



(12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103073632 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 01

(21) 申请号 201110329289. 8

(22) 申请日 2011. 10. 26

(71) 申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

(72) 发明人 韩文玲 马大龙 张岩飞 付伟伟

王平章 刘绘绘 潘文 李婷

王文彦 石太平

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

代理人 郭广迅

(51) Int. Cl.

C07K 14/52 (2006. 01)

C07K 16/24 (2006. 01)

C12N 15/19 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 5/10 (2006. 01)

A61K 38/19 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 37/02 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 31/00 (2006. 01)

A61P 37/08 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页

序列表4页 附图12页

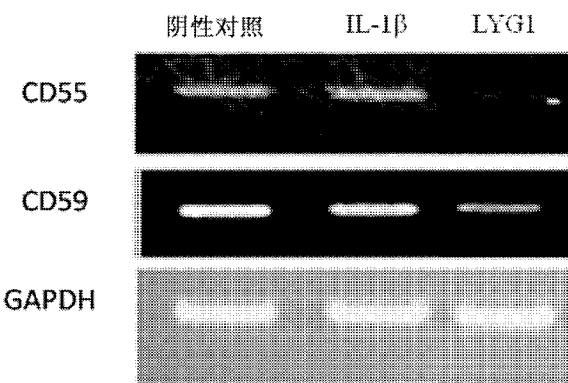
(54) 发明名称

具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子

LYG1 及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子 LYG1 及其应用, 所述 LYG1 (即成熟的和发挥功能的潜在新细胞因子 LYG1) 的序列为 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列, 所述应用为 LYG1 在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物及试剂盒中的应用, 所述治疗免疫相关疾病的药物为抗肿瘤药物、抗炎症药物、抗感染性疾病、治疗过敏性疾病和 / 或治疗自身免疫疾病的药物, 说明潜在新细胞因子 LYG1 在肿瘤、感染性疾病、炎症、过敏性疾病和自身免疫病方面可能发挥重要作用, 具有潜在的临床价值。



1. 一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的潜在新细胞因子 LYG1, 所述 LYG1 的序列为 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列, 优选地, 所述潜在新细胞因子 LYG1 为人类细胞因子 LYG1 或小鼠细胞因子 LYG1。

2. 一种抗权利要求 1 中的 LYG1 的抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的潜在新细胞因子 LYG1、或权利要求 2 所述的抗体、或编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物中的应用。

4. 根据权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 所述治疗免疫相关疾病的药物为抗肿瘤药物、抗炎药物、抗感染性疾病、治疗过敏性疾病和 / 或治疗自身免疫疾病的药物。

5. 根据权利要求 4 所述的应用, 其特征在于, 所述肿瘤为通过促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌和 / 或抑制补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 表达来抑制和 / 或治疗的肿瘤, 更为优选地, 所述肿瘤为黑色素瘤或对免疫治疗敏感的肿瘤;

或所述炎症、感染性疾病、过敏性疾病和自身免疫疾病为通过促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌来抑制和 / 或治疗的炎症、感染性疾病、过敏性疾病和自身免疫疾病, 更为优选地, 所述炎症为炎性肠病。

6. 根据权利要求 1 所述的潜在新细胞因子 LYG1、或权利要求 2 所述的抗体、或编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白在制备用于促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌和 / 或抑制补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 表达的药物中的应用。

7. 一种用于诊断免疫相关疾病的试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求 2 所述的抗体和 / 或用于在 PCR 中合成编码权利要求 1 所述的 LYG1 核苷酸序列的 DNA 链和 / 或其 cDNA 链的 PCR 引物, 所述抗体用于 LYG1 蛋白的定量检测、相关疾病中的检测和辅助诊断; 所述引物用于 LYG1 基因表达的定量检测。

8. 根据权利要求 7 所述的试剂盒在制备用于诊断免疫相关疾病的药物中的应用, 优选地, 所述免疫相关疾病为肿瘤、炎症、感染性疾病、过敏性疾病和 / 或自身免疫疾病, 更为优选地, 所述免疫相关疾病为炎症。

9. 一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物组合物, 所述药物组合物包括权利要求 1 所述的潜在新细胞因子 LYG1、或权利要求 2 所述的抗体、或编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白, 以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。

10. 根据权利要求 3 至 6 或 9 中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列为 SEQ ID NO :3 所示的核苷酸序列, 所述载体为 pcDNA3.1/myc-His(-)B, 所述宿主有机体为大肠杆菌、HEK293T、或 293-6E 细胞, 优选地, 所述大肠杆菌为 DH5 α 。

具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子 LYG1 及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的人类细胞因子及其应用,尤其涉及一种具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子 LYG1 在抗炎症、抗感染性疾病、抗肿瘤和自身免疫疾病等方面的应用。

背景技术

[0002] 人体免疫系统历经 30 亿年的进化,形成复杂而精细的调控系统,在机体具有至关重要的作用。它对外能够防御病原微生物的入侵,对内则能清除衰老、病变和死亡的细胞,维持内环境的稳定。免疫系统通过固有免疫应答和适应性免疫应答完成上述功能。作为免疫细胞之间的交流语言,细胞因子对固有免疫应答和适应性免疫应答均具有重要的调控作用。

[0003] 细胞因子是由机体各种细胞分泌的具有调控细胞生长分化、调节免疫功能和生理反应并参与病理反应的小分子蛋白质,通过与受体结合发挥作用。细胞因子主要包括白细胞介素 (Interleukin, IL)、集落刺激因子 (Colony-Stimulating Factor, CSF)、干扰素 (Interferon, IFN)、肿瘤坏死因子 (Tumor-Necrosis Factor, TNF) 等,是免疫细胞之间的交流语言,对固有免疫应答和适应性免疫应答均具有重要调控作用。

[0004] CD4⁺T 细胞在适应性免疫应答中发挥关键作用,它能够辅助 B 细胞产生抗体,辅助 CD8⁺T 细胞杀伤靶细胞。根据分泌的细胞因子和功能的不同,CD4⁺T 细胞可以分为 Th1, Th2, Th17 和 Treg 细胞,以及新发现的 Th9 和 Th22 细胞等。细胞因子在 Th 细胞的分化、活化和功能发挥中具有关键作用。首先,细胞因子能够决定初始 CD4⁺T 细胞的分化方向,如 IL-12、IL-4 分别是决定 Th1、Th2 分化所必需的细胞因子。其次,细胞因子对已分化的 Th 细胞具有调控作用,IL-12 与 IL-18 能够以 TCR 非依赖的方式协同促进 Th1 细胞分泌 IFN- γ 。此外,细胞因子还是 Th 细胞发挥作用的主要方式。Th1 和 Th2 细胞是两类非常重要的 CD4⁺T 细胞亚群,两者的平衡是免疫调节的重要方面。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、TNF- α 等,通过细胞免疫应答在抗病毒、抗胞内病原体感染、抗肿瘤、迟发型超敏反应中发挥重要功能,并参与类风湿性关节炎、糖尿病等自身免疫病的发生、发展;Th2 细胞主要分泌 IL-4、IL-5、IL-13 等,参与抗寄生虫感染和过敏反应,同时在异种移植物以及孕期胎儿的耐受方面起重要作用。深入研究 Th1、Th2 细胞的分化、生理和病理功能以及两者之间平衡的调控机制具有重要的理论意义和潜在的应用价值。

[0005] 目前,利用基因工程技术生产的重组细胞因子、重组可溶性受体、中和性抗体在治疗肿瘤、造血障碍、自身免疫性疾病等方面收到良好疗效,成为新一代药物。重组细胞因子作为药物具有很多优越之处,如:细胞因子为人体自身成分,可调节机体的生理过程和提高免疫功能,很低剂量即可发挥作用,因而疗效显著,已成为某些疑难病症不可缺少的治疗手段。目前已批准生产的细胞因子药物包括 IFN- α 、 β 、 γ , Epo, GM-CSF, G-CSF, IL-2 等。据不完全统计,目前国际上至少已有 26 个通过基因组药物进入临床研究,包括新的重组细胞

因子、重组可溶性受体和中和性抗体等。同时,细胞因子或者细胞表面受体检测也是判断机体免疫功能和免疫细胞分化的指标,在许多疾病的诊断、病程观察、疗效判断及细胞因子治疗监测等方面具有重要价值。例如,IFN- γ 及其重组蛋白已被用于治疗过敏性疾病、治疗诸如类风湿性关节炎和系统性硬皮病等自身免疫性疾病、治疗细菌真菌感染疾病、治疗病毒性感染疾病、抗寄生虫感染、抗纤维化作用和治疗肿瘤。

发明内容

[0006] 因此,本发明的目的是提供一种潜在新细胞因子 LYG1 及其在抗炎症、抗感染性疾病、抗肿瘤和自身免疫疾病等方面的应用。

[0007] 针对上述目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 一方面,本发明提供一种用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的潜在新细胞因子 LYG1 (即成熟的和发挥功能的 LYG1),所述 LYG1 的序列为 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列。

[0009] 优选地,所述潜在新细胞因子 LYG1 为人类细胞因子 LYG1 或小鼠细胞因子 LYG1。

[0010] 其中,所述 LYG1 的前体序列为 N 端未切除信号肽的氨基酸序列,所述信号肽的序列为 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。

[0011] 另一方面,本发明提供一种抗上述 LYG1 的抗体。

[0012] 再一方面,本发明提供上述所述的潜在新细胞因子 LYG1、或上述所述的抗体、或编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白在制备用于预防和 / 或治疗免疫相关疾病的药物中的应用。

[0013] 优选地,所述治疗免疫相关疾病的药物为抗肿瘤药物、抗炎症药物、抗感染性疾病、治疗过敏性疾病和 / 或治疗自身免疫疾病的药物。

[0014] 优选地,所述肿瘤为通过促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌和 / 或抑制补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 表达来抑制和 / 或治疗的肿瘤。

[0015] 更为优选地,所述肿瘤为黑色素瘤或对免疫治疗敏感的肿瘤。

[0016] 优选地,所述炎症、感染性疾病、过敏性疾病和自身免疫疾病为通过促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌来抑制和 / 或治疗的炎症、感染性疾病、过敏性疾病和自身免疫疾病。

[0017] 更为优选地,所述炎症为炎性肠病。

[0018] 又一方面,本发明提供上述所述的潜在新细胞因子 LYG1、或上述所述的抗体、或编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白在制备用于促进 Th1 细胞分化、促进细胞因子 IFN- γ 分泌和 / 或抑制补体调节蛋白 CD46、CD55 和 CD59 表达的药物中的应用。

[0019] 再一方面,本发明提供一种用于诊断免疫相关疾病的试剂盒,所述试剂盒包含上述所述的抗体和 / 或用于在 PCR 中合成编码上述所述的 LYG1 核苷酸序列的 DNA 链和 / 或其 cDNA 链的 PCR 引物,所述抗体用于 LYG1 蛋白的定量检测、相关疾病中的检测和辅助诊断;所述引物用于 LYG1 基因表达的定量检测。

[0020] 又一方面,本发明提供一种上述试剂盒在制备用于诊断免疫相关疾病的药物中的

应用。

[0021] 优选地,所述免疫相关疾病为肿瘤、炎症、感染性疾病、过敏性疾病和/或自身免疫疾病。

[0022] 更为优选地,所述免疫相关疾病为肿瘤或炎症。

[0023] 另一方面,本发明还一种用于预防和/或治疗免疫相关疾病的药物组合物,所述药物组合物包括上述所述的潜在新细胞因子 LYG1、或上述所述的抗体、或编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列、或含有编码上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体、或由含有编码权利要求上述所述的 LYG1 的核苷酸序列的载体导入或转染到宿主有机体产生的重组蛋白,以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。

[0024] 优选地,所述编码权利要求 1 所述的 LYG1 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:3 所示的核苷酸序列,所述载体为 pcDNA3.1/myc-His(-)B,所述宿主有机体为大肠杆菌、HEK293T 或 293-6E 细胞,更为优选地,所述大肠杆菌为 DH5 α 。

[0025] 本研究采用免疫基因组学策略,利用分泌验证、表达谱分析和系统性功能研究发现人类新基因 LYG1 编码一个经典的分泌蛋白。它在脂多糖 (LPS) 刺激的外周血单个核细胞 (PBMC, Peripheral blood mononuclear cell) 中、在 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞中和炎性肠病病人的炎性肠组织中表达下调,在 IL-1 β 刺激的 A549 细胞中表达上调,在 PMA 和 LPS 联合刺激的 THP1 细胞中表达显著上调,在单核细胞分化为树突状细胞后表达明显上调。重组 LYG1 蛋白能够下调前列腺癌细胞系 DU145 表面补体调节蛋白 CD55 和 CD59 在 mRNA 水平的表达,下调 CD46 和 CD59 在蛋白水平的表达。此外,重组 LYG1 蛋白还能够促进小鼠 Th1 细胞的体外和体内分化,在小鼠 DTH 模型中起保护性作用,促进 IFN- γ 的分泌,并能够抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞肿瘤模型中肿瘤的生长。而 Th1 细胞主要分泌 IFN- γ , 通过细胞免疫应答在抗病毒、抗胞内病原体感染、抗肿瘤、迟发型超敏反应中发挥重要功能,并参与类风湿性关节炎、糖尿病等自身免疫病的发生、发展。抑制补体调节蛋白的表达可以使补体系统发挥抗肿瘤作用。以上结果都提示,LYG1 是一个潜在的新细胞因子,在炎症、感染性疾病、肿瘤、过敏性疾病、自身免疫病方面可能发挥重要作用,具有潜在的临床应用价值。

