

# 重组 F3 肽-铜绿假单胞菌外毒素 A 抑制肿瘤生长

郭凯, 王贻莲, 周红姿, 陈泉, 陈凯, 李纪顺, 扈进冬, 杨合同

山东省科学院生物研究所, 山东省应用微生物重点实验室, 济南 250014

**摘要** 为检测重组的 F3 肽-铜绿假单胞菌外毒素 A (F3-PE39KDEL) 的抗肿瘤作用, 采用 MTT 法检测 F3-PE39KDEL 对人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549、人卵巢癌细胞 SKOV3 和人肝癌细胞 HepG2 的生长抑制活性。采用半数致死剂量法观察 F3-PE39KDEL 对小鼠的毒性反应。以接种人肺癌细胞的裸鼠为模型, 观察 F3-PE39KDEL 的抗肿瘤作用。结果显示, 培养 72、120 h 时, F3-PE39KDEL 对于人肺癌细胞 A549 和人乳腺癌细胞 MCF-7 具有显著的抑制活性,  $IC_{50}$  分别为 0.41、0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4.95、2.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。毒性试验结果显示, 静脉注射给予 F3-PE39KDEL 后小鼠的半数致死量为 1.1782 mg/kg, 动物出现自发运动减少, 死亡集中在给药后 1 d 内, 死亡动物及实验结束存活动物剖检未见异常。F3-PE39KDEL 对荷瘤裸鼠具有较强的抗肿瘤活性, 剂量分别为 0.1、0.2、0.4 mg/kg, 其抑制率分别达到 37.0%、43.2%、53.1%, 显示出良好的量效关系。F3-PE39KDEL 在靶向治疗肿瘤方面具有较好的应用前景。

**关键词** F3 肽; 铜绿假单胞菌外毒素 A; 受体; 肿瘤

**中图分类号** R735.3'5

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2014.07.001

## Recombinant Vascular Endothelial Receptor F3 Peptide-PE39KDEL Protein can Inhibit Tumor Growth

GUO Kai, WANG Yilian, ZHOU Hongzi, CHEN Quan, CHEN Kai, LI Jishun, HU Jindong, YANG Hetong

Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Shandong Academy of Sciences; Shandong Provincial Key Laboratory for Applied Microorganism, Jinan 250014, China

**Abstract** The objective was to investigate the antitumor effect of F3-PE39KDEL *in vitro* and *in vivo*. MTT method was employed to determine the inhibiting effect of F3-PE39KDEL on MCF-7, A549, SKOV3 and HepG2 cell lines. Its toxicity in mice was observed using the median lethal dose method. Its antitumor effect was determined based on the transplanted A549 cell line in nude mice. The results showed that when the culture times were 72 h and 120 h, the F3-PE39KDEL showed significant inhibitory effect on A549 and MCF-7 cell lines, with  $IC_{50}$  values of 0.41 and 0.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and 4.95 and 2.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. The toxicity test showed that the median lethal dose was 1.1782 mg/kg. The animals' spontaneous movement was decreased after administration, and animals died mainly within 1d after administration. All the animals including the dead and alive showed no abnormalities after sectional examination. The F3-PE39KDEL showed a potential antitumor effect *in vivo*. At the doses of 0.1, 0.2 and 0.4 mg/kg, its inhibitory rates were 37.0%, 43.2% and 53.1%, respectively, and the dose-activity relationship was also observed. These results suggest that the F3-PE39KDEL has good prospects in terms of targeted cancer therapy.

**Keywords** F3 peptide; PE39KDEL; receptor; tumor

收稿日期: 2013-10-09; 修回日期: 2014-01-19

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-214); 山东省科技发展计划项目(2012GSF12114); 山东省科学院博士基金项目(201207-18); 山东省留学人员科技活动择优项目(鲁人社字[2013]528号); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(2010GNC10947)

作者简介: 郭凯, 助理研究员, 研究方向为生物化学与分子生物学, 电子信箱: guokaicc@163.com; 杨合同(通信作者), 研究员, 研究方向为应用微生物学, 电子信箱: yanght@sas.org

引用格式: 郭凯, 王贻莲, 周红姿, 等. 重组 F3 肽-铜绿假单胞菌外毒素 A 抑制肿瘤生长[J]. 科技导报, 2014, 32(7): 15-21.

