

人肿瘤坏死因子衍生物 b cDNA 的构建与表达

邵轶虹 喻 红 庄 黎 林丽珠 赵寿元 李昌本

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 构建了人肿瘤坏死因子缺失 1~7 位和 102~107 位共 13 个氨基酸编码序列的 cDNA,即人肿瘤坏死因子衍生物 b(rhTNF α Db),转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导后,目的蛋白的表达量占菌体总蛋白量的 30%~60%。其中可溶性 rhTNF α Db 蛋白约占超声上清总蛋白的 40%。经柱层析纯化后,目的蛋白纯度达 95%以上。以 L929 细胞株检测 rhTNF α Db 的细胞毒活性,测得 rhTNF α Db 的比活性为 2×10^8 IU/mg。较 rhTNF α 原型提高一个数量级。rhTNF α Db 的体内外抑瘤试验也取得了初步结果。

关键词 肿瘤坏死因子衍生物, 表达, 抑瘤活性

分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999) 02-0189-95

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)是 Carswell 等人在 1975 年发现并命名的^[1]。TNF 是一种由激活的巨噬细胞产生的细胞因子,具广泛的生物学效应。对体内及体外培养的肿瘤细胞具有直接的抑制作用。此外还有抗病毒、细菌及寄生虫等作用。1987 年,美国、日本等国家开始进行人肿瘤坏死因子的临床抗肿瘤试验^[2,3]。在此过程中, TNF 表现出了对人体的毒副作用。为克服 hTNF α 的毒副作用,人们在局部给药、复合用药和对 rhTNF α 结构改造提高活性降低毒副作用两方面作了不懈的努力。1996 年 3 月在“TNF 和相关细胞因子临床和生物学功能”国际会议上,瑞典、荷兰和美国的几个研究组报道, rhTNF α 、IFN 以及 melphalan 联合用药,通过局部灌注治疗 300 多例四肢恶性黑色素瘤、软组织肉瘤患者,治癌率达 80%以上, rhTNF α 用量高达 3~4mg/肢体也未出现毒性死亡^[4]。因此, rhTNF α 是一种前景看好的肿瘤治疗药物。另一方面,自 80 年代以来,构建高效低毒的 rhTNF α 衍生物的努力一直没有停止过。在肿瘤坏死因子的三级结构中, N 端的 10 个氨基酸处于比较游离的状态,可变动性较大。日本的中村等人发现, N 末端切去 7 个氨基酸, Pro⁸-Ser⁹-Asp¹⁰变为 Arg-Lys-Arg, 可以提高细胞毒活性,降低致死毒性^[5]。而 C 端参与稳定三聚体作用,又处于分子内部,活动度小。据报道, C 端 157 位由 Leu 变为 Phe,能使肿瘤坏死因子诱导 U937 细胞分化的作用增加 20 倍^[6],但稳定性下降。hTNF α 的中部区段(101~103 位氨基酸)中引入部分缺失对 hTNF α 的细胞毒活性有提高^[7]。

本实验室已研究了氨基端、羧基端及中部区段经过修饰的 hTNF α ,发现生物活性都有不同程度的提高^[8,9]。本文报道构建的衍生物(rhTNF α Db),具有细胞毒活性高、抑瘤

谱广、稳定性好的特征。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 DH5 α (Gibco BRL)、BL21 (Novagen) 及质粒 pBluescript (Stratagene)、pRSETc (Invitrogen) 均为本实验室购置保存。

1.1.2 细胞株: L929、SGC、A549、HL-60、A375、MKN-45、MKN-28 +、Sky +、SMMC-7721、BGC、SPC-A、T24、Jukat 等细胞株均为本实验室保存。

1.1.3 酶与化学试剂: 限制酶、T4DNA 连接酶分别购自 Biolabs 和 Boehringer Mannheim 公司。DNA 序列测定试剂盒购自 USB 公司。IPTG、丙烯酰胺、甲基双丙烯酰胺购自 Sigma 公司。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP 由 Amersham 公司提供。hTNF α 多克隆抗体由温州复旦生物工程公司提供。二抗为 Vector Laboratories 公司的羊抗兔 IgG, 由上海肿瘤医院临床药理室提供。

1.2 方法

1.2.1 重组克隆、DNA 和蛋白质序列分析: 按《分子克隆实验指南》、有关试剂盒的说明书操作。N 端氨基酸序列分析由中科院上海植物生理研究所 Beckman 示范实验室完成。

