

# 人白介素-29 变异体在毕赤酵母中的表达及抗肿瘤活性

陆 源<sup>1</sup>, 陈 伟<sup>\*2</sup>, 李利云<sup>3</sup>, 彭荣刚<sup>2</sup>, 李 菲<sup>2</sup>, 邬敏辰<sup>2</sup>

(1. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 基于生物信息学分析的结果, 采用基因突变和大引物 PCR 技术完成人白细胞介素-29 (hIL-29) 成熟肽第 33 位氨基酸的定点突变, 成功实现其在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中的异源表达。重组人白细胞介素-29 变异体蛋白 (rhIL-29<sup>mut33</sup>) 在不同质量浓度时, 对肝癌细胞 BEL7402、结肠癌细胞 HCT8 和胃癌细胞 SGC7901 的增殖均有抑制作用, 而且抑制增殖效应强于野生型 rhIL-29。与低质量浓度相比, 高质量浓度下 rhIL-29<sup>mut33</sup> 对肿瘤细胞增殖抑制作用更强, 对上述 3 种肿瘤细胞的增殖抑制率分别达到 (31.76±2.87)%、(22.47±0.26)% 和 (34.41±0.40)%。rhIL-29<sup>mut33</sup> 良好的生物学活性表明该变异体具有较大的应用潜力。

**关键词:** 人白细胞介素-29; 定点突变; 基因克隆; 表达; 抗肿瘤活性

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)02—0185—07

## Expression of Recombinant Human Interleukin-29 Mutant in *Pichia pastoris* and Antitumor Analysis

LU Yuan<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>\*2</sup>, LI Liyun<sup>3</sup>, PENG Ronggang<sup>2</sup>, LI Fei<sup>2</sup>, WU Minchen<sup>2</sup>

(1. School of Medicine Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Based on results of the bioinformatics analysis, a mutant of recombinant human interleukin 29 (rhIL-29<sup>mut33</sup>) was constructed by site-directed mutagenesis and megaprimer PCR. Then, it was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. The rhIL-29<sup>mut33</sup> showed strong anti-proliferation effects on liver cancer cell BEL7402, colon cancer cell HCT8, and gastric cancer cell SGC7901 at different concentrations, and all of them showed stronger than that of wild type rhIL-29. At a high concentration of the rhIL-29<sup>mut33</sup>, the inhibition ratios of the three tumor cells were (31.76 ± 2.87)%, (22.47 ± 0.26)%, and (34.41 ± 0.40)%, respectively. The superior biological activities of rhIL-29<sup>mut33</sup>, especially the antitumor activity, make it have great potential applications in the drug industry.

**Keywords:** human interleukin-29, site-directed mutation, gene cloning, expression, antineoplastic activity

收稿日期: 2014-07-07

基金项目: 国家大学生创新训练计划项目(201210295024)。

\* 通信作者: 陈 伟(1956—), 男, 江西宜春人, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事免疫学和生物制药方面的研究。

E-mail: chenwei@jiangnan.edu.cn

人白细胞介素-29(Human interleukin-29, hIL-29)是近年发现的一种细胞因子,又称为干扰素 $\lambda 1$ (Interferon  $\lambda 1$ , IFN $\lambda 1$ ),其与 hIL-28A 和 hIL-28B 同属 IFN  $\lambda$  家族(IFN $\lambda$ s)<sup>[1-2]</sup>。hIL-29 通过结合特殊的异二聚体受体复合物起始信号的传导,其与 I 型 IFN 共享相同的 JAK-STAT 信号传导途径,促进一组共同基因的表达。因此, hIL-29 表现出一些与 I 型 IFN 相同的性质,如抗病毒、抗增殖、体内抗肿瘤以及免疫调节等生物学活性<sup>[3]</sup>。hIL-29 的特异受体复合物由特有的结合亚基 IL-28R1 和辅助亚基 IL-10R2 组成。IL-28R1 表达的细胞谱系较少,因此, hIL-29 作用的靶细胞有限,主要包括肝细胞、胃肠细胞和上皮细胞<sup>[4-8]</sup>。由此提示 hIL-29 作为药物的副作用可能比 I 型 IFN 更小,可望研制开发临床疗效高且副作用小的新一代干扰素药物。研究发现, hIL-29 肽链中有一个由胞内向胞外的跨膜结构域,其空间构象由 6 个  $\alpha$  螺旋(A-F)和无规则卷曲组成<sup>[9]</sup>。hIL-29 空间构象的 A、B 和 F 螺旋可能是 hIL-29 与特异性受体结合而发挥生物学效应的活性部位。对 hIL-29 的生物信息学分析表明, A 和 F 螺旋中有 4 个氨基酸残基可能是影响其生物学活性的关键氨基酸残基<sup>[10]</sup>。

