

促吞噬肽 tuftsin 增强丝裂霉素和力达霉素的抗肿瘤活性

刘文娟 刘秀均 甄永苏

摘要 目的 研究促吞噬肽(tuftsin, TF)与丝裂霉素(MMC)、力达霉素(LDM)联合的抑制肿瘤细胞增殖作用,以及 tuftsin 与力达霉素(LDM)整合成一个分子 LDM-TF,并探讨其抗肿瘤活性。**方法** 用 MTT 法检测 tuftsin 与不同浓度抗肿瘤药联合作用肿瘤细胞 24h 后,其体外抗细胞增殖作用。通过基因工程的方法构建了 tuftsin 与力达霉素辅基蛋白(LDP)的融合蛋白(LDP-TF),并进一步再通过加入发色团构建强化融合蛋白(LDM-TF)。用 CCK-8 法测 LDP-TF 蛋白的抗肿瘤活性,MTT 法检测 LDM-TF 的体外抗肿瘤活性。**结果** tuftsin 单独作用肿瘤细胞体外抗增殖作用较弱。tuftsin 与丝裂霉素(MMC)或力达霉素(LDM)联用均显示增效作用,其中以在胰腺癌 SW1990 细胞的增效作用最为显著。本实验室制备的融合蛋白 LDP-TF 和强化融合蛋白 LDM-TF 在体外对肿瘤细胞具有比力达辅基蛋白(LDP)和力达霉素(LDM)显示更强的抑制肿瘤细胞增殖作用。**结论** tuftsin 在体外与丝裂霉素和力达霉素联合显示协同作用。基于 tuftsin 的整合分子 LDP-TF 和 LDM-TF 与 LDP 或 LDM 比较,具有更强的抗肿瘤活性。

关键词 促吞噬肽 丝裂霉素 力达霉素 融合蛋白 联合

Tuftsin Potentiates the Antitumor Activity of Mitomycin and Lidamycin. Liu Wenjuan, Liu Xiujuan, Zhen Yongsu. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate the effect of tuftsin (TF) and its combination respectively with mitomycin (MMC) and lidamycin (LDM) on various cancer cell lines. Furthermore, an engineered tuftsin-integrated lidamycin fusion protein has been prepared and its antitumor efficacy was investigated. **Methods** Cultured tumor cells were treated with tuftsin or the combination of tuftsin with chemotherapeutic agents, MMC and LDM. Cell viability was measured by MTT assay and IC_{50} was calculated. By DNA recombination, TF was fused to the apoprotein (LDP) of lidamycin to obtain a fusion protein, LDP-TF. Then and the energized fusion protein LDM-TF was prepared by integrating the active chromophore of lidamycin into the LDP-TF. CCK-8 assay was used to measure the cytotoxicity of LDP-TF. MTT assay was used to measure the cytotoxicity of LDM-TF. **Results** TF alone showed mild cytotoxicity to various cancer cells. However, TF in combinations with MMC and LDM both showed synergy against cancer cells, in particular, the pancreatic carcinoma SW1990 cells. The fusion protein LDP-TF and the energized fusion protein LDM-TF exhibited more potent cytotoxicity to cancer cells as compared with LDP and LDM, respectively. **Conclusion** Tuftsin shows synergy with MMC and LDM. The integrated molecules, LDP-TF and LDM-TF, exert more potent cytotoxicity to cancer cells than LDP and LDM, respectively.

Key words Tuftsin; Mitomycin C; Lidamycin; Fusion protein; Combination

促吞噬肽(tuftsin)是一种由脾脏分泌产生的低分子四肽(Thr-Lys-Pro-Arg),具有较为广泛的生物活性,能够促进吞噬和调节免疫,已有实验证实其具有抗肿瘤作用^[1]。吞噬细胞、多形核细胞、巨噬细胞和单核细胞在其细胞膜上含有 tuftsin 的专一受体, tuftsin 通过其靶细胞膜受体的介导而发挥生物学活

