

基因工程人白细胞介素-2的生物功能研究

刘新垣¹ 虞建良¹ 郑宏大¹ 陈寅¹ 沈菊芳¹
 冯作化² 陈兆聪² 尤丽芳³ 孙邦华³ 周瑶玺³
 姚堃³ 常经丽⁴ 臧人杰⁴ 唐思伦⁴ 张叔人⁵
 张友会⁵ 姜延芳⁶ 沈优君⁶

¹ (中国科学院上海生物化学研究所, 上海)

² (同济医科大学, 武汉)

³ (南京医学院, 南京)

⁴ (上海第二医科大学, 上海)

⁵ (中国医学科学院肿瘤研究所, 北京)

⁶ (上海第一医科大学, 上海)

重组白细胞介素-2(rIL-2), 能维持T-淋巴细胞及CTLL-2细胞株(IL-2依赖)的增殖达一个月之久, 细胞总数增加了近千倍。这种作用能被rIL-2专一的单克隆抗体破坏, 显示rIL-2的专一性; rIL-2能增加天然杀伤细胞(NK)的活动达46—96%, 但其剂量太高时反而起抑制作用; 它能诱导淋巴因子激活的杀伤细胞(Lymphokine Activated Killer, LAK)的生成, 它还能杀伤转移性人肺癌细胞及抗NK的HL-60癌细胞株, 其杀伤效率达37.96—54.84%。这说明我们获得的rIL-2在上述生物功能方面与天然IL-2相似。

关键词 重组白细胞介素-2(rIL-2); rIL-2的生物功能; NK活性; LAK活性; T细胞增殖

白细胞介素-2(IL-2)是T细胞产生的一种淋巴因子, 对免疫应答的产生和调节起重要作用。它作用于含有IL-2受体的各种细胞, 从而发生多种功能, 主要包括: 1. 在体外维持T细胞的存活和长期增殖, 在体内加强T细胞的免疫应答^[1]; 2. 使NK细胞活化和增殖成为LAK细胞^[2], 使特异的CTLL活化和增殖成为肿瘤浸润细胞(Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL), 两者均为抗肿瘤的免疫活性细胞; 3. 加强 γ -型干扰素(IFN- γ)的产生^[4], 间接促使各种细胞表面MHC抗原的表达^[5]。由于IL-2的上述功能, 对癌症的治疗可能有重要价值。据报道^[6], 用它治疗25例已有转移的癌症病人, 其中11人瘤块缩小了50%,

效果良好。另据报道^[7], 目前已有五个厂家8种IL-2样品在进行临床试验。

用细胞培养生产IL-2, 产量低、价值贵, 不能满足需要。基因工程IL-2, 即重组IL-2(rIL-2)可以大量生产供应临床试验。本文对自制rIL-2的一些生物学活性进行了实验观察。迄今国内未见同类实验的报道。

材料与方 法

(一) 材料

1. 重组IL-2(rIL-2): 中国科学院上海生化所研制, 表达质粒在大肠杆菌

本文于1989年9月28日收到,

中表达之后, 分离包涵体, 溶解出 IL-2 并加以复性, 纯度 > 80%, 比活接近 1×10^6 u/mg IL-2^[8]。

2. 标准 rIL-2: Boehringer Mannheim 产品。

3. 抗人 rIL-2 单克隆抗体 (3B5)^[9]: 小鼠血清正常抗体 (由小鼠血清中分离得到)。IL-2 依赖的 CTLL-2 细胞等由中国医学科学院肿瘤研究所免疫室提供。

4. K₅₆₂ 细胞: 购自上海肿瘤所开发部。

5. 其他材料: 铬酸钠 (Na₂⁵¹CrO₄) 购自北京原子能研究所; 人外周血, 献血者提供, 肝素抗凝; ³H-TdR 为上海原子核研究所产品 ($30 \times 3.7 \times 10^{10}$ Bq/mole); PHA 为中科院上海生化所附属东风厂产品。

6. RPMI 1640 (Gibco) 培养液: 含 10% 小牛血清, L-谷氨酰胺 (300 μg/ml), 青霉素 (100 u/ml), 链霉素 (100 μg/ml)。长期培养 T 淋巴细胞时补加胰岛素 20 μg/ml, 转铁蛋白 20 μg/ml。

(二) 方法

1. rIL-2 的活性测定: 用 IL-2 依赖的 CTLL-2 细胞, 参照文献 [10] 的方法, 根据 ³H-TdR 的掺入量来确定 IL-2 的含量^[10]。

