

# 重组人IL-18-EGF的双顺反子表达及其对NK细胞和肝癌细胞的影响

钟连进 叶巍 文杰 洪德芳 艾冬冬 吕建新\*

(温州医学院检验医学院, 温州医学院生命科学学院, 浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

**摘要** 构建重组人IL-18-EGF肿瘤靶向分子双顺反子原核表达系统, 研究重组人IL-18-EGF融合蛋白对人自然杀伤细胞(natural killer cell, NK细胞)和人肝癌细胞(SMMC-7721)的影响。构建重组人IL-18-EGF原核双顺反子表达系统pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4/BL21, 重组蛋白经纯化后, 作用于NK细胞, 应用CCK-8法和ELISA试剂盒分别检测NK细胞的增殖情况和IFN- $\gamma$ 的分泌量。Cy3荧光标记IL-18-EGF检测融合蛋白与肿瘤细胞表面EGFR的结合情况。IL-18-EGF与NK细胞共同孵育24 h后, 取培养上清液作用于人肝癌细胞SMMC-7721, 分别使用细胞划痕实验和Transwell小室实验检测IL-18-EGF对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。实验结果显示: 重组人IL-18-EGF能加快NK细胞的增殖, 促进NK细胞分泌IFN- $\gamma$ ; IL-18-EGF能与肿瘤细胞表面EGFR特异性结合; 细胞划痕实验中, 重组人IL-18-EGF组空白区域的抗填充能力高于对照组; Transwell小室实验中, 12, 24, 48 h时IL-18-EGF组细胞穿膜数分别为 $94.6 \pm 2.9$ 、 $101.8 \pm 4.0$ 和 $116.2 \pm 4.5$ , 均显著低于相应时间的对照组(分别为 $128.6 \pm 8.5$ 、 $133.0 \pm 7.5$ 和 $138.8 \pm 5.4$ )( $P < 0.05$ )。以上结果表明, IL-18-EGF对人肝癌细胞SMMC-7721的迁移和侵袭能力有明显的抑制作用, 能提高机体的免疫能力, 有可能作为辅助药物运用于肝癌的治疗。

**关键词** IL-18-EGF; 肿瘤靶向因子; 肝癌细胞; NK细胞; 迁移; 侵袭

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 有着极高的致死率。由于HBV肝炎和相关肝炎后肝硬化患者基数大, 我国肝癌发病率和致死率均显著高于世界平均水平<sup>[1]</sup>。由肝硬化发展形成的肝癌, 容易早期发生肝内外转移, 而90%以上的肝癌患者死亡与肿瘤的转移和复发有关<sup>[2]</sup>。因此, 肝细胞肿瘤转移的临床治疗已成为基础和临床研究的重要课题。

白细胞介素(IL)-18是一种炎症和免疫增强因子, 由Ushio等<sup>[3]</sup>于1996年克隆合成, 前体含193个氨基酸, 成熟肽为157个氨基酸。IL-18能促进外周血淋巴细胞增殖, 刺激Th1细胞和NK细胞分泌IFN- $\gamma$ , 增强FasL介导的细胞毒效应, 促使NK细胞活化并增强NK细胞的细胞毒作用<sup>[4]</sup>。而表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在很多肿瘤细胞表面特异性高表达<sup>[5]</sup>。激活的EGFR可加快肿瘤细胞增殖, 加速肿瘤转移和阻碍肿瘤凋亡<sup>[6-8]</sup>。EGFR的配体除EGF外, 还包括EGF样多肽(如TGF $\alpha$ ), 这类多肽保守的第三环LoopC是与EGF受体结合区域, 以该环作为导向序列, 既可增强细胞因子对肿瘤细

胞的亲性和, 又可干扰EGF对肿瘤细胞的激活效应。

在我们前期的研究中, 通过连接肽(G-G-G-G-S)<sub>3</sub>将EGF的LoopC序列与成熟IL-18肽段连接, 利用原核表达载体pET32a(+)表达TrxA-EGF-IL-18融合蛋白于上清液中, 纯化产物再经肠激酶切割, 获得高生物学活性蛋白<sup>[9]</sup>。由于肠激酶价格高, 不适宜产业化的需求, 现采用双顺反子表达IL-18-EGF的方法, 在proIL-18-EGF终止子后加入Caspase-4基因, 在大肠杆菌细胞质诱导共同表达, 由Caspase-4直接切割带有前体的proIL-18-EGF, 获得成熟形态的IL-18-EGF。本研究选取人肝癌(SMMC-7721细胞株)为研究对象, 研究了人重组肿瘤靶向因子IL-18-EGF的对肝癌细胞分子靶向作用, 并通过刺激NK细胞产生免疫效应, 研究IL-18-EGF对人肝癌细胞迁移能力和侵袭能力的影响, 为临床治疗肝癌的复发转移提供实验依据。

