

医学与免疫生物技术

人 IL-29 的定点突变及抗肿瘤活性初步分析

陈伟¹, 朱荣², 葛春蕾², 陆源³, 李利云², 李菲¹, 邬敏辰¹

1 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

陈伟, 朱荣, 葛春蕾, 等. 人 IL-29 的定点突变及抗肿瘤活性初步分析. 生物工程学报, 2015, 31(5): 702-710.

Chen W, Zhu R, Ge CL, et al. Site-directed mutagenesis of human IL-29 and antineoplastic activity of the recombinant human IL-29 variant. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 702-710.

摘要: 为探讨人白细胞介素-29 (hIL-29) 变异体的抗肿瘤活性, 根据 hIL-29 成熟肽的生物信息学分析数据, 采用大引物 PCR 方法对其肽链第 33 位赖氨酸、35 位精氨酸的编码基因进行定点突变, 获得的 hIL-29 变异体基因构建重组真核表达质粒转化毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 进行发酵表达, 经纯化得到重组人白细胞介素-29 变异体蛋白 (rhIL-29^{mut33,35})。经 CCK-8 法检测抗肿瘤细胞增殖的数据显示, rhIL-29^{mut33,35} 对肝癌细胞 BEL7402、结肠癌细胞 HCT8 和胃癌细胞 SGC7901 的增殖均具有抑制作用, 高剂量组对这 3 种肿瘤细胞的增殖抑制率分别为 (30.99 ± 1.58)%、(22.47 ± 1.37)% 和 (32.05 ± 2.02)%, 而且抗增殖作用比野生型 rhIL-29 的更强 ($P < 0.01$), 表明变异体 rhIL-29^{mut33,35} 具有潜在的医药开发价值。

关键词: 白细胞介素-29, 定点突变, 变异体, 抗肿瘤活性

Received: August 29, 2014; **Accepted:** November 15, 2014

Supported by: National Undergraduate Innovative Training Programs (No. 201210295024).

Corresponding author: Wei Chen. Tel: +86-510-85328296; E-mail: chenwei@jiangnan.edu.cn

国家大学生创新训练计划项目 (No. 201210295024) 资助。

网络出版时间: 2015-02-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140429.html>

Site-directed mutagenesis of human IL-29 and antineoplastic activity of the recombinant human IL-29 variant

Wei Chen¹, Rong Zhu², Chunlei Ge², Yuan Lu³, Liyun Li², Fei Li¹, and Minchen Wu¹

¹ Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

³ School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To explore the anti-tumor proliferation activity of human interleukin-29 (hIL-29) variant and based on bioinformatics analyzed data of hIL-29, a mutant gene *hIL-29^{mut33,35}* was amplified by site-directed mutagenesis and megaprimer PCR. The *hIL-29^{mut33,35}* was inserted into an eukaryotic expression plasmid pPIC9K and successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. A recombinant variant protein (rhIL-29^{mut33,35}) was purified from the ferment supernatant of the engineering GS115. To observe the antineoplastic activity of the variant rhIL-29^{mut33,35}, a CCK-8 reagent was used to detect the anti-proliferation effect. Results show that it has strong anti-proliferation effect when acted on liver cancer cell BEL7402, colon cancer cell HCT8 and gastric cancer cell SGC7901. The inhibition ratios of the three tumor cells were $(30.99 \pm 1.58)\%$, $(22.47 \pm 1.37)\%$ and $(32.05 \pm 2.02)\%$, respectively. In high dose group, the anti-proliferation effect of the rhIL-29^{mut33,35} was stronger than that of wild type rhIL-29 ($P < 0.01$). This indicates the variant rhIL-29^{mut33,35} has potential development value for medicine.