2. 人 T 淋巴细胞的制备: 取肝素抗凝的人外周血, 用比重 1.077 的淋巴细胞分层液分离淋巴细胞^[6], Hanks 液洗 2 遍, 悬浮于 RPMI 1640 培养液中, 最后细胞浓度为 1×10^6 /ml, 加 PHA 至 100 μg/ml, 置 37°C, 5% CO₂ 培养箱, 培养 4 天, 用人淋巴细胞分层液分离转化的母细胞 (方法同分离外周血淋巴细胞) 洗 2 遍, 悬浮于 RPMI 1640 营养液中, 经台盼蓝染色计数, 活细胞比例 > 98%。

3. 人血 NK 细胞活性检测方法^[11];

效应细胞来自两位献血员的新鲜抗凝血液, 用淋巴细胞分离液处理, 得单核细胞, 用培养液制成悬液, 计数, 调整活细胞数至 5×10^6 /ml, 加于小试管, 每管 0.5 ml, 加等体积不同稀释度的 IL-2, 每管 0.5 ml, 每一稀释度作三个复管, 37°C 18 h 后, 经洗涤、计数, 调整上述效应细胞数到 5×10^5 /ml。靶细胞则为 2 天前换液培养的 K₅₆₂ 细胞, 调到 4×10^6 /ml, 加 Na₂⁵¹CrO₄ 3.7×10^6 Bq, 37°C 水浴 90 min, 然后洗去游离的 ⁵¹Cr, 计数靶细胞, 调到 1×10^5 /ml。

NK 细胞活性检测采用对倍稀释的方法。自然杀伤组的效应细胞和铬标记的靶细胞各为 0.2 ml; 自然释放组以培养液代效应细胞, 最大释放组也不加效应细胞, 但加 2% SDS 使标记的靶细胞裂解, 置 37°C 4 h, 然后加冷却的 Hanks 液 0.6 ml, 终止反应, 经离心, 吸去上清 0.5 ml, 用 Fj-454 型 γ 计数器测放射性。

$$\text{自然释放率}(\%) = \frac{\text{自然释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm}} \times 100$$

$$\text{自然杀伤率}(\%) = \frac{\text{试验组释放 cpm} - \text{自然释放组 cpm}}{\text{最大释放组 cpm} - \text{自然释放组 cpm}} \times 100$$

4. rIL-2 诱导人淋巴细胞激活与增殖——LAK 细胞形成^[12]: 常规分离人外周血淋巴细胞, 用两种方法制备 LAK 细胞, 一为 96 孔微量培养法, 另一为培养瓶法。前者细胞浓度为 $1-2 \times 10^5$ /ml, 每孔体积 0.2 ml, 加 rIL-2 (最终为 15 u/ml), 培养一定时间后加 ³HTdR (1 μCi/孔), 再培养 16 h 后测 ³HTdR 的掺入量。后者细胞浓度 1×10^6 /ml, 每瓶体积 5—8 ml, 加 rIL-2 到 15 u/ml, 培养一定时间后收获细胞, 作杀伤实验的效应细胞。

5. ^{51}Cr 释放实验^[12]: 靶细胞系裸鼠体内接种的人肺癌新鲜实体瘤细胞和 HL-60 传代细胞系。实体瘤细胞于实验前一天复苏, ^{51}Cr 标记量为 $200\text{--}400\mu\text{Ci}/2\text{--}5 \times 10^6$ 细胞, 传代细胞的 ^{51}Cr 标记量为 $100\text{--}200\mu\text{Ci}/1\text{--}2 \times 10^6$ 细胞数, 标记总体积小于 0.5ml , 标记时间 $2\text{--}3\text{h}$ 。

效应细胞于实验当天收获, 将效靶以合适比例混合, 37°C 5% CO_2 孵箱内培养 4h , 收上清测 ^{51}Cr 释放量, 杀伤率公式为

杀伤率(%) =

$$\frac{\text{实验组 cpm} - \text{自发释放 cpm}}{\text{最大释放 cpm} - \text{自发释放 cpm}} \times 100$$

结 果

IL-2 有许多重要生物功能, 下面报道中国科学院上海生物化学研究所制备的, 部分纯化 IL-2 的一些生物功能研究结果, 并用单抗证明这些功能仍是 rIL-2 的专一性作用, 而非大肠杆菌中的杂质所引起。

