

脑啡肽- α I 干扰素的镇痛作用和抗肿瘤作用*

朱千政¹⁾ 王 晶²⁾ 张笑冰 黎孟枫 张汝丽³⁾ 陈望秋 侯云德

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

摘要 从大肠杆菌工程菌中纯化脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白, 测定其在小鼠脑内的镇痛作用, 阿片受体结合功能及对肿瘤细胞生长抑制和体内抗肿瘤作用. 结果显示, 与 α I 干扰素母体相比, 融合蛋白具有较强的镇痛作用, 镇痛作用可为腹腔注射阿片受体拮抗剂 Naloxone 和 Naltrindole 反转, 融合蛋白可竞争³H 标记 σ 型阿片受体配基 DPDPE 与膜受体结合. 融合蛋白的肿瘤细胞生长抑制和体内抗肿瘤作用也高于母体分子, 说明脑啡肽和 α I 干扰素的融合蛋白实现并增强了脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白的双重功能.

关键词 干扰素, 融合蛋白, 镇痛作用, 抗肿瘤作用

干扰素 (interferon, IFN) 是一个分泌性的多功能蛋白家族^[1], 因其对病毒复制的干扰而得名, 但除抗病毒活性外, 干扰素还具有肿瘤细胞生长抑制功能和广泛的神经免疫内分泌调节功能^[2], 是脊椎动物抵抗病毒, 细菌和寄生虫感染及肿瘤的重要组成部分. 目前, 基因工程干扰素已为临床上治疗病毒病和肿瘤的重要药物. 但与大多数肿瘤化疗药物一样, 干扰素的抗肿瘤作用不具有特异性, 提高干扰素的抗肿瘤的特异性是干扰素研究中的一个重要理论和实际问题.

近年来在肿瘤细胞表面发现有一些肿瘤反应性或肿瘤相关抗原和某些异常表达的细胞表面分子, 这些表面分子为肿瘤靶向治疗提供了可能和窗口. 一些肿瘤细胞如神经母细胞瘤, 小细胞肺癌和直肠腺癌细胞表面具有丰富的 δ 型阿片受体^[3~5], 其意义还不清楚. Rigaudy 等^[6,7]用脑啡肽与玫瑰树碱交联, 以脑啡肽为载体将玫瑰树碱导向阿片受体丰富的肿瘤细胞. Flannery 等^[8]将抗肿瘤 IgG 与 IFN- α 化学交联, 可增强 NK 细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤作用. 我们构建了脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白. 本文观察了融合蛋白的各种功能并对其作用机制进行理论探讨.

1 材料和方法

1.1 重组人 IFN α 1 和融合蛋白的制备

重组人 α I 型干扰素工程菌 PBV89 DH5 α , 脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白工程菌 PBVE10 α 8 DH5 α 在 MDL1000-10/MDL-4CR 发酵罐 (B. E. MaRu, 日本岛津) 上进行发酵, 菌体经 7 mol/L 盐酸胍裂解, (NH₄)₂SO₄ 沉淀, 0.001 mol/L HCl (pH=2) 酸化, 再经 CM-Sephrose CL 4B 阳离子交换柱层析, Anti-IFN- α Sephrose CL 4B 亲和层析.

1.2 IFN α 1 和融合蛋白脑内镇痛作用

采用热板法 (hot plate test) 进行, 供试小鼠先经筛选. 脑室注射给药, 在给药后 5 min 将小鼠置于 (50 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C 的热板上, 从小鼠接触热板至开始舔脚后趾的时间为舔脚时间 (paw licking latency), 砍头时间 (cut off time) 为 60 s. 数据用 DUNCAH' S TEST 进行统计处理.

* 863 高技术发展计划资助.

¹⁾ 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850.

²⁾ 同济医科大学微生物教研室, 武汉 430030.

³⁾ 北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100038.

收稿日期: 1996-09-09, 修回日期: 1996-12-16

1.3 受体竞争试验

5×10^8 大鼠神经胶质瘤细胞 RT-2 细胞离心后, 细胞沉淀用 10 ml 50 mmol/L Tris·HCl pH 7.7 悬起, 匀浆破碎, 再反复冻融数次, 17 000 r/min 离心 20 min 后, 沉淀重新悬起, 在 0℃ 静止 1 h, 洗涤 2 次, 重悬为每份 0.1 ml. 加入不同终浓度 [^3H] DPDPE 和不同终浓度的干扰素或脑啡肽- αI 干扰素融合蛋白, 加入 10 ml 50 mmol/L Tris·HCl pH 7.7 使总体积为 200 μl , 在 24℃ 温育 1 h. 按常规方法用液体闪烁计数器测定放射计数.