Keywords: interleukin-29, site-directed mutagenesis, variant, antineoplastic activity

人 IL-29 是 2003 年初发现的一种新的细胞因子^[1-2]。研究发现, IL-29 和 IL-28 的靶细胞膜受体相同,是由 IL-28R1 和 IL-10R2 组成的异二聚体受体复合物,其中 IL-28R1 为结合亚基,对 IL-29 的细胞应答具有特异性,IL-10R2 为辅助亚基,对 IL-29 的细胞应答无特异性^[3]。而 IL-29 的胞内信号转导途径与 I 型干扰素 (Interferon, IFN) 相同,通过激活 Jak-STAT (Janus kinase-signal transducer of transcription) 信号通路而产生效应^[4-7],因此 IL-29 表现出与 I 型 IFN 相似的生物学性质,如抗病毒、抗增殖、免疫调节、体内抗肿瘤等生物学活性^[8-12]。由此,IL-29、IL-28A 和 IL-28B 又被称为 IFN- λ 家族,它们分别称为 IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ 3^[13-14]。

Gad 等^[3]研究发现,对 IFN- λ 3 肽链中的

34 Arg、36 Lys 和 44 Leu 等位点的氨基酸进行定点突变,可明显改变其抗病毒活性。本实验室郑海军等^[15]应用生物信息学分析工具对人 IL-29 与 IL-28B 的三级结构进行分析比对,发现两者的受体结合区域的 A、F 螺旋中仅 4 个氨基酸残基不同,即 IL-29/IL-28B 肽链中的 33 Lys/34 Arg、35 Arg/36 Lys、43 Lys/44 Leu 和 143 Ala/144 Pro,对这些氨基酸残基进行诱变可能影响 IL-29 与其受体结合的亲和力,进而改变 IL-29 的生物学活性。

基于上述研究发现和本实验室前期研究基础^[16-17],本文采用定点突变方法将 IL-29 成熟肽受体结合区域的 33 Lys、35 Arg 分别突变为 33 Arg、35 Lys,从而改变其与受体结合的亲和力,以期获得抗肿瘤活性更高的 IL-29 变异体。

1 材料与amp;方法

1.1 菌种、质粒和肿瘤细胞株

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 由本实验室保存；质粒 pUCm-T 购自生工生物工程（上海）股份有限公司；质粒 pPIC9K^M 购自 Invitrogen 公司；含 hIL-29 成熟肽基因的重组质粒 pPIC9K^M-hIL-29 由本实验室构建^[17]；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 工具酶、培养基和生化试剂

Taq plus DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA ladder marker、低分子量蛋白质 marker、EZ-10 柱式 DNA 回收试剂盒和硝酸纤维素膜（NC 膜）均为 BBI 公司产品；胰蛋白酶、酵母提取物为英国 OXOID 公司产品；YPD、MD、BMGY、BMMY、DAB、SDS、G418 和 RPMI-1640 培养基等均为生工生物工程（上海）股份有限公司产品，培养基的配制按 Invitrogen 公司操作手册；羊抗人 IL-29 多克隆抗体为美国 R&D 公司产品；HRP 标记兔抗羊 IgG 为上海明睿公司产品；新生小牛血清为浙江天杭生物科技有限公司产品；胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素溶液（100×）、Cell Counting Kit-8 试剂购自碧云天生物技术研究so；重组人干扰素 α2b 注射液为北京凯因科技股份有限公司产品；其余试剂均为国产分析纯。

1.3 定点突变

根据 NCBI 公布的 hIL-29 的编码基因序列（GenBank 登录号：AY336716.1），结合生物信息学分析数据，设计 1 对 PCR 引物及 1 条突变引物，扩增产物为编码 hIL-29 成熟肽的 cDNA，其碱基序列中第 98 位碱基 T 定点突变为 C，第 104 位碱基 C 定点突变为 T，引物序列见表 1。

表 1 引物及其序列

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
5'-Primer (hIL-29-F)	<u>CTCGAGAAAAGAGGCCCTGTCC</u> C CACTTCC
3'-Primer (hIL-29-R)	<u>GCGGCCGCTCAGGTGGACTCAG</u> G G T G G
Mutant primer (hIL-29-M)	TCCAATGCGTCC <u>CTGGCCTTCTT</u> G A A G C T C G C T A

The underlined sequences are the mutated sites.

