

人干扰素 α 2b-胸腺肽 α 1 融合基因在家蚕细胞中的表达和活性研究

郭冬生¹⁾ 朱成钢¹⁾ 张耀洲^{1)*} 吴祥甫²⁾

(¹⁾浙江大学生命科学院生物化学研究所, 杭州 310029; ²⁾中国科学院生物化学和细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 根据细胞因子协同作用的特点, 采用重组 DNA 技术构建了人干扰素 (IFN) α 2b-胸腺肽 (THY) α 1 融合基因, 克隆到 pBacPAK8 上, 获得重组转移载体 pBacPAK-IFN-THY. 与线形化 Bm-BacPAK6 病毒基因组 DNA 共转染家蚕细胞, 经过体内重组, 筛选到重组病毒 Bm-BacPAK-IFN-THY. 将 Bm-BacPAK-IFN-THY 感染家蚕细胞进行表达. DNA 印迹证明 IFN-THY 已插入 Bm-BacPAK6 中 (4 kb 左右的杂交带); SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、蛋白质印迹证明 IFN-THY 在家蚕细胞中得到了表达 (分子质量为 23 ku 左右), 且具有 IFN 蛋白的免疫原性; 微量细胞病变抑制法和玫瑰花结法显示 96 h 的表达产物 IFN 活性为 3.72×10^4 U/ml, 120 h 表达产物 IFN 活性为 3.10×10^5 U/ml, 48 ~ 72 h 表达产物 IFN 活性较低; 48 ~ 120 h 表达产物的玫瑰花结形成率均在 10% 以上. 结果表明融合基因在家蚕细胞中得到了高效表达, 表达的融合蛋白具有 IFN- α 2b 和 THY- α 1 的双重生物活性.

关键词 人 IFN- α 2b-THY- α 1 融合基因, 家蚕核型多角体病毒, 家蚕细胞, 基因表达

学科分类号 Q786

细胞因子在介导机体多种免疫反应, 如肿瘤免疫、移植免疫、自身免疫等过程中发挥重要作用, 细胞因子的作用具有多样性、网络性的特点, 它们不仅单独发挥生物学作用, 而且不同的细胞因子之间还有相互协同和制约作用. 近几年来利用细胞因子这一特点, 根据不同的抗感染或抗肿瘤的需要, 开展了细胞因子融合蛋白的研究^[1,2].

干扰素 (IFN) 是一类重要的抗病毒、抗肿瘤的治疗药物, 它们具有抗病毒活性、激活自然杀伤细胞、抑制肿瘤细胞增殖及免疫调节等作用, 其抗病毒活性最为公认^[3]. 目前 IFN- α 已被批准用于病毒性肝炎等多种疾病的治疗. 胸腺肽 (THY) 是一类具有促进 T 淋巴细胞分化、成熟和增强细胞免疫功能的多肽, 由 28 个氨基酸组成. 该活性多肽目前已广泛用于治疗免疫缺陷、肿瘤、病毒性肝炎和自身免疫等疾病^[4].

干扰素和胸腺肽具有相似和相辅相成的生物活性, 如免疫调节, 病毒性肝炎和肿瘤疾病的治疗等. 近几年人们对 IFN 和 THY 进行了联合应用研究, 研究证实, IFN 和 THY 的联合应用, 具有促进 T 细胞的生长、增殖、分化和激活 NK 细胞活性等功能, 并有协同作用, 可增强机体的免疫能力, 对肿瘤和艾滋病以及其他病毒性疾病的治疗作用比它们单独使用时更强^[5,6]. 但目前国内外对干扰素和胸腺肽都是单独生产, 临床上也都是单独给药, 两者的融合表达至今尚未见诸报道. 因此本文构建

了 IFN- α 2b 和 THY- α 1 融合基因, 用家蚕杆状病毒表达系统在家蚕细胞中进行了表达, 并对其生物活性进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 TG1、转移载体 pBacPAK8、家蚕核型多角体病毒 Bm-BacPAK6 和家蚕 (*Bombyx mori*) 细胞为本实验室保存, 质粒 Psk-IFN- α 2b 为中国科学院生物化学与细胞生物学研究所吴祥甫老师赠送.