1.2.2 克隆基因在大肠杆菌中的表达: 将带有重组质粒 pRSETc-rhTNF α Db 的大肠杆菌宿主菌 BL21(DE3) 单菌落, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 过夜培养物以 1:100 扩大培养 2.5~3h, 加 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L, 继续培养 4h, 离心收集菌体。

1.2.3 表达产物的鉴定分析: 取一定量发酵液离心收集菌体用凝胶上样缓冲液直接溶破 (100 μL A₆₀₀ 菌加 10 μL ddH₂O 和 10 μL 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液), 制成全菌蛋白样品; 其余悬浮于 10 倍体积的 TBS 溶液中, 超声破碎, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000r/min 离心 15min, 上清加入等体积 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 制成可溶性菌体蛋白的样品。SDS-PAGE 蛋白电泳后进行考马斯亮蓝染色。

1.2.4 表达产物的纯化: 超声破碎后的上清液, 用硫酸铵沉淀, 过 Sephadex 柱脱盐, 再上至阴离子交换层析柱 DEAE 纤维素 DE-52, 以盐浓度梯度的缓冲液洗脱, 收集含目的蛋白的洗脱峰。

1.2.5 纯化产物的反向柱-HPLC 分析: 在 Bio-Rad 402 型 HPLC 分析仪上进行, 色谱柱为 Bio-Rad C18 反向层析柱, 平衡液为 0.1% 三氟乙酸, 流速为 1mL/min, 洗脱梯度为 0~80% 乙腈。

1.2.6 表达产物的 Western-blot 分析: 将 SDS-PAGE 电泳胶和硝纤膜在电转移缓冲液中 100V, 250mA 电转移 2h。膜经洗涤、封闭、洗涤, 加入 hTNF α 多克隆抗体为一抗, Bio-羊抗兔 IgG 为二抗, 显色系统为辣根过氧化物酶及其底物 DAB。

1.2.7 表达产物的细胞毒活性检测: 用 L929 细胞, 测定细胞毒活性的方法同以前的报道^[7-9]。

1.2.8 表达产物的热稳定性试验: 按 1.2.7 所述方法测定在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和 56 $^{\circ}\text{C}$ 下存放不同时间的样品的活性。

1.2.9 表达产物对体外培养肿瘤细胞的细胞毒活性检测: 取生长旺盛的肿瘤细胞, 制成

2 × 10⁵ 个/mL 细胞悬液, 每孔加样 100 μL (2 × 10⁴ 个/孔), 培养 16 ~ 17h, 加不同稀释度的 TNF, 培养 48h, MTT 法及显微镜观察肿瘤细胞杀伤百分率。

1.2.10 表达产物的体内抑瘤效应: 雌性昆明种小鼠, 体重 18 ~ 20g, 随机分为 rhTNFα Db 处理组 and 对照组, 每组 10 只。取小鼠身上传代的 EC 瘤块和 S₁₈₀ 瘤块, 按 1:4 加生理盐水匀浆成悬液, 按 0.2mL/只 (1 × 10⁶ 细胞/只) 于小鼠腋下接种细胞悬液。通过小鼠尾静脉给药。rhTNFα Db 组给药剂量为 75 μg/kg 体重, 隔日给药, 共 6 次。停药后次日解剖, 称瘤重, 计算抑瘤率。

1.2.11 表达产物对 B₁₆ (黑色素瘤) 肺转移的抑制作用: 雌性 C₅₇BL/6 小鼠, 体重 18 ~ 20g, 经尾静脉按 0.2mL/只 (5 × 10⁴ 细胞/只) 注入经体外培养浓度调整为 5 × 10⁵ 个/mL 的 B₁₆ 细胞, 然后随机分为治疗组 and 对照组, 每组 10 只, 均为隔日静脉给药。治疗组按 100 μg/kg 体重接种后给药, 共 6 次, 对照组于接种后按 0.5mL/只鼠注射 PBS 溶液, 共 6 次。

2 结 果

2.1 rhTNFα Db cDNA 的获得及重组载体的构建

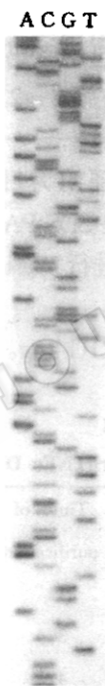


图 1 TNFα Db cDNA 的部分测序结果

Fig.1 Partial sequence of rhTNFα Db cDNA

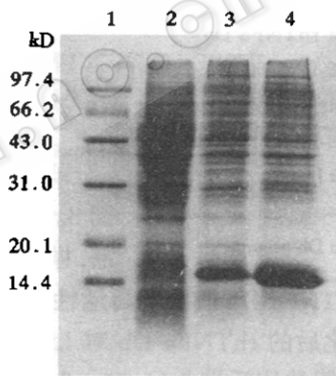


图 2 发酵产物的 SDS-PAGE 蛋白电泳

Fig.2 SDS-PAGE of rhTNFα Db produced in *E. coli*

- 1. Protein molecular weight markers
- 2. The bacteria harboring pRSETc, induced by IPTG
- 3. The bacteria harboring pRSETc-rhTNFα Db, not induced by IPTG
- 4. The bacteria harboring pRSETc-rhTNFα Db, induced by IPTG

