# 肿瘤微环境双重响应性的智能型蛋白毒素给药系统的构建和表征

谭娇<sup>1,2</sup>,陈应之<sup>2</sup>,蔺婷婷<sup>2</sup>,梁剑铭<sup>2</sup>,杨永新<sup>2</sup>,孙逊<sup>1\*</sup>,黄永焯<sup>2\*</sup>(1.四川大学华西药学院,成都 610041; 2.中科 院上海药物所,上海 201203)

摘要:目的 利用蛋白重组技术和PEG 定点修饰技术,制备具有肿瘤微环境双重响应性的智能型蛋白毒素给药系统。方法 利用基因重组技术,在天花粉蛋白(trichosanthin, TCS)的 C 端引入天冬酰胺内肽酶(legumain)的底物天冬酰胺肽段和 半胱氨酸残基,将所构建的突变体转化到大肠杆菌中表达目的蛋白并纯化。进一步将重组蛋白末端的半胱氨酸与具有巯基反应性的 mPEG-Hz-Mal 偶联合成 TCS-Asn10-Hz-PEG,采用弱阳离子交换柱纯化 TCS-Asn10-Hz-PEG,并在体外考察 了 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸敏感性和酶敏感性。结果 成功制备、分离和纯化得到了 TCS-Asn10-Hz-PEG,并在体外考察 了 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸敏感性和酶敏感性。结果 成功制备、分离和纯化得到了 TCS-Asn10-Cys,完成了 mPEG-Hz-Mal 与 TCS-Asn10-Cys 的定点偶联,得到智能型蛋白毒素给药系统 TCS-Asn10-Hz-PEG。TCS-Asn10-Hz-PEG 在体外 pH 5.6 的介质中和天冬酰胺内肽酶的作用下,能够水解或酶解释放出 TCS,具有酸敏感特性和酶敏感特性。结论 本实验设计的蛋白毒素给药系统,具有酸敏感和酶敏感双重响应特性。

关键词: 天花粉蛋白; 聚乙二醇修饰; 肿瘤微环境; pH 敏感; 天冬酰胺内肽酶

中图分类号: R963 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)11-1297-05 **DOI**: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.001

#### Constructed and Characterization of Tumor Microenvironment-sensitive Drug Delivery System

TAN Jiao<sup>1,2</sup>, CHEN Yingzhi<sup>2</sup>, LIN Tingting<sup>2</sup>, LIANG Jianming<sup>2</sup>, YANG Yongxin<sup>2</sup>, SUN Xun<sup>1\*</sup>, HUANG Yongzhuo<sup>2\*</sup>(1.West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2.Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To achieve tumor microenvironment-sensitive drug delivery which was prepared by recombinant and PEGylation techniques. **METHODS** A substrate peptide sequence of asparaginyl endopeptidase (legumain) was introduced to the C-terminus of trichosanthin(TCS) by recombinant technique; the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells. TCS-Asn10-Cys recombinant protein was expressed and purified according a standard protocol. Further, the C-terminus thiol of the recombinant protein was conjugated to mPEG-Hz-Mal. The TCS-Asn10-Hz-PEG conjugate was purified using CM sepharose fast flow column. The pH-sensitivity and enzyme-sensitivity of TCS-Asn10-Hz-PEG *in vitro* were tested. **RESULTS** The TCS-Asn10-Cys fusion protein was successfully expressed and purified. The tumor microenvironment-drug delivery system of TCS-Asn10-Hz-PEG was prepared. In either the pH 5.6 medium or the presence of legumain, the PEG chain could be cleaved by hydrolysis or proteolysis from the TCS, of which the activity was recovered. **CONCLUSION** It is developed a dual-sensitive drug delivery system of TCS-Asn10-Hz-PEG that can be responsive to either acidic hydrolysis or legumain proteolysis.