1.4 IFN 抗病毒活性的测定

IFN 抗病毒活性的测定采用细胞病变抑制法 (CPE), 在滤泡性口炎病毒 (VSV) - 人羊膜传代细胞 (Wish) 系统上行, 并用标准 IFN 进行校正.

1.5 抗肿瘤细胞增殖活性测定

采用 ^3H -TdR 掺入法检测细胞增殖程度并计算抑制率. 按 10^4 /孔密度接种人多形胶质母细胞瘤细胞 BT325 细胞或人结肠癌细胞 HCT-8 细胞于 96 孔细胞培养板, 在含 8% 胎牛血清及不同浓度的 αI 干扰素或脑啡肽- αI 干扰素融合蛋白的 IMEM 培养基中培养 9 h (不含样品的培养基为对照), 加入 3.7×10^{10} Bq/孔 ^3H -TdR, 于 37℃ 温育 4 h, 用细胞器收集细胞, 按常规方法用液体闪烁计数器测定放射性. 抑制率按以下公式计算:

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{计数率(实验组)} - \text{计数率(对照组)})}{\text{计数率(对照组)}} \times 100\%$$

1.6 αI 干扰素和融合蛋白的体内抗肿瘤作用

5×10^6 细胞数的小鼠恶性胶质瘤细胞 G-422, 腹部皮下接种于体重 18~20 g 的雄性昆明种小鼠, 每组 10 只. 接种 24 h 后, 在接种局部注射给药, 3×10^4 IU αI 干扰素或融合蛋白, 每天一次, 共 8d. 第 10 天处死动物, 剥瘤并称重. 对照组注射与药物等体积的生理盐水.

2 实验结果

2.1 重组人 IFN α1 和融合蛋白的制备

工程菌发酵获得的菌体经 7 mol/L 盐酸胍

裂解, 稀释和透析复性, 然后用硫酸铵分级沉淀获得粗制样品, 粗制样品用 CM-Sephrose Cl 4B 阳离子交换层析, 重组人 IFN α1 和脑啡肽- αI 干扰素融合的抗病毒活性均主要集中在 0.2 mol/L AAB 洗脱峰中, 纯化样品比活性分别为 2.8×10^6 IU/mg 和 2.7×10^6 IU/mg. 经上述阳离子交换层析获得的样品进一步用抗 α -干扰素抗体柱进行亲和层析, 纯度达 95%, 比活性均为 6×10^6 IU/mg, SDS-PAGE 电泳检查成一条带 (结果未示).

2.2 镇痛作用

纯化的干扰素和脑啡肽- αI 干扰素融合蛋白样品直接脑内注射, 监测尾温观察无明显的热源反应. 5~10 μl 不同浓度的 α1 型干扰素和融合蛋白注射入小鼠侧脑室, 恢复反应 5 min 后用 hot plate test 测定 paw licking latency 时间. 如图 1 所示, α1 型干扰素在 325 IU 时, 开始有镇痛作用, 500 IU 时产生明显的镇痛作用, 融合蛋白 125 IU 时镇痛作用明显高于母体干扰素 ($P < 0.01$).

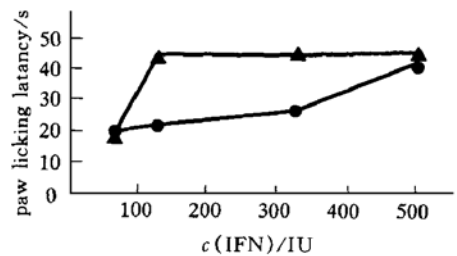


图 1 脑啡肽- αI 干扰素融合和重组人 IFN α1 的脑内镇痛作用

●—●: 干扰素; ▲—▲: 融合蛋白.

