

综述与专论

新型双分子细胞因子融合蛋白研究进展

刘 劫 马大龙

(北京医科大学免疫教研室, 北京 100083)

摘要 细胞因子通过相互协调、相互制约在体内发挥着重要的免疫调节作用, 利用细胞因子的这一特点, 近年来国内外设计并构建了新型的第二代细胞因子, 即利用基因工程技术和蛋白质工程技术将两种细胞因子合二为一, 使之成为具有多功能的嵌合蛋白新品种, 为细胞因子的理论研究及临床应用提供了新的手段与方法。

关键词 细胞因子, 蛋白质工程, 嵌合蛋白

1 前言

随着分子生物学技术与免疫学技术的不断发展, 细胞因子的研究获得了令人瞩目的成就, 迄今已成功地克隆化了几十种细胞因子的 cDNA, 大批的细胞因子基因工程产品也已问世。现已发现, 细胞因子在介导机体多种免疫反应, 如肿瘤免疫、感染免疫、移植免疫、自身免疫及造血系统等过程中发挥着重要的作用。细胞因子的作用具有多相性、网络性的特点, 它们不仅可以单独的发挥生物学活性, 而且不同的细胞因子之间还有相互协调和相互制约的作用, 利用细胞因子的这一特点, 一些实验室设计并构建出了新型双分子重组细胞因子融合蛋白, 即利用基因工程技术和蛋白质工程技术, 将功能类似或功能互补的两种细胞因子合二为一, 使之成为具有多功能的嵌合蛋白质新品种。这种新一代的细胞因子不仅为进一步探索细胞因子的生物学效应、结构与功能、细胞因子受体分布信号传导等理论研究打下基础, 还为开发临床新药开辟了新的道路。国内外开展比较多的嵌合分子是细胞因子与毒素, 如白喉毒素与 IL-2, IL-4, IL-6 的融合分子、毒素

与 CD4 分子、CD4 分子与免疫球蛋白 (Ig), Ig 与 MHC II 类抗原等的分子融合^[1-4], 而细胞因子间的嵌合分子的报导并不多见, 本文结合本室的工作介绍这一领域的进展。

2 人干扰素 IFN- γ 和人 IL2 嵌合分子 (IFN γ -IL2)

IL2 主要作用于 T 细胞, 可促进 T 细胞的增殖与分化, 同时对 NK, B 细胞及单核细胞也有作用。它与 IFN- γ 的很多生物学活性有交叉协同作用, 如两者协同杀伤肿瘤细胞, 都可增强 NK, CTL, LAK 细胞的活性, 这为临床上同时应用这两种细胞因子治疗肿瘤提供了理论依据。1986 年日本的 Masahara Seno 等人在大肠杆菌中成功表达了人 IFN γ -IL2 嵌合分子, 此嵌合分子既具有 IL2 的活性, 同时也具有 IFN γ 的生物学活性。作者比较了融合分子与 IFN γ 加 IL2 同时使用对 NK 活性的作用, 结果表明两者效应几乎相同, 但高于单独的 IL2 或 IFN γ 。这一实验结果证明 IFN γ -IL2 嵌合分子在效应上与 IL2 加 IFN- γ 使用并无更大的优越性。

1991 年中国预防医学科学院病毒学研究所与第四军医大学联合成功地构建并表达了重组人肿瘤坏死因子 (TNF) 和干扰素 (IFN α A) 的嵌合分子, 但活性检测证实, 虽然此嵌合分子既具有 TNF 的抗肿瘤, 又具有 IFN 抗病毒的双重活性, 但其活性较单独的 TNF 或 IFN α A 分别低 24 倍和 15 倍. 他们认为这种活性的降低可能是由于融合蛋白表达量的下降或是由于融合蛋白结构变化导致的^[5,6]. 本室也成功地构建并表达了小鼠干细胞生长因子 (SCF) 和小鼠 IL-3 的嵌合分子 (mSCF-IL3), 人 IL-8 和 IL-2 嵌合分子 (IL8-IL2), 但活性检测结果表明, mSCF-mIL3 和 IL8-IL2 的活性也都低于单独使用这些细胞因子时的活性. 我们 (内部资料) 认为, 其原因可能主要是由于两种不同分子融合后在空间构型上发生了干扰, 从而导致活性下降, 解决办法可用富含甘氨酸的接头连接两种分子, 使其互不干扰 (见后文).

