

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00128

· 论 著 ·

## 可诱导共刺激分子-Ig 融合蛋白的理化性质和体内生物学活性分析

张 鹏<sup>1</sup>, 王振猛<sup>2</sup>, 秦 琴<sup>1</sup>, 王 健<sup>1</sup>, 沈 茜<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 对自行研制的可诱导共刺激分子-Ig 融合蛋白的理化性质和体内生物学活性进行分析鉴定。**方法** 采用 HCl 水解法、Edman 法、胰酶消化 MALDI-TOF-MS 质谱法分别测定该融合蛋白的氨基酸组成、N 末端 15 个氨基酸序列、肽谱等理化性质, 并通过 CFSE 标记体内检测淋巴细胞增殖反应实验研究其抑制同种淋巴细胞增殖的生物学活性。**结果** 氨基酸组成分析测得样品的氨基酸组成与 ICOS-Ig 理论值基本一致。蛋白 N 末端 15 个氨基酸序列为 EINGSANYEMFIFHN, 与 ICOS-Ig 理论值一致。MALDI-TOF-MS 质谱测定共获得 6 个与理论预测值相符的肽段。ICOS-Ig 可以明显抑制同种 T 细胞的体内增殖反应。**结论** 所研制的可诱导共刺激分子-Ig 融合蛋白结构表达正确且具有体内抑制同种淋巴细胞增殖的活性, 为该融合蛋白的质量标准研究奠定了基础。

**[关键词]** ICOS-Ig 融合蛋白; 氨基酸组成; 氨基酸序列; 肽谱; 淋巴细胞增殖

**[中图分类号]** R 392.111 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0128-04

### Physicochemical properties and biological activity of a recombinant inducible co-stimulator-Ig fusion protein

ZHANG Peng<sup>1</sup>, WANG Zhen-meng<sup>2</sup>, QIN Qin<sup>1</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, SHEN Qian<sup>1\*</sup>

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Anesthesiology, East Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the physicochemical properties and biological activity of self-prepared fusion protein inducible co-stimulator-Ig. **Methods** Acid hydrolysis, edman degradation and peptide mass finger printing were used to determine the amino acid composition, N-terminal 15 amino acid sequences, and peptide mapping. *In vivo* mixed lymphocyte reaction assay was used for identification of its biological activity. **Results** The result of amino acids composition analysis was consistent with the theoretical value of ICOS-Ig. N-terminal 15 amino acid sequences of the product were EINGSANYEMFIFHN, consistent with the theoretical value of ICOS-Ig. Peptide match assay identified six peptides of the product which could match the theoretic maps of ICOS-Ig. ICOS-Ig and CsA noticeably inhibited the proliferation of allo-reactive T cells *in vivo*. **Conclusion** The prepared ICOS-Ig fusion protein has a correct structure and can inhibit the proliferation of allogeneic T cells *in vivo*, which lays a foundation for quality control of ICOS-Ig fusion protein.

**[Key words]** ICOS-Ig fusion protein; amino acid composition; amino acid sequence; peptide mapping; lymphocyte proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):128-131]

共刺激分子在免疫反应中对 T 淋巴细胞活化起到至关重要的作用, 故目前出现多种针对共刺激分子及其配体的生物制剂, 并成功应用于多种免疫性疾病动物模型中。其中 CTLA4-Ig (通用名 Abatacept) 于 2005 年由美国 FDA 批准上市, 用于治疗中、重度活动性类风湿关节炎, 为以阻断 T 淋巴细胞共

刺激分子为治疗靶点的临床研究展示了良好的前景。

可诱导共刺激分子 (inducible costimulator, ICOS) 与 CTLA4 共属于 CD28 家族的共刺激分子, 局限于活化后的 T 细胞上, 与其配体 ICOSL 结合, 在 Th1、Th2 效应细胞发挥作用的过程中以及在

**[收稿日期]** 2009-03-16 **[接受日期]** 2010-01-05

**[基金项目]** 国家高技术研究发展计划 (“863”计划) (2002AA214091), 国家自然科学基金青年基金 (30500501), Supported by the Hi-tech R & D Program of China (“863” Program) (2002AA214091) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (30500501).

