

巨噬细胞的白细胞介素(IL-12)研究

张宗梁 宋秋宝 林明群 姚鑫

(中国科学院上海细胞生物学研究所生命科学联合开放实验室 上海 200031)

1994年3月和1995年5月,在美国召开的两次IL-12专题学术会议指出,细胞因子IL-12有可能广泛用来治疗和预防感染(如血吸虫、疟疾、结核、利什曼原虫和爱滋病)和肿瘤。因而IL-12具有“热门分子”和“魔弹”的美称^[1,2]。1995年7月23—29日,在旧金山举行第九届国际免疫学会上介绍了56篇IL-12研究摘要,进一步地提供了IL-12研究新进展。

IL-12主要由单核-巨噬细胞产生。鉴于IL-12在免疫反应中的重要调节作用,我们将这方面的新知识,结合我们实验室的初步研究作一综述,以期对IL-12的一般生物学功能、调节免疫反应的机理和它在单核-巨噬细胞产生的可能信号通路有一个初步了解,有助于未来应用IL-12作为免疫调节剂,对各种疾病的预防和治疗^[3-4]。

一、单核-巨噬细胞

1. 巨噬细胞和肿瘤消退

自18世纪以来,不时有临床报道指出,细菌感染后的某些病人,有肿瘤的自发消退。根据这些观察,1891年Willian B. Coley开始使用革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌制剂作肿瘤临床治疗。类似的细菌制剂,包括卡介苗(BCG),链球菌衍生的OK 432也都用来作类似治疗,一直到今。上述治疗获得的效果被解释为吞噬细胞的激活和细胞因子的释放^[2]。

2. 巨噬细胞的发现和功能

1880年,Elie Metchnikoff首先发现具有吞噬功能的巨噬细胞。他当时推测,巨噬细胞可能在机体免疫防御系统中起重要作用^[5]。单核-巨噬细胞(统称巨噬细胞)的功能可分为三

类:

(1) 组织维系 如成骨细胞负责骨质修复与重建;脾脏巨噬细胞清除死亡红、白血球;肝脏细胞处理肠道吸收的内毒素等。

(2) 免疫调节 巨噬细胞加工抗原,并作为抗原呈递细胞(APC),诱导特异免疫反应和调节免疫细胞的活性。巨噬细胞的免疫调节功能包括淋巴细胞增殖和抑制效应。

(3) 控制病原体 如抗细菌、真菌、寄生虫、病毒和肿瘤等。巨噬细胞扮演的多种功能维系了机体的自身稳定,巨噬细胞功能多样性和它们的异质性有关。

3. 巨噬细胞和IL-12

巨噬细胞分泌许多细胞因子,其中包括六年前发现的IL-12。研究表明,IL-12在感染疾病的免疫预防和治疗上具有诱人前景^[1,6-9]。

二、白细胞介素-12(IL-12)

单核-巨噬细胞和天然杀伤(NK)细胞是宿主抗病原体的第一防线细胞。宿主在感染和病菌入侵、肿瘤形成的早期,上述效应细胞的活化效应主要由 γ -干扰素(IFN- γ)介导的。IFN- γ 诱导单核-巨噬细胞激活和迁移。激活的单核-巨噬细胞产生诱导IFN- γ 生成的因子,称为白细胞介素-12(IL-12)。IL-12是一个较强的细胞因子诱导分子,特别是诱导T淋巴细胞和NK细胞产生IFN- γ 。IL-12作为造血生长因子诱导干细胞分化,T协助细胞(Th1)发育和CD8⁺T淋巴细胞的抗感染和抗肿瘤细胞毒性。

