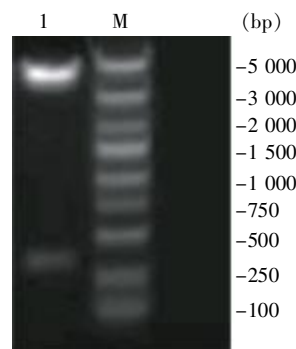
分别取纯化后的 Rap-His 融合蛋白, 以 BL21 (DE3) 蛋白作为对照。进行 Western blot 鉴定。在 16 000 处出现目的条带, 与融合蛋白的预期大小相符 (图 3)。

2.4 重组豹蛙酶在大肠杆菌中表达优化

使用 25、50、100、200、400、500 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱标签蛋白。结果显示在使用 200 mmol/L 咪唑浓度的洗脱液时, 有目的蛋白条带, 且 SDS-PAGE 结果显示杂蛋白较少 (图 4)。

2.5 豹蛙酶对 tRNA 降解实验

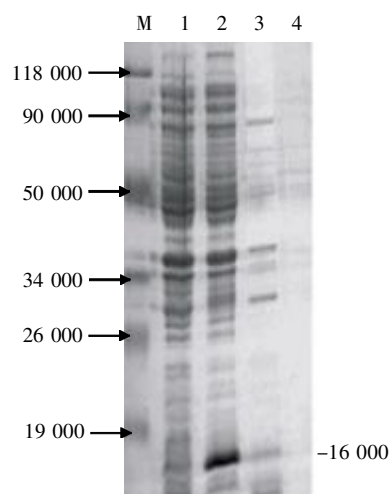
结果显示, 重组融合蛋白对 tRNA 有明显的降解能力 (图 5), 提示纯化后的重组融合蛋白具有一定的生物学活性。



1: 双酶切后的重组 pCold II-Rap 载体; M: Marker。

图 1 重组 pCold II-Rap 载体双酶切后电泳图

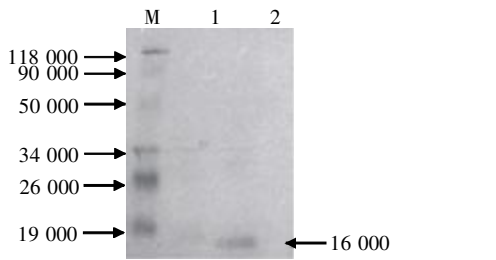
Figure 1 Recombinant pCold II-Rap Vector digested with two restriction enzymes



M: 蛋白 marker SM0441; 1: 空菌 BL21 (DE3); 2: 重组 pCold II-Rap Vector 菌液超声沉淀; 3: 重组 pCold II-Rap Vector 菌液超声上清; 4: 重组 pCold II-Rap Vector 菌液离心上清。

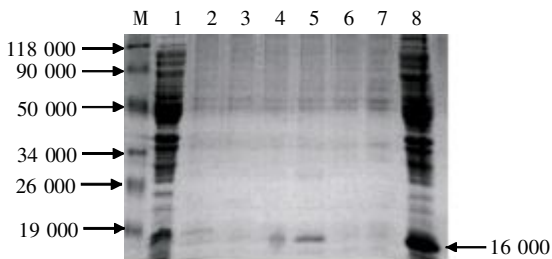
图 2 诱导表达重组蛋白 SDS-PAGE

Figure 2 Detection of fusion protein by SDS-PAGE



M: 蛋白 marker SM0441; 1: 空菌 BL21(DE3); 2: Rap-His 融合蛋白。
图 3 Western blot 鉴定诱导蛋白表达

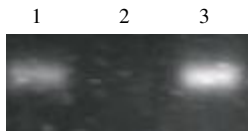
Figure 3 Detection of fusion protein by Western blot



M: 蛋白 marker SM0441; 1: 空菌 BL21(DE3); 2: 25 mmol/L 咪唑; 3: 50 mmol/L 咪唑; 4: 100 mmol/L 咪唑; 5: 200 mmol/L 咪唑; 6: 400 mmol/L 咪唑; 7: 500 mmol/L 咪唑; 8: 重组表达菌超声沉淀。

图 4 不同浓度咪唑洗脱 SDS-PAGE

Figure 4 Detection of recombinant fusion protein which was eluted in different levels of elution buffer (25~500 mmol/L imidazole) by SDS-PAGE