恶性肿瘤是威胁人类健康的重要疾病,目前肿瘤的非手术治疗包括放疗和化疗等,均以杀死肿瘤细胞为目的,大多数药物由于缺乏对肿瘤细胞的特异性,常规治疗剂量就会对正常组织器官产生显著的毒副作用。因此肿瘤靶向治疗已经成为肿瘤临床治疗的重要手段。肿瘤靶向治疗是利用具有一定特异性载体,将药物或其他杀伤肿瘤细胞的活性物质定向作用于肿瘤组织,而不影响正常组织细胞功能,从而提高疗效、减少毒副作用的一种方法。随着对肿瘤自身特点研究的不断深入,人们认识到绝大部分肿瘤的生长和转移都依赖于新生血管的形成。“没有肿瘤血管就没有肿瘤的浸润和转移”,这一基础理论研究的成果引起了肿瘤治疗理论的革命性进展<sup>[1]</sup>。最近10多年来,人们对肿瘤血管生成机制及肿瘤血管靶标分子进行了深入研究,并且针对肿瘤血管生成分子机制设计了一系列抗血管生成治疗策略及肿瘤血管的靶向治疗方案,肿瘤血管靶向治疗已成为目前肿瘤治疗的热点研究领域。

肽类具有靶向性、良好的生物相容性、无免疫原性、低毒性等特点,随着肿瘤细胞表面高表达肽类受体的发现,某些肽类可以作为导向物,以配体-受体特异性结合的方式应用于靶向药物递送系统。目前已经有研究表明抗肿瘤药物经过短肽修饰后取得较好的治疗效果<sup>[2-3]</sup>。F3肽来自高迁移组蛋白(high mobility group protein, HMG-2)N端的31个氨基酸残基<sup>[4]</sup>。F3肽的受体是新生血管内皮细胞和肿瘤细胞表面标志性分子——核仁素,正常细胞的核仁素只能在细胞核内表达,而在肿瘤细胞和肿瘤新生血管内皮细胞中核仁素能够在细胞表面表达<sup>[5]</sup>。由于F3肽几乎能与所有被测试的肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞高选择性地结合,可以将其携带的重组分子带到肿瘤细胞内<sup>[4]</sup>,因此F3肽可以作为肿瘤组织靶向给药的良好载体,能够携带抗肿瘤血管的药物实现靶向给药。

绿脓杆菌外毒素A(PEA)是铜绿假单胞杆菌各种分泌蛋白中毒性最强的外毒素,由613个氨基酸残基组成,分子量为66 kD,对多种培养细胞和哺乳动物都有强烈毒性。其毒性作用原理是抑制真核细胞的蛋白合成,即在细胞质中催化NAD<sup>+</sup>与蛋白合成延伸因子EF2共价结合,形成ADP核糖基化的EF2因子,使得EF2失活,蛋白质合成受阻<sup>[6,7]</sup>。PEA结构域(Domain, D)分为:DI(第1~252位氨基酸),具有与细胞识别和受体结合的功能;DIb(第365~484位氨基酸);DII(第253~364位氨基酸),负责PEA的跨膜转运,即将毒素从细胞膜外转移至细胞内有关;DIII(第405~613位氨基酸),DIII与DIb共同组成催化区域,用来进行ADP-核糖化作用<sup>[8]</sup>。

目前以GnRH或其衍生物为导向部分,以绿脓杆菌外毒素A(PE)的截短形式PE40及PE40衍生物为毒素部分的靶向治疗剂已经有报道<sup>[9]</sup>,这些融合蛋白的靶向性已得到广泛验证,能特异性地识别目的细胞并将其杀死。另有报道将PE毒素的359~365位氨基酸缺失后,PE毒素的活性会大幅度提高<sup>[10]</sup>;还有报道将PE末端5个氨基酸REDLK突变为KDEL后,PE的活性也会大幅度提高<sup>[11]</sup>。已有报道在大肠杆菌中异

源表达了以包涵体形式存在的F3-PE40<sup>[12]</sup>,但复性及复性后的抑制肿瘤活性实验未见报道。由于重组蛋白的复性过程复杂且难以保证活性,本实验室通过基因工程手段构建和表达了靶向融合蛋白F3-PE39KDEL,其以可溶性形式在大肠杆菌细胞质中表达,经纯化后得到重组的F3-PE39KDEL。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

