

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.04.002

· 研究快报 ·

## IL-3-LDM 融合蛋白对 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的靶向杀伤作用

张砚君<sup>1</sup>, 李双静<sup>1</sup>, 姜琳琳<sup>1</sup>, 刘荣<sup>2</sup>, 高雪<sup>1</sup>, 袁向飞<sup>1</sup>, 齐怀丰<sup>4</sup>, 范冬梅<sup>1▲</sup>, 苗庆芳<sup>3</sup>, 甄永苏<sup>3</sup>, 熊冬生<sup>1</sup>(1. 中国医学科学院北京协和医学院血液病医院暨血液学研究所 实验血液学国家重点实验室, 天津 300020; 2. 郑州市人民医院 肿瘤内科 河南省院士工作站, 河南 郑州 450053; 3. 中国医学科学院北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050; 4. 天津红日药业股份有限公司, 天津 301700)

**[摘要]** **目的:** 构建以 IL-3 为靶向、力达霉素(lidamycin, LDM)为弹头的融合蛋白 IL-3-LDM, 观察其对多种 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的靶向杀伤作用。**方法:** 原核表达 IL-3-LDP(interleukin 3-lidamycin)融合蛋白, 组装活性烯二炔(active enediyne, AE)发色团得到 IL-3-LDM。流式细胞术检测不同白血病细胞系(KG1-a、TF-1、M07e、HL-60、K562、Raji)表面 CD123 分子的表达, 并检测融合蛋白 IL-3-LDM 与各白血病细胞的结合能力; CCK-8 检测 IL-3-LDM 融合蛋白对不同 CD123 阳性率的白血病细胞的杀伤能力。**结果:** 组装活性发色团得到的 IL-3-LDM 蛋白纯度可达 90% 以上。急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)KG-1a 细胞表面 CD123 阳性率最高(88.9%), 其次为 M07e 和 TF-1 细胞(>75%), 再次为 HL-60 细胞(7.8%), 而 K562、Raji 细胞 CD123 表达呈阴性。体外 IL-3-LDM 融合蛋白对 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞(KG-1a、M07e、TF-1 和 HL-60 细胞)的结合能力和杀伤效率与细胞表面 CD123 的阳性率成正比, 对于 CD123 表达率最高的 KG-1a 细胞, LDM 的杀伤强度是多柔比星(adriamycin, ADR)的 1 415.8 倍, 而 IL-3-LDM 的杀伤强度又是 LDM 的 9.6 倍。**结论:** IL-3-LDM 融合蛋白可以有效携带细胞毒药物 LDM 并高效靶向杀伤 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞。

**[关键词]** IL-3; 力达霉素; 融合蛋白; CD123; 白血病; 肿瘤干细胞

**[中图分类号]** R733.7; R979.1; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)04-0391-07

## Targeting cytotoxicity effect of IL-3-lidamycin fusion protein on CD123<sup>+</sup> leukemia cells

Zhang Yanjun<sup>1</sup>, Li Shuangjing<sup>1</sup>, Jiang Linlin<sup>1</sup>, Liu Rong<sup>2</sup>, Gao Xue<sup>1</sup>, Yuan Xiangfei<sup>1</sup>, Qi Huaifeng<sup>4</sup>, Fan Dongmei<sup>1▲</sup>, Miao Qingfang<sup>3</sup>, Zhen Yongsu<sup>3</sup>, Xiong Dongsheng<sup>1</sup>(1. State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Hospital of Blood Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China; 2. Academician Workstation of Henan Province, Department of Medical Oncology, People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450053, Henan, China; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100050; 4. Tianjin Chase Sun Pharmaceutical Co. Ltd, Tianjin 301700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct a fusion protein IL-3-lidamycin(IL-3-LDM) with an IL-3 guide and a LDM warhead, and to investigate its targeting cytotoxicity on CD123<sup>+</sup> leukemia cells *in vivo*. **Methods:** IL-3-LDP(interleukin 3-lidamycin) fusion protein was obtained in a prokaryotic system, and further assembled with active enediyne(AE) to get IL-3-LDM. The expression of CD123 in six leukemia cell lines(KG1-a, TF-1, M07e, HL-60, K562, Raji) was detected by flow cytometry and the binding ability of IL-3-LDM with different leukemia cell lines was examined. The cytotoxicity of IL-3-LDM fusion protein on leukemia cells with different CD123 expression levels was detected by CCK-8. **Results:** The

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 30971291);天津市科技发展计划资助项目(No. 05YFGZGX02800)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30971291), and the Science and Technology Development Plan of Tianjin(No. 05YFGZGX02800)

**[作者简介]** 张砚君(1978-),女,天津市人,博士,主要从事肿瘤靶向治疗和耐药机制研究。E-mail: junjunfriend@126.com

**[通信作者]** 熊冬生(Xiong Dongsheng, Corresponding author), E-mail: dsxiong@hotmail.com; 范冬梅(Fan Dongmei, corresponding author), E-mail: fam19691217@163.com. ▲共同通信作者

