

大肠杆菌 Nissle1917 L-天冬酰胺酶 II 基因在大肠杆菌 BL21 中的表达与抗肿瘤活性

梁毅偈 孙运军 胡胜标 颜富 张旭 白利明 张友明 丁学知 夏立秋*

(湖南师范大学 生命科学学院 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地 湖南 长沙 410081)

摘要:【目的】从大肠杆菌 Nissle1917 中获得 L-天冬酰胺酶 II 基因, 并研究其抗肿瘤活性。【方法】以大肠杆菌 Nissle1917 基因组为模板 PCR 扩增 L-天冬酰胺酶 II 基因, 克隆至可诱导表达载体 pET28a 上。将 L-天冬酰胺酶 II 表达载体 pET28a-asp 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中并通过 IPTG 诱导表达, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和液相色谱-质谱(LC-MS)对表达的 L-天冬酰胺酶 II 进行鉴定, 并通过镍柱亲和层析纯化收集表达出的 L-天冬酰胺酶 II。用纯化定量以后的 L-天冬酰胺酶 II 作用小鼠乳腺癌 4T1 细胞、人肝癌 Hep-3B 细胞和人脐静脉内皮细胞 HUVEC。【结果】来自于大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶 II 基因可在大肠杆菌 BL21 中高效表达并通过 LC-MS 得到鉴定, 细胞毒性实验结果表明 L-天冬酰胺酶 II 对 4T1 细胞和 Hep-3B 细胞的生长具有较强的抑制作用, 而对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 的生长无明显抑制效果。【结论】来源于大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶 II 能显著抑制 4T1 细胞和 Hep-3 肿瘤细胞的生长, 而对人正常组织细胞的生长无明显抑制效果, 为进一步研究 L-天冬酰胺酶 II 特异性抗肿瘤作用机制和对实体瘤的应用研究奠定了重要基础。

关键词: L-天冬酰胺酶 II, 大肠杆菌, 克隆, 抗肿瘤

Expression of *Escherichia coli* Nissle1917 L-asparaginase II -encoding gene in *E. coli* BL21 and anti-tumor activity

LIANG Yi-Jie SUN Yun-Jun HU Sheng-Biao YAN Fu ZHANG Xu BAI Li-Ming
ZHANG You-Ming DING Xue-Zhi XIA Li-Qiu*

(State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

Abstract: [Objective] To study the anti-tumor activity of L-asparaginase II (ASP) of *Escherichia coli* Nissle1917. [Methods] L-Asparaginase II gene was amplified from the genome of *E. coli* Nissle1917 and inserted on the expression vector pET28a. The final expression vector pET28a-asp

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB227300); 国家自然科学基金项目(No. 31070006); 高校博士学科点专项科研基金项目(No. 20124306110006)

*通讯作者: Tel: 86-731-88872905; 信箱: xialq@hunnu.edu.cn

收稿日期: 2013-04-19; 接受日期: 2013-05-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for ASP expression. SDS-PAGE and LC-MS were used to determine the correct expression of ASP. After purification by nickel-affinity chromatography, the recombinant ASP was used to treat mouse 4T1 breast tumor cells, Hep-3B human hepatoma cells and Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). **[Results]** L-Asparaginase II gene from *E. coli* Nissle1917 was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) and identified by LC-MS. The purified L-asparaginase II inhibited the growth of 4T1 and Hep-3B tumor cells while not HUVEC. **[Conclusion]** The L-asparaginase II of *E. coli* Nissle1917 was active on 4T1 and Hep-3B tumor cells while not on normal tissue cells. Our results will be helpful for the further study on the active mechanism of ASP and its application in solid tumors therapy.

