DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.08.013
第26卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 8
690 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)08-0690-04

新型重组毒素 hIL15M/TNFαM 的构建、表达与活性测定

刘 芳[1], 丁蕾[2], 毛晓华[2] ([1]青海医学院生物化学教研室,西宁 810001;[2]东南大学基础医学院生物化学及生物发育学系,南京 210009)

提 要:目的 构建、表达 hIL15M/TNFαM 融合毒素,为研制可消除 hIL15 受体高表达细胞的特异性导向药物奠定基础。方法 人白介素15突变体(hIL15M)对靶细胞不具有激动作用,将该突变体与TNFα突变体(TNFαM)编码基因直接融合克隆至 pET 表达载体,并纯化出融合蛋白 hIL15M/TNFαM,MTT 法测定该蛋白的细胞毒活性。结果 SDS-PAGE 分析表明,重组菌株诱导后可以表达出 30×10^3 与预期大小一致的特异蛋白带。纯化的 hIL15M/TNFαM 对 PHA 激活的T细胞的杀伤作用是静止性T细胞的13倍。结论 hIL15M/TNFαM 融合蛋白对高表达 hIL15 受体的细胞具有较强的杀伤性作用,提示其对由活化的异常T细胞增多所致的疾病具有潜在的治疗作用。

关键词:人白介素15突变体(hIL15M);TNFα突变体(TNFαM);融合;表达
中图法分类号:R977.6;Q503 文献标识码:A

Construction expression and activity evaluation of a novel fusion toxin hIL15M/TNFαM

LIU Fang[1], DING-Lei[2], MAO Xiao-hua[2] ([1]Department of Biochemistry, Qinghai Medical College, Xining 210009, Qinghai Province, China; [2]Department of Biochemistry and Auxology, Medical College of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China)

Abstract: Objective To construct and express fusion toxin human IL15 mutant/TNFα mutant (hIL15M/TNFαM) in order to develop a targeted toxin capable of eliminating abnormal cells expressing high levels of hIL15 receptors. Methods DNA fragments of truncated hIL15M and TNFαM coding gene were joined in frame and cloned into T7 expression vector pET16b. The expressed fusion protein was purified from *E. coli*. Cytotoxicity of hIL15M/TNFαM was measured by MTT assay. Results *E. coli* transformed with the recombinant plasmid expressed an extra band with the expected size of 30×10^3. MTT assay indicated that PHA-activated T cells were 13 times more sensitive to the cytotoxic effect of hIL15M/TNFαM than to the resting T cells. Conclusion hIL15M/TNFαM has high toxic effect against cells expressing high levels of IL15 receptors, suggesting that hIL15M/TNFαM has potential therapeutic effect on T cell leukemia and other diseases related with improperly activated T cells.

Key words: human interleukin 15 mutant; tumor necrosis factor alpha mutant; protein fusion; expression

人白介素15(human interleukin 15, hIL15)属4α螺旋细胞因子家族,能刺激T、B、NK细胞的增殖,是参与机体天然免疫的主要成员之一。hIL15通过IL2Rβ和γ链完成信号转导,由此它的一部分功能与IL2相似。但hIL15有其自身高亲和力的特异性受体IL15Rα,hIL15与IL15Rα的亲和力是IL2与IL2Rα的1 000倍。hIL15与受体的结合决定于受体三聚体中的α链,即IL15Rα链是与hIL15结合的充分及必要条件[1,2]。

hIL15与多种疾病的发生发展有关,如自身免疫及炎症性疾病、结节病、多发性骨髓瘤、HTLV-1介导的T淋巴细胞性白血病、免疫排斥等。它们共同的致病机制是表达IL15受体的活化异常T淋巴细胞增多,hIL15可作为它们的生长因子并起趋化作用。因此杀伤这种异常增多的T淋巴细胞成为治疗上述疾病的思路之一[1]。我们以对靶细胞不具有激动作用的hIL15突变体(hIL15M)为载体、TNFαM为弹头,构建一种靶向于富含hIL15受体细胞的分子导向药物hIL15M/TNFαM。本研究该融合蛋白的表达、纯化及活性测定的初步结果。