3 重组人粒系-巨噬系集落刺激因子 (GM-CSF) 和人 IL-3 的嵌合分子^[7]

IL-3, GM-CSF 均为造血刺激因子, 它们对不同阶段的造血干细胞及祖细胞发挥着促增殖和促分化的作用. 而且 IL-3 和 GM-CSF 共用同一条 β 链做为它们的受体, 说明它们的受体在膜表面有相关性^[8], 因此 IL3 与 GM-CSF 的联合应用有可能更高效地刺激骨髓造血细胞的增殖与分化. 1991 年 Curtis 等人成功地克隆并表达了人 GM-CSF-IL3, IL3-GM-CSF 嵌合分子, 分别命名为 PIXY321, PIXY344. 其独到之处在于他们在 GM-CSF 和 IL3 连接处分别加入了由 15 个氨基酸组成的一小段多肽, 即 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ 或由 Gly₄ Ser Gly₅ Ser 11 个氨基酸组成的多肽, 使其两端的细胞因子不相互干扰而充分地折叠形成各自的天然空间结构, 并与其各自的受体结合从而高效的发挥生物学活性. 作者认为应选择那些低疏水性及低电荷效应的氨基酸来组成多肽, 使组成的多肽充分的伸展而不与 GM-CSF 和 IL-3 的

功能区发生相互作用、相互干扰. 多肽的长度最好在 40 Å 或 55 Å 左右, 该文由 11 个氨基酸组成的多肽长度已足够使两个蛋白质的功能区分开. 当然也不是所有的嵌合分子之间都需要加这段多肽的, GM-CSF C 端的半胱氨酸之后有 6 个氨基酸, 而 IL-3 在 N 端的半胱氨酸之前有 15 个氨基酸, 它们有可能各自充分折叠形成正确的空间结构, 因此 GM-CSF C 端直接与 IL3 的 N 端连结构建的嵌合分子 GM-CSF-IL3 可以形成它们各自的空间结构, 不发生相互干扰, 而充分地发挥各自的生物学活性. 受体结合试验表明融合分子能与带有 IL3 受体的细胞株 JM-1 或带有 GM-CSF 受体的细胞株 HL-60 结合, 其亲和力与单独使用 IL3 或 GM-CSF 相近. 值得重视的是, 在同时带有 IL3 与 GM-CSF 受体的细胞株 KG-1, AML-193 中, 融合分子表现出高于单独使用 IL3 时 5—10 倍的亲和力, 作者认为融合分子可能以一种新的方式与带有混合受体的细胞株进行反应. 进一步活性鉴定表明, 融合分子对 AML-193 细胞株的促增殖作用及刺激红系、单核/巨噬系、多潜能始祖造血细胞的集落形成的作用都明显高于单独使用 IL3, GM-CSF, 或 IL3 加 GM-CSF 同时使用, 可高出后者活性的 10—20 倍, 这可能与融合分子能和高亲和力受体结合并引起受体交联有关. 高活性的嵌合造血因子的表达成功为造血系统疾病提供了令人鼓舞的新的治疗手段. 目前, 在美国已开始了 PIXY321 融合造血因子临床 I 期试验. 本室在成功地表达人重组 IL-3 后^[9], 又构建并高效表达了人 GM-CSF-IL-3 嵌合分子, 并合成了一段由 15 个氨基酸组成的多肽, 加到 IL-3 与 GM-CSF 连结处以待提高其生物学活性 (待发表资料).

4 人 IL-6 双体分子 (IL6-IL6)

白介素 6 是一种作用广泛的细胞因子, 对 T, B 细胞及造血细胞都有刺激作用. 大肠杆菌表达的人重组 IL-6, 经 S-Sepharose Fast Flow 分离可得到两个峰, 鉴定后得知其中一

个峰值为单体 IL-6, 另一个则为双体 IL-6. 双体 IL-6 能与 IL-6 受体结合, 而且与受体结合亲和力高于天然的单体 IL-6.

如果在含有 IL-6 受体的细胞株中先加入双体 IL-6, 再加入高至 70 倍浓度的天然单体 IL-6 也不能竞争抑制双体 IL-6 与受体的结合. 但双体 IL-6 与单体 IL-6 在生物学活性方面差别并不大, 这一研究的意义还有待于进一步证实^[10]. 本室在现有的工作基础上, 成功地高效表达了人双体 IL-3 嵌合分子, 初步的活性结果表明, 双体 IL-3 对人骨髓细胞的集落刺激作用高于单体 IL-3 的作用. 这为开发新的高效造血因子提供了基础.

5 结 语

现有证据表明, 当细胞因子的嵌合分子做为一个单独的配体分子形式与受体结合时, 它可引起两个受体分子发生交联, 而受体分子形成同源双体或异源双体这对穿膜区的信号传导是非常重要的^[11]. 因此, 融合分子通过受体交联而引起一系列的生物学效应, 但这种效应的发挥与融合分子是否能形成各自正常的空间结构是紧密相关的. 如果两种细胞因子肽链之间发生相互作用而折叠在一起, 不能形成其天然的空间构型, 则将影响融合分子与受体的结合, 从而影响其生物学活性的发挥.