作者所在课题组前期已从健康人外周血单个核细胞经 RT-PCR 得到 hIL-29 成熟肽的编码基因,并获得酵母表达的重组 hIL-29 成熟肽<sup>[11-12]</sup>。在此基础上,作者以生物信息学分析结果为依据<sup>[10]</sup>,采用定点突变和大引物 PCR 技术将 hIL-29 成熟肽的 Lys33 定点改造为 Arg33,将变异体 hIL-29<sup>mut33</sup> 通过毕赤酵母 GS115 重组表达,初步分析了重组 hIL-29 变异体(rhIL-29<sup>mut33</sup>)的抗肿瘤活性,结果显示该变异体具有较好的抗肿瘤效应。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株和细胞株

大肠杆菌 *E. coli* JM109, 真核表达质粒 pPIC9K<sup>M</sup>:购自 Invitrogen 公司并经作者所在实验室改造;整合了 hIL-29 成熟肽基因的重组质粒 pPIC9K<sup>M</sup>-hIL-29:由作者所在实验室构建;克隆质粒 pUCm-T:上海 Sangon 公司;毕赤酵母 GS115: Invitrogen 公司;人肝癌细胞 BEL7402、人结肠癌细胞 HCT8 及人胃癌细胞 SGC7901:由江南大学药学院金坚教授惠赠。

### 1.2 主要试剂和培养基

各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、*rTaq* DNA 聚合酶、DNA Ladder Marker、低相对分子质量蛋白质 Marker 和 EZ-10 柱式 DNA 回收试剂盒:大连 TaKaRa 公司;胰蛋白胨、酵母提取物、DAB、SDS、G418、硝酸纤维素膜(NC 膜)和 RPMI-1640 培养基等:上海 Sangon 公司;羊抗人 IL-29 多克隆抗体:美国 R&D 公司;HRP 标记兔抗羊 IgG:上海明睿公司;新生小牛血清:浙江天杭生物科技有限公司;胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素溶液(100 $\times$ )和 Cell Counting Kit-8 试剂:碧云天生物技术有限公司;重组人干扰素  $\alpha 2b$  注射液:北京凯因科技股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基的配制按 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit(Invitrogen 公司)操作手册。

### 1.3 引物设计与合成

参照 NCBI 公布的 hIL-29 的编码序列(登录号:AY336716.1),结合生物信息学分析结果,设计扩增编码 hIL-29 成熟肽 cDNA 的特异性上、下游引物及突变引物(第 98 位碱基 T 突变为 C):

上游引物(hIL-29-F):5'-CTCGAGAAAAGAGGCCCTGTCCCCACTTCC-3',含 *Xho* I 位点;

下游引物(hIL-29-R):5'-GCGGCCGCTCAGGTGGACTCAGGTTGG-3',含 *Not* I 位点;

突变引物(hIL-29-A):5'-CCCTGGCCCTCTTGAAGCTCGCTA-3',含突变位点。

### 1.4 hIL-29<sup>mut33</sup> 编码基因的克隆

采用大引物 PCR 方法,对 hIL-29 成熟肽基因实行定点突变。第一轮 PCR 扩增以 pPIC9K<sup>M</sup>-hIL-29 质粒为模板, hIL-29-F 和 hIL-29-A 为引物,反应条件如下:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,57  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,30 个循环;72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。第二轮大引物 PCR 扩增以 pPIC9K<sup>M</sup>-hIL-29 质粒为模板,以第一轮 PCR 产物和 hIL-29-R 为引物,反应条件与第一轮相同。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后,用 EZ-10 Spin Column DNA Extraction Kit 回收目的基因,操作按说明书。将回收的目的基因与 pUCm-T 连接,转化 JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性转化子,送上海 Sangon 公司测序,测序正确的重组质粒 pUCm-T-hIL-29<sup>mut33</sup> 经 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切,回收目的基因 hIL-29<sup>mut</sup>,与同样双酶切的 pPIC9K<sup>M</sup> 质粒连接,转化 JM109 感受态细