在脑室注射重组人 IFN α1 或脑啡肽- αI 干扰素融合蛋白各 500IU 前 20 min, 通过小鼠腹腔给予阿片受体拮抗 Naloxone (5 mg/kg) 或 Naltrindole (2 mg/kg), 观察到重组人 IFN α1 的镇痛作用为 Naloxone 反转 (图 2), 脑啡肽- αI 干扰素融合蛋白的镇痛作用为 Naloxone 和 Naltrindole 反转 (图 3). 已知 Naloxone 优先竞争阿片 μ 受体, 在大剂量时亦与 κ 受体和 δ 受体结合, 而 Naltrindole 则为

δ 受体拮抗剂. 与 Blalock 等^[9]的人白细胞干扰素的镇痛作用可为 Naloxone 反转的现象一致, 并提示脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白的镇痛作用与阿片 μ 受体和 δ 受体均有关, 说明脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白中脑啡肽结构域具有其相应的功能.

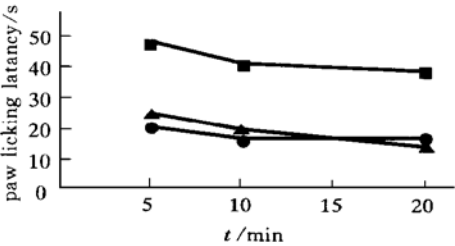


图2 重组人 IFN α 1 的脑内镇痛作用被阿片受体拮抗剂 Naloxone 反转

●—●: 生理盐水; ■—■: 干扰素;
▲—▲: 干扰素+ Naloxone.

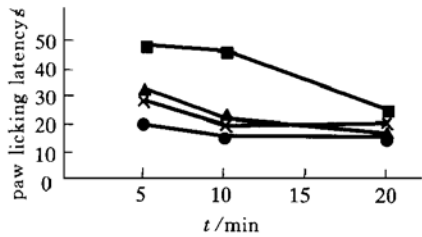


图3 脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白的镇痛作用为 Naloxone 和 Naltrindole 反转

●—●: 生理盐水; ■—■: 融合蛋白;
▲—▲: 融合蛋白+ Naloxone; ×—×: 融合蛋白+ Naltrindole.

2.3 对 [³H] DPDPE 与膜受体结合的影响

RT-2 细胞为小鼠神经胶质母细胞瘤细胞, 从培养的 RT-2 提取细胞膜, 在不同浓度 [³H] DPDPE 下, 测定了 [³H] DPDPE 与膜受体结合, 按 $[SB] / [F] = -1 / K_d [SB] + B_{MAX} / K_d$ 进行 Scatchard 分析, 估得 B_{MAX} 为 177 pmol/g 蛋白, K_d 为 22.4 nmol/L. 说明 RT-2 细胞具有丰富的 δ 型阿片受体. 在 [³H] DPDPE 浓度 5 nmol/L 时, 测定了不同浓度重组人 IFN α 1 和脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白对 [³H] DPDPE 膜受体结合的影响 (图 4). 重

组人 IFN α 1 对 [³H] DPDPE 与受体结合起增加作用, 干扰素浓度在 2 000 IU/ml 时达到高峰; 而脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白则竞争 [³H] DPDPE 与膜受体的结合, 这一结果进一步说明脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白中脑啡肽结构域具有脑啡肽功能.

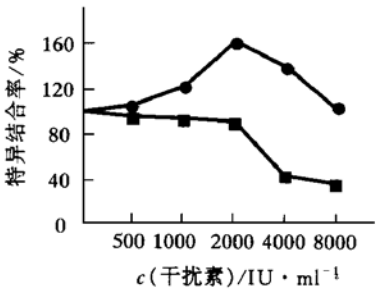


图4 重组人 IFN α 1 和融合蛋白对 [³H] DPDPE 与膜受体结合的影响

●—●: 干扰素; ■—■: 融合蛋白.

2.4 α I 干扰素和脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白的体内外抗肿瘤作用

构建脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白的一个基本构想是通过脑啡肽将 α I 干扰素导向到脑啡肽受体丰富的肿瘤细胞, 以增强 α I 干扰素的抗肿瘤作用. 神经母细胞瘤, 小细胞肺癌和直肠腺癌细胞表面具有丰富的 δ 型阿片受体, 本文选择多形胶质母细胞瘤细胞 BT-325 和人结肠癌细胞 HCT-8, 观察了 α I 干扰素和脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白对上述肿瘤细胞的体外抗增殖作用 (表 1), 在各种浓度下, 脑啡肽- α I

表1 α I 干扰素和脑啡肽- α I 干扰素融合蛋白对肿瘤细胞的体外抗增殖作用

肿瘤细胞	α I 干扰素或融合蛋白浓度 / IU · ml ⁻¹	抑制率 / %		P 值
		α I 干扰素	融合蛋白	
BT-325	10	7.6	31.6	< 0.01
	100	13.9	39.7	
	1000	20.1	47.1	
HCT-8	10	16.1	39.7	< 0.01
	100	22.9	46.5	
	1000	33.6	56.1	

干扰素融合蛋白的体外抗增殖作用均显著高于α I 干扰素母体. 低浓度时更为明显.