**[网络出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130722.1255.002.html>

purity of recombinant protein IL-3-LDM was more than 90% after assembling with AE. The results showed that the CD123 expression ratio was 88.9% on AML (acute myeloid leukemia) KG-1a cells, >75% on MO7e and TF-1 cells, 7.8% on HL-60 cells, and negative on K562 and Raji cells. The expression ratio of CD123 on leukemia cells (KG-1a, MO7e, TF-1 and HL-60) was positively related to its binding ability and sensitivity to IL-3-LDM *in vitro*. The cytotoxicity of LDM on KG-1a cells which expressed the highest level of CD133 was 1 415.8 fold stronger than that of adriamycin (ADR), and the cytotoxicity of IL-3-LDM was 9.6 fold than that of LDM. **Conclusion:** IL-3-LDM fusion protein can effectively target cytotoxic drug LDM to kill CD123<sup>+</sup> leukemia cells.

[ **Key words** ] IL-3; lidamycin; fusion protein; CD123; leukemia; cancer stem cell

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(4): 391-397 ]

IL-3R $\alpha$  链, 即 CD123 抗原, 是具有开发潜力的白血病干细胞 (leukemia stem cell, LSC) 特征性抗原之一, 是特异识别并结合 IL-3 的关键部位。其在急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 干细胞表面高表达, 而在正常造血干细胞表面几乎不表达<sup>[1]</sup>。这一显著差异, 使以 CD123 作为靶点清除 LSC 或诱导 LSC 凋亡, 进而根治白血病成为可能。力达霉素 (lidamycin, LDM) 是迄今报道过的对肿瘤细胞杀伤作用最强的大分子肽类抗肿瘤抗生素, 其分子结构新颖、生物活性强并且作用机制独特, 由我国自主研发<sup>[2]</sup>。本研究构建 IL-3 与 LDM 的酸性保护蛋白 (apoprotein, LDP) 偶联的融合蛋白 IL-3-LDP, IL-3-LDP 体外组装活性烯二炔 (active enediyne, AE) 发色团后形成完整的 IL-3-LDM, 检测其体外对不同 CD123 表达率白血病细胞的杀伤活性, 为 IL-3-LDM 的体内实验和临床应用奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

细胞系 KG-1a (AML 干祖细胞系) 购于美国 ATCC, 人白血病细胞系 TF-1 (红系白血病)、MO7e (人巨核细胞白血病)、HL-60 (早幼粒细胞白血病)、K562 (慢性髓系白血病)、Raji (B 细胞淋巴瘤) 由本实验室保存。BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司、ELISA 试剂盒购自欣博盛公司、CCK-8 购自日本 Dojindo 公司。Per-cy5.5-anti-CD123 抗体购自美国 BD 公司, FITC 标记的兔抗鼠抗体购自中国医学科学院协和干细胞公司。IL-3-LDP 表达载体由本室构建和保存, 活性发色团 AE 由中国医学科学院医药生物技术研究所保存。

### 1.2 IL-3-LDP 融合蛋白的表达与鉴定

重叠 PCR 克隆 IL-3-LDP 全长基因并在基因末尾引入 His6 标签, 构建融合蛋白表达载体 pET28a-IL-3-LDP, 转化大肠杆菌 BL21, 挑取测序

正确的克隆, 经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 ~ 4 h, 离心收集菌体。加入细菌周质腔裂解液冰上裂解 1 ~ 2 h, 离心收集上清, 经 PBS 过夜透析去除盐类等小分子物质。得到的上清液中含细菌周质腔表达的可溶性蛋白, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后, 镍亲和层析柱纯化后得到目的蛋白。进行 SDS-PAGE, 目标蛋白转移至 NC 膜后用 anti-His6 抗体和 HRP 标记的羊抗兔二抗进行 Western blotting 杂交鉴定<sup>[3]</sup>。镍柱纯化后的 IL-3-LDP 融合蛋白溶液经 BCA 试剂盒测总蛋白浓度, 用 IL-3 ELISA 试剂盒检测蛋白溶液中与 IL-3 反应的蛋白浓度, 计算蛋白纯度 (%) = IL-3 含量 / 总蛋白量  $\times$  100%。

### 1.3 IL-3-LDM 的组装与纯化

纯化蛋白溶液用 1  $\times$  PBS 离心置换后, 加入 5 倍分子量的 AE 发色团-甲醇溶液 (体积比为 50:1), 振摇混匀, 室温放置 12 h 组装成完整的活性靶向药物 IL-3-LDM。最后将混合液进行 PD-10 柱层析, 经 A280 nm 和 A343 nm 紫外监测后收集纯化融合蛋白 IL-3-LDM, HPLC 检测其蛋白吸收峰。