融合表达的F3-PE39KDEL蛋白为本实验室通过构建含有F3肽片段和PE39KDEL的载体,在*E. coli* BL21(DE3)pLysS异源诱导表达后纯化得到。RPMI-1640培养基,500 mL/瓶,购自美国Invitrogen公司。化学试剂购自Sigma及生工生物工程(上海)有限公司。人乳腺癌细胞MCF-7、人肺癌细胞A549、人卵巢癌细胞SKOV3及人肝癌细胞HepG2均来源于中国科学院上海细胞库,细胞培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中。SPF级Balb/c裸鼠(雌雄各半)240只,5~6周龄,购自中国医学科学院实验动物研究所。饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。饲养温度20~25℃,湿度40%~70%,12 h/12 h明暗交替,自由进食进水。

### 1.2 肿瘤细胞株抑制检测

肿瘤细胞培养方法:肿瘤细胞株以含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液生长于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中,常规传代。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,每孔加入200 μL,铺板使待测细胞调密度至10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>孔。5% CO<sub>2</sub>,37℃孵育,至细胞单层铺满孔底(96孔平底板),加入浓度梯度的药物,孵育16~48 h。每孔加入20 μL 0.5%的MTT溶液,继续培养4 h。终止培养,吸去孔内培养液。每孔加入150 μL二甲亚砜(DMSO),低速振荡10 min。在酶联免疫检测仪OD 490 nm处测量各孔的吸光值<sup>[13]</sup>。

### 1.3 半数致死剂量

试验选用120只BALB/c小鼠,雌雄各半,按体重随机分为溶剂对照组和供试品组5组,每组20只,采用半数致死剂量法,静脉注射给药,供试各组分别给予F3-PE39KDEL注射液1.60、1.35、1.15、0.95和0.80 mg/kg,给药速度2 mL/(kg·s),给药时间约10 s,溶剂对照组同法给予氯化钠注射液。

### 1.4 裸鼠成瘤模型制作

采用裸鼠接种人肿瘤组织块生长法,以尾静脉注射给药,评价F3-PE39KDEL对肿瘤增殖的抑制活性。

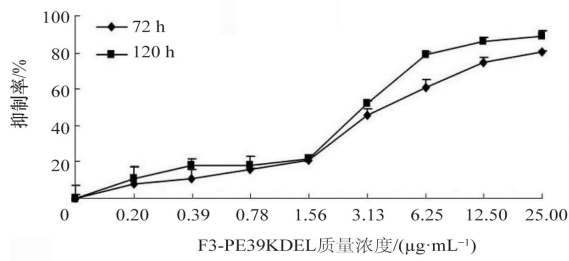
肿瘤组织块制作:收集细胞置50 mL离心管中,离心后磷酸缓冲液(PBS)清洗,生理盐水混悬并计数。每只裸鼠右前肢腋下接种2.0×10<sup>7</sup>/0.2 mL细胞,接种3只,裸鼠生长3~4周,待荷瘤鼠瘤组织块生长至1 g,处死动物,取瘤组织,冰浴下将肿瘤组织剖开,剔除坏死组织和结缔组织后,将组织块剪切成直径2 mm组织块备用。

肿瘤组织块接种:取裸鼠,局部皮肤消毒后,取上述备好的肿瘤组织块,以导管穿刺针法接种右前肢腋下皮内。动物放回原笼内,正常饮食饲养10 d。

### 1.5 裸鼠肿瘤抑制试验

供试各组分别给予溶剂对照氯化钠注射液、阳性药物依托泊苷(齐鲁制药有限公司)20 mg/kg、F3-PE39KDEL 0.1、0.2、0.4 mg/kg, 匀速尾静脉注射给药, 给药速度 2 mL/(kg·s), 给药时间约 10 s。隔日给药, 共 12 次。给药后每 5 d 测量肿瘤长径  $a$  和短径  $b$ , 肿瘤体积的计算式为  $V=(a \times b^2)/2$ 。给药 25 d 后, 将裸鼠处死, 取肿瘤称重并拍照。药物对肿瘤抑制率计算公式为

