

研究报告

新型猫源干扰素 FeIFN- ω 与干扰素 FeIFN- α 的表达及抗病毒活性比较

王鸿宾^{1,2}, 贾晓娟², 杨利敏², 孙蕾², 王红宁³, 刘文军²

1 四川农业大学动物科技学院, 雅安 625014

2 中国科学院微生物研究所分子病毒中心, 北京 100101

3 四川大学生命科学学院, 四川大学动物疾病防控生物工程研究中心, 成都 610064

摘要: ω 型干扰素(IFN- ω)与 α 型干扰素(IFN- α)同属于 I 型干扰素, 都具有抗病毒, 抗增殖和免疫调节的功能, 但它们之间的活性却存在较大差异。通过 PCR 扩增猫 ω 型干扰素基因(FeIFN- ω), 根据 GenBank 公布的猫 α 型干扰素基因序列, 合成猫 α 型干扰素基因(FeIFN- α)。分别构建原核表达载体 pET-His/FeIFN- α 和 pET-His/FeIFN- ω , 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)进行表达。表达产物经 Ni-NTA 亲和层析纯化, 复性后蛋白用细胞病变抑制法进行抗病毒活性测定。结果显示, 重组猫 ω 型干扰素(FeIFN- ω)抗病毒活性明显高于重组猫 α 型干扰素(FeIFN- α), 尤其对 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV), FeIFN- ω 的活性是 FeIFN- α 的 160 倍, 对犬瘟热病毒(CDV), FeIFN- ω 的活性是 FeIFN- α 的 4 倍, 而日本同类产品 Intercat®对 CDV 和 AIV 均未表现活性。以上研究为以 ω 型干扰素为基础的抗病毒药物应用奠定了重要的理论基础。

关键词: ω 型干扰素, α 型干扰素, 抗病毒活性

Comparison of Antiviral Activity Between FeIFN- ω and FeIFN- α

Hongbin Wang^{1,2}, Xiaojuan Jia², Limin Yang², Lei Sun², Hongning Wang³, and Wenjun Liu²

1 College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China

2 Center for Molecular Virology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

3 College of Life Science, Laboratory of Bio-engineering Research Center for Animal Disease Prevention and Control, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: Both IFN- ω and IFN- α belong to type I interferon and have antiviral, antiproliferative, immunomodulatory activities, but their bioactivities are usually different. *FeIFN- ω* gene was amplified by PCR. *FeIFN- α* gene was synthesized based on the published sequences of GenBank. Then the two types of feline interferon genes were subcloned into the pET-His vector, and expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Recombinant interferons were purified by affinity chromatography with immobilized nickel chelating NTA (Ni-NTA) and their antiviral activity was estimated according to the ability of IFNs to inhibit the cytopathic effects (CPE) of virus on cells. Results showed that the antiviral activities against various viruses of FeIFN- ω were higher than those of FeIFN- α . Against H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) and canine distemper virus (CDV), the antiviral activities of FeIFN- ω were 160 folds and 4 folds higher than those of FeIFN- α .

Keywords: FeIFN- α , FeIFN- ω , antiviral activity

Received: January 15, 2008; **Accepted:** March 19, 2008

Supported by: the Ministry of Science and Technology of China program (No. 2006BAD06A04) and Chinese Academy of Sciences Innovation projects (No. KSCX2-YW-N-054).

