

人 IL-29 定点突变体抗肿瘤细胞增殖活性分析

李利云¹, 陆源², 葛春蕾¹, 彭荣刚³,
李昕哲³, 谭敬³, 陈永康³, 陈伟^{*3}

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

摘要: 为分析人白细胞介素-29(hIL-29) 变异体抗肿瘤细胞增殖活性, 采用大引物 PCR 方法对人 hIL-29 基因第 104 位碱基进行点突变, 使 hIL-29 肽链第 35 位 Arg 定点改造为 Lys。得到的 hIL-29 变异体基因经重组后转化毕赤酵母 GS115 和诱导表达, 经纯化获得重组蛋白 rhIL-29^{mut35}。SDS-PAGE 分析显示 rhIL-29^{mut35} 的相对分子质量约 23×10^3 , Western Blotting 鉴定显示其与羊抗人 IL-29 多克隆抗体发生特异性结合反应。用 CCK-8 试剂检测 rhIL-29^{mut35} 对肿瘤细胞增殖的影响, rhIL-29^{mut35} 在不同质量浓度时对胃癌细胞 SGC7901、肝癌细胞 BEL7402、肺腺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HCT8 的增殖均有抑制作用, 高剂量组(1 000 ng/mL)rhIL-29^{mut35} 对胃癌细胞 SGC7901、肝癌细胞 BEL7402、肺腺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HCT8 增殖的抑制率分别为 $(34.20 \pm 1.50)\%$ 、 $(27.30 \pm 0.31)\%$ 、 $(30.20 \pm 0.68)\%$ 、 $(29.13 \pm 1.40)\%$, 与阴性对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。而且高剂量组的抗增殖效应高于野生型 rhIL-29 的($P < 0.01$), 这为进一步研制开发 IL-29 的抗肿瘤药物奠定基础。

关键词: 人白细胞介素-29; 定点突变; 重组蛋白; 抗肿瘤活性

中图分类号: Q 71 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)05-0553-07

Anti-Tumor Proliferation Activity of hIL-29 Variant

LI Liyun¹, LU Yuan², GE Chunlei¹, PENG Ronggang³, LI Xinzhe³,
TAN Jing³, CHEN Yongkang³, CHEN Wei^{*3}

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

Abstract: In order to analyze the antineoplastic activity of human interleukin-29(hIL-29) variant, a mutant gene of hIL-29 was amplified by megaprimer PCR, and the Arg35 of hIL-29 peptide chain was mutated to Lys35. A recombinant plasmid was constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115, the recombinant protein rhIL-29^{mut35} was induced and purified. The purified rhIL-29^{mut35} had a relative molecular mass of about 23×10^3 on SDS-PAGE profile and showed specific reaction with

收稿日期: 2015-05-04

* 通信作者: 陈伟(1956—), 男, 江西宜丰人, 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

引用本文: 李利云, 陆源, 葛春蕾, 等. 人 IL-29 定点突变体抗肿瘤细胞增殖活性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(05): 553-559.

goat anti-human IL-29 polyclonal antibody in Western blotting. With the Cell Counting Kit-8 reagent, the rhIL-29^{mut35} was found to have anti-proliferation effect on tumor cells SGC7901, BEL7402, A549 and HCT8 separately with inhibition ratios of (34.20±1.50)%, (27.30±0.31)%, (30.20±0.68)% and (29.13±1.40)% in the high dose group. The anti-proliferation effect of rhIL-29^{mut35} was stronger than that of wild type rhIL-29 ($P<0.01$), which supported the development of antineoplastic drugs of IL-29.

Keywords: human interleukin-29, site-directed mutation, recombinant protein, antineoplastic activity

Kotenko 等^[1]和 Sheppard 等^[2]两个研究小组于 2003 年共同发现Ⅲ型干扰素,它包括 3 个成员: IFN-λ1、IFN-λ2 和 IFN-λ3,即 IL-29、IL-28A 和 IL-28B。IL-29 通过结合异源二聚体受体复合物 IFN-λR1 和 IL-10R2 激活 JAK-STAT (Janus kinase-signal transducer of transcription) 信号传导途径,从而发挥其生物学活性^[1-2]。IL-29 与Ⅰ型干扰素具有相似的生物学性质,如抗病毒、抗肿瘤、抗增殖以及免疫调节等效应^[3-5]。Miknis 等^[6]研究发现,IL-29 肽链的某些氨基酸的改变可导致其蛋白质结构发生改变,进而影响其与受体结合的亲和力,从而影响其生物学活性。