KEY WORDS: trichosanthin; PEGylation; tumor microenvironment; pH sensitive; legumain

进入 21 世纪, 生物医学迅猛发展, 生物大分 子药物已成为药物研究开发中的重要研究领域。 目前重组蛋白药物虽然仅占全球处方药市场的 8%左右, 但其发展势不可挡<sup>[1]</sup>。天花粉蛋白 (trichosanthin, TCS)是从葫芦科栝楼属植物栝楼的 块茎中提取出来的一种 I 型核糖体失活碱性蛋 白。近年来随着对 TCS 结构和功能的深入研究, 发现 TCS 对乳腺癌、黑色素瘤、胃癌、结直肠癌、 肺癌、肝癌、白血病等多种肿瘤细胞有显著的抑 制作用<sup>[2-4]</sup>。然而,TCS 的临床应用面临体内的半 衰期短、免疫原性强以及肿瘤靶向性差等难题<sup>[5]</sup>。 因此,为了降低 TCS 的致敏性并延长体内代谢时

基金项目: 国家自然科学基金(81422048, 81172996, 81373357)

作者简介: 谭娇,女,硕士生 Tel: (021)20231000-1403 E-mail: jiaotan1112@sina.cn <sup>\*</sup>通信作者: 孙逊,女,博士,教授 Tel: (028)85502307 E-mail: xunsun22@gmail.com 黄永焯,男,博士,研究员 Tel: (021)20231000-1401 E-mail: yzhuang@mail.shcnc.ac.cn

间,增强其肿瘤特异靶向性,提高其在抗肿瘤应 用中的疗效和安全性,本实验将蛋白重组与现代 给药技术相结合,设计了一种具有肿瘤微环境双 重响应性的智能型 TCS 给药系统 TCS-Asn10-Hz-PEG。在C端将天冬酰胺内肽酶(legumian)的作用 底物天冬酰胺肽段和半胱氨酸通过蛋白重组技术 同时引入 TCS 中,一方面连接 PEG 的天冬酰胺肽段 可被肿瘤特异性微环境中的天冬酰胺内肽酶水解断 裂,另一方面半胱氨酸残基可以与 mPEG-Hz-Mal 化合物反应生成具有 pH 敏感的腙键, 腙键在微酸 性环境中可迅速发生水解、断裂,从而释放出药 物。本实验设计的 TCS 双重响应性给药体系,由 于 PEG 的屏蔽作用,在正常组织中不易被细胞摄 取,而通过肿瘤特异性微环境中的酶解和弱酸双 点触发,保证 PEG 与 TCS 的充分解离,定点在肿 瘤内释放出药物,游离的 TCS 恢复其入胞作用, 从而杀灭肿瘤细胞。实验设计思路见图 1。



图 1 肿瘤微环境双重响应性 TCS-Asn10-Hz-PEG 的设计 思路

Fig. 1 Design strategy for pH-sensitive/enzyme-sensitive TCS-Asn10-Hz-PEG

#### 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 药品与试剂 琼脂粉、浓盐酸、氯化钠和 咪唑均购自国药集团化学试剂有限公司;蛋白胨、 酵母提取物(英国 OXOID 公司);异丙基-β-D-硫代 半乳糖苷(IPTG,美国 Thermo 公司);三羟甲基氨 基甲烷(Tris,上海捷瑞生物工程有限公司);卡那 霉素(上海碧云天生物技术研究所);聚乙二醇甲醚 (Mw=2000,美国 Sigma-Aldrich 公司);Ni-NTA His·Bind resin(德国默克集团,Novagen);实验用 水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器 BT25S 电子天平(德国赛多利斯科学 仪器公司); GelDoc XR 凝胶成像系统(美国伯乐公司); Mini-protean 蛋白电泳仪(美国伯乐公司);

