

脑啡肽 - 干扰素融合蛋白具有较高的抑制肿瘤细胞生长活性*

黎孟枫 张 沁 曾 庆** 朱千政 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

摘 要

本文根据有些肿瘤细胞表面富含 δ 型阿片受体事实, 化学合成了脑啡肽 (Enk) N 端 5 肽编码区, 将其通过一连接 3 肽编码区与人 $\alpha 1$ 型干扰素 (IFN) 基因相连, 并在大肠杆菌中表达了这一融合蛋白. 以体外培养的人结肠腺癌细胞和多形胶质瘤细胞为模型, 采用 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入法证明该融合蛋白抑制肿瘤细胞生长的活性显著高于单纯的 IFN 分子. 通过 Naloxone 竞争阻断试验证明, 这种抑制活性的增高确由 Enk 导向区介导. 本文报道为 IFN 作用机制的研究提出了新课题, 同时也展示了导向 IFN 治疗肿瘤的应用前景.

关键词 干扰素、脑啡肽、受体、肿瘤、蛋白质工程

干扰素 (Interferon, IFN) 是具有抗病毒增殖和抑制肿瘤细胞生长等多种生物学活性的细胞因子, 它既是研究各种细胞因子的基本模型, 也是生物治疗, 特别是肿瘤生物治疗中广泛应用的药物. IFN 作用的靶细胞谱较广, 并不限于受病毒感染的细胞或肿瘤细胞. 尽管 IFN 产生的信号转导机制已基本弄清^[1], 但它与受体相互作用的过程非常复杂, 可能涉及多种受体成分和辅因子^[2], 甚至可观察到现有信号转导理论所不能圆满解释的直接抑制细胞生长的作用^[3]. 因此, 为了进一步探讨 IFN 与靶细胞作用机制的全貌, 同时提高 IFN 专一抑制肿瘤细胞的特异性和实用性, 作者试图利用具有肿瘤细胞亲嗜性的功能分子构成导向 IFN, 并观察这些融合蛋白对靶细胞的作用.

现已知道, 肿瘤细胞表面常带有一些特异的标志, 其中一部分是某些多肽因子的受体. 已有确凿证据表明, 一些肿瘤细胞, 如神经胶质母细胞瘤、小细胞肺癌和结直肠癌等, 其胞膜富含 δ 型阿片受体^[4-6]. Enk 是存在于动物机体内的多肽类生理物质, 参与体内神经、免疫、内分泌等生理过程的调节. 关于 Enk 分子结构与功能的关系, 已积累了大量的研究数据, 并

1993-05-18 收稿, 1993-09-16 收修改稿.

* 国家“863”高科技发展计划生物技术领域资助项目.

** 现在地址: 广东省微生物学研究所, 广州 510070.

已知道其 N 端的 5 肽线性结构是与 δ 型受体结合的基本功能区域^[7]。从上述背景出发,本文构建了具有肿瘤细胞亲嗜性的 Enk-IFN 融合蛋白,并证明其抑制肿瘤细胞生长的活性高于单纯的 IFN 分子。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂和酶类 限制酶、连接酶及 4XdNTP 购自德国 Boehringer Mannheim 公司,细胞培养基购自美国 GIBCO/BRL 公司,胎牛血清购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。抗 IFN- α 1 单克隆抗体偶联的 Sepharose 4B 亲和色谱介质由长春生物制品研究所提供。³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)购自核工业部北京原子能研究所。抗白细胞 IFN 抗血清由美国 MDNJ-Robert Wood Johnson 医学院 Pestka 教授惠赠。IFN- α 1c 纯品由本组自行制备^[8]。Enk 受体竞争剂 Naloxone 及其他主要生化试剂为美国 Sigma 公司产品或国产 AR 级试剂。

1.1.2 质粒、噬菌体和菌种 宿主菌 JM101 和 DH5 α 由本室提供。IFN- α 1c 表达质粒 pBV403 由本组构建^[8],其结构是,在通用的原核表达载体 pBV220^[9](本室张智清博士提供)的 EcoRI 和 BamHI 位点插入了 IFN- α 1c 基因。噬菌体 M13mp19 复制型 DNA 购自美 New England Biolabs 公司。