1: 重组融合蛋白; 2: 标准品 Ribonuclease A, 即阳参; 3: 阴参。

图 5 酵母 tRNA 降解实验

Figure 5 Yeast tRNA degradation assay

2.6 豹蛙酶抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖

用 MTT 检测重组 Rap-His 融合蛋白对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的影响。实验观察时间为 4 d, 每组设 3 个复孔取平均值, 酶标仪检测 $D(570 \text{ nm})$ 值, 绘制不同浓度豹蛙酶对乳腺癌细胞增殖抑制作用曲线 (图 6)。加入的豹蛙酶终浓度依次为 320、160、80、40、20、0 μg 。实验结果显示, 培养至第 4 天时, 浓度为 320、160、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的豹蛙酶处理组与 PBS 组相比细胞增殖受到抑制, 差异均有统计学意义, P 值分别为 0.022、0.028、0.031。但是浓度低于 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 对乳腺癌细胞的生长没有明显抑制作用。

在浓度为 320、160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 重组 Rap-His 融合蛋白对乳腺癌细胞有明显抑制作用, 以两组实验数据平均值计算融合蛋白对乳腺癌细胞的抑制率。

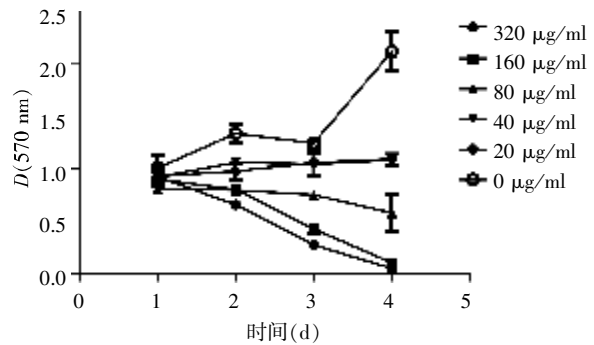


图 6 MTT 测定重组融合蛋白处理 MDA-MB-231 细胞增殖情况

Figure 6 The absorption values of recombinant fusion protein against MDA-MB-231 cells were measured by MTT assay

结果显示, 融合蛋白对肿瘤细胞的抑制率随着给药时间的延长而增加, 呈现时间依赖关系, 在第 3、4 天检测的肿瘤细胞生长抑制率分别为 71.6% 和 96.1%。蛋白浓度为 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用一定时间后, 融合蛋白保持在 70% 以上的细胞抑制率。

以作用时间为 4 d 组的实验数据作剂量效应关系图, 蛋白浓度为 X 轴, $D(570 \text{ nm})$ 为 Y 轴 (图 7)。通过方差分析, 实验结果具有统计学意义 ($P < 0.05$)。初步表明, 重组 Rap-His 融合蛋白豹蛙酶具有抑肿瘤细胞增殖的活性。

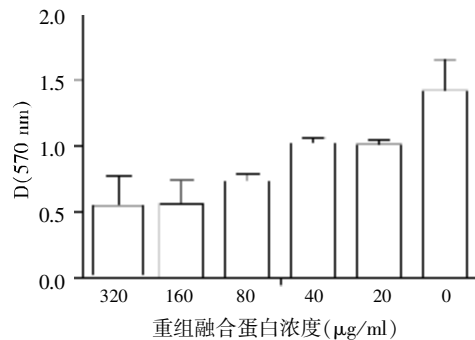


图 7 豹蛙酶给药 4 d 对乳腺癌细胞抑制作用趋势图

Figure 7 The cytostatic rate of recombinant fusion protein on breast cancer cells

3 讨论

豹蛙酶属于核糖核酸酶 A 超家族, 是最小的核糖核酸酶 A 超家族成员, 由 4 对半胱氨酸形成的 4 个二硫键构成其基本骨架。在氢键等弱分子间力相互作用下, 分子内部形成 7 个 β -折叠, 4 个 α -螺旋和 4 个 β -转角。在细胞内具有良好的稳定性, 药物体内半衰期为 3 h, 溶解温度 (T_m) 值为 90 $^{\circ}\text{C}$, 与核糖核酸酶抑制剂结合抑制常数 (K_i) 值约为 1×10^{-6} [2]。研究证

实它在体内外对多种肿瘤均具显著杀伤作用^[3]。豹蛙酶与细胞膜受体结合,通过内吞作用转入细胞质,破坏细胞膜的整体性,这一过程需要三磷酸腺苷(ATP),是豹蛙酶细胞毒性作用的关键步骤^[4]。美国AlfaCell公司已完成豹蛙酶治疗恶性间皮细胞瘤的Ⅲ期临床试验,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,是迄今为止唯一一个已用于肿瘤临床治疗的核糖核酸酶^[5-6]。但是豹蛙酶对于乳腺癌的治疗还缺乏系统性的研究。