本实验室以 rhTNFα cDNA 为模板, 设计相应引物, 构建了两种 rhTNFα 衍生物, 分别命名为 rhTNFα CG^[7]和 rhTNFα 61^[8]。其中 rhTNFα CG 缺失了 rhTNFα 中 102 ~ 107 位氨基酸, rhTNFα 61 缺失了 rhTNFα 中 1 ~ 7 位氨基酸。将这两种衍生物分别克隆进入 pRSETc 载体, 分别用限制酶 *Hinc* II、*Eco*RI 双酶切, 回收 pRSETc-rhTNFα 61/*Hinc* II -

*Eco*RI 以及 rhTNF α CG 双酶切后的小片段,经 T4 连接酶连接后,得到缺失了 1~7 位以及 102~107 位共 13 个氨基酸的 rhTNF α 衍生物 cDNA 的 pRSETc-rhTNF α Db,将其转化 BL21 受体菌。测序证实阅读框与设计相符。测序结果如图 1 所示。

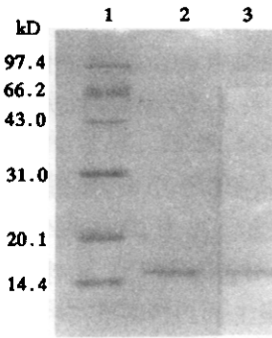


图 3 rhTNF α Db 的 Western 印迹分析
Fig. 3 Western blot of rhTNF α Db

1. SDS-PAGE of protein molecular weight markers;
2. SDS-PAGE of purified rhTNF α Db;
3. Western blot of purified rhTNF α Db protein

2.2 表达产物的电泳分析

表达菌体总蛋白及超声破碎后的上清进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析,结果见图 2。经 IPTG 诱导的含 pRSETc-rhTNF α Db 的菌体表达 16kD 左右的蛋白,表达量占菌体总蛋白的 30% 以上,最高可达 60%。

2.3 表达产物的纯化

发酵后收集的总菌体经超声破碎、硫酸铵沉淀、脱盐、阴离子交换层析柱分离。纯化终产物 SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色只有一条带。见图 3。

2.4 氨基酸序列测定结果

纯化产物 N 端 15 个氨基酸序列测定结果为:

Met Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln

其中第一个氨基酸 Met 为翻译起始密码子编码,第 2~15 号氨基酸分别对应于 hTNF α 原型的第 8~21 号氨基酸。

2.5 表达产物的 Western blot 分析

表达产物经 Western blot 鉴定,证明为目的蛋白。结果见图 3。(其中,样品 3 与样品 2 为同一块 SDS-PAGE 电泳胶上的样品,样品 3 在电泳后转移至硝纤膜上进行 Western blot 分析)。

2.6 rhTNF α Db 的细胞毒活性

纯化后的 rhTNF α Db 对 L929 细胞的比活性约为 2×10^8 IU/mg。rhTNF α 原型对 L929 细胞的比活性为 $(1.26 \pm 0.25) \times 10^7$ 。

表 1 rhTNF α Db 经纯化后的比活及回收率

Table 1 Specific activity and recovery rate of purified rhTNF α Db

Purification steps	Total activity /(IU)	Specific activity /(IU/mg)	Times of purification	Recovery rate /%
Supernatant of sonication	$(1.81 \pm 0.22) \times 10^9$	$(1.14 \pm 0.13) \times 10^7$	1	100
Precipitate by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(1.32 \pm 0.34) \times 10^9$	$(3.92 \pm 0.29) \times 10^7$	3.4	73
Desalt column	$(1.02 \pm 0.28) \times 10^9$	$(4.69 \pm 0.37) \times 10^7$	4.1	56
Ion exchange column	$(3.80 \pm 0.43) \times 10^8$	$(1.79 \pm 0.26) \times 10^8$	15.7	21

表 2 rhTNF α Db 在 37℃ 的热稳定性

Table 2 Thermostability of rhTNF α Db in 37℃

Time/h	0	1.0	7.0	12.0	52.0	240.0
Activity/IU	1.1×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8	1.1×10^8	8.0×10^7	5.3×10^7