1 材料与方法

1.1 酶和试剂

限制性内切酶,T_4 噬菌体DNA连接酶购自大连宝生物工程公司。Ni-NTA购自Qiagen公司。

1.2 质粒和菌株

E. coli JM83和BL21(DE3)plysS本室保存。pUC9 *Nde*Ⅰ由pUC9改造而来,其多克隆位点含 *Nde*Ⅰ 编码序列。质粒 pUC9 *Nde*Ⅰ-hIL15含有hIL15完整的编码序列,质粒 pUC18-TNFαM 含有删去了TNFαN端7个氨基酸的TNFα突变体DNA序列,据文

作者简介:刘 芳(1972-),女,山西省兴县人,硕士,讲师,主要从事基因工程方面的研究。电话:(0971)6175632

收稿日期:2003-08-18;修回日期:2003-10-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

献[3]报道这种突变体的细胞毒性强于野生型 TNFα。

1.3　DNA 操作

DNA 提取、酶切、电泳、回收、纯化按本室常规方法进行。DNA 测序由大连宝生物工程公司完成。

1.4　PCR 扩增 IL-15 突变体

上游引物为 5′-CTCTCTCATATGTTGAAAAAAATTGAAGATCT-3′, 5′端含 *Nde*Ⅰ位点及保护性硷基, 其余与 hIL15 成熟肽第 9 至 15 个氨基酸编码序列一致。下游引物为 5′-CTGAATTCAGAAGTGTTGATGAACATTT-3′, 5′端含 *Eco*RⅠ位点。PCR 反应按常规方法进行。初始 5 个循环的复性温度为 54 ℃, 随后升至 66 ℃继续循环 25 次。

1.5　hIL15M-TNFαM 融合蛋白的表达检测

携带重组表达质粒 pET-hIL15M-TNFαM 的大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 在 M9-CAA-Amp 培养基中培养至 D_{600} 为 0.5, 留取 1 ml 菌液作对照, 其余加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 1、2、3 h, 收集菌液行 SDS-PAGE。

1.6　hIL15M/TNFαM 融合蛋白的纯化

取诱导表达 2 h 的重组菌株培养液 500 ml, 离心收集菌体重悬于 15 ml 的 M 缓冲液(100 mmol/L NaH_2PO_4、10 mmol/L Tris-Cl、8 mol/L urea、10 mmol/L β-ME、0.1% Triton-X100、10 mmol/L Imidazole), 超声破碎菌体并离心(8 000 r/min、10 min), 取上清, 加 4 ml Ni-NTA 悬液, 平缓摇动 4 h, 上柱收集流出液, 以 6 倍柱床体积的 N 缓冲液(M 缓冲液中加入 20 mmol/L Imidazole)洗脱, 再以 6 倍柱床体积的 O 缓冲液(M 缓冲液中加入 200 mmol/L Imidazole)洗脱。分部收集, D_{280} 检测蛋白洗脱峰, 经 SDS-PAGE 检测后合并收集液。调节蛋白浓度为 0.5 mg/ml, 10 倍稀释于复性液(50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl、1 mmol/L PMSF、0.25 mmol/L GSSG、1.25 mmol/L GSH、10% 甘油)7 ~8 ℃复性 24 h, 离心(10 000× *g*、10 min、4 ℃), 收集上清, 透析后冷干保存。

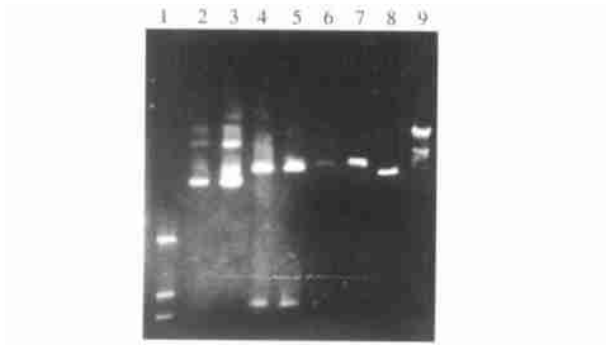
1.7　表达产物对活性 T 细胞的杀伤作用

常规分离外周血淋巴细胞, 调整细胞浓度为 2×10^6/ml, 加 PHA 至终浓度为 2 μg/ml, 96 孔培养板每孔加 0.1 ml 细胞悬液, 在 37 ℃、含 5% CO_2 培养箱中培养 3 d, 各孔中分别加不同稀释度样品 100 μl, 使样品终浓度分别为 10、1、0.1、0.01、0.001 μg/ml, 同时设空白对照(不含样品)。继续孵育 24 h 后, MTT 法测定细胞毒效应[4], 同时测样品对静止性 T 细胞的杀伤作用。细胞存活率 = 实验孔 A_{570}/ 空白孔 $A_{570}\times100\%$, 用细胞存活率对剂量对数作图并按反对数及作图法求出 IC_{50} 值, 再以细胞存活率对剂量作图(图 4)。

