

小鼠白细胞介素 18 在大肠杆菌中的表达、纯化及抗肿瘤作用研究

周 虎 赵惠仁* 裴冬生 陆 梁 胡书群

(徐州医学院生物化学与分子生物学研究中心 徐州 221002)

摘 要 用 RT-PCR 从小鼠肝脏细胞中扩增出小鼠白细胞介素 18(mIL-18)的 cDNA,克隆到表达载体 pJW2 中,经热诱导后在大肠杆菌 JM109 中表达。表达的重组 mIL-18(rmIL-18)主要以包涵体形式存在,占菌体总蛋白质的 18%。包涵体用 5 mol/L 尿素溶解后,经 Sephadex G-100 柱纯化。纯化的蛋白质经透析复性,在 0.5 mg/L Con A 存在的条件下,能够对小鼠脾细胞具有剂量依赖的 IFN- γ 诱生作用。以 1×10^5 H₂₂ 肝癌细胞腹腔注射昆明小鼠,构建小鼠 H₂₂ 肝癌腹水瘤模型。分别在肿瘤细胞接种后 1、4 和 8d,用 10 μ g 纯化产物对荷瘤小鼠进行腹腔注射。结果显示 rmIL-18 注射组小鼠死亡速率延缓,生存率显著提高($P < 0.01$),达到 62.5%。首次证明 mIL-18 对小鼠 H₂₂ 肝癌具有显著的抑制作用,经 mIL-18 作用后存活小鼠具有对 H₂₂ 肝癌细胞的免疫记忆性。

关键词 小鼠白细胞介素 18, 克隆, 表达, 纯化, 复性, H₂₂ 肝癌

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0548-05

白细胞介素 18(IL-18)又称 IFN- γ 诱导因子(IGIF),是新近发现的一种细胞因子,主要由活化的巨噬细胞产生^[1]。IL-18 除了能够诱导 Th1、NK、NKT 细胞产生 IFN- γ 外^[2],还能够增强 CD4⁺ T 细胞和 NK 细胞 FasL 介导的细胞毒作用^[3]。IL-18 还具有抗肿瘤^[4]、抗病原微生物以及抗超敏反应^[5]等生物学功能,另外 IL-18 还与 I 型糖尿病^[6]、类风湿性关节炎^[7]等自身免疫性疾病有关。由此可见,IL-18 具有多种生物学功能并且有潜在的临床应用价值。我们克隆了小鼠 IL-18(mIL-18)的 cDNA,并研究了其在大肠杆菌中的表达,探讨了重组小鼠 IL-18(rmIL-18)的纯化、复性,以及对小鼠 H₂₂ 肝癌的初步抑制作用。这为进一步研究其结构及抗肿瘤作用机理打下了基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及质粒

大肠杆菌 JM109,表达载体 pJW2 由本室保存。

1.2 酶及试剂

NdeI、SalI 限制酶,T4 DNA 连接酶,Taq 酶,RNA 提取试剂盒,RT-PCR 试剂盒,质粒提取试剂盒均购自 Promega 公司;Con A 购自 Sigma 公司;Sephadex G-100 购自 Amersham Pharmacia Biotech 公司;Mouse

IFN- γ ELISA 试剂盒购自晶美公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞及实验动物

H₂₂ 肝癌细胞购自上海药物所,昆明小鼠(6~8 周)由本院动物房提供。

1.4 mIL-18 cDNA 的克隆

用 RNA 提取试剂盒从昆明小鼠肝脏细胞中提取总 RNA,用 RT-PCR 方法扩增出 mIL-18 cDNA。根据 GenBank 上的 mIL-18 序列设计引物,上游引物为 5'-cctggaacatgatgaacttggccgacttc-3',5'端含 NdeI 酶切位点接头;下游引物为 5'-gcacgtcgacatcgataaacg tgttactctataaac-3',5'端含 SalI 酶切位点接头。PCR 循环条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 0.5min,60 $^{\circ}$ C 退火 1min,68 $^{\circ}$ C 延伸 2min,25 个循环。

1.5 mIL-18 cDNA 表达载体的构建与测序

DNA 片段回收、DNA 酶切、电泳鉴定、连接、转化、质粒抽提等操作均按照卢圣栋等人介绍的方法进行^[8]。酶切鉴定正确的重组表达载体用 ABI3700 全自动测序仪测序。

1.6 mIL-18 重组蛋白质的诱导表达

将含 mIL-18 cDNA 重组质粒的大肠杆菌 JM109 接种于 LB 培养基中 32 $^{\circ}$ C 振荡培养,使培养液的光密度 A₆₀₀ 达 0.6,迅速升温至 42 $^{\circ}$ C 继续培养 5h。离