1.1.3 肿瘤细胞及其培养 多形胶质母细胞瘤细胞(BT325)由北京天坛医院神经外科研究所建系并惠赠,在含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基中传代培养。人结肠腺癌细胞(HCT-8)细胞由中国医学科学院药物研究所惠赠,在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中传代培养。两种细胞均在 37°C, 5%CO₂ 环境中贴壁生长。

1.2 实验方法

1.2.1 寡核苷酸的合成与纯化 采用固相亚磷酰胺法在美国 ABI 公司产 381A 型 DNA 合成仪上合成寡核苷酸,随后经脱保护在瑞典 Pharmacia 公司产快速液相色谱 Mono Q 阴离子交换柱上纯化。

1.2.2 核苷酸和氨基酸序列测定 采用 Sanger 的末端终止法^[10]和 Messing 的 M13 克隆-模板系统^[11],在美国 Applied Biosystem (ABI) 公司产 370A 型 DNA 测序仪上进行核苷酸序列测定。蛋白质的氨基酸序列在美国 ABI 公司 477A 型蛋白质测序仪上采用 Edman 降解法^[12]进行测定。

1.2.3 基因操作的其他技术和方法 质粒 DNA 提取、DNA 琼脂糖凝胶电泳、限制性内切酶消化、互补寡核苷酸链退火及双链 DNA 连接、转化等一般基因操作按文献[13]的方法进行。

1.2.4 外源基因在大肠杆菌中的表达 含 Enk-IFN 融合蛋白表达载体的 DH5 α 菌在 30°C 活化过夜后,1:10 接种到 LB 培养液中,30°C 摇床扩增,待其浓度达 O.D.₆₀₀ 约 0.4 时,转至 42°C 使 PL 启动子去抑制,继续培养 4h,收获细菌。从培养液收获的菌体用 1% 培养体积的裂解液(7 mol/L 盐酸胍,0.25 mol/L Tris · Cl, pH8.0)于 4°C 作用 1 h,17000 r/min 离心 5min,上清为粗制的表达产物。

1.2.5 表达产物的纯化 上述粗制品按常规方法用 80% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 沉淀,去上清,重溶后加样至抗 IFN- α 1 单克隆抗体偶联的 Sepharose 4B 亲和色谱柱,用含 0.1 mol/L

NaCl 的 0.1 mol/L 甘氨酸溶液 (pH2.5) 洗脱, 收集特异洗脱峰, 采用美国 Beckman 公司产 DU70 型分光光度计在 280nm 波长下测定蛋白质含量。

1.2.6 抗病毒活性的测定 在滤泡性口炎病毒-人羊膜传代细胞系统中采用细胞病变抑制法进行, 以 50% 保护的稀释度为终滴度, 并用美国国立卫生研究院 (NIH) 提供的标准 IFN 进行校正。

1.2.7 抗细胞增殖活性的测定 采用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法检测细胞增殖程度并计算抑制率。按 10^4 /孔密度分种于 96 孔细胞培养板的 BT325 细胞和 HCT-8 细胞, 在含 8% 胎牛血清及不同浓度的待测样品的培养基中培养 19h (在不含样品的培养基中生长的细胞设为对照组), 随后按 $1\mu\text{Ci}$ /孔加入 $^3\text{H-TdR}$, 于 37°C 温育 4h, 用细胞收集器收集细胞至玻璃纤维滤膜, 最后按常规方法在美国 Beckman 公司产 LS 5000TA 液体闪烁计数器上测定放射性。每一浓度设置 3 个平行实验孔。

2 结 果

2.1 化学合成的 Enk 和连接肽编码区的序列

本实验合成的 2 段互补寡核苷酸的序列如图 1 所示。2 段寡核苷酸退火后, 形成 Enk 的 N 端 5 肽及连接肽 3 肽的编码区, 并在其上游带有 EcoRI 位点和起始密码, 在其下游带有 IFN- $\alpha 1c$ 的 N 端 3 肽编码区和可与 IFN- $\alpha 1c$ 基因其余部分连接的 DdeI 位点。

