

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0146-03

## 亚高温热疗对免疫功能的影响

陈洪雷<sup>1</sup>综述; 王雅杰<sup>1</sup>, 金冶宁<sup>2</sup>审阅(1. 第二军医大学附属长海医院肿瘤科, 上海 200433; 2. 上海第二医科大学附属瑞金医院肿瘤放疗科, 上海 200025)

[摘要] 亚高温热疗(MHT)是目前肿瘤治疗领域的研究热点之一。大量离体和在体实验研究表明, 39.5℃~41.5℃的加温并不能直接杀伤肿瘤细胞, 其抗肿瘤作用是通过提高正常免疫效应细胞活性、诱导免疫效应细胞再分布以及影响某些细胞因子和热激蛋白的表达而达到的, 因此具有重要的肿瘤免疫调节作用, 是一种安全、有效的辅助性肿瘤治疗手段。

[关键词] 加温疗法; 免疫调节; 肿瘤免疫

[中图分类号] R730.59 [文献标识码] A

近年来, 随着热疗的生理学和病理生理学研究逐步深入, 以及更为安全的加温设备和更为精确的测温、控温技术的应用, 热疗得到了迅速发展, 特别是加温范围在 39.5℃~41.5℃的亚高温热疗(Mild Hyperthermia, MHT), 因其临床实施较为方便, 患者耐受性良好, 已成为一种重要的辅助性肿瘤治疗手段。研究表明, MHT 对肿瘤细胞并无直接的杀伤作用, 而对机体的免疫功能则有重要的调节作用, 可使机体产生类似于生理状态下对感染的保护性反应, 从而提高了其自身的抗肿瘤作用。现对目前 MHT 免疫调节作用机理的研究现状分述如下:

### 1 提高免疫效应细胞的活性

淋巴细胞是机体最主要的免疫效应细胞, 大量离体和体实验已证实, 与  $\geq 42^\circ\text{C}$  的加温可抑制其免疫活性的作用不同, 在 MHT 的刺激下, T、B 淋巴细胞的活性明显提高。Wang<sup>[1]</sup>等用小鼠研究了其机制, 结果发现, MHT 可激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 并刺激产生多种 PKC 同工酶, 而 PKC 的激活是细胞信号传导途径中与淋巴细胞增殖和活化有关的关键步骤, 从而提高了淋巴细胞的活性。同时加温后淋巴细胞以血影蛋白(spectrin)为基础的细胞骨架结构亦明显改变, 细胞的极性增加, 伪足形状改变, 免疫活性提高。

MHT 也可活化其他类型的免疫效应细胞, 但其分子机制尚未明了。抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)是能捕捉、加工、处理抗原, 并将抗原提呈给抗原特异性淋巴细胞的一类细胞, 是淋巴细胞活化、增生、发挥效应的始动环节。树突状细胞(dendritic cells, DCs)是一类重要的 APC, 抗原提呈能力很强, 研究表明, MHT 可刺激 DCs 成熟, 提高其参与细胞免疫反应的活性<sup>[2]</sup>。表皮 Langerhans 细胞也是一种重要的 APC, 由其激活的 T 淋巴细胞介导的免疫反应在机体抗肿瘤免疫中起重要作用, 研究发现, MHT 可刺激 Langerhans 细胞出现更多的斑点状结构, 树突减少, 同时向淋巴结的引流增加, 因而能更有效地提呈肿瘤抗原给效应细胞<sup>[3]</sup>。健康志愿者接受 MHT 后, 其单核细胞表面的内毒素受体

CD14 和补体受体 CD11b 表达均升高, 而且在脂多糖刺激下释放的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  亦增加, 表明 MHT 可直接激活单核细胞, 使其对内毒素的反应性提高<sup>[4]</sup>。