### 1.4 流式细胞术检测融合蛋白 IL-3-LDM 与白血病细胞系的结合活性

1.4.1 流式细胞术鉴定 6 种白血病细胞表面 CD123 的表达率 悬浮培养 6 种人白血病细胞系 KG-1a、TF-1、MO7e、HL-60、K562、Raji, 收集细胞, 无菌生理盐水或 1  $\times$  PBS 洗 2 遍, 重悬细胞至密度为 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个/管。每管内加入 5  $\mu$ l Per-cy5.5-CD123 抗体, 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后用无菌生理盐水或 PBS 漂洗 2 次, 流式细胞仪检测各白血病细胞系表面 CD123 的表达率。

1.4.2 流式细胞术检测 IL-3-LDM 与 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的结合活性 各白血病细胞系细胞悬浮培养至对数生长期, 用 PBS 重悬至 1  $\times$  10<sup>6</sup> 个/管。设置空白对照组 (仅白血病细胞)、阴性对照组 (只加抗 His 抗体和二抗) 和阳性实验组 (1  $\mu$ g/ml IL-3-LDM

处理白血病细胞)。将细胞置 4 ℃ 孵育 1 h, 漂洗 2 次后在阴性对照组和阳性实验组中加入 20 μl 抗 His 抗体液(1:40), 4 ℃ 孵育 1 h 后漂洗 2 次, 加入 FITC 标记的兔抗鼠抗体工作液 20 μl, 4 ℃ 避光孵育 30 min。室温下 300 × g 离心 15 min, 弃上清后漂洗 2 次, 用 4% 多聚甲醛溶液 300 μl 固定细胞。轻轻吹打, 使细胞成单个悬液, 流式细胞术检测 IL-3-LDM 与 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的结合活性。

### 1.5 CCK-8 法检测 IL-3-LDM 对 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的杀伤活性

悬浮培养 M07e、KG-1a、HL-60、Raji 细胞, 铺 96 孔板(90 μl/孔, 每孔细胞 1 × 10<sup>4</sup> 个)。设置实验组(IL-3-LDM)、相关药物(LDM)对照组和阳性药物对照组[多柔比星(adriamycin, ADR)], 空白对照组(PBS), 从低到高浓度倍比稀释加药(表 1), 每组 3 个复孔。加药后在培养箱内孵育 4 h, 弃上清, 用 RPMI 1640 培养基 90 μl 重悬细胞, 继续培养 72 h。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液孵育 2 ~ 3 h, 酶标仪测定 450 nm 处光密度(D)值。各样本值扣除空白孔值后, 取复孔平均值, 计算杀伤率(%) = (D<sub>对照组</sub> - D<sub>实验组</sub>) / D<sub>对照组</sub> × 100%。

表 1 药物杀伤实验分组设计[ $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

Tab. 1 Cytotoxic experiment design[ $c_B / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ]

IL-3-LDM (× 10 <sup>-10</sup> )	LDM (× 10 <sup>-10</sup> )	ADR (× 10 <sup>7</sup> )	Blank control
0	0	0	PBS
3.55	9.50	1.48	
1.77	4.75	0.74	
0.89	2.38	0.37	
0.44	1.19	0.18	
0.22	0.59	0.09	
0.11	0.29	0.04	
0.05	0.15	0.02	

### 1.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prime5 软件计算 IC<sub>50</sub> 值, 并进行 *t* 检验统计分析, 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功表达 IL-3-LDP 融合蛋白并组装 IL-3-LDM 挑取正确克隆 pET28a-IL-3-LDP, 经 IPTG 诱导

表达 IL-3-LDP 蛋白, 纯化后经 SDS-PAGE 与 Western blotting 鉴定, 结果显示, 在相对分子质量 2 900 处有一明显目的蛋白条带, 与预计完全一致, 说明 IL-3-LDP 融合蛋白原核表达成功(图 1)。

IL-3-LDP 经镍柱亲和纯化后, 纯化液总蛋白质量浓度为 981.5 μg/ml, 共收集到 10 ml 液体, 蛋白总产量约 1 mg。与发色团组装为 IL-3-LDM 后, 采用 IL-3 的 ELISA 试剂盒进行 IL-3 的定量检测, IL-3 质量浓度为 902 μg/ml。高效液相色谱检测显示, 最终的蛋白纯度为 92%(图 2)。

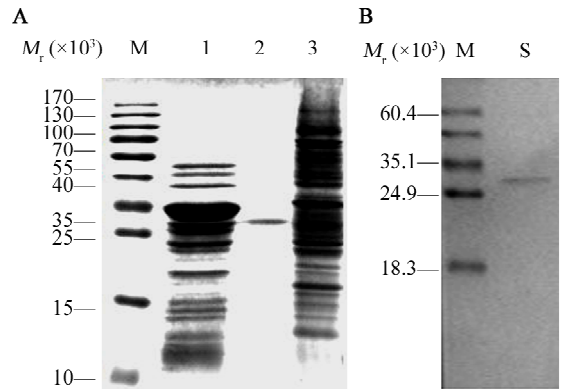


图 1 SDS-PAGE 与 Western blotting 鉴定 IL-3-LDP 融合蛋白

Fig. 1 Identification of IL-3-LDP fusion protein by SDS-PAGE and Western blotting