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、PCR 试剂为 Roche 公司产品, 家蚕细胞培养液 TC $\times 100$ 、胎牛血清 FBS 购自 GIBICOL 公司. 多聚阳离子脂质体转染试剂购自 Boehringer mannheim 公司、兔抗人多克隆抗体购自 Chemicon 公司. 碱磷酶标记山羊抗兔 IgG 购自 Vector 公司. 人传代羊膜细胞 (WISH) 和滤泡性口膜炎病毒 (VSV) 由浙江大学生命科学院保存.

1.2 方法

1.2.1 融合基因 IFN- α 2b-THY- α 1 的构建与重组转移载体 pBacPAK-IFN- α 2b-THY- α 1 的构建: 根

* 通讯联系人.

Tel: 0571-86971414, E-mail: dshguo@zju.edu.cn

收稿日期: 2003-03-14, 接受日期: 2003-04-30

据 $\text{THY-}\alpha 1$ 的氨基酸序列, 我们根据真核生物偏爱的密码子设计了 THY1 和 THY2 两个片段, 其核苷酸序列分别为 THY1 5' GGCGGATCCG ACGCTGCTGT GGACACCTCT TCTGAAATCA CCACCAAGGA CC-TGAAGGAA AAGAAG 3', THY2 5' GGCCTCGAGT CAGCCGTTTT CAGCTTCTTC CACCACTTCC TTC-TTTTCCT TCAGGTCCTT GGTGGT 3'. THY1 引入 BamH I 酶切位点, THY2 引入 Xho I 酶切位点. 将 THY1 和 THY2 两个片段 1:1 混合, 加入 dNTP 和 Klenow 酶进行补平. 为了使 IFN-THY 融合蛋白具有正确的空间结构, 我们以 GGGGS 为连接肽使 IFN 和 THY 连接在一起. 根据 IFN 的基因序列以及连接肽的核苷酸序列, 我们设计了一对引物. IFNL1 5' GCCATATGTG CGATCTGCCT CAAACC 3', IFNL2 5' ATGGATCCAC CACCGCCTTC CTTACTT-CTT AAACCTTC 3'. IFNL2 含连接肽编码序列的互补序列. 以 IFNL1 和 IFNL2 为引物, Psk-IFN 为模板, PCR 扩增带有连接肽核苷酸序列的 IFN 基因序列 IFNL , 在其 5' 端和 3' 端分别引入 Nde I 和 BamH I 酶切位点. PCR 技术参照文献 [7] 进行. PCR 进行 35 个循环, 反应条件为 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 最后 72°C 保温 10 min. PCR 产物经低熔点琼脂糖纯化后, 用 Nde I 和 BamH I 双酶切, 克隆到 PET-28a (+) 的 Nde I 和 BamH I 位点中, 构建质粒 PET-IFNL . 用 BamH I 和 Xho I 双酶切 PET-IFNL , 并与事先经 BamH I 和 Xho I 双酶切的 THY 相连接, 构建含 IFN 和 THY 融合基因的 pET-IFN-THY . 将 pET-IFN-THY 先用 Nde I 酶切, 然后用 Klenow 酶补平, 再用 Xho I 酶切, 用低熔点胶回收 IFN-THY, 并与事先经 BamH I 酶切并用 Klenow 酶补平, 再用 Xho I 酶切的 pBacPAK8 相连接, 构建含 IFN 和 THY 融合基因的昆虫杆状病毒转移载体 pBacPAK-IFN-THY (图 1).

1.2.2 家蚕 (*Bombyx mori*) 细胞培养技术: 细胞培养、重组病毒的获得按文献 [8] 进行, 共转染试验按 Lipofectin 产品说明书进行.

1.2.3 重组病毒的 DNA 印迹 (Southern blot) 分析: 分别从被重组病毒 Bm-BacPAK-IFN-THY 、野生病毒 Bm-BacPAK6 感染的家蚕细胞及正常家蚕细胞中提取总 DNA, EcoR I 酶切过夜, 所得样品进行 1% 琼脂糖电泳 ($1 \sim 2 \text{ V/cm}$) 后, 经虹吸法转移到尼龙膜上. 用 PCR 法将 pBacPAK-IFN-THY 上的 IFN-THY 用放射性同位素 [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$] dATP 标记,

作为探针. 预杂交及杂交见文献 [9].

