论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1362-03

免疫毒素 IL-3-PE38KDEL的表达及活性测定

沈 燕,陈 妤,娄世锋
(重庆医科大学附属第二医院血液科,重庆 400010)

【摘 要】目的:制备具有杀伤活性的新型抗白血病免疫毒素。方法:在异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(Isopropyl-beta-D-throgalactop yranoside,IPTG)的诱导下,高效表达免疫毒素IL3-PE38KDEL,采用细胞毒性实验,对毒素活性进行检测。结果:免疫毒素IL3-PE38KDEL以包涵体形式为主高效表达,该蛋白具有较好的毒素活性。结论:免疫毒素IL3-PE38KDEL具有良好的生物学活性,为其作为抗白血病药物的进一步研究打下了基础。

【关键词】白介素3;假单胞菌外毒素;免疫毒素
【中国图书分类法分类号】R686.1;R684 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-11

Expression and activity detection of IL3-PE38KDEL

SHEN Yan, et al
(*Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare a new type of anti-leukemia immunotoxin with killing activity. *Methods*: The method of cytotoxicity was used to study the activity of the immunotoxin after the induction of IPTG. *Results*: The expressed fusion proteins were detected mostly as inclusion bodies at high level. The result showed IL3-PE38KDEL had liable activity of toxicity. *Conclusion*: The fusion protein IL3-PE38KDEL has good biological activity, which paves way for the further study on its treatment of leukemia.

【Key words】Human interleukin-3; Pseudomonas exotoxin(PE38KDEL); Immunotoxin

作者介绍:沈 燕(1981-),女,硕士,
研究方向:白血病。
通讯作者:娄世锋,男,教授,E-mail:loushifeng@hotmail.com。

参 考 文 献

[1] Blom T,Franzen A,Heinegard D,et al. Comment on "The influence of the proinflammatory cytokine,osteopontin,on autoimmune demyelinating disease"[J]. Science,2003,299(5614):1845.

[2] Ashkar S,Weber G F,Panoutsakopoulou V,et al. Eta-1(osteopontin):an early component of type-1 (cell-mediated) immunity[J]. Science,2000,287(5454):860-864.

[3] Ophascharoensuk V,Giachelli C M,Gordon K,et al. Obstructive uropathy in the mouse:role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis[J]. Kidney Int,1999,56(2):571-580.

[4] 刘冠贤,邓安国,刘建社.狼疮肾炎患者尿蛋白通过p38丝裂素活化蛋白激酶信号途径刺激近端肾小管上皮细胞上调表达骨调素[J].中华肾脏病杂志,2005,21(6):351-355.

[5] Tan E M,Cohen A S,Fries J F,et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,1982,25(11):1271-1277.

[6] 臧敬五. 自身免疫性疾病研究的新进展——骨桥蛋白在类风湿关节炎中的病理机制研究[J].中国科学院刊,2005,20(3):208-210.

[7] Chabas D,Baranzini S E,Mitchell D,et al. The influence of the proinflammatory cytokine,osteopontin,on autoimmune demyelinating disease[J]. Science,2001,294(5547):1731-1735.

[8] Aringer M,Smolen JS.Tumor necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus:a rationale for therapeutic intervention[J]. Lupus,2004,13(5):344-347.

[9] 钟 清,甘 华,肖 刚.特异性COX-2抑制剂对小鼠狼疮性肾炎CD14+表达及TNF-α,IL-6的影响[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(1):71-74.

[10] Wong C K,Lit L C,Tam L S,et al. Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Rheumatology,2005,44(5):602-606.

[11] 李 龙,陈运芬,陈永雄,等.骨桥蛋白在狼疮性肾炎患者肾小管间质损伤中的作用[J]. 贵州医药,2002,26(5):390-391.

[12] Ohshima S,Yamaguchi N,Nishioka K,et al. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints[J]. J Rheumatol,2002,29(10):2061-2067.

