



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103073632 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 03

(21) 申请号 201110329289. 8

A61P 37/02(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 26

A61P 35/00(2006. 01)

(73) 专利权人 北京大学

A61P 29/00(2006. 01)

地址 100871 北京市海淀区颐和园路 5 号

A61P 31/00(2006. 01)

A61P 37/08(2006. 01)

(72) 发明人 韩文玲 马大龙 张岩飞 付伟伟

C12Q 1/68(2006. 01)

王平章 刘绘绘 潘文 李婷

G01N 33/53(2006. 01)

王文彦 石太平

(56) 对比文件

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280

CN 1373211 A, 2002. 10. 09,

US 6083700 A, 2000. 07. 04,

代理人 郭广迅

Clark, H. F 等. GenBank:NP_777558. 1. 《GenBa

nk》. 2011,

审查员 刘新蕾

(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)

权利要求书1页 说明书12页

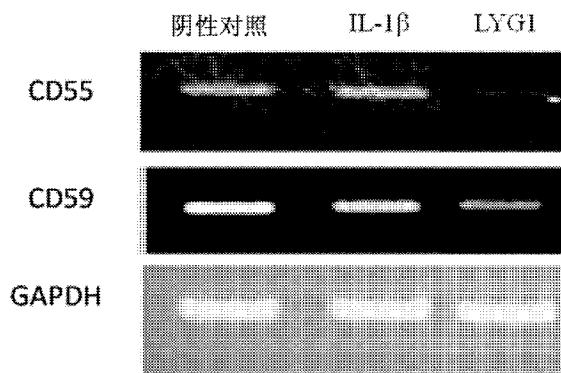
序列表4页 附图12页

(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. 一种潜在新细胞因子LYG1、或编码所述的LYG1的核苷酸序列、或含有编码所述的LYG1的核苷酸序列的载体、或由含有编码所述的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；

其中,所述LYG1的序列为SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列；

其中,所述治疗免疫相关疾病的药物为抗肿瘤药物；

其中,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；

其中,所述肿瘤为对免疫治疗敏感的肿瘤,所述对免疫治疗敏感的肿瘤为黑色素肿瘤。

2. 根据权利要求1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。

3. 根据权利要求2所述的应用,其中,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] 以下实施例中的人肺腺癌细胞系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]

***ATAATTTATGAGATGTCATAAAATCTCTCCAAAATAGGATGAGATGAACACTTTTAAACAAGAGAAC
AGGACTCTATAAAATCGCTGTGGGCTCACCACCTCTAAGGAGGAGCACTGACTGAAGACAGAAA
AATTGATGAAGTGAAGAAGACATGGTCCATTATGCCTTACAACTTACACAGTGCCTTTGGGAATT
CCAAAGTACTCAGTGGAGAGAGGTGTTTCAGGAGCCGTAGAGCCAGATCGTCATCATGTCTGCA***

TTGTGGCTGCTGCTGGGCCTCCTTGCCCTGATGGACTTGTCTGAAAGC

AGCAACTGGGGATGCTATGGAAACATCCAAAGCCTGGACACCCCTGGAGCATCTTGTGGGATTGGAAGACGTCACGG
CCTGAACTACTGTGGAGTTCGTGCTTCTGAAAGGCTGGCTGAAATAGACATGCCATACCTCCTGAAATATCAACCCA
TGATGCAAACCATTGGCCAAAAGTACTGCATGGATCCTGCCGTGATCGCTGGTGTCTTGTCCAGGAAGTCTCCCGGT
GACAAAATTCTGGTCAACATGGGCGATAGGACTAGCATGGTGCAGGACCCTGGCTCTCAAGCTCCCACATCCTGGAT
TAGTGAGTCTCAGGTTTCCCAGACAACTGAAGTTCTGACTACTAGAATCAAAGAAATCCAGAGGAGGTTTCCAACCT
GGACCCCTGACCAGTACCTGAGAGGTGGACTCTGTGCCTACAGTGGGGGTGCTGGCTATGTCCGAAGCAGCCAGGAC
CTGAGCTGTGACTTCTGCAATGATGTCCTTGCACGAGCCAAGTACCTCAAGAGACATGGCTTCTAA***CATCTCAGA
TGAAACCCAAGACCATGATCACATATGCAGCCTCAAATGTTACACAGATAAACTAGCCAAGGGC
ACCTGTAAGTGGGAATCTGAGTTTGACCTAAAAGTCATTAATAACATGAATCACATTAAGGA
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_
1748982.2, 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 atgtctgcattgtggetgetgc(SEQ ID NO:4)

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

[0044] 用上述引物,以人正常脾组织cDNA文库(CIontech:Cat.No.636743)、人正常胎肝
组织cDNA文库(CIontech: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50μL,其中含有:

	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
[0046]	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HEK293T无血清培养基,分别在细胞培养上清液中加入10 μ g/mL BFA(BrefeIdin-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 $^{\circ}$ C,15000g离心15分钟,上清液转入新管,存于-80 $^{\circ}$ C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40μL,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-CORBioscience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(DuIbacco'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质,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0.45μm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)in1×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)in1×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500μL,吸出蛋白,于4℃,18000g离心20分钟除菌,分装保存于-80℃待用。

[0064] 取5μL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5mIPBS,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'-tttcagagccgtagagcc(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'-ggtacc gc 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'-agagtctccaggaggcaactatgtg(SEQ ID NO:10),外侧下游引物5'-ccatggtccttgaagtatttgct(SEQ ID NO:11);内侧上游引物5'-aacattggcagtgacttggga(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 $^{\circ}$ 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)。

[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作用。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磨淋巴结,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, 200μL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 2×10^6 /mL, 铺至48孔板, 每孔500μL。

[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)(10μg/mL)预包被的48孔板中, 加入抗小鼠CD28(anti-mouse CD28)(2μg/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), 10μg/mL。Th17细胞的诱导条件为: TGF-β, 5ng/mL; IL-6, 10ng/mL; anti-mIL-4, 10μg/mL; 抗mIFN-γ(anti-mIFN-γ), 10μg/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100μL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100μL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、LTα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)(①Takayuki Yoshimoto, et al. Role of IL-16 in delayed-type hypersensitivity reaction *Blood*. 2000;2869-74;②Akina 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 μ 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 μ g/200 μ L/天/鼠),对照组腹腔注射PBS(200 μ L/天/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。

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
 [0001] 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

<212> PRT
<213> 人

<220>
<223> SEQ ID NO:2

<400> 2

Met Ser AIa Leu Trp Leu Leu Leu GIy Leu Leu AIa 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