### 2 诱导免疫效应细胞再分布

对不同品系、不同肿瘤类型荷瘤鼠的动物实验表明, MHT 后, 小鼠外周血、脾和腹腔中白细胞数量明显降低, 其中以淋巴细胞减少为主<sup>[5]</sup>。晚期实体瘤患者的全身 MHT 临床 I 期试验也见到治疗后循环中的 T 淋巴细胞和 L-选择素(+ )淋巴细胞数量减少<sup>[6]</sup>。而同时肿瘤血管的直径则明显扩大, 肿瘤血管和肿瘤基质内的有核细胞如类淋巴细胞、巨噬细胞、自然杀伤(natural killer, NK)细胞及粒细胞等的浸润明显增加, 证明 MHT 可促使大量不同类型的免疫效应细胞向肿瘤部位转移, 在肿瘤免疫中有重要作用, 其中 NK 细胞与肿瘤细胞的凋亡关系密切<sup>[7]</sup>。

MHT 还可诱导淋巴细胞向二级淋巴组织(如外周淋巴结、肠系膜淋巴结和 Peyer's 结等)的归巢增加<sup>[8]</sup>。二级淋巴组织和肿瘤组织内有一种特殊的高内皮细胞小静脉(high endothelial venules, HEV), 研究表明, MHT 可提高循环中淋巴细胞与 HEV 之间的依赖 L-选择素(L-selectin)及  $\alpha_4\beta_7$  整合素(integrin)的黏附作用<sup>[9]</sup>, 这种黏附作用的提高是通过增加 L-选择素和  $\alpha_4\beta_7$  整合素的活性实现的, 并未改变其细胞表面的密度, 而且这种现象不仅在体内, 在体外实验中亦能观察到, 说明 MHT 引起的此种效应在局部的淋巴组织微环境中即可出现, 并不需要下丘脑-垂体-肾上腺轴的参与<sup>[10-11]</sup>。另一方面, MHT 可增强 HEV 内皮细胞肌动蛋白的聚合, 提高其分泌的能刺激  $\alpha_4\beta_7$  整合素淋巴细胞归巢受体的因子的活性, 从而使大量的淋巴细胞选择性地转移至感染或肿瘤部位, 放大免疫效应, 而在正常组织血管的鳞状内皮细胞中则无此作用<sup>[12]</sup>。

### 3 对细胞因子表达的影响

实验材料不同、条件不同, MHT 对细胞因子表达的影响

亦不同。Shah<sup>[12]</sup>等的离体实验结果显示, MHT 对正常组织血管内皮细胞内黏附分子(如 ICAM-1, E-selectin, VCAM-1, P-selectin, PECAM-1, PNA, MAdCAM-1)的表达、细胞因子(如 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-11, IL-12, IL-13)的释放和趋化因子(如 IL-8, RANTES, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MIG)的分泌均无影响。Ostberg<sup>[13]</sup>等发现对 BALB/c 小鼠腹腔内注射脂多糖后予以 MHT, 可使小鼠血清中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、急性期蛋白  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白和结合珠蛋白(haptoglobin)浓度升高达 30%。而 Gnantf<sup>[14]</sup>等则发现, MHT 可使成人脐静脉内皮细胞的 PECAM-1 分泌增加, 24 h 后 E-选择素和单核细胞趋化因子亦有增加, 血管内皮生长因子分泌则减少。这些细胞因子的变化可通过其各自的生物学机制对机体免疫功能产生重要的调节作用。

#### 4 对热激蛋白的影响

热应激可诱导热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)和糖调蛋白(glucose-regulated proteins, GRPs)表达上调, 保护细胞自身免受损伤。实验发现, MHT 可提高 BALB/c 小鼠的心、肾、肺、淋巴结和胸腺组织中 HSP70 及肺、淋巴结和胸腺组织中 HSP110 的表达, 其中以淋巴组织中表达上调最高, 可能与加温后免疫应答提高有关。GRP170 的表达则不受影响<sup>[15-16]</sup>。而 HSP70 表达的增强, 可提高抗肿瘤免疫作用, 诱导肿瘤细胞死亡, 明显抑制肿瘤生长<sup>[17]</sup>。

人外周血离体加温后 HSP70 表达的变化则与温度和细胞类型有关, 加温至 39 $^{\circ}$ C 即可在单核细胞中有明显的诱导表达, 大于 41 $^{\circ}$ C 的加温仅在淋巴细胞和多形核白细胞中有轻微的表达升高。但健康志愿者 MHT 后 HSP70 的表达在所有类型淋巴细胞中均有同等程度的升高, 并无离体实验时表现出的不同细胞类型间的差异<sup>[18]</sup>。