1. IL-12分子和受体

(1) IL-12的发现 一些科学工作者已经注意到,细菌感染的宿主产生一种因子能诱

导 IFN- γ 的产生, 这种因子在人 Epstein-Barr 病毒(EBV)转化的 B 淋巴细胞株是组成性表达的。因为这种因子能刺激天然杀伤细胞活性, 故被称作“天然杀伤细胞刺激因子”(NKSF)^[10-11]。NKSF 已从佛波酯刺激的 EBV 转化细胞株(RPMI-8866)纯化, 证明是一种杂二聚体结构分子^[8,11]。编码两条肽链的 NKSF 基因已被克隆, 具有生物活性的重组 NKSF 已在真核细胞表达^[12]。以后, 另一实验室在 EBV 转化的 B 淋巴细胞株(NC 37)的培养上清液中证明有一种活性分子, 协同 IL-2, 能诱导淋巴因子激活杀伤细胞(LAK)的产生, 取名为“细胞毒性淋巴细胞成熟因子”(CLMF)^[13]。编码 CLMF 的基因纯化与克隆后, 证明 NKSF 与 CLMF 是相同的细胞因子, 从而统一称为白细胞介素-12(IL-12)。

(2) IL-12 的分子特征和受体 迄今为止的细胞因子中, 仅 IL-12 具有杂二聚体结构。IL-12 蛋白由分子量为 40 kDa(p 40)和 35 kDa(p 35)的两条链, 经二硫键维系而成。p 40 亚单位 cDNA 编码 328 个氨基酸组成的蛋白链, 其中包括 22 个氨基酸组成的信号肽。306 个氨基酸构成的成熟蛋白(Mr = 34,699), 含有 10 个半胱氨酸和 4 个潜在的 N-连接糖化位点。p 35 亚单位 cDNA 编码了 197 个氨基酸组成的成熟肽(Mr = 22,513), 有 7 个半胱氨酸和三个潜在 N-连接糖化位点, p 40 与 p 35 亚单位分别含有 10%和 20%的糖。小鼠和人 p 40 亚单位氨基酸组成有 70%相同, 而小鼠和人 p 35 蛋白链仅 60%相同。

人 IL-12 的 p40 与 p35 基因分别位于 5 号和 3 号染色体上^[14]。p 40 亚单位和 IL-6 及纤毛神经生长因子受体的细胞外区域相同^[15], 而 p 35 亚单位与 IL-6 和 G-CSF 相同^[16]。

尽管 IL-12 与 IL-12 受体相互作用后的信号传递通路还不清楚^[17], 但 IL-12 受体, 象 IL-6 受体那样, 带有一个信号传递蛋白 gp 130 或 gp 130 样分子在 IL-12 反应细胞表面, 接

受和传递 IL-12 输入的信号^[18]。高亲和的 IL-12 受体已在激活的人外周血 CD 4⁺ 和 CD 8⁺T 淋巴细胞和 CD 56⁺NK 细胞发现^[17,19]。但近来有研究显示, IL-12 能迅速诱导 PHA 激活的人 T 淋巴细胞 p 44 和 p 54 蛋白酪氨酸的磷酸化, 其中 p 44 是促分裂原激活蛋白激酶(MAPK), 此酶活性在 IL-12 刺激后达高峰^[18]。近来有报告表明, IL-12 还能诱导人 T 细胞和 NK 细胞 Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAKs)家族中 JAK 2 与 TYK 2 和转录因子(STATs)的酪氨酸快速磷酸化。磷酸化的转录因子 STATs 和 DNA 结合, 启动了 IL-12 介导的基因表达^[20-22]。

2. IL-12 的生物活性

(1) IL-12 增强细胞溶解淋巴细胞反应 最早描述 IL-12 生物活性的研究是两篇关于增强 NK/LAK 细胞溶解肿瘤细胞活性的报道^[11,13]。IL-12 能较快诱导人外周血 NK 细胞对 NK 敏感的和 NK 不敏感的, 或载有抗肿瘤细胞抗体的肿瘤细胞溶解。IL-12 诱导 NK 细胞最大溶瘤活性是 3-35 pM, 而 IL-2 产生相同水平的细胞毒效应需 1000 pM 以上^[11]。IL-12 引起 NK 活性增强与 IL-2 无关。因为 IL-12 的效应不为抗 IL-2 与抗 IL-2 受体抗体所封阻。IL-12 除直接提高正常人 NK 活性外, 还能刺激 HIV 感染病人, 肿瘤病人 NK 细胞活性^[23]。