Corresponding author: Hongning Wang. Tel: +86-28-85471599; E-mail: whongning@163.com

Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家科技支撑计划(No. 2006BAD06A04)和中国科学院知识创新工程重要方向项目(No. KSCX2-YW-N-054)资助。

干扰素是一类具有广谱抗病毒、抗增殖及免疫调节作用的分泌型糖蛋白,是机体防御系统的重要组成部分。根据细胞表面受体,酸稳定性,核酸序列以及染色体位置的不同^[1-3],将干扰素分为 I 型和 II 型。I 型干扰素主要起抗病毒和抗肿瘤作用,包括 IFN- α 、IFN- β 、IFN- ω 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- τ ^[4]、IFN- δ ,以及干扰素样细胞因子 limitin^[5]、IL28、IL29 等,II 型又称免疫干扰素,主要起免疫调节作用,只包括 IFN- γ 。目前已知的存在 IFN- ω 的物种有人、猫、马、羊、牛、猪、兔等。1992 年,日本东丽株式会社的 Nakamura 等人首次分离到了猫干扰素基因,并于 1993 年将其归类于 ω 型干扰素。1994 年,以其为基础的重组干扰素药物 Intercat[®]在日本上市,并被用于治疗猫杯状病毒感染和狗细小病毒感染。2007 年杨利敏等人发现了一种全新的猫 ω 型干扰素^[6],参照 Roberts RM 等人对 IFN- α 和 IFN- ω 区别的定义^[4],日本东丽株式会社的 Nakamura 等人所分离到的干扰素更接近于 IFN- α 。随后以日本东丽株式会社分离的干扰素为基础的猫干扰素的实验结果表明,猫干扰素对猫白血病毒(FLV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)及犬细小病毒具有显著的治疗效果^[7-9]。

本实验对获得的新型猫源干扰素 feIFN- ω 和干扰素 FeIFN- α 进行抗病毒活性研究,同时以日本产品 Intercat[®]作为对照,详细比较了三种猫源干扰素对多种不同病毒的抗病毒生物学活性。发现 ω 型干扰素与 α 型干扰素相比,在抗病毒活性方面具有明显优势。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α , Rosetta(DE3)中国科学院微生物研究所动物病毒分子生物学实验室保存; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; pET-His 表达载体购自基因动力公司。

1.1.2 细胞系、病毒株

猫肾细胞(CRFK),人宫颈癌细胞(HeLa),非洲绿猴肾细胞(Vero);水泡性口炎病毒(VSV),猫杯状病毒(FCV),犬温热病毒(CDV),H9N2 亚型禽流感病毒(AIV),由中国科学院微生物研究所动物病毒分子生物学实验室保存。

1.1.3 试剂、引物

各种工具酶购自 TaKaRa 公司; PVDF 膜购自 Millipore 公司; Ni-NTA 纯化柱购自 QIAGEN 公司; DMEM 细胞培养基购自 Gibco 公司; 质粒提取和胶回收试剂盒为美国 Omega 生物技术公司产品; 鼠源抗 His-tag 抗体和山羊抗小鼠抗体购自 Sigma 公司。基因及引物由上海生工公司合成; 测序由上海生工公司完成。

1.2 方法

1.2.1 原核表达质粒 pET-His/FeIFN- α 和 pET-His/FeIFN- ω 的构建及表达

根据 GenBank 公布的猫 α 型干扰素基因序列(GenBank 序列号 AB094996),合成 FeIFN- α 基因,并以其为模板,PCR 扩增 FeIFN- α 成熟区序列(引物: FeIFN- α for: 5'-CCAGGATCCATGTGTGCCCTGCC TGGGAGCC-3', FeIFN- α rev: 5'-GTAAGCTTTTAAG ATGACGCCAGGTCTCC-3'),通过引物引入 BamH I 和 Hind III 酶切位点。以包含 FeIFN- ω 基因的质粒为模板(中国科学院微生物研究所动物病毒分子生物学实验室保存)^[8],PCR 扩增 FeIFN- ω 成熟区序列(引物: FeIFN- α for 5'-CCAGGATCCatgtgtgatTTGcctCA Aactc-3', FeIFN- α rev: 5'-GTAAGCTTTTATTCTCA GATCTTAATCTTTT-3'),通过引物引入 BamH I 和 Hind III 酶切位点。将 FeIFN- α 和 FeIFN- ω 的 PCR 纯化产物分别亚克隆入 pMD18-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞,经 BamH I 和 Hind III 双酶切鉴定正确后,送生工公司测序,测序正确的质粒命名为 pMD-18/FeIFN- α 和 pMD-18/FeIFN- ω 。将质粒 pMD18/FeIFN- α 和 pMD18/FeIFN- ω 进行 BamH I 和 Hind III 双酶切后亚克隆入相同酶切的原核表达载体 pET-His,分别命名 pET-His/FeIFN- α , pET-His/FeIFN- ω 。重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta(DE3),37 $^{\circ}$ C IPTG 诱导 4 h。表达产物进行 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测,一抗为鼠源抗 His-tag 抗体,二抗为山羊抗小鼠抗体。