JY92-IIN 超声波细胞破碎机(宁波新芝生物技术股份有限公司); Purifier UPC 快速蛋白液相色谱仪(美国通用公司)。

# 1.2 方法

**1.2.1** TCS-Asn10-Cys 的构建与表达 以含有 TCS 序列的 pET3d-TCS 为模板,利用 PCR 技术在 TCS 基因 3'端插入 Asn10-Cys 编码序列,并运用 基因工程技术将 TCS-Asn10-Cys 重组基因插入原 核表达载体 pET28a 构建成 pET28a-TCS-Asn10-Cys 重组质粒。将 pET28a-TCS-Asn10-Cys 转化大 肠杆菌 BL21(DE3)菌株,涂布于培养平板中(含 50 µg·mL<sup>-1</sup> 卡那霉素)过夜培养,次日,挑取不同 的阳性单克隆菌落放入 1 mL LB 培养基(含 50 µg·mL<sup>-1</sup> 卡那霉素)中振荡培养 12 h, 再按照 1:100的比例取上述菌液转接于100 mL LB 培养基 (含 50 µg·mL<sup>-1</sup> 卡那霉素)中,在 37 ℃摇床上 250 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养至吸光值(OD<sub>600</sub>)约为 0.6 时, 加入 IPTG 诱导表达 4 h 后,离心收集菌体,进行 冻融处理,用 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达。

1.2.2 TCS-Asn10-Cys 的分离与纯化 将菌体进 行大量扩增后,收集菌体,经破碎处理后离心, 取上清液过 Ni-NTA His·Bind Resin,分别用含 20, 50,100,200,500 mmol 和 2 mol 咪唑的 PBS 溶 液洗柱,收集含各种浓度咪唑的流出液,取样进 行 SDS-PAGE 分析,筛选出合适洗脱浓度的咪唑 溶液,初步分离杂蛋白与目的蛋白 TCS-Asn10-Cys。为了满足后续合成实验的需要,进一步用快 速蛋白液相色谱仪(脱盐柱)除掉高浓度的咪唑,制 备得到 TCS-Asn10-Cys(Mw= 29 kDa)的 PBS 溶液。

1.2.3 mPEG-Hz-Mal 的合成 将聚乙二醇甲醚溶 于无水二氯甲烷中,逐滴加入 3 倍摩尔量的对硝 基氯甲酸苯酯(NPC)溶液,以三乙胺作为催化剂, 室温下剧烈搅拌反应 48 h,于异丙醇中重结晶得 到产物 mPEG-NPC。将 mPEG-NPC 加入到过量的 水合肼中进行取代反应过夜,然后透析除去未反 应的水合肼等杂质,冻干后得到 mPEG-Hz。将 mPEG-Hz 与 4 倍摩尔量的 *N*-(4-乙酰苯基)-2,5-马 来酰亚胺(APM)反应引入马来酰亚胺,经葡聚糖 LH-20 柱纯化,得到终产物 mPEG-Hz-Mal(Mw≈ 2 200)。

**1.2.4** TCS 重组蛋白的 PEG 定点修饰(TCS-Asn10-Hz-PEG) 将纯化后的 TCS-Asn10-Cys (1 mg·mL<sup>-1</sup>)与 mPEG-Hz-Mal 按摩尔比为 1:2 投

料反应(反应缓冲液为 pH 7.0 的 PBS 溶液,含 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA·2Na),置于水平摇床上晃动,冰 浴中反应过夜,用二硫苏糖醇(DTT)终止反应, SDS-PAGE 鉴定 PEG 修饰产物 TCS-Asn10-Hz-PEG 的合成结果,并优化合成条件。采用弱阳离 子交换柱分离合成产物 TCS-Asn10-Hz-PEG,经平 衡洗涤后,以 0~0.2 mol 的 NaCl 线性梯度洗脱, 以 SDS-PAGE 鉴定 PEG 修饰产物 TCS-Asn10-Hz-PEG 的出峰位置,收集目的蛋白。

**1.2.5** TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸敏感验证 将 TCS-Asn10-Hz-PEG 分别加入 pH 3.0 和 pH 5.6 的 PBS 溶液中,终浓度为 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>, 置于 37 ℃水 浴中孵育,在12 h 时取样 20 µL 进行 SDS-PAGE 分析,验证 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸敏感特性。