收稿日期: 2012-03-29 接受日期: 2012-06-20

浙江省重大科技专项(No.2009C13038), 浙江省临床检验诊断学重中之重学科和浙江省重点科技创新团队(No.2010R50048)资助项目

\*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 质粒pET32a(+)-IL-18-EGF<sup>[9]</sup>由本实验室构建和保存, 质粒pET28a(+)-IL-18-EGF由本实验室保存。

1.1.2 细胞株 人单核细胞系THP-1细胞由本实验室保存, 人肝癌系SMC-7721细胞株、人骨肉瘤细胞株U2OS购自中科院上海典型培养物保藏中心, 人恶性非霍奇金淋巴瘤患者的自然杀伤细胞NK-92MI购自美国模式培养物集存库。

1.1.3 主要试剂 限制性内切酶*Xba* I、*Nco* I、*Xho* I和Taq酶、T4 DNA连接酶、Plasmid Mini Kit、Gel Extraction Kit购自大连宝生物工程有限公司; 淋巴细胞分离液、Trizol试剂、青链霉素、胰蛋白酶消化液、CCK-8试剂盒购自碧云天生物科技公司; DEAE-SFF弱阴离子交换柱层析填料、SP-SFF阳离子交换柱层析填料、Q强阴离子交换柱层析填料、Cy3染料为GE公司产品; IL-18标准品购自MBL公司; DMEM培养基、MEM- $\alpha$ 培养基、胎牛血清、马血清购自Gibco公司; 24-well Martrigel-Transwell小室购自

BD医疗器械公司。

### 1.2 方法

1.2.1 双顺反子表达系统pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4的构建 分离人外周血单核细胞, Trizol试剂抽提细胞总mRNA, 逆转录为cDNA, PCR扩增出proIL-18(PCR引物见表1)。proIL-18扩增产物为模板扩增出pro片段, 提取pET32a(+)-IL-18-EGF质粒, PCR扩增出IL-18-EGF片段。产物经胶回收纯化后, 使用重叠延伸PCR以纯化的pro序列和IL-18-EGF PCR片段为模板, 在含dNTP、Pyrobest DNA聚合酶的反应体系中先进行5个循环PCR反应条件如下: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 42 °C 1min, 72 °C 1 min, 5个循环。再加入proIL-18上游引物和下游引物, 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 35个循环; 72 °C 5 min; 4 °C保存。所得proIL-18-EGF目的片段纯化后经*Xba* I/*Nco* I限制性内切酶酶切3 h, 与pET28 a(+)-载体连接, 构建pET28a(+)-proIL-18-EGF载体。Trizol抽提THP-1总cDNA, RT-PCR扩增*Caspase-4*基因, PCR产物纯化后与构建成功pET28a(+)-proIL-18-EGF质粒的同时进行*Nco* I/*Xho* I酶切, 使用T4 DNA连接酶

表1 proIL-18、连接序列、proIL-18-EGF、Caspase-4引物序列

Table 1 The primer sequences for proIL-18, linker, proIL-18-EGF and Caspase-4

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
proIL-18 F	CGT CTA GAC CAC ACC TTA AGG AGG ATA TAA CAT ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC
proIL-18 R	CAT GCC ATG GAT TTT ATT TAT TCC TGG TAT TAT ATC CTC CAC TAG TCT TCG TTT TGA ACA GTG AAC
Linker F	GAT GAA AAC CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA T
Linker R	ATT CAA GCT TGC CAA AGT AAT CTG ATT CCA GGT TTT CAT
proIL-18-EGF F	CAT GCC ATG GAT TTT ATT TAT TCC TCC TAT TAT ATC CTC CAC TAG AGA ACT ACT GCT TGG CAA CGA
proIL-18-EGF R	CGT CTA GAC CAC ACC TTA AGG AGG ATA TAA CAT ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC
Caspase-4 F	CAT GCC ATG GGC CAT CAT CAT CAT CAT GGC GCC CTC AAG CTT TGT CCT CAT GAA G
Caspase-4 R	CCG CTC GAG TGT TAA ATA TGC AAG CTG TAC TAA TGA AGG TGC

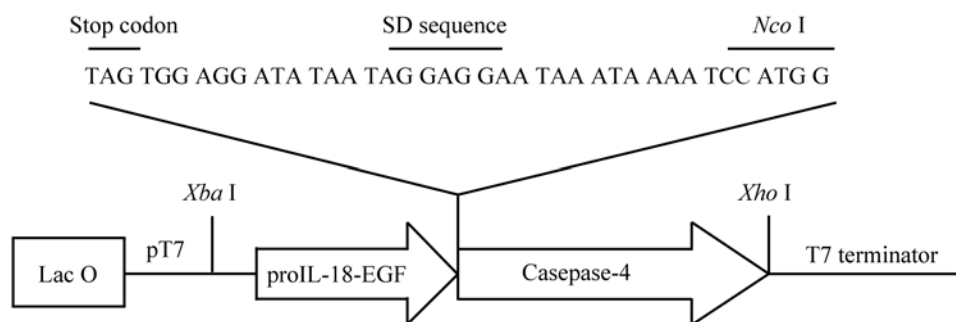


图1 表达载体pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4的构建示意图

Fig.1 Schematic representation of expression vector for IL18-EGF-Caspase-4

进行连接。重组质粒经*Xba* I/*Nco* I和*Nco* I/*Xho* I双酶切鉴定, 并进行DNA序列测序证实。构建成功的pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4(图1)载体转化到*E. coli* BL21(DE3)菌株中进行表达。