附图说明

[0026] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0027] 图 1 为 BFA 抑制试验,检测 LYG1 的分泌途径的结果,图中 pcDB 为转染了空载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B(以下缩写为 pcDB)的阴性对照组,LYG1 为转染了 pcDNA3.1/LYG1-myc-His(-)B(以下缩写为 pcDB-LYG1-myc-his)的实验组,其中抗肌动蛋白(抗-actin)为内参;

[0028] 图 2 为纯化 LYG1 蛋白并进行 SDS-PAGE 鉴定及 N 端测序的结果,图 A 为 SDS-PAGE 检测 LYG1 蛋白纯度的试验结果,图中 1 为蛋白标记,2 为还原的 LYG1 蛋白,3 为非还原的 LYG1 蛋白;图 2B 为 N 端测序分析的试验结果,图 2B-1 为空白对照测序的结果;图 2B-2 为标准品的测序结果;图 2B-3 ~ 12 分别为第一个氨基酸残基至第 10 个氨基酸残基测序结果;

[0029] 图 3 为 LYG1 多克隆抗体的鉴定结果,用蛋白质印迹 (Western blot) 的方法检测 LYG1 多克隆抗体对超表达 pcDB 及 LYG1 的 293T 培养上清中蛋白的识别能力,图中,抗 LYG1 (anti-LYG1) 为 LYG1 蛋白免疫后的兔源血清 (含 LYG1 多克隆抗体),正常血清 (normal

serum) 为免疫之前的兔源血清、抗 myc (anti-myc) 为阳性对照抗体、抗兔 IgG (anti-rabbit IgG) 为直接孵育二抗检测细胞裂解液, 作为空白对照, pcDB 为转染了空载体 pcDB 的阴性对照组, LYG1 为转染了 pcDB-LYG1-myc-his 的实验组;

[0030] 图 4 为 LYG1 (小鼠为 Lyg1) 的表达谱分析试验结果, 图 4A 表示 LYG1 在人正常各组织中广谱表达, 图中 1 为脑, 2 为心脏, 3 为肾脏, 4 为肝脏, 5 为肺, 6 为胰腺, 7 为胎盘, 8 为骨骼肌, 9 为结肠, 10 为卵巢, 11 为前列腺, 12 为小肠, 13 为睾丸; 图 4B 表示 LYG1 在免疫系统中表达较高, 图中 1 为白细胞, 2 为骨髓, 3 为淋巴结, 4 为脾脏, 5 为胸腺, 6 为扁桃体, 7 为胎肝; 图 4C 表示 Lyg1 在小鼠正常组织中胸腺, 胃和大脑中较高水平表达, 图中 1 为胸腺, 2 为淋巴结, 3 为小肠, 4 为结肠, 5 为脑, 6 为肾脏, 7 为肺, 8 为脾脏, 9 为肝脏, 10 为心脏; 图 4D 表示 LYG1 在单核细胞分化为树突状细胞 (Dendritic cells, DC) 的过程中表达上调, 图中 1 为 PBMC, 2 为单核细胞, 3 为未成熟树突状细胞 (imDC), 4 为酵母多糖 (Zymosan) 刺激成熟的 DC 细胞 (mDC-zymosan) 5 为 LPS 刺激成熟的 DC 细胞 (mDC-LPS); 图 4E 表示 Lyg1 在小鼠静息及活化的 Th1, Th17 和 Treg 细胞中的表达; 图 4F 表示实时定量 PCR 检测 LYG1 在炎性肠病人肠组织中表达下调, 图 4G 表示实时定量 PCR 检测 TNF- α 表达水平, 作为阳性对照;

[0031] 图 5 为 LYG1 (小鼠为 Lyg1) 在构建的以下 4 种炎性因子刺激下炎症模型中的表达变化的试验结果, 图 A 为 LPS (10ng/mL) 刺激的 PBMC; B 为 IL-1 β 刺激的 A549 细胞; C 为 PMA 和 LPS 刺激的 THP1 细胞; D 为 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞, 从以上细胞中提取 mRNA, 并制备 cDNA 文库, 以 cDNA 文库为模板, 检测 LYG1 (小鼠为 Lyg1) 的 mRNA 水平的表达情况。其中 IL-6、IL-8、IL-1 β 分别为对应的阳性对照;

[0032] 图 6 为在前列腺癌细胞系 DU145 中加入重组人 LYG1 真核蛋白后用 RT-PCR 和流式检测细胞膜表面 CD46、CD55 及 CD59 的 mRNA 水平和蛋白水平的表达变化情况, 图 6A 表示 LYG1 下调 CD46 及 CD59 的 mRNA 表达水平, 其中 IL-1 β 为阳性对照, 图 6B 表示 LYG1 下调 CD46 及 CD59 的蛋白表达水平, 其中 CD59 表达变化情况选用 IFN- γ 作为阳性对照;

[0033] 图 7 为重组人 LYG1 真核蛋白在小鼠 Th1 细胞体外分化中的作用, 图 7A 为用流式的方法检测加入不同浓度重组人 LYG1 真核蛋白后 Th1 细胞 (IFN- γ 阳性比例来反应) 百分比结果; 图 7B 所示为用 ELISA 方法检测加入不同浓度重组人 LYG1 真核蛋白后 Th1 细胞 IFN- γ 的分泌情况。其中 IL-18 为阳性对照;

[0034] 图 8 为重组人 LYG1 真核蛋白在小鼠 DTH 模型中的作用, 其中, 图 8A 所示为 mBSA 激发后 24 小时小鼠足垫肿胀情况, 图 8B 为用 ELISA 的方法检测小鼠血清中 IFN- γ 的水平, 图 8C 和图 8D 为体外加入 mBSA 的小鼠 LN 细胞培养上清中 IFN- γ 和 IL-17A 的分泌情况 (图 8B、8C、8D 中横坐标代表小鼠编号, 例如 PBS-1 代表 PBS 组的第一只小鼠), 图 8E 为用流式的方法检测体外加入 mBSA 的小鼠脾细胞培养 72 后的细胞比例情况, 分别给出了 PBS 和 LYG1 组代表性的两只的结果, 图中分析了 Th1 (IFN- γ 阳性比例) 和 Th17 细胞 (IL-17A 阳性比例) 所占 CD4⁺ 细胞的比例;

[0035] 图 9 为重组人 LYG1 真核蛋白在小鼠黑色素瘤模型中的作用, 用游标卡尺量取肿瘤长径 (a) 和短径 (b), 图 9A 为肿瘤大体观; 图 9B 为肿瘤生长曲线 (接种肿瘤后每组每天肿瘤体积平均值变化曲线); 图 9C 为肿瘤重量 (每组肿瘤重量的平均值)。

具体实施方式

[0036] 在本发明中所使用的术语,除非有另外说明,一般具有本领域普通技术人员通常理解的含义。除非有另外注明,为了便于区别,在本说明书中(而非权利要求书中)用全部字母都大写的 LYG1 表示人类 LYG1,仅首字母大写的 Lyg1 表示小鼠 Lyg1,LYG1 蛋白均为重组人 LYG1 真核蛋白。

[0037] 下面结合具体的制备实施例和应用实施例,并参照数据进一步详细地描述本发明。这些实施例只是为了举例说明本发明,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0038] 以下实施例中的入肺腺癌细胞系 A549 细胞、人单核细胞型淋巴瘤细胞系 THP1 细胞、人前列腺癌细胞系 DU145 均购自 ATCC;小鼠均为 C57BL/6J 小鼠(购于北京大学医学部实验动物科学部)。

[0039] 实施例 1LYG1 基因的 cDNA 的克隆

[0040] 通过生物信息学分析,发现 UniGene :Hs. 164589,其对应基因为 LYG1(序列为 SEQ ID NO :3 :

[0041]

**ATAATTTATGAGATGTCATAAATCTCTCCAAAATAGGATGAGATGAACACTTTTAAACAAGAGAAC
AGGACTCTATATAAATCGCTGTGGGCTCACCACCTCTAAGGAGGAGCACTGACTGAAGACAGAAA
AATTGATGAACTGAAGAAGACATGGTCCATTATGCCTTACAACTTACACAGTGCTTTGGGAATT
CCAAAGTACTCAGTGGAGAGAGGTGTTTCAGGAGCCGTAGAGCCAGATCGTCA****TCATGTCTGCA**

TTGTGGCTGCTGCTGGGCCTCCTTGCCCTGATGGACTTGTCTGAAAGC AGCAACTGGGGATGCTATGG

AAACATCCAAAGCCTGGACACCCCTGGAGCATCTTGTGGGATTGGAAGACGTCACGGCCTGAACTACTGTGGAGTTC
GTGCTTCTGAAAGGCTGGCTGAAATAGACATGCCATACCTCCTGAAATATCAACCCATGATGCAAACCATTGGCCAA
AAGTACTGCATGGATCCTGCCGTGATCGCTGGTGTCTGTCCAGGAAGTCTCCCGGTGACAAAATTCTGGTCAACAT
GGGCGATAGGACTAGCATGGTGCAGGACCCTGGCTCTCAAGCTCCACATCCTGGATTAGTGAGTCTCAGGTTTCCC
AGACAACTGAAGTTCTGACTACTAGAATCAAAGAAAATCCAGAGGAGGTTTCCAACCTGGACCCCTGACCAGTACCTG
AGAGGTGGACTCTGTGCCTACAGTGGGGGTGCTGGCTATGTCCGAAGCAGCCAGGACCTGAGCTGTGACTTCTGCAA
TGATGTCCTTGACGAGCCAAGTACCTCAAGAGACATGGCTTCTAA **CATCTCAGA**

**TGAAACCCAAGACCATGATCACATATGCAGCCTCAAATGTTACACAGATAAACTAGCCAAGGGC
ACCTGTAACTGGGAATCTGAGTTTGACCTAAAAGTCATTAAAAATAACATGAATCACATTAAAGGA
AGAATTTTGACCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**,斜体部分为 LYG1 非编码序列,

加有边框的部分为编码前体 LYG1 的信号肽的核苷酸序列,其余为 LYG1 编码序列), Ref : NM_174898.2, GeneID :149999339,为一未知功能人类新基因,利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正无误,然后根据该序列设计 LYG1 基因全长阅读框架的特异引物,并在上游引物中加入 NotI 酶切位点 gcggccgc 和 kozak 序列 cacc,下游引物加入 KpnI 酶切位点序列 ggtacc 和补齐碱基 gc :

[0042] 上游引物 :gcggccgc cacc atgtctgcattgtggtgtgtgc (SEQ ID NO :4)

[0043] 下游引物 :ggtacc gc gaagccatgtctcttgagggtacttg (SEQ ID NO :5)

[0044] 用上述引物,以人正常脾组织 cDNA 文库 (Clontech :Cat. No. 636743)、人正常胎肝组织 cDNA 文库 (Clontech :Cat. No. 636748) 以及人正常粒细胞 cDNA 文库的混合模板进行

PCR 扩增反应,反应条件如下:

[0045] 反应体积 50 μ L,其中含有:

[0046]

人正常脾/胎肝组织/粒细胞 cDNA 混合模板	5 μ L (5ng)
上游引物、下游引物	终浓度各 0.2 μ M
dNTP	终浓度各 200 μ M
Taq DNA 聚合酶	2.5U
10 $\times$ Taq DNA 聚合酶缓冲液	5 μ L
用双蒸水补足	至 50 μ L 体积

[0047] PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C,变性 5 分钟;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,61–58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒,扩增 10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 秒,扩增 20 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 分钟。

[0048] 扩增产物为 3' 有碱基 A 的 3' 突出粘端片段,用 QIAquick 胶回收试剂盒 (Qiagen, 28706) 按产品说明书进行纯化,然后与 3' 有碱基 T 的线性 pGEM-T EASY 载体 (Promega, A1360) 在 16 $^{\circ}$ C 下连接 8 小时,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,转化物在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上生长,挑选克隆,提取质粒,使用 ABI PRISM 3700 DNA 分析仪 (Perkin-Elmer/Applied Biosystem) 测序。

[0049] 实施例 2 真核细胞表达质粒 pcDB-LYG1-myc-his 的构建

[0050] 为了检测 LYG1 的功能,首先构建含有 LYG1 开放阅读框的真核表达质粒: pcDNA3.1/LYG1-myc-His(-)B。用 Not I 和 Kpn I 酶切 pGEM-T-LYG1,同时用 Not I 和 Kpn I 酶切真核表达载体 pcDNA3.1/myc-His(-)B(以下缩写为 pcDB) (Invitrogen, V85520),将酶切后的 LYG1 的 cDNA 基因片段与载体在 16 $^{\circ}$ C 下连接 8 小时,转化大肠杆菌 DH5 α ,转化物在含氨苄青霉素的 LB 平板培养基上生长,挑选生长的菌落,提取质粒,PCR 鉴定,挑选阳性克隆,通过测序(使用 ABI PRISM 3700DNA 分析仪,同上),选出正确的插入序列的 LYG1 的 cDNA 基因质粒,命名为 pcDB-LYG1-myc-his(带有 c-myc 和 6XHis 标签)。

[0051] 实施例 3LYG1 是一个经典途径的分泌蛋白

[0052] 1. 细胞培养和转染

[0053] HEK293T 细胞(为日本的 Tadashi Matsuda 教授馈赠),本室传代培养,用含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基培养。HEK293T 细胞用 Vigofect(威格拉斯)阳离子转染试剂,根据说明书进行操作,转染质粒 pcDB-LYG1-myc-his 和 pcDB。转染 6 小时后用常温的 1 $\times$ PBS 洗涤细胞一次,更换新鲜的 HEKG 无血清培养基,分别在细胞培养上清液中加入 10 μ g/mL BFA(Brefeldin-A) 和乙醇(用作阴性对照)。