心收集菌体,采用 15% SDS-PAGE 检测表达情况。

1.7 包涵体的分离、洗涤及溶解

用 TE 悬浮菌体,于冰浴中超声破碎 3 次,频率为 25kHz,每次 1 min。10 000g 离心 15 min 收集沉淀。以 2 mol/L 尿素洗涤 2 次,10 000g 离心 15min 收集沉淀。用 5 mol/L 尿素室温溶解沉淀,10 000g 离心 20 min 收集上清。

1.8 mL-18 重组蛋白质的纯化

5 mol/L 尿素溶解的上清经超滤浓缩后,用 Sephadex G-100 柱(2.5 cm × 95 cm)纯化。洗脱液为 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH6.8)、5mol/L 尿素、5 mmol/L β-巯基乙醇,流速为 20 mL/h,每管收集 5 mL。用 SDS-PAGE 分析纯化产物。

1.9 纯化产物的复性

纯化产物的复性采用透析复性法。用洗脱液稀释纯化产物至蛋白质浓度为 0.05 ~ 0.1 g/L。在复性液 (pH7.4PBS, 5% 甘油, 0.5mmol/L EDTA, 0.25 mmol/L β-巯基乙醇)中 4℃ 透析复性 24h,每 8h 换液 1 次。

1.10 纯化产物的生物活性鉴定

小鼠脾细胞收集按照 Okamura 等人的方法进行^[9],收集的脾细胞悬液以 3×10^6 细胞/mL 密度接种到 96 孔细胞培养板中。每孔加入不同浓度的 mL-18 和终浓度为 0.5mg/L 的 Con A,在 37℃,5% 的 CO₂ 孵箱中培养 24h,收集细胞上清,用 ELISA 法测定 IFN-γ 含量。

1.11 小鼠 H₂₂ 肝癌腹水瘤模型的构建及药物治疗

以 1×10^5 H₂₂ 肝癌细胞腹腔注射昆明小鼠,构建小鼠 H₂₂ 肝癌腹水瘤模型。分别在肿瘤细胞接种后 1、4 和 8d,每天对荷瘤小鼠腹腔注射 10μg mL-18/100μL 复性产物,连续注射 5d,对照组注射同样体积的复性缓冲液。每组 8 只,观察小鼠的死亡速率与生存率。

1.12 存活小鼠免疫记忆实验

经 mL-18 作用存活的 10 只小鼠,在第一次肿瘤细胞接种 80d 后,再次腹腔注射 1×10^5 H₂₂ 肝癌细胞。

2 结果

2.1 mL-18 cDNA 的克隆

以提取小鼠肝脏细胞的总 RNA 为模板,进行 RT-PCR。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定为一清晰条带,与预期的结果 620bp 相符(图 1)。

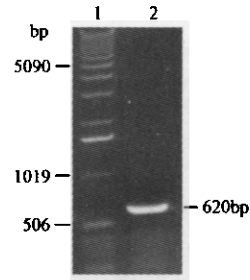


图 1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis of RT-PCR product

1. DNA marker; 2. Product of RT-PCR

2.2 pJW2/mL-18 表达载体的构建和鉴定

RT-PCR 产物与质粒 pJW2 经 *Nde*I、*Sal*I 双酶切并纯化后,在 T4 DNA 连接酶作用下,室温连接 6 h 后转化感受态细胞 JM109。小量制备所获得质粒经双酶切后,琼脂糖凝胶电泳显示一条与目的基因分子量一致的 DNA 片段(图 2)。测序结果表明所克隆的 mL-18 序列与 GenBank 上序列一致。

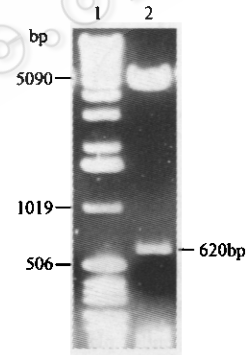


图 2 限制酶电泳鉴定图谱

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid

1. DNA marker; 2. pJW2/mL-18/ *Nde*I + *Sal*I

2.3 表达产物的分析鉴定

重组菌温度诱导后,经上样缓冲液裂解,在 15% 的 SDS-PAGE 上可观察到一分子量与理论值(约 18.3kD)相符的条带,占菌体总蛋白的 18%。冰浴超声破碎后离心,将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果显示 mL-18 主要位于沉淀中,说明表达的 mL-18 是以包涵体的形式存在(图 3)。该沉淀经洗涤后用 5 mol/L 尿素溶解,蛋白质电泳显示纯度已达 50% 左右。