胞,经 PCR 筛选鉴定获重组表达质粒 pPIC9K<sup>M</sup>-*hIL*-29<sup>mut33</sup>后,送上海 Sangon 公司测序鉴定。

### 1.5 *hIL*-29<sup>mut33</sup> 在毕赤酵母 GS115 中的表达

pPIC9K<sup>M</sup> 和经测序鉴定的 pPIC9K<sup>M</sup>-*hIL*-29<sup>mut33</sup> 经 *Sal* I 线性化后,用电转化法分别转化毕赤酵母 GS115;转化的毕赤酵母 GS115 涂布 MD 平板,挑选在 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含不同质量浓度 G418 的 YPD 平板,筛选出抗高质量浓度 (2.0 mg/mL) 的重组毕赤酵母,分别命名为 GS115/9K<sup>M</sup> 和 GS115/*hIL*-29<sup>mut33</sup>。按《分子克隆实验指南》的方法提取重组 GS115 基因组 DNA,以通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR,鉴定目的基因是否整合入 GS115 基因组内。GS115/9K<sup>M</sup> 和 GS115/*hIL*-29<sup>mut33</sup> 的诱导表达按 Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen 公司)操作手册。

### 1.6 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的分离纯化

诱导表达的发酵液经 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。向上清液中加入硫酸铵至 30% 饱和度,4 ℃ 静置过夜后离心去除部分杂蛋白质和色素。在上清液中继续加入硫酸铵至 65% 饱和度,4 ℃ 静置过夜,离心收集沉淀。将沉淀溶于柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (10 mmol/L, pH 6.0),经透析、超滤浓缩 (截留相对分子质量为 10 000, Millipore 公司) 后,加至预先用上述缓冲液平衡的 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱 (Φ 16 mm×200 mm),以同样缓冲液洗柱,然后以含 NaCl 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (10 mmol/L, 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L NaCl, pH 6.0) 进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,收集洗脱液。将含有 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的洗脱液超滤浓缩至 3 mL,加至预先用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡的 Sephadex G-75 凝胶层析柱 (Φ 1.6 cm×100 cm),然后同一缓冲液洗脱,流速 0.4 mL/min,收集含 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的组分,冷冻干燥。

### 1.7 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的鉴定

取少量纯化后的重组蛋白冻干粉,用适量的无菌超纯水溶解,采用 SDS-PAGE 对重组蛋白质进行分析及表观相对分子质量测定。以 Western Blot 鉴定 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 是否表达,经 SDS-PAGE 后将蛋白质电转移至 NC 膜上,用含 10% 健康兔血清的 TBST 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, 土温-20 0.05%, pH 7.2) 于 4 ℃ 封闭过夜, TBST 清洗后用羊抗人 IL-29 抗体 (1:1 000) 于 37 ℃ 孵育 2 h,

TBST 清洗后用 HRP 标记的兔抗羊 IgG (1:2 500) 于 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 清洗后用 DAB 试剂显色。

### 1.8 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的 HPLC 纯度鉴定

采用美国安捷伦公司的 Agilent 1100 液相色谱系统,选择色谱柱:Agilent C18, 300 Å, 5 μL 反相柱。将纯化蛋白质的冻干粉用 10 mmol/L, pH 7.0 的 PBS 溶解,调节质量浓度为 2 mg/mL 以上,上样量为 20 μL。检测波长为 260 nm,对各个吸收峰进行积分,按面积归一法计算 *hIL*-29<sup>mut33</sup> 的纯度。