[0002]

```

ataatttatg agatgtcata aatctctcca aataggatg agatgaacac ttttaacaag      60
agaacaggac tetatataaa tegetgtggg ctaccacct ctaaggagga gcactgactg      120
aagacagaaa aattgatgaa ctgaagaaga catggtccat tatgccttac aaacttacac      180
agtgetttgg gaattccaaa gtactcagtg gagagaggtg tttcaggagc cgtagagcca      240
gatcgtcate atgtctgcat tgtggetgct gctgggecte cttgcctga tggacttgtc      300
tgaaagcagc aactggggat gctatgaaa catecaaage ctggacacce ctggagcate      360
ttgtgggatt ggaagacgic acggcctgaa ctactgtgga gttcgtgctt ctgaaagget      420
ggctgaaata gacatgceat acctcctgaa atatcaacce atgatgcaaa ccattggcca      480
aaagtactgc atggatcctg ccgtgategc tgggtgtctt tccaggaagt ctcccgggtga      540
caaaattctg gtcaacatgg gcatagggac tagcatgggtg caggacctg getetcaage      600
tcccacatcc tggattagtg agtctcaggt ttcccagaca actgaagttc tgactactag      660
aatcaaagaa atccagagga ggtttccaac ctggaccctt gaccagtacc tgagaggtgg      720
actctgtgce tacagtgggg gtgtgggcta tgccgaage agccaggacc tgagctgtga      780
cttetgcaat gatgtccttg cagagccaa gtacctcaag agacatgget tetaacatct      840
cagatgaaac ccaagacat gatcacatat gcagcctcaa atgttacaca gataaaacta      900
gccaaaggca cctglaactg ggaalctgag ttlgacctaa aaglcattaa aalaacatga      960
atcacattaa aggaagaatt ttgacctgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa     1015

```

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

<220>
<223> SEQ ID NO:4

	<400> 4 gcggccgcca ccatgtctgc attgtgctg 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	
[0003]	<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 gcggccgcca ccatgtctgc attgtgctg 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	

	<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
[0004]	<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