**[作者简介]** 张 鹏, 博士, 主治医师. E-mail: wang\_zhangpeng@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873612, E-mail: msminli@hotmail.com

T/B细胞协同作用、抗体产生和类型转换中,均发挥着至关重要的作用<sup>[1-3]</sup>。多种疾病的动物模型研究表明,以ICOS途径为靶点的免疫调节对自身免疫、移植免疫和肿瘤免疫均有着重要的临床治疗意义<sup>[4-6]</sup>。本研究成功构建了人ICOS胞外区与人IgG Fc融合蛋白真核表达系统,获得了ICOS-Ig融合蛋白,该蛋白为二聚体形式,可以与配体ICOSL特异性结合,并能抑制体外同种T淋巴细胞增殖<sup>[7]</sup>。

为了进一步验证ICOS-Ig融合蛋白的结构及功能,我们根据《中国生物制品规程》<sup>[8]</sup>的要求对该融合蛋白的氨基酸组成、N末端15个氨基酸、肽谱等理化性质进行测定,并通过CFSE标记体内检测淋巴细胞增殖反应实验进一步验证了其体内生物学活性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

ICOS-Ig融合蛋白由本实验室自行制备,并经SDS-PAGE法、蛋白质印迹法和流式细胞术证实为二聚体形式的Ig融合蛋白,可以与配体ICOSL特异性结合<sup>[7]</sup>。雄性BALB/c、C57BL/6和C3H小鼠,8~10周龄,购自中国科学院实验动物中心。CFSE购自Molecular Probes公司。CsA购自NOVARTIS公司。APC-anti-mouse CD3、PEcy5-anti-mouse CD4、PEcy5-anti-mouse CD8流式抗体均购自eBioscience公司。

### 1.2 蛋白质氨基酸组成分析

纯化的蛋白样品100  $\mu\text{g}$ , 6 mol/L HCl溶解, 110 $^{\circ}\text{C}$ 温箱放置18 h, 置入氨基酸自动分析仪进行氨基酸分析。

### 1.3 蛋白质N端测序

纯化后的蛋白经还原性12%SDS-PAGE后,湿法电转移至PVDF膜上,取PVDF膜置于0.5%考马斯亮蓝R-250/甲醇液中,室温染色5 min; 50%甲醇脱色,直至PVDF膜背景干净,蛋白条带清晰;切下PVDF膜上的ICOS-Ig蛋白带,在ABI 491型蛋白序列仪上测定N末端15个氨基酸序列。

### 1.4 蛋白质肽谱分析

将纯化的蛋白样品100  $\mu\text{g}$ , 用胰蛋白酶Trypsin酶解蛋白质后采用LCQ-DECA-XP plus液相质谱联用仪进行MALDI-TOF-MS肽质谱测试,主要参数如下:检测方式为正离子,进样方式为纳喷,毛细管温度为170 $^{\circ}\text{C}$ ,反相C<sub>8</sub>柱8 mm $\times$ 150 mm (RP-18),扫描范围为400 000~2 000 000。经过肽质谱分析和Peptident数据库搜索,得到其覆盖率。

## 1.5 CFSE标记体内检测淋巴细胞增殖反应<sup>[9]</sup>

以<sup>60</sup>Co照射(18 Gy)BALB/c小鼠,分别经尾静脉注射 $3\times 10^7$ 个以CFSE标记的C57BL/6小鼠T淋巴细胞,实验分组如下:(1)空白对照组,不进行处理;(2)对照IgG组,腹腔注射对照IgG 0.2 mg/d,连用3 d;(3)ICOS-Ig组,腹腔注射ICOS-Ig融合蛋白0.2 mg/d,连用3 d;(4)CsA组,腹腔注射CsA 0.2 mg/d,连用3 d。经照射的C57BL/6小鼠接受上述C57BL/6小鼠T淋巴细胞输注作为同基因对照组。3 d后处死受鼠,取脾细胞,以Tris-NH<sub>4</sub>Cl液裂解红细胞,分别用APC-CD3、PE-cy5-CD4或PE-cy5-CD8标记细胞,用CFSE<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>或CFSE<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>设门,流式细胞术检测CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞增殖情况。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS 12.0统计分析软件进行单因素方差分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ICOS-Ig融合蛋白的氨基酸组成分析

