

# 抗癌新药-Onconase与双氢青蒿素联合治疗非小细胞肺癌及恶性间皮细胞瘤

费俭\*, 沈如凌, 李俊, 王雪松, 王一成, 田雪, 翟昌宝, 胡晓珺, 王庆诚\*

上海南方模式生物研究中心, 上海浦东张江金科路3577号  
\*联系人: 费俭: feijian124@gmail.com; 王庆成: weiqunus@yahoo.com

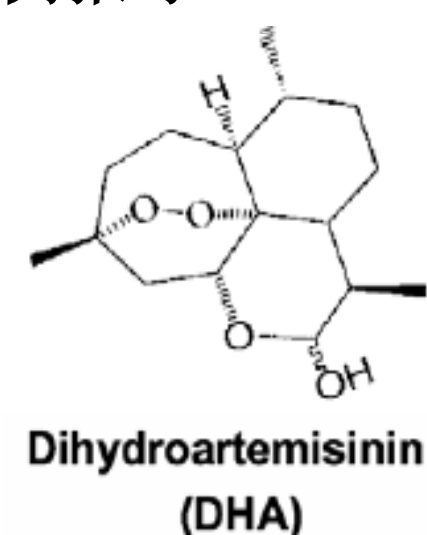
## 引言

Onconase (Onc) 是从豹蛙卵内提取的一种核酸酶, 由104个氨基酸组成。它对多种肿瘤细胞有选择性杀伤, 但对正常细胞影响不大。它不损伤骨髓, 也不易引起耐药性。它的主要副作用为肾毒性, 但停药后可以逆转。Onconase的免疫原性非常低, 可以多次用药。Onc是世界上第一个用于临床的核糖核酸酶, 已被美国, 欧盟和澳大利亚批准作为孤儿药物用于恶性间皮细胞瘤的治疗。目前, Onc正在美国进行治疗非小细胞肺癌的第二期临床试验。

青蒿素和它的衍生物是新一代抗疟疾药物。近年来, 发现青蒿素类药物也具抑制肿瘤生长, 血管生成及肿瘤转移等活性。迄今已有上百万恶性疟疾患者接受过青蒿素类药物治疗, 但由这类药物引起的不良反应甚少报道。青蒿素类药物用于肿瘤治疗, 已有多个实验室报导了令人鼓舞的体外和体内实验结果, 并有一些治疗效果相当好的临床个案报导。



美洲北方豹蛙



## 实验概述

我们已自行克隆了Onc基因, 并在大肠杆菌内实现了高表达。每立升罐上发酵液可得一百多毫克Onc纯品。Onc的结构与细胞毒性均与文献值相符。在皮下植入人恶性间皮细胞瘤或人非小细胞肺癌的裸鼠模型中, Onc成功地抑制了肿瘤的生长。

我们同时研究了Onc与双氢青蒿素 (DHA) 或阿霉素联合治疗上述两种肿瘤的效果。DHA是青蒿素类药物中抗肿瘤活性较强的一种。阿霉素 (ADR) 是经典的抗癌药。体外等效曲线分析发现, Onc与DHA或ADR合用, 对肿瘤生长的抑制均有协同效应。荷瘤裸鼠实验证实, 联合疗法同样呈现协同效应, 可以完全抑制肿瘤的生长。

经Onc/DHA治疗的肿瘤组织内的血管明显少于对照组或两药分别治疗的。实验结果强力暗示, 对肿瘤血管生成的抑制, 可能在Onc/DHA抑制肿瘤生长的活性中起着重要作用。

## 结果一

### • Onc制备

合成Onconase基因在BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞中表达。经IPTG诱导表达、包涵体变复性和离子交换柱纯化后, 每立升罐上发酵液可产一百多毫克95%以上纯度的Onconase。

在临床上, 每位病人每次平均注射0.8毫克Onconase, 每周注射一次。我们现有工艺已达实用水平。

### • Onc单独治疗人恶性间皮细胞瘤的体内实验

将人恶性间皮细胞瘤皮下接种于裸小鼠, 七天后 (其时平均肿瘤体积不到200 mm<sup>3</sup>) 开始静脉内注射Onc (2.5 mg/kg, or 75 mg/小鼠) 或生理盐水, 每周两次。连续注射6次, 肿瘤生长可被完全抑制, 而对对照组的平均肿瘤体积在第38天已超过1500 mm<sup>3</sup>。