性的。当这些细胞上的特异性受体与 tuftsin 结合后,即可发挥其促吞噬、杀菌、抗肿瘤及其他生物活性^[1]。最近有 tuftsin 在体外对肿瘤细胞抗肿瘤增殖的报道, tuftsin 及其改造的化合物选择性的对肿瘤细胞有抗增殖作用^[2]。tuftsin 与抗肿瘤药物联合对肿瘤细胞的作用仍有待进一步研究。

丝裂霉素(mitomycin C, MMC)属细胞周期非特异性抗肿瘤药,主要作用是使细胞的 DNA 交联,阻碍 DNA 的复制,从而抑制肿瘤细胞分裂。力达霉素(lidamycin, LDM)也称 C-1027,属于烯二炔类抗生素,主要引起特定序列的 DNA 双链断裂,低剂量时诱导

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)基金资助项目(2009CB521807)

作者单位:100050 中国医学科学院/北京协和医学院医药生物技术研究所

通讯作者:甄永苏,电子信箱:zhenys@public.bta.net.cn

肿瘤细胞发生凋亡,并引起一系列肿瘤相关基因表达的改变^[3]。本研究用 CCK - 8 法检测 tuftsin 对 H460、SW1990 和 MCF - 7 细胞的体外抗增殖作用。同时,采用 MTT 法观察 tuftsin 与作用方式不同的两种化疗药物丝裂霉素和力达霉素联用对不同肿瘤细胞的体外抗增殖作用。并进一步通过基因工程技术将 tuftsin 与抗肿瘤药物力达霉素整合为一个分子:强化融合蛋白 LDM - TF,并用 MTT 法检测在体外抗肿瘤活性。

材料与方法

1. 药物与试剂:tuftsin (Sigma),丝裂霉素 C (Sigma),力达霉素 (实验室),MTT (Sigma),CCK - 8 试剂盒 (Beyotime Company)。Tuftsin 用 1 × PBS 配成 1 mol/L,丝裂霉素 C 用 1 × PBS 配成 1 mmol/L,力达霉素用 1 × PBS 配成 1 μmol/L,以上药品均于 -20℃ 避光储存。抗 His - tag 单克隆抗体 (北京中原公司)。HisTrap 亲和色谱柱 (GE 公司)。PCR 引物合成 (上海英维杰基公司),序列如下:R1 为 5' - gc ctc gag acg cgg ctt ggt acg cgg ctt ggt tga acc gcc tcc acc tga acc gcc tcc acc gcc gaa ggt cag agc cac - 3',其中“下划线”是 XhoI 酶切位点,R2 为 5' - gc cat atg aaa tac ctg ctg ccg acc - 3',其中“下划线”是 NdeI 酶切位点。

2. 载体和菌株:含有 LDP 蛋白的重组质粒 (实验室),DH5α 和 BL21star™ (DE3) (北京金式金生物科技公司)。非小细胞肺癌细胞 H460、胰腺癌细胞 SW1990 和乳腺癌细胞 MCF - 7 (实验室)。

3. 方法:(1)CCK - 8 试剂盒检测在体外 tuftsin 对肿瘤细胞的杀伤活性:肺癌细胞 H460、胰腺癌细胞 SW1990 和乳腺癌细胞 MCF - 7 细胞,以每孔 3000 个细胞的密度接种于 96 孔板中,37℃ 培养 24h 后加入不同浓度的 tuftsin。孵育 24h 后,每孔加入 20 μl CCK - 8 溶液继续培养 1h。酶标仪测定 450nm 处的吸光度 (A₄₅₀)。实验设置无药对照组和无细胞空白组,按下面公式计算细胞的存活率并计算出 IC₅₀ 值:细胞存活率 (%) = (加药组 A₄₅₀ 值 - 空白组 A₄₅₀ 值) / (对照组 A₄₅₀ 值 - 空白组 A₄₅₀ 值) × 100%。(2)MTT 法检测 tuftsin 与抗肿瘤药物联用对肿瘤细胞的体外抗增殖作用:主要步骤和计算方法参考文献[4]。(3)LDP - TF 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达:以质粒 pEFL 为模板,引物 R1 和 R2 进行 PCR,通过酶切和连接获得重组表达载体 pET30 - LDP - TF。将 pET30 - LDP - TF 转化至大肠杆菌 BL21star™ (DE3) 感受态细胞。挑取单克隆接种 LB 培养基 (卡那霉素 50 μg/ml),公司测序。将测序正确的阳性菌株划线,挑取单克隆接种至 50ml LB 培养基 (卡那霉素 50 μg/ml) 中,37℃ 振荡培养过夜。次日将 50ml 菌液转接至 500ml LB 培养基 (卡那霉素 50 μg/ml) 中,37℃ 继续振荡培养至 OD₆₀₀ = 1.0 ~ 2.0,在无菌条件下加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,37℃ 振荡培养 8h,制备全细胞各个组分进行

