

# 重组人胸腺素 $\alpha$ 原体外对 $IFN\gamma$ , $IFN\alpha$ 及 $TNF\alpha$ 的影响

邱磊, 郭葆玉\*, 苗红, 道书艳, 张冉, 袁鹏群, 杨旭

(第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433)

**摘要:** 目的 体外观察重组人胸腺素  $\alpha$  原 (prothymosin  $\alpha$ , Pro T $\alpha$ ) 对几种重要细胞因子分泌的影响。方法 用脾淋巴细胞、脾巨噬细胞及腹腔巨噬细胞, 以 ELISA 法检测 Pro T $\alpha$  对  $IFN\gamma$ ,  $IFN\alpha$  和  $TNF\alpha$  分泌的影响。结果  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$  Pro T $\alpha$  明显促进脾细胞分泌  $IFN\gamma$  ( $P < 0.05$ ), 该浓度的 Pro T $\alpha$  也明显刺激小鼠脾巨噬细胞分泌  $IFN\alpha$  ( $P < 0.01$ ); 在小鼠腹腔巨噬细胞中, Pro T $\alpha$  能明显刺激  $IFN\alpha$  和  $TNF\alpha$  的分泌 ( $P < 0.01$ )。结论 Pro T $\alpha$  对细胞因子  $IFN\gamma$ ,  $IFN\alpha$  和  $TNF\alpha$  的分泌均有促进作用。

**关键词:** 胸腺素  $\alpha$  原; 免疫调节; 细胞因子

中图分类号: R967

文献标识码: A

文章编号: 0513 - 4870(2002)05 - 0326 - 03

人胸腺素  $\alpha$  原 (prothymosin  $\alpha$ , Pro T $\alpha$ ) 自 1995 年克隆成功以来<sup>[1]</sup>, 其生物学活性成为人们研究的热点。研究发现 Pro T $\alpha$  是一个重要的免疫调节因子<sup>[2]</sup>, 它不仅在保护小鼠抗致病菌机会感染实验中作用优于胸腺素  $\alpha$ , 而且延长荷瘤小鼠寿命, 促进老年动物的脾、胸腺等免疫器官的重量。同时, 它在治疗肿瘤、自身免疫疾病和慢性肝炎等方面均有良好的应用前景。本文以我室克隆的一种胸腺素  $\alpha$  原 (其 cDNA 序列登录了 GenBank: AF170294) 为基础, 在原核系统中成功表达了分子量为  $3.7 \times 10^4$  的融合蛋白, 并对该蛋白的生物活性进行了体外研究。

## 材料与方 法

**动物** BALB/c 小鼠,  $\eta$ , 4~6 周龄, 购自本校动物所。

**材料与试剂** 胸腺素  $\alpha$  原与谷胱甘肽-硫转移酶 (GST) 的融合蛋白及对照品 GST 蛋白, 均由本室构建、表达并纯化。RPMI-1640 为 Gibco 产品; Con A 为 Watson Biomedical 产品; 脂多糖 (LPS) 购自 Sigma 公司; 超级新生小牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司生产。小鼠  $IFN\gamma$ ,  $IFN\alpha$  及  $TNF\alpha$  定量用 ELISA 试剂盒购自上海百特科技有限公司; BCA<sup>TM</sup> 蛋白分析试剂盒购自 PIERCE 公司。

**仪器** SK-200 型全新电动加样器 (上海浦江分析仪器厂), XSZ-D2 型倒置光学显微镜 (重庆光学仪器厂), CD2 Water Jacketed Incubator (Farma Scientific), Wellscan MK3 型酶联免疫检测仪 (Labsystems Dragon 公司), AKTA explore 蛋白纯化系统工程 (Amersham Pharmacia Biotech)。