2　结果

2.1　融合蛋白 hIL15M/TNFαM 的表达载体的构建

质粒 pUC9NdeⅠ-hIL15 中含有 hIL15 成熟肽全长编码基因, 以该质粒为模板通过 PCR 获得了 330 bp hIL15 突变体(hIL15M)基因序列。与天然的 hIL15 相比, hIL15M 去除了 N 端的 8 个氨基酸残基。将 PCR 扩增片段经 NdeⅠ/*Eco*RⅠ双切后克隆至 pUC9NdeⅠ的相应位点, 并经 DNA 测序确认。从 pUC9NdeⅠ-hIL15M 中用 *Nde*Ⅰ/*Eco*RⅠ纯化出 330 bp 的 hIL15M 基因片段; 从 pUC18-TNFαM 中用 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ纯化出 480 bp 的 TNFαM 基因片段; 从 T7 表达载体 pET16b 中用 *Nde*Ⅰ/*Bam*HⅠ纯化 5.7 kb 的线性载体, 由于该线性化的载体不能自身连接, 因此上述 3 个片段经 T4 连接酶连接并转化大肠杆菌 JM83 后, 只有插入了 hIL15M-TNFαM 的重组质粒才能在 *E. coli* 中复制增殖。所以, Amp^+ 平板中的抗性菌落即为所要筛选的重组克隆。挑取两个抗性菌落抽提质粒并行限制性酶切分析(图 1), 经 *Nde*Ⅰ/*Bam*HⅠ双切后生成了 5.7 kb 和 0.8 kb 两个片段, 分别与 pET16b 空载体和 hIL15M-TNFαM 融合基因的大小相符。为了使 hIL15M 与 TNFαM 融合后不影响各自空间结构的组成, 构建时在两个蛋白间插入 3 个 Gly 与 1 个 Ser 组成的小肽。



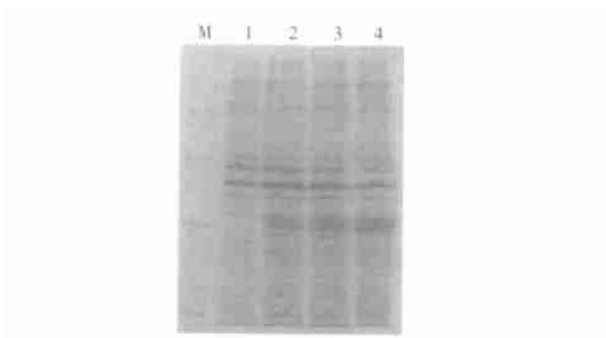
1: DNA marker(2.0、1.0、0.75 kb); 2, 3: pET-hIL15M-TNFα plasmid; 4, 5: pET-hIL15M-TNFαM/*Bam*HⅠ+*Nde*Ⅰ; 6, 7: pET-hIL15M-TNFαM/*Bam*HⅠ; 8: pET16b/*Bam*HⅠ; 9: λ/*Hin*d Ⅲ(23.9、9.4、6.5、4.3、2.3、2.0 kb)

图 1　pET-hIL15M-TNFαM 的酶切鉴定

Fig 1　Restriction analysis of pET-hIL15M-TNFαM

2.2　hIL15M/TNFαM 的表达

将重组载体 pET-hIL15M-TNFαM 转化 *E. coli* BL(DE3)plysS, 在 IPTG 诱导后的不同时间点取样检测, 图 2 是 SDS-PAGE 电泳结果, 与诱导前相比, 诱导后 1、2、3 h 均出现了一条约 30×10^3 的特异蛋白带, 与预计的分子量相符。进一步对表达蛋白进行细胞内定位, 发现表达产物主要以包涵体形式存在, 在宿主菌可溶性上清中未发现表达产物的存在。诱导后将菌液培养温度降至 30 ℃, 仍未发现可溶性的表达产物。



M: Protein molecular weight marker(97.4× 10^3、66.2× 10^3、43× 10^3、31× 10^3、20.1× 10^3、14.4× 10^3); 1: Uninduced total cellular proteins; 2－4: Total bacterial proteins induced by IPTG for 1, 2, 3 h, respectively