1.2.2 重组蛋白的纯化和复性

收集表达菌体,超声破菌后 SDS-PAGE 检测,重组蛋白以包涵体形式表达。包涵体用 PH8.0 的磷酸盐缓冲溶液洗涤两遍,溶于 Buffer B (8mol/L urea, 0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.01 mol/L Tris-Cl, pH8.0),室温搅拌 2 h, 10 000 g 离心 15 min 收集上清蛋白液。将蛋白液与预先用 10 倍柱体积的 Buffer B 平衡的

Ni-NTA Agarose 充分混匀, 室温结合 30 min 装柱。上柱后采用 PH 梯度洗脱目的蛋白, 收集洗脱液, 洗脱液经 SDS-PAGE 检测, 将含有目的蛋白的洗脱液用 pH8.0 的磷酸盐缓冲溶液进行透析复性。复性蛋白浓度用考马斯亮蓝染色法(Bradford)^[10]测定。

1.2.3 重组干扰素抗病毒活性检测

比较干扰素 FeIFN- α 、FeIFN- ω 以及日本产品 Intercat[®] 抗不同种属病毒的活性。所用病毒及对应的细胞系: 水泡性口炎病毒(VSV)/CRFK 细胞, 猫杯状病毒(FCV)/CRFK 细胞, 犬温热病毒(CDV)/Vero 细胞, H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)/HeLa 细胞。测定方法为细胞病变(CPE)抑制为基础的抑制微量测定法^[11,12]。用含有 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基将细胞接种于 96 孔板中, 于 5% CO₂, 37°C 培养至单层。将干扰素样品 FeIFN- α 、FeIFN- ω 和日本产品 Intercat[®]预稀释 1000 倍, 再按 4 倍梯度稀释, 每个梯度重复两孔。按每孔 100 μ L 接入。18 h 后, 换入用不含 FBS 的 DMEM 培养基稀释的 100TCID₅₀ 病毒液, 同时设置不加干扰素的病毒对照组和加干扰素及病毒的细胞对照组, 待病毒对照组出现 90%以上细胞病变时, 进行结晶紫染色, 用酶标仪 (Tekan, Grodig, Austria)在 570 nm 波长读值。结果根据 Reed-Muench 法计算^[13,14]。

2 结果

2.1 FeIFN- α 和 FeIFN- ω 基因鉴定

FeIFN- α 和 FeIFN- ω 基因 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 在 500 bp 以上处有特异的目的条带 (图 1), 测序结果表明克隆的基因大小分别为 513 bp 和 519 bp。

2.2 重组蛋白的表达, 纯化及 Western blotting 检测

重组质粒转化 Rosetta(DE3)大肠杆菌, 在 37°C, IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 的条件下诱导 4 h, 目的蛋白能高效表达。表达产物经 SDS-PAGE 检测和 Western blotting 鉴定(图 2、图 3), 重组蛋白 FeIFN- α 和 FeIFN- ω 的大小分别约为 22 kD 和 19 kD。表达产物经包涵体洗涤, Ni-NTA 亲和层析两步纯化之后, 蛋白纯度能达到 90%以上。纯化后蛋白经稀释复性, 蛋白浓度分别为 0.5 mg/mL、1 mg/mL。