近几年来, 细胞因子在临床上得到了越来越

广泛的应用, 在肿瘤、感染、造血障碍等疾病中收到了良好的疗效. 因为机体很多功能是由细胞因子共同作用、共同协调的, 因此开发的新一代细胞因子融合分子可能更高效地发挥其药理学作用, 为临床疾病治疗提供新的有效药物, 同时为细胞因子与受体间的相互作用机制、细胞因子结构与功能间的关系等方面的研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Kiyokawa T, Wihams D P, Snider C *et al.* Protein Engineering, 1991; 4 (4): 463
- 2 Lee-Fong L, Murphy J R. Protein Engineering, 1991; 4 (8): 989
- 3 Aulio P, Alcamì J, Popoff M R *et al.* EMBO J, 1992; 11 (2): 575
- 4 Zwirner J, Weissenhorn W, Karlsson L *et al.* J Immunol, 1992; 148 (1): 272
- 5 智 刚, 候云德, 张德震等. 生物化学杂志, 1991; 7 (1): 89
- 6 Seno M, Hinuma S, Onda H *et al.* FEBS Lett, 1986; 199 (2): 187
- 7 Benson M, Hinuma S, Onda H *et al.* PNAS, 1991; 88: 5809
- 8 Kitamura T, Sato N, Arai K *et al.* Cell, 1991; 66: 1165
- 9 马大龙, 狄春辉, 庞 建等. 高技术通讯, 1991; 11: 26
- 10 Wijdenes J, Clement C, Klein B *et al.* Molec Immun, 1991; 28 (11): 1183
- 11 Kruse N, Tong H-P, Sebald W. EMBO J, 1992; 11 (9): 3237

vWF 的结构与功能

钱丽清 龚国胜* 吴圣楣

(上海儿科医学研究所, 上海 200092)

摘要 vWF 是体内一种分子量很大的糖蛋白, 其功能单位是 vWF 单体, 能与 Gp I b, Gp II b-III a, 胶原, FVIII 和肝素等结合而参与凝血与止血, 其缺陷将引起血管性假血友病.

关键词 vWF, 结构, 功能

Current Researches on Recombinant Fusion Proteins Comprising Dimeric Cytokines. Liu Jie, Ma Dalong. (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 194

Cytokines play an important role in the immune regulation. Among the different cytokines, there can be either synergy or suppression effects. Based on the network effects of the cytokines, researchers have designed and constructed by genetic engineering and protein engineering techniques some novel cytokines comprising dimeric cytokine proteins, which exhibited multiple bioactivities. Such molecules could be used for the researches on the immune regulation as well as the clinical applications.

Key words cytokine, protein engineering, fusion protein

The Structure and Function of vWF. Gong Qian Liqing, Guosheng, Wu Shengmei. (*Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 196

von Willebrand factor (vWF) is a high molecular weight multimeric glycoprotein and is absent or abnormal in von Willebrand disease (vWD). The essential information for its function resides in the monomer. vWF participates in thrombosis and haemostasis through interacting with Gp I b, Gp II b-III a, collagen, FVIII and heparin.

Key words vWF, function, domain

The Contractile Proteins and Regulatory Mechanism of the Crustacean Striated Muscle. Chen Ming, Zhong Yongmei. (*Shanghai Insti-*

tute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 200

Myofilament arrangement, contractile proteins, and Ca^{2+} -dependent regulatory mechanisms between the crustacean and vertebrate striated muscles are different. The ratios of the thick to thin myofilament of vertebrate striated, crustacean fast and slow muscles are 1 : 2, 1 : 3 and 1 : 6 respectively, as well as the myofilament arrangement also differ from one another. The molecular assembly of the crustacean thick myofilament composes of myosin and paramyosin are different from that of the vertebrate striated muscle. The thin myofilament comprises actin, tropomyosin, and troponin. The molecular weight of troponin T is relatively high, and troponin C has only single Ca^{2+} -binding site. The thin and thick myofilament regulatory mechanisms coexist in the crustacean striated muscle.

Key words striated muscle, myofilament arrangement, contractile proteins, thick myofilament regulation, thin myofilament regulation

The Past and Present of Investigation on Plant Actins. Liu Xiong, Yan Longfei. (*College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 203

Actin widely occurs in plant cells as an important cytoskeleton element. It is involved in many key cellular activities. The structure, function and properties of plant actin are described here.

Key words actin, plant microfilament, intracellular movement

Crystal Growth of Membrane Proteins. Zou