(责任编辑:关蕴良)

人白细胞介素3(Interleukin3,IL3)是由131个氨基酸组成的多肽,它通过相应细胞表面的IL3受体(IL3 Receptor,IL3R)发挥生物学效应。近来研究表明IL3受体在急性髓性白血病的白细胞干/祖细胞表面表达,而且细胞实验也证实了多数急性髓性白血病(Acute myelocytic leukemia,AML)细胞能表达IL3R并对外源性的IL3有反应,而在正常的造血干细胞并不表达该受体,为此IL3R成为了选择性治疗AML的新靶点[1]。

我科在免疫毒素的研究方面已取得了一定的进展,在此基础上,本实验旨在应用本室制备的免疫毒素IL3-PE38KDEL原核表达载体,研究在IL3导向下,携带毒素蛋白对白血病靶向治疗的可能性,探索白血病治疗的新途径。

1 材料与方法

1.1 免疫毒素IL3-PE38KDEL的高效表达

1.1.1质粒与菌株 质粒PQE30-IL3-PE38KDEL为本室构建的含有IL3基因及假单胞菌外毒素基因片段 (PE38KDEL)的原核表达质粒,其中IL3基因序列在前,假单胞菌外毒素基因序列在后,两者之间为连接肽基因序列。经Takara公司测序证实,基因序列及读码框架正确。质粒PQE30,PQE30-IL3,大肠杆菌SG13009为我室保存。

1.1.2重组质粒PQE30-IL3-PE38KDEL的诱导表达,包涵体形裂解及蛋白复性 将重组质粒PQE30-IL3-PE38KDEL转化感受态大肠杆菌SG13009,挑选单克隆,在含有100 mg/L青霉素,35 mg /L氯霉素的LB培养液中37℃活化,1:20接种至含相同抗生素浓度的LB培养液中继续培养至A_{600}约为0.4时,加入异丙基硫代-B-D一半乳糖苷至终浓度1 mmol/L,诱导6 h后收集菌体,冰浴超声波碎细菌、离心、分离包涵体,并保留上清液,包涵体反复洗涤后,8 mol/L尿素溶解,收集上清,经镍亲合层析柱纯化蛋白,依次以6 mmol/L、4 mmol/L、2 mmol/L、0 mmol/L的尿素溶液透析复性蛋白。

1.1.3 SDS-聚丙烯胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polya crylamide gelelectrophoresis,SDS-PAGE) 分析各阶段产物及其纯度。

1.2 免疫毒素PQE30-IL3-PE38KDEL的细胞毒活性测试

1.2.1 细胞株 人急性髓性白血病细胞株TF-1,人红白血病细胞株K562购自四川大学华西移植免疫中心。

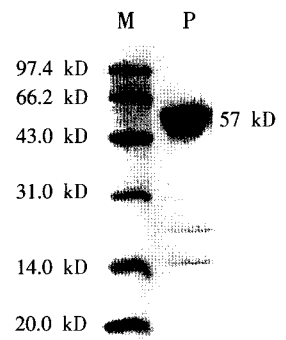
1.2.2 细胞毒实验检测毒素活性 将生长良好的TF-1细胞,按1×10^5 mol/L浓度接种于96孔培养板中37℃, 培养36 h,加入倍比稀释的免疫毒素,再培养48 h,24 h及48 h后观察细胞形态,48 h后每孔加入50 μl MTT(5 mg/ml),于37℃培养10 h,弃去反应混合液,加入150 μl二甲基亚砜,震洗10 min,测定OD_{560}值,检测中同时设立IL3组及空白对照组。细胞生存率(%)=试验细胞组OD_{560}值/对照细胞组OD_{560}值×100%

1.2.3免疫毒素IL3-PE38KDEL的杀伤特异性 为确定免疫毒素IL3-PE38KDEL的细胞杀伤特异性,选择人红白血病细胞株K562作为阴性对照,方法及步骤同前。