1.2.2 IL-18-EGF的表达和纯化 pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4/*E. coli* BL21(DE3)菌株以0.5 mol/L IPTG于25 °C诱导表达24 h。离心收集细菌, 按破菌缓冲液用量比例为5 mL缓冲液/g湿菌体加入破菌缓冲液(0.1 mol/L HEPES, pH7.5, 含1.0 mmol/L EDTA和10 mmol/L DTT)重悬菌体, 冰上预冷10 min(为防止蛋白变性失活, 以下操作均在低温条件下进行)。细菌悬液通过压力破碎仪(压力约为90 MPa)二次破碎裂解菌体, 32 000×g离心30 min, 收集上清。上清液用缓冲液(25 mmol/L HEPES, pH7.0)稀释到1 L。依次通过DEAE-SFF和SP-SFF离子层析柱, 收集穿透液用25 mmol/L Bis-Tris propane HCl调整pH至9.5并稀释到2 L, 流经平衡过的Q强阴离子交换柱, 用同样的缓冲液以0~0.5 mol/L NaCl线性洗脱。纯化产物IL-18-EGF使用G-75凝胶阻滞层析除盐, 冷冻干燥成粉末, -70 °C保存。

1.2.3 NK-92MI细胞的培养和传代 NK-92MI细胞培养于含12.5%胎牛血清和12.5%马血清的MEM- $\alpha$ 培养基中, 置37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度CO<sub>2</sub>培养箱中培养。当细胞生长至80%~90%时, 室温下1 000 r/min离心5 min, 去上清, 细胞沉淀加入新鲜培养基混匀, 以1:2比例传代培养。

1.2.4 IL-18-EGF对NK细胞增殖的影响 收集对数生长期NK-92MI细胞, 调整细胞密度为 $5 \times 10^4$ /mL, 200  $\mu$ L/孔接种于96孔板。培养24 h后加入IL-18-EGF融合蛋白冻干粉末, 调整终浓度为10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ g/mL, 以不加IL-18-EGF为阴性对照组, 每组设3个复孔, 置于培养箱培养24 h。每孔加入10  $\mu$ L CCK-8试剂, 混匀后置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱继续培养4 h, 自动酶标仪于450 nm处检测各组吸光度, 制作标准曲线计算各组细胞密度。

1.2.5 IL-18-EGF对NK细胞分泌IFN- $\gamma$ 的影响 以PBS为溶剂分别配制20  $\mu$ g/mL的IL-18-EGF和IL-18标准品。取对数期NK-92MI细胞, 调节细胞密度至 $5 \times 10^6$ /mL, 以100  $\mu$ L/孔接种于96孔板, 分为处理组、阳性对照组和阴性对照组, 处理组和阳性对照组分别加入100  $\mu$ L 20  $\mu$ g/mL IL-18-EGF和100  $\mu$ L 20  $\mu$ g/mL IL-18标准品, 使IL-18-EGF和IL-18的终浓度为10  $\mu$ g/mL,

阴性对照组加入100  $\mu$ L PBS, 每组做3个重复孔, 置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h。1 500 r/min离心5 min, 取上清, 使用IFN- $\gamma$  ELISA试剂盒检测IFN- $\gamma$ 分泌量。

1.2.6 IL-18-EGF与肝癌细胞表面EGFR的结合实验 使用Cy3染料对1 mg/mL IL-18-EGF融合蛋白进行荧光标记。将盖玻片放入细胞培养6孔板中, 取对数生长期的U2OS细胞(不表达EGFR<sup>[10]</sup>)和SMMC-7721细胞(表面高表达EGFR<sup>[11]</sup>), 胰蛋白酶消化后, 接种于盖玻片, 添加DMEM培养基培养至细胞密度为30%。弃去培养基, 4 °C预冷PBS洗涤细胞, 每孔添加1 mL细胞固定液, 固定细胞20 min。预冷PBS洗涤细胞2 min, 添加细胞封闭液封闭细胞1 h。预冷PBS洗涤细胞2 min, 加入Cy3荧光标记的IL-18-EGF覆盖盖玻片, 37 °C孵育2 h。预冷PBS清洗细胞3 min, 添加抗荧光淬灭封片液, 激光共聚焦显微镜观察细胞表面荧光。