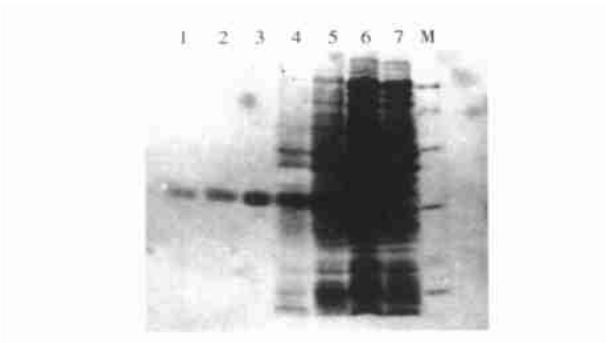
图 2　hIL15M/TNFαM 在大肠杆菌中的表达检测

Fig 2　SDS-PAGE analysis of hIL15M/TNFαM expression in *E. coli*

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 hIL15M/TNFαM 的纯化

由于表达产物的氨基端带有来自载体的组氨酸链，故用 Ni-NTA 亲和层析从包涵体中纯化 hIL15M/TNFαM 融合蛋白。图 3 可见，经低浓度咪唑（20 mmol/L）流洗后，200 mmol/L 咪唑洗脱可以得到电泳纯的目的蛋白。将亲和层析分离的目的蛋白低温复性，所得样品即可用于生物活性的测试。



M: Protein molecular weight marker (97.4× 10^3, 66.2× 10^3, 43× 10^3, 31× 10^3, 20.1× 10^3, 14.4× 10^3); 1—3: Washed by buffer O; 4: Washed by buffer N; 5: Flow-through fraction; 6: Total cellular proteins induced by IPTG for 2 h; 7: Uninduced total cellular proteins

图3 hIL15M/TNFαM 的 Ni-NTA 亲和层析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of purified hIL15M/TNFαM fusion protein

2.4 hIL15M/TNFαM 对 IL15Rα 阳性细胞的杀伤作用

PHA 活化的 T 细胞表达 IL15Rα，而静止性 T 细胞不表达 IL15Rα[5]。用 MTT 法测定 hIL15M/TNFαM 对 T 细胞的细胞毒作用，结果表明重组蛋白对 PHA 活化与非活化 T 细胞均有杀伤作用，并存在一定的量效关系。以半数杀伤浓度（IC_{50}）为指标，hIL15M/TNFαM 对静止性及活化 T 细胞的 IC_{50} 分别为 2 911 ng/ml、224 ng/ml，该重组蛋白对活化 T 细胞的杀伤作用是非活化 T 细胞的 13 倍（图 4）。提示重组融合蛋白的细胞毒效应具有靶向性，即主要作用于 IL15Rα 阳性细胞。

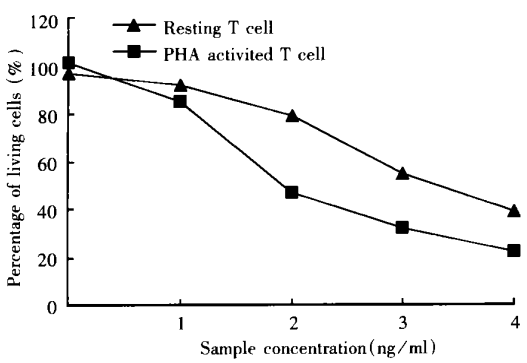


图4 hIL15M/TNFαM 对 T 细胞的杀伤图谱

Fig 4 The map of hIL15M/TNFαM killing T cell

3 讨论

hIL15 通过 IL15Rα 和 IL2Rβγ 受体三聚体完成信号转导及对靶细胞的激动作用。hIL15 与受体复合物的高亲和力结合，取决于该细胞因子与其特异的受体 α 链之间的作用，而 βγ 链是启动信号转导所必需的。阻断 hIL15 与 β 或 γ 亚基的结合，可以抑制信号转导和细胞增殖，但 hIL15 仍可通过 α 亚基与 αβγ 受体复合物结合[6]。由于 hIL15 氨基端的 A 螺旋区，特别是第 8 位的 Asp 是与 β 亚基作用所必须的，所以删除 hIL15 氨基端前 8 个氨基酸，可以抑制该因子对效应细胞的激动增殖作用。但这种改造不影响与受体 α 亚基的作用，hIL15M 仍可以和受体高亲和力结合。