### 1.9 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 的抗肿瘤活性分析

将 *rhIL*-29<sup>mut33</sup>、野生型 *rhIL*-29、阳性对照 IFN-α2b 分别设置 50、500、1 000 ng/mL 3 个剂量组,同时设置空白和阴性对照组,每组设 5 个平行孔。取对数期生长的 BEL7402、HCT8 和 SGC7901 细胞,经体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化后,用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养液调整细胞浓度至 1×10<sup>5</sup> 个/mL,接种 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL (空白孔不接种),置 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24 h 后,吸去上清液;取上述样品用 RPMI-1640 完全培养液稀释,分别按剂量组每孔加入 100 μL,空白和阴性对照组加入等体积的完全培养液,置 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂继续培养 1 h,酶标仪测定 A<sub>450</sub>,计算 *rhIL*-29<sup>mut33</sup> 对 BEL7402、HCT8 以及 SGC7901 细胞的增殖抑制率,并运用 SPSS 软件 22.0 进行统计分析,采用单因素方差分析结果,检验水准 α=0.05。

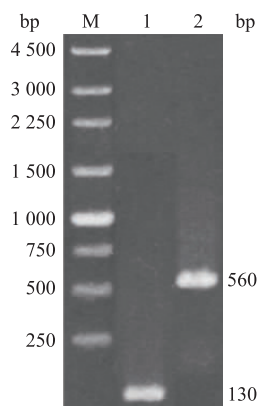
IR (增殖抑制率) = 1 - 样品组 A<sub>450</sub> 值 / 阴性对照组 A<sub>450</sub> 值

## 2 结果与讨论

### 2.1 *hIL*-29<sup>mut33</sup> 基因的克隆

按照 1.4 中的方法进行 PCR 反应,经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测第一轮 PCR 产物,在约 130 bp 处有一明显的条带,见图 1 泳道 1。将目的产物回收纯化。以第一轮 PCR 产物为大引物,进行第二轮 PCR 扩增,结果显示,PCR 产物在约 560 bp 处有一条特异性的条带,见图 1 泳道 2。PCR 产物大小与预期相符,回收产物与 pUCm-T 连接的重组质粒 pUCm-T-*hIL*-29<sup>mut33</sup>,经测序鉴定的结果显示,基因大小为 563 bp,编码 181 个氨基酸,将其序列与 *hIL*-29 的编码基因 (登录号:AY336716.1) 比对显示

第 98 位碱基 T 突变为 C。将 *hIL-29<sup>mut33</sup>* 与 pPIC9K<sup>M</sup> 连接得到的重组表达质粒 pPIC9K<sup>M</sup>-*hIL-29<sup>mut33</sup>* 经测序鉴定,结果表明目的基因没有发生突变,且读码框完全正确。



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: 以 *hIL-29-F*、*hIL-29-A* 为引物第一轮 PCR 产物; 2: 以第一轮 PCR 产物、*hIL-29-R* 为引物第二轮 PCR 产物

图 1 *hIL-29<sup>mut33</sup>* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplifications for *hIL-29<sup>mut33</sup>*

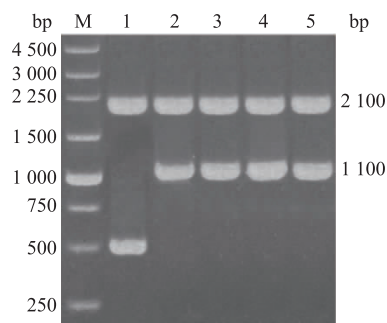
## 2.2 *hIL-29<sup>mut33</sup>* 基因在毕赤酵母中的表达

按照 1.5 中的方法,将线性化的 pPIC9K<sup>M</sup>-*hIL-29<sup>mut33</sup>* 质粒电转化酵母 GS115 感受态细胞后,经 G418 筛选获得高拷贝的 *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115*。将挑选的高拷贝 *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115* 重组子为模板,用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行菌液 PCR 检测。结果显示,PCR 反应扩增出长度约为 2 100 bp 和 1 100 bp 的产物,2 100 bp 的产物为 GS115 本身的 AOX1 基因,1 100 bp 的产物包括约为 600 bp 的目的基因 (563 bp) 和 500 bp pPIC9K<sup>M</sup> 质粒上的 5'-AOX 和 3'-AOX 引物序列之间的片段,见图 2,表明 *hIL-29<sup>mut33</sup>* 基因已成功整合入酵母 GS115 基因组中。