12% SDS - PAGE 电泳分析,以确定目的蛋白在大肠杆菌中的定位。(4)LDP - TF 蛋白的分离纯化:分析得知 LDP - TF 蛋白主要在大肠杆菌周质腔中表达,周质腔蛋白提取的具体步骤参考文献,纯化步骤按照 HisTrap 亲和色谱柱说明书的要求进行操作^[4]。目的蛋白浓缩采用 3 K 的超滤管 (Millipore 公司),采用 Pierce 公司的 BCA 试剂盒进行蛋白定量,蛋白的纯度利用高效液相色谱法测定。(5)强化融合蛋白 LDM - TF 的构建:详细步骤参照文献[4]。(6)CCK - 8 试剂盒检测融合蛋白 LDP - TF 对肿瘤细胞的杀伤活性:详细步骤参照“方法 (1)”中的内容,设同浓度的力达霉素辅基蛋白 (LDP) 作为对照。(7)MTT 法检测 LDM - TF 对肿瘤细胞的杀伤活性:详细步骤参照文献[4],设同浓度的力达霉素作为对照。

4. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组样品数据之间的比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 表示有统计学意义。

结 果

1. CCK - 8 检测 tuftsin 对不同肿瘤细胞的体外抗增殖作用:实验结果表明,tuftsin 单独作用肿瘤细胞体外抗增殖作用较弱,浓度高达 5 mmol/L 时才起到一定的抑制效果,抑制率为 40% ~ 50%。tuftsin 在 1 mmol/L 时,对非小细胞肺癌细胞 (H460),胰腺癌细胞 (SW1990) 和乳腺癌细胞 (MCF - 7) 的抑制率是有差异的,分别为 34%,17% 和 31%。因此选用此浓度与 MMC 和 LDM 联用,观察其在以上肿瘤细胞中的抗细胞增殖作用。

2. tuftsin 增强 MMC 对肿瘤细胞的体外抗增殖作用:MMC 单一用药时对 SW1990 细胞抑制率达 50% (IC₅₀) 的浓度为 2.3×10^{-5} mol/L,与 1 mmol/L tuftsin 联用后 IC₅₀ 约为 2×10^{-6} mol/L,1 mmol/L tuftsin 与 10 μmol/L (10^{-5} mol/L) MMC 联用对 SW1990 的抗增殖作用达 79%,CDI = 0.39;MMC 与 tuftsin 联用在 H460 细胞中,MMC 在 10 μmol/L (10^{-5} mol/L) 和 1 μmol/L (10^{-6} mol/L) 时,tuftsin 对 MMC 有明显的增效作用,CDI = 0.53,与单一的 MMC 相比有显著差异;而在 MCF - 7 细胞中无增效作用 (图 1)。

3. tuftsin 增强 LDM 对肿瘤细胞的体外抗增殖作用:LDM 单一用药时对 SW1990 细胞抑制率达 50% (IC₅₀) 的浓度为 9×10^{-10} mol/L,与 1 mmol/L tuftsin 联用后 IC₅₀ 约为 7×10^{-11} mol/L;LDM 与 tuftsin 联用在 H460 细胞中,LDM 在 1 nmol/L (10^{-9} mol/L) 和 0.1 nmol/L (10^{-10} mol/L) 时,tuftsin 有明显的增强 LDM 的抗肿瘤活性,在 MCF - 7 细胞中无增效作用 (图 2)。