Keywords: L-Asparaginase II, *Escherichia coli*, Clone, Antineoplastic

L-天冬酰胺酶 II (L-Asparaginase II, EC 3.5.1.1) 是一种能专一性地催化 L-天冬酰胺水解成 L-天冬氨酸和氨的蛋白质, 同样也是一种重要的蛋白类抗肿瘤药物, 其在临床上被广泛用于淋巴瘤和儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的治疗^[1-2]。1953 年 Kidd^[3]观察到豚鼠血清具有破坏小鼠 Gardner 癌细胞的作用。1961 年 Broome^[4]对豚鼠血清进行分离提纯后发现, 具有抗肿瘤活性的组分同时表现出极强的 L-天冬酰胺酶的活力, 并推测豚鼠血清中起抗肿瘤作用的关键物质可能是 L-天冬酰胺酶。1964 年 Mashburn 等从大肠杆菌中分离出 L-天冬酰胺酶, 并且发现该酶具有与豚鼠血清中分离到的 L-天冬酰胺酶相似的抗癌作用。这为豚鼠血清中抗肿瘤活性物质是 L-天冬酰胺酶的推测提供了更有力的证据, 并为大量生产和临床应用创造了条件^[5]。1967 年 Campbell 等^[6]发现大肠杆菌 B 中 L-天冬酰胺酶有 EC-1 和 EC-2 两个组分, 仅后者有抗癌作用, 并将后者命名为 L-天冬酰胺酶 II。此后, L-天冬酰胺酶 II 成为抗肿瘤研究方面的一大热点。现有研究已证实了下述来源的 L-天冬酰胺酶 II 具有抗癌作用: 粘质赛氏杆菌、梨型嗜热菌^[7]、胡萝卜软腐欧氏杆菌^[8]、普通变形杆菌、软腐欧氏杆菌、柠檬杆菌等^[9]。

L-天冬酰胺酶 II 抗肿瘤的机制是 L-天冬酰胺酶 II 能“剥夺”肿瘤细胞所需的 L-天冬酰胺, 从而起到抑制肿瘤生长的作用。从近期的研究表明 L-

天冬酰胺在细胞代谢链中起重要作用, 该氨基酸的缺乏将致使细胞氨基酸、蛋白质和核酸代谢出现紊乱。而对于一些对 L-天冬酰胺酶 II 敏感的癌细胞如卵巢癌细胞在体外培养时, 需添加 L-天冬酰胺作为营养物, 而机体正常细胞却可以依靠自身合成 L-天冬酰胺^[10]。将 L-天冬酰胺酶 II 用于淋巴瘤和儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)的治疗中, 外源天冬酰胺酶的进入能使血液中天冬酰胺分解成天冬氨酸, 降低机体中天冬酰胺含量, 低含量的天冬酰胺无法满足肿瘤细胞生长所需, 从而达到抑制肿瘤生长的目的。同时, 机体正常细胞的生长不受影响。

虽然 L-天冬酰胺对体外培养的肿瘤细胞生长具有较好的抑制效果, 但在对实体瘤的治疗应用中, 效果并不理想。随着近年来对于实体瘤的深入研究, 人们重新在肿瘤临床治疗中开发 L-天冬酰胺酶相关的药物^[11]。本研究通过对具有肿瘤靶向性的大肠杆菌 Nissle1917^[12]中 L-天冬酰胺酶 II 基因的克隆与表达, 发现来源于大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶 II 能很好的抑制小鼠乳腺癌细胞 4T1 和人肝癌细胞 Hep-3B 的生长, 为构建以大肠杆菌 Nissle1917 为平台的抗肿瘤靶向工程菌奠定了重要基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pET28a 载体, 大肠杆菌 GB2005、大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 Nissle1917, 人肝癌细胞、