(一) rIL-2 对维持 CTLL-2 细胞生长增殖的作用

取 PHA 刺激 4 天后分离的 T 淋巴母细胞, 加入 96 孔培养板, 2×10^4 /孔, 以 10u/ml 的 rIL-2 传代培养。于传代培养的第 4、11、18、25、28 天取出一部分细胞转入另一培养板, 分为 2 组, 一组继续加 rIL-2 10u/ml 培养, 另一组不加 rIL-2, 或只加 PHA 刺激作为空白对照, 两组细胞再培养 3 天, 加 $^3\text{H-TdR}$ 标记 8h, 结果细胞能继续持久增殖, 至第 28 天时, 仍可继续掺入 $^3\text{H-TdR}$, 表明此时细胞仍有增殖能力。细胞增殖情况见图 1, 28 天后, 细胞总数增加了 988 倍 (4 次实验, cpm 值在 $616\text{--}1360$ 倍之间, 平均为 988 ± 409 倍)。

若不加 rIL-2 或单用 PHA 刺激, 3 天后细胞即停止增殖。

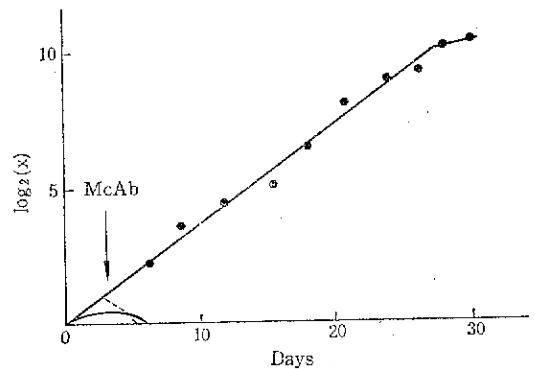


图 1 重组白细胞介素-2 维持 T 淋巴细胞增殖作用

Fig. 1 Maintenance of T lymphocyte multiplication by rIL-2

纵坐标中 X 为 T 淋巴细胞的增殖倍数

X in ordinate stands for the multiplication times of T lymphocytes

上述维持 T-淋巴细胞的增殖, 的确是由于 rIL-2 的专一作用而非大肠杆菌任何其他物质的功能, 因为在加 rIL-2 的同时, 如加入 rIL-2 的单克隆抗体 (3B5), 则上述 rIL-2 维持 T-淋巴细胞的增殖功能立即被取消了, 这一强有力的证据说明 rIL-2 对维持 T-淋巴细胞增殖的重要作用。

(二) rIL-2 单克隆抗体对 rIL-2 功能的抑制作用

在 96 孔板中, 每孔加入 2×10^4 T-淋巴细胞, 再加入 2u rIL-2, 同时加入不同浓度的 rIL-2 抗体 (3B5), 最后总体积为 0.2ml , 培养 64h , 加入 $^3\text{H-TdR}$, 继续培养 8h 。图 2 结果可见, 随着 rIL-2 抗体浓度的增加, T-淋巴细胞的生存率下降, 故 $^3\text{H-TdR}$ 的掺入下降。

用 IL-2 依赖的 CTLL-2 传代细胞, 所得结果也与此类似 (数据未列出), 即 rIL-2 抗体 3B5 对 rIL-2 的生物功能也表现

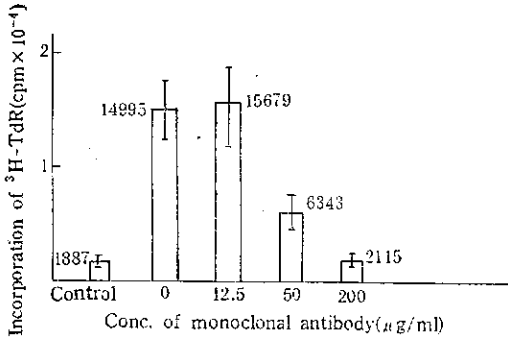


图 2 不同浓度IL-2抗体(3B5)对rIL-2功能的抑制作用

Fig.2 Inhibition to the function of rIL-2 by antibodies of rIL-2(3B5)

图中cpm值为三次实验结果的平均值,具体实验条件见正文

The value of cpm is the average result of three experiments,For details,see the text

明显的抑制作用,而正常鼠血清抗体(MIg)则对rIL-2的功能无任何影响。上述结果充分说明rIL-2能维持T-淋巴细胞及CTLL-2的增殖是由于rIL-2的专一性作用,而非大肠杆菌中杂质所引起。

(三) rIL-2对NK细胞活性的增强作用

取二名输血员外周血做NK活性试验,51Cr标记细胞的自然释放率为7.76%,符合释放试验要求。IL-2的浓度逐渐提高,它对NK活性的增强效应也随之上升(表1),但过高浓度的IL-2对NK活性似有抑制作用,符合国外文献报道。