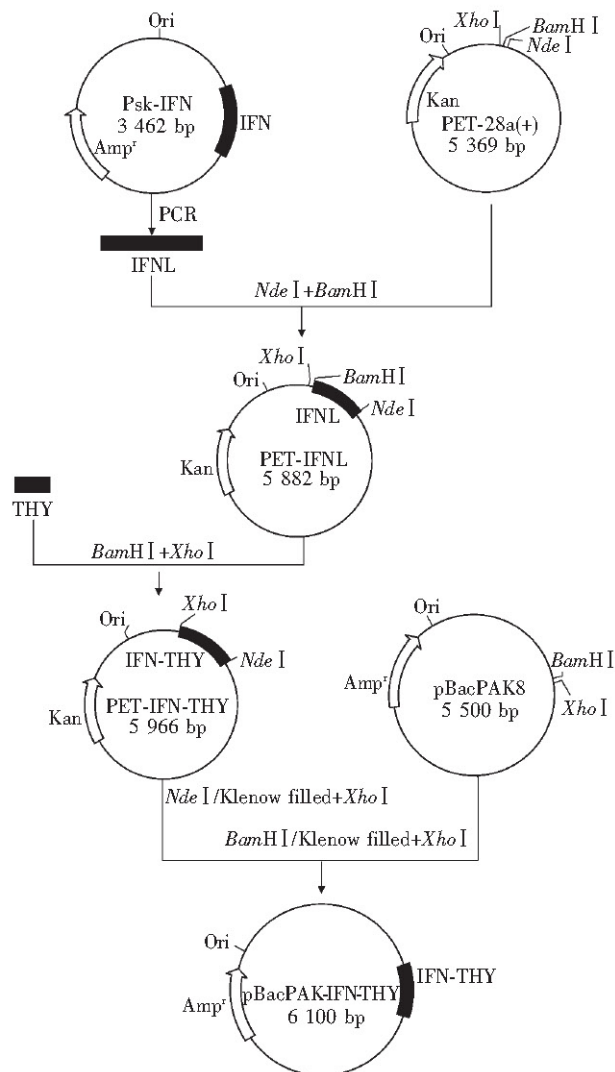


Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pBacPAK-IFN-THY

1.2.4 融合基因在家蚕细胞中的表达及表达样品的收集: 以感染复数 = 10 的剂量感染细胞 (2×10^6), 27°C 下培养 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 分批收集细胞沉淀, 用 PBS ($\text{pH } 7.4$) 悬浮细胞, 冰浴超声处理 2 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, -20°C 放置待用.

1.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白质印迹 (Western blot) 鉴定: 分别取 $30 \mu\text{g}$ 的 48 h、72 h、96 h、120 h 的表达产物和等量的阴性对照 (野生病毒的表达产物及正常家蚕细胞全蛋白) 进行 12% SDS-PAGE, 经电转法将其移到 NC 膜上, 进行杂交^[9]. 蛋白质分子质量标准

经丽春红染色. 一抗为兔抗人 IFN 多克隆抗体, 碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 作为二抗.

1.2.6 表达产物的活性测定: 表达产物中 IFN 的活性测定用微量细胞病变抑制法^[10], THY 的活性测定用 E-玫瑰花结法. 采集新鲜猪胸腺, 制备淋巴细胞悬液, 45℃ 温浴 1 h 脱 E-受体. 洗涤细胞调整细胞浓度至 10⁶ 个/ml, 分置于测试管中, 每管 0.2 ml, 加入 0.1 ml 稀释成不同浓度的表达产物, 37℃ 共培养 1 h, 将绵羊红细胞洗涤后调整细胞浓度至 10⁷ 个/ml, 每一测试管加 0.2 ml, 600 g 离心 2 min, 4℃ 放置过夜, 次日计数玫瑰花结形成率.

2 结 果

2.1 获得 pET-IFN-THY 和 pBacPAK-IFN-THY

PET-IFN-THY 被 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳中出现一条约 600 bp 的条带. pBacPAK-IFN-THY 的 PCR 产物也出现约 600 bp

的单一条带 (图 2), 与设计的融合基因大小一致. 证明 IFN-THY 已插入到 PET-28a (+) 和 pBacPAK8 中. 构建的融合基因序列分析同预期结果一致. 融合基因的 DNA 序列测定结果见图 3.

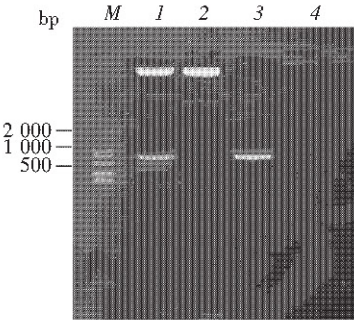


Fig. 2 Identification of pET-IFN-THY and pBacPAK-IFN-THY

M: DL2000 marker; 1: pET-IFN-THY /*Nde* I + *Xho* I; 2: PET-28a (+) /*Nde* I + *Xho* I; 3: PCR amplification of pBacPAK-IFN-THY; 4: PCR amplification of pBacPAK8.