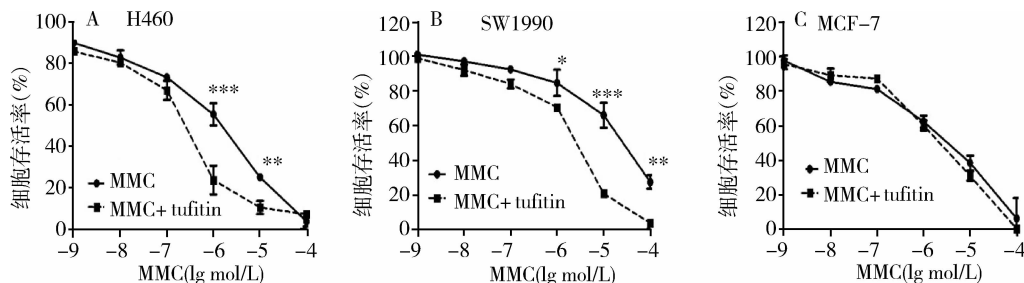


图1 tuftsin 与丝裂霉素 (MMC) 联用对 H460、SW1990 和 MCF-7 细胞的抗增殖作用

联合用药组与单一用药组 *t* 检验比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

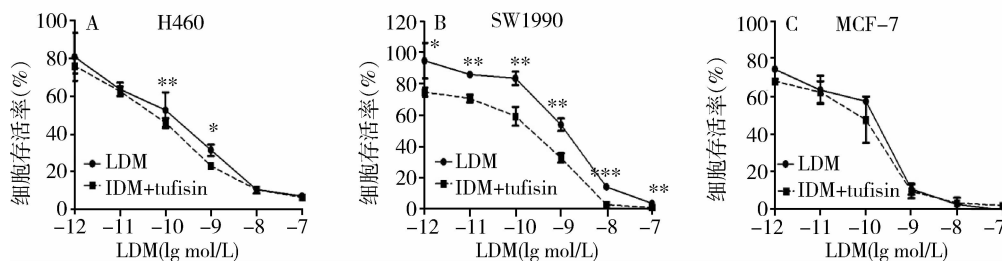


图2 tuftsin 与力达霉素 (LDM) 联用对 H460、SW1990 和 MCF-7 细胞的抗增殖作用

联合用药组与单一用药组 *t* 检验比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

4. LDP - TF 蛋白的构建与表达: ldp - tf 基因包括 3 部分, 从 N 端到 C 端依次为: pelB 信号肽、ldp 基因和 tuftsin, 其中 ldp 和 tf 之间由 (GGGS)₂ 柔性肽连接起来 (图 3A)。ldp - tf 基因全长 450bp, 编码 150 个氨基酸, 其中 pelB 信号肽长 72bp, 编码 24 个氨基酸, 其作用是促使融合蛋白在细菌的周质腔中表达,

之后被周质腔中的信号肽酶切除, 只保留末端的丙氨酸和甲硫氨酸; ldp 基因长 330bp, 编码 110 个氨基酸; tf 基因长 12bp, 编码 4 个氨基酸; 连接肽长 30bp, 编码 10 个氨基酸, 因此成熟的 LDP - TF 蛋白共包含 126 个氨基酸。将表达载体 pET30 - LDP - TF 转化到大肠杆菌中, 加入 IPTG 进行诱导后, 12%