[0054] 2. 细胞培养上清及细胞总蛋白提取和蛋白质印迹 (Western blot) 分析

[0055] HEK293T 细胞培养上清液的收集:48 小时后,细胞融合率约达到 90%时,收集各实验组细胞及细胞培养上清液,于 4 $^{\circ}$ C,2000g 离心 10 分钟,弃沉淀,再于 4 $^{\circ}$ C,15000g 离心 15 分钟,去除细胞碎片,留取细胞培养上清液。

[0056] HEK293T 细胞总蛋白的提取:将留取上清液后的细胞置于冰上,用冰预冷的 1 $\times$ PBS 洗两遍,用冰预冷的 1 $\times$ PBS 吹下细胞,将细胞收集到 1.5mL 离心管中,于 4 $^{\circ}$ C,2000g 离心 5 分钟。去除上清,在沉淀中加入 RIPA 细胞裂解液 (20mM Tris-HCl, pH 7.4,150mM

NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 蛋白酶抑制剂 Cocktail), 冰上放置 30 分钟, 4℃, 15000g 离心 15 分钟, 上清液转入新管, 存于 -80℃ 备用。

[0057] 蛋白定量: 细胞提取的蛋白按照 BCATM 蛋白检测试剂盒 (BCATM Protein Assay Kit) (Pierce, 23227) 说明书提供的方法进行蛋白定量。

[0058] 蛋白质印迹: 每组细胞裂解液取总蛋白 30ug, 每组细胞培养上清液取 40 μL, 加入蛋白上样缓冲液 (北京宝赛生物技术有限公司), 于 99℃ 煮 10 分钟。12.5% PAGE 电泳, 100V 电转 1.5 小时, TBST 液平衡, 用 5% 牛奶室温封闭 1 小时, 加入相应的一抗, 4℃ 过夜, 用 TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 分钟; 然后加入相应的 IRDye™ 700/800 标记的二抗 (1 : 10000), 室温避光反应 1 小时; 再用 TBST 充分洗膜 3 次, 每次 10 分钟; 最后使用双色红外荧光扫描成像系统 (Odyssey Infrared Imager, 美国 LI-COR Bioscience 公司) 检测信号。

[0059] 如图 1 所示, 结果表明, 加入 BFA 后, LYG1 分泌明显减少, 证明 LYG1 为通过经典途径 (内质网高尔基体途径) 分泌的分泌蛋白。

[0060] 实施例 4 重组人 LYG1 真核蛋白的纯化及 N 端序列分析

[0061] 为了进行潜在新细胞因子 LYG1 的功能研究, 我们在 293-6E 细胞中表达与纯化了 LYG1 重组蛋白。293-6E 细胞购于加拿大国家研究委员会 (national research council of canada)。将 293-6E 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养 24 小时。使用 PEI 阳离子转染法转染 pcDB-LYG1-myc-his 真核表达质粒。

[0062] 转染 16 小时后用常温的 1×PBS 洗涤细胞一次, 更换新鲜的 HEKG 无血清培养基, 在 5% CO₂、37℃ 的培养箱中培养。48 小时后收集细胞培养上清液, 于 4℃, 2000g 离心 10 分钟, 去除培养上清液的细胞, 弃沉淀, 再于 4℃, 18000g 离心 20 分钟, 去除上清中的小颗粒物, 留取处理后的细胞培养上清用于后续纯化。

[0063] 用 Ni²⁺ 柱料纯化上述处理后的细胞培养上清液: 先将上清液经过 0.45 μm 滤器过滤后, 在上清液中加入咪唑 (10mM) / NaCl (200mM), 再与柱料结合, 流速控制在 10 滴每分钟, 再用平衡缓冲液【咪唑 (20mM) / NaCl (200mM) in 1×PBS (pH7.4)】冲洗柱料, 以洗去未结合的杂蛋白, 至分光值回至基线后, 用洗脱液【咪唑 (500mM) / NaCl (200mM) in 1×PBS (pH7.4)】洗脱结合蛋白直至分光值不再下降, 收集洗脱液于超滤管中, 用预冷的 1×PBS (pH7.4) 12mL, 4℃ 离心 2 次, 浓缩至 500 μL, 吸出蛋白, 于 4℃, 18000g 离心 20 分钟除菌, 分装保存于 -80℃ 待用。

[0064] 取 5 μL 蛋白用 BCA 方法对其进行蛋白定量, 取部分样品加入蛋白上样缓冲液, 于 100℃ 水浴煮 5 分钟, 进行 SDS-PAGE 以及蛋白质印迹检测, 鉴定 LYG1 蛋白纯化的纯度, 结果如图 2A 所示, 蛋白的纯度较高, 大于 90%, 内毒素残留小于 1EU/mg, 可能存在糖基化修饰, 而 ExPASy 数据库分析预测 LYG1 含有 0 糖基化修饰位点, 这与之相符。样品中未加 β-巯基乙醇为非还原的 LYG1 蛋白, 加入 β-巯基乙醇为还原的 LYG1 蛋白。SDS-PAGE 电泳检测的分子量是蛋白质的表观分子量, 并非真正的分子量大小。在还原条件下, 链内二硫键完全打开, 蛋白 SDS-PAGE 电泳时呈现长条状; 在非还原条件下, 蛋白由于链内二硫键的存在, 比还原条件下相对而言更接近于球形。所以, 非还原条件下, 蛋白表观分子量就更小一些。

[0065] 另外, 取部分样品进行 SDS-PAGE, 并将蛋白转移至 PVDF 膜上, 染色并脱色后, 用于蛋白质 N 端序列分析。结果如图 2B 所示, 检测了 N 端 10 个氨基酸, 分别为 S/A, N, W, G, /,

Y, G, N, I, Q, 说明前体 LYG1 的 N 端 19 个氨基酸为信号肽序列。其中每个图中都有一个较高的峰, 此为系统分泌的副产物 dptu, 为相对内参。所以通过我们实验验证, LYG1 成熟蛋白 (即发挥功能的蛋白, 即潜在新细胞因子 LYG1) 的氨基酸序列是切除了前体 LYG1N 端前 19 个氨基酸后的序列, 以下所有的实施例用到的重组人 LYG1 真核蛋白都符合这个要求。

[0066] 实施例 5LYG1 多克隆抗体的制备及鉴定

[0067] 抗体可用于检测、诊断及治疗疾病, 于是我们制备了 LYG1 的抗体。用纯化的 LYG1 蛋白免疫动物。选用成年雄性新西兰兔 (购买于北京大学医学部实验动物科学部), 初次免疫将 300 μ g 的抗原用 PBS 稀释至 1mL 后与等体积的弗氏完全佐剂充分混合, 于两足部各 0.25mL 皮下注射, 其余后背部皮下多点 (6 点) 注射。之后每 3 周加强免疫一次, 用量同前, 全部后背部皮下多点 (8 点) 注射。第三次加强免疫后 10 天取兔耳缘静脉血样检测效价, 至效价达 1 : 10⁵ 以上后, 将家兔处死心脏取血, 获取血清。进行初步的蛋白质印迹鉴定。如图 3 所示, 抗 LYG1 组 (anti-LYG1 组) (免疫后血清, 1 : 1000 稀释, 实验组), 抗 myc 组 (anti-myc) (阳性对照), 免疫前的对照血清 (normal serum, 1 : 1000 稀释), 抗兔 IgG (anti-rabbit IgG) (二抗对照), 抗 LYG1 的多克隆抗体 (anti-LYG1) 能够特异识别细胞培养上清液中的 LYG1 蛋白和纯化的 LYG1 重组蛋白, 可用于 LYG1 相关疾病的检测和诊断。蛋白有两条带, 均为特异性, 提示 LYG1 蛋白可能存在修饰。

[0068] 实施例 6LYG1 在组织和细胞中的表达谱分析 (RNA 提取、RT-PCR 和 Real-time PCR)

[0069] 为了分析 LYG1 在正常组织中、免疫细胞不同分化阶段及不同细胞炎症模型中的表达变化, 我们使用购买的 Clontech 公司的人正常组织 cDNA 文库, 实验室制备的小鼠正常组织 cDNA 文库和人及小鼠的细胞文库, 采用巢式 PCR 对 LYG1 进行扩增。细胞文库包括制备如下: 收集不同分化阶段的 DC 细胞、小鼠静息及活化的 Th 细胞、未刺激及炎症因子 LPS (100ng/mL) 刺激 6h 的 PBMC (浓缩白细胞由北京市红十字血液中心提供, 采用淋巴细胞分层液 (购自上海华精生物科技有限公司) 密度梯度离心法得到)、未刺激及炎症因子佛波酯 (PMA, Phorbol-12-myristate-13-acetate) (10ng/mL, 24 小时) 后用 LPS (100ng/mL) 刺激 3h、6h、12h 的 THP1、未刺激及炎症因子 IL-1 β (10ng/mL) 刺激 3h、6h、15h、24h 的 A549 细胞、未刺激及炎症因子 LPS 刺激 2h、4h、6h 的小鼠巨噬细胞 (每只小鼠腹腔注射 3% 硫代乙醇酸钠 2mL, 48 小时后断颈处死固定, 向腹腔内注射 5mL PBS, 轻柔腹腔后打开腹腔回收 PBS, 2000rpm, 4 $^{\circ}$ C 离心获取腹腔巨噬细胞), 使用 TRIzol 提取总 RNA。每个样品取 2 μ g, 用反转录试剂盒【Reverse transcriptTM kit (Invitrogen)】逆转录合成单链 cDNA 文库。扩增 GAPDH 作为内参。实时定量 PCR 采用 SYBR Green 方法和荧光定量 PCR 仪 (LightCycler 仪器, ABI7500) 进行。

[0070] 人 LYG1 的扩增: 使用外侧上游引物 5' -tttcaggagccgtagagcc (SEQ ID NO:6), 外侧下游引物 5' -tgatcatggtcttgggttt (SEQ ID NO:7), 内侧上游引物 5' -gcggccgc cacc atgtctgcattgtggctgctgc (SEQ ID NO:8), 内侧下游引物 5' -ggtagc gaagccatgtctcttgaggtacttg (SEQ ID NO:9) 进行巢式扩增。一扩条件为: 94 $^{\circ}$ C (5 分钟) $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C (30 秒), 56 $^{\circ}$ C (30 秒), 72 $^{\circ}$ C (30 秒), 扩增 30 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C (7 分钟)。一扩产物稀释 50 倍作为二扩模板, 94 $^{\circ}$ C (5 分钟) $\rightarrow$ 94 $^{\circ}$ C (30 秒), 58 $^{\circ}$ C (30 秒), 72 $^{\circ}$ C (30 秒), 扩增 30 个循环 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C (7 分钟)。

[0071] 小鼠 Lyg1 的扩增: 使用外侧上游引物: 5' -agagtctccaggaggcaactatg

tg(SEQ ID NO:10), 外侧下游引物 5'-ccatgggtccttgaagtatttggtct(SEQ ID NO:11); 内侧上游引物 5'-aacattggcagtggtgacttggga(SEQ ID NO:12), 内侧下游引物 5'-gcgcaaggacgtcattgcag(SEQ ID NO:13) 进行巢式扩增, 扩增 GAPDH 作为内参。扩增条件为一扩: 94℃ (5 分钟) → 94℃ (30 秒), 56℃ (30 秒), 72℃ (30 秒), 扩增 30 个循环 → 72℃ (7 分钟)。一扩产物稀释 50 倍作为二扩模板, 94℃ (5 分钟) → 94℃ (30 秒), 58℃ (30 秒), 72℃ (30 秒), 扩增 30 个循环 → 72℃ (7 分钟)。

[0072] 结果表明, 如图 4A 所示, LYG1 在多种组织中具有低水平表达, 如肾脏, 肝脏、肺脏、胰腺, 胎盘, 骨骼肌, 结肠、卵巢、前列腺、小肠和睾丸; 如图 4B 所示, 在免疫系统中表达稍高, 尤其是骨髓, 胸腺和扁桃体。此外, 我们制备了小鼠正常组织 cDNA 文库, 与人正常组织表达谱一致, Lyg1 在胸腺中表达稍高, 且在胃和大脑中也有较高水平表达, 在结肠, 肾脏和肺中低水平表达 (如图 4C 所示)。我们还检测了在单核细胞分化为 DC 细胞过程中 LYG1 的表达情况: LYG1 在 PBMC 和单核细胞中表达较低, 在 imDC 中表达稍高, 而在酵母多糖和 LPS 刺激成熟 DC 中 LYG1 表达上调 (如图 4D 所示)。酵母多糖和 LPS 分别介导了 DC 对初始 T 细胞 (Naive T 细胞) 向 Th17 和 Th1 细胞方向分化, 而 LYG1 作为一个分泌蛋白, 其在酵母多糖和 LPS 刺激的 DC 中表达上调, 提示 LYG1 有可能参与微环境中 Th 细胞的分化。此外, 我们还检测了 Lyg1 在小鼠不同 Th 细胞亚群中的表达情况, 发现 Lyg1 在 Th17 和 Treg 细胞中表达较高, 在 Th1 细胞中表达较低 (如图 4E 所示)。此外, 我们还检测了 LYG1 在炎性肠病 (IBD) 病人炎性肠组织和正常人肠组织中的表达情况。发现在病人炎性肠组织中, LYG1 的表达下调 (如图 4F、4G 所示), 提示 LYG1 与炎性肠病的发生发展具有密切关系。此外, 我们还检测了 LPS 刺激的 PBMC (图 5A)、IL-1 β 刺激的 A549 细胞 (图 5B)、PMA 和 LPS 刺激的 THP1 细胞 (图 5C) LYG1 的表达情况以及 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞 (图 5D) Lyg1 的表达情况。如图所示, LYG1 在 LPS 刺激的 PBMC 中表达下调, 而在 IL-1 β 刺激的 A549 细胞中表达上调, 在 PMA 及 LPS 共同刺激的 THP1 细胞中, LYG1 的表达明显上调。在 LPS 刺激的小鼠巨噬细胞中 Lyg1 的表达下调。这些结果提示 LYG1 可能参与炎症的发生和发展。炎性肠病人组织及多种炎症模型表达谱都提示 LYG1 具有抗炎的作用, 其重组蛋白或抗体具有治疗炎症的功能。