2.4 重组蛋白质的纯化

将溶解的包涵体超滤后上 Sephadex G-100 柱,在 280 nm 处检测蛋白质,其层析图谱为两个主要的蛋白质峰,峰 1 位于 42 管为细菌蛋白质,峰 2 位于 55 管为 mL-18(图 4)。纯化样品用 SDS-PAGE 分

析,考马斯亮蓝染色后,看到一条带(图3)。

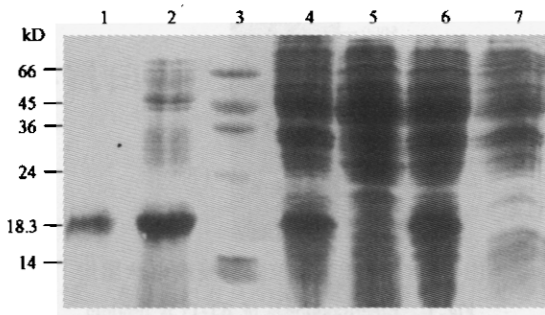


图3 纯化蛋白质的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of rmIL-18 in the course of purification electrophoresis was on a 15% running gel and proteins were visualized by Coomassie brilliant blue R-250 staining 1. Purified rmIL-18 by Sephadex G-100 column; 2. Soluble inclusion bodies in 5 mol/L urea; 3. Protein molecular weight marker; 4. Precipitation of cell lysates; 5. Supernatant of cell lysates; 6. Induced total bacteria proteins; 7. Uninduced total bacteria proteins

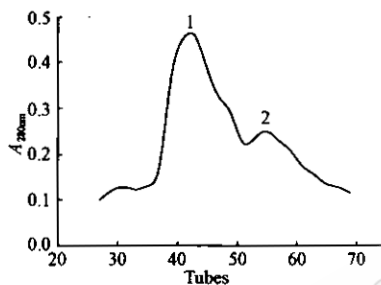


图4 蛋白质 Sephadex G-100 柱洗脱图谱

Fig.4 Sephadex G-100 gel filtration of the rmIL-18 and elution with 0.02 mol/L phosphate buffer pH6.8, 5mol/L urea, 5mmol/L β -mercaptoethanol, the peak 2 is the target protein

2.5 生物活性测定

纯化产物透析复性后与 Con A 共刺激小鼠脾细胞 24 h, 细胞培养上清中检测到 IFN- γ 。随着 rmIL-18 浓度的增加, 上清中 IFN- γ 含量也随之上升。说明 rmIL-18 能够刺激小鼠脾细胞产生 IFN- γ (图5)。

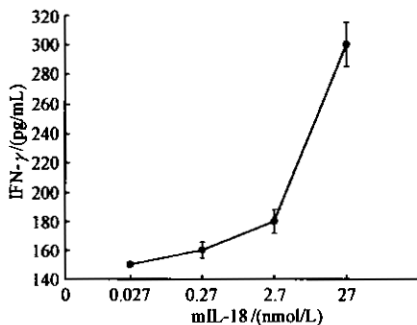


图5 小鼠脾细胞受 rmIL-18 刺激后诱导 IFN- γ 分泌的检测

Fig.5 Induction of IFN- γ production by mouse splenocytes in response to rmIL-18

2.6 对肿瘤的抑制作用

对照组昆明小鼠在接种 H₂₂ 肝癌细胞 10d 后, 腹部开始增大, 20d 后开始死亡。rmIL-18 注射组小鼠比对照组的死亡速率明显降低(图6)。对照组在肿瘤接种后 36d, 小鼠全部死亡。在接种 1, 4d 后注射 rmIL-18, 每组有 5 只小鼠完全抑制肿瘤生长, 生存率显著提高 ($P < 0.01$), 达到 62.5%。而在接种 8d 后注射 rmIL-18, 小鼠死亡速率比对照组降低, 但最终只有 1 只存活。

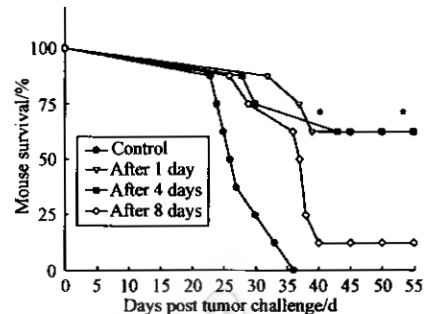


图6 rmIL-18 抑制肿瘤作用

Fig.6 Antitumor effects of rmIL-18 (* $P < 0.01$)

Recombinant mIL-18(10 μ g/mouse) was administrated i. p. on days 1, 4, and 8 after tumor challenge