	[脑啡肽 5肽导向区]	[连接肽部分]	[干扰素 N端]
	Tyr Gly Gly Phe Met	Ser Gly Ser	Cys Asp Leu
oligo1:	TCGAC ATG TAC GGT GGC TTT ATG	TCC GGA TCC	TGC GAC CTG C
oligo2:	G TAC ATG CCA CCG AAA TAC	AGG CCT AGG	ACG CTG GAC GGA CT
	EcoRI	BamHI	DdeI

图 1 合成的寡核苷酸的序列

Olig01 和 Olig02 为 2 段合成的寡核苷酸, 第 2 行为对应的氨基酸序列

2.2 Enk-IFN 融合蛋白表达质粒的构建

用 EcoRI 和 BamHI 双酶消化 pBV403, 切下 IFN- $\alpha 1c$ 基因并再用 DdeI 消化, 与 pBV403 中的 pBV220 部分、以及上述退火后的双链寡核苷酸连接, 构建成 Enk-IFN 融合蛋白表达质粒 pBV405 (图 2), 转化大肠杆菌 DH5 α 后可在 PRPL 串联启动子控制下表达。为精确鉴定 Enk-IFN 基因的一级结构, 又用 EcoRI+PstI 双酶将该基因从 pBV405 切下, 插入 M13mp18 复制型双链的相应位点, 提取单链后测定核苷酸序列, 证明与原设计完全相符 (全序列略)。

2.3 Enk-IFN 融合蛋白的表达、纯化和 N 端氨基酸序列

温度诱导表达 Enk-IFN 后, 经粗制和单克隆抗体亲和色谱, 获得 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上呈现单一条带的纯品 (图 3)。测定此纯品的 N 端 15 个残基的序列, 证实与原设计完全相符。

2.4 Enk-IFN 的抗病毒活性

4 次测定蛋白质含量和抗病毒活性, 比活性分别为 9.8×10^7 单位/mg, 7.0×10^7 单位/mg,

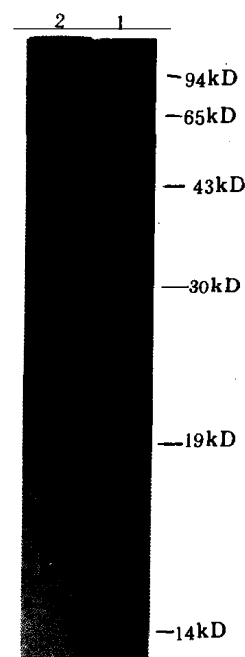
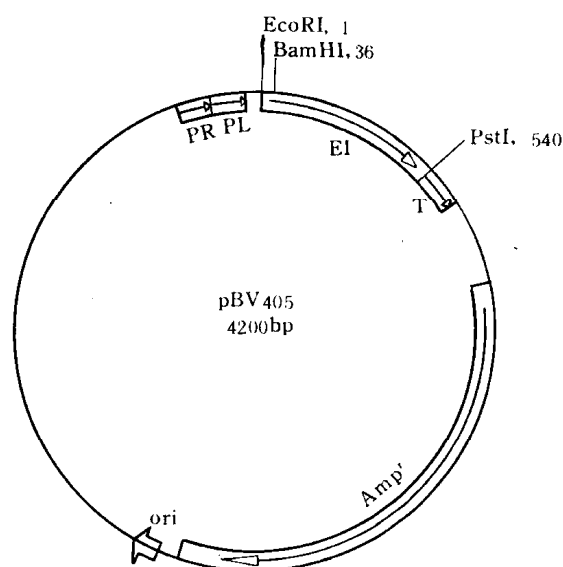


图 2 Enk-IFN 表达质粒 pBV405 的物理图谱

EI 为 Enk-IFN 基因, T 为转录终止信号, PRPL 为 PRPL 串联启动子, Amp^r 为氨苄青霉素抗性基因, ori 为复制起始位点

图 3 Enk-IFN 纯品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

1——蛋白质分子量标准参照物, 2——Enk-IFN 纯品

8.5×10^7 单位/mg, 7.5×10^7 单位/mg, 平均为 8.2×10^7 单位/mg 蛋白, 与单纯的 IFN- $\alpha 1c$ 的比活性无明显差别。