1.2.7 肝癌细胞迁移能力的划痕实验 将SMMC-7721细胞接种于6孔培养板, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养至细胞全部均匀分布板底。在单层培养细胞上, 用干净移液器滴头沿培养板底部中间划痕。将200  $\mu$ L  $5 \times 10^6$ /mL NK-92MI细胞接种于96孔板, 分成3组, A组添加10  $\mu$ g/mL IL-18-EGF, B组添加10  $\mu$ g/mL IL-18标准品, C组未添加IL-18-EGF或IL-18标准品, 置37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱共同孵育24 h后, 吸取150  $\mu$ L上清液, 加入到上述已划痕的6孔培养板中, 添加A组上清液的为处理组, 添加B组和C组上清液的分别为阳性对照组和阴性对照组。SMMC-7721细胞继续培养48 h, 分别在6, 12, 24, 48 h观察并拍照记录各组细胞迁移情况。

1.2.8 肝癌细胞侵袭能力的Transwell小室实验 SMMC-7721细胞用无血清DMEM培养液在37 °C及5% CO<sub>2</sub>条件下饥饿培养24 h。胰酶消化调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ /mL。将200  $\mu$ L  $5 \times 10^6$ /mL NK-92MI细胞接种于96孔板, 分别与培养液、10  $\mu$ g/mL的IL-18-EGF融合蛋白、10  $\mu$ g/mL的IL-18标准品共同孵育48 h, 1 500 r/min室温离心5 min, 吸取150  $\mu$ L上清。将 $1 \times 10^6$ /mL的SMMC-7721肝癌细胞100  $\mu$ L接种于Transwell小室上室, 加入100  $\mu$ L上步取得的上清。孔板下室加入600  $\mu$ L含10% FBS的DMEM培养基, 常规培养24 h。90%酒精常温固定30 min, 0.1%结晶紫常温染色10 min, 清水漂净, 用棉签拭去上室非侵袭细胞,

对穿膜细胞进行计数。

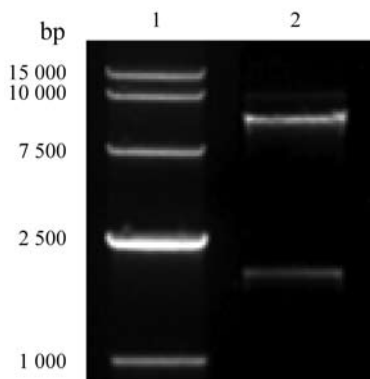
### 1.3 统计学分析

以上实验至少重复3次, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS17.0软件进行统计学处理。组间差异使用单因素方差分析(ANOVA), 各实验组与阴性对照组比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 时, 差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4重组质粒的构建

提取转化菌*E. coli* BL21质粒, 对重组质粒进行*Xba* I/*Xho* I双酶切, 得到1 612 bp大小DNA条带(图2), 与预期目的片段proIL-18-EGF-Caspase-4长度一致。质粒测序结果与Genbank比对, 证实DNA条带就是基因proIL-18-EGF-Caspase-4。



泳道1: DL 15 000 DNA marker; 泳道2: *Xba* I/*Xho* I酶切pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4重组载体结果。

Lane 1: DL 15 000 DNA marker; Lane 2: recombinant plasmid pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4 digested by *Xba* I/*Xho* I.

图2 重组质粒pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4的酶切鉴定

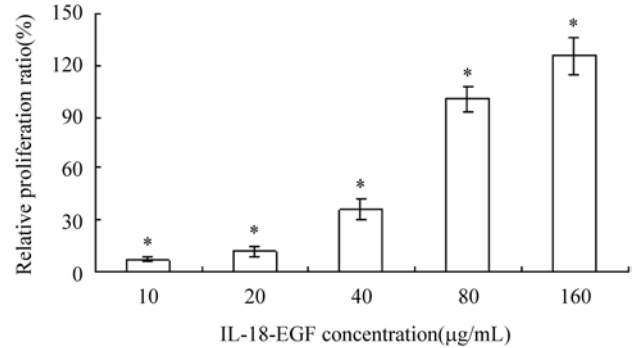
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4 digested by *Xba* I/*Xho* I

### 2.2 IL-18-EGF对NK细胞增殖的影响

CCK-8测定结果显示, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IL-18-EGF融合蛋白与NK-92MI细胞共同培养24 h后, 各实验组NK细胞的数量与阴性对照组相比均显著增加( $P < 0.05$ ), 并且相对增殖率随着融合蛋白浓度的增加而增加(图3), 呈剂量依赖关系, 相关系数 $r = 0.9496$ 。

### 2.3 IL-18-EGF的体外活性

按ELISA试剂盒进行操作, 实验检测结果如图4所示: 阴性对照组、IL-18-EGF组和IL-18组每百万细胞产生的IFN- $\gamma$ 的量分别为(1.7 $\pm$ 0.2) pg、(11.8 $\pm$ 0.7) pg、(20.6 $\pm$ 1.2) pg, IL-18-EGF组和IL-18组均比阴性对照组有显著增长( $P < 0.05$ ), 证实IL-18-EGF具有刺激NK-92MI细胞产生IFN- $\gamma$ 的能力。