IL-12 和外周血淋巴细胞, 或纯化的 NK 细胞温育 3-7 天, 可诱导 LAK 细胞的产生。比较 IL-12 和 IL-2 对纯化 NK 细胞、LAK 细胞的抗肿瘤能力, IL-12 诱导 LAK 细胞的溶瘤效应是 IL-2 介导最大活性的 50%, 这可能与 IL-12 诱导 NK 增殖能力较低有关。以低浓度 IL-2 和 IL-12 合并使用可产生超叠加的 LAK 溶瘤效果。IL-12 介导的 LAK 激活, 同样不依赖 IL-2, 因为 IL-12 诱导 LAK 活性不会因加入抗人 IL-2 抗体而降低。

IL-12 除了能增加 NK/LAK 细胞抗瘤效应外, IL-12 还能上调这些细胞的表面抗原(主要

3. IL-12 促进造血干细胞形成

IL-12 是造血干细胞的协同生长因子^[20], 它能增强干细胞因子诱导的骨髓细胞生成, 或集落刺激诱导的干细胞增殖。近有报告指出,

瘤和 Lewis 肺癌生长的功效^[24,25]。

IL-12 介导的抗肿瘤效应可能通过一系列步骤, 首先 IL-12 诱导 NK 和/或 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 和其它细胞因子, 它们对宿主抗

是粘附分子)和受体。应用纯化的NK细胞作研究,IL-12不仅增强了NK细胞表面CD56分子,而且还能增加IL-2受体 α 和 β ,TNF受体(75 kDa),CD2,ICAM-1和LFA-1分子在细胞表面的表达。

(2) IL-12诱导的细胞因子和免疫反应

IL-12诱导IFN- γ 和Th1细胞免疫;IL-12诱导T淋巴细胞和NK细胞产生多种细胞因子,如IFN- γ ,TNF- α ,GM-CSF,M-CSF,IL-2,IL-3和IL-8。IL-12最显著的生物活性之一是诱导休止和激活T细胞以及NK细胞产生IFN- γ 。IL-12单独,或与IL-2协同,诱导人未分离周围血淋巴细胞产生IFN- γ 。此外,IL-12能协同植物血球凝集素、佛波酯、抗CD3抗体和淋巴样细胞上的同种抗原,刺激IFN- γ 产生,诱导Th1细胞增殖。因此,IL-12成为早期细胞免疫开关,即上调Th1反应,降低与抗体相关的Th2反应。

抗原呈递时,抗原呈递细胞(APC)把MHC-II分子上的抗原传递给T协助细胞(Th),还需要一个共同刺激信号,即通过APC表面膜结合辅助因子B7和Th细胞产生的IL-12,协同T细胞受体和CD3分子(TCR/CD3)以及CD28分子间的相互作用,诱导Th1产生IFN- γ ,使对抗原起反应的、已分化的Th1细胞增殖。因此,IL-12诱导的抗原特异免疫,Th1细胞的产生,受IFN- γ 的协助^[3]。

Th克隆细胞用抗原呈递细胞(APC)去刺激时是不能引起Th细胞增殖的,必需有可溶性细胞因子作为“第二信使”方能引起Th1增殖。尽管IL-1是一个颇强的细胞因子,因Th1克隆上无IL-1受体,不能介导Th1细胞的激活和增殖。而IL-12的直接靶细胞是Th1细胞(而不是Th2)细胞,并诱导Th1细胞IL-2受体 α 链的表达。加入抗IFN- γ 抗体不影响IL-2受体 α 链的产生。其它细胞因子,如IL-3,GM-CSF,和TNF- α ,都不能替代IL-12的第二信号功能。然而,IL-1仅能诱导

抗原呈递细胞介导的Th2克隆的IL-2受体 α 链的表达和增殖。

IL-12和IL-1主要由巨噬细胞产生,因此在抗原呈递过程中激活或调变巨噬细胞产生的IL-12和IL-1分别控制了Th亚类的生长和增殖^[24]。换言之,巨噬细胞IL-12/IL-1的分泌决定了Th1和Th2之间的平衡。