[0073] 实施例 7LYG1 对补体调节蛋白分子的影响

[0074] 补体调节蛋白 (CRP) 的高表达能抑制补体系统对肿瘤细胞的攻击, 使肿瘤逃避机体免疫防御。细胞因子能够通过调节补体调节蛋白从而在肿瘤的免疫治疗中发挥重要功能。如在对肾癌的研究中发现 IL-1 能下调 CD46、CD59 的表达, IL-4 能持续下调 CD46、CD55 及转化生长因子, 增加 C3 在肿瘤细胞上的沉积, 在针对抗肿瘤相关抗原使用抗体的同时联合运用细胞因子将成为一种新的有效的免疫治疗方法。于是, 我们观察了 LYG1 对肿瘤细胞系表面 CRP 表达的影响。在 DU145 培养体系中加入重组 LYG1 蛋白, 收取 48h 的细胞做 RT-PCR 试验, 72h 细胞做荧光染色。结果表明, 与未加 LYG1 蛋白对照组相比, LYG1 能够下调 CD55 和 CD59 在 mRNA 水平的表达 (图 6A), 下调 CD46 和 CD59 在蛋白水平的表达 (图 6B), 而 mRNA 水平 CD46 无变化, 蛋白水平 CD55 无变化, 推测其与收取细胞的时间点有关系。实验表明 LYG1 能够通过下调 CRP 的表达来阻止免疫逃逸, 使得补体系统能够发挥抗肿瘤效应, 从而抑制肿瘤的发生发展, 也进一步表明 LYG1 蛋白具有活性。

[0075] 实施例 8LYG1 能够促进小鼠 Th1 细胞的体外分化

[0076] 1. 分离小鼠 CD4⁺T 细胞及小鼠 Th 细胞的体外诱导分化

[0077] 1.1 小鼠 CD4⁺T 细胞的分离及培养

[0078] 取 6~8 周雌性 C57BL/6J 小鼠,颈椎脱臼处死,75%乙醇浸泡 1 分钟,取出小鼠置于无菌皿上,在小鼠腹中部剪开小口,撕开皮肤,眼科剪分离结缔组织,取两侧腹股沟淋巴结;之后进入腹腔取肠系膜淋巴结及两侧腹主动脉旁淋巴结,放入 200 目筛网上置于盛有 1640 培养液的培养皿中用研杵轻轻研压淋巴结,获细胞悬液,根据小鼠 CD4⁺T 细胞阴性分选试剂盒 (Invitrogen DYNAL) 说明书,获得小鼠 CD4⁺T 细胞。具体为:用缓冲液 1 重悬 LN 细胞,加入胎牛血清 (FBS) 和抗体混合物 (抗小鼠 B220 (anti-mouse B220), CD11b, Ter-119, CD16/32 和 CD8), 4℃ 孵育 20 分钟,用缓冲液 1 洗一遍,加入洗过的磁珠,室温孵育 15 分钟,磁力架静置 2min,即可获得 CD4⁺T 细胞。取部分 CD4⁺T 细胞,加入抗小鼠 CD4-PerCP 抗体 (anti-mouse CD4-PerCP 抗体),避光 4 度孵育 20min, PBS 洗一次,200 μL 重悬,用流式的方法检测分选的 CD4⁺T 细胞的纯度。将 CD4⁺T 细胞用含 10% 热灭活血清的 RPMI 1640 培养基重悬,浓度为 2×10⁶/mL,铺至 48 孔板,每孔 500 μL。

[0079] 1.2 小鼠 Th 细胞和 iTreg 细胞的体外诱导分化

[0080] 根据 1.1 所述的步骤磁珠分选得到小鼠 CD4⁺T 细胞,培养于抗小鼠 CD3 (anti-mouse CD3) (10 μg/mL) 预包被的 48 孔板中,加入抗小鼠 CD28 (anti-mouse CD28) (2 μg/mL) 和 rhIL-2 (4ng/mL), 并加入外源性 LYG1 重组蛋白 (0, 0.1, 1, 10ng/ml) 和抗体,诱导小鼠 Th1、Th17 和 iTreg 细胞的分化。Th1 细胞的诱导条件为:IL-12, 10ng/mL; 抗 mIL-4 (anti-mIL-4), 10 μg/mL。Th17 细胞的诱导条件为:TGF-β, 5ng/mL; IL-6, 10ng/mL; anti-mIL-4, 10 μg/mL; 抗 mIFN-γ (anti-mIFN-γ), 10 μg/mL。第四天换液,在只有 IL-2 (4ng/mL) 条件下培养两天即可获得小鼠 Th1 和 Th17 细胞。iTreg 的诱导条件为:IL-2, 4ng/mL; TGF-β, 5ng/mL; 体外诱导三天即可。

[0081] 2. 免疫荧光染色

[0082] 2.1 细胞膜分子检测

[0083] 收获不同类型的免疫细胞,用 PBS/0.1% BSA 洗涤两次,直接加入 100 μL 封闭液 (PBS/10% 正常羊血清) 重悬细胞,4℃ 封闭 30 分钟;随后加入标记的抗体,4℃ 避光孵育 40min;使用相应 IgG 作为同型对照。最后用 PBS/0.1% BSA 洗涤两次后,通过流式细胞仪收集细胞,使用 Cellquest 软件 (BD 公司) 对结果进行分析。

[0084] 2.2 细胞内分子检测

[0085] 收获不同类型的免疫细胞,用冷的 PBS/0.1% BSA 洗涤两次,首先用 4% 多聚甲醛冰上固定 30min;然后用 0.1% Triton X-100 室温孵育 30min,1500rpm 离心 5min。再加入 100 μL 封闭液 (PBS/10% 正常羊血清) 重悬细胞,室温封闭 30 分钟。随后加入标记抗体,4℃ 避光孵育 40min;使用相应 IgG 作为同型对照。最后用 PBS/0.1% BSA 洗涤两次后,通过流式细胞仪收集细胞,使用 Cellquest 软件对结果进行分析。

[0086] 3. ELISA

[0087] 细胞培养相应时间后收获上清,于 4℃,2000g 离心 10 分钟,弃沉淀,再于 4℃,15000g 离心 15 分钟,去除上清中细胞和碎片。使用 IFN-γ、IL-4、IL-17A 细胞因子 ELISA 试剂盒 (eBioscience) 夹心法检测细胞因子的分泌量。

[0088] 如图 7A-B 所示,重组人 LYG1 真核蛋白在小鼠体系是有活性的,它能够促进小鼠

Th1 细胞的体外分化 (IFN- γ 阳性百分比提高) 和 IFN- γ 的分泌,LYG1-1ng/mL 与不加 LYG1 组有显著差异 ($p = 0.0002$)。

[0089] 由于 Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、IL-2、LT α 等,通过细胞免疫应答在抗病毒、抗胞内病原体感染、抗肿瘤、迟发型超敏反应中发挥重要作用,因此 LYG1 重组蛋白及抗体能够通过促进 Th1 细胞分化和 IFN- γ 分泌从而在抗病毒、抗胞内病原体感染、抗肿瘤方面有重要应用价值。

[0090] 实施例 9LYG1 的体内功能研究

[0091] 1. LYG1 能够抑制小鼠迟发型超敏反应 (DTH)

[0092] 为了研究 LYG1 在体内对 Th 细胞分化及存活的影响,我们用 mBSA 诱导了小鼠 DTH 模型,选取 8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,第 0 天给每只小鼠腹部皮内两点注射 125 μ g (50 μ L) CFA 充分乳化的 mBSA,每日腹腔注射 100ng LYG1 蛋白。第七天每只小鼠左足垫皮下注射 150 μ g mBSA/PBS 溶液 (30 μ L) 进行激发,右足垫皮下注射等体积的 PBS 做为阴性对照。激发前和激发 24 小时后均使用游标卡尺测量小鼠足垫厚度。衡量 DTH 反应强度的足垫厚度变化计算公式是:足垫肿胀程度 (mm) = (mBSA 激发的足垫厚度 - 激发前足垫厚度) - (PBS 注射的足垫厚度 - 激发前足垫厚度) (① Takayuki Yoshimoto, et al. Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction Blood. 2000 ;2869-74; ② Akina Ishii, Keisuke Obok, et al. Development of IL-17-mediated Delayed-Type Hypersensitivity is not affected by down-regulation of IL-25 expression. Allergol Int. 2010 ; 399-408)。然后眼球取血,4℃过夜,3000rpm 离心,取血清至新 Ep 管,12000rpm 离心 10min 去除碎片,所得血清即可用于 IFN- γ 的 ELISA 检测。取脾、腹股沟淋巴结和肠系膜淋巴结,研磨获得脾细胞和淋巴结细胞 (LN 细胞),重悬成 5×10^6 /mL 培养于 24 孔板,在 10 μ g/mL mBSA 或 3 μ g/mL 4℃预包被过夜的 CD3 抗体刺激下分别培养 5 天和 3 天,分别获取细胞进行流式检测和培养上清进行 ELISA 检测。

[0093] 结果发现,如图 8 所示,LYG1 蛋白能够抑制小鼠足垫肿胀程度 (图 8A),血清中 IFN- γ 的浓度明显高于 PBS 对照组 (图 8B)。在体外刺激的淋巴结细胞培养上清中,IFN- γ (图 8D) 和 IL-17A (图 8C) 的浓度均显著高于 PBS 对照组,但 IFN- γ 倍数更高。流式的结果 (图 8E) 也显示,LYG1 组 Th1 (IFN- γ 阳性比例) 和 Th17 (IL-17A 阳性比例) 细胞在 CD4⁺ 细胞中的比例都高于 PBS 组,但 Th1 细胞得比例有更为显著的差异。有研究结果报道,在 mBSA 诱导的 DTH 模型中,主要参与的 CD4⁺ 细胞为 Th1 和 Th17 细胞,而分泌 IFN- γ 的 Th1 细胞在 DTH 发病中具有保护作用,分泌 IL-17A 的 Th17 细胞则能加重 DTH 的发展。DTH 模型的诱导分为两个阶段,前 7 天为抗原特异性 Th 细胞的分化阶段,激发后为抗原特异性 Th 细胞的效应阶段。在本实验中,免疫阶段的每天都腹腔注射 LYG1 蛋白,而激发后不注射蛋白,血清中 IFN- γ 浓度 LYG1 组显著高于对照组,同样体外刺激的 LN 细胞的培养上清中 LYG1 组 IFN- γ 的含量明显高于对照组,体外抗原刺激的脾细胞中 LYG1 组 Th1 细胞比例明显提高,提示 LYG1 有可能通过促进抗原特异性 Th1 细胞的分化和 IFN- γ 的分泌而对迟发型超敏反应 DTH 模型发挥了保护作用。这与体外的研究结果是一致的,并证明 LYG1 能够治疗 Th1 细胞 (IFN- γ) 介导的过敏反应。

[0094] 2. LYG1 能够抑制 B16 肿瘤的体内生长

[0095] 前期结果提示 LYG1 能够促进 Th1 细胞的分化和 IFN- γ 的分泌,并能够下调肿瘤

细胞表面补体调节蛋白的表达,提示 LYG1 可能参与抗肿瘤免疫反应。小鼠 B16 肿瘤模型具有低免疫原性,对免疫治疗敏感,且不易转移的特点,是研究通过免疫相关分子尤其细胞因子治疗肿瘤的经典动物模型。于是我们利用此模型研究了 LYG1 在抗肿瘤方面的作用。

[0096] 选取 8-10 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠,腋下皮下注射 B16 细胞 (2×10^5 个细胞 / $100 \mu\text{L}$ PBS/ 鼠),第五天给小鼠脱毛,观察肿瘤生长情况。根据肿瘤生长情况,将小鼠分组,每组至少 5 只。每组小鼠腹腔注射 LYG1 蛋白 ($20 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}/\text{天}/\text{鼠}$),对照组腹腔注射 PBS ($200 \mu\text{L}/\text{天}/\text{鼠}$),共连续注射 5 天。用游标卡尺量取肿瘤长径 (a) 和短径 (b),肿瘤的体积算法为 $V = 1/2ab^2$ 。结果如图 9 所示,与 PBS 组相比,注射蛋白组肿瘤体积明显减小 (图 9A),肿瘤生长缓慢 (图 9B),肿瘤重量明显降低 (图 9C)。以上结果证明重组 LYG1 蛋白能够明显抑制 B 16 肿瘤的生长。

[0097] 3. 统计学分析

[0098] 以上数据的标准差代表一次实验中不同复孔间的差异,以上实验均至少重复两次以上,以其中一次的数据作为代表;Student's T 检验分析各组之间是否存在显著性差异, $p < 0.05$ 认为具有统计学差异。

[0001]

序 列 表

<110> 北京大学
<120> 具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子LYG1及其应用
<130> DIC11110116E
<160> 13
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 175
<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> SEQ ID NO:1