氨基酸组成分析结果显示测得纯化的蛋白样品氨基酸组成与ICOS-Ig理论值基本一致(表1)。

表1 ICOS-Ig融合蛋白的氨基酸组成分析  
Tab 1 Amino acid composition analysis of ICOS-Ig

Amino acids	Theoretical value	Content(%)	Amino acid amount
Asp	15	6.582	33
Asn	20		
Glu	19	5.589	28
Gln	17		
Thr	21	3.236	16
Ser	32	4.444	22
Pro	27	4.552	23
Gly	19	3.833	19
Ala	9	2.471	12
Cys	13	0.078	0
Val	28	5.323	26
Met	4	1.055	5
Ile	12	2.390	12
Leu	32	6.410	32
Tyr	16	2.498	12
Phe	16	3.156	16
Lys	30	5.347	27
His	12	2.426	12
Arg	6	1.461	7

### 2.2 ICOS-Ig融合蛋白的N端测序

纯化的蛋白样品N端15个氨基酸测得序列为:EINGSANYEM FIFHN,结果与ICOS-Ig理论值一致(图1)。

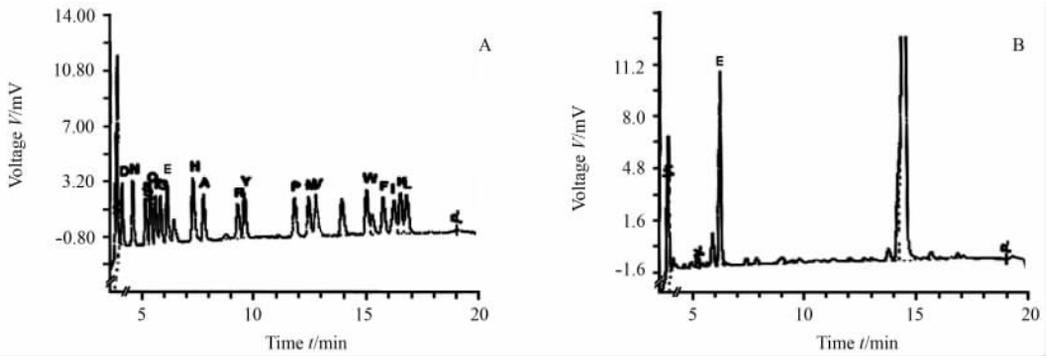


图 1 ICOS-Ig 融合蛋白 N 端测序

Fig 1 N-terminal sequencing of ICOS-Ig

A: Standard chromatogram of PTP-amino acids; B: Chromatogram of N-terminal first amino acid Glu (E) of ICOS-Ig

2.3 ICOS-Ig 融合蛋白的肽谱分析 采用胰蛋白酶法酶解 ICOS-Ig 融合蛋白后,经质谱测定,共获得 6 个肽段与理论预测肽段相符,如表 2 所示。该结果经瑞士生物信息研究所 EXPASY 分子生物服务

网站的 Peptident 数据库搜索显示,在相对分子质量为 50 000 左右的范围内未检索到与上述条件相符的已知蛋白,证明该融合蛋白为全新蛋白,且与预测的目的蛋白相符。

表 2 ICOS-Ig 融合蛋白的肽段覆盖率分析

Tab 2 Peptide match assay of ICOS-Ig

Peak No.	Sequence	MH+	Accession Sp.	Peptides(Hits) ions
T1	R. EPQVYTLPPSR. D	1 287. 45	178. 8	11/20
T2	R. EPQVYTLPPSRDELTK. N	1 874. 08	526. 9	17/30
T3	K. FNWYVDGVEVHNAK. T	1 678. 83	1 658. 1	20/26
T4	K. GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK. T	2 545. 66	879. 1	18/42
T5	R. VVSVLTVLHQDWLNGK. E	1 809. 10	1 107. 3	18/30
T6	K. VTLTGGYLHIYESQLCCQLK. E	2 384. 70	404. 1	12/38