#### 5 与免疫治疗的协同作用

MHT 能提高机体免疫功能的特性, 促使人们探讨其与各种肿瘤免疫疗法联合应用的可能性。Payne<sup>[19]</sup>等对人胶质母细胞瘤细胞株进行的体外实验表明, 加温至 39 $^{\circ}$ C 可明显提高干扰素的抗病毒活性及其对不同肿瘤细胞的抗增殖作用, 认为 MHT 与干扰素联合应用对于免疫力低下的晚期恶性肿瘤患者有治疗价值。Gnantf<sup>[14]</sup>等发现, MHT 可抑制血管内皮生长因子的产生, 与肿瘤坏死因子联合应用可增强其抗肿瘤血管生成作用。另有研究发现, MHT 可明显提高热休克蛋白 HSP110 和 HSP70 作为肿瘤特异性疫苗的抗肿瘤活性<sup>[16]</sup>。MHT 也能提高荷瘤鼠的放射免疫治疗效果, 皮下移植了人结肠癌的裸鼠 MHT 后给予静脉注射放射性碘标记的抗 CEA 单克隆抗体, 抗体的生物学分布虽未受加温的影响, 但提高了肿瘤对抗体的放射敏感性, 肿瘤生长因而明显受到抑制<sup>[20]</sup>。

#### 6 结 语

作为一种新的辅助性肿瘤治疗方法, MHT 可显著增强机体的免疫功能, 因此尤其适用于免疫力低下的晚期恶性肿

瘤患者。同时, 与其他常规治疗手段如放疗、化疗和免疫治疗等有协同抗肿瘤作用, 而且安全无毒, 有良好的发展前景。其最优的治疗方案及与其他肿瘤治疗手段的最佳结合方式是今后的研究方向。

#### [参 考 文 献]

- [1] Wang XY, Ostberg JR, Repasky EA. Effect of fever-like whole-body hyperthermia on lymphocyte spectrin distribution, protein kinase C activity, and uropod formation[J]. *J Immunol*, 1999, 162(6): 3378-3387.
- [2] Zheng H, Benjamin IJ, Basu S, et al. Heat shock factor 1-independent activation of dendritic cells by heat shock: Implication for the uncoupling of heat-mediated immunoregulation from the heat shock response[J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33(6): 1754-1762.
- [3] Ostberg JR, Patel R, Repasky EA. Regulation of immune activity by mild (fever-range) whole body hyperthermia: Effects on epidermal Langerhans cells[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2000, 5(5): 458-461.
- [4] Zellner M, Hergovics N, Roth E, et al. Human monocyte stimulation by experimental whole body hyperthermia[J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2002, 114(3): 102-107.
- [5] Ostberg JR, Repasky EA. Comparison of the effects of two different whole body hyperthermia protocols on the distribution of murine leukocyte populations[J]. *Int J Hyperthermia*, 2000, 16(1): 29-43.
- [6] Kraybill WG, Olenki T, Evans SS, et al. A phase I study of fever-range whole body hyperthermia (FR-WBH) in patients with advanced solid tumors: Correlation with mouse models[J]. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18(3): 253-266.
- [7] Burd R, Dziedzic TS, Xu Y, et al. Tumor cell apoptosis, lymphocyte recruitment and tumor vascular changes are induced by low temperature, long duration (fever-like) whole body hyperthermia[J]. *J Cell Physiol*, 1998, 177(1): 137-147.
- [8] Evans SS, Wang WC, Bain MD, et al. Fever-range hyperthermia dynamically regulates lymphocyte delivery to high endothelial venules[J]. *Blood*, 2001, 97(9): 2727-2733.
- [9] Ostberg JR, Gellin C, Patel R, et al. Regulatory potential of fever-range whole body hyperthermia on Langerhans cells and lymphocytes in an antigen-dependent cellular immune response[J]. *J Immunol*, 2001, 167(5): 2666-2670.
- [10] Evans SS, Bain MD, Wang WC. Fever-range hyperthermia stimulates  $\alpha 4 \beta 7$  integrin-dependent lymphocyte-endothelial adhesion[J]. *Int J Hyperthermia*, 2000, 16(1): 45-59.
- [11] Evans SS, Schleider DM, Bowman LA, et al. Dynamic association of L-selectin with the lymphocyte cytoskeletal matrix[J]. *J Immunol*, 1999, 162(6): 3615-3624.
- [12] Shah A, Unger E, Bain MD, et al. Cytokine and adhesion molecule expression in primary human endothelial cells stimulated with fever-range hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18(6): 534-551.
- [13] Ostberg JR, Taylor SL, Baumann H, et al. Regulatory effects of fever-range whole-body hyperthermia on the LPS-induced acute inflammatory response[J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68(6): 815-820.
- [14] Gnantf MF, Turner EM, Alexander HR. Effects of hyperthermia and tumour necrosis factor on inflammatory cytokine secretion and procoagulant activity in endothelial cells[J]. *Cytokine*, 2000, 4(4): 339-347.
- [15] Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA. Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia[J]. *Int J Hyperthermia*, 2002, 18(6): 552-562.
- [16] Wang XY, Kazim L, Repasky EA, et al. Characterization of heat