<400> 1
Ser Asn Trp Gly Cys Tyr Gly Asn Ile Gln Ser Leu Asp Thr Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Cys Gly Ile Gly Arg Arg His Gly Leu Asn Tyr Cys Gly Val
20 25 30

Arg Ala Ser Glu Arg Leu Ala Glu Ile Asp Met Pro Tyr Leu Leu Lys
35 40 45

Tyr Gln Pro Met Met Gln Thr Ile Gly Gln Lys Tyr Cys Met Asp Pro
50 55 60

Ala Val Ile Ala Gly Val Leu Ser Arg Lys Ser Pro Gly Asp Lys Ile
65 70 75 80

Leu Val Asn Met Gly Asp Arg Thr Ser Met Val Gln Asp Pro Gly Ser
85 90 95

Gln Ala Pro Thr Ser Trp Ile Ser Glu Ser Gln Val Ser Gln Thr Thr
100 105 110

Glu Val Leu Thr Thr Arg Ile Lys Glu Ile Gln Arg Arg Phe Pro Thr
115 120 125

Trp Thr Pro Asp Gln Tyr Leu Arg Gly Gly Leu Cys Ala Tyr Ser Gly
130 135 140

Gly Ala Gly Tyr Val Arg Ser Ser Gln Asp Leu Ser Cys Asp Phe Cys
145 150 155 160

Asn Asp Val Leu Ala Arg Ala Lys Tyr Leu Lys Arg His Gly Phe
165 170 175

<210> 2
<211> 19

[0002]

<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> SEQ ID NO:2

<400> 2

Met Ser Ala Leu Trp Leu Leu Leu Gly Leu Leu Ala Leu Met Asp Leu
1 5 10 15

Ser Glu Ser

<210> 3
<211> 1015
<212> DNA
<213> 人

<220>
<223> SEQ ID NO:3

<400> 3

ataatttatg agatgtcata aatctctcca aaataggatg agatgaacac ttttaacaag 60
agaacaggac tctatataaa tcgctgtggg ctaccacact ctaaggagga gcaactgactg 120
aagacagaaa aattgatgaa ctgaagaaga catggtccat tatgccttac aaacttacac 180
agtgtcttgg gaattccaaa gtactcagtg gagagaggtg ttccaggagc cgtagagcca 240
gategtcatc atgtctgcat tgtggctgct gctgggcctc ctgcccctga tggacttgtc 300
tgaaagcagc aactggggat gctatggaaa catccaaagc ctggacaccc ctggagcatc 360
ttgtgggatt ggaagacgtc acggcctgaa ctactgtgga gtctgtgctt ctgaaaggct 420
ggctgaaata gacatgcat accctctgaa atatcaaccc atgatgcaaa ccattggcca 480
aaagtactgc atggatcctg ccgtgatcgc tgggtgtctt tccaggaagt ctcccgtga 540
caaaattctg gtcaacatgg gcgataggac tagcatgggtg caggaccctg gctctcaagc 600
tcccacatcc tggattagtg agtctcaggt ttcccagaca actgaagtgc tgactactag 660
aatcaaagaa atccagagga ggtttccaac ctggaccctc gaccagtacc tgagaggtgg 720
actctgtgcc tacagtgggg gtgctggcta tgtccgaagc agccaggacc tgagctgtga 780
cttctgcaat gatgtccttg cagagccaa gtacctcaag agacatggct tctaacatct 840
cagatgaaac ccaagacat gatcacatat gcagcctcaa atgttacaca gataaaacta 900
gccaagggca cctgtaactg ggaatctgag ttgacctaa aagtcattaa aataacatga 960
atcacattaa aggaagaatt ttgacctgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1015

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> SEQ ID NO:4

[0003]

<400> 4 gcggccgccca ccatgtctgc atttggtgctg ctgc	34
<210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> SEQ ID NO:5	
<400> 5 ggtaccgcga agccatgtct cttgaggtac ttg	33
<210> 6 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> SEQ ID NO:6	
<400> 6 tttcaggagc cgtagagcc	19
<210> 7 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> SEQ ID NO:7	
<400> 7 tgatcatggt cttgggttt	19
<210> 8 <211> 34 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> SEQ ID NO:8	
<400> 8 gcggccgccca ccatgtctgc atttggtgctg ctgc	34
<210> 9 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> SEQ ID NO:9	
<400> 9 ggtaccgcga agccatgtct cttgaggtac ttg	33
<210> 10 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	

[0004]

<220>		
<223>	SEQ ID NO:10	
<400>	10	
	agagtctcca ggaggcaact atgtg	25
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ ID NO:11	
<400>	11	
	ccatggtcct tgaagtattt ggct	24
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ ID NO:12	
<400>	12	
	aacattggca gtggacttgg ga	22
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SEQ ID NO:13	
<400>	13	
	gcgcaaggac gtcattgcag	20