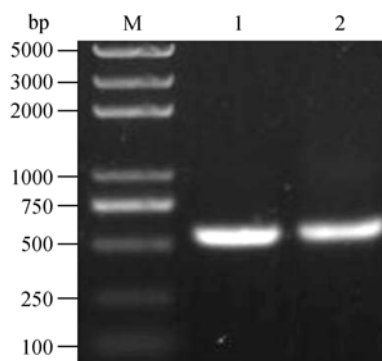


图 1 猫干扰素 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Purified PCR products of feline interferons by agarose gel electrophoresis

M: DL5000 marker; 1: FeIFN- α ; 2: FeIFN- ω

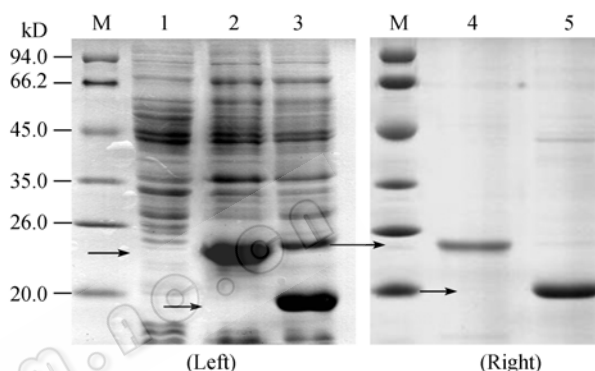


图 2 蛋白表达(左)及纯化(右)结果

Fig. 2 12% SDS PAGE analysis of recombinant proteins

M: molecular weight markers; 1: rosetta/pET-His as a negative control; 2: expressed protein pET-His/FeIFN- α ; 3: expressed protein pET-His/FeIFN- ω ; 4: purified protein FeIFN- α ; 5: purified protein FeIFN- ω

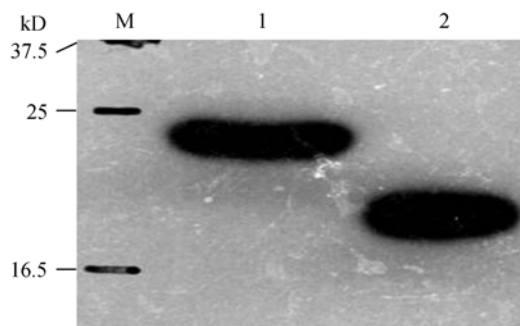


图 3 Western blotting 检测表达蛋白

Fig. 3 Western blotting analysis of expressed proteins

M: molecular weight markers; 1: pET-His/FeIFN- α ; 2: pET-His/FeIFN- ω

2.3 重组干扰素抗病毒活性比较

试验中几种干扰素在抗不同种属病毒的活性方面表现出很大差异。FeIFN- α 、FeIFN- ω 以及 Intercat[®]对水泡性口炎病毒(VSV)和猫杯状病毒

(FCV)均具有很高的活性,对水泡性口炎病毒(VSV), FeIFN- ω 的活性达到 14.5×10^6 u/mg, 是 FeIFN- α 的 2 倍。对于犬温热病毒(CDV)和 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV), FeIFN- ω 与其他两种干扰素的活性差异更加显著。尤其是对 AIV, FeIFN- ω 的活性是 FeIFN- α 的 160 倍。对 CDV, FeIFN- ω 的活性是 FeIFN- α 的 4.6 倍。而日本产品 Intercat[®]对 CDV 和 AIV 没有活性。表 1 中每一结果都经过 3 次以上试验, 结果能高度重复。(表 1、图 4)。