小鼠乳腺癌细胞, 由本实验室保存。Xho I, Nco I 等限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司。RPMI1640 培养基购自 Invitrogen; 胎牛血清(FBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 注射用青霉素钠、硫酸链霉素和胰蛋白酶购自上海生工, MTT 试剂盒购自 Invitrogen, 二甲基亚砜购自 Sigma 公司; 其余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 Nissle1917 中 L-天冬酰胺酶 II 基因的获得: 根据 L-天冬酰胺酶 II (L-Asparaginase II, EC 3.5.1.1) 的 DNA 片段序列设计引物, 其中上游引物(P1: 5'-CATGCCATGGAGTTTTTCAAAAAGACGGCAC-3') 引入 Nco I 酶切位点, 下游引物(P2: 5'-CCGCTCGAGGTACTGATTGAAGATCTGCTGG-3') 引入了 Xho I 酶切位点。用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取大肠杆菌 Nissle1917 的基因组 DNA, 以此基因组为模板扩增 L-天冬酰胺酶 II 基因。扩增程序为: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 诱导型表达载体 pET28a-asp 的构建及检测: 由 Nco I 和 Xho I 双酶切 L-天冬酰胺酶 II 基因扩增产物并纯化回收, 与双酶切后的 pET28a 载体连接, 以构建成为诱导型表达载体 pET28a-asp。连接产物热转入大肠杆菌 GB2005 内, 在含 Kan 50 mg/L 的 LB 固体平板上进行筛选, 提取转化子中质粒进行酶切鉴定, 将阳性重组质粒送上海英骏生物技术有限公司测序以进一步验证。

1.2.3 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3): 将大肠杆菌 BL21(DE3) 菌种保藏液接种于 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养过夜活化, 按 2% 接种量转接, 培养 2 h 至 OD_{600} 为 0.4–0.6, 冰浴 10 min, 用预冷的无菌双蒸水洗涤 2 次, 30 μ L 水重悬菌体,

加入 2 μ L 重组质粒, 混匀转入电转杯, 1 350 V 电击, 37 °C 复苏 1 h, 用含 Kan 50 mg/L 的 LB 平板进行筛选, 挑取转化子进行 PCR 鉴定, 质粒酶切鉴定。

1.2.4 大肠杆菌 BL21(pET28a-asp) 中 L-天冬酰胺酶 II 的诱导表达与检测: 重组工程菌株大肠杆菌 BL21(pET28a-asp) 接种 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 按 2% 接种量转接, 培养 2 h 至 OD_{600} 为 0.6, 加入 IPTG (终浓度为 0.4–0.5 mg/L), 30 °C、220 r/min 诱导培养 120 min。表达产物通过 SDS-PAGE 和 LC-MS 检测。

1.2.5 收集纯化 L-天冬酰胺酶 II 表达产物: 大肠杆菌 BL21(pET28a-asp) 经诱导培养 2 h 后, 收集菌体, 用无菌水清洗 2 次, 加入结合缓冲液混匀, 超声破碎, 13 000 r/min 离心 10 min 取上清, 经镍离子柱手动纯化蛋白, 用结合缓冲液平衡和洗脱杂蛋白, 用洗脱缓冲液洗脱目标蛋白, 收集到的目标蛋白洗脱液透析除盐, 经真空冷冻干燥机干燥, 并用 Bradford 法测定纯化的 L-天冬酰胺酶 II 的含量。

1.2.6 L-天冬酰胺酶 II 表达产物的抗肿瘤活性检测: 在 96 孔板中接种人肝癌 Hep-3B 细胞、小鼠乳腺癌 4T1 细胞和人脐静脉内皮细胞 HUVEC, 每孔 1×10^3 cells/90 μ L, 置于 5% CO_2 培养箱中, 37 °C 培养, 待细胞贴壁后分别加入 L-天冬酰胺酶 II 使细胞培养基中 L-天冬酰胺酶 II 浓度分别达到 100、200、300、400 mg/L, 向其中加入等量的无菌双纯水和不做任何处理作为对照组。继续培养 48 h, 通过观察肿瘤细胞形态推测 L-天冬酰胺酶 II 对肿瘤细胞的抑制作用, 采用 MTT 法检测该蛋白对各种肿瘤细胞的生长抑制率。

2 结果与分析

2.1 获取大肠杆菌 Nissle1917 中 L-天冬酰胺酶 II 基因

以大肠杆菌 Nissle1917 基因组为模板, 以 P1、P2 为引物进行 PCR, 扩增产物大小为 1 000–1 100 bp, 与预期 DNA 片段 1 044 bp 大小一致(图 1)。