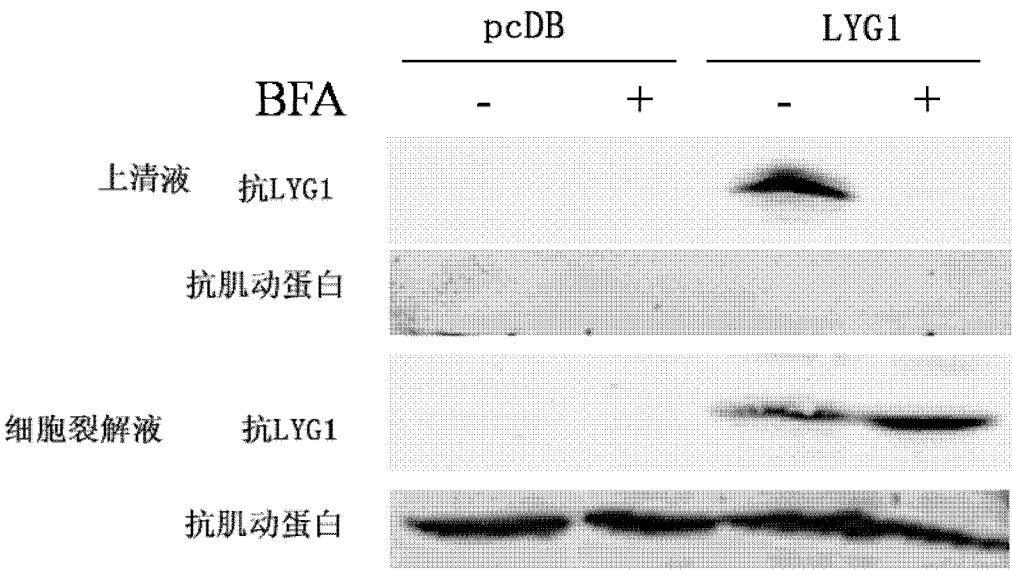


图 1

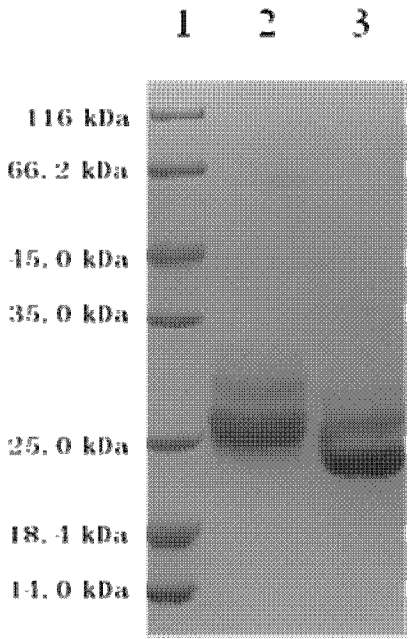


图 2A

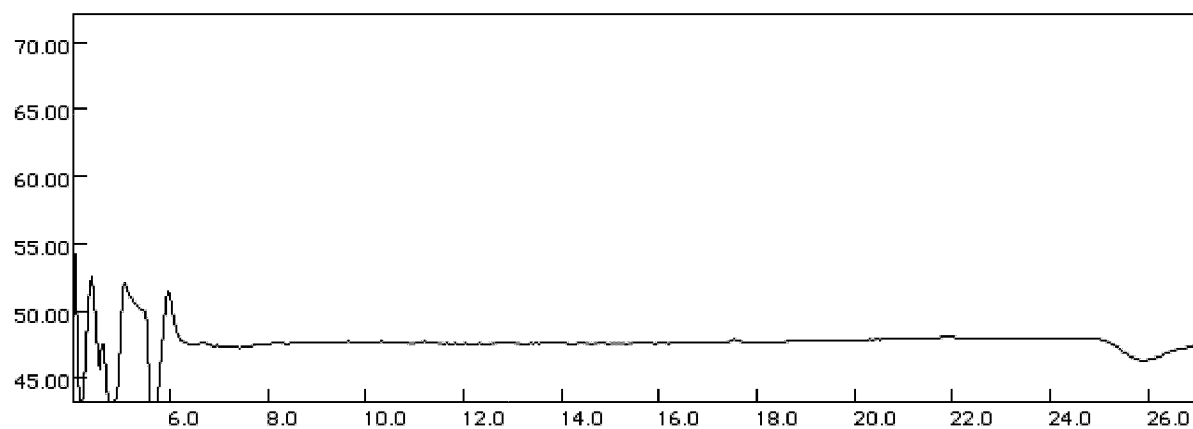


图 2B-1

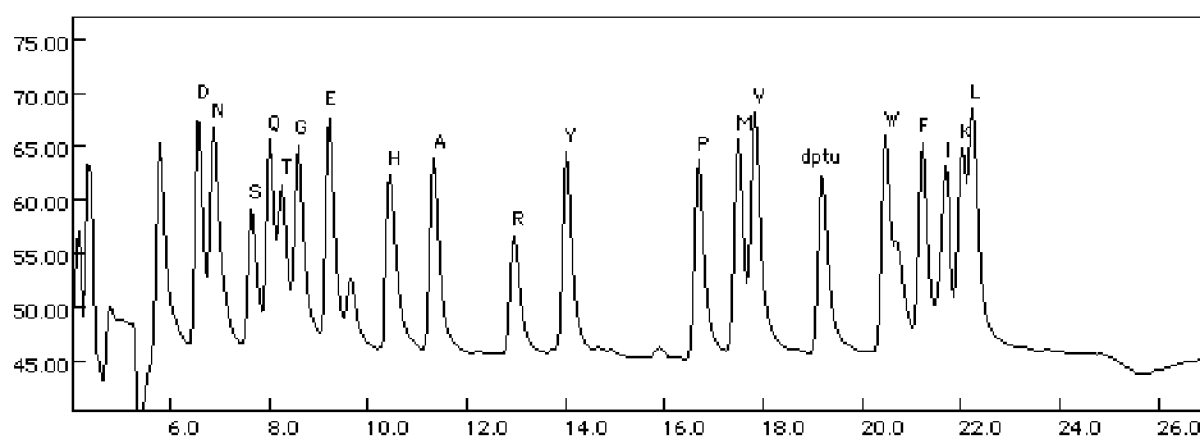


图 2B-2

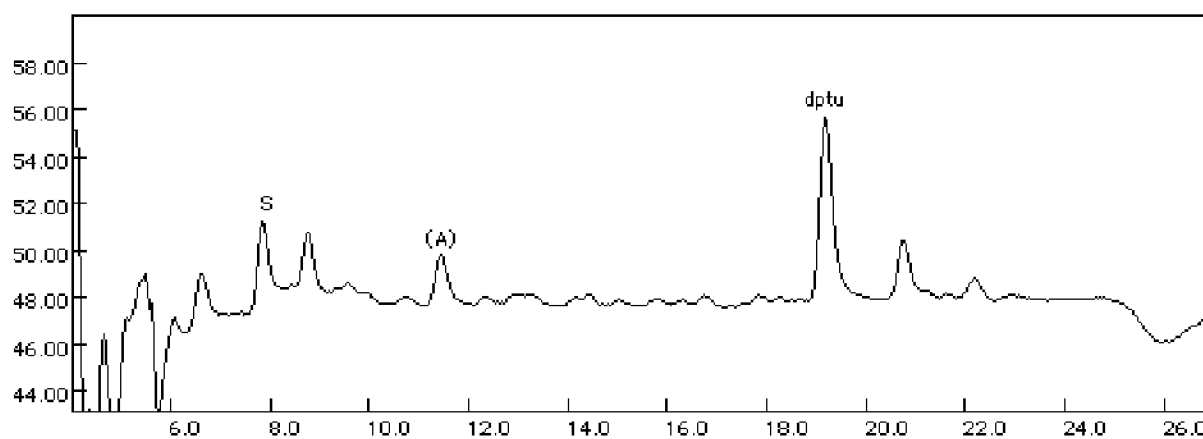


图 2B-3

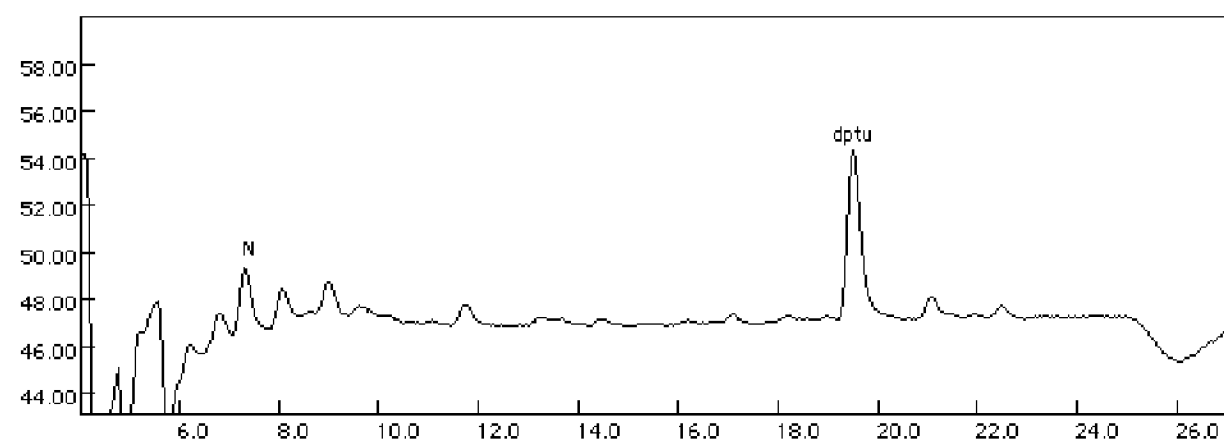


图 2B-4

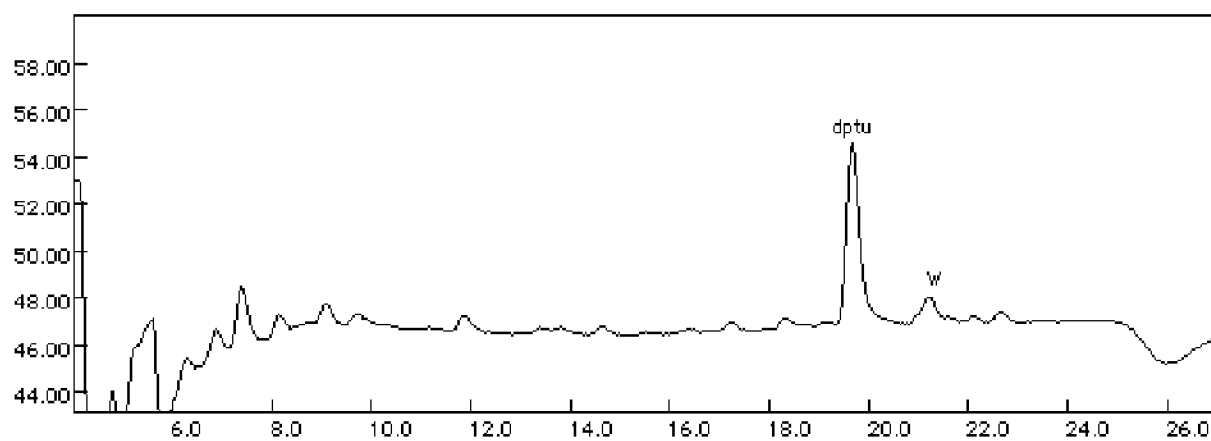


图 2B-5

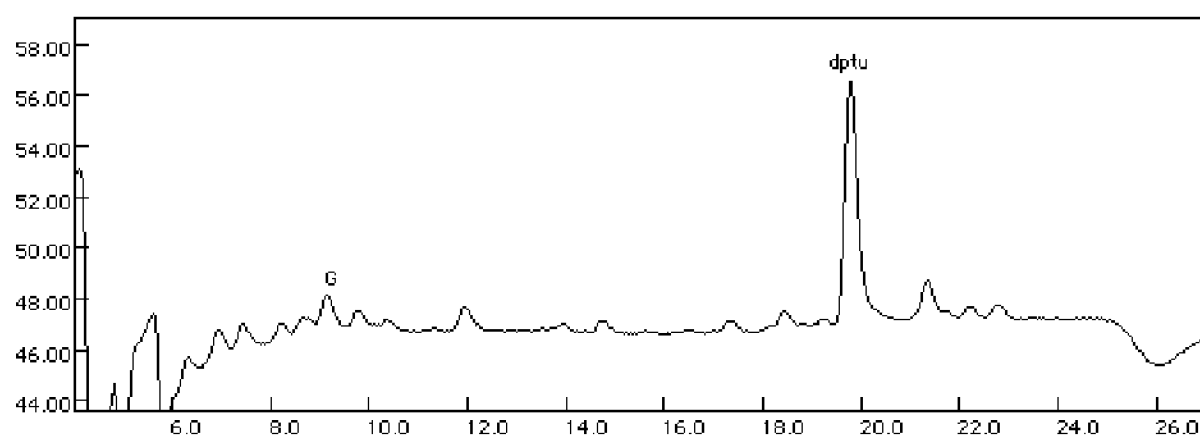


图 2B-6

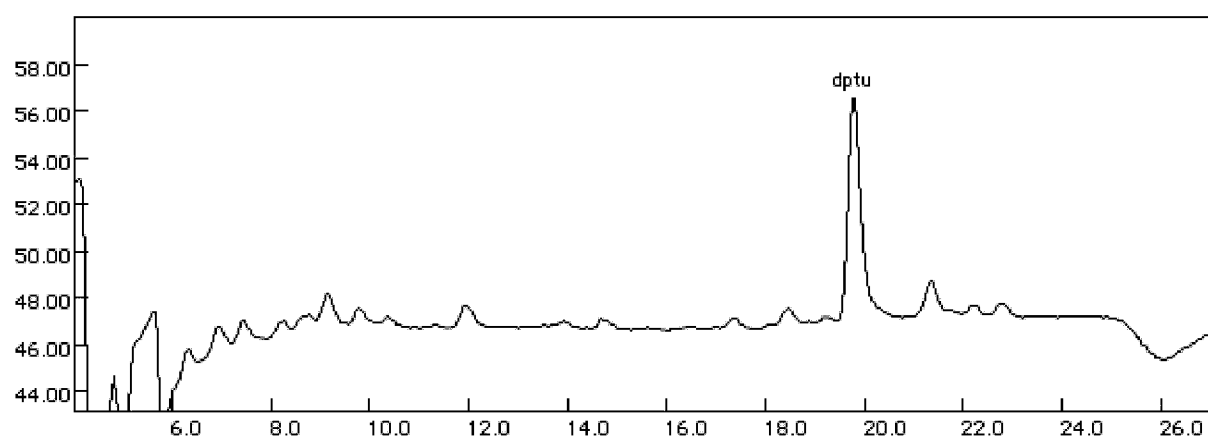


图 2B-7

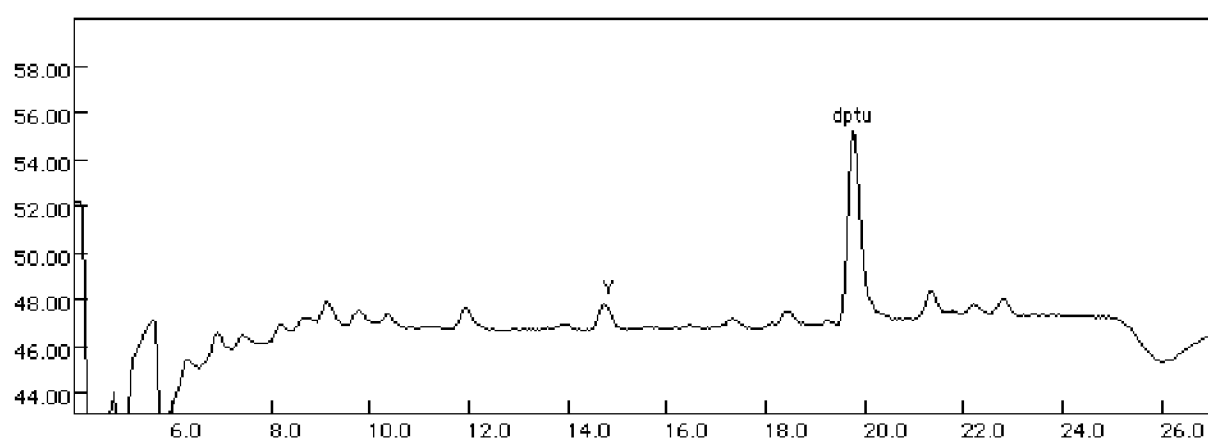


图 2B-8

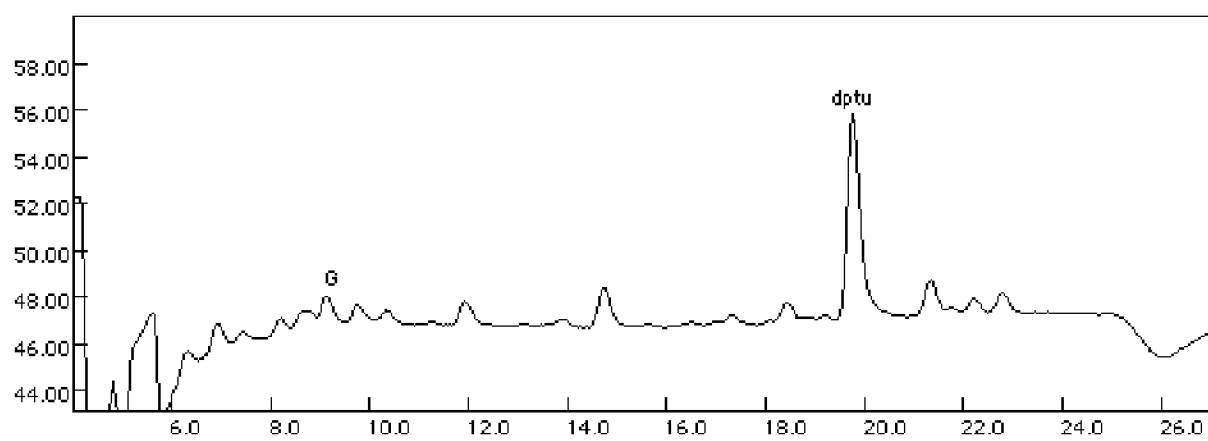


图 2B-9

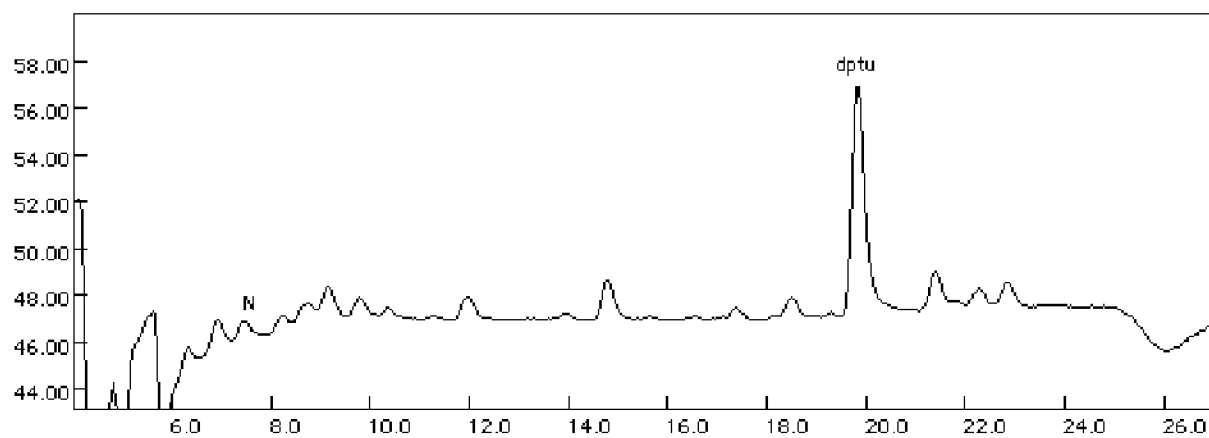


图 2B-10

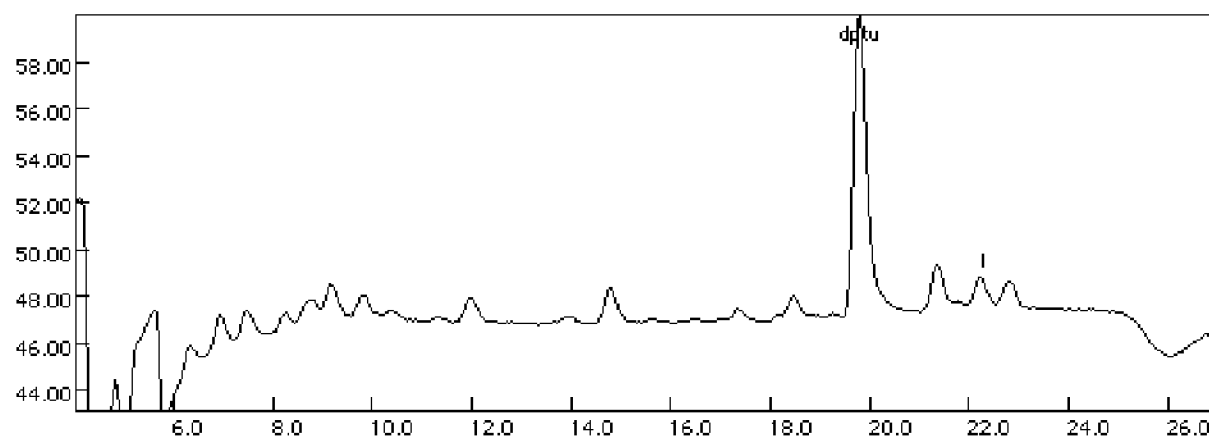


图 2B-11

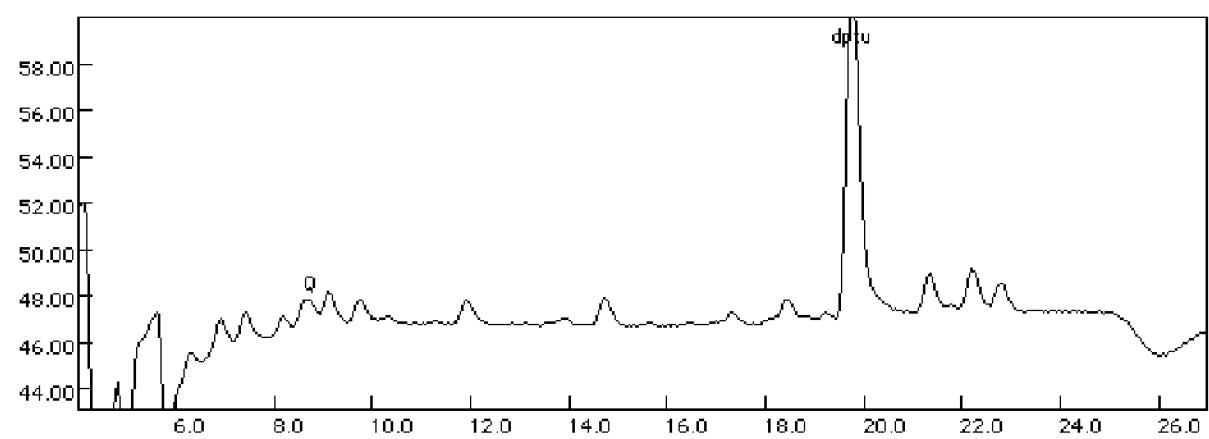


图 2B-12

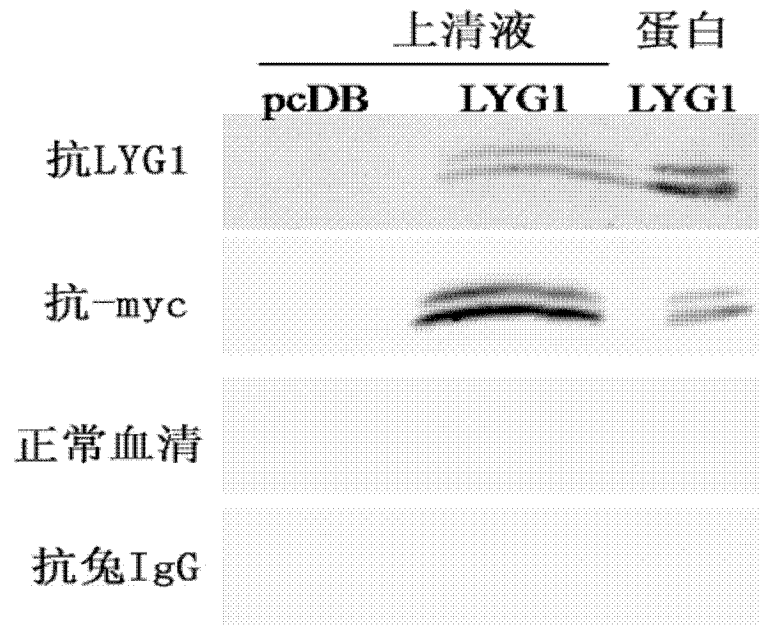


图 3

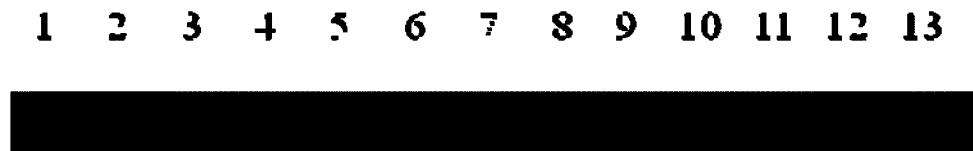


图 4A

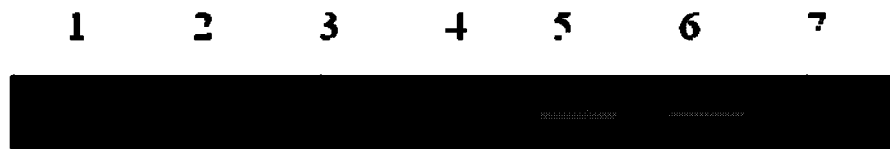