ATG TGC GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA
CAG ATG CGT AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC
CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG
ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC
CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG
ATA CAG GGG GTG GGG TGT ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG
AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC
TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA
AGT TTA AGA AGT AAG GAA GGC GGT GGT GGA TCC GAC GCT GCT GTG GAC ACC TCT TCT GAA
ATC ACC ACC AAG GAC CTG AAG GAA AAG AAG GAA GTG GTG GAA GAA GCT GAA AAC GGC TGA

Fig. 3 Sequence of human IFNα2b/THYσ1 fusion gene

2.2 重组病毒的获得

将质粒 pBacPAK-IFN-THY 共转染到 Bm-BacPAK6 中, 经过三轮的挑斑、96 孔板筛选后, 提取被感染细胞的总 DNA. DNA 印迹 (图 4) 显

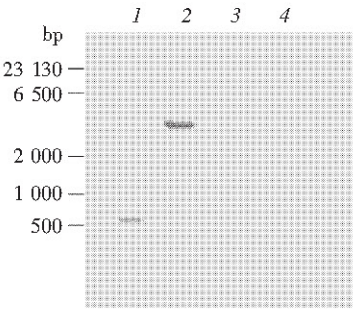


Fig. 4 Southern blot analysis of Bm-BacPAK-IFN-THY
1: PCR amplification of IFN-THY from pBacPAK-IFN-THY (hundredfold dilution); 2: BmNPV-IFN-THY/*Eco*RI; 3: wild BmNPV/*Eco*RI; 4: Genomic DNA of wild BmN cells/*Eco*RI.

示, 只有发生了交换重组的病毒 DNA 杂交到 4 kb 左右单一条带, 与预期结果一致, 阳性对照 pBacPAK-IFN-THY 的 PCR 产物有 600 bp 左右的单一杂交带, 而阴性对照野生型病毒和正常细胞基因组 DNA 没有杂交带. 证明 IFN-THY 已整合到 BmNPV 上.

2.3 IFN 与 THY 融合蛋白在家蚕细胞中的表达

表达产物经 SDS-PAGE 检测, 显示有 23 ku 左右的表达蛋白带 (图 5a). 蛋白质印迹 (图 5b) 显示重组病毒的表达样品在 23 ku 的相应位置有阳性显色带, 与预期结果一致, 而阴性对照野生病毒的表达样品及正常家蚕细胞全蛋白中则没有, 说明我们所表达的蛋白质具有 IFN 蛋白的免疫原性. 以上结果表明 IFN-THY 基因已在家蚕细胞中得到表达.

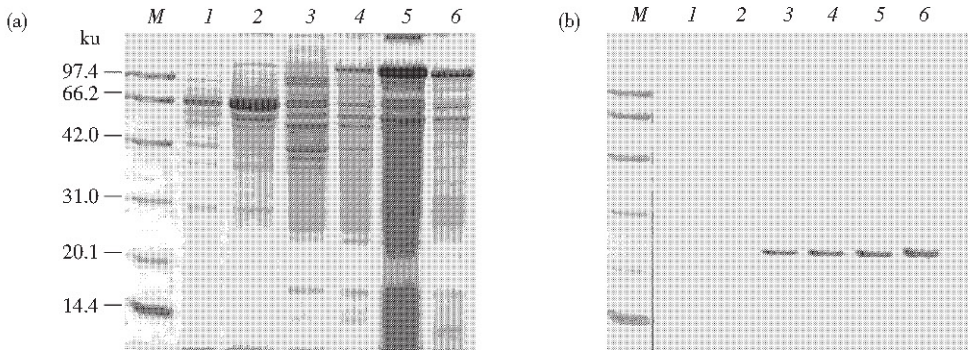


Fig. 5 SDS-PAGE (a) and Western blot (b) analysis of IFN-THY fusion protein expressed in BmN cells
M: protein molecular mass marker; I: BmN cell total protein; 2: BmN cell total protein infected with wild BmNPV; 3~6: BmN cell total protein infected with BmNPV-IFN-THY (48 h, 72 h, 96 h, 120 h).

