

气味沙雷氏菌核糖体 P 组分的分离纯化及抗肿瘤作用

王 旭 梁 炜 张 玮 王洪海 陈永青

(复旦大学微生物学及微生物工程系 上海 200433)

关键词 气味沙雷氏菌, 核糖体, 分离和纯化, 抗肿瘤

分类号 Q939.9, R392.7 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)03-0275-78

本实验室曾对气味沙雷氏菌(*Serratia odorifera*)抗肿瘤活性及作用机理进行了深入的研究,发现该菌苗具有抑制体内肿瘤细胞增殖的作用^[1],并且对小鼠 SI80 肿瘤细胞的 DNA 合成有明显的直接抑制作用^[2]。研究同时表明它是一种很有效的免疫增强剂,能促进巨噬细胞的吞噬功能且有一定的持续性^[3,4],并且具有激活淋巴细胞释放淋巴因子和诱导干扰素的产生^[5,6]。为了找出该菌苗中的抗肿瘤有效成分,我们对该菌的核糖体进行了研究,发现核糖体制剂对带瘤小鼠有较强的保护作用,能激活腹腔巨噬细胞和 NK 细胞活性,并能诱生具有抑瘤作用的可溶性因子^[7]。我们曾经对该菌的全菌体蛋白进行分离,并在体外检测其对癌细胞的细胞毒活性,发现分子量为 15kD~17.5kD 的蛋白质组分具有体外直接抑制癌细胞生长的作用^[8]。本工作利用 Western-blot 方法找出核糖体中具有强免疫原性的成分(P 组分),将其分离纯化,用荷瘤裸小鼠检测其抑瘤作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 气味沙雷氏菌的培养及其核糖体制剂的制备^[7,9]。

1.1.2 制备电泳槽及辅助设备:由 Bio. RAD 公司出品,型号 Model 491。

1.1.3 一抗:为新西兰兔抗核糖体的多克隆抗血清(由本实验室制备)。

1.1.4 二抗:为 HRP 交联的羊抗兔抗体(购自上海东风生物化学试剂厂)。

1.1.5 低分子量标准蛋白:由上海生物化学研究所东风生物化学试剂厂出品。

1.1.6 QGY:人启东肝癌细胞。

1.1.7 QGY-9204:为复旦大学细胞分子生物学实验室建立的裸小鼠人肝癌细胞实验模型,本实验所用模型为 14 代。

1.1.8 实验用鼠:实验共用裸小鼠 12 只(BALB/C 种系)雌雄各半,鼠龄为 4~6 周,分成三组每组 4 只。

1.2 方法

1.2.1 SDS-PAGE 制备电泳分离核糖体 P 组分:分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%。加入预处理的核糖体进行电泳,同时开始洗脱,以分部收集器收集洗脱液,每 10min 收集一管。洗脱速度为 0.2mL/min。用蛋白核酸检测仪 A₂₈₀ 监测,并同步记录。得到制备电泳蛋白洗脱峰,收集曲线中的峰值部分。

1.2.2 洗脱液的浓缩,去 SDS^[10]:在洗脱液中加入 4 倍体积 -20℃ 丙酮混匀后置 -20℃ 冰箱 8h,4℃,9000r/min 离心 25min,弃上清。沉淀用 -20℃ 的 75% 丙酮洗涤,离心两次使更彻底地除去 SDS。

1.2.3 蛋白浓度的测定^[11]。

1.2.4 蛋白纯度的测定^[12]。

1.2.5 核糖体及核糖体 P 组分的蛋白质免疫印迹分析(Western-Blot Analysis)^[13]。

1.2.6 QGY-9204 的接种:取荷瘤 21d 左右(本模型传代周期为 20~25d)的裸小鼠断颈处死,在无茵条

件下取出瘤块,用 PBS 缓冲液冲洗,剪碎后加少许 PBS,用 2mL 注射器、16 号针头将 QGY 注射到正常裸小鼠右侧肩部皮下。实验组 1 每只注射糜状的 QGY 瘤 0.2mL 和 0.1mL 核糖体 P 组分(0.1mg),实验组 2 和对照组每只注射糜状 QGY 瘤 0.2mL 和 0.1mL 生理盐水,在室温 25~27℃,无菌条件下饲养。实验组 2 于接种瘤后第 5 天在瘤周围注射核糖体 P 组分 0.1mL(0.1mg),以后每 5d 注射 1 次,共注射 3 次,对照组用生理盐水注射。