## 2.3 rhIL-29<sup>mut33</sup> 的表达和鉴定

挑取 *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115* 菌落常规诱导表达 72 h, 将发酵上清液按 1.6 中的方法经盐析、透析、超滤、SP-Sephrose Fast Flow 阳离子交换层析和 Sephadex G-75 凝胶层析纯化的产物,经 SDS-PAGE 分析表明,在约 22 600 处可见明显的单一目的蛋白质条带,见图 3 泳道 3,而 GS115/9K<sup>M</sup> 的发酵液在该处并无相同条带,见图 3 泳道 1。SDS-PAGE 结果显示, rhIL-29<sup>mut33</sup> 的表观相对分子质量高于理论计算相对分子质量 (20018.0),这可能由于 rhIL-

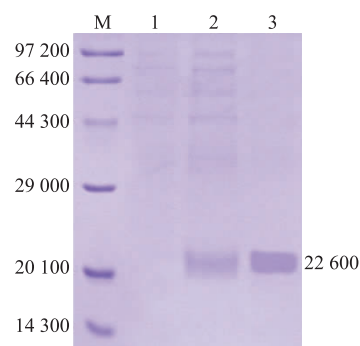
29<sup>mut33</sup> 在酵母 GS115 表达过程中发生了糖基化修饰<sup>[9]</sup>。用在线软件 NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 和 NetOGlyc 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) 分别对 N 和 O 糖基化位点进行预测,结果表明 *hIL-29<sup>mut33</sup>* 氨基酸序列中含有 1 个 N-糖基化位点和 8 个 O-糖基化位点。



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: GS115/9K<sup>M</sup>; 2-5: *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115*

图 2 重组毕赤酵母 *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115* 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detections of recombinant *P.pastoris hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115*

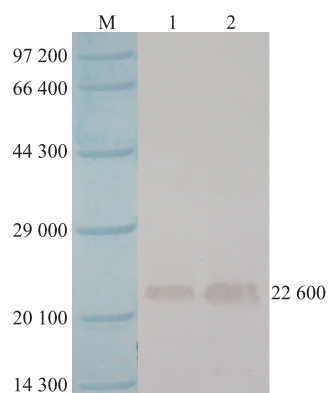


M: 低相对分子质量蛋白质 Marker; 1: GS115/9K<sup>M</sup>; 2: *hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115*; 3: 纯化蛋白质 rhIL-29<sup>mut33</sup>

图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed products

*hIL-29<sup>mut33</sup>/GS115* 的发酵上清液经 Western Blot 分析,结果显示,重组表达的 rhIL-29<sup>mut33</sup> 与羊抗人 IL-29 抗体反应后在 NC 膜上呈现特异性反应条带,其大小约为 22 600,见图 4,与 SDS-PAGE 中的条带大小相符,但反应条带略有弥散,这可能是 Western Blot 的放大效应所致。



M:低相对分子质量蛋白质 Marker;1:*hIL-29<sup>mut33</sup>*/GS115;2:纯化蛋白质 *rhIL-29<sup>mut33</sup>*

图4 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的 Western Blot 鉴定

Fig. 4 Western Blot of *rhIL-29<sup>mut33</sup>*

## 2.4 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的 HPLC 纯度鉴定

采用 C18 反相柱,在 HPLC 系统上检测纯化后 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的纯度。流动相为:10%乙腈和 0.5%三氟乙酸;洗脱条件为:0~10 min,10%~30%的乙腈和 0.5%三氟乙酸;10~20 min,30%~70%的乙腈和 0.5%的三氟乙酸。经过面积归一法计算,*rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的纯度为 95.13%,可以用于体外细胞活性的检测。

## 2.5 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的抗肿瘤活性分析

按照 1.9 中的方法,*rhIL-29<sup>mut33</sup>* 对 BEL7402、HCT8 和 SGC7901 三株肿瘤细胞的增殖抑制分析结果表明,各剂量组均显示增殖抑制效应,随着 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 浓度的增加,细胞增殖抑制率均随之增加,呈现浓度-效应依赖关系,见表 1。统计分析均采用 SPSS 软件 22.0,符合方差齐性和正态分布的数据,进一步做单因素方差分析; $p<0.05$  记作\*,表示显著性差异; $p<0.01$  记作\*\*,表示极显著差异。