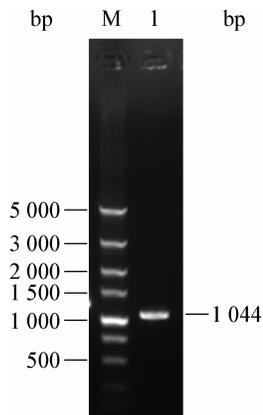


图1 L-天冬酰胺酶II基因的扩增

Figure 1 Amplification of the L-asparaginase II gene

注: M: 分子量标准(DL5000); 1: L-天冬酰胺酶II基因的PCR扩增产物。

Note: M: Molecular weight marker; 1: Homo-L-asparaginase II.

2.2 构建诱导表达载体 pET28a-asp 及其鉴定

在含有 Kan 50 mg/L 的 LB 固体平板上挑选 7 个转化子对其质粒进行提取, 以 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 凝胶电泳显示在 1 000–1 100 bp 大小处有条带(图 2), 测序结果表明, 该 DNA 片段大小为 1 044 bp, 在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 测得序列与 L-天冬酰胺酶 II (GenBank: AP012306.1) 的一致性为 97%, 对应氨基酸序列的一致性为 99%。表明来源于大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶 II 已成功克隆至表达载体 pET28a。

2.3 L-天冬酰胺酶 II 的表达与检测

重组工程菌大肠杆菌 BL21(pET28a-asp)经超声破碎后, 收集菌体沉淀和上清, 经 SDS-PAGE 检测, 均在 35 kD 处有明显条带, 而对照组没有检测到该大小条带, 与预测结果相符合(图 3)。通过 LTQ XL 液质联用质谱仪鉴定, 采用 Sequest 搜索引擎搜库, 搜索数据库为从 NCBI 下载的 *E. coli* 所有种类的蛋白。结果显示该蛋白为 L-天冬酰胺酶 II, 来源于大肠杆菌 K-12, 见表 1。

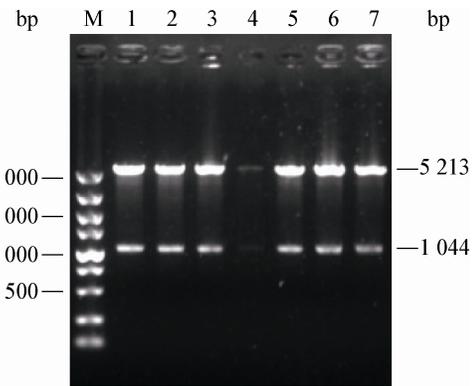


图2 pET28a-asp 的酶切鉴定

Figure 2 Identification of plasmid pET28a-asp by digestion

注: M: DNA 分子量标准(DL5000); 1–7: 1–7 号转化子 pET28a-asp 质粒 *Nco* I + *Xho* I 双酶切产物。

Note: M: Molecular weight marker; 1–7: pET28a-asp of number 1–7 transformants digested with *Nco* I + *Xho* I.

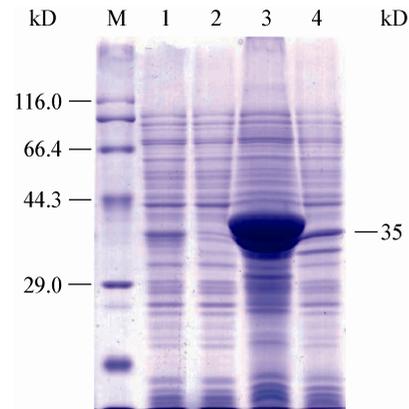


图3 SDS-PAGE 检测 L-天冬酰胺酶 II 的诱导表达

Figure 3 SDS-PAGE analyzing the expression of L-asparaginase II after induction

注: M: 蛋白分子量标准; 1: 含有质粒 pET28a-asp 的 BL21(DE3) 菌体沉淀蛋白; 2: 含有质粒 pET28a 的 BL21(DE3) 菌体沉淀蛋白; 3: 含有质粒 pET28a-asp 的 BL21(DE3) 菌体溶解蛋白; 4: 含有质粒 pET28a 的 BL21(DE3) 菌体溶解蛋白。

Note: M: Protein molecular weight marker; 1: The sedimentary proteins of *E. coli* BL21(pET28a-asp) induced by IPTG; 2: The sedimentary proteins of *E. coli* BL21(pET28a) induced by IPTG; 3: The supernatant proteins of *E. coli* BL21(pET28a-asp) induced by IPTG; 4: The supernatant protein of *E. coli* BL21(pET28a) induced by IPTG.