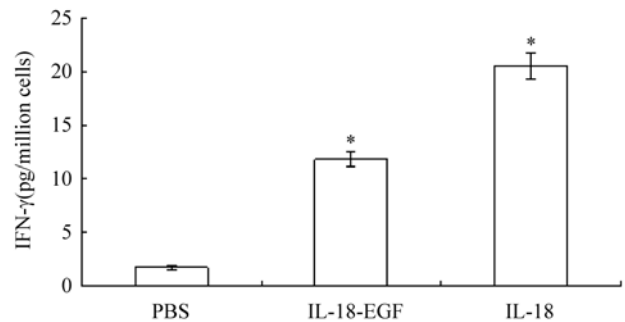


\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

\* $P < 0.05$  vs the control group.

图3 IL-18-EGF对NK细胞的增殖作用

Fig.3 Proliferation of NK cell by IL-18-EGF



\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

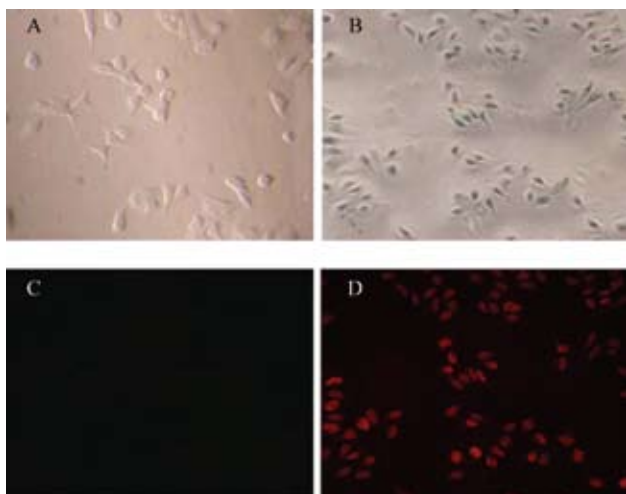
\* $P < 0.05$  vs the control group.

图4 IL-18-EGF刺激NK细胞的分泌IFN- $\gamma$

Fig.4 IL-18-EGF stimulates NK cell secretes IFN- $\gamma$

### 2.4 IL-18-EGF与肝癌细胞特异性结合实验

U2OS细胞和SMMC-7721细胞固定封闭后, 添加Cy3标记的IL-18-EGF作用, 用抗荧光淬灭封片液封片, 在激光共聚焦显微镜下观察。如图5C和5D所示, 在550 nm的激发光作用下, SMMC-7721-(EGFR<sup>+</sup>)细胞膜表面在在570 nm放射出荧光, 而U2OS(EGFR<sup>-</sup>)细胞无荧光发射。与明场照片(图5A和5B)对比, 证实IL-18-EGF融合蛋白能同肿瘤细胞



A,C: 同一视野U2OS细胞的明场和荧光照片; B,D: 同一视野SMMC-7721细胞的明场和荧光照片。  
A,C: bright-field and fluorescence of the same field of U2OS cells, respectively; B,D: bright-field and fluorescence of the same field of SMMC-7721 cells, respectively.

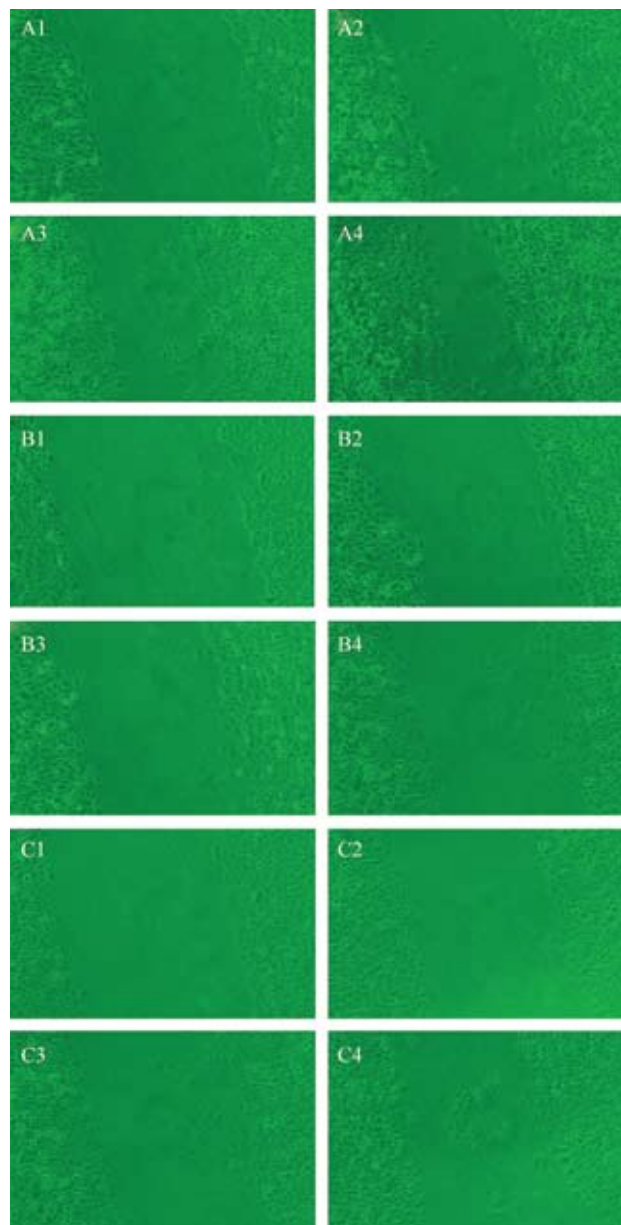
图5 激光共聚焦显微镜观察IL-18-EGF与SMMC-7721肝癌细胞特异性结合(600×)