IL-12诱导 $\gamma\delta$ T细胞产生IFN- γ :研究揭示,IL-12是上调Th1细胞的主要开关。Th1细胞来源于胸腺外已定型的 $\alpha\beta$ 谱系。在胸腺内,其T细胞受体基因重排和选择,定型为CD4⁺CD8⁻和CD4⁻CD8⁺的 $\alpha\beta$ T细胞亚群。前者通过T细胞受体(TCR)识别抗原呈递细胞上MHC II蛋白,而后者识别MHC I蛋白。CD4⁺CD8⁻和CD4⁻CD8⁺细胞成熟后,进入淋巴样组织,在抗原与细胞因子的作用下发育为Th1和Th2细胞。

然而,胸腺外定型的 $\gamma\delta$ T淋巴细胞,在胸腺经TCR基因重排和选择分化为CD4⁻CD8⁻表型细胞,成熟后进入不同的外周组织,子宫与皮肤。 $\gamma\delta$ T细胞的主要功能是抗感染、抗肿瘤和调节体液免疫反应^[25]。

最近的研究揭示,热灭活的李司忒菌在腹腔免疫小鼠后,引起 $\gamma\delta$ T细胞分泌大量的IFN- γ 和 $\gamma\delta$ T细胞一定程度的增殖。 $\gamma\delta$ T细胞在感染部位的大量累积和IFN- γ 的显著分泌在控制机体的感染起了重要作用。这是腹腔巨噬细胞通过分泌的IL-12/IL-1调节 $\gamma\delta$ T细胞,控制感染的一个重要例子^[26]。此前,有些报告指出,在感染结核分枝杆菌的小鼠引流淋巴结;鼻内用流感病毒感染小鼠的肺部;血吸虫病感染后肝脏的肉芽肿内;感染锥虫、疟原虫的小鼠脾脏内以及结核型的麻风病人和利什曼患者皮肤病灶区有大量的 $\gamma\delta$ T累积。此外,在急性期和恢复期的疟疾病人和爱滋病患者的外周血中 $\gamma\delta$ T细胞数的增多。上述 $\gamma\delta$ T的累积或激活是否也与巨噬细胞分泌的IL-12与IL-1有关是引起关注的问题,估计这个问题不久会有明确的回答。

IL-12 诱导 LAK 产生 TNF- α ；实验指出，IL-12 和 IL-2 诱导的 LAK 细胞溶解肿瘤细胞活性，其中 40—90% 可为抗人 TNF- α 的抗体所抑制。

IL-12 诱导 CTL 产生 IL-2；除上述效应外，IL-12 能增强特异的同种异基因细胞毒性淋巴细胞(CTL)反应。在体外加入 IL-12，能增加人外周血淋巴细胞对 X-射线照射处理的同种异基因黑色素瘤细胞反应。激起 1/2 最大反应的 IL-12 浓度为 1-5 pM(10 倍低于 IL-2 的诱导浓度)。IL-12 诱导 CTL 反应的增强需要原位产生 IL-2。分析 IL-2 调节 IFN- γ 合成的机制揭示，IL-12 增加了 IFN- γ 的基因转录。IL-12 与 IL-2 间的协同效应可能与胞浆 IFN- γ mRNA 的稳定性有关^[27]。

IL-12 诱导激活的 B 淋巴细胞增殖、分化和抗体产生；Gately 实验室曾报道，在激活的 B 淋巴细胞表面未曾观察到高亲和的 IL-12 受体^[9,28]。最近他们应用流式细胞仪纯化的 B 淋巴细胞和 RT-PCR 技术观察到 IL-12 R β 链不仅在人的 T 和 NK 细胞上而且在 B 细胞株(SKW 6.4)表面有高水平的组成性表达的。此外，激活的人扁桃体 B 淋巴细胞上也表达有 IL-12 R β 链^[28]。

近来的另一报道指出，IL-12 加入有金黄色葡萄球菌和 IL-2 刺激的 B 淋巴细胞(经流式细胞仪纯化，纯度 99% 以上)，能增强 B 淋巴细胞产生广谱的免疫球蛋白。IL-12 浓度即使低至 0.2 ng/ml，仍能 3—4 倍地增加 IgG，IgM 和 IgA 的分泌。应用其它辅助细胞因子 IL-3，IL-6 和 IL-10 比较证明，IL-12 是最强的调变因子，它与 IL-2 能共同刺激 B 淋巴细胞的增殖、分化和免疫球蛋白的分泌^[29]。IL-12 调变 B 淋巴细胞的另一功能是诱导它们产生 IFN- γ 。