[文章编号] 1007-385X(2004)02-0148-03

## 细胞因子重组融合蛋白研究进展

郝子扬 综述; 张立煌 审阅(浙江大学免疫学研究所, 杭州 310031)

**[摘要]** 细胞因子重组融合蛋白是一类利用基因工程的方法将编码细胞因子和其他有特定功能的蛋白分子基因序列连接并表达相应蛋白质融合产物。其结构特点为将细胞因子功能活性域与其他分子的活性域融合, 各组分可发挥协同作用, 使融合蛋白的生物学活性较各单体大大增强。按生物学功能的不同可分为: 细胞因子与抗体的融合蛋白、细胞因子与毒素的融合蛋白、不同细胞因子的融合蛋白、细胞因子与细胞因子受体的融合蛋白以及细胞因子与其他分子的融合蛋白。这些兼具特异性和高效性的新型重组融合蛋白有些已走向临床, 在抗肿瘤、抗风湿病、抗 HIV 感染等领域发挥作用, 为人类疾病的治疗提供新的手段。

**[关键词]** 融合蛋白; 细胞因子; 抗体; 毒素; 抗肿瘤

**[中图分类号]** Q78 **[文献标识码]** A

重组融合蛋白(recombinant chimeric protein)是一种人工合成的蛋白质分子, 目前对其尚无明确定义, 一般认为是利用基因工程方法将两段或多段编码有功能的蛋白质基因序列连接在一起并表达出相应蛋白质的融合产物。早在 1987 年, Williams 等<sup>[1]</sup>便应用基因工程手段将白喉毒素的受体结合部位以白细胞介素-2(IL-2)替代构建出一个重组融合蛋白。而后, 重组融合蛋白高效、特异的生物学作用显示出临床应用的广阔前景, 引起了学者们的重视, 尤其近几年发展迅速。在这些重组蛋白中, 绝大多数包含有细胞因子成分, 其作用通常可分为两类, 即载体靶向作用和/或直接生物学活性。本文根据与细胞因子融合的分子的不同, 将细胞因子重组融合蛋白分为以下几类:

### 1 细胞因子与抗体的融合蛋白

抗肿瘤抗体和细胞因子融合蛋白同时保留抗体和细胞因子功能, 表现出较相当量单独抗体和细胞因子更高的抗肿瘤活性, 且不伴全身毒性反应<sup>[2]</sup>。提示这些特殊融合蛋白分子可在人类癌症治疗中发挥作用。

Peng 等<sup>[3]</sup>1999 年构建了一个单链 IL-12-IgG3 融合蛋白, 由两部分组成, 一是抗 Her2/neu 抗体部分, 25% ~ 30% 的人类乳腺癌中 Her2/neu 抗原过度表达, 转移性乳腺癌可通过人源化的抗 Her2/neu 抗体有效的被靶向, 故可以该特异性抗体为载体将细胞因子导至肿瘤灶; 另一部为单链 IL-