实验证明, 对抑制人恶性间皮细胞瘤生长onconase是非常有效的药物。

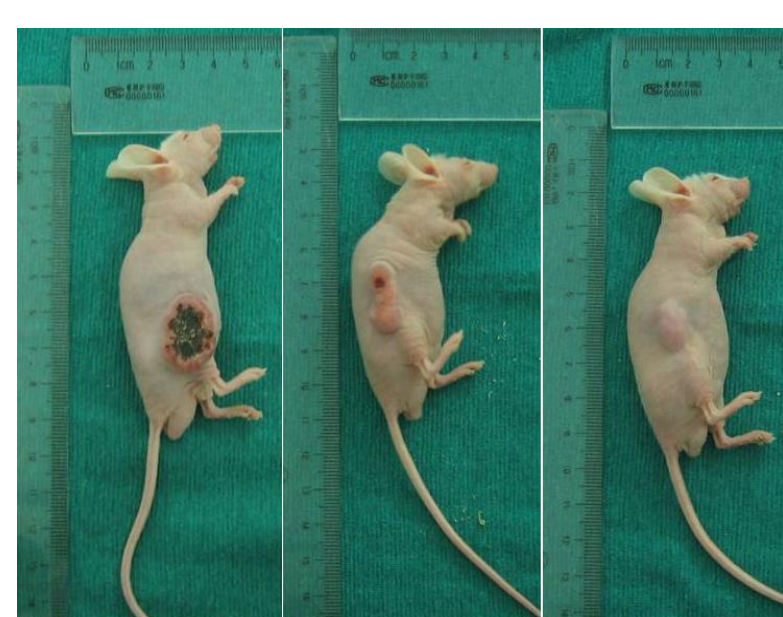


图1. 荷人恶性间皮细胞瘤的裸鼠经3次Onc注射、6次Onc注射和生理盐水分别治疗后, 肿瘤生长情况比较。

## 结果二

### • Onc与其它抗癌药物联合使用的研究

我们研究了Onc与化疗药阿霉素以及青蒿素对肿瘤治疗的协同作用。发现两种药与Onc对恶性间皮细胞瘤及非小细胞肺癌均有协同作用。

Onc与青蒿素对肿瘤生长抑制的协同作用是我们的重要发现, 已申请中国专利和世界专利。

### • 体外等效曲线分析

我们先分别测定Onc与DHA对某种细胞的IC<sub>50</sub>, 然后将两药按不同比例混合, 再测定各组混合物的IC<sub>50</sub>。然后用等效曲线法分析它们对肿瘤细胞生长的抑制效果。如图2所示, 如果点分布在红线附近, 为加成; 如果点分布在红线左侧, 为协同; 如果点分布在右侧, 则为拮抗。图2结果显示, 对测试的所有四个NSCLC细胞株生长的抑制, Onc与DHA合用均表现协同作用。