在小鼠恶性胶质瘤细胞 G-422 的小鼠移植瘤模型上, 对α I 干扰素和脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白的体内抗肿瘤作用进行了评价 (表 2), 脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白表现出很强的体内抗肿瘤活性, 与α I 干扰素母体相比, 呈现出极显著差异.

表 2 α I 干扰素和脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白的体内抗肿瘤作用

药品名称	瘤重/g	均值	P 值
生理盐水	4. 25; 1. 77; 1. 86; 3. 67; 1. 77; 1. 99; 2. 04; 2. 11; 3. 25; 2. 17;	2. 48	
重组人 IFNα1	1. 90; 2. 19; 1. 55; 1. 16; 1. 17; 0. 85; 0. 91; 2. 06; 0. 64; 1. 45;	1. 45	< 0. 01
融合蛋白	0. 05; 0. 23; 0. 74; 0. 10; 0. 24; 0. 57; 0. 45; 0. 46; 0. 71; 0. 54;	0. 41	< 0. 01

3 讨 论

一些肿瘤细胞如神经母细胞瘤, 小细胞肺癌和直肠腺癌细胞表面具有丰富的δ 型阿片受体, Rigaudy 等^[6, 7]用脑啡肽与玫瑰树碱交联, 证实以脑啡肽为载体可将玫瑰树碱导向阿片受体丰富的肿瘤细胞. Blalock 等^[9]发现人白细胞干扰素具有脑内的镇痛作用, 其镇痛作用可为 Naloxone 反转, 白细胞干扰素可竞争³H 标记吗啡与阿片受体的结合, 说明人白细胞干扰素能结合阿片受体. 提示以脑啡肽为载体实现干扰素的导向似乎是可能的, 本文的结果证明了这一构想.

本文首先观察到在低浓度时脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白的脑内镇痛作用明显高于重组人 IFNα1, 脑啡肽-α I 干扰素融合的脑内镇痛作用可为阿片受体拮抗 Naloxone 和 Naltrindole 反转, 随后又观察到脑啡肽-α I 干扰素融合能竞争 [³H] DPDPE 与膜受体的结合, 说明脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白的镇痛作用与阿片 μ 受体和 δ 受体均有关, 脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白中脑啡肽结构域具有其相应的功能. 由于阿片 μ 受体和 δ 受体后信号均与 G 蛋白偶联,

脑啡肽与α I 干扰素的融合可能使受体后信号传导得以加强, 融合蛋白脑内镇痛作用得到提高.

脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白对多形胶质母细胞瘤细胞 BT-325 和人结肠癌细胞 HCT-8 的体外抗增殖作用在各种浓度下均显著高于α I 干扰素母体. 移植瘤动物模型上, 观察到脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白对小鼠恶性胶质瘤细胞 G-422 表现出很强的体内抗肿瘤活性, 说明脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白对丰富的δ 型阿片受体的肿瘤细胞具有较很强的体内外抗肿瘤活性. 脑啡肽-α I 干扰素融合抗肿瘤活性的提高可能的机制是, 脑啡肽结构域以某种方式提高了脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白和肿瘤细胞的结合, 脑啡肽结构域与其膜受体的结合可能使α I 干扰素引发的受体后信号得到加强, 从而使脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白的抗肿瘤活性得以提高. 脑啡肽和α I 干扰素是否有受体共享还不清楚, 但从α I 干扰素具有脑内的镇痛作用并能结合阿片受体, 神经系统的肿瘤如神经胶质瘤对α 干扰素的治疗比较敏感来看, 它们在受体和受体后信号传导有某种关联是可能的.

Flannery 等^[8]将抗肿瘤 IgG 与 IFN-α 化学交联, 可增强 NK 细胞对肿瘤细胞的特异性杀伤作用. 脑啡肽-α I 干扰素融合蛋白在体内是否能增强 NK 细胞对δ 型阿片受体丰富的肿瘤细胞的特异性杀伤作用有待阐明.