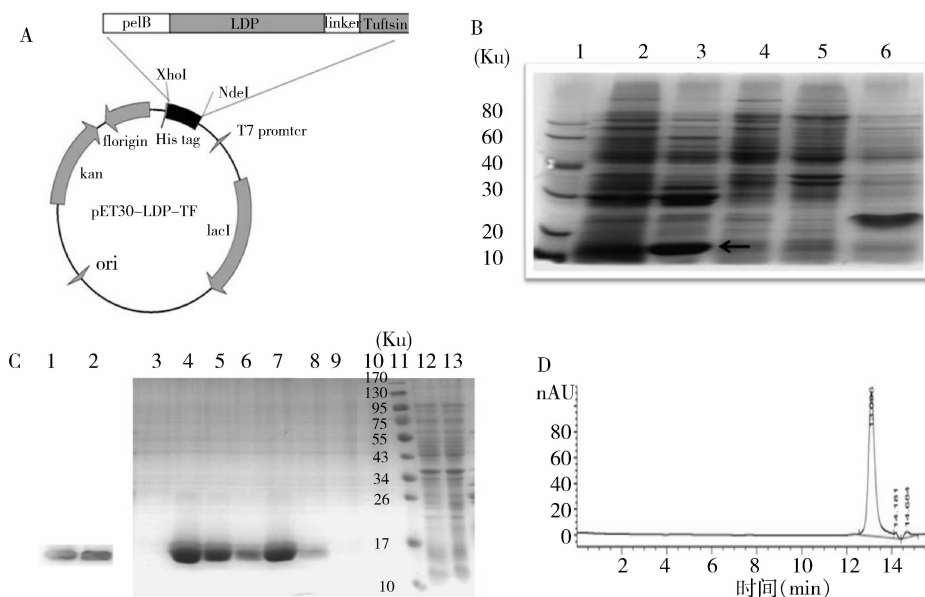


图3 融合蛋白 LDP - TF 的构建表达与纯化

A. 重组表达载体 pET30 - LDP - TF 构建组成示意图; B. SDS - PAGE 分析融合蛋白的表达定位情况; 其中 1 是蛋白相对分子质量标准, 2, 3, 5, 6 是 IPTG 诱导大肠杆菌后总蛋白的上清组分, 周质腔组分, 细胞质可溶组分, 包涵体组分; C. SDS - PAGE 分析融合蛋白的纯化情况。1, 2. Western blot 分析纯化后的目的蛋白; 3 ~ 9. 洗脱缓冲液洗下的目的蛋白; 11. 蛋白相对分子质量标准; 10, 12, 13. 洗涤缓冲液洗下来的杂蛋白; D. 高效液相色谱法检测 LDP - TF 蛋白的纯度

SDS - PAGE 电泳分析结果显示在 12kDa 处有明显的目的条带出现,对培养液上清液、周质腔、细胞质可溶以及不可溶组分进行分析发现,LDP - TF 蛋白主要定位于周质腔中,有少部分释放到了培养液上清中(图 3B)。对影响蛋白表达产量的各个条件进行了优化,最终确定表达条件为:温度 37℃、菌体起始密度 $A_{600} = 1.0$ 、IPTG 浓度为 0.1mmol/L、诱导时间为 8h。周质腔中的蛋白经过高渗和低渗处理后释放出来,经过 Ni2+ 亲和色谱纯化后,得到高纯度的 LDP - TF 蛋白,经 HPLC 检测其纯度达到了 94.4%(图 3C、图 3D),产量为每升发酵液获得约 60mg 的活性蛋白。

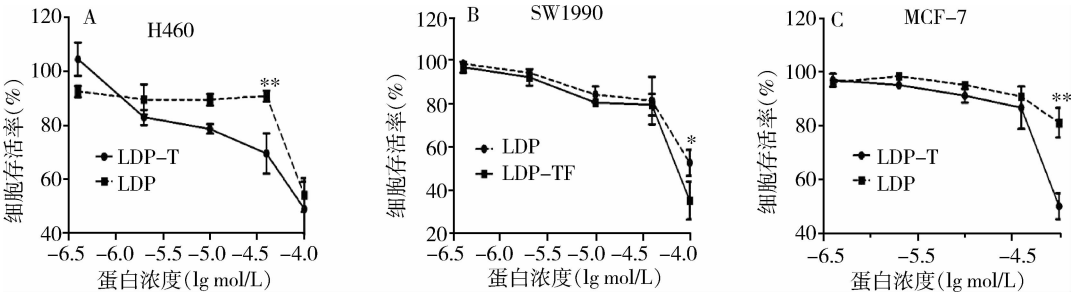


图 4 融合蛋白 (LDP - TF) 和 LDP 对肿瘤细胞的抑制率
融合蛋白用药组与力达霉素辅基蛋白用药组 *t* 检验比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

6. 强化融合蛋白 LDM - TF 对肿瘤细胞的体外杀伤活性:LDP - TF 蛋白与 LDM 的发色团分子在体外进行组装,HPLC (C4 柱) 检测结果显示,在 350nm (6min) 处出现特定吸收峰,表明分子组装成功,得到了强化融合蛋白 LDM - TF。MTT 实验结果显示,LDM - TF 对体外培养的乳腺癌细胞 MCF - 7,肺癌细胞 H460 和胰腺癌细胞系 SW1990 有强烈的杀伤作用,其 IC_{50} 值分别为 1.2×10^{-10} 、 1.6×10^{-10} 和 1.4×10^{-10} mol/L,而 LDM 相应的 IC_{50} 值分别为 $2.8 \times$