2.4 ICOS-Ig 融合蛋白的生物学活性 流式细胞术检测结果(图 2)显示,同基因对照组的 CFSE 荧光强度无明显降低,说明无明显细胞增殖。ICOS-Ig 组和 CsA 组的 CFSE 荧光强度明显强于空白对照

组和对照 IgG 组( $P < 0.05$ ),表明所研制的 ICOS-Ig 融合蛋白可以在一定程度上抑制体内同种 T 淋巴细胞增殖反应。

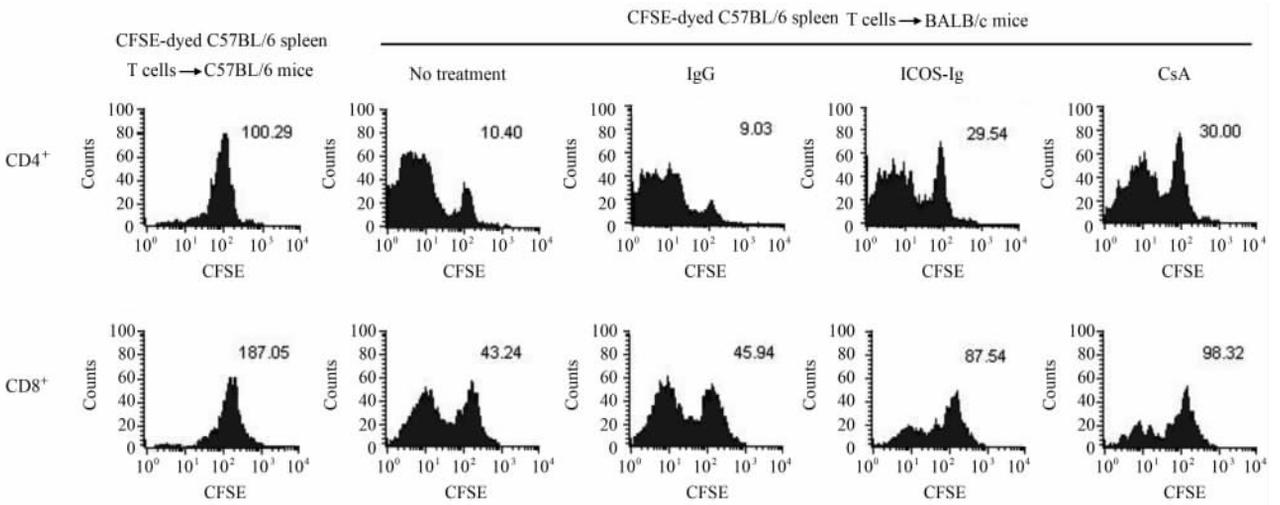


图 2 ICOS-Ig 抑制体内同种 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞增殖反应

Fig 2 ICOS-Ig inhibited allogeneic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation *in vivo*

### 3 讨论

对于任何一个新的功能性蛋白质,无论是天然存在的抑或是按照人们意愿设计研制的,除了要系统地深入研究其序列结构、生物学功能外,还要对其物化表征进行充分的揭示。基因工程产品的鉴定,美国FDA和我国的SFDA已经有了明确的要求,其内容涉及到诸如相对分子质量、氨基酸序列、肽谱等,这也是基因工程药物质量控制的重要依据<sup>[8]</sup>。

本实验室前期研究中采用基因工程的方法将ICOS胞外区与人IgG1的绞链区及CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>区结合,构建ICOS-Ig融合蛋白真核表达体系,并证明该蛋白为二硫键结合的二聚体形式,符合ICOS-Ig融合蛋白的表达形式。Western Blotting分析该样品可被抗人IgG1 Fc抗体特异性识别,证明该蛋白为Ig融合蛋白<sup>[7]</sup>。本研究进一步分析了该融合蛋白氨基酸组成、N端15个氨基酸序列、肽谱等理化性质,并利用新型活体染料CFSE标记技术研究了ICOS-Ig体内生物学活性。