A: SDS-PAGE; B: Western blotting;  
M: Protein marker; 1: Lysate; 2: Purified liquid;  
3: Effluent; S: IL-3-LDP fusion protein

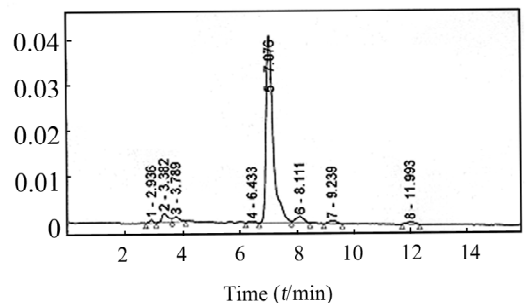


图 2 高效液相色谱检测 IL-3-LDM 吸收峰

Fig. 2 Absorption peak of IL-3-LDM measured by HPLC

### 2.2 IL-3-LDM 融合蛋白和白血病细胞的结合活性

2.2.1 6 种白血病细胞系 CD123 的表达率 流式细胞术检测结果(图 3)显示, KG-1a 细胞表面 CD123 表达量最高, 其次为 M07e 和 TF-1 细胞系, 均可达到 75% 以上; 再次为 HL-60 细胞, 但仅为

7.8%, 属弱阳性表达; 而 K562、Raji 细胞 CD123 表达呈阴性。

2.2.2 IL-3-LDM 和白血病细胞的结合能力与 CD123 表达率相关 IL-3-LDM 融合蛋白与不同细胞系分别孵育, 流式细胞术检测结果显示, IL-3-LDM 和 CD123<sup>+</sup> 细胞的结合能力与细胞表面 CD123 表达

率成正比。TF-1、MO7e 细胞系与 IL-3-LDM 融合蛋白结合率最高, 可达 90% 以上; HL-60、K562 细胞系与融合蛋白结合能力最弱, 呈阴性(图 4)。IL-3-LDM 与白血病细胞的结合能力与该细胞 CD123 阳性率完全一致, 说明 IL-3-LDM 可以很好地与细胞表面的 CD123 结合, 靶向 CD123<sup>+</sup> 的白血病细胞系。