12(scIL12), Peng 等<sup>[3]</sup>把 IL-12 的 p35 和 p40 亚单位通过多肽接头连接(p40 linker p35)后再与抗 Her2/neu 抗体重链氨基端融合, 得到融合蛋白 mscIL-12. Her2. IgG3。流式细胞术检测结果表明, Her2IgG3 和 IL-12 的融合未影响该融合蛋白在细胞表面的解离率、内化和降解, 且其中 IL-12 的组分能和 IL-12R 结合。小鼠体内抗肿瘤实验结果显示, 从发现肿瘤第 1 天起给予 mscIL-12. her2. IgG3, 减缓了肿瘤生长; 而从第 6 天起给药, 则抑制肿瘤生长, 表明 mscIL-12. her2. IgG3 在免疫功能正常的小鼠体内具有显著抗肿瘤活性。

2003 年, Heuser 等<sup>[4]</sup>构建了一种抗 CD30 抗体与 IL-12 的融合蛋白, 该蛋白能诱导 IFN- $\gamma$  的分泌以及 NK 细胞介导的 Hodgkin 氏淋巴瘤来源的细胞的溶解。Hodgkin 氏病的发病机理部分是由于 Th2 反应占支配地位, 伴随失能 T 细胞聚集在恶性 Hodgkin/Reed-Sternberg(H/RS)细胞周围, 由 CD30 结合域(HRS3-scFv)和 IL-12 的 p40-p35 亚单位组成的抗 CD30 抗体-IL-12 融合蛋白, 可逆转 Th2 极化状态, 该蛋白具有特异性结合 CD30 抗原和 IL-12 受体的能力, 能刺激 T 细胞分泌 IFN- $\gamma$ , 并高效诱导 NK 细胞溶解 CD30<sup>+</sup>细胞。这些特性使 HRS3-scFv-hi-IL-12 可用于 Hodgkin 氏淋巴瘤的特异性免疫治疗。

**[基金项目]** 国家 863 课题(2001AA215111)

shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effects of fever-range hyperthermia on vaccine activity [J]. J Immunol, 2001, 166(1): 490-497.

[17] Ito A, Shinkai M, Honda H, et al. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles[J]. Cancer Immunol Immunother, 2003, 52(2): 80-88.

[18] Oehler R, Pusch E, Zellner M, et al. Cell type-specific variations in the induction of hsp70 in human leukocytes by feverlike whole body hyperthermia[J]. Cell Stress Chaperones, 2001, 6(4):

306-315.

[19] Payne J, Nair MP, Ambrus JL, et al. Mild hyperthermia modulates biological activities of interferons[J]. Int J Hyperthermia, 2000, 16(6): 492-507.

[20] Saga T, Sakahara H, Nakamoto Y, et al. Enhancement of the therapeutic outcome of radio-immunotherapy by combination with whole-body mild hyperthermia[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(11): 1429-1434.

**[收稿日期]** 2003-10-17

**[修回日期]** 2004-03-03

## 2 细胞因子与毒素的融合蛋白

在一些肿瘤细胞表面存在许多细胞因子受体,可利用细胞因子作为靶向载体将细胞毒素运送到肿瘤微环境以杀伤肿瘤细胞。白喉毒素与细胞因子的重组融合蛋白便是这样一类能直接杀伤靶细胞的免疫制剂<sup>[5]</sup>。体外试验表明,白喉毒素-IL-2的融合蛋白(DAB<sub>389</sub>-IL-2)对表达高亲和力IL-2受体的细胞株起毒性作用,而缺乏完整的高亲和力受体的细胞株(有p55亚单位而无p75亚单位)则对该融合毒素相对耐受<sup>[6]</sup>。细胞结合该融合毒素后,可观察到类似于IL-2刺激之后的情况<sup>[7]</sup>即IL-2、IL-2受体、c-myc和IFN- $\gamma$ 的mRNA的表达增高,蛋白合成在4~6h内开始受抑制,继发的凋亡则在40~72h内发生<sup>[5]</sup>。Saleh等<sup>[8]</sup>报道DAB<sub>389</sub>-IL-2在皮肤T细胞淋巴瘤(cutaneous T cell lymphoma, CTCL) I期临床试验中单独使用显示出显著的临床治疗效果。DAB<sub>389</sub>-IL-2已成为美国食品与药品管理局(FDA)核准的临床治疗药物。