图 4B

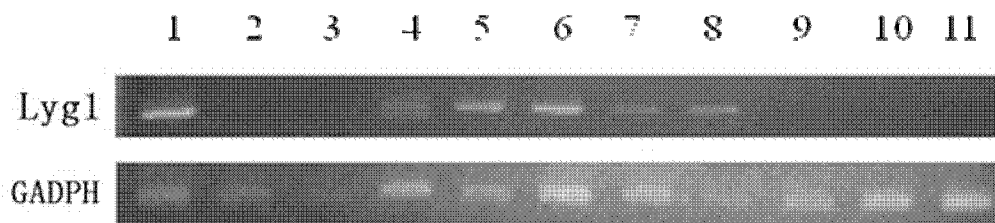


图 4C

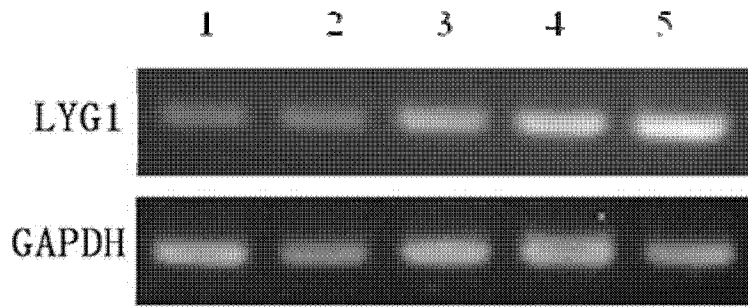


图 4D

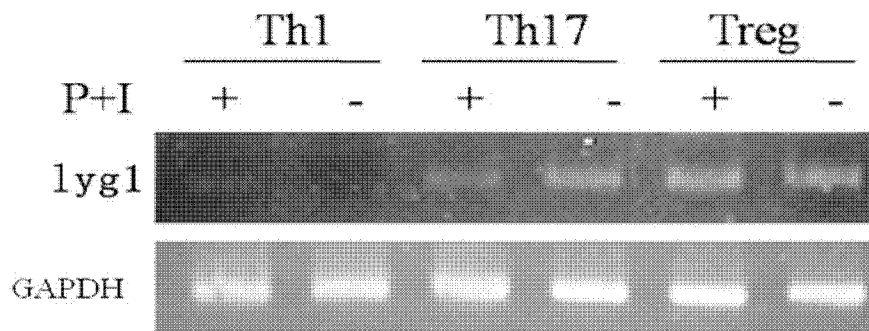


图 4E

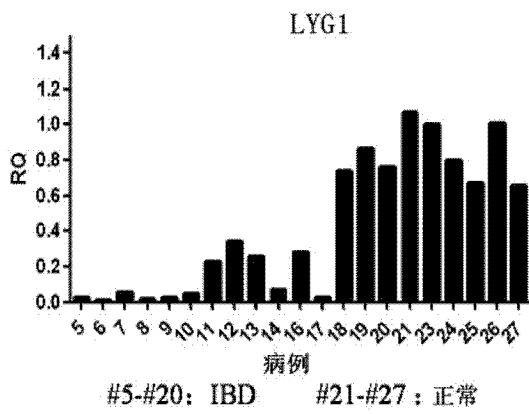


图 4F

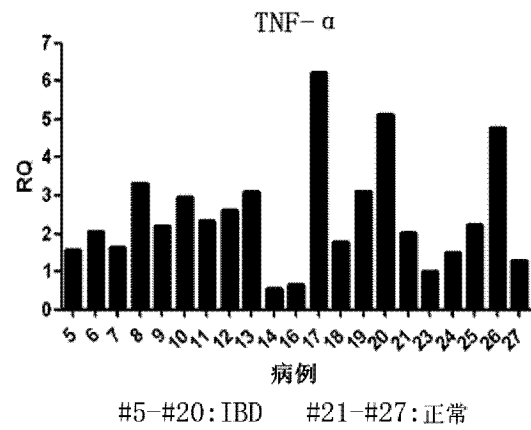


图 4G

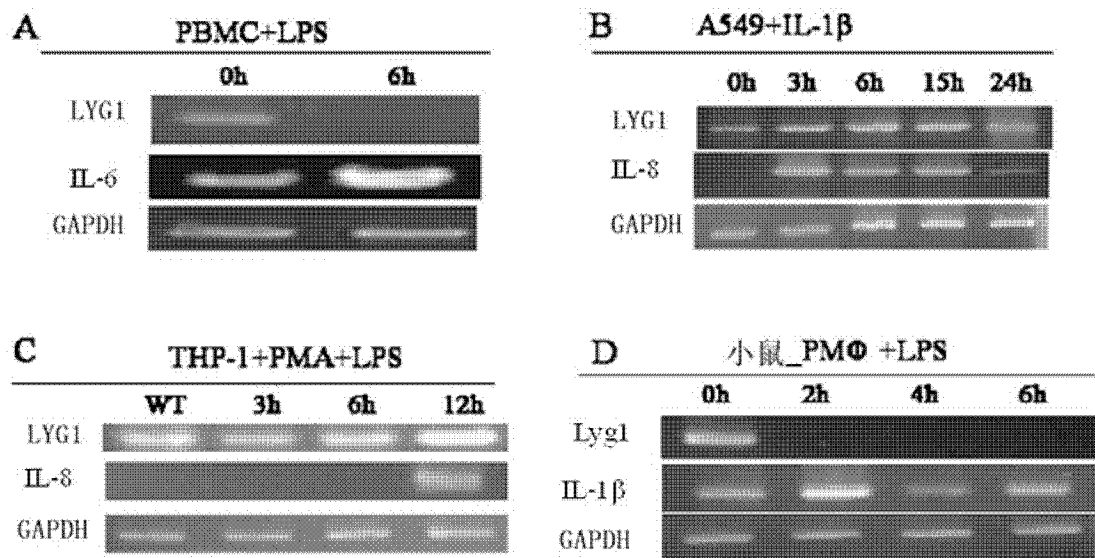


图 5

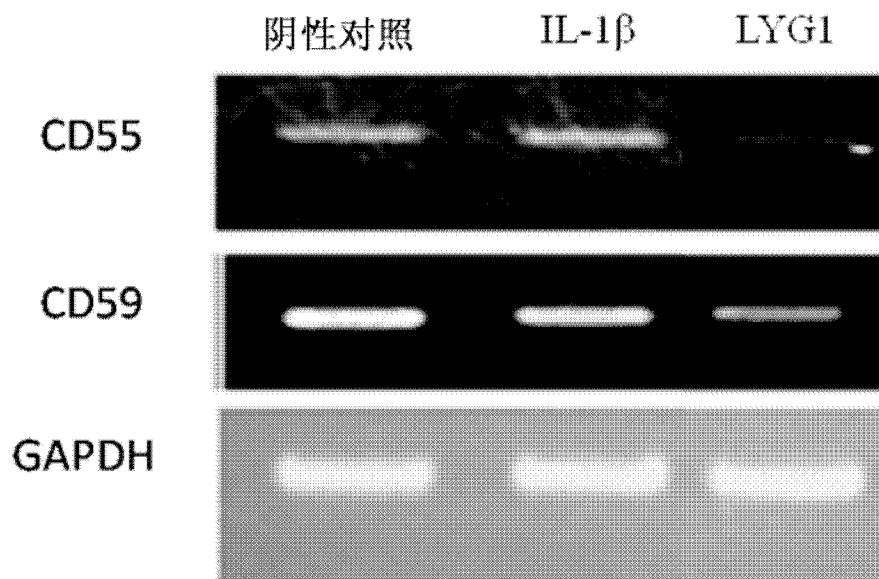


图 6A

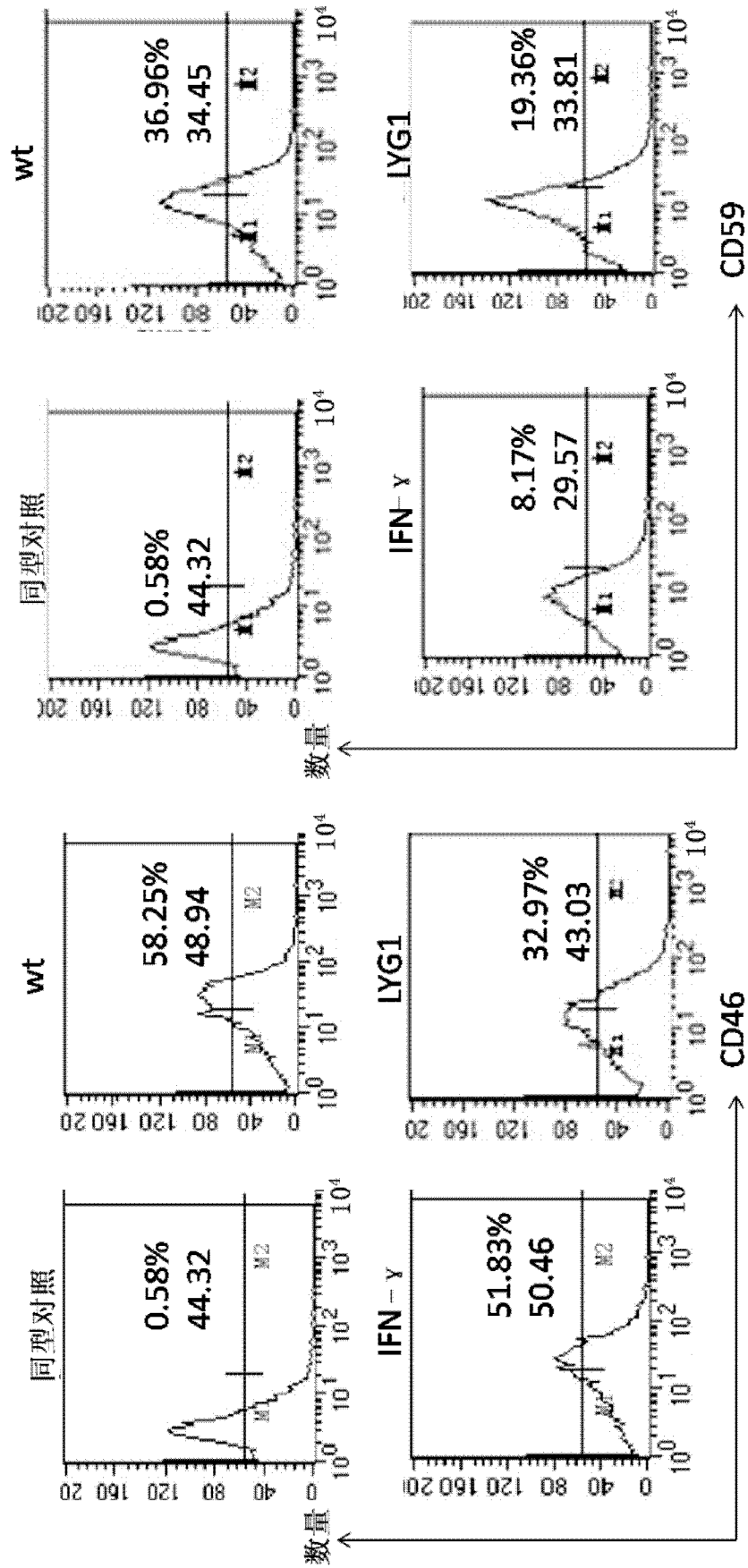


图 6B

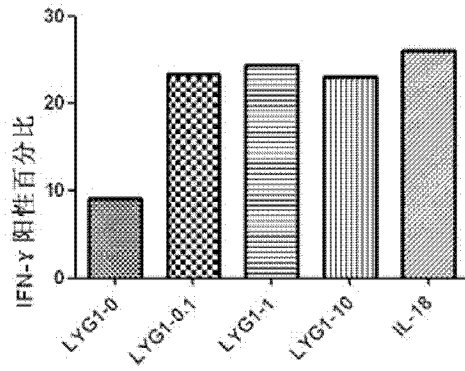


图 7A

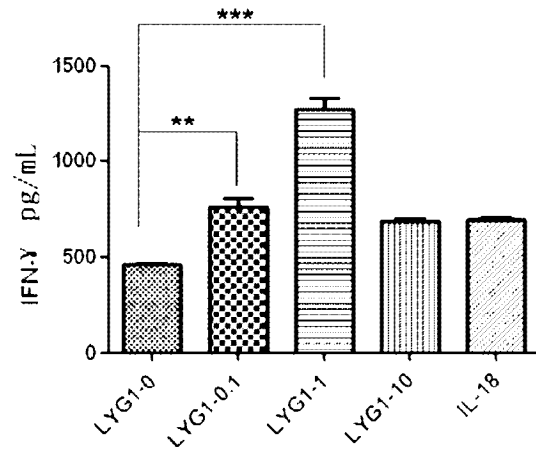


图 7B

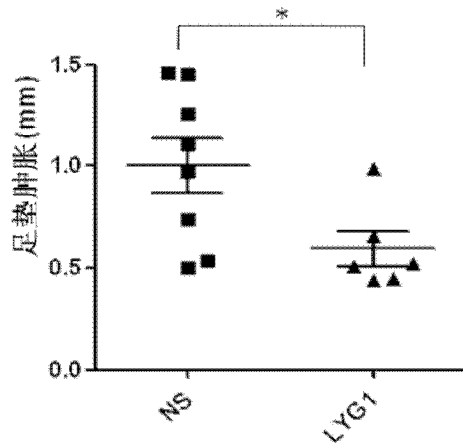


图 8A

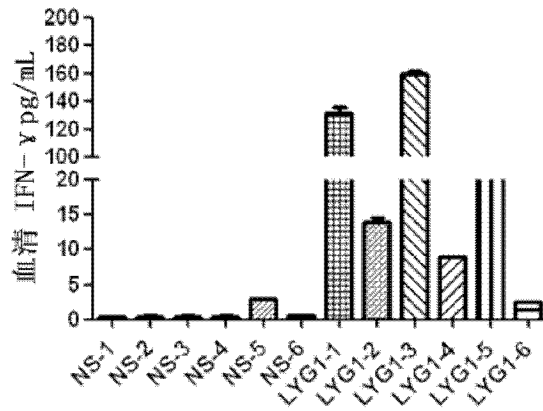


图 8B

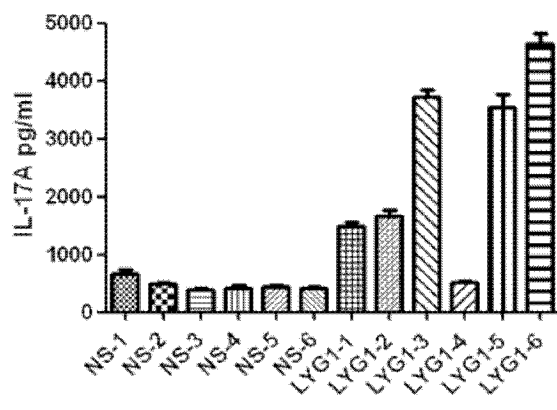


图 8C

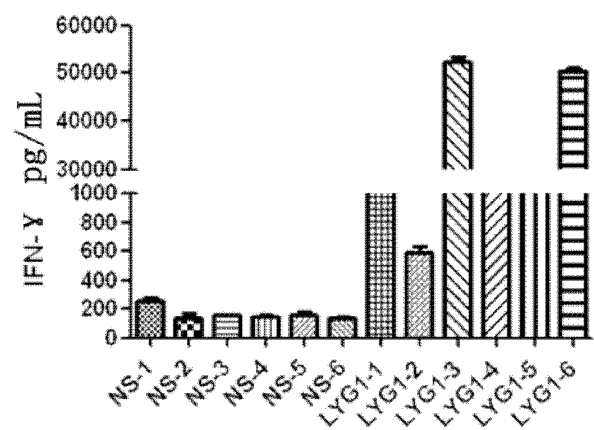


图 8D

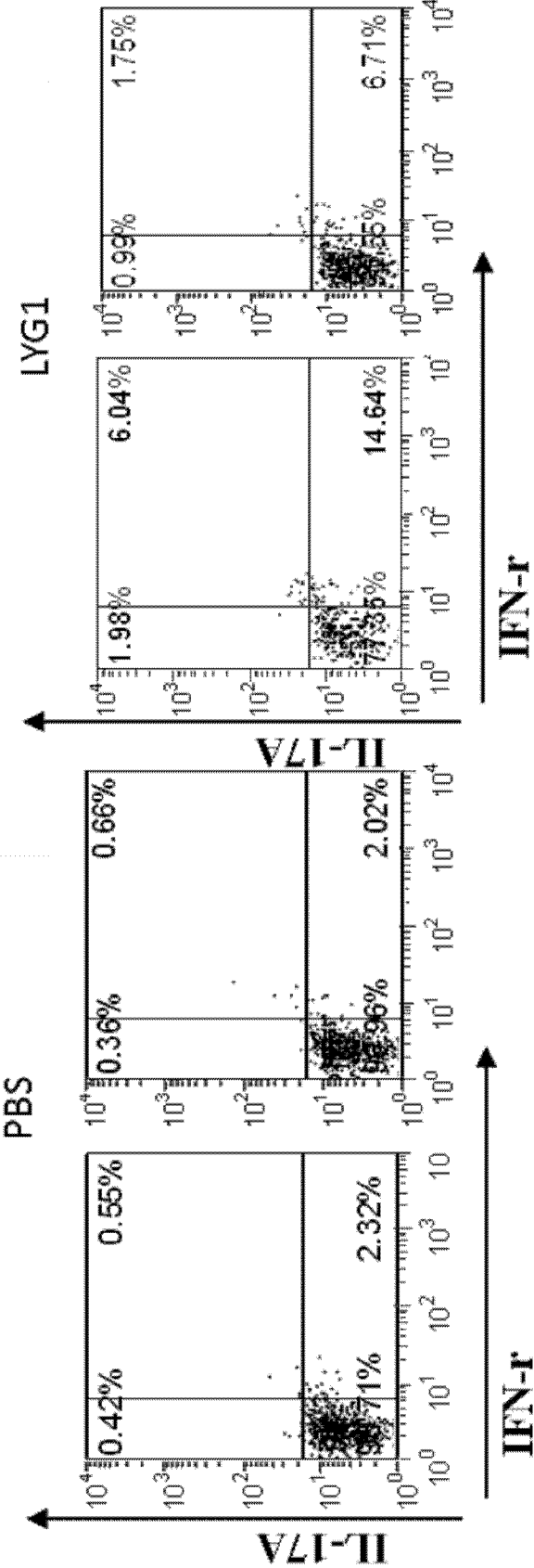


图 8E

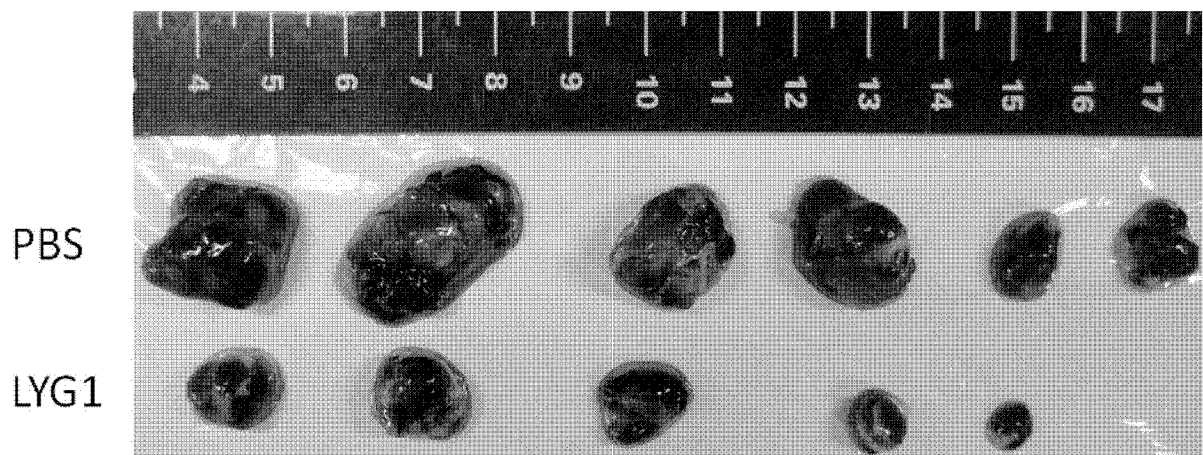


图 9A

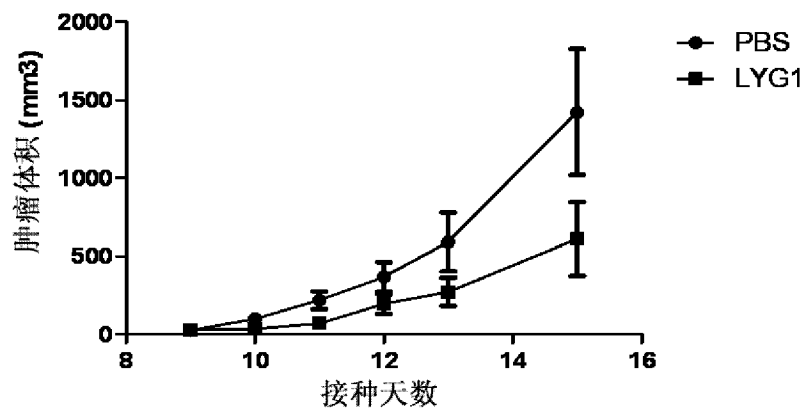