文中作者根据生物信息学分析的结果^[7],采用大引物 PCR 方法对人白细胞介素-29 (hIL-29) 基因的 104 位碱基进行突变,使 hIL-29 第 35 位 Arg 定点改造为 Lys,期望提高其抗肿瘤活性,从而为深入研究探讨 IL-29 抑制肿瘤细胞增殖的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株、质粒 人肺腺癌细胞 A549 由邱丽颖教授(江南大学无锡医学院)惠赠;人胃癌细胞 SGC7901、人结肠癌细胞 HCT8 和人肝癌细胞 BEL7402 由金坚教授(江南大学药学院)惠赠; *E. coli* JM109,毕赤酵母(*Pichapastoris*) GS115 由本实验室保存;克隆质粒 pUCm-T,购自生工生物工程(上海)股份有限公司(简称上海生工);真核表达质粒 pPIC9K^M,购自 Invitrogen 公司并经本实验室改造和保存;重组质粒 pPIC9K^M-hIL-29(整合了 hIL-29 全长 DNA 的 pPIC9K^M 质粒)由本研究室构建并保存^[8],用于表达带有天然 N 端的 hIL-29。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I 和

Sal I, T4 DNA 连接酶及 250 bp DNA Ladder Marker,低相对分子质量蛋白质标准品,均购于大连 Takara 公司;Taq plus DNA 聚合酶、硝酸纤维素膜(NC 膜)、HRP 标记兔抗羊 IgG、EZ-10 柱式 DNA 回收试剂盒,均购自上海生工;普通新生牛血清,购自浙江天杭生物科技有限公司;羊抗人 IL-29 多克隆抗体,购自美国 R&D 公司;改良型 RPMI-1640 培养基,购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;干扰素 α2b 标准品,购自北京凯因科技股份有限公司;Cell Counting Kit-8 试剂和胰酶细胞消化液,购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 引物设计及合成 以 hIL-29 基因序列为模板,通过 Oligo7 软件设计扩增编码 hIL-29 成熟肽 cDNA 的特异性上游引物(命名为 hIL-29-F)、下游引物(命名为 hIL-29-R)及突变引物(命名为 Mutant Primer)。突变引物中第 16 位碱基设计为 T,使该碱基组成的密码子由 AGG 突变为 AAG,该密码子编码的氨基酸则由 Arg 突变为 Lys。引物序列见表 1,引物由上海生工合成。

表 1 用于大引物 PCR 的引物序列

Table 1 Oligonucleotides used for megaprimer PCR

引物名称	引物序列 (5'-3')
hIL-29-F	CTCGAGAAAAGAGGCCCTGTCCCCACTTCC
hIL-29-R	CGGCGCTCAGGTGGACTCAGGGTGG
Mutant Primer	TCTTCCAATGCGTCTTGGCCTTCTTTGA

注:下划线部分表示酶切位点

1.2 方法

1.2.1 rhIL-29^{mut35} 基因的克隆与鉴定 利用大引物 PCR 方法对 hIL-29 基因进行定点突变。大引物 PCR 包括两轮 PCR 扩增,两轮 PCR 扩增都以 pPIC9K^M-hIL-29 质粒为模板。第一轮 PCR 扩增以 hIL-29-F 和 Mutant Primer 为引物,反应条件如下:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,45℃退火 30 s,

72 ℃延伸60 s,2个循环;94 ℃变性 30 s,57 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,28个循环,72 ℃延伸 10 min,10 ℃保温。PCR 产物经 1.2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后,EB 染色,按 DNA 回收试剂盒说明书回收目的片段。以第一轮 PCR 扩增的回收产物和 hIL-29-R 为引物进行第二轮 PCR 扩增,反应条件同第一轮 PCR 扩增。PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳后,EB 染色,凝胶成像仪拍照并按 DNA 回收试剂盒说明书回收目的基因片段。

1.2.2 重组真核表达质粒 pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 的构建 回收的目的基因片段与 pUCm-T 连接,化学法转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。转化液涂布于预先涂有 IPTG 和 X-gal 的氨苄抗性琼脂平板上,放置 1 h 后,倒置培养过夜。蓝白斑筛选阳性转化子进行菌液 PCR 扩增,条带大小正确的菌株送上海生工测序(命名为 JM109/pUCm-T-hIL-29^{mut35})。将测序正确的 pUCm-T-rhIL-29^{mut35} 及 pPIC9K^M 质粒双酶切然后割胶回收并连接,转化 JM109 感受态细胞,菌液 PCR 条带大小正确的菌株送上海生工测序(命名为 JM109/pPIC9K^M-hIL-29^{mut35})。