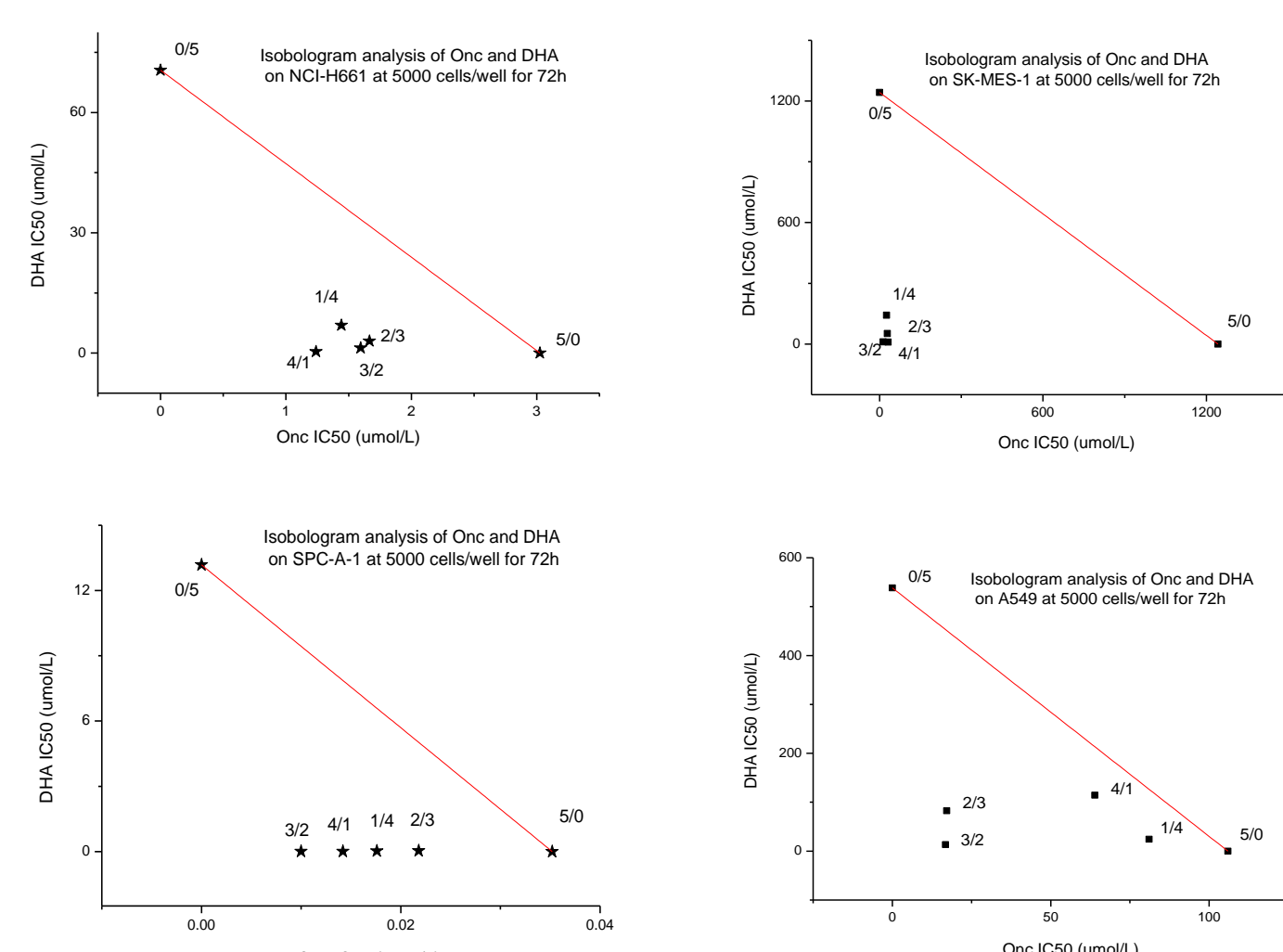


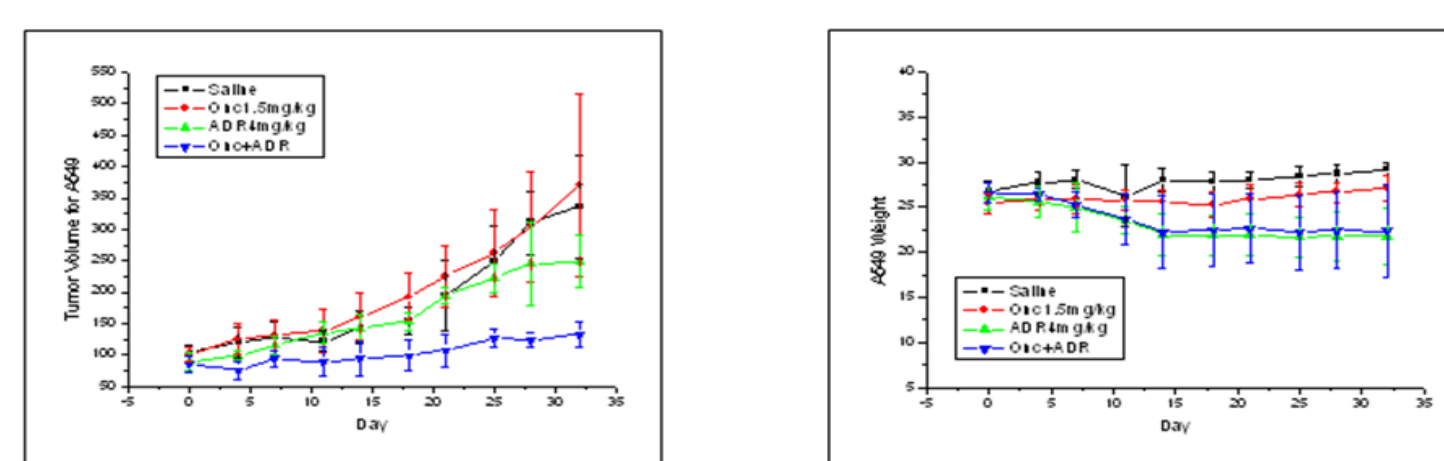
图2. Onc与DHA联合用药对不同NSCLC细胞株生长抑制效果的等效曲线分析

## 结果三

表1. Onc对其它人非小细胞肺癌细胞株的细胞毒性

名称	癌类型	IC50 (mM)
A549	上皮细胞	110.0
NCI-H661	大细胞	3.0
SPC-A-1	腺癌	0.032
SK-MES-1	鳞癌	1300

a. Human non-small cell lung cancer treated with the combination of Onc and adriamycin