(四) LAK细胞的培养及LAK对肿瘤的杀伤效率

在肯定了所制备的rIL-2生物学活性后,又进一步研究了rIL-2激活人LAK细胞形成的能力,结果见表2。在缺乏任何外来物质刺激的条件下,不同培养天数后,rIL-2均能引起人的淋巴细胞的增殖反应,随着培养天数的增加,增殖反应能力增强,符合文献报道关于LAK细胞增

表 1 rIL-2对NK细胞活性的影响 Table 1 Effect of rIL-2 on the activity of NK

| Concentration of rIL-2(u/ml) | Release of ⁵¹ Cr(%) | |
|------------------------------|--------------------------------|---------------|
| | Blood donor1 | Blood donor 2 |
| 0 | 23.18 | 23.96 |
| 10 | 22.46 | |
| 100 | 32.19 | 33.30 |
| 1000 | 44.98 | 35.02 |
| 10000 | 19.94 | 6.91 |
| 100000 | 3.24 | 1.38 |

三次实验结果类似,选其中典型的一次结果列于表中,具体实验方法见正文

The results of three experiments are similar. Data presented is a typical one. For details,see the text

殖动力学的研究结果^[1,2]。经IL-2激活的LAK细胞对培养的肿瘤细胞以及新鲜分离的人实体瘤均具有杀伤能力。本实验将人肺癌组织接种于裸鼠并获生长成功,用此裸鼠体内转移性人肺癌细胞和人HL-60细胞株(NK抵抗)作靶细胞,研究了rIL-2激活的LAK细胞的杀伤能力,从图3可见,无论是NK抵抗的HL-60细胞株还是新鲜实体瘤细胞,LAK细胞均能杀伤之,随着效靶比例增大,杀伤百分率也增加。因对传代的HL-60细胞株也有效,

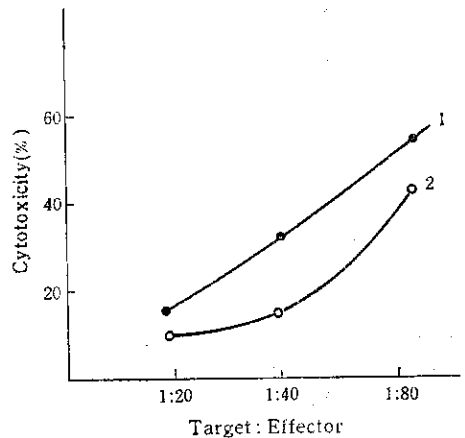


图 3 人LAK细胞在试管内杀伤肿瘤细胞的作用 Fig.3 In vitro cytotoxicity of LAK against cultured cell line and solid tumor 1. HL-60细胞株 HL-60 cell line 2. 人肿瘤细胞 human lung carcinoma

故排除了由于组织相容性抗原不同导致细胞毒所产生的作用。

表 2 rIL-2诱导LAK的生成与增殖
Table 2 Induction and multiplication
of LAK cells by rIL-2

| Culture time (Days) | ³ H-TdR uptake (cpm × 10 ⁻⁴) |
|------------------------|--|
| 3 | 8880 ± 294.16 |
| 6 | 54020 ± 276.89 |
| 8 | 83423.5 ± 4346.19 |

每空 2×10^4 个细胞与 rIL-2 共同保温到一定天数后,加 ³H-TdR 再培养 16h, 然后收集细胞, 测定其 cpm 值, 表中结果为 3 次实验平均值

2×10^4 human lymphocytes per well were cultured with our rIL-2 for some days. ³H-TdR was added and the cells were cultured for another 16 h. Then cells were harvested and assayed for ³H-TdR uptake. The results are mean value of three experiments

讨 论

IL-2 的临床研究有很大的进展^[13], rIL-2 与天然 IL-2 生物功能基本相似, 目前 rIL-2 在国外已有很多公司大规模生产^[7]。

中科院上海生化所在大肠杆菌中表达了 IL-2, 其产率较高, 约占菌体总蛋白的 30—40%, 分离包涵体, 其纯度可达 70—80% (本文所用 rIL-2 纯度 > 80%), 溶解包涵体后, 基本上可完全恢复其生物活性, 达 10^6 u/mg rIL-2, 应用这种样品, 我们研究了它的生物功能, 证明它与天然 IL-2 的生物功能相似。rIL-2 的这些功能