2.4 IFN-THY 的生物活性检测

2.4.1 IFN 的抗病毒生物活性测定: IFN-THY 中 IFN 的活性测定用微量细胞病变抑制法, 图 6 显示, 96 h 表达样品 IFN 活性为 3.72×10^4 U/ml, 120 h 表达样品 IFN 活性为 3.10×10^5 U/ml, 而 48~72 h 表达样品活性较低. 结果表明, 表达产物具有 IFN 生物活性.

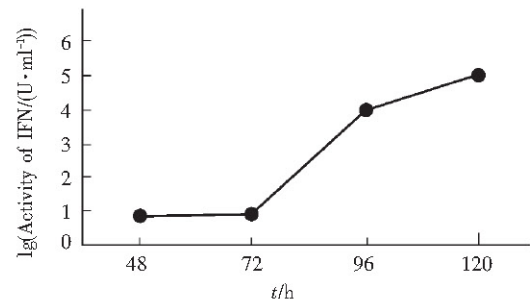


Fig. 6 The IFN activity in BmN cells infected by Bm-BacIFN-THY

2.4.2 THY 的活性测定: IFN-THY 中 THY 的活性用玫瑰花结法测定(图7). 结果发现: 与对照

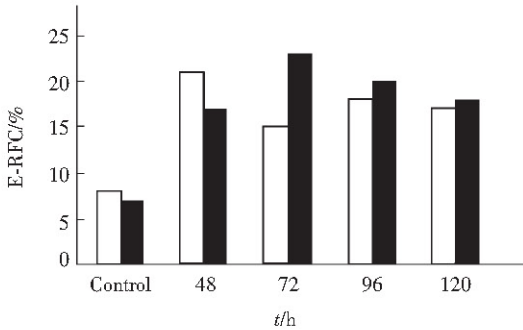


Fig. 7 E-RFC of THY in BmN cells infected by Bm-Bac-IFN-THY
□: physiological saline, ■: BmN cell infected with wild BmNPV.

组相比, 表达样品提高了玫瑰花结形成率, 48~120 h 表达产物的玫瑰花结形成率均在 10% 以上, 即表明表达产物均有胸腺肽活性.

3 讨 论

本文报道 IFN 和 THY 的融合表达. 在构建 IFN-THY 融合基因时, 为使表达后两种蛋白质的空间构象尽量与天然产物相近, 并使其生物活性达到最高, 从结构上应符合以下要求: a. 核苷酸序列分析两者在框架内的融合; b. 两者间用富含疏水性氨基酸的接头连接. 本研究中, 我们设计了编码 5 个疏水性和低电荷效应的氨基酸序列 (GGGGS) 作为接头, 因为甘氨酸结构简单, 不易形成折叠, 对融合蛋白的立体构象影响较小.

与其他系统相比, 昆虫杆状病毒表达系统是一种高效的真核表达系统, 其特点是表达量高、重组蛋白多为可溶性蛋白, 而且对表达出的外源蛋白能够进行正确的蛋白质翻译后加工和糖基化修饰使其具有生物活性^[8]. 本文用昆虫杆状病毒表达系统表达了 IFN-THY 融合蛋白. 以上各项实验证实重组蛋白具有与两种天然蛋白同样的生物学活性, 表明我们已成功地在家蚕细胞中获得了有活性的 IFN-THY 高表达. 这为今后在真核水平上探讨融合蛋白 IFN-THY 的性质并应用于临床打下了基础.

近些年开展了一些以 IFN 为基础的融合蛋白的研究. Le 等^[11] 1988 年构建了 IFN α 2-delta4 和 IFN α 1 的融合蛋白, Eshhar 等^[12] 1997 年构建了 IFN 和 ScFv 的融合蛋白, 这些研究体现了以 IFN 为基础的融合蛋白在治疗方面的研究进展. 本研究将 IFN 和 THY 的融合基因在家蚕细胞中表达, 这