表1 重组工程菌 *E. coli* BL21(pET28a-asp) 表达产物质谱鉴定结果

Table 1 The MS result of expression products from the recombinant strain *E. coli* BL21(pET28a-asp)

Accession No.	Protein name	Molecular weight (kD)	Score	Identified peptides	Coverage (%)
gi443459	L-Asparaginase	34.6	630.25	97	29.6

2.4 L-天冬酰胺酶 II 的纯化与定量

用镍离子柱和透析纯化后的 L-天冬酰胺酶 II 经 SDS-PAGE 检测(图 4), 从图 4 中可以看出, 蛋白纯度较高, 产物表达量通过 Bradford 法测定, 重组工程菌诱导培养 2 h 后, L-天冬酰胺酶 II 的表达量达到 20 mg/L。

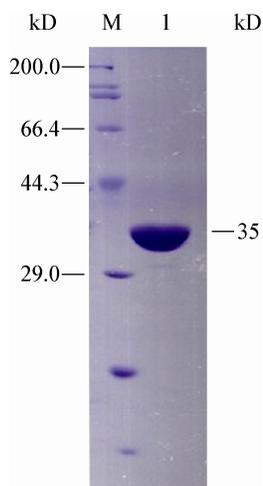


图 4 SDS-PAGE 检测 L-天冬酰胺酶 II 的诱导表达纯度
Figure 4 Detection the purity of L-asparaginase II by SDS-PAGE

注: M: 蛋白分子量标准; I: 镍离子柱洗脱的样品.

Note: M: Protein molecular weight marker; I: The sample washed from Ni pillar.

2.5 L-天冬酰胺酶 II 的抗肿瘤活性

用终浓度为 100、200、300、400 mg/L 的 L-天冬酰胺酶 II 作用 Hep-3B 细胞、4T1 细胞和 HUVEC 48 h 后, 与对照组比较, Hep-3B 细胞和 4T1 细胞生长受到不同程度的抑制, 呈现浓度依赖性, 而 HUVEC 的生长无明显抑制(图 5)。用 400 mg/L 的 L-天冬酰胺酶 II 处理 Hep-3B 细胞和 4T1 细胞 48 h 后, 对细胞的抑制率分别达到了 61.25%和 58.70%。在倒置显微镜下对 4T1 细胞(图 6)和 Hep-3B 细胞(图 7)形态进行观察, 可以明显观察到随着 L-天冬酰胺酶 II 蛋白浓度的增加, 肿瘤细胞开始变小聚集在一起, 周围出现细胞碎片, 存活的活细胞越来越少。

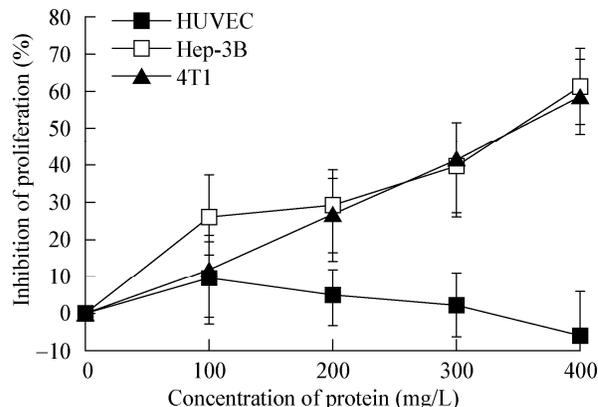


图 5 不同浓度 L-天冬酰胺酶 II 作用 48 h 对 HUVEC 细胞、Hep-3B 细胞和 4T1 细胞生长的影响

Figure 5 Effect on the growth of HUVEC cells, Hep-3B cells and 4T1 cells when treated with different concentration of L-asparaginase II for 48 h