并非大肠杆菌中杂质所引起, 而是 rIL-2 的专一作用, 其证据如下: 1. CTLL-2 需要依赖 IL-2 才能生长, 虽然它无种属转异性(即人、鼠等 rIL-2 均能维持 CTLL-2 的增殖), 但对 IL-2 要求的专一性则很强, 其他因子不能维持它的增殖, 而上述 rIL-2 则能维持 CTLL-2 细胞的增殖。2. rIL-2 维持 T-淋巴母细胞及 CTLL-2 细胞的增殖, 可被人的专一性的 rIL-2 的单克隆抗体进行专一性的阻断, 而鼠的抗体无此作用。rIL-2 的研究成功, 对 IL-2 的临床应用研究将有很大的推进作用。

IL-2 的临床应用, 虽然取得较大进展, 但目前还有一些问题有待解决, 主要是 IL-2 的半衰期短, 很快失活, 而用量太大又产生严重毒性, 为了解决这个问题, 目前国际上已采取如下措施: 1. 在基因水平上进行改造, 改变 IL-2 基因的密码子产生新型蛋白质, 使其功能得到改进(包括毒性下降)。2. 在蛋白质水平上进行改造, 在 rIL-2 蛋白分子上加聚乙二醇(PEG)、肝素等大分子基因, 可使之毒性降低, 半衰期延长。3. rIL-2 与 LAK 及肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor Infiltrating Lymphocyte, TIL)合用, 特别是 TIL 细胞很有潜力。4. rIL-2 与肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF), IFN- α 、IFN- γ 等其他淋巴因子合用能增强它们的效应。上述 4 点我们也都都在研究之中。

参 考 文 献

- [1] 刘新垣: 前进中的生物化学论文集, 沈绍文主编, pp. 134—142, 中国科学出版社, 1987.
- [2] Herberman, R. B. et al., *Immunol. Today*, 8: 178—181, 1987.
- [3] Rabinowich, H. et al., *Cancer Research*, 47: 173—177, 1987.
- [4] Vilcek, J. et al., *Immunol.*, 135: 1851, 1985.
- [5] Doherty, P. G., *British Med. Bull.*, 41: 7—14, 1985.
- [6] Rosenberg, S. A. et al., *New Eng. J. Med.*, 313: 1485—1492, 1985.
- [7] 戴頌志: 国外医学情报, 10: 14, 1989.
- [8] Liu Xinyuan et al., Annual Meeting of the International Society for Interferon Research, p. 45, 1988.

- [9] 张叔人等: 中国医学科学院院报, 10,56,1989.
 [10] 匡彦德等: 上海医科大学学报, 14:10—13,1987.
 [11] 田培坤等: 细胞生物学杂志, 6:36—39,1984.
 [12] 常经丽等: 9:79, 1989.
 [13] Rosenberg, et al. : *Prog. Can. Res.*, p.55—90, 1986.
 [14] Jun guoya, et al. : *J. Med. Coll. PLA*, 3:374—379, 1988.
 [15] 郭亚军、刘 垣: 肿瘤, 3:147, 1989.

Biological Functions of Recombinant Human Interleukin-2

Liu Xinyuan¹ Yu Jianliang¹ Zheng Hongda¹ Chen Yin¹
 Shen Jufang¹, Feng Zuohua² Chen Zhaocong², You Lifang³
 Sun Banghua³ Zhou Yaoyu³, Yao Kun³ Chang Jingli⁴
Zhang Renjie⁴ Tang Silun⁴ Zhang Shuren⁵ Zhang Youhui⁵
 Jiang Yanfang⁶ Shen Youjun⁶

- 1 (Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)
 2 (Tongji Medical University, Wuhan)
 3 (Nanjing Medical College, Nanjing)
 4 (Shanghai Second Medical University, Shanghai)
 5 (Institute of Oncology, Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing)
 6 (Shanghai First Medical University, Shanghai)

Recombinant interleukin-2 (rIL-2) is able to maintain the growth and multiplication of T-lymphocytes and IL-2 dependent CTLL-2 cells up to 28 days with the multiplication of T-lymphocytes as high as about 1000 fold. When rIL-2 and its monoclonal antibody were added together, the above functions of rIL-2 were specially blocked, showing that these biological functions were exerted specifically by rIL-2. The rIL-2 is also able to increase the NK (natural killer) activity up to 46—96%, while higher concentrations of rIL-2 might exhibit inhibitory effect. The cytotoxicity of LAK cells induced by rIL-2 for killing HL-60 cell line and solid tumour (human lung carcinoma) reached 54.84% and 37.96%, respectively. All above results indicate that the biological functions of rIL-2 were quite similar to that of the natural one.

Key words

Recombinant interleukin-2 (rIL-2); biological functions of rIL-2; NK activity; LAK activity; T-cell multiplication