3. IL-12 促进造血细胞形成

IL-12 是造血干细胞的协同生长因子^[30]，它能增强干细胞因子诱导的骨髓细胞生成，或集落刺激诱导的干细胞增殖。近有报告指出，

IL-12 能协同干细胞生长因子 SCF 和 IL-4 诱导红细胞表面红血球生成素受体的表达和红血球的生成^[31]。IL-12 和钢因子(SF)，IL-3 或/和其它造血因子，不仅增加干细胞的存活与增殖，还能有效支持前淋巴细胞的生长和形成^[3]。

4. IL-12 的抗寄生虫和抗肿瘤转移作用

基于上述 IL-12 的生物活性，说明 IL-12 是一个很强的免疫调变剂^[17,32]和治疗剂。它已有效地用来治疗和预防寄生虫、病毒和肿瘤。疗效机制是 IL-12 诱导 Th 1 的发育和 IFN- γ 的产生，这对降低 Th 2 反应起重要作用。Th 2 细胞产生 IL-4，IL-10，抑制许多 Th 1 细胞的效应功能，如阻遏单核细胞和巨噬细胞的细胞因子分泌和 O₂⁻，NO 的产生，抑制巨噬细胞的细胞毒性和 Th 1 介导的延缓型超敏反应^[33]。

IL-12 上述开启细胞免疫反应的功能，这对抗寄生虫、细菌、病毒和肿瘤是重要的，因为宿主抵抗上述病理原需要细胞介导的免疫反应。

为了试验 IL-12 抗利什曼病的效果，在感染利什曼原虫的当天，注射 0.1—1 μ g 的 IL-12，BALB/c 小鼠感染利什曼病的程度降低 1,000—10,000 倍，其治愈率可达 89%^[17]。这是 IL-12 降低了 IL-4 和增加了 Th 1 型反应所致。

同样，应用适量的 IL-12 还可防止弓形虫(*Toxoplasma*)感染和淋巴球性脉络丛脑膜炎病毒在体内复制。

应用 IL-12 可以抗小鼠 B 16 F10 黑色素瘤的肺转移和 M 5076 网织细胞肉瘤的肝转移。除了 IL-12 的抗转移作用外，IL-12 还具有抗黑色素瘤，网织细胞肉瘤，肾细胞癌，结肠癌，肉瘤(MCA-105 和 KA 31)，B 细胞淋巴瘤和 Lewis 肺癌生长的功效^[3,5,9-10,17]。

IL-12 介导的抗肿瘤效应可能通过一系列步骤，首先 IL-12 诱导 NK 和/或 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 和其它细胞因子，它们对宿主抗

肿瘤效应是十分重要的。此外, $\text{IFN-}\gamma$ 可以激活肿瘤部位的巨噬细胞和促使 CD 8^+ 细胞毒性 T 细胞的产生。这些效应细胞抑制肿瘤的生长和/或肿瘤消退。

5. IL-12 作为疫苗佐剂

IL-12 作为有效的药物治疗剂外, 已考虑用来作为疫苗佐剂。使用可溶抗原三硝基苯-血兰蛋白(TNP-KLH)免疫动物时, 辅助以 IL-12, 小鼠产生预示的 Th 1 型反应, 增加 $\text{IFN-}\gamma$ 和抑制了 Th 2 细胞的 IL-4 水平。宾夕法尼亚大学研究者们用可溶性利什曼抗原(SIA)加上 IL-12 佐剂, 完全防止了易感小鼠株(BLAB/C)对利什曼原虫的感染, 目前类似实验已在灵长类动物进行^[1]。

三、巨噬细胞激活的信号传递的多种信号通路

引起巨噬细胞激活的配基分子是广泛多样的。其中脂多糖, 化学趋向肽(N-fMLP, N-甲酰甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸), 集落刺激因子(CSFs), $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 等分子对巨噬细胞的激活效应最为显著^[33-35]。