**1.2.6** TCS-Asn10-Hz-PEG 的酶敏感验证 将 TCS-Asn10-Hz-PEG 溶于含有的 20 µg·mL<sup>-1</sup> 天冬 酰胺内肽酶的 PBS 溶液中,终浓度为 0.2 mg·mL<sup>-1</sup>, 置于 37 ℃水浴中孵育,在 2,4,6,12,24,48 h 时取样 20 µL 进行 SDS-PAGE 分析,验证 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酶敏感特性。

# 2 结果与讨论

2.1 TCS-Asn10-Cys 的表达与鉴定

以含有 TCS 基因的质粒为模版,利用 PCR 技术在 C 端引入具有天冬酰胺内肽酶敏感性的天冬酰胺序列 Asn10 和半胱氨酸残基,将含有突变体基因的质粒转化感受态大肠杆菌 *E.coli* BL21,挑取阳性克隆,扩增,经 IPTG 诱导表达 TCS-10Asn-Cys 蛋白。结果表明经 IPTG 诱导,在 29 kDa 附近出现明显的新增蛋白条带,与理论分子量 29 kDa 相符合,初步证明蛋白表达成功,见图 2。



图 2 不同阳性克隆菌落中 TCS-10Asn-Cys 的表达 Fig. 2 The expression of TCS-10Asn-Cys in different positive clones

# 2.2 TCS-Asn10-Cys 的分离与纯化

经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后,用 12% SDS-PAGE 分析表明当洗脱液中咪唑浓度为

100 mmol·L<sup>-1</sup>时,即可将 TCS-Asn10-Cys 大量洗 脱出来,在分子量约为 29 kDa 处,出现很明显的、 单一的蛋白条带,见图 3。



图 3 TCS-Asn10-Cys 的分离与纯化 Fig. 3 The purification of TCS-Asn10-Cys

# 2.3 mPEG-Hz-Mal 的合成

经氢谱鉴定, δ=6.839(2H, -CH2=CH2-)为 APM 中马来酰亚胺的特征峰, δ=7.240~7.752(4H, -CH2=CH2-)为 APM 中苯环的特征峰, δ=3.488 (*m*, -O-CH2-CH2-O)是聚乙二醇主链的特征峰, 以上结果表明 mPEG-Hz-Mal 合成成功。结果见图 4。



**图 4** mPEG-Hz-Mal 的氢谱图



#### 2.4 TCS 重组蛋白的 PEG 定点修饰

PEG 修饰是一种能够改善蛋白质药物药效和 性能,降低不良反应的有效方法之一。亲水性 PEG 链具有良好的生物相容性,能够掩盖蛋白表面的 抗原决定簇,降低蛋白质的免疫原性<sup>[6]</sup>。PEG 的立 体位阻作用可以防止蛋白之间发生相互作用,提 高蛋白质的稳定性,还能避免体内调理素的吸附, 从而有效逃避人体网状内皮系统(RES)的清除,延 长血浆半衰期<sup>[7]</sup>。另外,借助 EPR 效应,PEG 修 饰后的蛋白药物能提高其在肿瘤部位的蓄积,增 强了蛋白药物对肿瘤的靶向选择性<sup>[8-9]</sup>。传统的 PEG 修饰蛋白药物虽然显著改善了其成药性,但 是 PEG 的位阻效应会极大地抑制蛋白药物与细胞 表面受体的结合, 阻碍其进入细胞发挥药理作用。 为了达到定点修饰的目的。本研究利用基因工程 技术,将半胱氨酸残基引入天花粉蛋白的C末端, 它能与mPEG-Hz-Mal 末端的马来酰亚胺发生特异 性反应, TCS-Asn10-Cys 经 PEG 修饰后出现一条 分子量增大的主条带,及少量未反应的 TCS-Asn10-Cys,见图 5。经弱阳离子交换柱层析纯化 可将 TCS-Asn10-Cys 和过量的 mPEG-Hz-Mal 除 去,得到较为均一的产物 TCS-Asn10-Hz-PEG,它 在 SDS-PAGE 中表观分子量显著增大(35 kDa 左 右),高于 mPEG-Hz-Mal 及 TCS-Asn10-Cys 分子 量之和。其中的原因可能是由于线状的 PEG 分子 水力学半径较大,大大降低了蛋白泳动速率;另 一可能的原因是 PEG 的水化程度非常高, 使得 PEG 化蛋白在 SDS-PAGE 胶中的泳动行为异常。 纯化后的 TCS-Asn10-Hz-PEG 经凝胶成像系统分 析后,产物纯度约为 90%,可以用于后续实验中, 见图 6。利用蛋白重组与 PEG 定点修饰技术,将 PEG 通过定点偶联到 TCS 的末端,PEG 分子能够 降低蛋白毒素的免疫原性、延长生物半衰期、提 高蛋白毒素稳定性。