hIL-29 成熟肽基因的定点突变采用大引物 PCR 方法，以 pPIC9K^M-hIL-29 质粒为模板、hIL-29-F 和 hIL-29-M 为引物，进行第一轮 PCR，反应条件：94 °C 预变性 2 min；94 °C 30 s，57 °C 30 s，72 °C 15 s，30 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。再进行第二轮大引物 PCR，以 pPIC9K^M-hIL-29 质粒为模板、第一轮 PCR 产物和 hIL-29-R 为引物，反应条件：94 °C 2 min；94 °C 30 s，45 °C 30 s，72 °C 1 min，2 个循环；94 °C 30 s，55 °C 30 s，72 °C 1 min，28 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 EZ-10 Spin Column DNA Extraction Kit 回收目的基因，按说明书操作。回收的目的基因与 pUCm-T 连接，转化 JM109 感受态细胞，经蓝白斑筛选阳性转化子，送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定。

1.4 重组毕赤酵母工程菌的构建与诱导表达

pPIC9K^M 质粒和测序正确的重组质粒 pUCm-T-hIL-29^{mut33,35} 同时用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切，回收酶切后的目的基因和 pPIC9K^M 质粒，用 T4 DNA 连接酶于 10 °C 连接过夜，连接产物转化 JM109 感受态细胞，提取质粒用 PCR 进行筛选，获得重组表达质粒 pPIC9K^M-hIL-29^{mut33,35}，送上海生工生物工程技术有限公司测序鉴定。

经测序鉴定的 pPIC9K^M-hIL-29^{mut33,35} 用 *Sal* I 线性化，电转化毕赤酵母 GS115，转化液

涂布 MD 平板,挑选在 MD 平板上生长良好的菌落点种至含不同浓度 G418 的 YPD 平板,筛选出高拷贝整合的重组毕赤酵母,命名为 *hIL-29^{mut33,35}/GS115*,电转化及筛选按 Invitrogen 公司操作手册。提取工程菌株 *hIL-29^{mut33,35}/GS115* 的基因组 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,重组工程菌的诱导表达按 Invitrogen 公司操作手册进行。

1.5 rhIL-29^{mut33,35} 的分离纯化及鉴定

诱导表达的发酵液 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液用超滤管(截留相对分子量为 10 kDa, Millipore 公司)超滤浓缩后,用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 6.0)透析,然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 \times 200 mm),以同样缓冲液洗柱;以含 NaCl 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(NaCl 浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L, pH 6.0)进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,收集各洗脱峰经 SDS-PAGE 分析,将含有 rhIL-29^{mut33,35} 的洗脱液超滤浓缩后冷冻干燥。

rhIL-29^{mut33,35} 的活性用 Western blotting 鉴定,取少量纯化的重组蛋白冻干粉,以适量无菌超纯水溶解,经 SDS-PAGE 后将蛋白电转移至 NC 膜上,转移的 NC 膜用 TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 15 mmol/L NaCl, 0.05% 吐温-20, pH 7.2)漂洗 5 次,用含 10%健康兔血清的 TBST 缓冲液 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日用 TBST 漂洗 5 次,加入羊抗人 IL-29 抗体(1:1 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBST 漂洗 5 次,加入 HRP 标记的兔抗羊 IgG(1:2 500) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 漂洗 5 次,用 DAB 试剂显色。

1.6 rhIL-29^{mut33,35} 的抗肿瘤活性分析

将野生型 rhIL-29、rhIL-29^{mut33,35}、IFN- α 2b(阳性对照)分别设置 50、500 和 1 000 ng/mL 3 个剂量组,同时设置空白和阴性对照组(肿瘤细胞自然生长组),每组设 5 个平行孔。

液氮冻存的 BEL7402、HCT8 和 SGC7901 细胞复苏后,用 RPMI 1640 完全培养液(含 10% 小牛血清)培养至对数生长期,经 0.25%胰蛋白酶消化和 RPMI 1640 培养液洗涤后,用 RPMI 1640 完全培养液调整细胞浓度至 1×10^8 个/mL,接种 96 孔细胞培养板,100 μ L/孔(空白孔不接种),置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 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 μ L,空白和阴性对照组加入等体积的完全培养液,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂继续培养 1 h,用酶标仪测定 A_{450} ,计算各组样品对 3 株肿瘤细胞的增殖抑制率,结果用 SPSS 软件 22.0 进行单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