b. Human non-small cell lung cancer treated with the combination of Onc and DHA

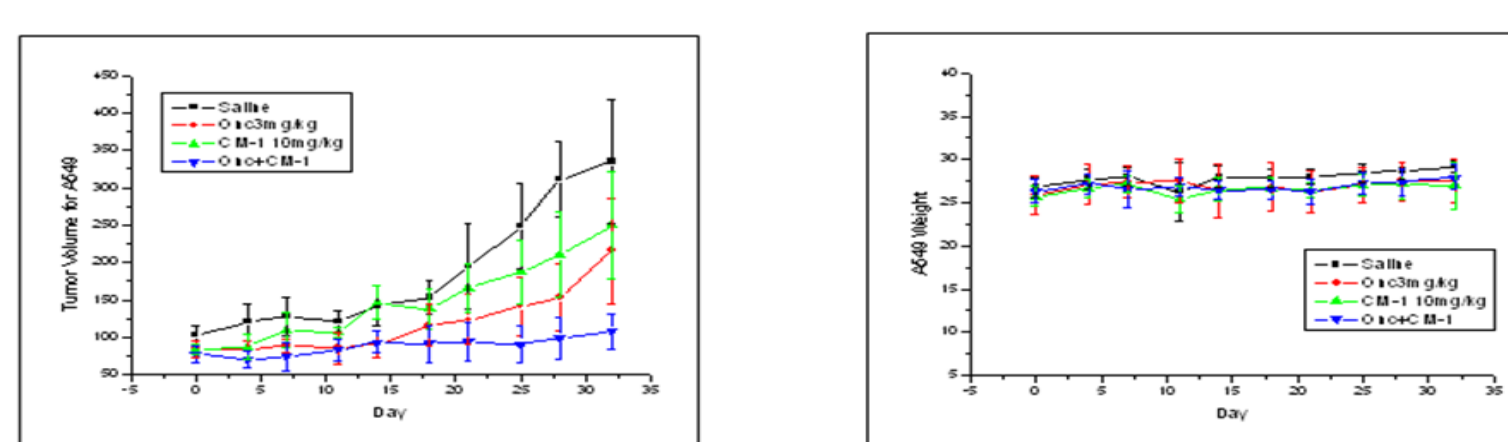


图3. Onc/ADR和Onc/DHA体内治疗NSCLC A549细胞的效果比较。