1.2.3 重组质粒 pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 的表达及鉴定 测序正确用碱裂解法抽提重组质粒 pPIC9K^M-hIL-29^{mut35} 并用 *Sal* I 线性化,电转化法转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞,转化液涂布于组氨酸缺陷型的 MD 平板。G418 筛选高拷贝重组菌株。经菌液 PCR 鉴定正确的进行甲醇诱导表达。发酵条件按照参考文献^[9]。发酵上清液经 SDS-PAGE(12 g/dL 分离胶,5 g/dL 浓缩胶)鉴定。

1.2.4 重组蛋白 rhIL-29^{mut35} 的纯化及活性分析 将发酵液离心收集上清液,经过硫酸铵沉淀初步除去色素和部分杂蛋白质。用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L,pH 6.0)将沉淀复溶,然后经透析除去部分盐离子;最后经 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析进一步纯化重组蛋白。阳离子交换层析具体步骤按参考文献^[10]。SDS-PAGE 分析各洗脱峰,将含有 rhIL-29^{mut35} 的洗脱液冷冻干燥。取冻干粉末用 PBS (10 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.2) 稀释,Western blotting 分析鉴定 rhIL-29^{mut35} 的活性,具体步骤按参考文献^[8-9]。

1.2.5 CCK-8 法检测 rhIL-29^{mut35} 抗肿瘤细胞增殖效应 肿瘤细胞 SGC7901、BEL7402、A549 和 HCT8 细胞用改良型 RPMI1640 完全培养基(含体积分数

10%小牛血清,简称 1640 完全培养基)在 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 培养箱培养和传代,取对数生长期的肿瘤细胞用体积分数为 0.25%的胰蛋白酶消化后,经血球计数板计数,用 1640 完全培养基调整细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL;按每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板,置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h 后,观察细胞贴壁情况,确认贴壁且生长良好后吸去上清液;每孔分别加入 100 μL 用 1640 完全培养基稀释的阳性对照 IFN-α2b、野生型 rhIL-29、rhIL-29^{mut35},每个样品设置 50、500 ng/mL 和 1 000 ng/mL 3 个剂量组,每组设 5 个平行孔;空白(不接种细胞)和阴性对照组(接种细胞)加入等体积的 1640 完全培养基,置 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱培养 24 h,每孔加入 10 μL Cell Counting Kit-8 试剂,继续培养 30~60 min(不同细胞测板时间不同)后用酶标仪于 450 nm 波长处测吸光度(OD₄₅₀),按式(1)计算各组样品对肿瘤细胞的增殖抑制率。

$$\text{抑制率(Inhibition ratio,IR)} = \frac{\text{OD}_{450 \text{ 阴性}} - \text{OD}_{450 \text{ 样品}}}{\text{OD}_{450 \text{ 阴性}} - \text{OD}_{450 \text{ 空白}}} \times 100\%$$

其中,OD_{450 阴性}为阴性对照组 OD₄₅₀ 值;OD_{450 样品}为样品组 OD₄₅₀ 值;OD_{450 空白}为空白组 OD₄₅₀ 值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析,用单因素方差分析各组样品对肿瘤细胞的抗增殖作用的差异,检验水准 α=0.05。

2 结果与讨论

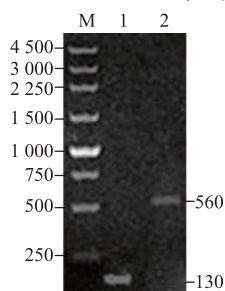
2.1 大引物 PCR 产物分析鉴定

通过大引物 PCR,第一轮 PCR 产物经 1.2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 130 bp 的特异性条带,大小与理论值相符(见图 1 泳道 1);第二轮 PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析,在约 560 bp 可见特异性条带,且与理论值相符(见图 1 泳道 2)。