增殖抑制率(Inhibition ratio, IR) = (1 - 样品组 A_{450} 值/阴性对照组 A_{450} 值) \times 100%。

2 结果与分析

2.1 hIL-29 成熟肽基因的定点突变

用大引物 PCR 方法对 hIL-29 基因进行定点突变,第一轮 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,回收约 130 bp 的产物作为第二轮 PCR 的大引物,进行第二轮 PCR,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳结果显示,在约 560 bp 处有一条 PCR 产物条带(图 1,泳道 1),其大小与预期相符。回收产物与 pUCm-T 连接的重组质粒 pUCm-T-*hIL-29^{mut33,35}*,经测序结果显示,基因

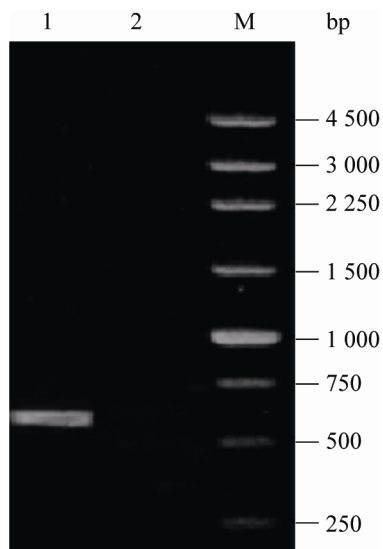


图1 *hIL-29^{mut33,35}* 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *hIL-29^{mut33,35}*. M: 250 bp DNA ladder marker; 1: product of second PCR amplified with primers *hIL-29-R* and the first PCR products; 2: empty.

大小为 563 bp, 编码 181 个氨基酸, 将测定的 *hIL-29^{mut33,35}* 序列与 *hIL-29* 的编码基因序列 (GenBank 登录号: AY336716.1) 比对显示: 第 98 位碱基 T 突变为 C, 三联体密码由 CTT 突变为 CCT, 编码产物由 Lys 突变为 Arg; 第 104 位碱基 C 突变为 T, 三联体密码由 CCT 突变为 CTT, 编码产物由 Arg 突变为 Lys。将 *hIL-29^{mut33,35}* 与 pPIC9K^M 连接构建的重组表达质粒 pPIC9K^M-*hIL-29^{mut33,35}* 经测序鉴定, *hIL-29^{mut33,35}* 的序列与在 pUCm-T-*hIL-29^{mut33,35}* 中的一致, 且读码框完全正确。

2.2 重组毕赤酵母工程菌的构建与诱导表达

按 1.4 的方法, 线性化的 pPIC9K^M-*hIL-29^{mut33,35}* 质粒电转化酵母 GS115 感受态细胞后, 经 G418 筛选获得高拷贝的重组工程菌株 *hIL-29^{mut33,35}/GS115*。提取的工程菌株基因组

DNA 以通用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行 PCR 鉴定的结果显示, PCR 扩增产物为约 2 200 bp 和 1 100 bp 的 DNA 条带, 约 2 100 bp 的产物为酵母 GS115 的 AOX1 基因, 约 1 100 bp 的产物包括目的基因 (563 bp) 和 pPIC9K^M 质粒上的 5'-AOX 和 3'-AOX 引物序列之间的片段 (500 bp), 表明 *hIL-29^{mut33,35}* 基因已成功整合入酵母 GS115 基因组中 (图 2)。

工程菌株 *hIL-29^{mut33,35}/GS115* 用 1.5% 的甲醇诱导表达 96 h 的发酵上清液, 经超滤和 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析纯化的产物, 经 SDS-PAGE 分析的图谱显示, 在约 23 kDa 处有一明显目的蛋白条带 (图 3, 泳道 3), 而 pPIC9K^M/GS115 的发酵液在该处无相同条带 (图 3, 泳道 2)。经测定 rhIL-29^{mut33,35} 的表观分子量高于理论计算的相对分子量 (约 20 kDa), 可能是 rhIL-29^{mut33,35} 在酵母 GS115 表达过程中发生了糖基化修饰^[18]所致。