目前，利用基因工程技术，将天然毒素的受体结合区基因替换为抗体或细胞因子基因，制备了多种免疫毒素，它们能够选择性地识别和杀伤细胞表面过量表达某类分子的异常细胞，而对正常组织细胞损伤较少。这类药物的弹头部分，通常来源于植物或微生物毒素，极强的免疫原性制约了这一类免疫毒素的开发和临床应用。TNFα 是一种人源性毒性因子，对人体不具有免疫原性。因此，我们以对效应细胞不具有激动作用的 hIL15M 为载体，TNFαM 为弹头构建了两者的融合蛋白，体外实验表明，hIL15M/TNFαM 对 PHA 激活的 T 细胞的杀伤作用是静止性 T 细胞的 13 倍，即 hIL15M/TNFαM 的毒性作用具有一定的选择性。这种选择性作用的基础，在于活化的与静止 T 细胞表面 IL15Rα 的丰度不同[5]，hIL15 与受体极高的亲和力，使融合蛋白主要定向于 IL15R 丰富的靶细胞，这样活化的 T 细胞表面富集了较高浓度的融合蛋白。一方面，通过 TNFα 受体介导一系列信号转导引发细胞毒作用，另一方面，也可能通过 IL15Rα 介导 hIL15M/TNFαM 内化，使 TNFα 直接在细胞内发挥作用，因为将 TNFαM 通过显微注射或逆转录病毒载体直接导入胞内可以使细胞迅速凋亡或恢复肿瘤细胞程序性死亡机制[7,8]。本研究构建的融合蛋白对静止性 T 细胞也有一定的杀伤作用，这可能是因为静止性 T 细胞表面有 TNFα 受体的表达。

在白介素类细胞因子中，由于 IL-2 受体的表达具有较高的细胞特异性，IL-2 常被用作导向药物的载体。然而，基于 hIL15 的导向药物在以下方面较 IL-2 具有优越性：①hIL15 的副作用特别是血管渗出综合征低于 IL-2[9]；②hIL15 血浆清除率快于 IL-2，较少引发非特异性毒性；③hIL15 在肿瘤组织的分布高于非肿瘤组织[10]；④hIL15/IL15Rα 的亲和力千倍于 IL-2/IL2Rα，因此可以通过减少剂量进一步增强导向药物的特异性，减轻载体和弹头的毒副作用。这一点对于 TNFα 尤为重要，因为 TNFα 在体内达到抗肿瘤等治疗效应时，所需的剂量往往也对机体产生严重的全身性毒性。因此，离体及在体研究均表明含 TNFα 的靶向药物较单纯 TNFα 具有更好的治疗效果。本研究结果表明，融

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合蛋白 hIL15M/TNFαM 对高表达 IL-15 受体的 T 细胞具有更强的细胞毒作用，提示这一重组蛋白对 T 细胞性白血病及由 T 细胞异常活化所致的疾病具有潜在的治疗价值。因为导致这些疾病的白血病细胞或 T 细胞表面具有高丰度的 IL-15 受体，可以成为该融合蛋白作用的靶标。

参考文献：

[1] Fehniger T A, Caligiuri M A. Interleukin-15: biology and relevance to human disease[J]. Blood, 2001, 97(1): 14—32.
[2] Eisenman J, Ahdieh M, Beers C, *et al*. Interleukin-15 interactions with interleukin-15 receptor complexes: characterization and species specificity [J]. Cytokine, 2002, 20(3): 121—129.
[3] Shin N K, Lee I, Chang S G, *et al*. A novel tumor necrosis factor-alpha mutant with significantly enhanced cytotoxicity and receptor binding affinity [J]. Biochem Mol Biol Int, 1998, 44(6): 1075—1082.
[4] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. J Immunol Meths, 1989, 119(2): 203—210.
[5] Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, *et al*. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15[J]. J Immunol, 2001, 167(6): 3129—3138.
[6] Pettit D K, Bonnert T P, Eisenman J, *et al*. Structure-function studies of interleukin 15 using site-specific mutagenesis polyethylene glycol conjugation, and homology modeling[J]. J Biol Chem, 1997, 272(4): 2312—2318.
[7] Smith M R, Munger W E, Kung H F, *et al*. Direct evidence for an intracellular role for tumor necrosis factor-alpha 1[J]. J Immunol, 1990, 144(1): 162—169.
[8] Tos A G, Cignetti A, Rovera G, *et al*. Retroviral vector-mediated transfer of the tumor necrosis factor alpha gene into human cancer cells restores an apoptotic cell death program and induces a by stander-killing effect[J]. Blood, 1996, 87(6): 2486—2495.
[9] Plunkett F J, Akbar A N. IL-15—friend or foe in transplantation rejection [J]? Transplantation, 2001, 72(5): 771.
[10] Kobayashi H, Carrasquillo J A, Paik C H, *et al*. Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukin 2 and 15 [J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3577—3583.