图 6 TCS-Asn10-Hz-PEG 的分离和纯化 Fig. 6 The purification of TCS-Asn10-Hz-PEG

### 2.5 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸敏感验证

所谓肿瘤微环境,即肿瘤细胞繁殖和生存的 内环境,有关肿瘤微环境影响肿瘤生长进程的研 究是肿瘤学中的热点问题。肿瘤微环境的理化性质 方面与人体正常内环境存在着许多不同的地方,这 些差异已成为了药物肿瘤靶向给药系统设计中常 用的靶点。如肿瘤部位由于在有氧或者无氧条件 下高速糖酵解产生的大量乳酸使其细胞外 pH 呈 微酸性(pH 5.5~6.5),而正常组织的 pH 一般为 7.4 左右<sup>[10-11]</sup>。本实验利用这一特性,在 TCS-Asn10-Hz-PEG 中引入了酸敏感的腙键。实验结果表明, TCS-Asn10-Hz-PEG 中的腙键在 pH 5.6 的介质中, 12 h 后释放出绝大部分 TCS,在 pH 3.0 的介质中, TCS 能完全释放,见图 7。TCS-Asn10- Hz-PEG 在 中性 pH 7.0 和微碱性 pH 7.4 的 PBS 溶液中,仅 有很少程度的降解,释放出少量的 TCS。



图 7 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酸解 Fig. 7 The acidolysis of TCS-Asn10-Hz-PEG

### 2.6 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酶敏感验证

肿瘤组织中有大量特异性表达的蛋白分布在 肿瘤细胞膜表面。其中,天冬酰胺内肽酶是一种 应激蛋白,目前其已成为广大研究学者的重点研 究对象。天冬酰胺内肽酶在正常的组织器官,如 肺、肝脏与肾脏中表达量很低,而其在肿瘤组织 中以及肿瘤微环境的巨噬细胞中的表达量显著升 高<sup>[12]</sup>。在肿瘤组织中,天冬酰胺内肽酶可分泌到 细胞外, 也可以成为细胞膜蛋白, 并且天冬酰胺 内肽酶可以特异地水解天冬酰胺肽链。根据天冬 酰胺内肽酶的这一特点重构了阿霉素,把天冬酰 胺内肽酶作用底物的肽段连接到阿霉素上制得前 体药物 legubicin。legubicin 在肿瘤组织中经天冬 酰胺内肽酶的作用释放出游离阿霉素,从而提高 了阿霉素的肿瘤靶向性,降低了其对机体正常组 织的不良反应<sup>[13]</sup>。本研究在 TCS 的 C 末端引入了 天冬酰胺内肽酶底物肽,目的是使 TCS-Asn6-Hz-PEG 在肿瘤微环境发生酶解断裂,从而在肿瘤部 位特异性释放 TCS 并发挥抗肿瘤药效。酶敏感实 验证明, TCS-Asn10-Hz-PEG 中的天冬酰胺肽段在 天冬酰胺内肽酶作用下,24 h 后释放出 30%左右 TCS,见图 8 和表 1。同时结合酸敏感和酶敏感特 性的智能型 TCS 给药系统有望在肿瘤部分发生定 点释放,发挥抗肿瘤的作用。