2 结 果

1.1 表达产物免疫毒素IL3-PE38KDEL的SDS-PAGE分析

PQE30-IL3-PE38KDEL转化大肠杆菌SG13009后,经IPTG诱导后,免疫毒素蛋白IL3-PE38KDEL主要以包涵体形式表达,上清液中融合蛋白量很少,SDS-PAGE电泳可见在分子量57kD处出现了新的蛋白,表达量占全菌的20%,包涵体溶解后纯度达85%,利用尿素溶液浓度梯度透析复性的方法, 复性后,融合蛋白回收率在90%以上(见图1)。



M. 蛋白质 marker,P. 融合蛋白 IL3-PE38KDEL

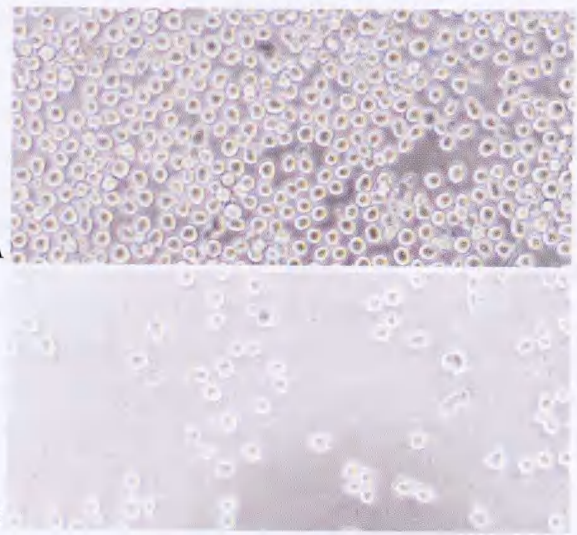
图 1 免疫毒素的 SDS-PAGE 鉴定

2.2 融合蛋白IL3-PE38KDEL的活性检测

对相同剂量的毒素蛋白,TF-1细胞很敏感,作用24 h后细胞溶解,胞浆中细胞碎片堆积,大部分细胞死亡,48 h后已不见细胞形态(见图2),加入IL3的对照组,TF-1细胞基本正常,图3为根据的细胞生存率绘制的杀伤曲线,由曲线可知随着免疫毒素剂量增加,TF-1细胞几乎完全死亡,而对K562细胞无明显杀伤作用,IL-3本身也对细胞生长无明显影响。

3 讨 论

免疫毒素(Immunotoxin,IT)是用化学方法或基因工程方法将肿瘤选择性配体与经修饰的多肽毒素共价连接而成的抗肿瘤制剂。通过与肿瘤细胞表面受体或抗原相结合后内化,继而在胞内抑制蛋白质合成,导致肿瘤细胞死亡。近年来急性髓性白血病AML的白血病的治疗主要是骨髓干细胞移植和大剂量化疗,虽然明显改善了AML预后,但由于标准的治疗措施对白血病细胞选择性低,常导致明显