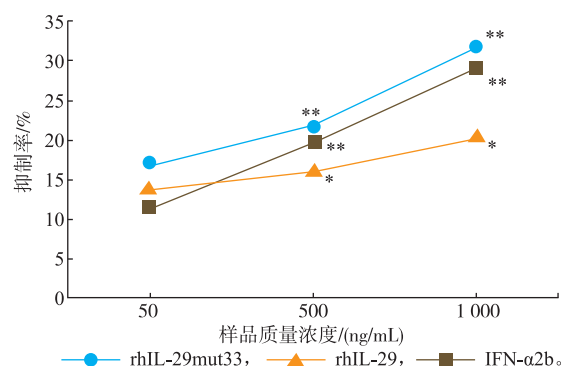
表 1 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 对不同肿瘤细胞株的抑制作用

Table 1 Inhibition effects of *rhIL-29<sup>mut33</sup>* on different tumor cell lines

| 抑制率/%   | <i>rhIL-29<sup>mut33</sup></i> 剂量/(ng/mL) |            |            |
|---------|-------------------------------------------|------------|------------|
|         | 50                                        | 500        | 1 000      |
| BEL7402 | 17.01±0.65                                | 21.79±1.00 | 31.76±2.87 |
| HCT8    | 10.39±0.26                                | 12.93±0.08 | 22.47±0.26 |
| SGC7901 | 10.78±0.26                                | 23.10±0.14 | 34.41±0.40 |

统计分析结果显示,*rhIL-29<sup>mut33</sup>*、野生型 *rhIL-29* 及商品化的 IFN- $\alpha$ 2b 对 3 株肿瘤细胞增殖的抑制效应略有差异,*rhIL-29<sup>mut33</sup>* 在低、中、高剂量组对 BEL7402 细胞抑制作用均强于野生型 *rhIL-29* 及 IFN- $\alpha$ 2b,其高剂量组的抑制率达到 (31.76±

2.87)%,见图 5,极显著地抑制了 BEL7402 细胞的增殖。

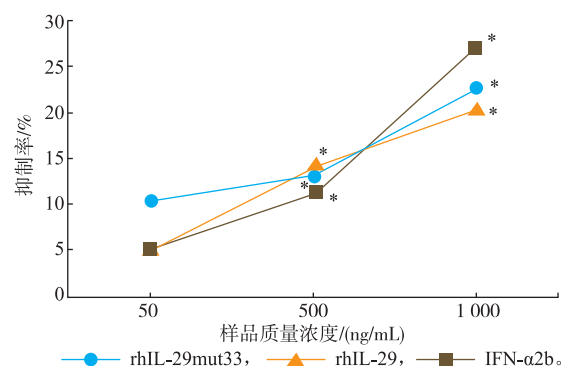


与对照组相比,\* $p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$

图5 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 对 BEL7402 细胞的抗增殖活性分析

Fig. 5 Antiproliferative activities analysis of *rhIL-29<sup>mut33</sup>* in BEL7402 cells

高剂量组的 *rhIL-29<sup>mut33</sup>*、*rhIL-29* 及 IFN- $\alpha$ 2b 对 HCT8 细胞的增殖抑制率分别为 (22.47±0.26)%、(20.38±1.23)%和 (27.16±1.22)%,表明 *rhIL-29<sup>mut33</sup>*、*rhIL-29* 对 HCT8 细胞的抑制效应低于 IFN- $\alpha$ 2b,而 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 和 *rhIL-29* 对 HCT8 细胞增殖的抑制效应差异不大,见图 6。



与对照组相比,\* $p<0.05$

图6 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 对 HCT8 细胞的抗增殖活性分析

Fig. 6 Antiproliferative activities analysis of *rhIL-29<sup>mut33</sup>* in HCT8 cells

对 SGC7901 细胞的增殖抑制分析结果显示,*rhIL-29<sup>mut33</sup>* 表现出良好的细胞增殖抑制能力,*rhIL-29<sup>mut33</sup>*、*rhIL-29* 及 IFN- $\alpha$ 2b 的高剂量组对该细胞的增殖抑制率分别为 (34.41±0.40)%、(29.09±1.76)%和 (27.74±1.25)%,见图 7。三者均表现出显著的增殖抑制效应,但 *rhIL-29<sup>mut33</sup>* 的抑制作用更强,极显著地抑制了 SGC7901 细胞的增殖。