$$\text{抑制率} = (m_0 - m) / m_0 \times 100\%$$



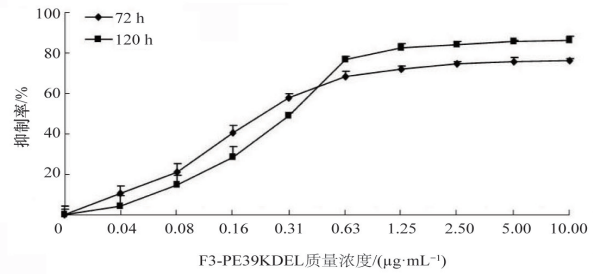
(a) 人乳腺癌细胞 MCF-7

式中,  $m_0$  为阴性对照组肿瘤平均质量,  $m$  为给药组肿瘤平均质量。

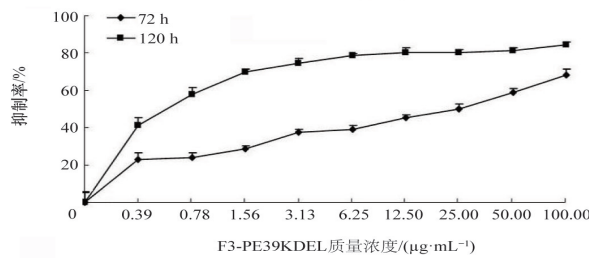
## 2 结果与分析

### 2.1 肿瘤细胞株抑制检测

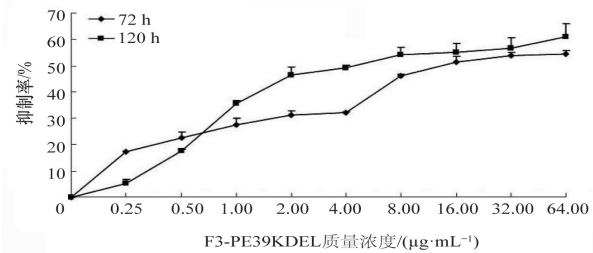
图 1 和表 1 为 F3-PE39KDEL 对 4 种不同的人肿瘤细胞株生长均有抑制作用, 但其抑制活性差异较大。培养 72、120 h 时, 对人肺癌的抑制活性最强, 其  $IC_{50}$  质量浓度分别为 0.41、0.42  $\mu\text{g/mL}$ 。



(b) 人肺癌细胞 A549



(c) 人卵巢癌细胞 SKOV3



(d) 人肝癌细胞 HepG2

图 1 F3-PE39KDEL 对不同肿瘤细胞的生长抑制作用

Fig. 1 F3-PE39KDEL inhibits the growth of different cancer cells

表 1 F3-PE39KDEL 对不同人肿瘤细胞株的  $IC_{50}$  值  
Table 1 F3-PE39KDEL effect on the  $IC_{50}$  of growth of different cancer cells

细胞株	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
	培养 72 h	培养 120 h
MCF-7	4.95	2.53
A549	0.41	0.42
SKOV3	17.80	0.82
HepG2	17.07	7.61

### 2.2 F3-PE39KDEL 致死剂量

结果显示, F3-PE39KDEL 小鼠最大不死剂量为 0.80 mg/kg, 最小全死剂量为 1.60 mg/kg (表 2, 表 3, 表 4), 采用组间公比 0.84, 兼顾供试品配制的便利性, 设计给药剂量序列为 1.60、1.35、1.15、0.95、0.80 mg/kg。本试验条件下, 小鼠静脉

注射给予 F3-PE39KDEL 6 h 后开始出现自发活动减少、竖毛、蜷卧等症状, 给药 8 h 后开始出现动物死亡, 以上症状出现的例数与给药剂量正相关。动物死亡主要集中在药后 1 d 以内, 存活动物药后 2 d 可基本恢复正常, 死亡动物及试验结束存活动物剖检未见异常, 实验动物异常活动详见表 5 和表 6。采用 Bliss 法计算半数致死剂量和 95% 可信限, Balb/c 小鼠体重, 合并统计  $LD_{50}$  为 1.1782 mg/kg, 95% 的可信限为 1.0969~1.2686 mg/kg, 且雌雄动物未有显著差别。

### 2.3 肿瘤裸鼠体重

单次给药后, 存活动物药后 1 d 体重均略有降低, 药后 7 和 14 d 体重增长趋势与溶剂对照组一致, 雌雄组未见显著性差异 (表 7, 表 8)。

接种肿瘤的裸鼠分别给予溶剂对照氯化钠、阳性药物依托泊苷 20 mg/kg、F3-PE39KDEL 0.1、0.2、0.4 mg/kg, 在 25 d 的给药期间中未见动物体重明显降低 (表 9)。说明各组动物对 F3-PE39KDEL 均具有较好的耐受性。