**Pro T $\alpha$  对小鼠脾细胞分泌  $IFN\gamma$  的影响** 小鼠脾细胞悬液制备: 脱白处死 BALB/c 小鼠, 在无菌金属筛网上研磨分离单个细胞, 用 Hanks 液洗涤 3 次。用 1% 台盼蓝染色法检测细胞活力, 计数细胞。再用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液将细胞稀释, 使浓度为  $5 \times 10^9 \cdot$  L $^{-1}$ 。铺入 24 孔板, 每孔 1 mL。将细胞分两组, 其中一组加 Con A 至终浓度  $5 \mu\text{g} \cdot$  mL $^{-1}$ 。用 BCA<sup>TM</sup> 蛋白分析试剂盒对纯化的 GST 和样品定量。每组细胞又分别设对照组, 空白和 GST 组 ( $1 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ); 不同浓度的 Pro T $\alpha$  样品组 ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-10}$  mol  $\cdot$  L $^{-1}$ ), 每孔加样  $5 \mu\text{L}$ 。在  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 72 h, 收集细胞培养液,  $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心, 上清液作为待测样品。用 ELISA 法定量检测  $IFN\gamma$  的表达。建立标准曲线时设标准品 8 孔: 1000, 500, 250, 125, 62, 31, 16, 0  $\text{pg} \cdot$  mL $^{-1}$ , 绘制半对数曲线, 根据样品 A 值在该曲线图上查出相应  $IFN\gamma$  含量。

**Pro T $\alpha$  对脾巨噬细胞分泌  $IFN\alpha$  的影响** 制备小鼠脾巨噬细胞: 按上述方法制备脾细胞悬液, 用含 20%~40% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液将细胞悬液稀释成  $1 \times 10^{10} \cdot$  L $^{-1}$ , 接种到培养瓶中。置  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h。收集培养瓶中的

收稿日期: 2001-06-11.

作者简介: 邱磊 (1972-), 女, 硕士研究生;

郭葆玉 (1949-), 男, 教授, 博士生导师。

\* 通讯作者 Tel: (021) 25070348, E-mail: pharmas@21.cn.com

贴壁细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,计数。用含  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 的无血清培养液调整细胞到  $2 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 。分组情况同上,细胞加入样品后培养 24 h,用 IFN $\alpha$  的 ELISA 定量试剂盒测定。

**Pro T $\alpha$  对腹腔巨噬细胞分泌 IFN $\alpha$  的影响**  
用常规方法收集小鼠腹腔渗出液,4 $^{\circ}\text{C}$ ,800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心,去上清液。用预冷的 RPMI-1640 培养液洗涤细胞 3 次,用台盼蓝染色计数细胞并决定细胞活力。用含  $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  LPS 的无血清培养液调整细胞到  $2 \times 10^9 \cdot \text{L}^{-1}$ 。分组情况亦同上,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ ,5% $\text{CO}_2$  培养箱中,24 h 后上清液作为待测样品。用 ELISA 法定量检测 IFN $\alpha$  的含量。

**Pro T $\alpha$  对腹腔巨噬细胞分泌 TNF $\alpha$  的影响**  
分离巨噬细胞,加入样品后培养 12 h,收集上清液,用 TNF $\alpha$  的 ELISA 定量试剂盒测定。

统计学处理 采用 *t* 检验。

## 结 果

### 1 Pro T $\alpha$ 对小鼠脾细胞分泌 IFN $\gamma$ 的影响

与对照组相比,在无 Con A 作用下,单独 Pro T $\alpha$  不能明显刺激小鼠脾细胞分泌 IFN $\gamma$ ;在与 Con A( $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 共同作用下,只有  $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组的 Pro T $\alpha$  明显促进脾细胞分泌 IFN $\gamma$ ,见表 1。

**Table 1 Effect of prothymosin  $\alpha$  (Pro T $\alpha$ ) on secretion of IFN $\gamma$  in splenic lymphocytes of BALB/c mice *in vitro***

Group	Concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IFN $\gamma$ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	
		Without Con A	With Con A
GST control	$1 \times 10^{-7}$	10	20
Pro T $\alpha$	$1 \times 10^{-7}$	20	90*
	$1 \times 10^{-8}$	9	48
	$1 \times 10^{-9}$	5	30
	$1 \times 10^{-10}$	2	25

Splenocytes were isolated from BALB/c mice and incubated with various concentrations of Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with or without Con A ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 72 h. IFN $\gamma$  levels in the cultured supernatant were detected by ELISA.  $n = 3$ , \*  $P < 0.05$  vs GST control

### 2 Pro T $\alpha$ 对小鼠脾巨噬细胞分泌 IFN $\alpha$ 的影响

在 LPS 的诱导下,与对照组相比,只有  $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  高浓度 Pro T $\alpha$  明显刺激小鼠脾巨噬细胞分泌 IFN $\alpha$ ,见表 2。