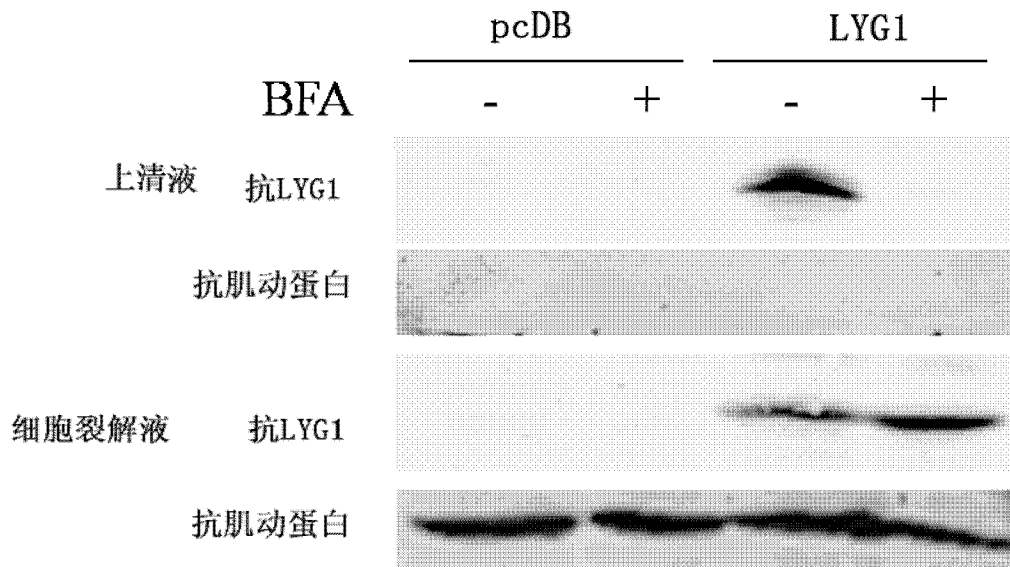


图1

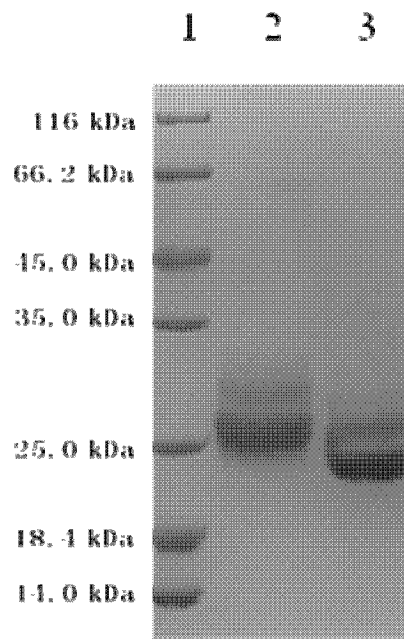


图2A

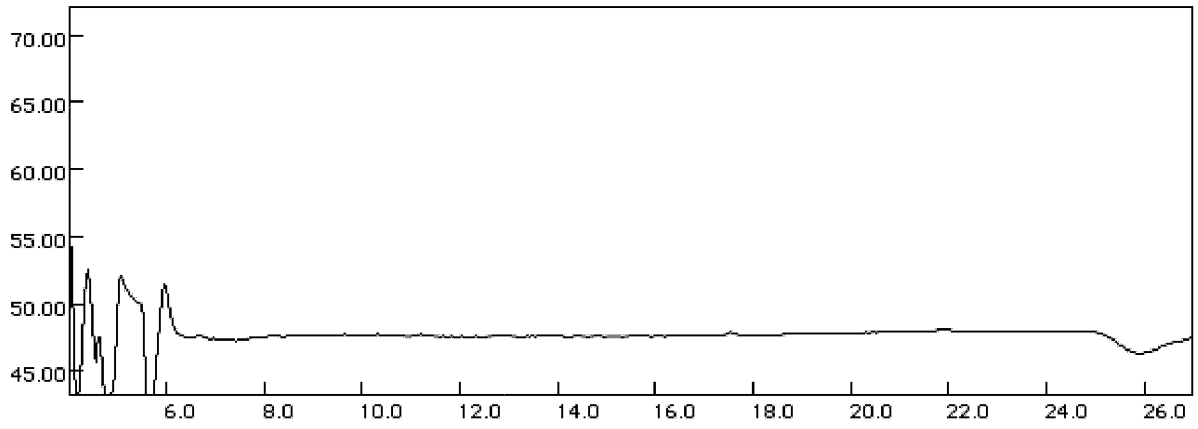


图2B-1

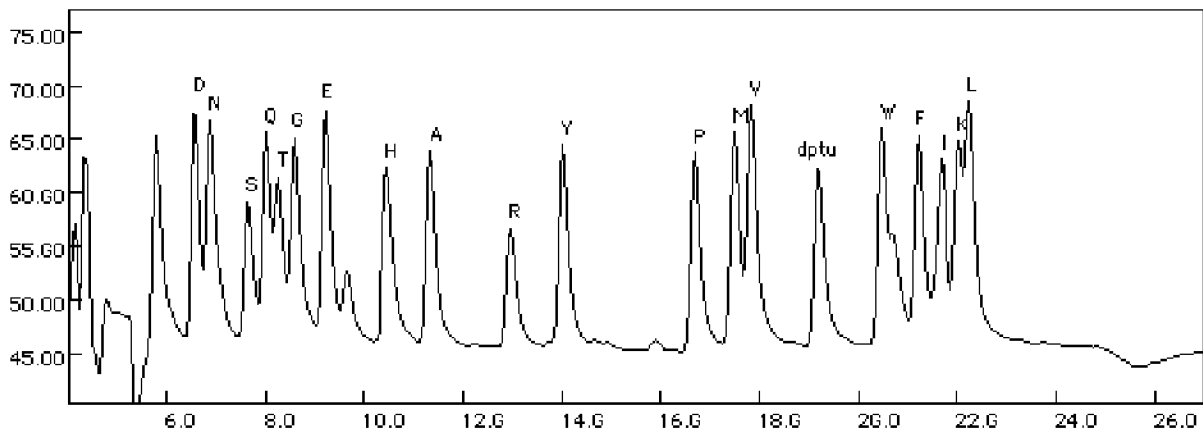


图2B-2

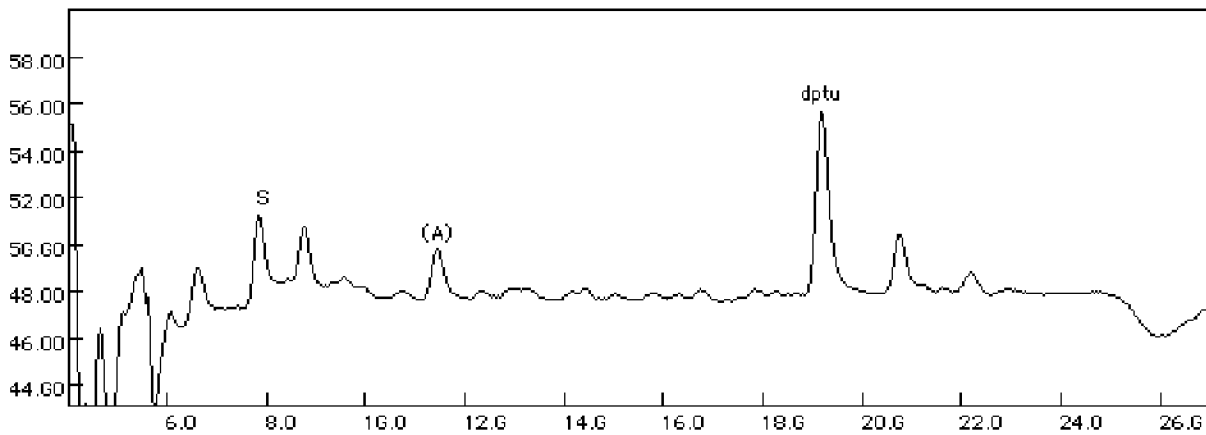


图2B-3

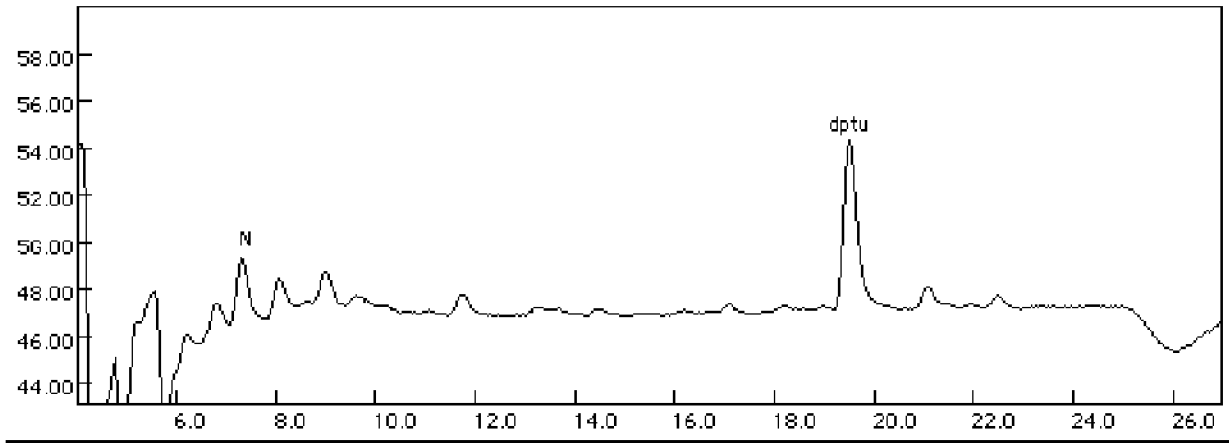


图2B-4

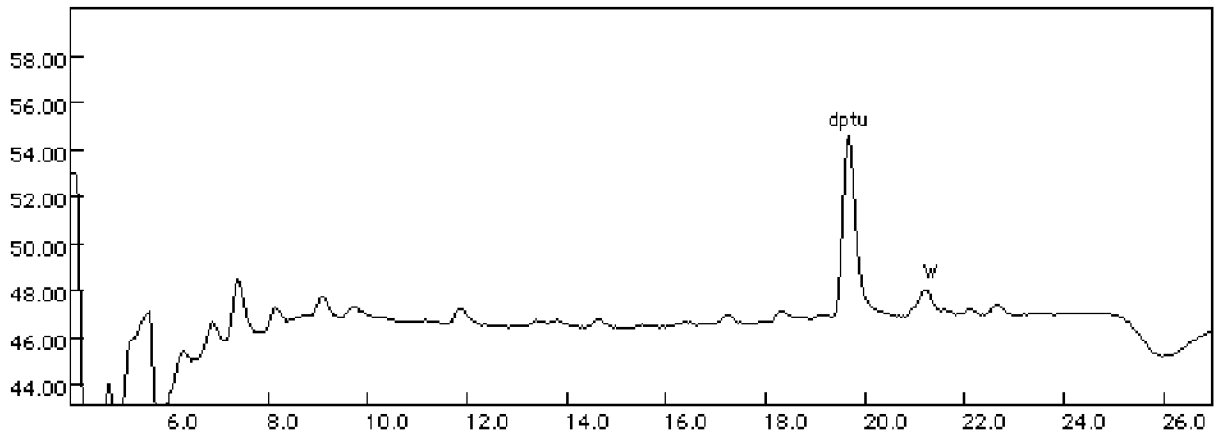