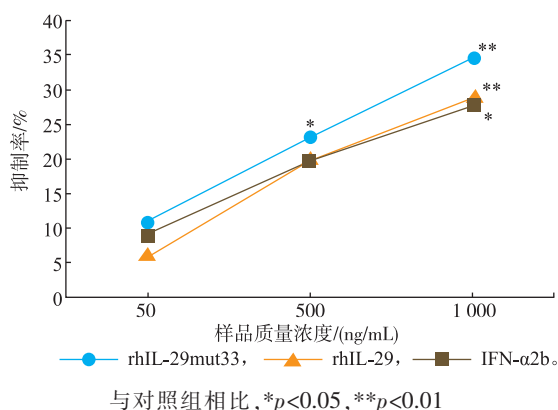


图7 rhIL-29<sup>mut33</sup>对SGC7901细胞的抗增殖活性分析  
Fig. 7 Antiproliferative activities analysis of rhIL-29<sup>mut33</sup> in SGC7901 cells

分析结果表明,不同剂量组的变异体 rhIL-29<sup>mut33</sup>对这3种肿瘤细胞的增殖均有抑制作用,且随着药物质量浓度的增加,增殖抑制率也随之增加。对于HCT8细胞, rhIL-29<sup>mut33</sup>的抑制作用强于野生型 rhIL-29,但弱于商品化的 IFN-α2b;而对于BEL7402和SGC7901细胞, rhIL-29<sup>mut33</sup>的抑制作用强于野生型 rhIL-29和商品化 IFN-α2b,表现出极显著的抗肿瘤细胞增殖效应。

### 3 结语

近年来,随着对 hIL-29 生物学活性的研究日益

### 参考文献:

- [1] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R [J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(1): 63-68.
- [2] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin W, et al. IFN-λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nature Immunology*, 2003, 4(1): 69-77.
- [3] Zhou Z, Hamming OJ, Ank N, et al. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases [J]. *Virology*, 2007, 81(14): 7749-7758.
- [4] Witte K, Gruetz G, Volk HD, et al. Despite IFN-lambda receptor expression, blood immune cells, but not keratinocytes or melanocytes, have an impaired response to type III interferons: implications for therapeutic applications of these cytokines[J]. *Genes and Immunity*, 2009, 10(8): 702-714.
- [5] Meager A, Visvalingam K, Dilger P, et al. Biological activity of interleukins-28 and -29; comparison with type I interferons[J]. *Cytokine*, 2005, 31(2): 109-118.
- [6] Zitzmann K, Brand S, Baehs S, et al. Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 344(4): 1334-1341.
- [7] Doyle SE, Schreckhise H, Khuu-Duong K, et al. Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2006, 44(4): 896-906.
- [8] Li Q, Kawamura K, Ma G, et al. Interferon- lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents[J]. *European Journal of Cancer*, 2010, 46(1): 180-190.

广泛和深入, hIL-29 由于具有与 IFN-α 相似的抗病毒和抗肿瘤活性以及细胞靶向性而引起越来越多研究者的关注。已有研究表明, hIL-29 的突变可以影响它的抗病毒和抗肿瘤活性, 而且很多突变被假设且与受体联系起来<sup>[13]</sup>。作者在前期研究的基础上, 结合生物信息学分析, 采用定点突变方法对 hIL-29 的 A/F 螺旋中 4 个关键氨基酸位点之一的 Lys33 进行分子改造, 以改变 hIL-29 与受体结合的亲和性, 从而提高其生物学活性。