另一种融合毒素是转化生长因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )-假单胞菌外毒素A<sup>[10]</sup>。假单胞菌外毒素A(Pseudomonas exotoxin A, PE)为不可逆性蛋白合成抑制剂,将其细胞结合域删除即为PE40,仅表现出极低的细胞和动物毒性<sup>[11]</sup>。再将编码TGF- $\alpha$ 的基因与PE40基因融合,表达产物为TP40,后者既有TGF- $\alpha$ 受体结合活性,又保留PE的细胞毒性。某些肿瘤如人类胰腺癌组织过度表达上皮生长因子受体(EGF-receptor),其配体之一即TGF- $\alpha$ 。实验证明TP40这一双功能蛋白能抑制或杀伤表达高水平EGF受体的肿瘤细胞。

这类融合蛋白中细胞因子成分不仅发挥自身生物学活性,且作为毒素运输载体,其综合结果为同时使该细胞因子和毒素浓集到肿瘤局部以特异性加强治疗效果。

## 3 不同细胞因子的融合蛋白

将两种或多种细胞因子融合在一起的构想是基于这些细胞因子具有相同或相关功能活性,而各自作用靶点不同,其融合基因表达产物很可能表现出各个组分之间的协同作用。

1991年Curtis等<sup>[12]</sup>报道了第一个由不同细胞因子组成的融合蛋白,根据IL-3和粒细胞/巨嗜细胞集落刺激因子(GM-CSF)在小鼠和灵长类体内刺激造血的协同作用,构建了融合蛋白PIXY-321(GM-CSF-IL-3)和PIXY-344(IL-3-GM-CSF)。两者均在GM-CSF与IL-3之间引入了一段疏水氨基酸序列从而保证其各自的天然构象以确保其与受体结合<sup>[12]</sup>。实验结果表明,两者对只表达GM-CSF受体的细胞株(HL-60)或只表达IL-3受体的细胞株(JM-1)的结合能力与单体大致相同(略低),说明该种融合蛋白既可以经GM-CSF域又能经IL-3域结合相应受体。进一步研究发现,PIXY-321在刺激骨髓集落形成中较等摩尔数的GM-CSF和IL-3混合物有更佳的效果<sup>[12]</sup>。

继PIXY321/344之后,另一个具有代表性的融合蛋白是胰岛素样生长因子II-白介素-3(IGF-II-IL-3)。IGFs常与其

他生长因子一起发挥协同作用,是最好的二联细胞因子融合蛋白的备选因子。IGF II可刺激多种组织中细胞的增殖或分化。将IGF II与一段信号肽以及胰岛素样的昆虫激素bombyxin的N端序列融合表达,便可得到分泌形式的具有生物活性的BOMIGF<sup>[13]</sup>。Difalco等<sup>[14]</sup>制备了一种BOMIGF和IL-3的融合蛋白,体外试验中它可刺激正常外周血细胞中的骨髓干细胞集落形成,体内试验结果亦显示该融合蛋白能动员具有高度增殖活性的骨髓干细胞进入外周血,进而定居至脾脏而发挥造血功能。

不同细胞因子的融合蛋白作用靶细胞的范围比单细胞因子与其他分子融合蛋白更广。各细胞因子成分均可与相应受体结合,各自发挥作用。若两个细胞因子组分互相作为载体并各自发挥相关的生物学活性,可能发挥协同作用。

## 4 细胞因子与细胞因子受体的融合蛋白

通过将体内发挥作用时相互依赖或者所具有的协同作用细胞因子与细胞因子受体基因重组,可大大促进其生物学活性的发挥。

IL-6在肝细胞的增殖中起着增强作用<sup>[15]</sup>。IL-6和IL-6R $\alpha$ (gp80)的结合使其易于和另一个受体——IL-6R $\beta$ (gp130)结合。IL-6R $\alpha$ 尚以可溶性蛋白的形式存在。sIL-6R与IL-6结合后,靶细胞对IL-6的敏感性增高,并可使仅表达膜结合型IL-6R的细胞(IL-6R $\alpha$ -gp130<sup>+</sup>)对IL-6起反应。在sIL-6R/IL-6双基因转染的小鼠中,sIL-6R发挥锚定IL-6的作用,延长血浆IL-6半衰期,同时细胞对IL-6的敏感性显著提高<sup>[16]</sup>。