图2B-5

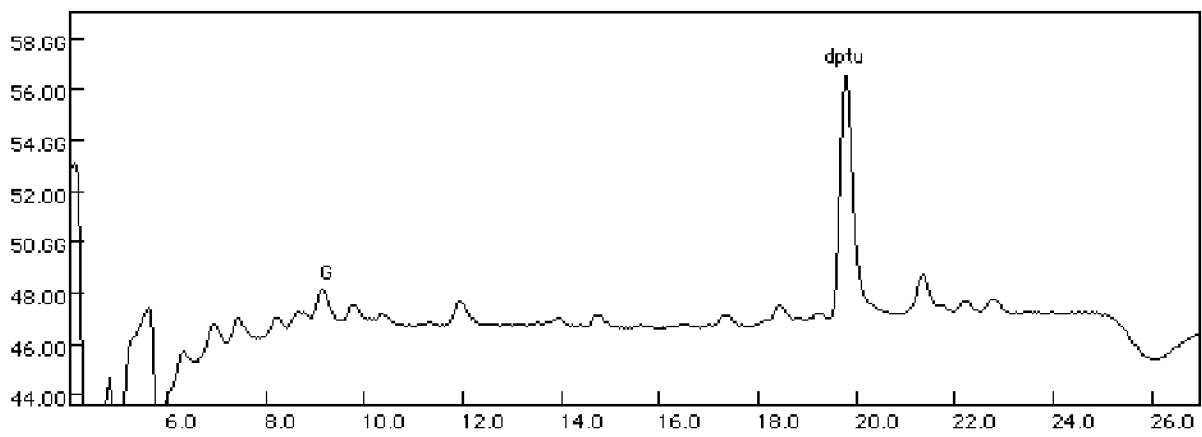


图2B-6

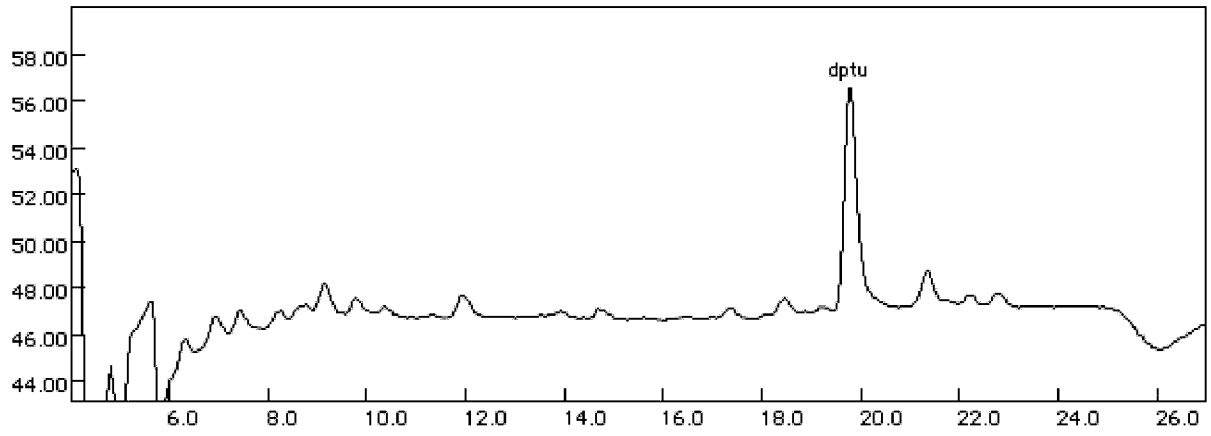


图2B-7

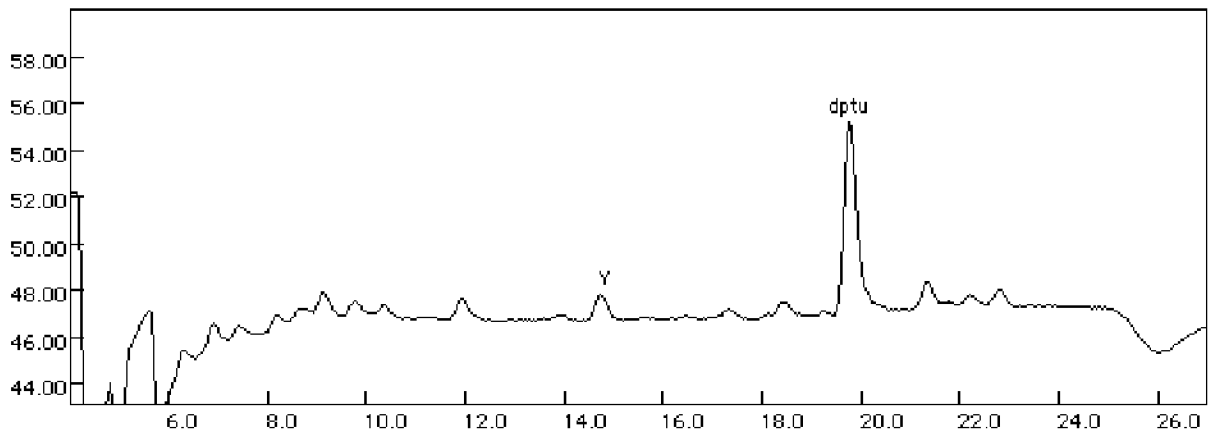


图2B-8

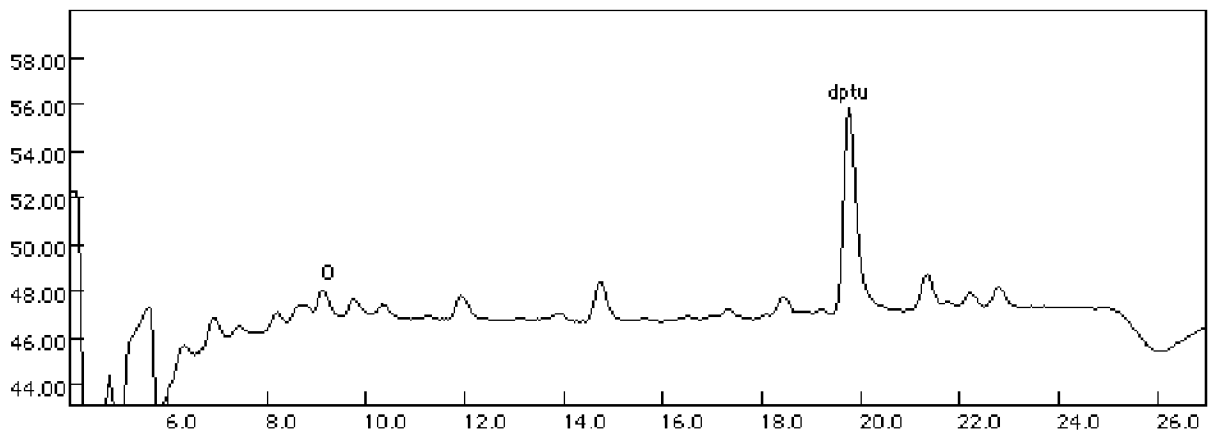


图2B-9

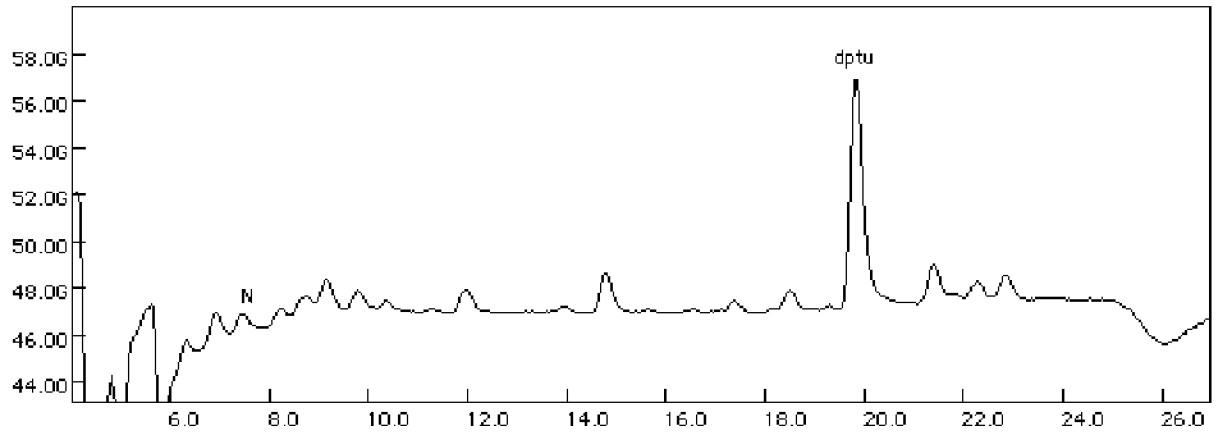


图2B-10

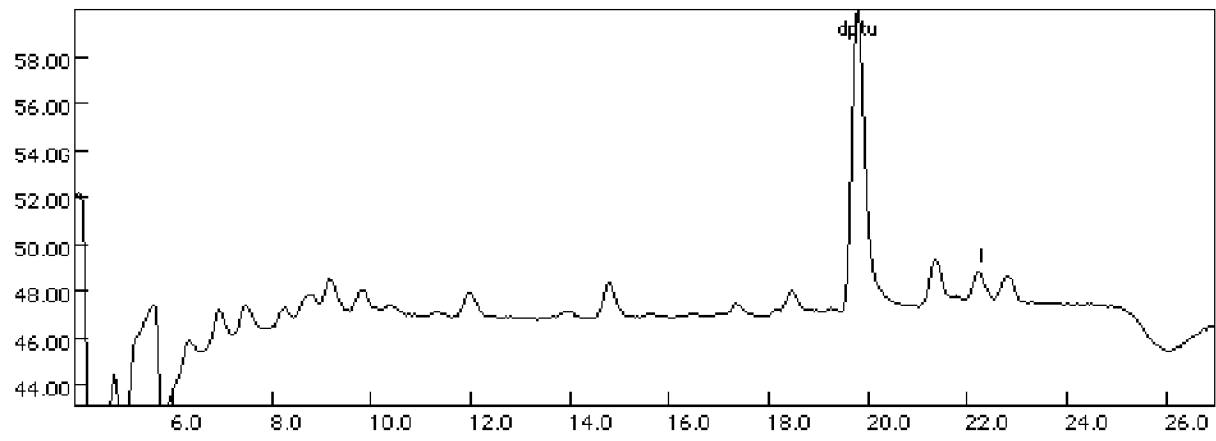


图2B-11