作者采用定点突变和大引物 PCR 技术成功克隆出 hIL-29<sup>mut33</sup> 的编码基因并在毕赤酵母 GS115 中实现了异源表达, 获得的 rhIL-29<sup>mut33</sup> 表现出良好的抗增殖活性。对于 BEL7402、HCT8 和 SGC7901 这 3 种肿瘤细胞, 不同剂量的 rhIL-29<sup>mut33</sup> 均具有抗肿瘤细胞增殖效应, 而且对肿瘤细胞增殖抑制作用均强于野生型 rhIL-29。同时随着药物质量浓度的增加, 细胞增殖抑制率均随之增加。高剂量的 rhIL-29<sup>mut33</sup> 对细胞增殖抑制作用最强, 对上述 3 种细胞的细胞抑制率分别达到 (31.76±2.87)%、(22.47±0.26)% 和 (34.41±0.40)%。本研究成果为 hIL-29 分子改造的深入研究奠定了理论和实验基础, 也为后续研制高效的干扰素抗肿瘤药物提供参考。

- [9] Zachary JM, Eugenia M, Wei L, et al. Crystal structure of human interferon- $\lambda$  1 in complex with its high-affinity receptor interferon- $\lambda$  R1[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2010, 404(4): 650-664.
- [10] 郑海军, 朱荣, 葛春蕾, 等. 人白细胞介素-29 的生物信息学分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(2): 209-212.  
ZHENG Haijun, ZHU Rong, GE Chunlei, et al. Bioinformatics of human interleukin-29 [J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2013, 26(2): 209-212. (in Chinese)
- [11] 陈伟, 于明磊, 郑海军, 等. 人白细胞介素-29 基因的克隆和真核表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(4): 446-448.  
CHEN Wei, YU Minglei, ZHENG Haijun, et al. Cloning and eukaryotic expression of human interleukin-29 gene [J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2012, 25(4): 446-448. (in Chinese)
- [12] 郑海军, 陆源, 陈伟, 等. 天然 N-末端人白细胞介素-29 成熟肽在毕赤酵母中表达条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(3): 402-405.  
ZHENG Haijun, LU Yuan, CHEN Wei, et al. Optimization of condition for expression of native N-terminus of human interleukin-29 mature peptide in *Pichia pastoris*[J]. **Chinese Journal of Biologicals**, 2013, 26(3): 402-405. (in Chinese)
- [13] Gad H H, Dellgren C, Hamming O J, Vends S, et al. Interferon- $\lambda$  is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family[J]. **Biological Chemistry**, 2009, 284(31): 20869-20875.

## 会议信息

会议名称(中文): 2016 第六届国际分子与细胞生物学大会

会议名称(英文): Congress of Molecular&Cell Biology-2016

所属学科: 细胞生物学, 遗传与发育生物学, 生物技术与生物工程, 生物信息学, 医学免疫学

开始日期: 2016-04-25

结束日期: 2016-04-28

所在城市: 辽宁省 大连市

主办单位: 国家外国专家局国外人才信息研究中心 中国国际贸易促进委员会大连市分会

承办单位: 百奥泰国际会议有限公司

联系人: 吴超

联系电话: 0411-84575669-857

E-MAIL: jane@bitlifesciences.com

通讯地址: 大连市高新园区汇贤园 1 号

邮政编码: 116025

会议网站: <http://www.bitcongress.com/cmcb2016/cn/default.asp>

会议介绍: 第六届国际分子与细胞生物学大会将于 2016 年 4 月 25-28 日在大连国际会议中心举行。本届大会将和第七届国际 DNA 和基因组活动周同时同地举办, 组委会已邀请到诺贝尔奖大师、著名院士、500 强企业高管、海外华人科学家、国内外学术专家和企业界人士出席会议并做主题报告, 将有来自近 60 个国家和地区的 2000 位专业人士参会, 其中外宾 1000 人以上。将举办“生物制造 2025”主题论坛、诺贝尔奖大师论坛、中日韩生物技术论坛、大师校园行、企业卫星会议、大型晚宴及文艺演出、海外高层次人才和项目对接会、科技考察等活动。此外还有基因、蛋白质和多肽、抗体、疫苗、分析、遗传学 6 大分会和“第七届国际生物展”, 将举办 200 多场专题报告, 将有 400 个项目参与对接, 参展商 150 家。

本届会议议题包括细胞结构和功能的前沿进展、干细胞热门故事、细胞能量与代谢新思路、RNA 生物学前沿话题、分子与细胞生物学最新技术、分子与细胞生物学和转化医学等 5 个部分 40 场分论坛, 为国内外学术界和产业界搭建经验交流、成果分享、展览展示和交流合作的平台。