Fig.5 IL-18-EGF and SMMC-7721 cell specific binding observation by laser scanning confocal microscope(600×)

表面EGFR特异性结合, 且几乎所有肝癌细胞均已结合IL-18-EGF。

### 2.5 肝癌细胞划痕实验

为研究IL-18-EGF融合蛋白对肝癌细胞SMMC-7721的迁移能力的影响, 本研究采用细胞划痕实验, 在培养的单层癌细胞上划出空白区域, 分别加入各实验组NK细胞上清液后, 继续培养观察空白区域的填充情况。图6显示, 划痕后继续培养48 h后, 处理组在6, 12, 24, 48 h时(图6B1-图6B4)癌细胞划痕区域填充数目均明显低于同一时段的阴性对照组(图6A1-图6A4), 也低于同一时段的阳性对照组(图6C1-图6C4), 提示重组人IL-18-EGF融合蛋白能抑制肿瘤细胞迁移。



A1-A4: 6, 12, 24, 48 h的对照组; B1-B4: 6, 12, 24, 48 h的IL-18-EGF组; C1-C4: 6, 12, 24, 48 h的IL-18组。  
A1-A4: 6, 12, 24, 48 h of control group; B1-B4: 6, 12, 24, 48 h of IL-18-EGF group; C1-C4: 6, 12, 24, 48 h of IL-18 group.

图6 IL-18-EGF对SMMC-7721细胞迁移的影响(400×)  
Fig.6 Effect of IL-18-EGF on SMMC-7721 cell migration(400×)

表2 各组不同时间点SMMC-7721跨膜细胞数比较

Table 2 Compare of SMMC-7721 trans-membrane-cell number in different time point

组别 Groups	时间点 Time point			
	n	12 h	24 h	48 h
Control group	5	128.6±8.5	133.0±7.5	138.8±5.4
10 µg/mL IL-18-EGF group	5	94.6±2.9 <sup>#</sup>	101.8±4.0 <sup>#</sup>	116.2±4.5 <sup>*</sup>
10 µg/mL IL-18 group	5	82.4±3.8 <sup>#</sup>	90.2±3.2 <sup>#</sup>	98.4±2.8 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>P<0.05, 与阴性对照组比较, <sup>#</sup>P<0.05, 与48 h组相比较。

<sup>\*</sup>P<0.05 vs the control group, <sup>#</sup>P<0.05 vs the 48 h group.

## 2.6 肝癌细胞侵袭能力检测

采用底膜带孔并涂胶的Transwell培养小室接种癌细胞,观察迁移穿过底膜的癌细胞数目,以此来观察癌细胞侵袭力的变化。结果(表2)发现,对照组12 h SMMC-7721细胞穿膜数为 $128.6 \pm 8.5$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  IL-18组细胞穿膜数为 $82.4 \pm 3.8$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  IL-18-EGF组为 $94.6 \pm 2.9$ , IL-18组和IL-18-EGF组细胞穿膜数均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。各组的细胞穿膜数都随着时间的增加而增加,但在相同的时间点上,IL-18组和IL-18-EGF组细胞侵袭数均显著低于对照组( $P < 0.05$ )。以上结果表明,IL-18-EGF对肝癌细胞的侵袭力有明显的抑制作用。