表2 雌动物 LD<sub>50</sub> 计算

Table 2 LD<sub>50</sub> calculations for female animals

剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	动物数	死亡数	实验几率单位	回归几率单位
1.60	0.20412	10	10	—	6.5480
1.35	0.13033	10	6	5.2529	5.6881
1.15	0.06070	10	5	5.0000	4.8766
0.95	-0.02228	10	2	4.1585	3.9096
0.80	-0.09691	10	0	—	3.0398
LD <sub>50</sub>	1.1784 mg/kg				
95%可信限	1.0967~1.3006 mg/kg				

注：“—”在急性毒性实验中，当动物死亡数为0或100%时，不计算实验几率单位。

表3 雄动物 LD<sub>50</sub> 计算

Table 3 LD<sub>50</sub> calculations for male animals

剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	动物数	死亡数	实验几率单位	回归几率单位
1.60	0.20412	10	9	6.2817	6.1459
1.35	0.13033	10	7	5.5240	5.5079
1.15	0.06070	10	4	4.7471	4.9058
0.95	-0.02228	10	2	4.1585	4.1883
0.80	-0.09691	10	1	3.7183	3.5430
LD <sub>50</sub>	1.1792 mg/kg				
95%可信限	1.0477~1.3403 mg/kg				

表4 雌雄动物合并 LD<sub>50</sub> 计算

Table 4 LD<sub>50</sub> calculations for combined female and male animals

剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	对数剂量	动物数	死亡数	实验几率单位	回归几率单位
1.60	0.20412	20	19	6.6452	6.3171
1.35	0.13033	20	13	5.3849	5.5858
1.15	0.06070	20	9	4.8746	4.8957
0.95	-0.02228	20	4	4.1585	4.0734
0.80	-0.09691	20	1	3.3548	3.3337
LD <sub>50</sub>	1.1782 mg/kg				
95%可信限	1.0969~1.2686 mg/kg				

表5 雌性动物异常症状

Table 5 List of abnormal symptoms of female animals

剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	药后 6 h				药后 8 h				药后 1 d				药后 2 d			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
1.60	3/10	0/10	0/10	0/10	10/10	6/10	6/10	0/10	×	×	×	10/10	×	×	×	×
1.35	3/10	0/10	0/10	0/10	9/10	9/10	9/10	0/10	2/10	4/10	0/10	6/10	0/4	3/4	0/4	0/4
1.15	1/10	0/10	0/10	0/10	6/10	4/10	6/10	0/10	5/10	5/10	3/10	5/10	0/5	2/5	0/5	0/5
0.95	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10	1/10	0/10	6/10	3/10	2/10	2/10	0/8	0/8	0/8	0/8
0.80	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

注：表中A,B,C,D分别表示自动活动减少，竖毛，蜷卧，死亡。n/m表示出现症状动物数/动物总数，“×”表示动物全部死亡。下同。

表6 雄性动物异常症状

Table 6 List of abnormal symptoms of male animals

剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	药后 6 h				药后 8 h				药后 1 d				药后 2 d				
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
1.60	4/10	0/10	0/10	0/10	9/10	7/10	6/10	0/10	1/10	1/10	0/10	9/10	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
1.35	2/10	0/10	0/10	0/10	10/10	5/10	5/10	0/10	1/10	3/10	0/10	7/10	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3
1.15	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	4/10	2/10	0/10	4/10	7/10	3/10	4/10	1/6	1/6	0/6	0/6	0/6
0.95	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	2/10	2/10	0/10	2/10	5/10	2/10	2/10	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
0.80	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	1/10	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9

表7 雌性动物体重统计数据(均值±SD)

Table 7 Weight statistics of female animals (average±SD)

剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体重/g			
	药前	药后 1 d	药后 7 d	药后 14 d
0	18.49±0.52 (n=10)	19.13±0.68 (n=10)	19.47±0.92 (n=10)	19.59±0.89 (n=10)
1.60	18.48±0.88 (n=10)	× (n=0)	× (n=0)	× (n=0)
1.35	18.72±0.98 (n=10)	18.01±1.02 (n=4)	19.24±1.17 (n=4)	19.79±0.82 (n=4)
1.15	18.37±1.01 (n=10)	17.97±0.88 (n=7)	18.84±1.24 (n=5)	19.82±1.12 (n=5)
0.95	18.33±0.70 (n=10)	18.10±0.68 (n=10)	18.63±0.45 (n=8)	19.04±0.96 (n=8)
0.80	18.60±0.55 (n=10)	18.53±0.53 (n=10)	19.07±0.36 (n=10)	19.88±0.66 (n=10)