10^{-10} 、 2.4×10^{-10} 和 3.3×10^{-10} mol/L,其杀伤活性要比 LDM 高。 10^{-9} mol/L LDM - TF 对 MCF - 7 细胞的抑制率为 85%,而 LDM 对其抑制率为 65%,有显著差异(图 5A)。 10^{-8} mol/L LDM - TF 对 H460 细胞的抑制率为 96%,而 LDM 对其抑制率为 88%,有显著差异(图 5B), 10^{-9} mol/L LDM - TF 对 SW1990 细胞的抑制率为 82%,而 LDM 对其抑制率为 67%,有显著差异(图 5C)。

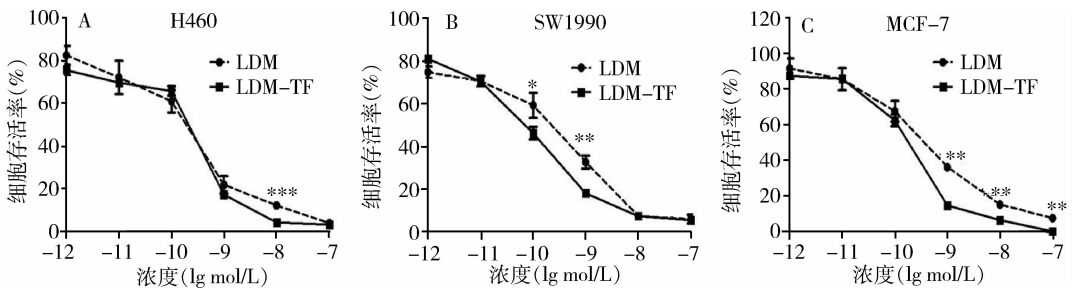


图 5 强化融合蛋白 (LDM - TF) 与力达霉素 (LDM) 分别对 H460、SW1990 和 MCF - 7 细胞的抗增殖作用
强化融合蛋白用药组与力达霉素用药组 *t* 检验比较, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

讨 论

促吞噬肽 tuftsin 是一种由脾脏产生的天然四肽,

具有促进吞噬细胞吞噬功能,并具有抗肿瘤活性。动物体内实验证明,移植白血病细胞的动物注射 tuftsin

后,能使移植性肿瘤的发生延迟,发生率降低,并且延长实验动物的寿命,tuftsins 脂质体药物载体能够增强抗肿瘤药物的抑制肿瘤细胞增殖作用^[5,6]。进一步研究指出,tuftsins 及其同系物具有选择性的抗肿瘤活性,并且可能通过抑制 DNA 拓扑异构酶的活性发挥其抗肿瘤的作用^[2]。在临床检测中发现,tuftsins 可以促进白细胞肿瘤细胞吞噬,并且将其标记微颗粒的表面可以用来抗炎治疗^[2,7,8]。

丝裂霉素(MMC)属于抗生素类抗肿瘤药物,破坏 DNA 的结构和功能,而 tuftsins 可能抑制 DNA 拓扑异构酶的功能,两药可以互补。tuftsins 与丝裂霉素联用在 SW1990 和 H460 细胞中,有明显的增效作用。力达霉素本身就具有强烈的杀伤肿瘤细胞的活性,tuftsins 与力达霉素(LDM)联用在 SW1990 细胞中,有明显的增效作用。tuftsins 与抗肿瘤药物(MMC 和 LDM)连用的结果显示,在特定的肿瘤细胞和某种浓度下,tuftsins 可以增效抗肿瘤药物的抗肿瘤细胞增殖活性。