## 3 讨论

随着在分子层面对肿瘤发展机制认识的不断深入,以及组学技术在医学领域的运用,肿瘤药物开发也已从传统的细胞毒性药物筛选转变为针对肿瘤发生发展进程中关键分子的特异治疗<sup>[12]</sup>。分子靶向治疗也因其高特异性、低毒性、较高的安全性和耐受性等特点被誉为最具前景的肿瘤治疗方式<sup>[13]</sup>。EGFR在人类多种实体肿瘤如肺癌、结直肠癌、卵巢癌、脑部肿瘤、头颈部肿瘤的细胞表面都有特异性过度表达,并且可达正常细胞的100倍以上<sup>[14]</sup>,这种特性为肿瘤的治疗提供了一个理想的靶点。埃罗替尼(Erlotinib)、吉非替尼(Gefitinib)、拉帕替尼(Lapatinib)等三种特异性靶向EGFR的酪氨酸激酶抑制剂在肝癌治疗中的作用已得到临床证实<sup>[15]</sup>。而IL-18的抑制肿瘤的免疫调节作用也已经过体内实验和临床试验阶段<sup>[16]</sup>。为进一步提高肿瘤治疗的特异性和安全性,本实验室通过连接肽段(G-G-G-G-S)<sub>3</sub>将免疫调节因子IL-18和能与EGFR结合的EGF的LoopC环桥接起来,使用真核、原核两种方式表达融合蛋白,该融合蛋白在动物实验中也表现出良好的肿瘤抑制效果<sup>[17]</sup>。

IL-18前体含有193个氨基酸,成熟的IL-18为157个氨基酸,裂解位点是<sup>36</sup>Asp-<sup>37</sup>Tyr,半胱氨酸蛋白酶Caspase-4能将proIL-18切割成为活性成熟形式<sup>[18]</sup>。直接表达成熟的IL-18由于起始密码子ATG的作用,N基端会带有甲硫氨酸,影响到IL-18蛋白生物学活性<sup>[19]</sup>。本研究模拟机体内IL-18的合成过程,在大肠杆菌BL21中采用双顺反子共表达proIL-18-EGF和Caspase-4,以Caspase-4蛋白酶切割proIL-18-EGF的

前体pro片段,直接表达有天然N端的IL-18-EGF。因为本研究采用的是双顺反子同时表达两种不同的蛋白IL-18-EGF和Caspase-4,所以在IL-18-EGF的终止子后,加入一段空白序列对两段基因进行间隔,同时在Caspase-4起始密码子上游-14位置添上原核核糖体结合位点Shine-Dalgarno序列(SD序列,图1)。为使目的蛋白在大肠杆菌原核表达系统中获得理想表达,我们比较了外源蛋白在两种宿主菌BL21(DE3)和Rosetta(DE3)中的表达情况。结果显示,经IPTG诱导表达后,BL21(DE3)外源蛋白表达量约占50%,而Rosetta(DE3)表达量仅占20%左右。可能原因为Rosetta(DE3)拥有其它质粒和表达框架,从而影响了外源蛋白的表达。

NK细胞可通过分泌 $\gamma$ 干扰素和释放穿孔素诱导肿瘤细胞凋亡,Miller等<sup>[20]</sup>对癌症晚期患者输入单倍体相合供者NK细胞,5/19例急性髓系白血病患者获得完全缓解。结果显示,NK细胞过继治疗的方式对癌症患者有确切疗效。IL-18对NK细胞发挥全部生物学效应至关重要,IL-18信号缺陷的NK细胞不能在IL-12刺激下分泌产生 $\gamma$ 干扰素<sup>[21]</sup>。在本研究中,IL-18-EGF与NK细胞共同孵育,分离培养上清再与SMMC-7721肝癌细胞共同培养,通过划痕实验和Transwell小室实验分别研究IL-18-EGF作用下肿瘤动力学的改变。在划痕实验中,IL-18-EGF组细胞填充明显低于阴性对照组(图),提示IL-18-EGF致使SMMC-7721肝癌细胞迁移能力的降低。Transwell小室实验中,12, 24, 48 h时IL-18-EGF组穿膜细胞数均显著低于对照组,提示IL-18-EGF融合蛋白可通过免疫调理作用抑制人肝癌细胞SMMC-7721的侵袭。但在此研究中同时发现,在细胞划痕试验中,IL-18-EGF抑制SMMC-7721细胞迁移能力高于IL-18组,而在Transwell小室实验中,IL-18-EGF抑制SMMC-7721细胞侵袭能力却低于IL-18组,其具体机制尚不清楚,须待进一步的研究。

IL-18-EGF融合蛋白能刺激NK细胞增殖并产生IFN- $\gamma$ ,能特异性的与肿瘤细胞结合,并能激活NK细胞抑制SMMC-7721细胞的迁移能力和侵袭能力,提示IL-18-EGF能提高机体的免疫能力,有作为辅助药物运用于肝癌治疗的可能。