豹蛙酶在体内的作用机制与RNA干扰(RNAi)相似,它能高度特异地降解tRNA,对rRNA和mRNA没有作用^[7-9]。本研究中以酵母tRNA为底物,用纯化后的重组豹蛙酶做降解实验,发现在体外重组豹蛙酶可以有效降解tRNA。豹蛙酶的细胞毒性与肿瘤细胞所处细胞周期密切相关,在豹蛙酶处理24h后,部分细胞停止于G1期。另一方面,在对牛内皮细胞株CCL-209作用研究中发现,处于对数生长期的细胞在豹蛙酶药物作用24h后,细胞增长停止,而对处于停滞期的细胞没有作用^[10-11]。本实验用重组豹蛙酶处理肿瘤细胞,发现纯化的蛋白具有杀伤肿瘤细胞的活性,并且随着加药浓度和时间的增加,该重组蛋白对肿瘤细胞的抑制率也逐渐提高。在药物作用剂量下,豹蛙酶只作用于肿瘤细胞,而对正常生长细胞没有影响,这可能与细胞识别有关^[12]。豹蛙酶与蛋白体抑制剂如N-乙酰亮氨酸氨酰苯丙氨酸,以及 β 干扰素能协同作用抑制生存基因的表达和细胞增殖、凋亡^[13]。

本课题通过构建Rap原核表达载体,优化实验条件表达并纯化Rap-His融合蛋白,经MTT检测,初步证实该重组蛋白在体外可以有效地抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖。成功制备有活性的重组Rap-His融合蛋白,为进一步与治疗性抗体偶联,靶向治疗肿瘤奠定基础。利用特异性抗体的靶向性和内化作用,结合Rap在胞内的杀伤作用,能有效抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞凋亡,有望成为新一代治疗乳腺癌的药物,具有较好的临床应用前景。

[参考文献]

- [1] Darzynkiewicz Z, Carter S, Mikulski S, et al. Cytostatic and cytotoxic effects of pannon (P-30 Protein), A novel anticancer agent [J]. *Cell Tissue Kinet*, 1988, 21 (3): 169-182
- [2] Notomista E, Cafaro V, Fusiello R, et al. Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein [J]. *FEBS Lett*, 1999, 463(3): 211-215
- [3] Zhao HL, Xue C, Du JL, et al. Sustained and cancer cell targeted cytosolic delivery of onconase results in potent antitumor effects [J]. *J Control Release*, 2012, 159 (3): 346-352
- [4] Grabarek J, Ardelt B, Du L, et al. Activation of caspases and serine proteases during apoptosis induced by onconase (Ranpirnase) [J]. *Exp Cell Res*, 2002, 278 (1): 61-71
- [5] Mikulski SM, Costanzi JJ, Vogelzang NJ, et al. Phase II trial of a single weekly intravenous dose of ranpirnase in patients with unresectable malignant mesothelioma [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(1): 274-281
- [6] Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z. Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1): 181-189
- [7] Qiao M, Zu LD, He XH, et al. Onconase downregulates microRNA expression through targeting microRNA precursors [J]. *Cell Res*, 2012, 64(6): 1771-1779
- [8] 何庆, 刘志敏. 豹蛙酶研究进展 [J]. *生物技术通讯*, 2008, 19(5): 760-762
- [9] Chang CH, Gupta P, Michel R, et al. Ranpirnase (Frog RNase) targeted with a humanized, internalizing, anti-trop-2 antibody has potent cytotoxicity against diverse epithelial cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(8): 2276-2286
- [10] Jiang Y, Blanga S, Amitsur M, et al. Structural features of tRNA^{Lys} favored by anticodon nuclease as inferred from reactivities of anticodon stem and loop substrate analogs [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(6): 3836-3841
- [11] Johnson RJ, McCoy JG, Bingman CA, et al. Inhibition of human pancreatic ribonuclease by the human ribonuclease inhibitor protein [J]. *J Mol Biol*, 2007, 368(2): 434
- [12] Makarov AA, Ilinskaya ON. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets [J]. *FEBS Lett*, 2003, 540(1): 15-20
- [13] Graham ML. Pegaspargase: a review of clinical studies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2003, 55(10): 1293-1302

[收稿日期] 2013-02-17