表8 雄性动物体重统计数据(均值±SD)

Table 8 Weight statistics of male animals (average±SD)

剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	体重/g			
	药前	药后 1 d	药后 7 d	药后 14 d
0	19.23±0.62 (n=10)	19.72±0.93 (n=10)	21.21±0.81 (n=10)	22.29±0.91 (n=10)
1.60	19.73±0.89 (n=10)	20.11 (n=1)	22.25 (n=1)	23.27 (n=1)
1.35	19.45±0.73 (n=10)	19.44±0.22 (n=3)	21.37±0.60 (n=3)	22.82±0.99 (n=3)
1.15	19.66±0.60 (n=10)	19.24±0.67 (n=8)	20.93±1.31 (n=6)	22.07±1.42 (n=6)
0.95	19.50±0.92 (n=10)	19.31±0.87 (n=9)	20.71±1.31 (n=8)	21.45±1.41 (n=8)
0.80	19.73±0.55 (n=10)	19.90±0.84 (n=10)	20.98±1.04 (n=9)	22.00±1.03 (n=9)

表9 不同时间点裸鼠体重平均值(均值±SD)

Table 9 Mean body weight of nude mice at different times (average±SD)

给药 天数/d	溶剂对照 氯化钠	依托泊苷	F3-PE39KDEL		
			0.1 mg·kg <sup>-1</sup>	0.2 mg·kg <sup>-1</sup>	0.4 mg·kg <sup>-1</sup>
0	24.64±1.57	24.69±1.44	24.68±1.23	25.05±1.19	24.45±1.23
5	24.86±0.99	22.44±2.13	24.63±1.34	24.94±1.34	24.43±1.15
10	24.94±1.27	22.61±2.62	25.04±1.50	25.55±1.96	25.10±1.16
15	24.64±1.59	22.96±3.25	25.01±1.73	25.90±1.85	24.73±1.36
20	25.1±1.73	25.37±1.89	25.80±2.01	26.74±1.67	25.86±1.42
25	24.96±1.81	24.89±2.56	25.24±1.97	26.59±1.78	24.81±1.33
30	24.94±1.38	24.99±2.59	24.78±1.60	26.09±2.15	24.69±1.51

### 2.4 F3-PE39KDEL的抗肿瘤作用

体内抗肿瘤实验结果显示, F3-PE39KDEL能够显著抑制人肺癌细胞 A549 在 Balb/c 裸鼠体内的生长(图2), 在 0.2 和 0.4 mg/kg 给药剂量下, 裸鼠肿瘤体积明显小于阴性对照组; 每2天1次, 连续治疗25 d, 各组动物一般状况未见明显异常。表10显示, 在0.2和0.4 mg/kg 给药剂量下, 裸鼠肿瘤质量分别为(0.46±0.14)和(0.38±0.13)g, 与对照组相比(肿瘤质量为(0.81±0.12)g)差异显著(P<0.05, 表10和图3), 对肿瘤抑制率分别为43.2%和53.1%。

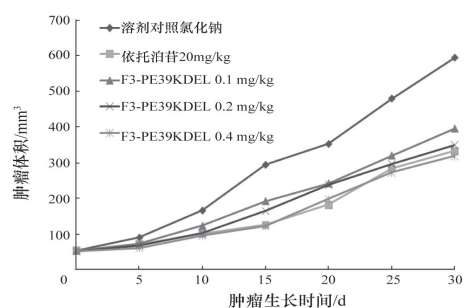


图2 不同时间点测量人肺癌A549肿瘤体积平均值

Fig. 2 Mean tumor volumes of A549 at different times

表10 F3-PE39KDEL对裸鼠移植人非小细胞肺癌A549的抑制作用

Table 10 Effects of F3-PE39KDEL on the growth of human non-small cell lung cancer cell line A549