2.7 rhTNF α Db 的热稳定性

将纯化后的 rhTNF α Db 在 37℃ 保温 240h, 活性仍保留 50%。在 56℃ 保温 12h, 活性仍保留 50%。

表 3 rhTNF α Db 在 56℃ 的热稳定性

Table 3 Thermostability of rhTNF α Db in 56℃

Time/h	0	0.5	1.0	5.0	8.0	12.0
Activity/IU	1.1×10^8	1.1×10^8	8.0×10^7	5.3×10^7	5.3×10^7	5.3×10^7

2.8 rhTNF α Db 的体外抑瘤谱

rhTNF α Db 对体外培养的人胃癌细胞株 MKN-28 + 和 MKN-45 等有明显的杀伤作用; 对肺癌细胞株 A549 和 SPC-A、黑色素瘤细胞株 A375 以及结肠癌细胞株 BGC 等也有杀伤作用; 对结肠癌细胞株 SGC、白血病细胞株 HL-60 和 Jukat、肺癌细胞株 Sky +、肝癌细胞株 SMMC-7721、膀胱癌细胞株 T24 等细胞的生长无明显抑制作用; 作为对照的 rhTNF α 原型对体外培养的人胃癌细胞株 MKN-28 + 和 MKN-45 稍有抑制作用, 而对其余细胞的生长未见抑制作用。

表 4 rhTNF α Db 的体外抑瘤谱

Table 4 Anti-tumor spectrum of rhTNF α Db *in vitro*

Tumor cell lines	Dilution ratio of samples					
	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
SGC	-	-	-	-	-	-
A549	+	+	+	+	-	-
HL-60	-	-	-	-	-	-
A375	+	+	-	-	-	-
MKN-45	++++	++++	+++	+++	+++	++
MKN-28 +	++++	++++	+++	+++	+++	++
Sky +	-	-	-	-	-	-
SMMC-7721	-	-	-	-	-	-
BGC	++	++	+	-	-	-
SPC-A	++	++	+	-	-	-
T24	-	-	-	-	-	-
Jukat	-	-	-	-	-	-

Notes: The initial concentration of the sample was 1×10^6 IU/mL.

++++ Means all of cells were killed; +++ means 75 percent of cells were killed;

++ Means 50 percent of cells were killed; + means 25 percent of cells were killed;

- Means all of cells were alive.

2.9 rhTNF α Db 的体内抗肿瘤活性

rhTNF α Db 对接种于雌性昆明种小鼠的小鼠 EC 和 S₁₈₀ 实体瘤的生长抑制率分别为 40.07% 和 29.34%。

表 5 rhTNF α Db 对 EC 和 S₁₈₀ 实体瘤的抑瘤活性Table 5 Anti-tumor effects of rhTNF α Db towards EC and S₁₈₀ solid tumor

Tumor lines	Groups	Animals' number		Animals' weights/g		Tumors' weights/g		Inhibition/ %
		Beginning	End	Beginning	End	Total	Average	
EC	Control	10	10	20.7	27.8	26.7	2.67 ± 0.29	-
	Treatment	10	10	20.7	24.7	16.0	1.60 ± 0.26	40.07
S ₁₈₀	Control	10	9	18.7	21.0	15.1	1.67 ± 0.21	-
	Treatment	10	10	18.8	20.5	11.8	1.18 ± 0.32	29.34

2.10 rhTNF α Db 对小鼠黑色素瘤 B₁₆ 肺转移的抑制

rhTNF α Db 对雌性 C₅₇BL/6 小鼠的黑色素瘤 B₁₆ 肺转移的抑制率为 60.41 %

表 6 rhTNF α Db 对黑色素瘤 B₁₆ 肺转移的抑制效应Table 6 Anti-pulmonary metastasis effect of rhTNF α Db towards B₁₆ melanoma

Group	Animal's number		Animal's weight		Number of pulmonary surface nodules		Inhibition/ %
	beginning	end	beginning	end	Total	Average	
Control	6	6	18.1	19.0	624	104.00 ± 6.16	
Treatment	6	6	18.0	18.8	247	41.17 ± 3.55	60.41