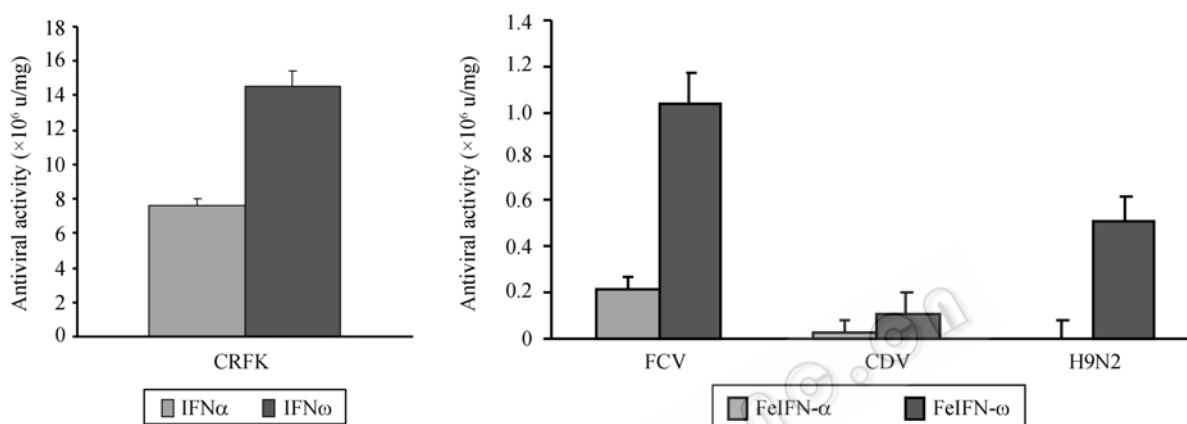


图 4 干扰素对不同病毒的抗病毒活性比较

Fig. 4 Antiviral activities of IFNs against different virus

3 讨论

I 型干扰素具有广泛的生物学活性: 抗病毒, 抗增殖, 刺激多种免疫细胞包括 T 细胞、NK 细胞、单核细胞、巨噬细胞以及树突状细胞的细胞毒活性, 刺激 MHC I 类抗原的表达, 诱导凋亡基因的表达, 抑制抗凋亡基因的表达, 调节细胞分化, 抗血管生成活性等^[1,15]。这些特性使得干扰素可以用来治疗多种疾病。不同亚型干扰素之间同源性很高, 但它们的抗病毒、抗增殖以及免疫调节的活性存在很大差异^[5,16]。IFN- ω 属 I 型干扰素, 1996 年, Kunzi 等发现人 IFN- ω 与 IFN- α 同样具有抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)复制的作用, 且抑制 HIV 蛋白合成的程度大于 IFN- α ^[17], 本试验中, 猫 IFN- ω 与猫 IFN- α 相比, 表现出更高的抗病毒活性, 与上述试验结果相符。本研究证明了猫 ω 型干扰素不仅对猫源病毒具有很高的抗病毒活性, 而且对其他种属的病毒也具有广泛的抗病毒活性。

表 1 干扰素对不同病毒的抗病毒活性比较

Table 1 Antiviral Activities of IFNs against different virus

	Antiviral activity (×10 ⁶ u/mg)			
	VSV/CRFK	FCV/CRFK	CDV/Vero	AIV/Hela
FeIFN- α	7.64	0.21	0.021	0.0032
FeIFN- ω	14.5	1.03	0.097	0.52
* Intercat [®]	10.0	2.6	<0.00006	<0.00006

* Intercat[®]的抗病毒活性表示为每瓶的单位。

*Antiviral activity of Intercat IFN is shown as units per vial.