## 致谢

作者衷心感谢中科院上海生物化学和细胞生物学研究所的崔大数教授对本研究工作长期无私的支持。我们也十分感谢蒋芝华老师对组化工作的指导和帮助。

## 结果四

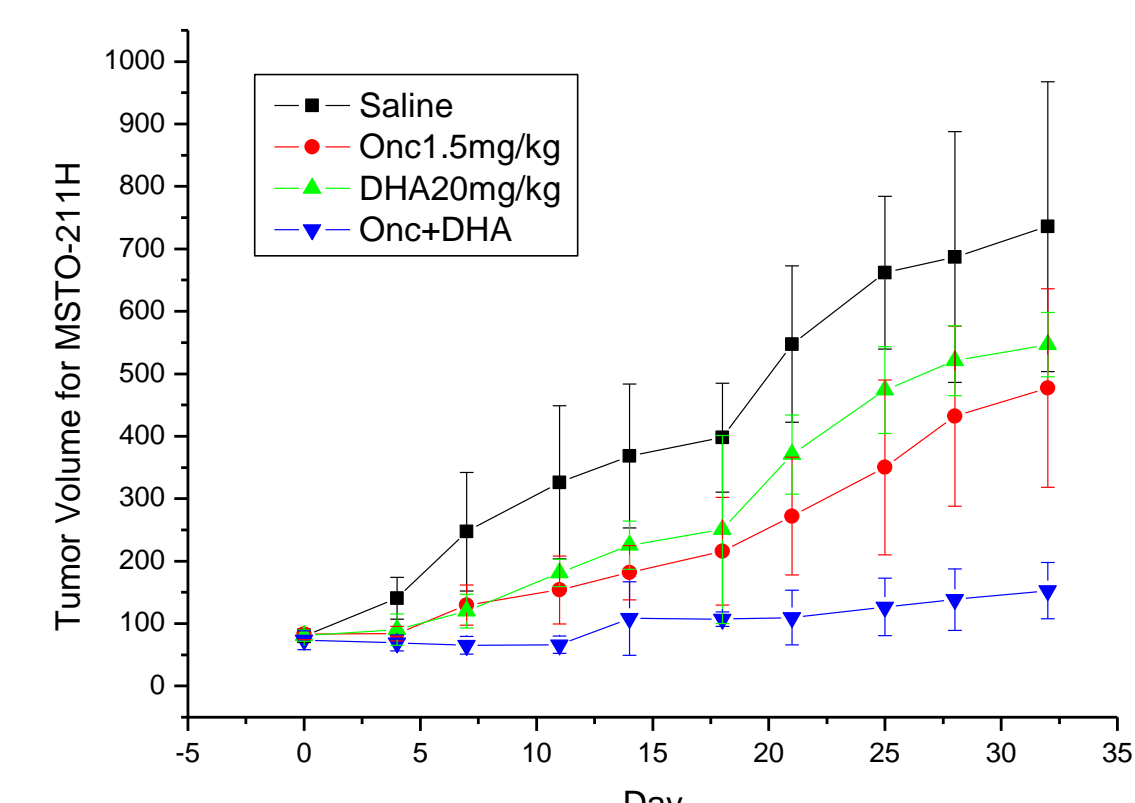
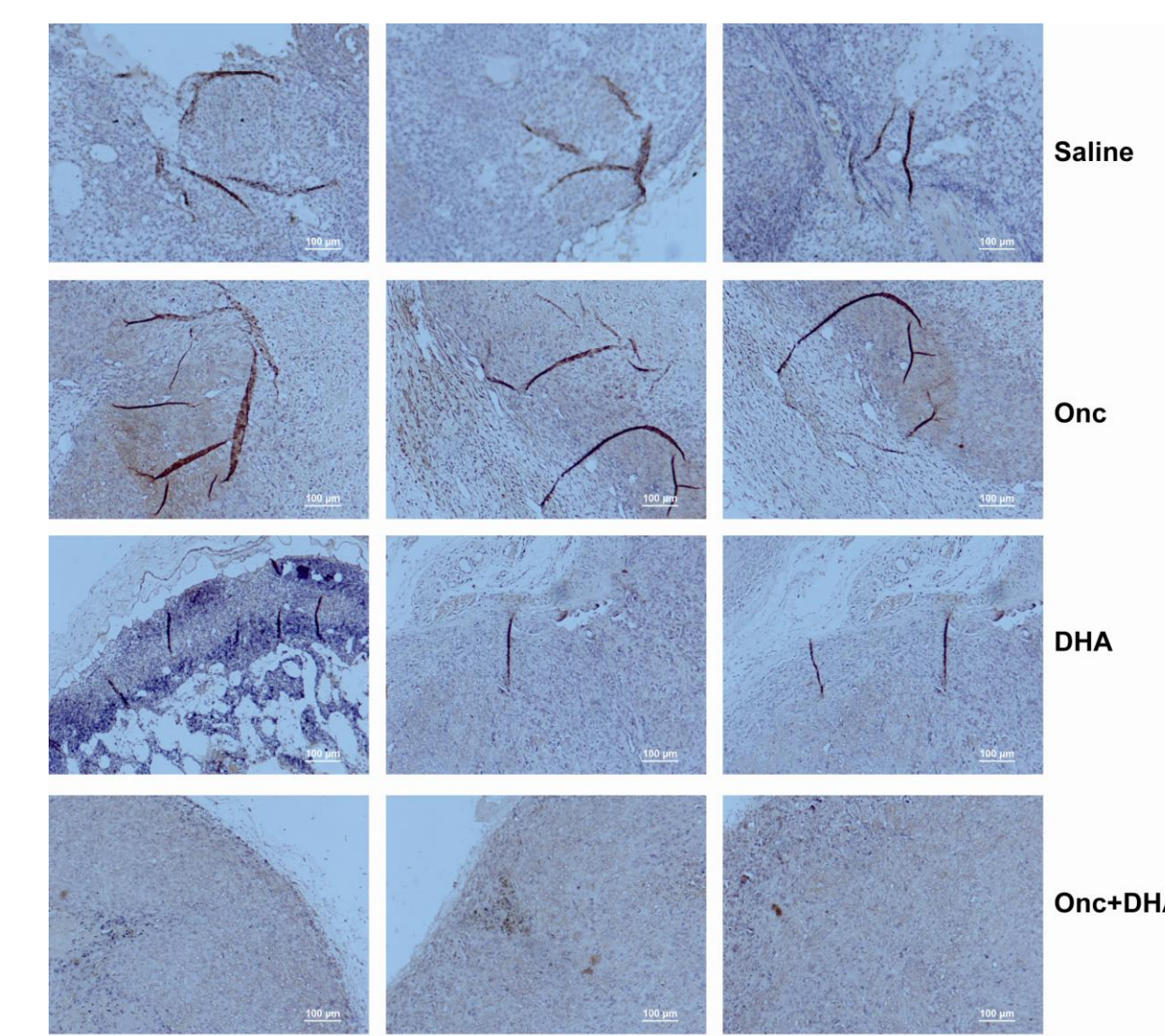