### 3 Pro T $\alpha$ 对小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IFN $\alpha$ 的影响

在 LPS 的诱导下,与对照组相比,Pro T $\alpha$  能明显刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌 IFN $\alpha$ , $1 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组有显著性差异,其他各组均有极显著性差异,见表 3。

**Table 2 Effect of Pro T $\alpha$  on secretion of IFN $\alpha$  in splenic macrophages of BALB/c mice *in vitro***

Group	Concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IFN $\alpha$ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
LPS		10
LPS + GST	$1 \times 10^{-7}$	16
LPS + Pro T $\alpha$	$1 \times 10^{-7}$	100**
	$1 \times 10^{-8}$	44
	$1 \times 10^{-9}$	20
	$1 \times 10^{-10}$	10

Splenic macrophages were isolated from BALB/c mice and incubated with various concentrations of Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of LPS ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h. IFN $\alpha$  levels in the cultured supernatant were detected by ELISA.  $n = 3$ , \*\*  $P < 0.01$  vs LPS + GST ( $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

**Table 3 Effect of Pro T $\alpha$  on secretion of IFN $\alpha$  in peritoneal macrophages of BALB/c mice *in vitro***

Group	Concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IFN $\alpha$ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
LPS		5
LPS + GST	$1 \times 10^{-7}$	0
LPS + Pro T $\alpha$	$1 \times 10^{-7}$	100**
	$1 \times 10^{-8}$	22**
	$1 \times 10^{-9}$	20**
	$1 \times 10^{-10}$	12*

Peritoneal macrophages were isolated from BALB/c mice and incubated with various concentrations of Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of LPS ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h. IFN $\alpha$  levels in the cultured supernatant were detected by ELISA.  $n = 3$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs LPS + GST ( $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

### 4 Pro T $\alpha$ 对腹腔巨噬细胞分泌 TNF $\alpha$ 的影响

在 LPS 的诱导下,与对照组相比, $1 \times 10^{-7}$  和  $1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Pro T $\alpha$  均能明显刺激小鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF $\alpha$  ( $P < 0.01$ ),见表 4。

**Table 4 Effect of Pro T $\alpha$  on secretion of TNF $\alpha$  in peritoneal macrophages of BALB/c mice *in vitro***

Group	Concentration/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF $\alpha$ / $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
LPS		24
LPS + GST	$1 \times 10^{-7}$	27
LPS + Pro T $\alpha$	$1 \times 10^{-7}$	102**
	$1 \times 10^{-8}$	62**
	$1 \times 10^{-9}$	35
	$1 \times 10^{-10}$	30

Peritoneal macrophages were isolated from BALB/c mice and incubated with various concentrations of Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of LPS ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 12 h. TNF $\alpha$  levels in the cultured supernatant were detected by ELISA.  $n = 3$ , \*\*  $P < 0.01$  vs LPS + GST ( $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

## 讨 论

细胞因子主要参与免疫反应和炎症反应,影响反应的强度和持续时间的长短,涉及到感染免疫、肿瘤免疫、自身免疫、移植免疫等诸多方面。细胞因子

并不是孤立存在的,它们之间可通过合成分泌的相互调节、受体表达的相互调控、生物学效应的相互影响而组成细胞因子网络。

Pro T $\alpha$  在一定剂量上可显著促进细胞因子 IFN $\gamma$ 、IFN $\alpha$  和 TNF $\alpha$  的分泌。众所周知, TNF 除有抗肿瘤作用外,对免疫反应、机体代谢和炎症反应均有重要的调节和介导作用,它是一个有炎症介导作用的细胞因子。Pro T $\alpha$  对 TNF $\alpha$  的合成有促进作用,将对肿瘤的治疗有重大的意义。目前,国外的 Pro T $\alpha$  制剂已进入黑色素瘤和直肠癌患者体内淋巴细胞和单核细胞抗瘤活性的临床验证阶段<sup>[3]</sup>。