盐酸水解法能较满意地得到除色氨酸和胱氨酸以外的其他所有氨基酸,是目前水解蛋白质或多肽应用最广泛的一种方法。氨基酸组成分析测得样品的氨基酸组成与理论值基本一致,提示样品可能为ICOS-Ig,确证有待进一步序列分析数据。由于一些羟基氨基酸(丝氨酸、苏氨酸)水解时有所破坏,同时各种肽键在酸水解时,有些肽键水解不完全或受到破坏,因此样品的氨基酸组成往往仅能与理论值基本一致,这是一种正常的现象<sup>[8]</sup>。

样品N端15个氨基酸序列为EINGSANYEMFIFHN,与ICOS-Ig理论值一致。N端15个氨基酸序列的测定,很大程度上排除了蛋白质混淆的可能,因为不大可能有两种不同的蛋白质在N端15个氨基酸序列是完全一样的<sup>[8]</sup>。样品酶解产物的肽质谱图谱与目标蛋白ICOS-Ig理论酶解产物的肽质谱图谱进行肽段覆盖率分析,测得6个匹配的肽段,确证样品为目标产物ICOS-Ig。

CFSE是一种新型活体标记染料,可以自由穿透细胞膜,并偶联到细胞蛋白质上,当细胞分裂时,CFSE标记物可平均地分配到2个子代细胞中,荧光强度减半<sup>[9]</sup>。本研究将CFSE预染供体BALB/c脾细胞输注给受体C57BL/6鼠,加入ICOS-Ig/对照IgG或免疫抑制剂CsA,3d后取受体鼠脾和淋巴组织,流式细胞术测定体内淋巴细胞增殖反应程度,结

果发现ICOS-Ig和CsA均能明显抑制同种T细胞的体内增殖反应。结果提示ICOS-Ig重组蛋白能在体内有效抑制同种混合淋巴细胞的增殖反应,有望在免疫性疾病的治疗中发挥作用。

综上所述,本研究进一步验证了所构建的ICOS-Ig融合蛋白的结构和活性,为进一步的实验研究和临床研究提供了安全性和有效性保证,同时为ICOS-Ig融合蛋白的质量标准研究奠定了基础,对进一步开展此类新药研究具有重要的指导意义。

### [参考文献]

- [1] Hutloff A, Dittrich A M, Beier K C, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28[J]. *Nature*, 1999, 397: 263-266.
- [2] Mahajan S, Cervera A, MacLeod M, Fillatreau S, Perona-Wright G, Meek S, et al. The role of ICOS in the development of CD4 T cell help and the reactivation of memory T cells[J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 1796-1808.
- [3] McAdam A J, Greenwald R J, Levin M A, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, et al. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching[J]. *Nature*, 2001, 409: 102-105.
- [4] Kashizuka H, Sho M, Nomi T, Ikeda N, Kuzumoto Y, Akashi S, et al. Role of the ICOS-B7h costimulatory pathway in the pathophysiology of chronic allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2005, 79: 1045-1050.
- [5] Ansari M J, Fiorina P, Dada S, Guleria I, Ueno T, Yuan X, et al. Role of ICOS pathway in autoimmune and alloimmune responses in NOD mice[J]. *Clin Immunol*, 2008, 126: 140-147.
- [6] Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M J, Lang S, Kirkwood J M, Whiteside T L. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression[J]. *J Immunol*, 2008, 180: 2967-2980.
- [7] 张鹏, 秦琴, 王振猛, 王健, 沈茜. 人ICOS-Ig融合蛋白的真核表达及生物学活性[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 753-756.  
Zhang P, Qin Q, Wang Z M, Wang J, Shen Q. Eukaryotic expression of human ICOS-Ig fusion protein and analysis of its biological activity[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 753-756.
- [8] 国家药品监督管理局. 中国生物制品规程[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 370-375.
- [9] Suchin E J, Langmuir P B, Palmer E, Sayegh M H, Wells A D, Turka L A. Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answers to an old question[J]. *J Immunol*, 2001, 166: 973-981.

[本文编辑] 孙岩