A. 加入免疫毒素前的 TF-1 细胞;B. 免疫毒素作用 24 h 后的 TF-1 细胞

图 2 免疫毒素作用后的细胞形态

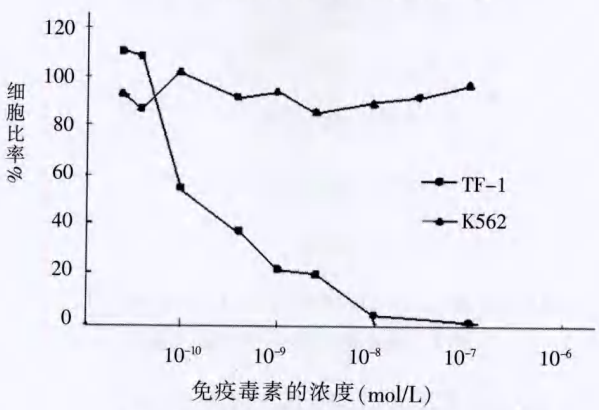


图 3 免疫毒素的特异性杀伤作用

毒副作用并增加治疗相关死亡率。假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin,PE)为单链蛋白,将PE的Ⅰa区、部分Ⅰb区去掉并将PE的C端氨基酸REDLK变为KDEL即可得到PE38KDEL, 可以减小分子量,极大的提高其跨膜能力和结合活性,从而增强所构免疫毒素的杀伤力[2,3]。近年来,用PE与单克隆抗体或细胞因子融合成免疫毒素治疗肿瘤的研究逐渐增多[4]。将粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor,G-CSF)与PE40构成免疫毒素G-CSF-PE40,对表达G-CSF受体的白血病细胞有高度选择性杀伤作用,而对正常造血影响很小。此外,IL-6-PE40、抗Tac(F_V)-PE40近来还被成功应用于移植物肿瘤细胞净化处理[5]。

现已证明,急性髓性白血病的干/祖细胞表型为$CD34^+$、$CD38^-$、$CD71^-$、$HLA\text{-}DR^-$、$CD90^-$、$CD117^-$、$CD123^+$,CD123即为白细胞介素3受体 (IL-3R) 的编码蛋白,在正常造血早期细胞中可以表达该受体,但正常造血干细胞并不表达,所以IL-3受体被认为是AML干细胞的相对特异性标志,IL3R与IL3结合后能迅速内化到细胞浆,故利用IL3携带生物毒素杀伤白血病干细胞就成为很有希望的治疗办法。1996年,Chunghuang chan等构建了重组毒素IL-3-DT390,并经进一步的细胞和动物实验证明了IL-3-DT390对AML的选择性杀伤作用[6]。但白喉毒素DT的治疗剂量与中毒剂量非常接近,且人群中因预防免疫常有DT抗体而影响其临床应用。PE38KDEL与DT的杀伤细胞机制类似,但对某些细胞如A431、KB及MCF7细胞株,PE38KDEL的毒性更强, 且PE38KDEL在人体的耐受剂量较大,治疗剂量空间更大。

本研究中,由IL-3引导下的免疫毒素IL3-PE38KDEL能特异性杀伤表达IL3的细胞株TF-1,且随着免疫毒素的浓度增高,杀伤率增加,在10^{-9} mmol/L水平即有良好杀伤作用,而对不表达IL-3的K562细胞株无明显杀伤作用,说明IL3-PE38KDEL具有良好的杀伤特异性。

本实验表达的IL3-PE38KDEL蛋白具有毒性强,选择性好的特点,为白血病导向治疗奠定了基础,今后的工作中,还需经动物实验进一步验证该免疫毒素体内应用价值,我们相信免疫毒素IL3-PE38KDEL将有良好的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Monica L,Guzman,Sarah J,et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells[J]. Blood,2001,98:2301-2307.

[2] 崔京霞,纪剑飞,倪剑锋,等.重组铜绿假单胞菌外毒素PE38KDEL的克隆、表达与活性检测[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(12):985-990.

[3] 胡川闽,郭建秀,李 鹏.抗肝癌单链免疫毒素HAb 25(scFv)-PE40的构建及其导向作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(22):2209-2212.

[4] 吴 瑕,张 林,李 虹,等.IL18-PE38融合基因真核表达载体的构建及其在软骨细胞中的表达[J]. 四川大学学报,2005,36(4):456-459.

[5] Janenda K,Batra,David J,et al. Single -Chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing pseudomonas exotoxin A or diphtheria toxin:Anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-Anti-TFR(Fv)[J]. Molecular And Cellular Biology,1991,11:2200-2205.

[6] Chan C H,Blazar B R,Greenfield L,et al. Reactivity of murine cytokine fusion toxin,diphtheria toxin390 -murine interleukin -3 (DT390-mIL-3),with bone marrow progenitor cells[J]. Blood,1996,88:1445-1456.

(责任编辑:冉明会)