参 考 文 献

1 侯云德. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 1990. 598~647

2 Blalock J E. Molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews*, 1989, **69**: 1~ 31

3 Alumets T, Falkmen S, Grimelius L *et al.* Immunocytochemical demonstration of enkephalin and β-endorphin in endocrine tumors of the rectum. *Acta Path Microbiol Scand Sect A*, 1980, **88**: 103~ 109

4 Davis W G, Torney W P, Kelaney C V. Enkephalins in large bowel malignancy and in acute appendicitis. *Gut*, 1979, **20**: 865~ 867

5 Roth K A, Barchas J D. Small cell carcinoma cell lines contain opioid peptides and receptors. *Cancer*, 1986, **57**: 769~ 773

6 Rigaudy P, Charcosset J Y, Garbay J C *et al.* Attempts to

target antitumor drugs toward opioid receptor-rich mouse tumor cells with enkephalin-ellipticinium conjugates. *Cancer Res*, 1989, **49**: 1836~ 1842

7 Rigaudy P, Garbay J C, Jacquemin S A *et al.* Synthesis and binding properties to DNA and to opioid receptors of enkephalin-ellipticinium conjugates. *Int J Peptid Protein Res*, 1987, **30**: 347~ 355

8 Flannery G R, Pelham J M, Dixon G J *et al.* Immunomodulation: NK cells activated by interferon-conjugated monoclonal antibody against human osteosarcoma. *Eur Cancer Clini Oncol*, 1984, **20**: 791~ 794

9 Blalock J E, Eric M S. Human leukocyte interferon (HuINF- α): potent endorphin-like opioid activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981, **101**: 472~ 478

Stronger Analgesia and Antitumor Activities of Enkephalin- α I Interferon Fusion Protein.
ZHU Qianzheng¹⁾, WANG Jing²⁾, ZHANG Xiaobing, LI Mengfeng, ZHANG Ruli³⁾, CHEN Wanqiu, HOU Yunde (*National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, Beijing 100052, China;* ¹⁾*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100850, China;* ²⁾*Department of Microbiology, Tong Qi Medical University, Wuhan 430030, China;* ³⁾*Neuro-*

science Centre, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract Human colorectal, pulmonary carcinoma as well as neuroblastoma have been shown to be rich in opiate receptors. A possible targeted fusion protein, consisting of Enkephalin and α I interferon, was constructed, bacterially expressed, and purified. When injected intracerebrally into mice, enkephalin- α I interferon fusion protein caused more potent analgesia than α I interferon. The analgesia effects of the fusion protein were prevented and reversible by opiate antagonist, naloxone and naltridole. The fusion protein also inhibits bindings of [³H] DPDPE to opiate receptor. The enkephalin- α I interferon fusion protein was shown to have more antiproliferative and antitumor activities against opiate receptor bearing tumors, both *in vivo* and *in vitro*. These results suggest enkephalin- α I interferon fusion protein may be able to target opiate receptors on tumor cells.

Key Words interferon, fusion protein, analgesia, antitumor activity

GI 双突变体 GIK253RA198C 的构建及其性质分析*

伍传金 王琛 滕脉坤 王淳 肖亚中 王玉珍 牛立文 崔涛
(中国科学技术大学生物系, 合肥 230026)

摘要 以双引物法对葡萄糖异构酶 (GI) 基因进行定点突变, 将突变体基因于大肠杆菌中表达, 获得了 GI 双点突变体 GIK253RA198C. 研究 K253R 和 A198C 双点突变对 GI 的结构和性质的作用, 结果表明 GIK253RA198C 的热稳定性明显下降, 最适反应温度降低 5℃. 文章从结构和机制上解释了为何同是 K253R 突变, 对 SM33 GI 和密苏里游动放线菌 GI 的热稳定性产生不同的影响, 认为这是由于 Lys253 在两种 GI 结构的位置上存在微小差异, 从而使引入的 Arg 对亚基间的相互作用产生了相反效应所引起.

关键词 D-葡萄糖异构酶, 定点突变, 基因表达, 热稳定性

葡萄糖异构酶 (GI) 是一种重要的工业酶, 同时也是探讨酶催化机制和建立蛋白质工

* 国家“863”计划资助项目 (863-103-21-08).
收稿日期: 1996-10-10, 修回日期: 1997-02-03