本次试验就新型猫源干扰素 FeIFN- ω 的抗病毒活性进行了详细的研究, 并和 FeIFN- α 以及日本产品 Intercat[®]进行比较。FeIFN- ω 与 FeIFN- α 的氨基酸序列同源性为 42.14%, 两种干扰素在大肠杆菌中的表达和纯化无明显差异。新型重组干扰素 FeIFN- ω 对多种不同病毒表现出较高的抗病毒活性。虽然本次实验仅限于体外细胞系实验, 但在此阶段已初步显示其抗病毒活性的高效性和广谱性, 为下一步的临床研究指明了方向。鉴于目前干扰素的临床用药主要以 α 型干扰素为主, 本研究为以 ω 型干扰素为基础的抗病毒药物应用奠定了重要的理论基础。

REFERENCES

- [1] De Maeyer E, De Maeyer-Guignard. Type I interferon. *Intern Rev Immunol*, 1998, **17**: 53-73.
- [2] Walter MR, Bordens R, Nagabushan TL, *et al.* Review of recent developments in the molecular characterization of recombinant alpHa interferons on the 40th anniversary of the discovery of interferon. *Cancer Biother*

- RadiopHarm*, 1998, **13**: 143–154.
- [3] Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, *et al.* Biological properties of recombinant ω -interferons on the 40th anniversary of the discovery of interferon. *Cancer Res*, 1998, **58**: 2489–2499.
- [4] Roberts MR, Cross JC, Leaman DW, *et al.* Unique features of the tropHoblast interferons. *Pharm Ther*, 1991, **51**: 329–345.
- [5] Kenji Oritani, Paul W Kincade, Cai Zhang, *et al.* Type I interferons and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. *Cytokine and Growth Factor Rev*, 2001, **12**: 337–348.
- [6] Yang LM, Xue QH, Sun L, *et al.* Cloning and characterization of a novel feline IFN- ω . *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2007, **27**: 119–127.
- [7] De Mari K, Maynard L, Sanquer A, *et al.* Therapeutic effects of recombinant feline interferon-omega on feline leukemia virus (FeLV)-infected and FeLV/ feline immunodeficiency virus (FIV)-coinfected symptomatic cats. *Vet Intern Med*, 2004, **18**(4): 477–482.
- [8] Ishiwata K, Minagawa T, Kajimoto T. Clinical effects of the recombinant feline interferon-omega on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, **60**(8): 911–917.
- [9] Martin V, Najbar W, Gueguen S, *et al.* Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo- controlled challenge trial. *Veterinary Microbiology*, 2002, **89**(223): 115–127.
- [10] Zhang LX, Zhang TF, Wang JZ. The Protein Protocols Handbook. Beijing: Science Press, 2000, **8**: 42–46.
- 张龙翔, 张庭芳, 汪家政. 蛋白质手册. 科学出版社, 2000, **8**: 42–46.
- [11] John A, Armstrong. Semi-micro dye-binding assay for rabbit interferon. *Applied Microbiology*, 1971, **21**(4): 723–725.
- [12] Sara Rubinstein, Philip C, Familletti, Sidney Pestka, *et al.* Convenient assay for interferons. *Journal of Virology*, 1981, **37**(2): 755–758.
- [13] Fei ZZ, Guan YX, Yao SJ, *et al.* A colorimetric method to assay biological activity of recombinant human IFN- γ . *Microbiology*, 2001, **31**(3): 65–69.
- 费铮铮, 关怡新, 姚善涇. 重组人 γ 干扰素复性过程中体外活性检测方法研究. *微生物学通报*, 2001, **31**(3): 65–69.
- [14] Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, *et al.* Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control (Hardcover). Washington DC: ASM Press, 2004, Chapter 2, **4**, 42–58.
- [15] Pestka S, Langer JA, Zoon KC, *et al.* Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem*, 1987, **56**: 727–777.
- [16] Baron S, Coppenhaver DH, Dianzani F, Eds. Interferon. Principles and Medical Applications. Galveston, University of Texas, 1992, 1–15.
- [17] Kunzi MS, Pitha PM. Role of interferon-stimulated gene ISG215 in the interferon-omega-mediated inhibition of human immunodeficiency virus replication. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1996, **16**(11): 919–927.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的(Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法(Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论(Conclusions)：如系基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如系应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。