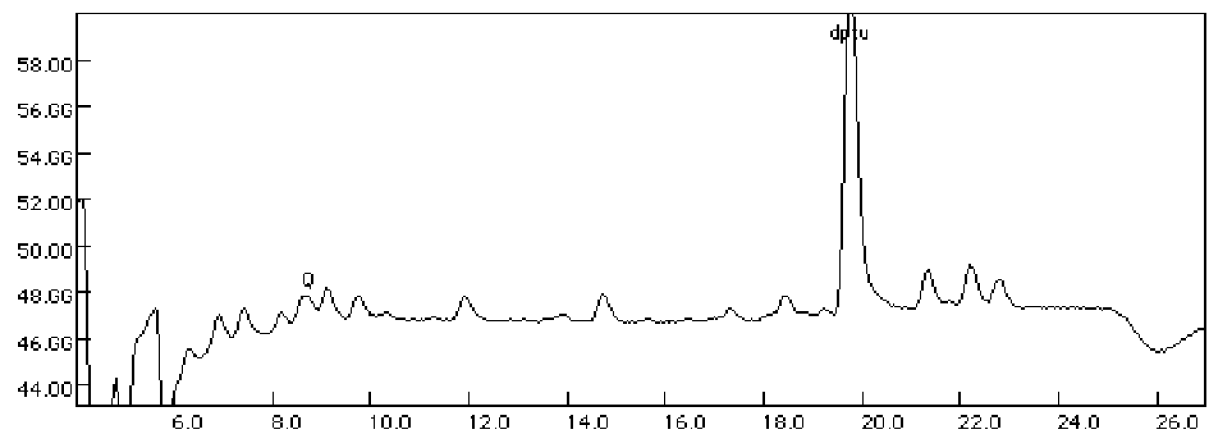


图2B-12

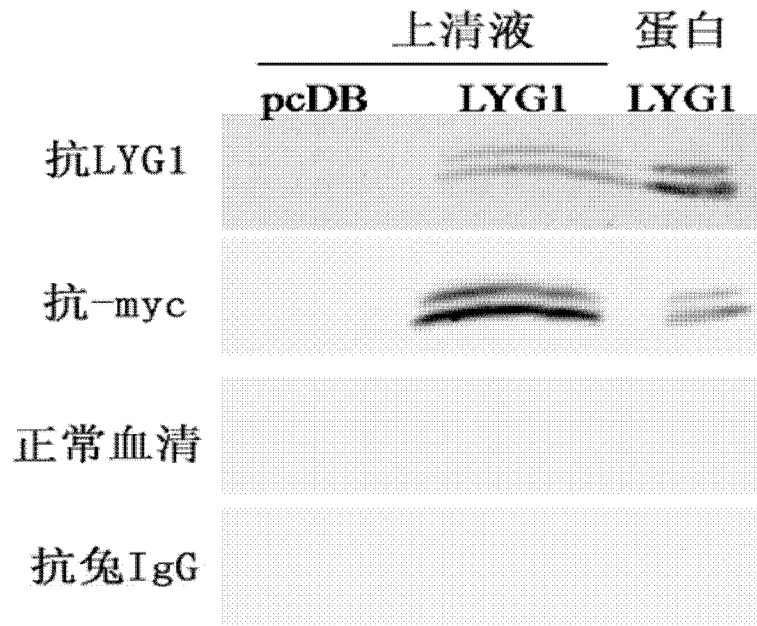


图3

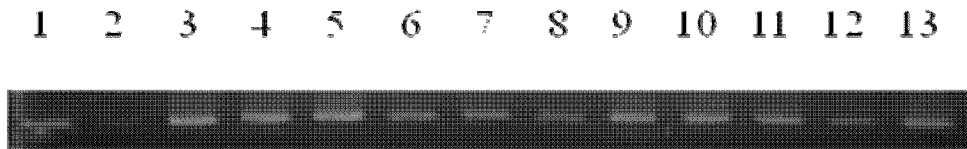


图4A

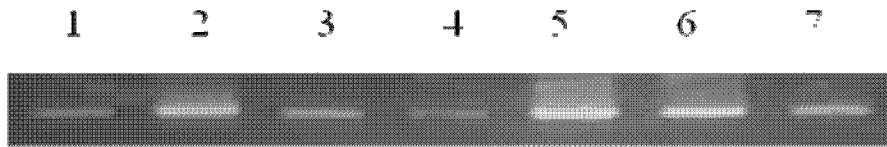


图4B

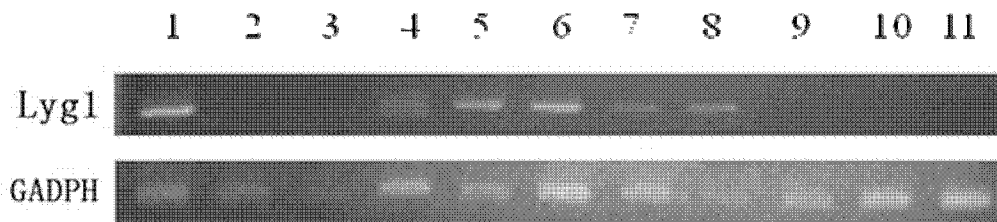


图4C

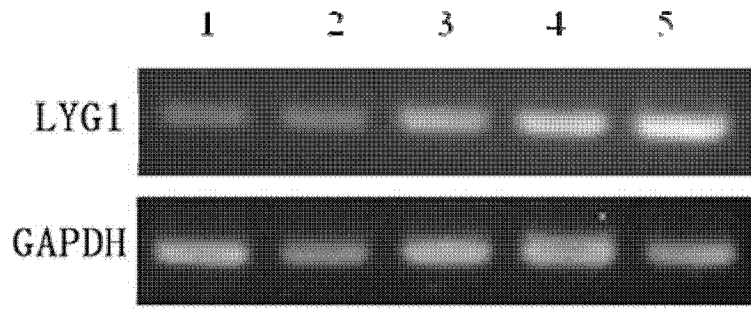


图4D

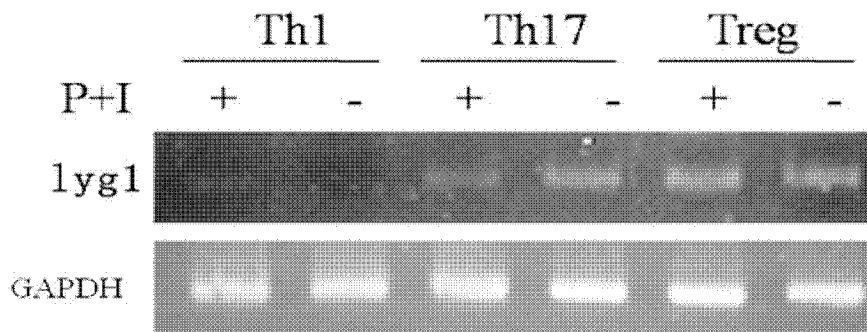