1.2.7 实体瘤的测量:从接种 QGY-9204 后第 5 天开始,分别测量记录每只裸小鼠的瘤体积(长×宽×高),每隔 3d 测量 1 次。实验结束时处死裸小鼠,分别取出完整瘤块称重。

2 结 果

2.1 制备电泳分离核糖体蛋白 P 组分

粗核糖体经制备电泳分离,洗脱液的 A₂₈₀ 值变化(图 1),将管号 29、30、31、32、33(峰 II)和管号 63、64、65、67(峰 III)分别经丙酮浓缩后进行 SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 分析结果显示峰 II 为 16kD 蛋白,将峰 II 合并即为 P 组分。峰 III 为分子量是 43kD 的一类蛋白。而峰 I 则没有蛋白条带,可能是核糖体内的核酸成分。

2.2 核糖体的免疫印迹反应

核糖体经免疫印迹反应显示,从核糖体中分离的 16kD 蛋白(P 组分)与核糖体产生相同免疫沉淀条带,具有相同特征,表明 16kD 蛋白(P 组分)为核糖体特异性免疫组分(图 2)。

2.3 P 组分对裸小鼠的保护作用

裸小鼠接种 QGY-9204 后,比较不同时间点实验组及对照组实体瘤的体积和最终瘤的重量,其结果以表 1 和图 3 表示如下:

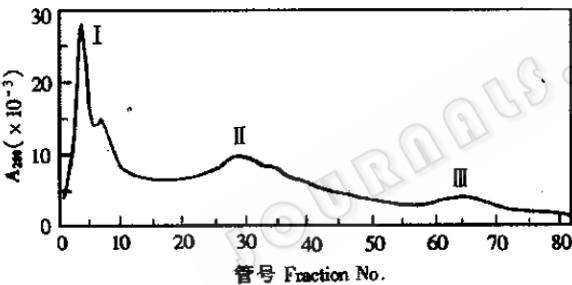


图 1 气味沙雷氏菌核糖体制备电泳分离洗脱图

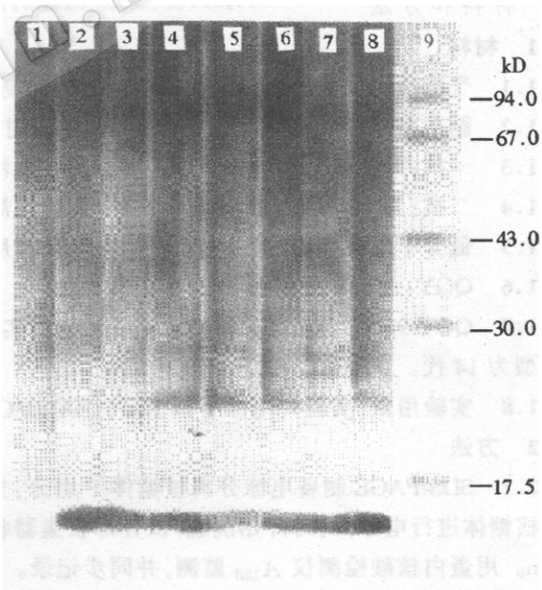


图 2 核糖体及 16kD 蛋白与核糖体多抗免疫印迹反应
1.空白;2~3.16kD 蛋白(P 组分);
4~8.核糖体蛋白;9.蛋白分子量 Marker.