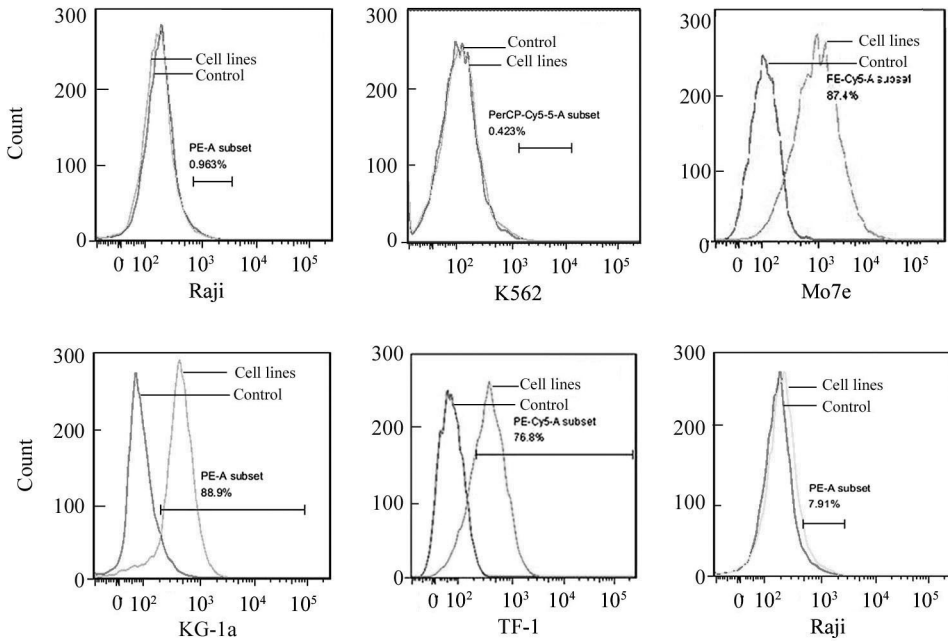


图 3 不同白血病细胞系 CD123 表达的阳性率

Fig. 3 Positive rate of CD123 expression on different leukemia cell lines

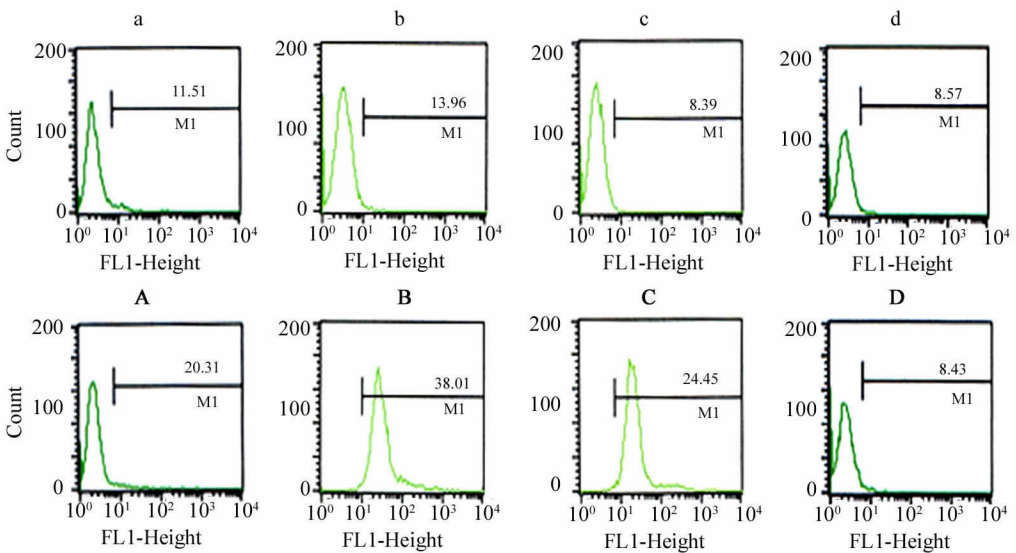


图 4 IL-3-LDM 与 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞系的结合活性

Fig. 4 Binding activity of IL-3-LDM with CD123<sup>+</sup> leukemia cell lines

a: HL-60; b: TF-1; c: MO7e; d: K562;

A: HL-60 + IL-3-LDM; B: TF-1 + IL-3-LDM; C: MO7e + IL-3-LDM; D: K562 + IL-3-LDM

### 2.3 IL-3-LDM 体外高效杀伤 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞

将 IL-3-LDM 融合蛋白、LDM 药物单体、常用化疗药物 ADR 分别与不同白血病细胞孵育后,以 CCK-8 法检测药物对细胞的杀伤情况(图 5),并计算出 3 种药物杀伤各细胞的 IC<sub>50</sub>(图 6)。结果显示,在 CD123 表达率最高的 KG-1a 细胞, LDM 可强有力地杀伤肿瘤细胞,其杀伤强度是 ADR 的 1 415.8 倍;而 IL-3-LDM 的杀伤作用更强,是 LDM

的 9.6 倍。在另一 CD123 表达率较高的 MO7e 细胞, IL-3-LDM 的杀伤前度是 LDM 的 2.3 倍。对 CD123 表达阴性和弱阳性的白血病 Raji 和 HL-60 细胞, IL-3-LDM 的杀伤作用强度和 LDM 无明显区别。未加发色团的 IL-3-LDP 不具备细胞杀伤能力,其中的 IL-3 成分对肿瘤细胞的增殖有轻微促进作用,但对结合发色团后的杀伤没有影响。