图4E

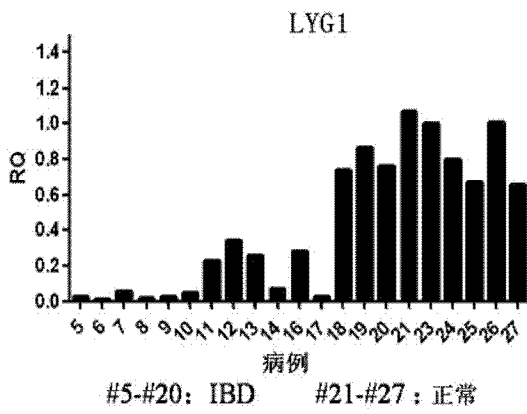


图4F

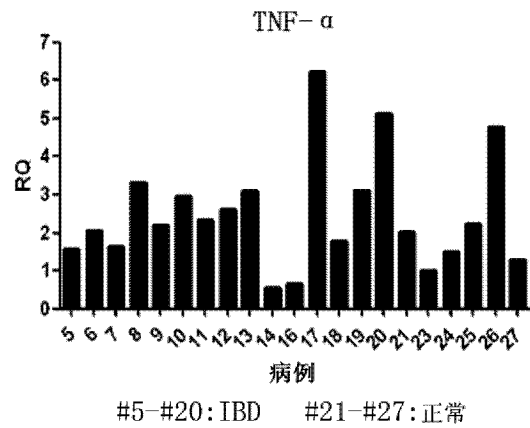


图4G

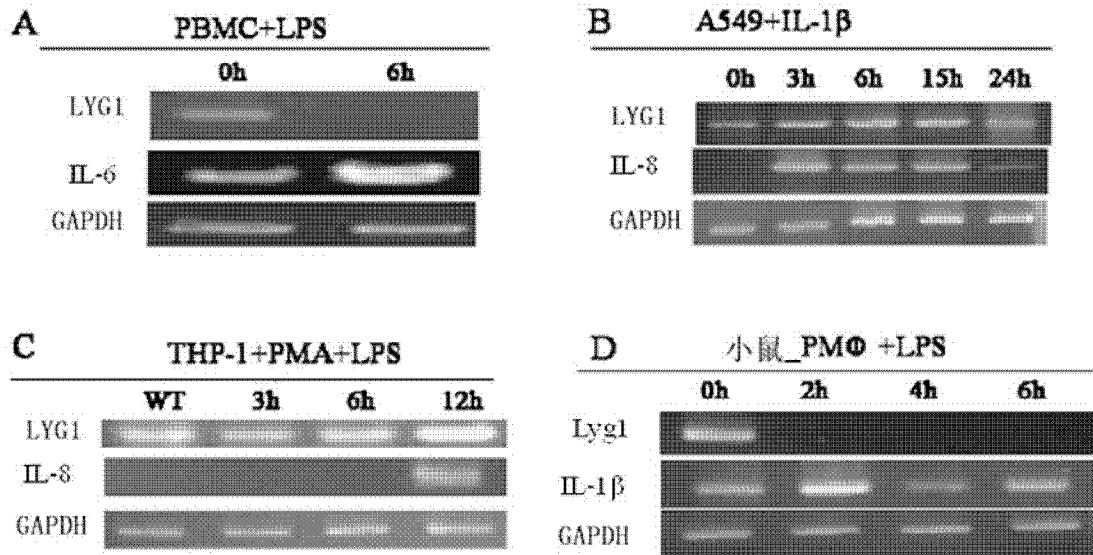


图5

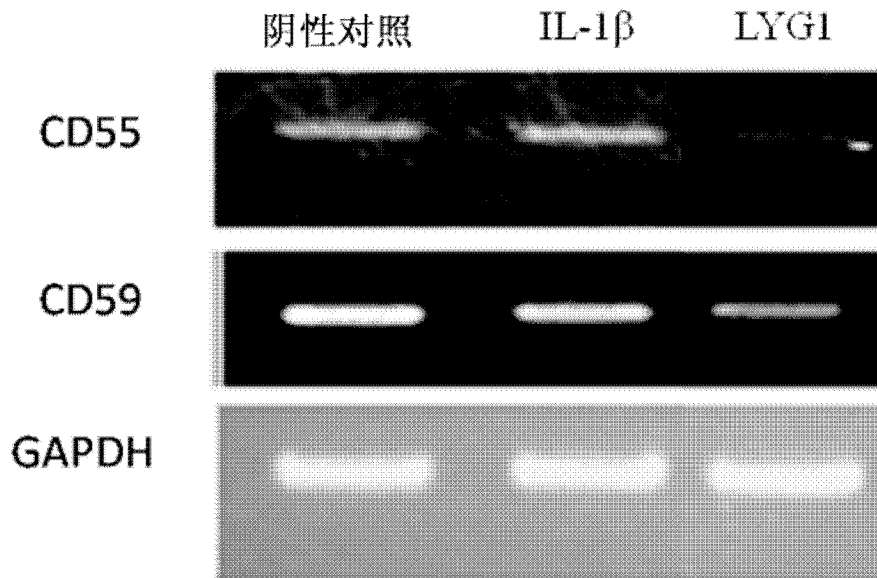


图6A

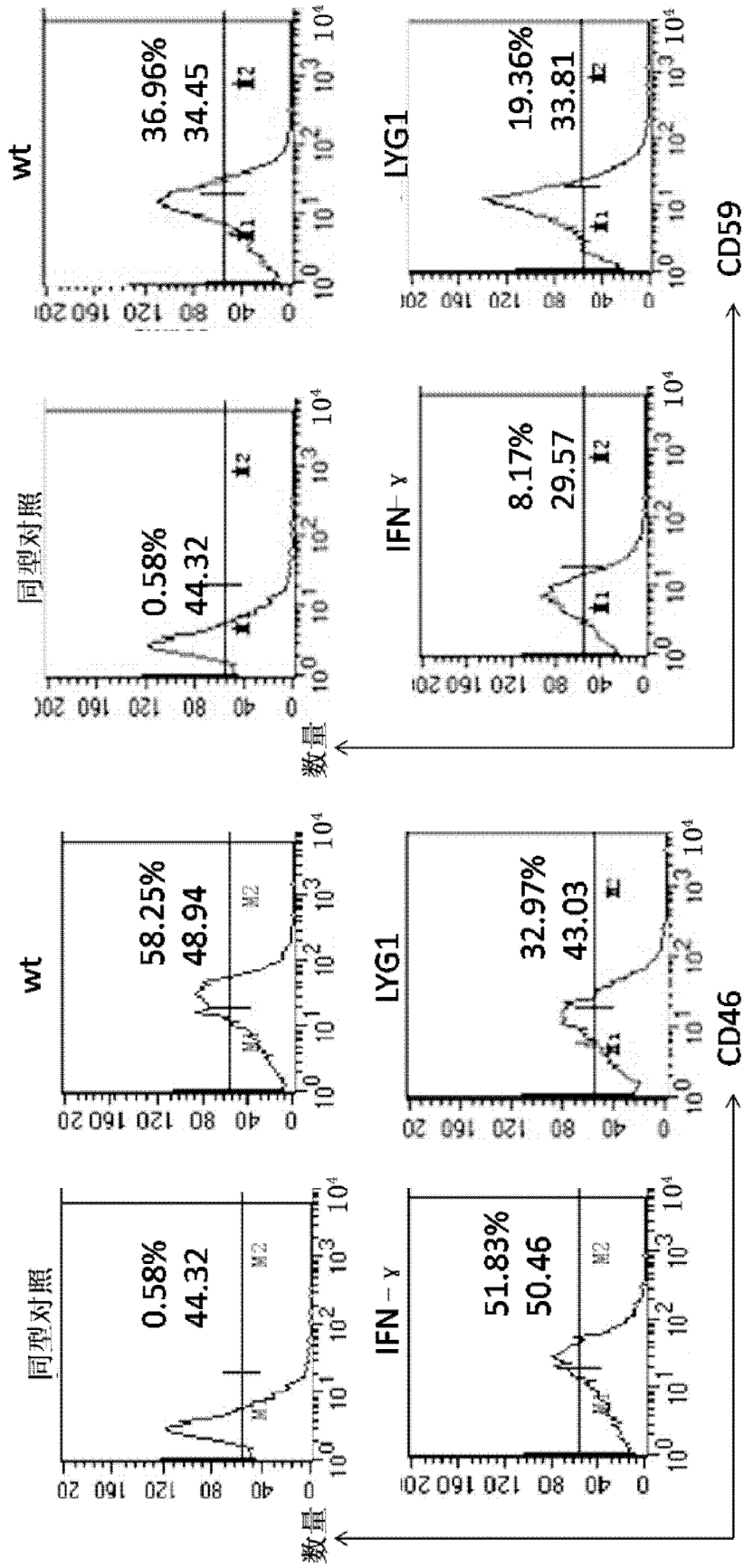


图6B

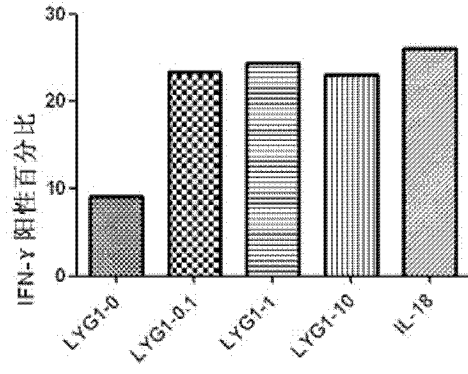


图7A