干扰素是实验中另一个重要的细胞因子。IFN $\alpha$  的 C 端与 Pro T $\alpha$  在统计学上有显著的同源性<sup>[4]</sup>。根据 IFN $\alpha$ 2 与 Pro T $\alpha$  之间最有同源性的区域设计了一段用<sup>125</sup>I 标记的八肽,即 IFN $\alpha$ 2 的 130~137 序列。这段序列是受体识别区域的一部分,能与小鼠淋巴细胞上的高亲和力受体相互作用,这种结合能同时被 IFN $\alpha$ 2 与 T $\alpha$ 1 有效地阻断。Pro T $\alpha$  和 T $\alpha$ 1, 及其 16~23 区能阻断 rIFN $\alpha$ 2 与淋巴细胞上的受体结合。而 IFN $\alpha$  的免疫调节作用是与受体相互作用后才发挥的,此受体也能与 Pro T $\alpha$  和 T $\alpha$ 1 相互作用。这可能是由于不同的受体亚基与不同的蛋白位点结合表现不同的活性。在体外实验中 Pro T $\alpha$  能促进 IFN 的合成,其机制可能与受体的相互作用有关。正是这种对 IFN 合成的促进作用,使 Pro T $\alpha$

对某些疾病的治疗有了更进一步的意义。

我国是肝炎发病率高的国家,目前对已感者和病毒携带者尚无较好治疗办法。干扰素治疗肝炎的近期疗效为 40%左右,但副作用大且复发率(反跳)高,不令人满意,影响到其临床扩大使用。基于上述原因,迫切需要寻找新的有效药物和新的疗法以提高疗效。国内用于临床治疗慢性乙型肝炎所用的进口药品日达仙就是一个化学合成的胸腺素  $\alpha$ 1 制剂。Pro T $\alpha$  的 N 端前 28 个氨基酸残基即为  $\alpha$ 1 的序列,而 Pro T $\alpha$  对免疫功能的调节活性要高于  $\alpha$ 1。因此,我们推测 Pro T $\alpha$  可能对肝炎有很好的治疗作用。

REFERENCES:

[1] Evstafieva AG, Chichkova NV, Makarova TN, et al. Overproduction in *Escherichia coli*. purification and properties of human prothymosin  $\alpha$  [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 231(3): 639 - 643.

[2] Smith MR. Prothymosin  $\alpha$ : in search of function [J]. *Leuk Lymph*, 1995, 18(3 - 4): 209 - 214.

[3] Eckert K, Grunberg E, Garbin F, et al. Preclinical studies with prothymosin alpha on mononuclear cells from tumor patients [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1997, 19(9 - 10): 493 - 500.

[4] Zavlyalov VP, Navolotskaya EN, Vasilenko RN, et al. The sequence 130 - 137 of human interferon  $\alpha$ 2 is involved in the competition of interferon, prothymosin alpha and cholera toxin B subunit for common receptors on human fibroblasts [J]. *Mol Immunol*, 1995, 32(6): 425 - 431.

EFFECT OF RECOMBINANT PROTHYMOSIN  $\alpha$  ON SECRETION OF IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  AND TNF $\alpha$  IN VITRO

QU Lei, GUO Bao-yu, MIAO Hong, DAO Shu-yan, ZHANG Ran, YUAN Peng-qun, YANG Xu

(Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the effect of prothymosin  $\alpha$  (Pro T $\alpha$ ) as a fusion protein on secretion of IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  and TNF $\alpha$  *in vitro*. **METHODS** The *in vitro* study was carried out on the culture of splenocytes, splenic and peritoneal macrophages isolated from Balb/c mice. Splenocytes were incubated with various concentrations of Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) with or without Con A ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 72 h. Splenic and peritoneal macrophages were respectively treated with Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in the presence of LPS ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h. Then IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  and TNF $\alpha$  levels in the supernatant were detected by ELISA. **RESULTS** Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was found to obviously increase IFN $\gamma$  level ( $P < 0.05$ ) in the supernatant of splenocytes compared with the control group. Moreover, Pro T $\alpha$  ( $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) significantly induced the secretion of IFN $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) and TNF $\alpha$  ( $P < 0.01$ ) in splenic and peritoneal macrophages. **CONCLUSION** *In vitro*, Pro T $\alpha$  could increase the secretion of IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$  and TNF $\alpha$ .

**KEY WORDS:** prothymosin  $\alpha$ ; immunoregulate; cytokine