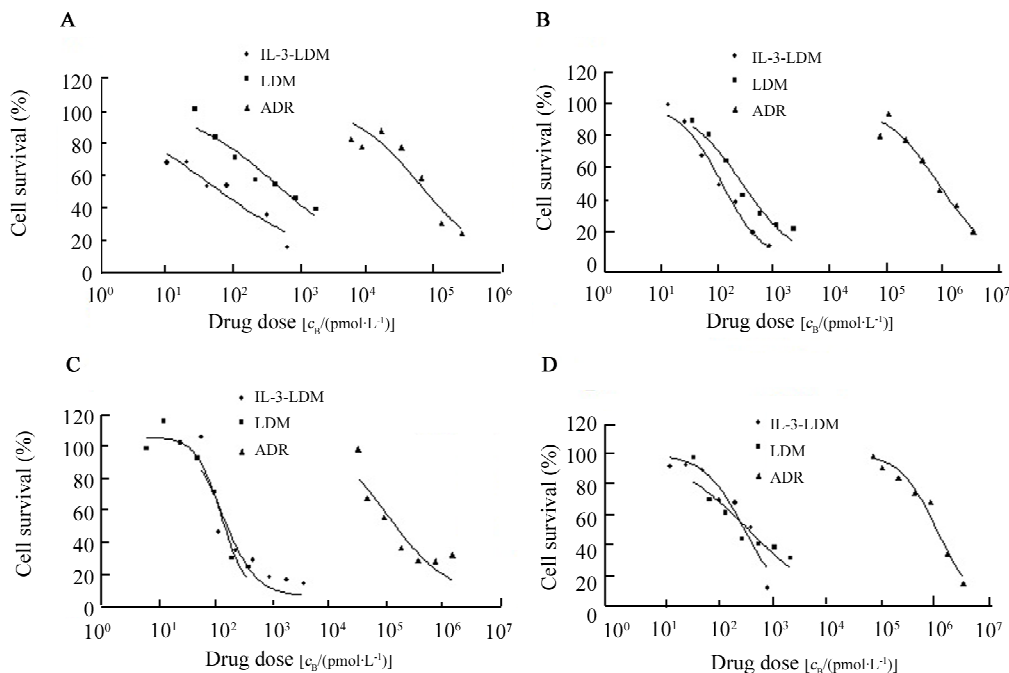


图 5 IL-3-LDM 对 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞的杀伤作用

Fig. 5 Cytotoxicity of IL-3-LDM on CD123<sup>+</sup> leukemia cells

A: MO7e; B: KG-1a; C: HL-60; D: Raji

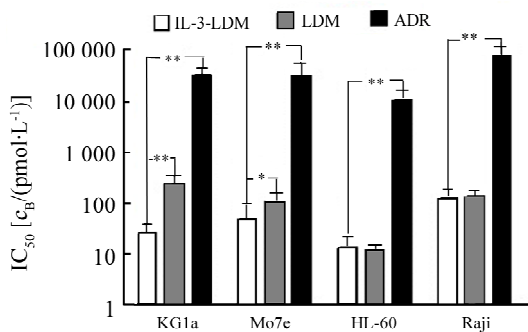


图 6 IL-3-LDM、LDM、ADR 对 4 种 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞杀伤的 IC<sub>50</sub> 的比较

Fig. 6 Comparison of the IC<sub>50</sub> of IL-3-LDM, LDM and ADR killed four types of CD123<sup>+</sup> leukemia cells

### 3 讨论

造血干细胞是最早被证实存在的干细胞,而“肿瘤干细胞”这一概念也最早被应用于白血病。尽管对于肿瘤干细胞的来源还有不同意见,但肿瘤干细胞是肿瘤耐药、复发的根源已达成共识<sup>[4]</sup>。白血病的治疗目标也从最初清除肿瘤细胞逐渐转向彻底清除白血病干细胞,并同时保留人体的正常造血干细胞池。

针对白血病干细胞的靶向治疗方法包括抑制干细胞特有的信号通路分子、靶向干细胞特有的耐药蛋白、抑制原癌基因、干扰干细胞的增殖和凋亡途径以及改变肿瘤微环境相关分子等<sup>[5-6]</sup>。在肿瘤干细胞靶向治疗中,靶点与“弹头”药物的恰当选择直接影响治疗效果。对白血病干细胞特异性抗原研究发

现,各亚型 AML 干细胞除具有与正常造血干细胞相同的表型如 CD34<sup>+</sup>、CD38<sup>-</sup>、CD71<sup>-</sup> 和 HLA-DR<sup>-</sup> 外<sup>[7]</sup>,还具有其特征性的表型,如 CD90(Thy-1)<sup>-</sup>、CD117(ckit)<sup>-</sup> 与 CD123<sup>+</sup><sup>[11]</sup>。目前,DT(388)IL-3 是利用 CD123-IL-3 靶向系统携带毒素杀伤白血病干细胞的典范,已进入 I/II 期临床试验,在 AML 的治疗中取得了很好的效果,能够有效地清除具有克隆形成能力的癌细胞,同时保证对正常干细胞的损伤最小<sup>[8-10]</sup>。还有研究<sup>[11]</sup>应用 CD123 的中和抗体靶向清除急性髓系白血病干细胞(AML-LSC)。最近,利用 CD123xCD3 双特异抗体<sup>[12]</sup>和 CD123 特异性嵌合抗体技术<sup>[13]</sup>激活自身免疫细胞从而针对 CD123<sup>+</sup> 细胞发挥杀伤作用,该研究也取得了一定效果。虽然以上治疗手段尚处于研究阶段,但均不同程度地证明了靶向 CD123 传递系统是治疗 AML 的可行手段。

本研究在此基础上,将我国自主研发的新型抗生素 LDM 中的 LDP 通过基因融合的方法与 IL-3 偶联,表达出融合蛋白 IL-3-LDP,体外组装高效的杀伤活性发色团后形成新一代的抗肿瘤干细胞药物 IL-3-LDM。LDM 不同于现有的蛋白类药物,其两部分(LDP 与发色团)可拆分再组合,是结构新颖、广谱高效的烯己二炔类抗生素,对耐药细胞也有明显的杀伤作用。实际发挥作用的发色团相对分子量仅为 843,易快速进入细胞,且非能量依赖,对于克服抗体类大分子药物入胞难等问题具有明显优势。并且 IL-3-LDM 前体药物 IL-3-LDP 可溶性蛋白以特殊的细菌周质腔表达方式表达,无需裂解细菌,仅破坏细菌周质腔即可释放,便于蛋白的收集、纯化。在以往的实验中,本课题组对此方法进行了研究,已证明纯化蛋白中内毒素对后期实验影响较小,且进一步体外组装后再经过二次纯化,内毒素影响可以忽略。