（编辑 栗 嘉）

文章编号：1000-5404(2004)08-0693-01

个案与短篇

苦黄注射液致药物热 2 例

Two cases of drug fever caused by intravenous drip of Kuhuang

李志勇，曹利峰 （江苏省太仓市人民医院，太仓 215400）

苦黄注射液系中药制剂，由苦参、大黄、大青叶、茵陈等中药组成，具有清热利湿，疏肝退黄作用，临床上用于治疗有湿热内蕴、胆汁外溢、黄疸胁痛、乏力、纳差等症的黄疸型病毒性肝炎患者，有较好的退黄作用。我院在应用苦黄静脉滴注治疗黄疸型肝炎时发生 2 例药物热，报告如下。

例 1：女 41 岁，因乏力 1 月，纳差、尿黄 3 d 于 2002 年 4 月 17 日入院。查体：体温 37 ℃，皮肤巩膜黄染，心肺无异常，腹部平软，肝脾肋下未及，肝区叩痛，腹部移动性浊音阴性，神经系统无异常。肝功能损害，TB 79.7 μmol/L，DB 51.2 μmol/L，TP 73.9 g/l，GLB 27.6 g/L，ALT 1 824 U/l，AST 1 761 U/L，ALP 344 U/L，GGT 144 U/L；HBsAg(－)，HBsAb(－)，HBeAg(－)，HBeAb(－)，HBcAb(－)，HBcAb-IgM(－)，乙肝前 S1 抗原(－)，乙肝前 S1 抗体(－)，甲型肝炎抗体 IgM(－)，丙型肝炎抗体(－)，丁型肝炎抗体 IgM(－)，丁型肝炎抗体 IgG(－)；戊型肝炎抗体 IgM(－)；戊型肝炎抗体 IgG(－)；类风湿因子(－)，抗核抗体(－)，抗线粒体(－)，血沉(－)；PT 13 s (9.6～13 s)，PT%90.1，FIB 1.89 g/L (1.7～4.1 g/L)，TT 17.1 s (14～21 s)；血 WBC 5.3×10^9/L，GR 54.9，Mo 6.3，Ly 38.8，RBC 3.91×10^{12}/L，HGB 117 g/L，HCT 0.361，PLT 111×10^9 l，大便常规(－)，尿 WBC 1～2/HP。胸部计算机摄像检查(CR 检查)无异常，心电图无异常，腹部肝胆 B 超无异常。入院诊断病毒性肝炎(未分型)急性黄疸型。入院后给予苦黄注射液、潘南金注射液、肝太乐、复合微生素 B 治疗。用药第 3 天起，在滴注苦黄过程上，出现发热、全身不适，体温最高达 38.6 ℃，无鼻塞、流涕、无咳嗽、咯痰，无呕吐、腹泻，连续 3 d 滴注苦黄后发热，查血常规正常，胸部再次 CR 检查无异常，第 6 天起，停用苦黄后，未再发热。诊断为苦黄致药物热。住院 15 d，症状明显减轻，胆红素及转氨酶明显下降，肝炎好转出院。

例 2：男 49 岁，因乏力、纳差、尿黄 12 年，加重伴昏迷 2 d 于 2002 年 6 月 27 日入院。1 年前因慢性乙型肝炎、肝硬化、胃底食道静脉破裂出血行脾切除、胆囊切除、胰尾切除、胃底静脉结扎术。查体：体温 38.2 ℃，Bp 16/8 kPa，慢性肝病面容，深度黄疸，头颈及上肢可见蜘蛛痣，浅表淋巴结未及肿大，口腔无溃疡，颈部抵抗，双肺底呼吸音低，有湿啰音，心浊音界不大，心音正常，腹部隆起，肝肋下未及，腹部移动性浊音(＋)，扑翼样

（下转 696 页）

作者简介：李志勇(1967－)，男，四川省大竹市人，主治医师，主要从事肝炎、肝硬化方面的研究。电话：(0512)56781260
收稿日期：2002-12-06；修回日期：2003-02-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net