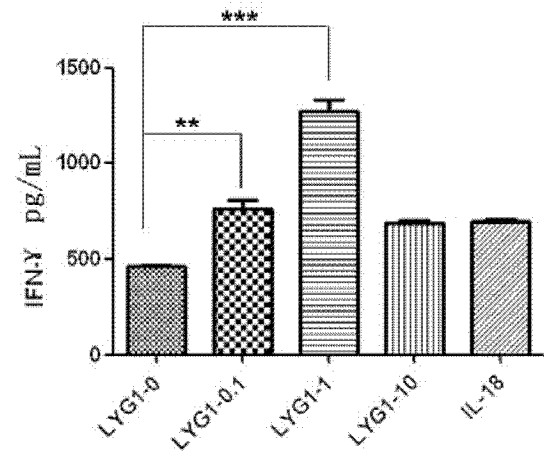


图7B

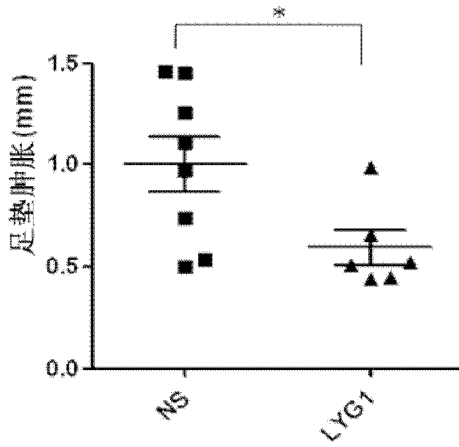


图8A

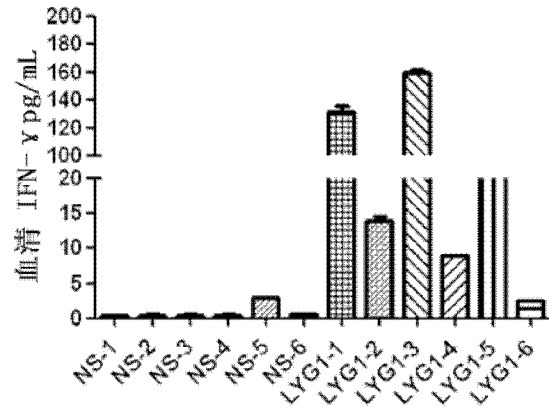


图8B

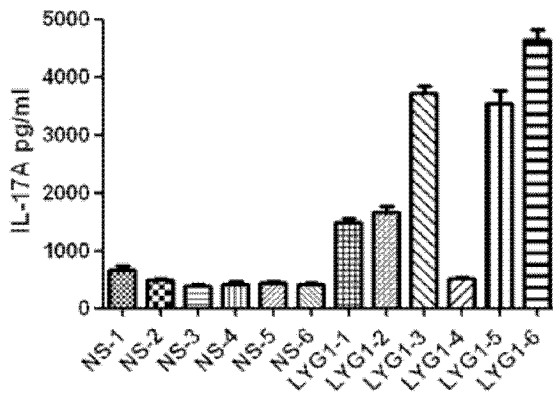


图8C

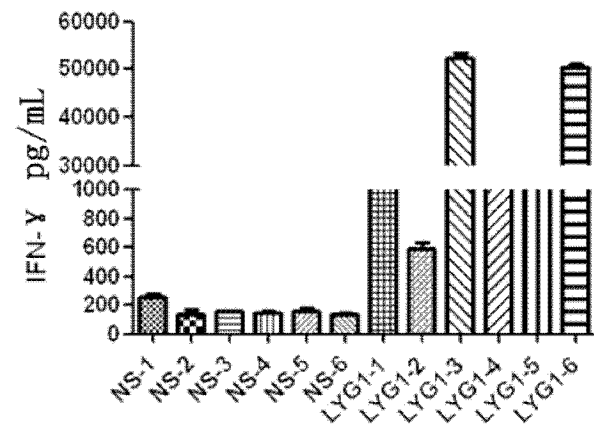


图8D

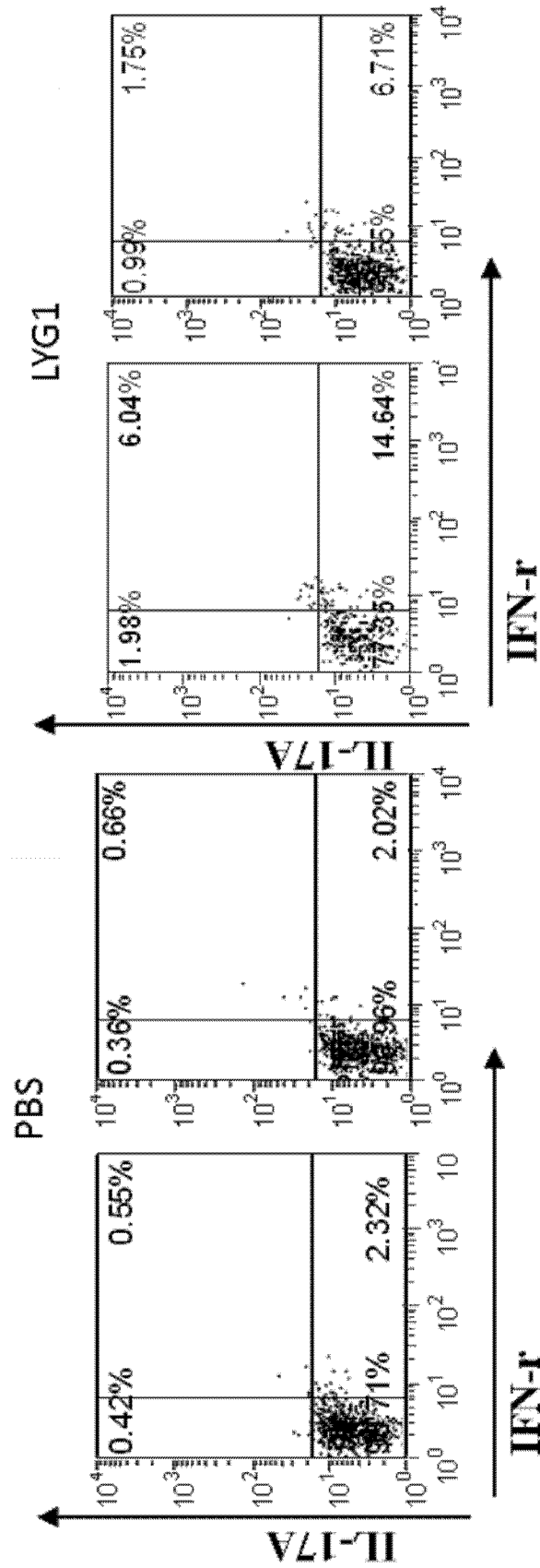


图8E

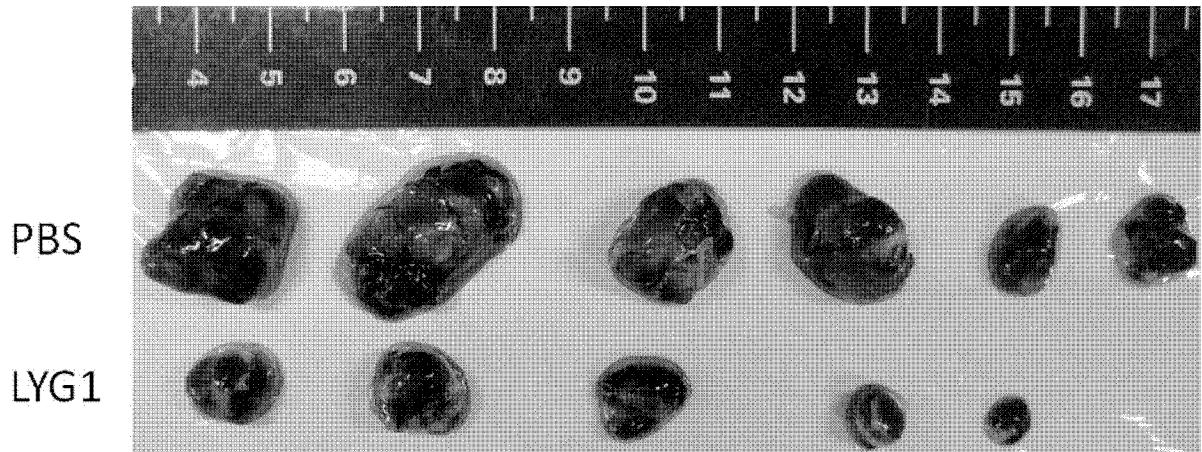


图9A