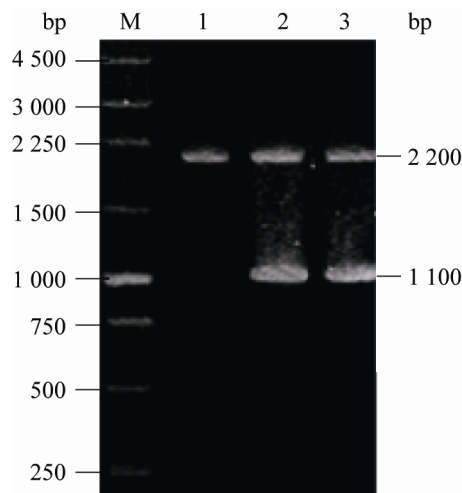


图2 重组毕赤酵母 *hIL-29^{mut33,35}/GS115* 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR detections of recombinant *P. pastoris hIL-29^{mut33,35}/GS115*. M: 250 bp DNA ladder marker; 1: pPIC9K^M/GS115; 2-3: *hIL-29^{mut33,35}/GS115*.

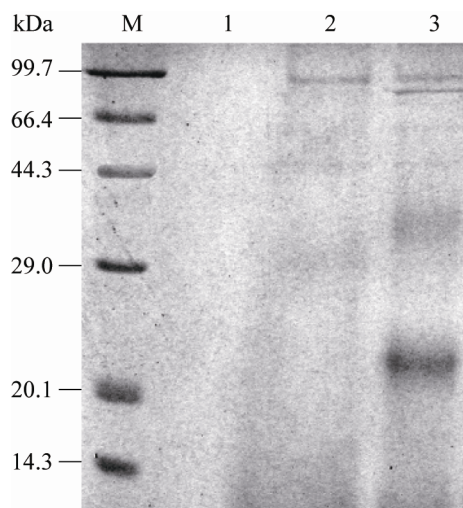


图 3 工程菌株 *hIL-29^{mut33,35}/GS115* 发酵液的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed rhIL-29^{mut33,35}. M: middle molecular weight protein marker; 1: empty; 2: pPIC9K^M/GS115; 3: *hIL-29^{mut33,35}/GS115*.

2.3 rhIL-29^{mut33,35} 的纯化和鉴定

发酵上清的超滤浓缩液用 SP-Sepharose Fast Flow 层析纯化,收集的 NaCl 梯度洗脱液经 SDS-PAGE 分析显示,目的蛋白主要在 0.4 mol/L 和

0.6 mol/L NaCl 梯度被洗脱,而流穿峰和 0.2 mol/L NaCl 缓冲液洗脱的主要是色素和杂蛋白。从 PAGE 图谱分析,以 0.4 mol/L NaCl 缓冲液洗脱的目的蛋白纯度较高,而 0.6 mol/L NaCl 缓冲液的洗脱峰还含有少量杂蛋白(图 4)。如需获得纯度更高的目的蛋白,可将 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 的洗脱峰合并后,进一步用分子筛层析纯化。

纯化的 rhIL-29^{mut33,35} 经 Western blotting 分析结果显示, rhIL-29^{mut33,35} 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 23 kDa(图 5),与 SDS-PAGE 图谱的条带大小相同,但反应条带弥散,这可能是电泳转移过程中电极缓冲液温度升高和 Western blotting 的放大效应所致。

2.4 rhIL-29^{mut33,35} 的抗肿瘤活性分析

用 CCK-8 试剂检测 rhIL-29^{mut33,35} 对肿瘤细胞 BEL7402、HCT8 和 SGC7901 的增殖抑制结果表明,各剂量组均显示增殖抑制效应,且细胞增殖抑制率随着 rhIL-29^{mut33,35} 剂量的增加而增大,具有较明显的剂量-效应关系(图 6-8)。