2.7 免疫记忆性实验

再次给存活小鼠注射 1×10^5 H₂₂ 肝癌细胞, 5 周后 10 只小鼠全部存活下来。说明经 rmIL-18 作用后存活的小鼠获得了对 H₂₂ 肝癌的免疫抑制。

3 讨论

1995 年, Okamura 等从先经热灭活的痤疮丙酸杆菌感染, 后经脂多糖攻击引起中毒性休克的小鼠肝脏中分离出一种因子, 该因子能够诱导 Th1 类细胞产生 IFN- γ , 故被命名为 IFN- γ 诱导因子(IGIF)^[1]。后研究发现它除能诱导 IFN- γ 产生外, 还具有其他多种生物学活性, 现命名为 IL-18^[18]。IL-18 在结构上与 IL-1 β 相似, 但在功能上更接近于 IL-12^[11]。小鼠的 IL-18 前体由 192 个氨基酸残基组成, 含一段 35 个氨基酸残基的前导序列, 有活性的 mIL-18 有 157 个氨基酸残基组成。IL-18 的前体在 IL-1 β 转换酶(ICE 或 caspase-1)作用下, 去除前导序列成为成熟的 IL-18 而发挥生物学作用^[12]。但是由于细菌中没有 ICE, 无法切除 IL-18 前体的前导序列, 我们设计了上游引物, 去除 mIL-18 的前导序列, 但这样可能会在成熟的 mIL-18 的 5' 端多了一个蛋氨酸。经过生物学活性测试, 发现 rmIL-18 仍具有刺激小鼠脾细胞产生 IFN- γ 的活性。这说明 5' 端即使多了一

个 Met,也不会明显影响 rmIL-18 的生物学活性。国内杜勇^[13]等人曾将人的 IL-18(hIL-18)克隆到大肠杆菌中用 IPTG 诱导表达,并用 NiNTA 柱纯化。胡晓^[14]等表达出 hIL-18 和 hIL-18-GFP 融合蛋白质。我室裴冬生^[15]等人也成功克隆出 hIL-18,并已在大肠杆菌 DH5 α 、JM101 中表达。我们开始也用大肠杆菌 DH5 α 、JM101 表达 mL-18,发现 mL-18 在此两菌株中不表达或表达量很低。后来改用大肠杆菌 JM109、BL21,在这两菌株中 mL-18 得到较高的表达。这可能是由于 mL-18 中含有一些稀有密码子,而不同菌株对一些稀有密码子的识别能力不同所致。

国外对 IL-18 抗肿瘤的作用已有报道。IL-18 并非直接对肿瘤产生作用,而是通过激活一些免疫细胞来抑制肿瘤^[16]。文献报道 IL-18 的抗肿瘤作用主要由 NK 细胞介导,但是也有文献报道 CD4⁺ T 细胞和 CD8⁺ T 也起重要的作用,这可能是由于 IL-18 可以激活体内不同的免疫细胞,而不同肿瘤的抑制需要不同的免疫细胞作用。最近也有文献报道 IL-18 可以通过诱导肿瘤细胞产生 FasL,直接诱导肿瘤细胞凋亡^[17]。目前已经发现 IL-18 对多种肿瘤有显著抑制作用,但是也有文献报道 IL-18 单独应用对一些肿瘤无效^[18],肝癌是一种常见的恶性肿瘤,对人类健康有极大的危害性,而国内外目前还没有关于 IL-18 对肝癌作用的报道。本实验构建了小鼠 H₂₂ 肝癌腹水瘤模型,并证明 rmIL-18 对 H₂₂ 肝癌具有显著的抑制作用,存活小鼠具有对 H₂₂ 肝癌细胞的免疫记忆性。IL-18 的显著抗肿瘤作用具有潜在的临床应用价值,小鼠的肿瘤,无论在组织发生上、临床过程上以及组织形态学上都与人类的肿瘤有相似之处,因此对鼠源性白介素 18 抗肿瘤作用的研究具有极其重要的意义。IL-18 在小鼠实验的基础上,一方面确定其疗效并找到有效的用药途径和用药剂量,另一方面对其产生的毒副作用进行充分的研究,积累大量的实验数据,确定其有效性和安全性后,才能进行临床试验,最终才能应用于临床。我们的实验为进一步研究 IL-18 的抗肝癌作用机理及临床应用打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*, 1995, **378**(2): 88 ~ 91
- [2] Sugawara I. Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens. *Microbes*