图 8 TCS-Asn10-Hz-PEG 的酶解

Fig. 8 The proteolysis of TCS-Asn10-Hz-PEG

表1 TCS-Asn10-Hz-PEG	的酶;	解程	度
---------------------	-----	----	---

```
Tab. 1 Legumain proteolysis of TCS-Asn10-Hz-PEG
```

分解产物	酶解程度/%						
	0 h	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h
TCS-b-PEG/%	94	77.7	73.3	74.8	73.1	69.3	69.1
TCS/%	6	22.3	26.7	25.2	26.9	30.7	30.9

3 结论

本实验同时采用重组蛋白表达技术与现代药

物制剂学技术,利用酸敏感性的腙键以及酶敏感的短肽连接 PEG 与 TCS,有望能够避免 PEG 阻碍 TCS 进入细胞的劣势。本实验设计的肿瘤微环境 双重响应性的智能型 TCS 给药体系,通过 PEG 定 点修饰与定点释放,结合天冬酰胺内肽酶水解与 pH 触发解离技术,为研制低毒、高效和低免疫原 性的 TCS 制剂,为开发具有抗肿瘤价值的临床用 药提供了新的思路和技术手段。

#### REFERENCES

- [1] EVALUATE PHARMA. Biotech set to dominate drug industry growth [R]. 2009.
- [2] LI M, CHEN F, LIU C P, et al. Dexamethasone enhances trichosanthin-induced apoptosis in the HepG2 hepatoma cell line [J]. Life Sci, 2010, 86(1/2): 10-16.
- [3] ZHANG K, XU J, HUANG X, et al. Trichosanthin down-regulated p210Bcr-Abl and enhanced imatinib-induced growth arrest in chronic myelogenous leukemia cell line K562 [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(4): 581-587.
- [4] LEE K M, WONG K B, SHAW P C. Recent advances in trichosanthin, a ribosome inactivating protein with multiple pharmacological properties. Toxicon, 2005, 45(6): 683-689JIANG X Z. Manufactural method for a warm external medicament: China, 88105607.3 [P]. 2010-07-26.
- [5] AN Q, LEI Y, JIA N, et al. Effect of site-directed PEGylation of trichosanthin on its biological activity, immunogenicity, and pharmacokinetics [J]. Biomol Eng, 2007, 24(6): 643–649.
- [6] CHAN W L, SHAW P C, LI X B, et al. Lowering of trichosanthin immunogenicity by site-specific coupling to dextran [J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57(8): 927-934.
- [7] FEE C J, VAN ALSTINE J M. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues [J]. Chem Eng Sci, 2006, 61(3): 924-939.
- [8] PASUT G, VERONESE F M. PEGylation for improving the effectiveness of therapeutic biomolecules [J]. Drugs Today (Barc), 2009, 45(9): 687-695.
- [9] NARIMATSU S, YOSHIOKA Y, WATANABLE H, et al. Lysine-deficient lymphotoxin-α mutant for site-specific PEGylation [J]. Cytokine, 2011, 56(2): 489-493.
- [10] LEE E S, GAO Z, BAE Y H. Recent progress in tumor pH targeting nanotechnology [J]. J Control Release, 2008, 132(2): 164-170.
- [11] WU W, LUO Y, SUN C, et al. Targeting cell-impermeable prodrug activation to tumor microenvironment eradicates multiple drug-resistant neoplasms [J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 970-980.
- [12] EROGLU A, SARI A. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast cancer tissues [J]. Med Oncol, 2007, 24(2): 169-174.
- [13] LIU C, SUN C Z, HUANG H N, et al. Overexpression of Legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy [J]. Cancer Res, 2003, 63(11): 2957-2964.

收稿日期: 2014-01-02