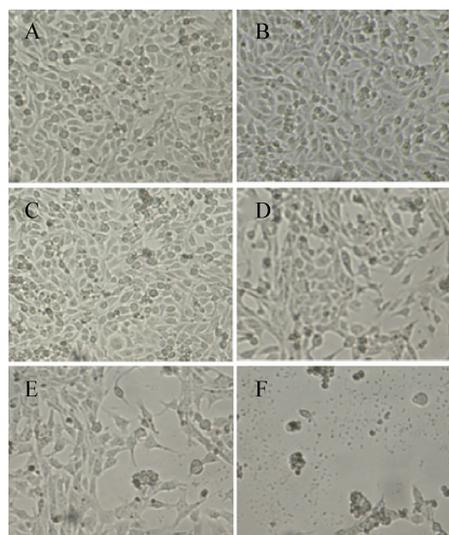


图 6 L-天冬酰胺酶 II 对 4T1 细胞形态的影响(100×)

Figure 6 Morphological changes of 4T1 cells after been treated by L-asparaginase (100×)

注: A: 未经任何处理的 4T1 细胞; B: 经无菌水处理 48 h 的 4T1 细胞; C: 经 100 mg/L L-天冬酰胺酶 II 处理 48 h 的 4T1 细胞; D: 经 200 mg/L L-天冬酰胺酶 II 处理 48 h 的 4T1 细胞; E: 经 300 mg/L L-天冬酰胺酶 II 处理 48 h 的 4T1 细胞; F: 经 400 mg/L L-天冬酰胺酶 II 处理 48 h 的 4T1 细胞。

Note: A: Untreated; B: Treated by H₂O for 48 h; C: Treated by L-asparaginase II with 100 mg/L for 48 h; D: Treated by L-asparaginase II with 200 mg/L for 48 h; E: Treated by L-asparaginase II with 300 mg/L for 48 h; F: Treated by L-asparaginase II with 400 mg/L for 48 h.

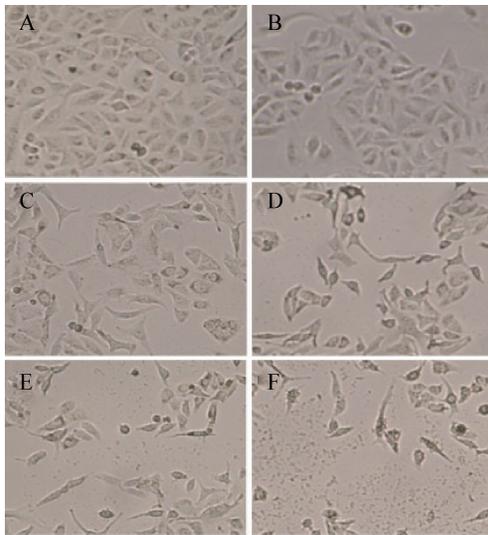


图7 L-天冬酰胺酶Ⅱ对 Hep-3B 细胞形态的影响(100×)
Figure 7 Morphological changes of Hep-3B cells after been treated by L-asparaginase (100×)

注: A: 未经任何处理的 Hep-3B 细胞; B: 经无菌水处理 48 h 的 Hep-3B 细胞; C: 经 100 mg/L L-天冬酰胺酶Ⅱ处理 48 h 的 Hep-3B 细胞; D: 经 200 mg/L L-天冬酰胺酶Ⅱ处理 48 h 的 Hep-3B 细胞; E: 经 300 mg/L L-天冬酰胺酶Ⅱ处理 48 h 的 Hep-3B 细胞; F: 经 400 mg/L L-天冬酰胺酶Ⅱ处理 48 h 的 Hep-3B 细胞。

Note: A: Untreated; B: Treated by H₂O for 48 h; C: Treated by L-asparaginase II with 100 mg/L for 48 h; D: Treated by L-asparaginase II with 200 mg/L for 48 h; E: Treated by L-asparaginase II with 300 mg/L for 48 h; F: Treated by L-asparaginase II with 400 mg/L for 48 h.