基于以上几点,Fischer<sup>[17]</sup>等用基因重组的方法构建了一种IL-6-sIL-6R融合蛋白hyper-IL-6。在gp130<sup>+</sup>细胞上,该融合蛋白表现出了完全的生物学活性,而所需浓度仅为非融合形式的IL-6和sIL-6R的100至1000分之一,因而被用于在体外有效的扩增造血祖细胞,且该作用具有剂量依赖关系。进一步的大鼠体内试验表明,hyper-IL-6可逆转D-gal引起的亚致死性或致死性肝毒性损伤,且此作用不可被IL-6替代<sup>[16]</sup>。

## 5 细胞因子与其他分子的融合蛋白

细胞因子还被设计与其他生物活性分子如某些肿瘤相关抗原,信号转导途径中的相关分子等融合。

Aqeilan等<sup>[18]</sup>报道了一个新的人融合蛋白IL-2-Bax用于靶向治疗。Bax属于Bcl-2蛋白家族,为促凋亡因子。诱导Bax表达便可介导细胞凋亡而不需要附加的细胞死亡刺激信号,且通过凋亡途径杀伤靶细胞可使组织损伤和全身性反应降至最低。研究表明,该融合蛋白介导的靶细胞凋亡呈剂量依赖关系。靶向性细胞因子和凋亡蛋白融合产物在体内及体外可选择性杀伤特定类型细胞,开创了疾病靶向治疗新视野。

Reinartz等<sup>[19]</sup>将IL-6与抗独特型单克隆抗体重组,制备了chACA125-IL-6融合蛋白并将其用于卵巢癌研究。小鼠

抗独特型单抗 ACA125 模拟卵巢癌细胞上的 CA125 抗原,可诱导抗-抗独特型抗体(Ab3)反应,该反应与卵巢癌患者生存时间呈正相关。试验结果表明融合蛋白接种后抗 CA125 (Ab3)的浓度较 IL-6 与 chACA125 联用高,且未观察到抗人 IL-6 抗体产生,而联用情况下可以检测到抗人 IL-6 抗体产生。综上,chACA125-IL-6 融合蛋白通过 IL-6 区域直接刺激 ACA125 特异性 B 细胞而简单联用 IL-6 则从整体上增强免疫反应。通过增强抗原特异性体液免疫反应,抗原-IL-6 融合蛋白将改善疫苗接种方法和抗肿瘤免疫治疗手段。

由于细胞因子种类繁多且每一细胞因子的作用又具有多样性,而在体内环境中各种细胞因子间相互作用更为复杂,因而细胞因子融合蛋白研究几乎涵盖所有常见细胞因子。但凡在功能上相关的细胞因子或相关的分子,若其融合产物的生物学活性能够大于或者等于各个组分简单相加的结果,即具有其他单体分子无法比拟的高效性,便有构建融合分子的意义;或者,在与特定的靶向性分子结合之后,具有一定毒性的细胞因子能有选择的、特异的浓集于病灶局部,使全身性的不良反应降至最低点,即具有某些单体细胞因子所不具有的特异性,也是融合蛋白的研究方向之一。但在进行融合蛋白构建时,分子大小也是决定该产品最终功效的因素之一。如在 PIXY321 的后续临床实验中发现,其虽能加速造血功能的恢复,但在第二轮使用时由于抗 PIXY321 中和抗体的产生而抑制了其造血活性<sup>[20]</sup>。因此在构建细胞因子融合蛋白时,必须慎重选择所融合的细胞因子并且在设计中尽可能降低分子量以减少免疫原性。若能很好解决抗原性问题,细胞因子融合蛋白应用前景将非常广阔。最近,一些抗肝纤维化细胞因子和细胞因子受体融合蛋白开始引起研究者兴趣,这类融合蛋白的构建可能会为逆转肝纤维化的进程提供一种疗法,并给细胞因子融合蛋白新分子的构建提供新的思路。

#### [参考文献]

[1] Williams DP, Parker K, Bacha P, *et al.* Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2: Genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein[J]. *Protein Eng*, 1987, 1(6): 493-498.