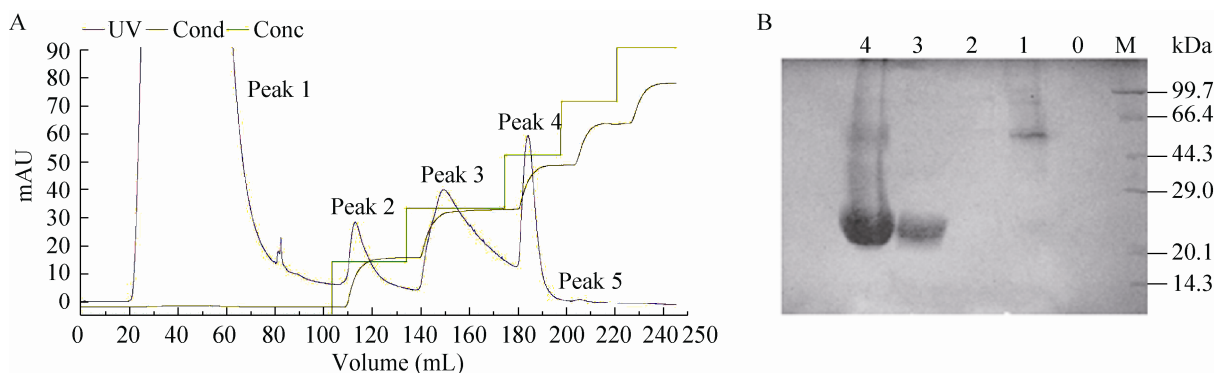


图 4 rhIL-29^{mut33,35} 的 SP Sepharose Fast Flow 层析纯化图谱与洗脱峰的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Chromatography patterns of the rhIL-29^{mut33,35} purified with SP Sepharose Fast Flow (A) and SDS-PAGE analysis of the eluted peaks (B). (A) Peak 1: eluted with 0 mol/L NaCl buffer; Peak 2: eluted with 0.2 mol/L NaCl buffer; Peak 3: eluted with 0.4 mol/L NaCl buffer; Peak 4: eluted with 0.6 mol/L NaCl buffer; Peak 5: eluted with 0.8 mol/L NaCl buffer. B: SDS-PAGE analysis of the eluted peaks. (B) M: middle molecular weight protein marker; 0: empty; 1: eluted with 0 mol/L NaCl buffer; 2: eluted with 0.2 mol/L NaCl buffer; 3: eluted with 0.4 mol/L NaCl buffer; 4: eluted with 0.6 mol/L NaCl buffer.

单因素方差分析结果显示, rhIL-29^{mut33,35}、野生型 rhIL-29 及商品化的 IFN- α 2b 对 3 株肿瘤细胞的增殖均具有抑制效应, 但对不同肿瘤细胞的增殖抑制率各有差异。rhIL-29^{mut33,35} 的低、中、高剂量组对肝癌细胞 BEL7402 增殖表现出明显的抑制作用 (图 6), 尤其高剂量组的抑制率达 (30.99 \pm 1.58)% ($P < 0.01$)。对结肠癌细胞

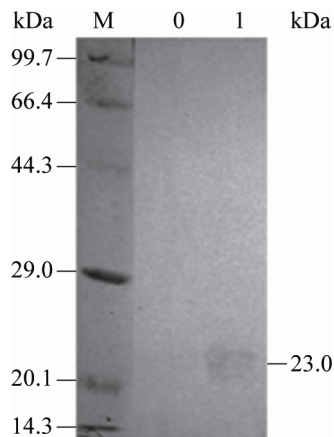


图 5 rhIL-29^{mut33,35} 的 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Western blotting of the purified rhIL-29^{mut33,35}. M: middle molecular weight protein marker; 0: empty; 1: the purified rhIL-29^{mut33,35}.

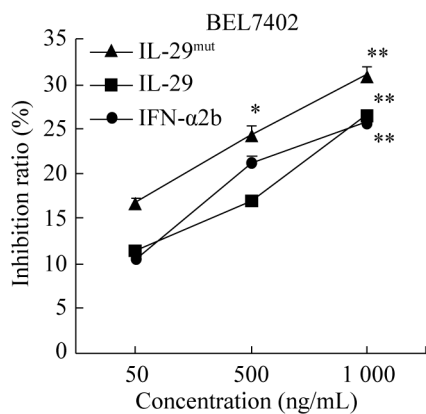


图 6 rhIL-29^{mut33,35} 对肝癌细胞 BEL7402 的增殖抑制效应

Fig. 6 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut33,35} on liver cancer cells BEL7402. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with negative control.