2.5 Enk-IFN 抑制肿瘤细胞增殖的活性

3H-TdR 掺入法测定不同浓度 Enk-IFN, IFN- $\alpha 1c$ 对 BT325 细胞和 HCT-8 细胞的抑制活性, 以及过量 Naloxone (作用浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$) 和抗白细胞 IFN 抗血清 (每孔加入量为

表 1 Enk-IFN 和 IFN 抑制细胞生长效应的比较

细胞系	Enk-IFN 或 IFN 加入量 (抗病毒活性单位)	肿瘤细胞抑制率 (%) ^{a)}		p 值 ^{b)}
		Enk-IFN	IFN	
HCT-8	10	31.6	7.6	<0.01
	100	39.7	13.9	
	1000	47.1	20.1	
	1000+Naloxone	26.8		>0.05
	1000+抗血清	-5.6		<0.01
BT325	10	39.7	16.1	<0.01
	100	46.5	22.9	
	1000	56.1	33.6	
	1000+Naloxone	35.6		>0.05
	1000+抗血清	-3.2		<0.01

a) 抑制率 = $\frac{\text{实验组 3 次测定 CPM 平均值} - \text{对照组 3 次测定 CPM 平均值}}{\text{对照组 3 次测定 CPM 平均值}}$

b) Enk-IFN 组与 IFN 组比较。

1:100000 中和效价) 对该抑制活性的阻断, 结果如表 1 和图 4.

3 讨 论

本研究采用多形胶质母细胞瘤细胞和结肠腺癌细胞作为模型, 研究了 Enk-IFN 融合蛋白对富含 δ 型阿片受体的细胞的生长抑制效应. 研究表明, IFN 与 Enk 融合后提高了抑制肿瘤细胞生长的活性.

根据已有的报道, 某些肿瘤细胞表面较其相应的正常组织带有更丰富的 δ 型阿片受体, 这些细胞包括小细胞肺癌细胞^[4]、结直肠腺癌细胞^[5] 和胶质细胞瘤细胞^[6] 等, 因此提出了采用阿片样物质作为导向基团将一些效应分子导入靶细胞的可能性. 动物体内的阿片受体有多种型别, 各种型别的受体与不同的阿片样物质间的亲和力差别很大, 其中 δ 型受体与 Enk 结合能力较强, 并能与 Naloxone 发生低亲和结合^[14], 因此, 本研究选择了 Enk 作为导向分子. 实验显示, 施加过量的 Naloxone 可使 Enk-IFN 抑制细胞生长的活性回降至与单纯 IFN 相近的水平, 这表明 Enk-IFN 抑制活性的提高与靶细胞膜上的 Enk 受体有关, 即为 Enk 特异性介导的. 另一方面, 过量的抗 IFN 抗体可完全阻断 Enk-IFN 的抑制活性, 又表明这种抑制活性来源于 IFN.

Enk 是存在于动物体内的正常生理物质, 参与神经传导、免疫调节等重要生命活动; 同时, 它与受体作用的区域又位于短短的 N 端 5 肽部分^[7], 因此, 从蛋白质工程的角度来看, Enk 既不易影响人体正常的生理功能, 也可能不易诱生中和抗体, 而且还具有潜在的镇痛作用, 作为导向分子显然有其合理性和优越性. 现已知道, Enk5 肽中 N 端第一个 Tyr 对受体结合活性是必需的^[7], 因此本实验在分子设计上将 Enk 置于 N 端, 并在 Enk 与 IFN 之间加入了 Ser-Gly-Ser 三肽连接区, 以保证 IFN 能独立形成功能构象. 本文采用在基因水平上构建融合蛋白的操作方式, 既有利于大量获取目的产物, 又便于分子拆分重组和进行结构功能研究, 显然优于在蛋白质水平上进行化学偶联的方式. 从现有结果来看, 这些策略是成功的.