[2] Penichet ML, Morrison SL. Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 248(1-2): 91-101.

[3] Peng LS, Penichet ML, Morrison SL. A single-chain IL-12 IgG3 antibody fusion protein retains antibody specificity and IL-12 bioactivity and demonstrates antitumor activity[J]. *J Immunol*, 1999, 163(1): 250-258.

[4] Heuser C, Diehl V, Abken H, *et al.* Anti-CD30-IL-12 antibody-cytokine fusion protein that induces IFN-gamma secretion of T cells and NK cell-mediated lysis of Hodgkin's lymphoma-derived tumor cells[J]. *Int J Cancer*, 2003, 106(4): 545-552.

[5] Foss FM. Interleukin-2 fusion toxin: Targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 941: 166-176.

[6] Kiyokawa T, Williams DP, Snider CE, *et al.* Protein engineering of DAB-IL-2 fusion toxins to increase biologic potency[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 636: 331-339.

[7] Walz G, Zanker B, Brand K, *et al.* Sequential effects of interleukin 2-diphtheria toxin fusion protein on T-cell activation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(23): 9485-9488.

[8] Saleh MN, LeMaistre CF, Kuzel TM, *et al.* Antitumor activity of DAB389IL-2 fusion toxin in mycosis fungoides[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39(1): 63-73.

[9] Wick MJ, Frank DW, Storey DG, *et al.* Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 335-363.

[10] Baldwin RL, Kobrin MS, Tran T, *et al.* Cytotoxic effects of TGF-alpha-Pseudomonas exotoxin A fusion protein in human pancreatic carcinoma cells[J]. *Pancreas*, 1996, 13(1): 16-21.

[11] Kondo T, FitzGerald D, Chaudhary VK, *et al.* Activity of immunotoxins constructed with modified *Pseudomonas* exotoxin A lacking the cell recognition domain[J]. *J Biol Chem*. 1988, 263(19): 9470-9475.

[12] Curtis BM, Williams DE, Broxmeyer HE, *et al.* Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(13): 5809-5813.

[13] Congote LF, Li Q. Accurate processing and secretion in the baculovirus expression system of an erythroid-cell-stimulating factor consisting of a chimaera of insulin-like growth factor II and an insect insulin-like peptide[J]. *Biochem J*, 1994, 299 ( Pt 1): 101-107.

[14] Difalco MR, Congote LF. Preparation of a recombinant chimaera of insulin-like growth factor II and interleukin 3 with high proliferative potency for haemopoietic cells[J]. *Biochem J*, 1997, 326 ( Pt 2): 407-413.

[15] Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, *et al.* Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice [J]. *Science*. 1996, 274(5291): 1379-1383.

[16] Galun E, Zeira E, Pappo O, *et al.* Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury[J]. *FASEB J*, 2000, 14(13): 1979-1987.

[17] Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, *et al.* A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion[J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(2): 142-145.

[18] Aqeilan R, Yarkoni S, Lorberboum-Galski H. Interleukin 2-Bax: a novel prototype of human chimeric proteins for targeted therapy[J]. *FEBS Lett*, 1999, 457(2): 271-276.

[19] Reinartz S, Hombach A, Kohler S, *et al.* Interleukin-6 fused to an anti-idiotypic antibody in a vaccine increases the specific humoral immune response against CA125<sup>+</sup> (MUC-16) ovarian cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(12): 3234-3240.

[20] Miller LL, Korn EL, Stevens DS, *et al.* Abrogation of the hematological and biological activities of the interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein PIXY321 by neutralizing anti-PIXY321 antibodies in cancer patients receiving high-dose carboplatin[J]. *Blood*, 1999, 93(10): 3250-3258.

[收稿日期] 2003-10-08

[修回日期] 2003-11-21