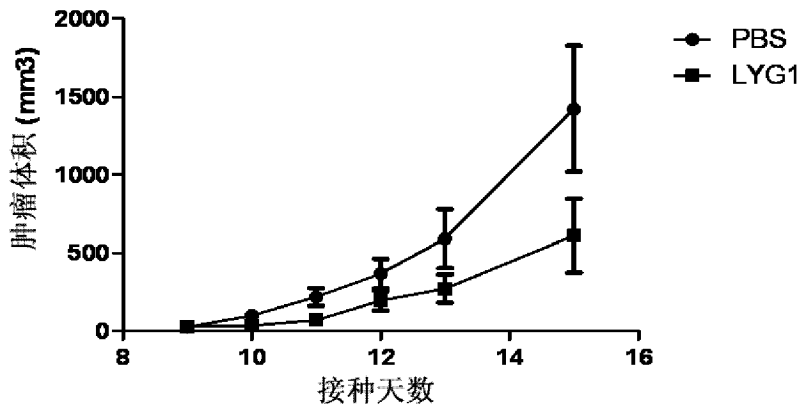


图9B

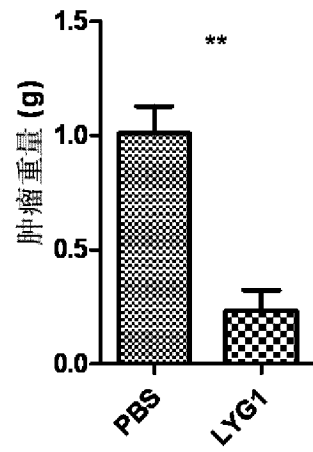


图9C

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	CN103073632B	公开(公告)日	2016-08-03
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		
审查员(译)	刘新蕾		
其他公开文献	CN103073632A		
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。