LDM 的另一大特点是其超高效的细胞杀伤活性,其细胞毒性是普通临床一线化疗药 ADR 的 1 万倍<sup>[14]</sup>。已证实,在血液肿瘤细胞中,极低浓度的 LDM 就可以诱导慢性髓系白血病细胞系 HL-60 出现凋亡<sup>[15]</sup>,并对多发性骨髓瘤<sup>[16]</sup>等血液系统肿瘤细胞均表现出良好的杀伤活性。研究<sup>[16]</sup>发现,LDM 主要是通过与 DNA 小沟嵌合进而影响细胞基因组复制,阻滞细胞周期于 G<sub>2</sub>/M 期,从而启动细胞凋亡、死亡程序。这种对 DNA 的作用不依赖于细胞周期和细胞类型,针对处于静息期的干细胞,是最为理想的“弹头”药物。

CD123 在造血细胞各阶段的表达情况直接决定

着细胞对 IL-3 类靶向蛋白的敏感性。曾有研究认为,在最初的干祖细胞阶段,细胞对 IL-3 的需要量不高可能是制约 IL-3 靶向治疗的一个重要因素。我国临床调查<sup>[19]</sup>显示,急性淋巴细胞白血病初诊患者血清中 IL-3 水平明显低于正常对照组,但在 AML 患者中还未见相关报道。应用 IL-3 类靶向蛋白或许会对表达 IL-3R 的正常细胞的生存有影响,联合其他药物治疗也许能降低融合蛋白的使用量及毒性,成为避免影响正常细胞生存的有效措施。亦有研究<sup>[20]</sup>联合应用 DT(388)IL-3 与阿糖胞苷,提高了对 AML 模型小鼠的疗效。另一方面,IL-3 与 CD123 的结合作用可以在短时间<sup>[17]</sup>、低浓度<sup>[18]</sup>水平下进行。因此,本实验将 IL-3 与低剂量、高毒性的 LDM 联合,作为针对 AML 干细胞的细胞毒药物,希望通过在干细胞周围富集毒素,从而小范围地、快速地发挥作用,并且这种杀伤作用不依赖于干细胞的一般生理特性,避免了对正常干细胞的功能产生影响。

本研究首次构建 IL-3-LDM 融合蛋白,并研究其对 4 种 CD123<sup>+</sup> 白血病细胞系的杀伤作用,综合发挥 IL-3 的高效靶向作用与 LDM 的强大细胞毒性作用。结果显示,IL-3-LDM 能很好地结合白血病肿瘤细胞表面 CD123 分子,体外有效靶向杀伤多种 CD123<sup>+</sup> 的白血病肿瘤细胞,且杀伤效率与 CD123 阳性率成正比。这一结果证明其有望应用于针对 CD123<sup>+</sup> 白血病肿瘤干细胞的治疗,为 IL-3-LDM 的体内实验及临床应用奠定了实验基础。同时,针对 LDM 体外组装的活性发色团成分,本课题组正寻找新的方法使其与 LDP 的结合与分离更加可控和稳定,从而实现对白血病肿瘤细胞更为稳定、高效的靶向杀伤作用。

## [参考文献]

- [1] Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain in a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells [J]. *Leukemia*, 2000, 14(10): 1777-1784.
- [2] Hu JL, Xue YC, Xie MY, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027. I. Discovery, taxonomy of producing organism, fermentation and biological activity [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 1988, 41(11): 1575-1579.
- [3] 任思楣, 张砚君, 彭洪薇, 等. 靶向白血病干细胞 CD123 的毒性融合蛋白的制备 [J]. *白血病·淋巴瘤*, 2011, 20(8): 490-493.
- [4] Horton SJ, Huntly BJ. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology [J]. *Haematologica*, 2012, 97(7): 966-974.
- [5] Ferretti E, Cocco C, Airoidi I, et al. Targeting acute myeloid leukemia cells with cytokines [J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 92(3): 567-575.