组别	剂量/ (mg·kg <sup>-1</sup> )	动物数 (结束/开始)	体重/g	瘤重/g	抑制率/%
溶剂对照氯化钠	0	8/8	25.9±1.38	0.81±0.12	
依托泊苷	20.0	8/8	24.8±1.60	0.40±0.16	50.6
	0.1	8/8	26.1±2.15	0.51±0.19	37.0
F3-PE39KDEL	0.2	8/8	27.6±1.51	0.46±0.14	43.2
	0.4	8/8	25.0±2.59	0.38±0.13	53.1

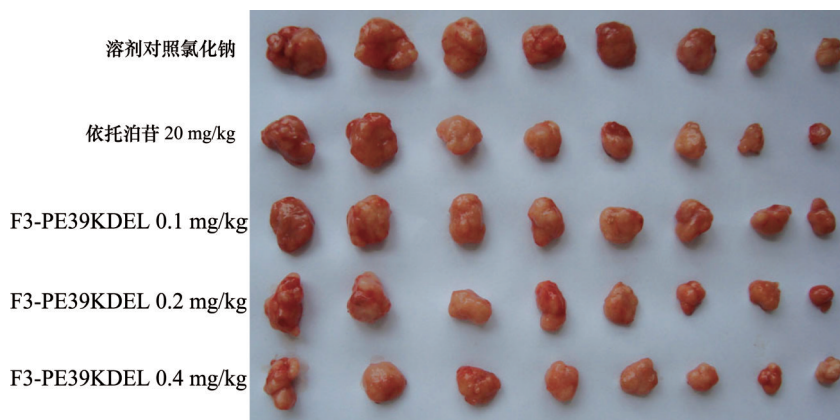


图3 裸鼠接种人肺癌细胞A549实验各组裸鼠肿瘤照片

Fig. 3 Photograph of tumors in nude mice in each group after being inoculated with human lung cancer cell line A549

### 3 讨论

通过接种肿瘤的裸鼠分别给予溶剂对照氯化钠、阳性药物依托泊苷 20 mg/kg、F3-PE39KDEL 0.1、0.2、0.4 mg/kg, 发现各组动物对药物均具有较好的耐受性, 未见动物体重明显降低。重组 F3-PE39KDEL 0.1、0.2、0.4 mg/kg 对人肺癌 A549 肿瘤生长的抑制率分别为 37.0%、43.2%、53.1%, 阳性对照药物依托泊苷注射液的抑制率为 50.6%。

国内外的研究表明, 实体瘤形成过程中有大量血管生成, 同时肿瘤细胞和血管内皮细胞表面还能表达 F3 受体<sup>[4]</sup>, F3 肽几乎能与所有被测试的肿瘤细胞和肿瘤血管内皮细胞高选择性地结合<sup>[14,15]</sup>。

本实验室成功表达和纯化了以人促性腺激素释放激素 GnRH 为信号肽的 GnRH-PE39KDEL<sup>[16]</sup>, 实验证明该重组蛋白具有较好的肿瘤细胞抑制活性。因此, 选用 PE39KDEL 为活性中心, 以与肿瘤细胞和血管内皮细胞表面特异表达的 F3 受体作为靶点选用 F3 小肽。通过基因重组和异源表达, 得到了具有肿瘤靶向亲和的融合蛋白 F3-PE39KDEL。通过肿瘤细胞抑制、肿瘤抑制试验和半致死剂量的研究, 证实该融合蛋白对人肺癌具有较好的抑制活性, 同时毒副作用较低。本研究以人肺癌细胞 A549 及荷瘤裸鼠为模型研究了 F3-PE39KDEL 的肿瘤抑制作用, 而 F3-PE39KDEL 的作用机制仍是未知环节, 因此 F3-PE39KDEL 抑制肿瘤血管生成的作用靶点及其构效关系的研究工作有待于进一步开展。

### 4 结论

通过体外抗肿瘤试验证实 F3-PE39KDEL 对人乳腺癌细胞 MCF-7、人肺癌细胞 A549、人卵巢癌细胞 SKOV3 和人肝癌细胞 HepG2 的生长都具有较好的抑制活性。其中对人肺癌的抑制活性最强, 其 IC<sub>50</sub> 为 0.41 μg/mL。用 Bliss 法计算半数致死剂量 LD<sub>50</sub> 为 1.1782 mg/kg, 且雌雄动物未有显著差别。在 0.4 mg/kg 给药剂量下, F3-PE39KDEL 能显著抑制人肺癌细胞 A549 在 Balb/c 裸鼠体内的生长, 抑制率达到 53.1%。初步证实该融合蛋白对人结肠癌具有较好的抑制活性。