在此以前, 曾有人将 Enk 与小分子抑癌药玫瑰树碱相偶联^[15], 虽然证实偶联产物可与肿瘤细胞特异结合, 但 Enk 既不能显著增加这些药物进入肿瘤细胞的数量, 也不能减少药物对正常细胞的破坏. 众所周知, IFN 具有抑制细胞生长的活性; 同时 IFN 生物学活性的发挥又有赖于细胞膜上的 IFN 受体. 上文提到, 受 IFN 受体控制, 并由酪氨酸激酶介导的信号转导系统已于最近阐明^[1], 但 IFN 受体成分并不是单一的, IFN 与受体的作用形式本身也远未弄清, 甚至通常可观察到 IFN 对肿瘤细胞生长的直接抑制作用^[3]. 鉴于本研究的结果, 我们认为融合蛋白中 Enk 的作用可能在于帮助 IFN 以高浓度聚集于细胞膜上, 从而使 IFN 更易于

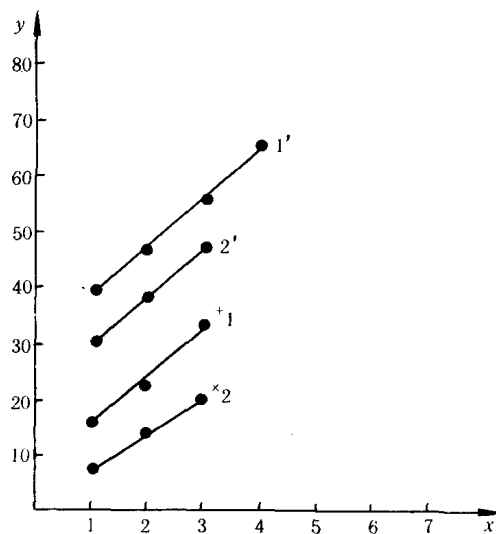


图 4 细胞生长抑制曲线

x 轴: 样品的抗病毒活性的对数, y 轴: 细胞生长抑制率. 1——IFN- α 1c 对 BT325 的作用, 1'——Enk-IFN 对 BT325 的作用; 2——IFN- α 1c 对 HCT-8 的作用, 2'——Enk-IFN 对 HCT-8 的作用; + 为 1000 单位 Enk-IFN+Naloxone (10 μ mol/L) 对 BT325 的作用; x 为 1000 单位 Enk-IFN+Naloxone (10 μ mol/L) 对 HCT-8 的作用

通过某些特定的方式发挥其功能。至于 Enk-IFN 与 Enk 受体结合后的命运、它可能诱发的信号传递过程、以及它们与 IFN 受体间的功能关系,这些有趣的问题尚待进一步研究阐明。综上所述,本文的结果为 IFN 作用机制的研究提出了新课题。

除上述一些肿瘤细胞以外,人 T 淋巴细胞亦富含阿片受体,因此提出了导向治疗人类免疫缺陷病毒感染的可能性。由此看来,Enk 作为导向分子的潜在用途是多方面的。

参 考 文 献

- [1] Marx, J., *Science*, 1992, **257**:744—745.
- [2] Finbloom, D. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**:22545—22548.
- [3] Fleischmann, W. R. *et al.*, *Interferon, Principles and Medical Applications* (eds. Baron, S. *et al.*), The University of Texas, Galveston, 1992, 299—308.
- [4] Roth, K. A. *et al.*, *Cancer*, 1986, **57**:769—773.
- [5] Almers, J. *et al.*, *Acta Pathol. Microbiol. Scan. Sect. A*, 1980, **88**:103—109.
- [6] Law, P. Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1984, **159**:4096—4104.
- [7] Gramsch, C. *et al.*, *J. Neurochem.*, 1983, **40**:1220—1226.
- [8] Li, M. F. *et al.*, *Progress in Natural Science*, 1992, **2**:269—274.
- [9] 张智清等, *病毒学报*, 1988, **4**:97.
- [10] Sanger, F. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74**:5463—5467.
- [11] Messing, J. *et al.*, *Methods Enzymol.* (eds. Wu, R. *et al.*), Academic Press, New York, 1983, **101**:20—78.
- [12] Edman, P. *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1967, **1**:80.
- [13] Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989, 6.1—10.1.
- [14] Kosterlitz, H. W. *et al.*, *Regulatory Roles of Opioid Receptors*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1988, 100—108.
- [15] Rigaudy, P. *et al.*, *Cancer Res.*, 1989, **49**:1836—1842.