## 参考文献 (References)

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics,

2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
- 2 Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42(5): 1208-36.
- 3 Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, *et al.* Cloning of the cDNA for human IFN-gamma inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biologic activities of the protein. *J Immunol* 1996; 156(11): 4274-9.
- 4 Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, *et al.* Interferon- $\gamma$ -inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: Synergism with interleukin-12 for interferon- $\gamma$  production. *Eur J Immunol* 1996; 26(7): 1647-51.
- 5 Grünwald V, Hidalgo M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(12): 851-67.
- 6 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 2001; 37(4): 9-15.
- 7 Herbst RS. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2002; 16(9): 19-24.
- 8 Mendelsohn J, Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(14): 2787-99.
- 9 潘建华, 彭颖, 郑昭暲, 吕建新. 重组人EGF-IL-18融合蛋白的表达纯化及复性. *细胞生物学杂志*(Pan Jianhua, Peng Ying, Zheng Zhaojing, Lü Jianxin. Expression, purification, and refolding of recombinant human EGF-IL-18 fusion protein in *E.coli*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2006; 28(5): 711-6.
- 10 Dai FH, Chen Y, Ren CC, Li JJ, Yao M, Han JS, *et al.* Construction of an EGF receptor-mediated histone H1(0)-based gene delivery system. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129(8): 456-62.
- 11 Friedman M, Nordberg E, Höidén-Guthenberg I, Brismar H, Adams GP, Nilsson FY, *et al.* Phage display selection of affibody molecules with specific binding to the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Eng Des Sel* 2007; 20(4): 189-99.
- 12 Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, *et al.* Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 439(7074): 353-7.
- 13 Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004; 432(7015): 294-7.
- 14 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8(1): 3-9.
- 15 Llovet JM, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48(4): 1312-27.
- 16 Srivastava S, Salim N, Robertson MJ. Interleukin-18: Biology and role in the immunotherapy of cancer. *Curr Med Chem* 2010; 17(29): 3353-7.
- 17 吕建新, 王震, 何剪太, 张阳德. 靶向IL18-EGF融合蛋白体内抗肿瘤活性研究. *中国现代医学杂志*(Lü Jianxin, Wang Zhen, He Jiantai, Zhang Yangde. Effect of targeting IL18-EGF fused protein on the antineoplastic activity *in vivo*. *China Journal of Modern Medicine*) 2009; 19(6): 805-10.
- 18 Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: Linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 2004; 117(5): 561-74.
- 19 Kirkpatrick RB, McDevitta PJ, Maticoa RE, Nwagwub S, Trullio SH, Mao J, *et al.* A bicistronic expression system for bacterial production of authentic human interleukin-18. *Protein Expr Purif* 2003; 27(2): 279-92.
- 20 Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, *et al.* Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; 105(8): 3051-7.
- 21 Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, Fuséri N, Ryffel B, Dalod M, *et al.* Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* 2008; 18(3): 1627-31.

## Bicistronical Expression of the Recombinant Human IL-18-EGF and Its Effects on NK Cell and the Human Hepatoma Cells

Zhong Lianjin, Ye Wei, Wen Jie, Hong Defang, Ai Dongdong, Lü Jianxin\*

(School of Laboratory Medicine and Life Science, Zhejiang Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** Recombinant human IL-18-EGF tumor targeting molecular was due to prokaryotic bicistronical expression system, and the effects of this fusion protein on human natural killer cell (NK cell) and hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 were investigated. A bicistronical expression system pET28a(+)-proIL-18-EGF-Caspase-4/BL21 was constructed to express recombinant human IL-18-EGF. The recombinant protein was purified and its effect on human natural killer cell was studied. CCK-8 method was used to observe NK cell proliferation ability stimulated by IL-18-EGF and the IFN- $\gamma$  secreted by NK cell was determined by ELISA. IL-18-EGF was labeled by Cy3 dye to observe its ability of binding with the tumor cell surface EGFR. After IL-18-EGF and NK cells were incubated for 24 h, the culture supernatant was took to hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721. Then wound healing assay and Transwell assay were used to study the suppressions of migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell, respectively. The experimental results showed that the recombinant human IL-18-EGF can promote NK cell proliferation and increase the IFN- $\gamma$  secreted by NK cell. IL-18-EGF can specially bind to tumor cell surface EGFR. Wound healing assay indicated that the capacity of filling blank area in the IL-18-EGF group was higher than that in the control group. Cell invasion assay results showed that the average amount of invading cells in the IL-18-EGF group ( $94.6 \pm 2.9$ ,  $101.8 \pm 4.0$  and  $116.2 \pm 4.5$  after 12, 24, 48 h, respectively) was significantly lower than the control group ( $128.6 \pm 8.5$ ,  $133.0 \pm 7.5$  and  $138.8 \pm 5.4$  after 12, 24, 48 h, respectively,  $P < 0.05$ ). The results suggest that IL-18-EGF can inhibit migration and invasion of hepatocellular carcinoma cell and improve human immune ability. It may be used in the treatment of liver cancer as a auxiliary drug.

**Key words** IL-18-EGF; tumor targeting factor; hepatocellular carcinoma cell; migration; invasion

Received: March 29, 2012 Accepted: June 20, 2012

This work was supported by the Zhejiang Provincial Science and Technology Major Project (No.2009C13038), Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Laboratory Medicine and Key Science and Technology Innovation Team of Zhejiang Province (No.2010R50048)

\*Corresponding author. Tel: 86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com