#### 参考文献 (References)

- [1] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease[J]. Nature Medicine, 1995, 1(1): 27-30.
- [2] 吴学萍, 谢明均, 孙艳, 等. 短肽修饰的甲氨蝶呤的制备及细胞毒性作用[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(1): 32-35.  
Wu Xueping, Xie Mingjun, Sun Yan, et al. Preparation of methotrexate modified by small peptide and study on its cytotoxic effect[J]. Chinese Journal of Hospital Pharmacy, 2011, 31(1): 32-35.
- [3] 周雅梅, 吴学萍, 曾理, 等. 肽修饰的甲氨蝶呤体外抗肿瘤作用初步研究[J]. 药学报, 2012, 47(4): 452-458.  
Zhou Yamei, Wu Xueping, Zeng Li, et al. *In vitro* anti-tumor effect of methotrexate modified by peptide[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2012, 47(4): 452-458.
- [4] Porkka K, Laakkonen P, Hoffman J A, et al. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(11): 7444-7449.
- [5] Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, et al. Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(31): 22223-22235.
- [6] Yates S P, Merrill A R. A catalytic loop within pseudomonas aeruginosa exotoxin A modulates its transferase activity[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(37): 35029-35036.
- [7] Yates S A S P, Merrill A R. Insight into the catalytic mechanism of pseudomonas aeruginosa exotoxin A[J]. Biochemistry, 2002, 277(48): 46669-46675.
- [8] 祁志荣, 李虹. PE 类重组免疫毒素的研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2006, 34(1): 50-53.  
Qi Zhirong, Li Hong. Advances in recombinant immunotoxin of PE class [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2006, 34(1): 50-53.
- [9] 张艳, 刘秀群. 高效低毒的系列功能蛋白: 中国, 200410033621.6[P]. 2004-10-03.  
Zhang Yan, Liu Xiuqun. Series functional protein of high efficiency and low toxicity: CN, 200410033621.6[P]. 2004-10-03.
- [10] Taupiac M P, Bébien M, Alami M, et al. A deletion within the translocation domain of pseudomonas exotoxin A enhances translocation efficiency and cytotoxicity concomitantly [J]. Molecular Microbiology, 1999, 31(5): 1385-93.
- [11] Fitzgerald D J, Pastan I H. Recombinant pseudomonas exotoxin with increased activity: US, 5821238 A[P]. 1998-10-13.
- [12] 朱海兵, 黄轶, 曾昭淳. F3 重组毒素的克隆表达及纯化 [J]. 科技导报, 2009, 27(12): 19-22.  
Zhu Haibing, Huang Yi, Zeng Zhaochun. The cloning, expression and purification of F3 recombinant toxin [J]. Science & Technology Review, 2009, 27(12): 19-22.
- [13] 刘新, 邵长伦, 孔雯, 等. 中药复方海藻制剂体外免疫调节、细胞毒和抗氧化作用[J]. 中国海洋药物, 2009, 28(4): 13-16.  
Liu Xin, Shao Changlun, Kong Wen, et al. Immunomodulatory, cytotoxic and antioxidant effects of traditional Chinese medicine seaweed complex prescription *in vitro*[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2009, 28(4): 13-16.
- [14] Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: Current therapies and future prospects [J]. Journal of Amino Acids, 2012, 2012: doi: 10.1155/2012/1967347.
- [15] Winer I, Wang S, Lee Y E, et al. F3-targeted cisplatin-hydrogel nanoparticles as an effective therapeutic that targets both murine and human ovarian tumor endothelial cells *in vivo* [J]. Cancer Research, 2010, 70(21): 8674-83.
- [16] 郭凯, 赵晓燕, 周红姿, 等. 重组人促性腺激素-铜绿假单胞菌外毒素 A 蛋白的可溶性表达、纯化和对肿瘤细胞的抑制活性[J]. 山东科学, 2013, 26(2): 41-47.  
Guo Kai, Zhao Xiaoyan, Zhou Hongzi, et al. Soluble expression and purification of GnRH-PE39KDEL and the inhibition to the activity of a tumor cell [J]. Shandong Science, 2013, 26(2): 41-47.

(责任编辑 吴晓丽)