力达霉素在低剂量时可以迅速的激活线粒体凋亡通路促使细胞凋亡^[9]。力达霉素由 1 个辅基蛋白和 1 个发色团组成,发色团是活性部分,辅基蛋白起保护发色团作用,并且这两个部分可以拆分,这样的性质力达霉素可以作为弹头药物。本研究报道了力达霉素辅基蛋白(LDP)在高剂量下在体外有一定抗肿瘤细胞增殖作用(图 5),并且 tuftsins 与力达霉素辅基蛋白的融合蛋白 LDP-TF 比 LDP 抗肿瘤细胞增殖作用明显增强(图 4)。强化融合蛋白 LDM-TF 抗肿

瘤细胞增殖作用也有明显增强(图 5)。本研究表明 tuftsins 是一种较好的化疗增强剂,其作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Jain S, Amiji M. Tuftsins - modified alginate nanoparticles as a noncondensing macrophage - targeted DNA delivery system[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(4):1074 - 1085
- 2 Kukowska - Kaszuba M, Dzierzbicka K, Serocki M, *et al.* Solid phase synthesis and biological activity of tuftsins conjugates[J]. *J Med Chem*, 2011, 54(7):2447 - 2454
- 3 陈淑珍,甄永苏,邵荣光. 力达霉素抗肿瘤作用及其分子机制研究新进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2010(6):401 - 407
- 4 郭晓芳,朱小飞,钟根深,等. 以人表皮生长因子受体 2 为靶点的强化融合蛋白 LDP-Hr-AE 的构建及抗肿瘤活性研究[J]. *中国药理学杂志*, 2012(12):941 - 947
- 5 Nishioka K. Anti - tumour effect of the physiological tetrapeptide, tuftsins[J]. *Br J Cancer*, 1979, 39(3):342 - 345
- 6 Khan A, Khan AA, Dwivedi V, *et al.* Tuftsins augments antitumor efficacy of liposomized etoposide against fibrosarcoma in Swiss albino mice [J]. *Mol Med*, 2007, 13(5 - 6):266 - 276
- 7 Constantopoulos A, Likhite V, Crosby WH, *et al.* Phagocytic activity of the leukemic cell and its response to the phagocytosis - stimulating tetrapeptide, tuftsins[J]. *Cancer Res*, 1973, 33(6):1230 - 1234
- 8 Xu Y, Zhu J, Xiang K, *et al.* Synthesis and immunomodulatory activity of [60] fullerene - tuftsins conjugates [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36):9940 - 9949
- 9 邱强,王真,蒋建明,等. 力达霉素经线粒体依赖通路介导细胞凋亡[J]. *药理学学报*, 2007, 42(2):132 - 138

(收稿日期:2013 - 01 - 06)

(修回日期:2013 - 01 - 25)

F 基因型腮腺炎减毒活疫苗的临床前安全性评价

梁 燕 张颖丽 廖 芸 刘龙丁 姬秋彦 王丽春 崔平芳 赵红玲 王晶晶 李琦涵

摘 要 **目的** 观察 F 基因型腮腺炎减毒活疫苗的急性毒性及长期毒性试验效果。**方法** 取前期制备的 F 基因型腮腺炎减毒活疫苗进行大鼠急性毒性试验,之后进行临床症状监测及大体病理学检查;并采用恒河猴进行长期毒性试验,之后观察试验动物的临床症状,进行血液学、生化检测、CD4⁺、CD8⁺ 细胞比例检测、病毒血症检测、病毒在组织器官的分布检测以及病理检查。**结果** 急性毒性试验表明给予大鼠相当于人用剂量的 1200 倍剂量时,无论是临床症状监测还是大体病理学检查,均无明显异常;而长期毒性试验结果表明,恒河猴 3 次免疫 8 倍人用剂量时,疫苗对动物临床症状、血液学和血清生化指标无明显影响,

基金项目:国家“863”计划项目(2012AA02A404);“十二五”重大新药创制国家科技重大专项基金资助项目(2012ZX09101319);国家科技重大专项基金资助项目(2009ZX10004 - 308);云南省应用基础研究重点项目(2008CC018)

作者单位:650118 昆明,中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所(梁燕、廖芸、刘龙丁、姬秋彦、王丽春、崔平芳、赵红玲、王晶晶、李琦涵);100176 北京,中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心(张颖丽)(注:梁燕和张颖丽为共同第一作者)

通讯作者:李琦涵,电子信箱:Imbecams.LQ@gmail.com