3 讨论

已有研究结果表明, L-天冬酰胺酶Ⅱ能特异性作用于卵巢癌细胞并使其细胞表面的唾液酸化路易斯 X 抗原的表达量降低, 从而影响卵巢癌细胞自身的侵袭与黏附作用, 另外, L-天冬酰胺酶Ⅱ还能诱导肿瘤细胞内 AMPK、Atg12、Beclin-1 等因子的产生, 从而使肿瘤细胞脱落凋亡^[11]。大多数肿瘤细胞本身不能合成天冬酰胺或是合成量很少, 需依赖宿主供给, 外源性天冬酰胺酶能使肿瘤微环境中天冬酰胺分解成天冬氨酸, 使肿瘤细胞缺乏天冬酰胺, 不能合成蛋白质, 从而达到抗肿瘤目的^[13]。

本研究从大肠杆菌 Nissle1917 中首次获得

L-天冬酰胺酶Ⅱ基因, 构建了 pET28a-*asp* 表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 中得到高效表达, 并用 LTQ XL 液质联用质谱仪鉴定。用纯化后的 L-天冬酰胺酶Ⅱ作用于人类肝癌细胞 Hep-3B、小鼠乳腺癌细胞 4T1 和人类脐静脉内皮细胞 HUVEC, 结果表明来自大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶Ⅱ能够明显抑制人肝癌细胞 Hep-3B 和小鼠乳腺癌细胞 4T1 的生长, 并呈现浓度的依赖性, 但对人脐静脉内皮细胞 HUVEC 无抑制效果。

本实验结果显示从具有对肿瘤高靶向性和非致病性的大肠杆菌 Nissle1917^[14] 中获得的 L-天冬酰胺酶Ⅱ基因能很好地在大肠杆菌 BL21 中表达, 并具有较好的抑制肿瘤细胞生长的效果, 这为进一步将大肠杆菌 Nissle1917 构建成为抗肿瘤靶向工程菌提供了理论基础。作为一个可以在多数物种中发现的蛋白, 通过现代基因工程技术的改造, L-天冬酰胺酶Ⅱ基因也能在多数抗肿瘤工程菌中顺利表达。这为后续构建 L-天冬酰胺酶Ⅱ工程菌应用于小鼠乳腺癌细胞 4T1 实体瘤的治疗研究奠定了重要基础。

肝癌往往因隐蔽性高、恶化程度高而不能被及时有效的治疗, 本研究发现来自于大肠杆菌 Nissle1917 的 L-天冬酰胺酶Ⅱ能高效地抑制肝癌细胞 Hep-3B 的生长, 而对正常的人类脐静脉内皮细胞 HUVEC 无任何抑制和副作用, 这为抗肝癌药物的发现和研究提供了一个新的技术途径。

参考文献

- [1] 费建明, 吴岩, 占鹏飞, 等. 利用家蚕杆状病毒 Bac-to-Bac 系统表达大肠杆菌 L-天冬酰胺酶Ⅱ[J]. 蚕桑通报, 2011(2): 42-43.
- [2] 李晓媛, 陈建华, 吴梧桐. PEG-L-天冬酰胺酶的临床研究近况[J]. 药学进展, 2009, 33(11): 503-510.
- [3] Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced *in vivo* by means of normal guinea pig serum[J]. Journal of Experimental Medicine, 1953, 98: 565-582.
- [4] Broom JD. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects[J]. Nature, 191, 19: 1114-1115.
- [5] 刘红, 潘红春. 抗癌药物 L-天冬酰胺酶及其研究进展[J]. 四川轻化工学院学报, 2000, 13(2): 31-36.
- [6] Campbell HA, Mashburn LT. Two L-asparaginases from