- [ 6 ] Seke Etet PF, Vecchio L, Nwabo Kamdje AH. Signaling pathways in chronic myeloid leukemia and leukemic stem cell maintenance: Key role of stromal microenvironment [ J ]. *Cell Signal*, 2012, 24( 9 ): 1883-1888.
- [ 7 ] Kühnl A, Grimwade D. Molecular markers in acute myeloid leukaemia [ J ]. *Int J Hematol*, 2012, 96( 2 ): 153-163.
- [ 8 ] Frankel AE, McCubrey JA, Miller MS, et al. Diphtheria toxin fused to human interleukin-3 is toxic to blasts from patients with myeloid leukemias [ J ]. *Leukemia*, 14( 4 ): 576-585.
- [ 9 ] Frankel A, Liu JS, Rizzieri D, et al. Phase I clinical study of diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia [ J ]. *Leuk Lymphoma*, 2008, 49( 3 ): 543-553.
- [ 10 ] Yalcintepe L, Frankel AE, Hogge DE. Expression of interleukin-3 receptor subunits on defined subpopulations of acute myeloid leukemia blasts predicts the cytotoxicity of diphtheria toxin interleukin-3 fusion protein against malignant progenitors that engraft in immunodeficient mice [ J ]. *Blood*, 2006, 108( 10 ): 3530-3537.
- [ 11 ] Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor  $\alpha$  chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells [ J ]. *Cell Stem Cell*, 2009, 2( 5 ): 31-42.
- [ 12 ] Kuo SR, Wong L, Liu JS. Engineering a CD123 $\times$ CD3 bispecific scFv immunofusion for the treatment of leukemia and elimination of leukemia stem cells [ J ]. *Protein Eng Des Sel*, 2012, 25( 10 ): 561-569.
- [ 13 ] Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor [ J ]. *Br J Haematol*, 2013, 161( 3 ): 389-401.
- [ 14 ] Jiang B, Li DD, Zhen YS. Induction of apoptosis by enediyne anti-tumor antibiotic C-1027 in HL60 human promyelocytic leukemia cells [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 208( 1 ): 238-244.
- [ 15 ] Zhen YZ, Lin YJ, Li Y, et al. Lidamycin shows highly potent cytotoxic to myeloma cells and inhibits tumor growth in mice [ J ]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30( 7 ): 1025-1032.
- [ 16 ] Shao RG, Zhen YS. Eneidiyne anticancer antibiotic lidamycin: Chemistry, biology and pharmacology [ J ]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8( 2 ): 123-131.
- [ 17 ] Broughton SE, Dhagat U, Hercus TR, et al. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: From ligand recognition to initiation of signaling [ J ]. *Immunol Rev*, 2012, 250( 1 ): 277-302.
- [ 18 ] Demoulin S, Roncarati P, Delvenne P, et al. Production of large numbers of plasmacytoid dendritic cells with functional activities from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells: Use of interleukin-3 [ J ]. *Exp Hematol*, 2012, 40( 4 ): 268-278.
- [ 19 ] 万楚成, 夏云金, 刘瑜, 等. 急性白血病患者血清白细胞介素-3/转化生长因子- $\beta$ 1 水平检测的临床意义 [ J ]. *白血病·淋巴瘤*, 2006, 15( 1 ): 42-43.
- [ 20 ] Hogge DE, Feuring-Buske M, Gerhard B, et al. The efficacy of diphtheria-growth factor fusion proteins is enhanced by co-administration of cytosine arabinoside in an immunodeficient mouse model of human acute myeloid leukemia [ J ]. *Leuk Res*, 2004, 28( 11 ): 1221-1226.

[ 收稿日期 ] 2013 - 03 - 26

[ 修回日期 ] 2013 - 05 - 25

[ 本文编辑 ] 黄静怡

## · 科技动态 ·

## 环鸟苷-腺苷酸合成酶作为识别细胞质 DNA 分子能促进 I 型干扰素通路的活化

DNA 出现在错误的位置,就意味着危险的信号。病原微生物的 DNA 侵入细胞质感染细胞,或者细胞核或线粒体中的 DNA 在细胞损伤的情况下进入细胞质中,都会引起机体的免疫反应、造成损伤,引起自身免疫病如系统性红斑狼疮的发生。然而机体对 DNA 的识别机制尚不明确。2013 年 2 月 *Science* 报道了美国德州大学西南医学研究中心陈志坚教授课题组的研究工作,阐述了环磷酸鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase, cGAS)相关的重要分子机制:cGAS 能识别细胞质中的 DNA,并触发一条全新的天然免疫信号系统,从而加强宿主的防御功能,增强炎症和自身免疫反应。

首先,作者发现,在细胞质中有 DNA 存在的情况下,新型的第二信使环磷酸鸟苷-腺苷(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP)的合成增加,并能够直接与接头蛋白 STING 作用,从而触发 I 型干扰素的产生。通过分离纯化和质谱分析,发现负责合成 cGAMP 的物质属于核苷酸转移酶家族,命名为 cGAS。以不同形式的 DNA 转染或以病毒 DNA 感染细胞时,cGAS 过表达能够通过 STING 依赖的方式活化转录因子 IRF3,并促进 IFN- $\beta$  的产生;干扰 RNA 靶向沉默 cGAS 后,可抑制 IRF3 的活化和 IFN- $\beta$  的产生。接着,作者证实 cGAS 是通过催化 cGAMP 合成从而发挥作用,并且 cGAS 能够直接与细胞质中的 DNA 结合。这就说明 cGAS 是一种新型的 DNA 识别分子,能够直接识别细胞质中的 DNA,并催化新型第二信使 cGAMP 的合成,通过 STING 依赖的方式活化 IRF3,促进 I 型干扰素的释放。

作者开创性地发现了新型 DNA 识别分子及其下游的第二信使和相关的完整固有免疫信号转导通路,为揭示细胞质 DNA 的识别打开了新局面,也为自身免疫病的研究提供了新线索。

[ 孟君 摘译,刘星光 审阅. Sun L, Wu J, Du F, et al. *Science*, 2013, 339( 6121 ):786-791. ]