- Infect*, 2000, **2**(10): 1257 ~ 1263
- [3] Golab J. Interleukin 18 - interferon gamma inducing factor - a novel player in tumor immunotherapy? *Cytokine*, 2000, **12**(4): 332 ~ 338
- [4] Kikuchi T, Akasaki Y, Joki T *et al.* Antitumor activity of interleukin-18 on mouse glioma cells. *Journal of immunotherapy*, 2000, **23**(2): 184 ~ 189
- [5] Yoshimoto T, Nagai N, Ohkusu K *et al.* LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta + T cells. *J Immunol*, 1998, **161**(3): 1483 ~ 1492
- [6] Rothe H, Jenkins N A, Copeland N G *et al.* Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest*, 1997, **99**(3): 469 ~ 474
- [7] Gracie J A, Forsey R J, Chan W L *et al.* A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 1999, **104**(10): 1393 ~ 1401
- [8] LU S D(卢圣栋). Current protocols for molecular biology, 2nd ed, Beijing: Peking Union Medical College Press, 1999
- [9] Okamura H, Nagata K, Komatsu T *et al.* A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infection and immunity*, 1995, **63**(10): 3966 ~ 3972
- [10] Ushio S, Namba M, Okura T *et al.* Cloning of the cDNA for human IFN- γ -inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol*, 1996, **156**(11): 4274 ~ 4279
- [11] Kohno K, Kurimoto M. Interleukin-18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both. *Clin Immunol Immunopath*, 1998, **86**(1): 11 ~ 15
- [12] Gu Y, Kuida K, Tsutsui H *et al.* Activation of interferon- γ inducing factor mediated by interleukin-1 β converting enzyme. *Science*, 1997, **275**(5297): 206 ~ 209
- [13] DU Y(杜勇), JIANG T(江涛), DU G X(杜桂鑫) *et al.* Cloning of precursor/mature human interleukin-18 genes from human PBMC, expression and purification of the proteins in *E. coli*. *Immunological Journal*(免疫学杂志), 1999, **15**(4): 226 ~ 228
- [14] HU X(胡晓), LU P(吕平), WANG L F(王丽峰) *et al.* Expression and analysis of recombinant human IL-18 and human IL-18-GFP fusion protein. *Chin J Microbiol Immunol*(中国微生物学和免疫学杂志), 1999, **19**(4): 306 ~ 310
- [15] PEI D S(裴冬生), HU S Q(胡书群), ZHAO H R(赵惠仁). Interleukin 18: high level expression in *E. coli*, purification and renaturation of the recombinant protein. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2000, **32**(4): 397 ~ 400
- [16] Tanaka F, Hashimoto W, Okamura H, *et al.* Rapid generation of potent and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by interleukin 18 using dendritic cells and natural killer cells. *Cancer Res*, 2000, **60**(17): 4838 ~ 4844
- [17] Okano F, Yamada K. Canine interleukin-18 induces apoptosis and enhances Fas ligand mRNA expression in a canine carcinoma cell line. *Anticancer Res*, 2000, **20**(5B): 3411 ~ 3415
- [18] Sobota V, Bubenik J, Simova J *et al.* Intratumoral IL-2 gene transfer improves the therapeutic efficacy of IL-12 but not IL-18. *Folia Biol (Praha)*, 2000, **46**(5): 191 ~ 193

Expression and Purification of Murine Interleukin 18 in *Escherichia coli* and Its Antitumor Effects

ZHOU Hu ZHAO Hui-Ren* PEI Dong-Sheng LU Liang Hu Shu-Qun

(Research Center for Biochemistry and Molecular Biology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

Abstract Total RNA was extracted from murine hepatocytes, and the cDNA of interleukin 18 (IL-18) was amplified by RT-PCR. The cDNA was introduced into the expression vector pJW2 and sequenced. Under heat induction, the recombinant murine IL-18 (rmIL-18) was expressed in inclusion bodies in *E. coli* with the yield accounting for 18% of total bacteria proteins. The inclusion bodies were dissolved with 5 mol/L urea, and rmIL-18 was purified using Sephadex G-100 column chromatography. In the presence of 0.5 mg/L Con A, the purified rmIL-18 showed dose-dependent IFN- γ -inducing activity in murine splenocytes. The purified rmIL-18 exhibited significant antitumor effects in Kunming mice challenged intraperitoneally (i. p.) with H₂₂ hepatocarcinoma when administered 10 μ g rmIL-18 i. p. on days 1,4 after challenge, and the mice survived resisted the rechallenged with H₂₂ cells.

Key words murine interleukin 18, cloning, expression, purification, renaturation, H₂₂ hepatocarcinoma

Received: March 26, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-516-5748423; E-mail: zhaohuir@yahoo.com