种全新的策略与传统的生产干扰素和胸腺肽的方法相比具有明显的优势。目前干扰素和胸腺肽都是单独生产, 干扰素主要用基因工程的方法生产。而 $\text{THY}\alpha 1$ 由于在动物的胸腺肽中含量极低, 仅为 0.56% ~ 1.0% 之间, 其分子质量又小, 因此很难用基因工程的方法生产, 故目前 $\text{THY}\alpha 1$ 的产品都用多肽合成来进行制备。这些传统技术生产的干扰素和胸腺肽只具有单一的生物活性, 其应用范围具有相对的局限性, 而用家蚕细胞表达的 IFN-THY 融合蛋白具有两者的双重生物活性, 120 h 表达样品 IFN 活性高达 3.10×10^5 U/ml, 48 ~ 120 h 表达产物的玫瑰花结形成率均在 10% 以上。至于本研究的表达样品对肿瘤、病毒有多大的抑制作用, 比 IFN 和 THY 单独作用时的治疗效果能增强多少, 还有待进一步的实验研究, 目前, 动物疾病模型试验正在进行中。综上所述, 本研究设计的在家蚕细胞中表达 IFN-THY 融合基因不但使生产过程和应用过程合二为一, 而且也可充分发挥这两种细胞因子的协同作用, 使之对肿瘤、艾滋病及其他病毒性疾病有更好的治疗效果。IFN-THY 融合基因的研究为开发多功能细胞因子, 更有效地发挥其药理作用, 同时也为研究细胞因子与受体间的相互作用机制、细胞因子结构与功能的关系打下了基础, 有关 IFN-THY 融合蛋白的功能及其在疾病治疗上的应用价值正在进一步研究中。

参 考 文 献

- 1 Curtis B M, Williams D E, Broxmeyer H E, *et al.* Hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (13): 5809 ~ 5813
- 2 Klimka A, Barth S, Drillich S, *et al.* A deletion mutant of Pseudomonas exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9 (rhIL-9-ETA) shows specific cytotoxicity against IL-9-receptor-expressing cell lines. *Cytokines Mol Ther*, 1996, **2** (3): 137 ~ 146
- 3 Laura R, Lawrence P, Malte L, *et al.* Differences in activity between α and β type I interferons explored by mutational analysis. *J Biol Chem*, 1998, **273** (14): 8003 ~ 8008
- 4 Franco F J, Diaz C, Barcia M, *et al.* Thymosin alpha 1 is a native peptide in several tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1120** (1): 43 ~ 48
- 5 Yuen M F, Lai C L. Treatment of chronic hepatitis B. *The Lancet Infectious Diseases*, 2001, **1** (4): 232 ~ 241
- 6 Garaci E, Pica F, Rasi G, *et al.* Thymosin alpha 1 in the treatment of cancer: from basic research to clinic. *International Journal of Immunopharmacology*, 2000, **22** (12): 1067 ~ 1076
- 7 Griffin H, Griffin A M. PCR Technology Current Innovation. Boca Raton: CRC Press, 1994. 5 ~ 12
- 8 Summer M D, Smith G E. A Manual of Methods for Baculovirus Vector and Insect Culture Procedures. Texas: Texas Agricultural Experimental Station and Texas A&M University College Station, 1987. 1 ~ 56
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 474 ~ 898
- 10 Stewart W E. The Interferon System. Heidelberg: Springer-Verlag Press, 1979. 13 ~ 25
- 11 Le H V, Syto R, Schwartz J, *et al.* Purification and properties of a novel recombinant human hybrid interferon delta-4 alpha 2/alpha 1. *Biochim Biophys Acta*, 1988, **957** (1): 143 ~ 151
- 12 Eshhar Z. Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immuno Immunother*, 1997, **45** (3): 131 ~ 136

Expression of Human IFN α 2b-THY α 1 Fused Gene in *Bombyx mori* Cell and Study of Its Bioactivity

GUO Dong-Sheng¹⁾, ZHU Cheng-Gang¹⁾, ZHANG Yao-Zhou^{1)*}, WU Xiang-Fu²⁾

¹⁾ Institute of Biochemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

²⁾ Institute of Biochemistry and Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract The baculovirus shuttle vector, pBacPAK-IFN-THY was constructed which contains the genes of IFN- $\alpha 2b$ and THY- $\alpha 1$. Constructed vector was coinfecting with linear Bm-BacPAK6 DNA into BmN cells. The recombinant virus was screened and plaque-purified. The BmN cells were infected with the recombinant virus. The results showed that the protein was successfully prepared and its bioactivities were testified by WISH-VSV system and E-RFC. Results indicated that the expressed fusion protein have bioactivities of both IFN- $\alpha 2b$ and THY- $\alpha 1$.

Key words IFN α 2b - THY α 1 fused gene, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmN cells, gene expression

* Corresponding author. Tel: 86-571-86971414, E-mail: dshguo@zju.edu.cn

Received: March 14, 2003 Accepted: April 30, 2003