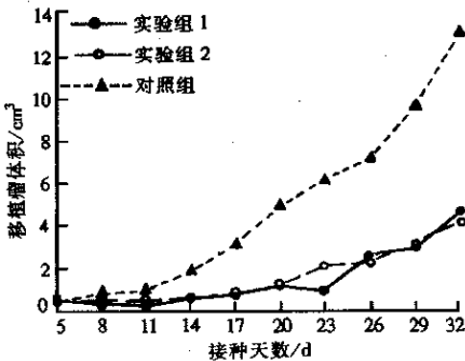


图 3 核糖体 P 组分对 QGY-9204 移植瘤生长抑制曲线

表 1 核糖体 P 组分对 QGY-9204 移植瘤生长的抑制作用

接种后测量瘤体积 的时间/d	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	瘤重(g)
实验组 1 瘤体积/(cm ³)	0.55	0.38	0.31	0.59	0.79	1.28	1.08	2.61	2.97	4.65	4.3
SD/(n=4)	0.072	0.089	0.15	0.33	0.39	0.55	0.66	1.20	1.35	1.95	1.92
P 值	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组 2 瘤体积/(cm ³)	0.55	0.55	0.49	0.67	0.84	1.22	2.14	2.32	3.11	4.26	3.25
SD/(n=4)	0.061	0.095	0.078	0.30	0.28	0.50	0.78	0.81	1.21	1.65	1.12
P 值	>0.05	<0.01	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001	<0.01
对照组瘤体积/(cm ³)	0.50	0.79	0.99	1.91	3.17	4.95	6.19	7.16	9.56	13.00	7.93
SD/(n=4)	0.030	0.099	0.15	0.26	0.29	0.49	0.92	0.81	1.63	1.21	1.501

从上述结果可以看出,从第八天开始,实验组移植瘤的生长受到抑制。作 *t* 检验统计学处理,发现第八天实验组 1、实验组 2 与对照组之间开始出现显著性差异($P<0.01$),第 14 天出现极显著差异($P<0.001$)。同样,最终实验组和对对照组瘤重量的比较也具有极显著的差异($P<0.001$)。同时,当以不同的免疫方式试验核糖体 P 组分对荷瘤裸小鼠的保护作用时,各试验组瘤的生长情况也有较大的差异,从表 1 和图 3 看出实验组 1 的瘤生长情况与实验组 2 相似,但是实验组 2 的免疫剂量是实验组 1 的 3 倍。由此可见,核糖体 P 组分对人肝癌细胞移植瘤(QGY-9204)有明显的抑制作用,且实验组 1 的免疫方式的抑瘤效应更为明显。

3 讨 论

用制备电泳制备核糖体 16kD 蛋白(P 组分)经 Western-blot 印迹反应,P 组分仍然保持其免疫原性能与核糖体的多抗特异性杂交。这说明蛋白质经过 SDS 变性,经 SDS-PAGE 回收后仍能保持其生物学活性和免疫原性。

通过裸鼠实验发现,P 组分以不同方式注射裸鼠,其抑瘤效果有差异。实验组 1 是 P 组分与 QGY 瘤混合后接种于小鼠皮下,而实验组 2 是接种 QGY 瘤 5d 后在肿瘤周围注射 P 组分,并且注射剂量是实验组 1 的 3 倍。结果虽然显示两组的抑瘤效果相似,但是从使用的剂量而言,实验组 1 的抑瘤效果要好于实验组 2。这说明 P 组分对肿瘤的抑制机理更多的是在于它的直接杀伤作用。由于实验组 1 能使 P 组分与肿瘤细胞充分接触,而实验组 2 只使 P 组分与肿瘤分围细胞接触,所以实验组 1 抑瘤效果较好。裸小鼠没有胸腺,是一类免疫缺陷型小鼠,P 组分对荷瘤裸小鼠有明显的保护作用,并且实验组 1 的肿瘤在接种瘤后第 5 至 11 天之间反而在缩小,至第 14 天肿瘤体积恢复到第 5 天的水平,其间隔时间正好与药物在机体内滞留时间相符,这进一步说明了 P 组分对 QGY 肿瘤细胞有直接的杀伤作用。同时在体外的细胞实验也观察到核糖体和 P 组分对 QGY 细胞都有杀伤作用。这可能是 P 组分中有特定的氨基酸序列或特异性的空间结构能影响癌细胞的生长转移或与癌细胞表面受体结合诱导其凋亡(Apoptosis)。^[14-16]