HCT8, 仅高、中剂量组 rhIL-29^{mut33,35} 的抑制作用比野生型 rhIL-29 的更强 ($P < 0.05$), 低剂量组的抑制效应差异不大 (图 7)。rhIL-29^{mut33,35} 的高剂量组对胃癌细胞 SGC7901 的抑制率达 32.05 \pm 2.02%, 显著高于野生型 rhIL-29 的作用 ($P < 0.01$), 提示变异体 rhIL-29^{mut33,35} 可能对胃癌细胞 SGC7901 具有较好的增殖抑制效应 (图 8)。

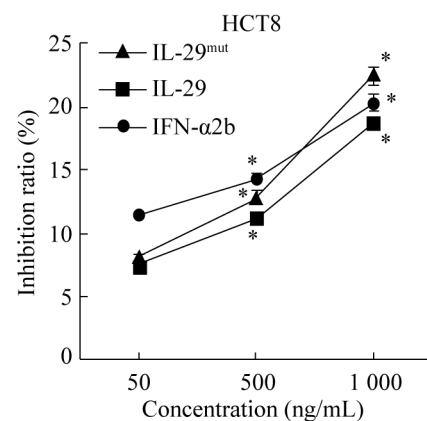


图 7 rhIL-29^{mut33,35} 对结肠癌细胞 HCT8 的增殖抑制效应

Fig. 7 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut33,35} on colon cancer cells HCT8. *: $P < 0.05$, compared with negative control.

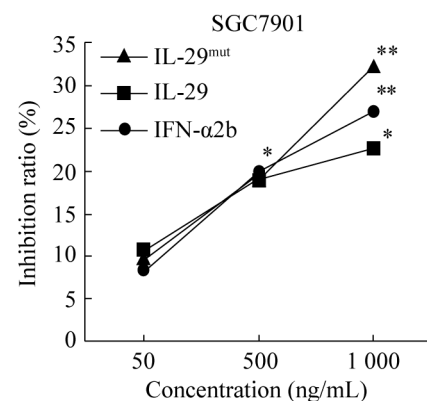


图 8 rhIL-29^{mut33,35} 对胃癌细胞 SGC7901 的增殖抑制效应

Fig. 8 Anti-proliferative effect of rhIL-29^{mut33,35} on gastric cancer cells SGC7901. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, compared with negative control.

3 讨论

自 IL-29 被发现以来,由于其具有与 I 型干扰素相似的生物学活性而受到广泛的关注,国际上对 IL-29 的生物学功能与医药应用的相关研究日益深入。虽然 IL-29 与 I 型 IFN 通过激活相同的 Jak-STAT 信号通路而产生效应,但人体不同组织器官中 IL-29 受体 (IL-28R1) 的表达具有明显差异^[19-20]。本研究获得的变异体 rhIL-29^{mut33,35} 对 3 株不同肿瘤细胞的增殖抑制效应不同,也可能与这些细胞表面 IL-28R1 的表达差异有关。IL-28R1 在人体不同组织细胞表达的差异,使 IL-29 作用的靶细胞比 I 型 IFN 的更局限。因此,IL-29 作为潜在的新型干扰素类药物,其临床副作用可能比 I 型 IFN 的更小^[21]。

在抗病毒活性方面,国际上对 IL-29 的开发已进入临床应用研究, I 期临床试验发现,用聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 对 IL-29 (IFN- λ 1) 进行修饰后,PEG-IFN- λ 1 的半衰期和稳定性均得到提高,同时最大限度地保留了 IFN- λ 1 的生物学活性^[22-23]。目前,PEG-IFN- λ 1 已进入 II 期临床试验,其临床适应症为丙型肝炎,给药剂量为 80–240 μ g,每周 1 次,以聚乙二醇化 IFN- α 2a (PEGASYS) 为对照。经 4–12 周临床应用显示 PEG-IFN- λ 1 的疗效良好,与 PEGASYS 的效果基本相同,但不良反应更少,药物作用更温和,其他 IFN 常见的不良反应如肌痛、疲劳、恶心和头痛等的发生率有所下降^[24-25]。

本文采用定点突变方法对野生型 hIL-29 进行分子改造,获得的变异体 rhIL-29^{mut33,35} 经初步分析,显示出较好的体外抗肿瘤细胞增殖活性,而且抗增殖作用要高于野生型 rhIL-29 的 ($P < 0.01$),表明变异体 rhIL-29^{mut33,35} 具有潜在的医药开发价值,为后续研制开发新的干扰素类