3 讨 论

总结本实验室对于肿瘤坏死因子衍生物的研究工作,我们发现,将 rhTNF α 的 N 端缺失 7 个氨基酸,可得到抑瘤谱扩大的 rhTNF α 衍生物;rhTNF α 中部区段的部分缺失,可提高它的细胞毒活性。分析 rhTNF α 单体的立体结构,hTNF α 分子的中部区段(101~113 位氨基酸)处于 hTNF α 分子顶端突出的位置,用 PC/GENE 软件分析表明,Gln102-Glu107 平均亲水性是 hTNF α 中最高的三个部位之一,推测这段区域在 hTNF α 实现其生物学功能时有重要意义。有报道指出 hTNF α 105~110 位氨基酸的结构类似 lectin,对某些多糖分子有亲和性,与裂解寄生虫(Salivarian 锥虫)有关^[10]。这段多肽与肿瘤细胞杀伤以及毒副作用有何关系,还有待于进一步研究。而 hTNF α C 端有参与稳定三聚体的作用,又处于分子内部,活动度小。hTNF α 的 C 端只要缺失一个氨基酸就会大大影响整个分子活性。hTNF α 在形成三聚体的活性结构时,一个分子的 C 端第 157 位氨基酸(Leu)与另一个分子的第 11 位氨基酸(Lys)之间形成一个离子对, rhTNF α 衍生物的热稳定性可能与这个离子对是否存在有关^[11]。基于以上认识,我们定向构建了 rhTNF α Db。

由于 hTNF α 蛋白质中没有糖基化位点,所以在大肠杆菌中的表达对其活性没有任何影响。又由于我们所使用的表达载体为大肠杆菌中的高表达载体,因此 rhTNF α Db 在大肠杆菌中的表达量可高达 60%。此外,我们的纯化工艺简单易行,在经过硫酸铵盐析及脱盐处理以后,只需通过一根阴离子交换树脂,就可得到纯度达 95% 以上的目的蛋白。rhTNF α Db 的细胞毒活性测试结果显示,纯化后的 rhTNF α Db 的比活性高达 10⁸ IU/mg,

比 hTNF α 原型提高一个数量级。体外抑瘤试验表明,该衍生物对多种体外培养的肿瘤细胞有直接杀伤作用,而原型 hTNF α 仅对胃癌细胞株 MKN-28+ 及 MKN-45 有抑制作用,可见 rhTNF α Db 的体外抑瘤谱有明显扩大。同时,rhTNF α Db 的体内抑瘤试验也有了令人满意的结果。以上这些结果均表明,rhTNF α Db 有很好的临床应用前景。

致 谢 rhTNF α Db 体内抑瘤试验由上海医药工业研究院药理室完成,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kasset *et al.* *Proc, Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**:3666.
- [2] K. Kimura, T. Taguchi, L. Urushizaki *et al.* *Cancer Chemother Pharmacol*, 1987, **20**:223.
- [3] E. T. Creagan, J. S. Kovach, C. G. Moertel *et al.* *Cancer*, 1988, **62**:2467.
- [4] J. L. Ferdy, L. Danielle. *Nature Biotechnology*, 1996, **14**:106.
- [5] Satoshi, Nakamuro. *Int. J. Cancer*, 1991, **48**:744.
- [6] R. Kamijo, K. Takeda, M. Nagumo *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, **160**:820.
- [7] 王 昆等. 自然科学进展——国家重点实验室通讯, 1996, **6**(2):236~242.
- [8] 蔡武城等. 高技术通讯, 1993, **7**:13~16.
- [9] 常金丽等. 遗传学报, 1995, **22**(5):329~335.
- [10] L. Rudolf, M. Stefan *et al.* *Science*, 1994, **263**:814~817.
- [11] Guo Donglin, Shen Baohe *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **207**(3):927~932.

Construction and Expression of the cDNA Encoding for Human Tumor Necrosis Factor α Derivative b

Shao Yihong Yu Hong Zhuang Li Lin Lizhu Zhao Shouyuan Li Changben

(*Institute of Genetics, State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433*)

Abstract DNA fragments isolated from two kinds of human tumor necrosis factor α derivative cDNA were ligated to construct a novel recombinant human tumor necrosis factor α derivative (rhTNF α Db) cDNA. The cDNA was subcloned in an expressing vector and transformed the *E. coli* BL21 (DE3). After induction, the transformants harboring recombinant plasmid expressed target protein at the percentage of 30~60 of total bacterial proteins. The soluble rhTNF α Db accounted for about 40 percent of total soluble bacterial proteins. The target protein was obtained with a purity of above 95% through chromatography columns. The cytotoxicity of rhTNF α Db for mouse L929 cells *in vitro* was assayed and the specific activity is 2×10^8 IU/mg protein, which is 10 times more than that of rhTNF α . The anti-tumor effects of rhTNF α Db were also tested *in vitro* and *in vivo*.

Key words Tumor necrosis factor α derivatives, gene expression, anti-tumor effects