2.2 重组质粒测序及序列比对结果

阳性转化子 JM109/pUCm-T-hIL-29^{mut35} 的测序结果显示其大小为 546 bp,编码 181 个氨基酸;将测定的序列与 Gene Bank 的 hIL-29 基因序列(登录号:AY336716.1)比对,结果显示重组质粒 JM109/pUCm-T-hIL-29^{mut35} 中目的基因第 104 位碱基 G 成功突变为 A,且其余序列完全一致(见图 2)。重组真核表达质粒 JM109/pPIC9K^M-hIL-29^{mut35} 的测序鉴定

结果显示, JM109/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 中目的基因与 JM109/pUCm-T-rhIL-29^{mut35} 中的完全一致。



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: 第一轮 PCR 产物; 2: 第二轮 PCR 产物

图 1 大引物 PCR 结果

Fig. 1 Result of megaprimer PCR

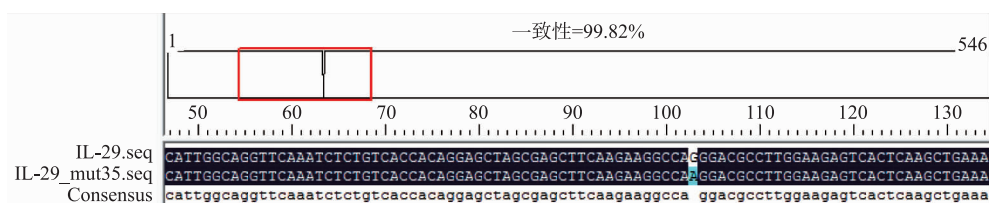
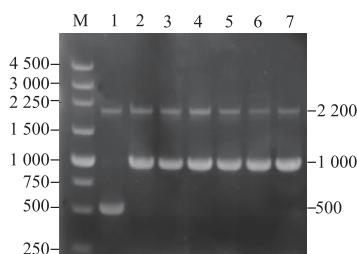


图 2 hIL-29 和 rhIL-29^{mut35} 的序列比对结果

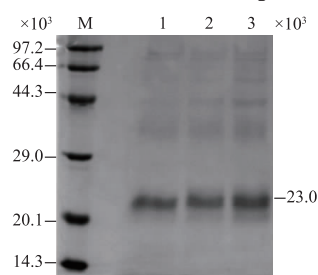
Fig. 2 Sequence comparison result of hIL-29 and rhIL-29^{mut35}



M: 250 bp DNA Ladder Marker; 1: GS115/pPIC9K^M; 2-7: GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35}

图 3 GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 的菌液 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR confirmation of GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35}



M: 低相对分子质量标准蛋白质; 1-3: GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 的发酵上清液

图 4 GS115/pPIC9K^M-hIL-29^{mut35} 重组子发酵液上清的 SDS-PAGE 分析

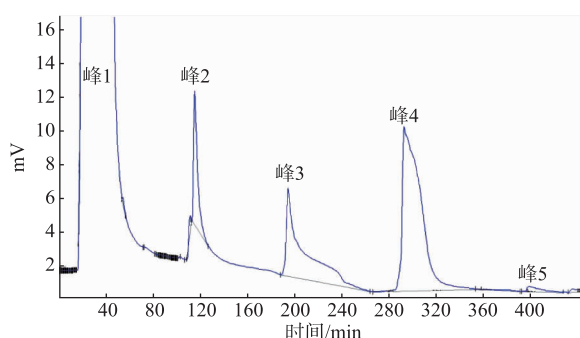
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expressed supernatant of recombinant GS115/pPIC9K^M-hIL-29^{mut35}

2.3 重组质粒 pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 在 *P. pastoris* GS115 中的表达及鉴定

用 3'-AOX 和 5'-AOX 通用引物进行酵母菌液 PCR 扩增, 以空酵母 GS115 的基因组为模板作对照, 扩增出约 2 200 bp 和 500 bp 的 DNA 条带; 而以 GS115/pPIC9K^M-hIL-29^{mut35} 重组子为模板, PCR 扩增出约 2 200 bp 和 1 000 bp 的特异性条带 (见图 3), 表明 hIL-29^{mut35} 基因已成功整合入宿主基因组中。鉴定正确的重组子按参考文献^[8]条件进行发酵, 发酵上清液经 SDS-PAGE (12 g/dL 分离胶, 5 g/dL 浓缩胶) 鉴定。在约 23 000 处可见目的蛋白质条带, 与理论值相符 (见图 4)。