抗肿瘤药物奠定了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunol*, 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. *Nature Immunol*, 2003, 4(1): 69–77.
- [3] Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, et al. Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20869–20875.
- [4] Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem*, 2007, 282(10): 7576–7581.
- [5] 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 Virol*, 2007, 81(14): 7749–7758.
- [6] Guentherberg KD, Grignol VP, Raig ET, et al. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal transduction and apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(2): 510–520.
- [7] Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, et al. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem*, 2004, 279(31): 32269–32274.
- [8] Witte K, Witte E, Sabat R, et al. IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21(4): 237–251.
- [9] Doyle SE, Schreckhise H, Khuu-Duong K, et al. Interleukin-29 uses a type I interferon-like program to promote antiviral responses in human

- hepatocytes. *Hepatology*, 2006, 44(4): 896–906.
- [10] Dai J, Megjugorac NJ, Gallagher GE, et al. IFN- λ 1 (IL-29) inhibits GATA3 expression and suppresses Th2 responses in human naive and memory T cells. *Blood*, 2009, 113(23): 5820–5838.
- [11] Mennechet FJ, Uze G. Interferon-lambda-treated dendritic cells specifically induce proliferation of FOXP3-expressing suppressor T cells. *Blood*, 2006, 107(11): 4417–4423.
- [12] Zitzmann K, Brand S, Baehs S, et al. Novel interferon- λ s induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 344: 1334–1341.
- [13] Donnelly RP, Kotenko SV. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J Interf Cytok Res*, 2010, 30(8): 555–564.
- [14] Lopušná K, Režuchová I, Betakova T, et al. Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta Virol*, 2013, 57(2): 171–179.
- [15] Zheng HJ, Zhu R, Ge CL, et al. Bioinformatics of human interleukin-29. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(2): 209–212 (in Chinese).
郑海军, 朱荣, 葛春蕾, 等. 人白细胞介素-29的生物信息学分析. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(2): 209–212.
- [16] Chen W, Yu ML, Zheng HJ, et al. Cloning and eukaryotic expression of human interleukin-29 gene. *Chin J Biologicals*, 2012, 25(4): 446–448 (in Chinese).
陈伟, 于明磊, 郑海军, 等. 人白细胞介素-29基因的克隆及真核表达. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(4): 446–448.
- [17] Zheng HJ, Lu Y, Chen W, et al. Optimization of condition for expression of native N-terminus of human interleukin-29 mature peptide in *Pichia pastoris*. *Chin J Biologicals*, 2013, 26(3): 402–405 (in Chinese).
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. *中国生物制品学杂志*, 2013, 26(3): 402–405.
- [18] Zachary JM, Eugenia M, Wei L, et al. Crystal structure of human interferon- λ 1 in complex with its high-affinity receptor interferon- λ R1. *Mol Bio*, 2010, 404(4): 650–664.
- [19] 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. *Genes Immun*, 2009, 10(8): 702–714.
- [20] 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. *Eur J Cancer*, 2010, 46(1): 180–190.
- [21] Zheng HJ, Chen W. Progress in research on human IL-29. *Chin J Biologicals*, 2012, 25(1): 118–122 (in Chinese).
郑海军, 陈伟. 人白细胞介素-29 的研究进展. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(1): 118–122.
- [22] Muir AJ, Shiffman ML, Zaman A, et al. Phase 1b study of pegylated interferon lambda 1 with or without ribavirin in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 2010, 52(3): 822–832.
- [23] Anderw JM, Mitchell L, Shiffman ML, et al. A phase 1b dose-ranging study of 4 weeks of PEG-interferon (IFN) lambda (PEG-rIL-29) in combination with Ribavirin (RBV) in patients with chronic genotype 1 hepatitis C virus (HCV) infection[C]. AASLD. The Liver Meeting in Boston, MA, 2009-11-30.
- [24] Ramos EL. Preclinical and clinical development of pegylated interferon-lambda 1 in chronic hepatitis C. *J Interf Cytok Res*, 2010, 30(8): 591–595.
- [25] Bristol-Myers Squibb. Pipeline asset update for PEG-interferon lambda [EB/OL]. [2014-04-21]. http://www.bms.com/research/investigational/hepatitis/Pages/PEG_interferon_lambda.aspx.

(本文责编 陈宏宇)