图 9B

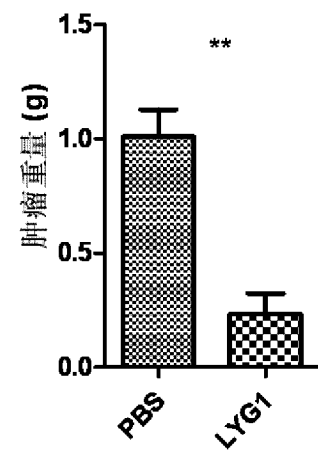


图 9C

专利名称(译)	具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子LYG1及其应用		
公开(公告)号	CN103073632A	公开(公告)日	2013-05-01
申请号	CN201110329289.8	申请日	2011-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	韩文玲 马大龙 张岩飞 付伟伟 王平章 刘绘绘 潘文 李婷 王文彦 石太平		
发明人	韩文玲 马大龙 张岩飞 付伟伟 王平章 刘绘绘 潘文 李婷 王文彦 石太平		
IPC分类号	C07K14/52 C07K16/24 C12N15/19 C12N15/63 C12N1/21 C12N5/10 A61K38/19 A61K39/395 A61K48/00 A61P37/02 A61P35/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P37/08 C12Q1/68 G01N33/53		
其他公开文献	CN103073632B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种具有抗感染和抗肿瘤活性的潜在新细胞因子LYG1及其应用，所述LYG1(即成熟的和发挥功能的潜在新细胞因子LYG1)的序列为SEQ ID NO：1所示的氨基酸序列，所述应用为LYG1在制备用于预防和/或治疗免疫相关疾病的药物及试剂盒中的应用，所述治疗免疫相关疾病的药物为抗肿瘤药物、抗炎症药物、抗感染性疾病、治疗过敏性疾病和/或治疗自身免疫疾病的药物，说明潜在新细胞因子LYG1在肿瘤、感染性疾病、炎症、过敏性疾病和自身免疫病方面可能发挥重要作用，具有潜在的临床价值。