2.4 rhIL-29^{mut35} 的纯化及活性分析

发酵上清液经硫酸铵沉淀、透析后, 再经 SP-Sepharose Fast Flow 交换层析洗脱收集洗脱液, 用 SDS-PAGE 分析结果显示, rhIL-29^{mut35} 主要出现在含 0.6 mol/L NaCl 的液洗脱峰 (峰 4), 其余洗脱峰为杂蛋白质 (见图 5)。



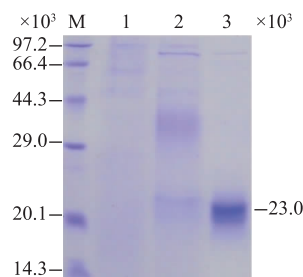
峰 1: 流穿峰; 峰 2: 0.2 mol/L NaCl 缓冲液的洗脱峰; 峰 3: 0.4 mol/L NaCl 缓冲液的洗脱峰; 峰 4: 0.6 mol/L NaCl 缓冲液的洗脱峰; 峰 5: 0.8 mol/L NaCl 缓冲液的洗脱峰

图 5 rhIL-29^{mut35} 的 SP-Sepharose Fast Flow 离子交换层析

Fig. 5 SP-Sepharose Fast Flow cation exchange column of rhIL-29^{mut35}

取纯化的 rhIL-29^{mut35} 及未纯化发酵液进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析结果显示, 纯化

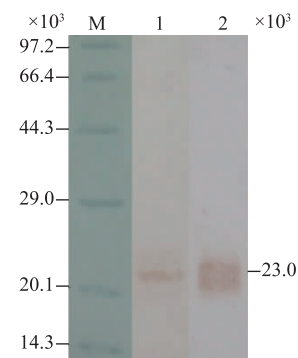
的 rhIL-29^{mut35} 在 SDS-PAGE 及 Western blotting 图谱上均出现单一条带,其相对分子质量大小约 23 000(见图 6—7),表明纯化的 rhIL-29^{mut35} 可与羊抗人 IL-29 抗体发生特异性结合反应,保持了免疫学活性,可用于体外细胞学活性的检测。



M:低相对分子质量标准蛋白质;1:GS115/pPIC9K^M 发酵上清液;2:GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 发酵上清液;3: 纯化蛋白 rhIL-29^{mut35}

图 6 rhIL-29^{mut35} 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of rhIL-29^{mut35}



M: 低相对分子质量标准蛋白质;1:GS115/pPIC9K^M-rhIL-29^{mut35} 发酵上清液;2:纯化蛋白 rhIL-29^{mut35}

图 7 rhIL-29^{mut35} 的 Western blotting 鉴定

Fig. 7 Western blot analysis of rhIL-29^{mut35}

2.5 rhIL-29^{mut35} 的抗肿瘤细胞增殖活性

按 1.2.5 方法检测 rhIL-29^{mut35} 对 4 种肿瘤细胞的增殖抑制效应显示,不同剂量组的 rhIL-29^{mut35} 对胃癌细胞 SGC7901、肝癌细胞 BEL7402、肺腺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HCT8 的增殖均表现出抑制作用(见表 2);尤其高剂量组对 4 株肿瘤细胞的增殖均具有较强的抑制效应,与阴性对照组相比,差异均具有显著的统计学意义 ($P<0.01$)。采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,不同质量浓度 rhIL-29^{mut35} 对肿瘤细胞 SGC7901、BEL7402、A549 和 HCT8 的抑制率的 P 值见表 3。

表 2 rhIL-29^{mut35} 对肿瘤细胞 SGC7901、BEL7402、A549 和 HCT8 的抑制率

Table 2 Inhibition ratios of tumor cells SGC7901, BEL7402, A549 and HCT8 by rhIL-29^{mut35}

rhIL-29 ^{mut35} 剂量组/ (ng/mL)	SGC7901	BEL7402	A549	HCT8
50	(9.29± 0.66)%	(8.85± 0.11)%	(15.25± 0.85)%	(12.72± 0.29)%
500	(18.25± 0.99)%	(19.98± 0.33)%	(20.64± 2.45)%	(20.19± 0.39)%
1 000	(34.20± 1.50)%	(27.30± 0.31)%	(30.20± 0.68)%	(29.13± 1.40)%