本实验室在对核糖体抑瘤作用的研究时发现它在体外能抑制多种癌细胞的生长,用游离的核糖体制剂免疫小鼠时,对荷瘤小鼠的保护率低。在制剂中加入了等体积不完全福氏佐剂后,保护率才明显提高。可见核糖体对荷瘤小鼠的保护作用,更多的依赖于其非特异性免疫增强作用。而 P 组分只用很少的量(0.1mg),且不须佐剂就能对荷瘤小鼠产生强大的保护作用。这是由于其一方面具备直接杀伤作用,同时 P 组分作为一种具有强免疫原性的蛋白又能增强机体的免疫功能,间接的达到抑制肿瘤生长的效果。

参 考 文 献

[1] 黄惟让,刘启鼎,杜樊琴等.上海免疫学杂志,1983,3(1):41~43.

- [2] 褚忠强, 叶美娣, 宋大新等. 上海免疫学杂志, 1985, 5(2): 65~68.
- [3] 俞吉安, 李君瓔. 动物学研究, 1985, 6(3): 265~270.
- [4] 俞吉安, 李君瓔. 动物学研究, 1986, 7(1): 15~19.
- [5] 梅民权, 李君瓔, 杜平等. 上海免疫学杂志, 1985, 5(4): 198~201.
- [6] 梅民权, 李君瓔, 杜平等. 上海免疫学杂志, 1985, 5(4): 202~205.
- [7] 孙浩清, 郑善良, 李君瓔. 复旦学报(自然科学版), 1985, 24(2): 133~139.
- [8] 王旭, 彭武林, 刘启鼎等. 复旦学报(自然科学版), 1997, 36(5): 1~6.
- [9] 郭明, 刘启鼎, 李君瓔. 上海免疫学杂志, 1986, 6(4): 197~200.
- [10] Hager D A, Burgess R R. *Analytical Biochemistry*, 1980, 109(1): 76~86.
- [11] Bradford M. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248~254.
- [12] Leammli U K. *Nature*, 1970, 227(15): 680~685.
- [13] Burnette W N. *Analytical Biochemistry*, 1981, 112(1): 195.
- [14] Himsley F H, Hill R, Rosen B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(15): 6996~7000.
- [15] Mangeney M, Lingwood C A, Caillou B *et al.* *Cancer Res*, 1993, 53(21): 5314~5319.
- [16] Humphries M J, Olden K, Yamada K M. *Science*, 1986, 233(4762): 467~470.

FRACTION P ISOLATED FROM THE RIBOSOMES OF *SERRATIA ODORIFERA* AND ITS TUMOR INHIBITING EFFECT

Wang Xu Liang Wei Zhang Wei Wang Honghai Chen Yongqing

(Department of Microbiology and Microbial Technique, Fu Dan University, Shanghai 200433)

Abstract A protein (component P) with molecular weight of 16kD was isolated by the method of preparation electrophoresis from the ribosomes of *Serratia odorifera*, which were obtained by the method of differential centrifugation. This protein showed specific immune response reactivity with the antiserum of the ribosomes mentioned above. Meanwhile, component P showed apparent protective function for QGY-tumorcharged nude mouse and different ways of giving medicine. It was evident from study results that component P isolated from the ribosomes of *Serratia odorifera* showed a direct function for tumor growth inhibition and it was the effective component of the ribosomes of *Serratia odorifera*.

Key words *Serratia odorifera*, Ribosome, Isolation and purification, Antitumor