图4. Onc/DHA对生长于裸鼠身上的人恶性间皮细胞瘤 MSTO-211H的生长呈现协同抑制作用。



免疫组化切片分析不同给药组肿瘤血管生长抑制情况: 生理盐水组: Saline, n=6; Onc给药组: Onc1.5mg/kg, n=5; DHA给药组: DHA20mg/kg, n=5; 协同给药组: Onc1.5mg/kg + DHA20mg/kg, n=5  
图5. 经Onc与DHA联合或分别治疗的人间皮细胞瘤的组化分析血管内皮细胞由抗CD34染色。结果显示经Onc/DHA治疗的肿瘤中的血管生成明显受到抑制。

## 讨论

Onconase在体外和体内均对恶性间皮细胞瘤有很强的抑制作用。美国Tamir公司进行的临床试验已证实了它的临床应用价值, 并发现它是一个副作用不严重, 免疫原性很低的药物。青蒿素类药物已在世界上广泛用于耐药的恶性疟疾治疗, 证明是非常有效而安全的药物。它们的抗肿瘤活性也已被很多体外与以内的实验证实, 并在一些肿瘤临床治疗的个案中显现惊人的疗效。

我们发现, 对人恶性间皮细胞瘤和人非小细胞肺癌的体外或体内的生长, Onc和双氢青蒿素 (DHA) 合用, 均呈现协同效应, 但同时保持低毒的特性。在体内实验中, Onc/DHA和Onc/ADR (阿霉素) 都可以完全抑制肿瘤的生长, 但Onc/DHA组的裸鼠, 治疗后体重变化很小, 也未观察到明显的不良反应。而Onc/ADR组, 裸鼠治疗后体重明显下降, 并伴有腹泻, 虚弱等症。结果预示, Onc/DHA联合疗法非常有可能在临床上成为一种有效而低毒, 低免疫原性的新的治疗非小细胞肺癌和恶性间皮细胞瘤的方案。

体内实验的肿瘤切片组化检验显示, Onc/DHA联合用药对肿瘤血管的生成也有协同效应。对肿瘤血管生成的抑制效应可能在Onc/DHA抑制肿瘤体内生长的活性中起着重要作用。这个疗法是否适用于其他肿瘤, 正在研究之中。

## 结论

1. Onconase 与双氢青蒿素 (DHA) 合用对肿瘤生长具协同抑制作用。
2. Onc/DHA合用的毒性远低于Onc/ADR (阿霉素) 合用。
3. Onc/DHA合用对肿瘤血管生成的协同抑制可能在其体内抗肿瘤活性中起重要作用。
4. 肺癌是我国发病率最高的癌种, 每年有50万新检出病人。Onc/DHA疗法在非小细胞肺癌治疗上, 有很高的临床应用和市场潜力。