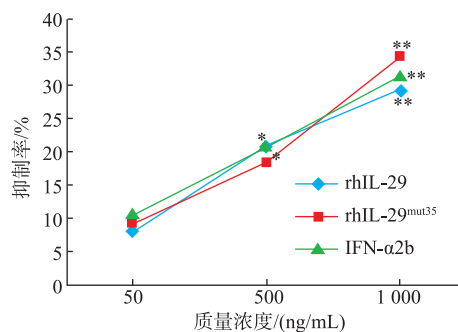
表 3 rhIL-29^{mut35} 对肿瘤细胞 SGC7901、BEL7402、A549 和 HCT8 的抑制率的 P 值

Table 3 P values of inhibition ratios of tumor cells SGC7901, BEL7402, A549 and HCT8 by rhIL-29^{mut35}

rhIL-29 ^{mut35} 剂量组/ (ng/mL)	SGC7901	BEL7402	A549	HCT8
50	0.316	0.001	0.000	0.020
500	0.053	0.000	0.000	0.000
1000	0.001	0.000	0.000	0.000

注: P 值:与阴性对照相比

方差分析结果显示, rhIL-29^{mut35}、IFN- α 2b 及野生型 rhIL-29 对肿瘤细胞 SGC7901、BEL7402、A549 和 HCT8 增殖的抑制各有差异。对胃癌细胞 SGC7901, 高剂量组 rhIL-29^{mut35} 的抑制效应高于 IFN- α 2b 及 rhIL-29 的(见图 8), 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。



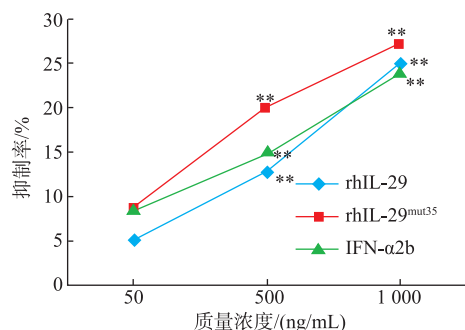
* $P<0.05$; ** $P<0.01$, 与阴性对照相比

图 8 rhIL-29^{mut35} 对胃癌细胞 SGC7901 的抗增殖效应

Fig. 8 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut35} on the gastric cancer cell SGC7901

对肝癌细胞 BEL7402, 中剂量组 rhIL-29^{mut35} 的

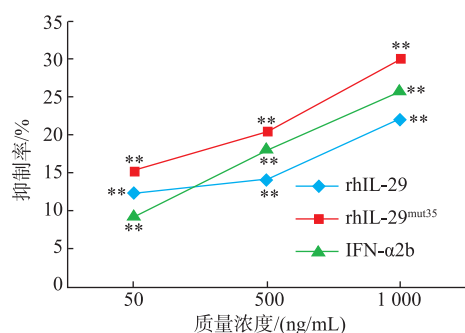
抑制效应显著高于 IFN- α 2b 及 rhIL-29 的,差异具有显著统计学意义($P<0.01$),而 3 个样品高剂量组对 BEL7402 细胞的增殖抑制效应差异不大,无统计学意义(见图 9)。



* $P<0.05$; ** $P<0.01$, 与阴性对照相比

图 9 rhIL-29^{mut35} 对肝癌细胞 BEL7402 的抗增殖效应
Fig. 9 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut35} on the liver cancer cell BEL7402

对肺腺癌细胞 A549,高、中和低剂量组 rhIL-29^{mut35} 的抑制效应均大于野生型 rhIL-29 及 IFN- α 2b 的,其中高剂量组的效应显著高于 IFN- α 2b 及野生型 rhIL-29,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明 rhIL-29^{mut35} 对 A549 的增殖抑制效应较强(见图 10)。



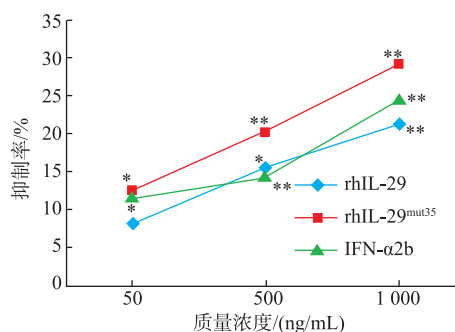
* $P<0.05$; ** $P<0.01$, 与阴性对照相比

图 10 rhIL-29^{mut35} 对肺腺癌细胞 A549 的抗增殖效应
Fig. 10 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut35} on the lung adenocarcinoma cell A549

参考文献:

- [1] KOTENKO S V, GALLAGHER G, BAURIN V V, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 69-77.
- [2] SHEPPARD P, KINDSVOGEL W, XU W F, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(1): 63-68.
- [3] GUENTERBERG K D, GRIGNOL V P, RAIG E T, et al. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal

对结肠癌细胞 HCT8,高、中和低剂量组 rhIL-29^{mut35} 的抑制效应均大于野生型 rhIL-29 及 IFN- α 2b 的,尤其高、中剂量组的效应显著高于野生型 rhIL-29 及 IFN- α 2b,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明 rhIL-29^{mut35} 对 HCT8 的增殖抑制作用较强(见图 11)。



* $P<0.05$; ** $P<0.01$, 与阴性对照相比

图 11 rhIL-29^{mut35} 对结肠癌细胞 HCT8 的抗增殖效应
Fig. 11 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut35} on the colon cancer cell HCT8

3 结 语

文中作者采用定点突变方法对 hIL-29 肽链进行分子改造后,得到的变异体 rhIL-29^{mut35} 蛋白对胃癌细胞 SGC7901、肝癌细胞 BEL7402、肺腺癌细胞 A549 和结肠癌细胞 HCT8 的增殖抑制作用均高于野生型 rhIL-29,表明对 hIL-29 与受体结合的关键位点进行定点改造可望提高其抗增殖作用。rhIL-29^{mut35} 对 4 种肿瘤细胞增殖表现出不同的抑制效应,可能是因不同肿瘤细胞的 IL-29 受体表达存在差异^[1]。Li 等^[12]研究表明,IL-29 可通过诱导细胞凋亡和阻滞细胞分裂而抑制肿瘤细胞的增殖,但关键位点氨基酸与 IL-29 抗肿瘤细胞增殖的构效关系及作用机理还需深入研究,从而为研制开发 IL-29 的抗肿瘤药物奠定免疫药理基础。

- transduction and apoptosis[J]. **Mol Cancer Ther**,2010,9(2):510-520.
- [4] MAHER S G,SHEIKH F,SCARZELLO A J,et al. IFN- α and IFN- λ differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity[J]. **Cancer Biol Ther**,2008,7(7):1109-1115.
- [5] MEAGER A,VISVALINGAM K,DILGER P,et al. Biological activity of interleukins-28and-29:comparison with type I interferons[J]. **Cytokine**,2005,31(2):109-118.
- [6] MIKNIS Z J,MAGRACHEVA E,LI W,et al. Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ RI[J]. **J MolBiol**,2010,404(4):650-664.
- [7] ZHENG Haijun,ZHU Rong,GE Chunlei,et al. Bioinformatics of human interleukin-29 [J]. **Chin J Biologicals March**,2013,26(2):209-212.(in Chinese)
- [8] CHEN Wei,YU Minglei,ZHENG Haijun,et al. Cloning and eukaryotic expression of human interleukin-29 gene [J]. **Chin J Biologicals March**,2012,25(4):446-448.(in Chinese)
- [9] 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]. **Chin J Biologicals March**,2013,26(3):402-405.(in Chinese)
- [10] LU Yuan,CHEN Wei,LI Liyun,et al. Expression of recombinant human interleukin-29 mutant in *Pichia pastoris* and antitumor analysis[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(2):185-191.(in Chinese)
- [11] WITTE K,WITTE E,SABAT R,et al. IL-28A,IL-28B,and IL-29:promising cytokines with type I interferon-like properites[J]. **Cytokines Growth Factor Rev**,2010,21(4):237-251.
- [12] 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]. **Eur J Cancer**,2010,46(1):180-190.

科技信息

欧盟批准一项关于乳糖醇的健康声称

2017年4月11日,据欧盟网站消息,欧盟发布(EU) 2017/676 条例,修订(EU) No 432/2012,批准一项乳糖醇(lactitol)健康声称。

本次健康声称申请由杜邦公司提交。欧盟食品安全局经过评估认为,乳糖醇可通过增加排便频率来维持正常的肠道功能。

与此有关的使用条件为,该声称仅限于每日定量摄取的含有 10 g 乳糖醇的食品补充剂中,应该向消费者说明每日摄取 10 g 乳糖醇才会促进正常的肠道功能。

新条例规定,该声称不能面向儿童。新条例自发布后第 20 日起生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟批准一项关于乳糖醇的健康声称 [EB/OL]. (2017-4-17). <http://news.foodmate.net/2017/04/425700.html>