由刺激起始的细胞反应和功能调节, 是由细胞的信号传递系统介导的, 它具有快速、可逆地在蛋白丝氨酸/苏氨酸, 或酪氨酸残基上磷酸化的特点。引起巨噬细胞反应的信号通路基本上有如下四种类型: 1) 膜受体-G 蛋白(异三聚复合物)信号通路; 2) 受体内蛋白酪氨酸激酶(PTK)信号通路; 3) 受体(受体内不含 PTK)-胞浆 PTK 信号通路; 4) $\text{IFN-}\gamma$ 介导的 JAK-STAT 通路^[32]。

四、免疫调变巨噬细胞的信号传递

80 年代中期, 我们实验室观察到脂多糖(LPS)处理人和小鼠抑制性巨噬细胞, 可把抑制性巨噬细胞转变为能增强 T、B 淋巴细胞及 NK 细胞活性的新表型巨噬细胞。这类免疫调

变巨噬细胞保持或增强了它原有的抗肿瘤效应。近来, 我们观察到免疫调变巨噬细胞伴随有重要信号分子的激活和 IL-12 的分泌。但是, 免疫调变机理或信号通路是不清楚的。

1. LPS 和 PMA 介导的小鼠抑制性巨噬细胞 PKC 同功酶的变化

LPS 诱导的抑制性巨噬细胞行为或功能的显著改变, 清楚地提示, LPS 介导的免疫调变效应是通过从膜到核的信号传递通路来介导的。PKC 在信号传导中所起的关键作用与许多细胞功能的活化有关。最近, 我们实验室的初步实验表明, LPS 与佛波酯启动的小鼠腹腔巨噬细胞 PKC- α 和- ϵ 从细胞质到细胞膜的转位动力学和内源底物磷酸化呈相应的关系。这说明, LPS 介导的免疫调变和 PKC- α 与 PKC- ϵ 活化相关。

2. LPS 和 PMA 介导的 Raf-1, MAPK 和 cPLA 2 激活

MAPK 通过磷酸化胞浆磷酸脂酶 A 2 (cPLA 2) 使 cPLA 2 活化。cPLA 2 具有特异切割磷脂 Sn-2 位花生四烯酸的功能, 释放的花生四烯酸经环氧化酶产生前列腺素, 作为细胞内第二信使。我们以前的研究发现, 免疫调变巨噬细胞产生大量的前列腺素(PGE 2), 这表明, LPS 介导的 PKC 活化可能和 cPLA 2 激活有关。为了进一步证明这种可能性, 我们应用 LPS 和 PMA 处理小鼠抑制性巨噬细胞, 重复试验证明, LPS 和 PMA 显著增大了 cPLA 2 的活性。

鉴于 cPLA 2 是 MAPK 的下游信号, 似乎清楚提示我们, PKC 信号通路和 Raf-1-MAPK-cPLA 2 之间存在着“对话”。

为了论证这种可能性, 我们应用 PTK 抑制剂, Herbimycin A 去封阻 PTK-Ras 途径介导的 Raf-1 激活, 观察 LPS 和 PMA 对 Raf-1 和其下游信号分子的影响, 并用 Western 印迹方法证明, LPS 和 PMA 引起了 Raf-1 和 MAPK 的磷酸化(迁移淌度滞缓效应)。

与此同时, 我们进一步观察 LPS 和 PMA

对 cPLA 2 活性的影响。实验发现, LPS, PMA, A 23187(钙离子载体)和 Okadaic acid (Raf-1/ MAPK 激活剂, 或蛋白磷酸酯酶 I 型和 II A 型的特异抑制剂)显著刺激了 cPLA 2 的活性。这进一步论证了免疫调变巨噬细胞 PGE₂ 的产生与 cPLA 2 活化相关; 而且, cPLA 2 的活化可能是通过 PKC 的激活, Raf-1 与 MAPK 的活化介导的。上述结果表明, PKC 信号途径的活化, 以及与 Raf-1-MAPK 通路间的“对话”是免疫调变巨噬细胞所需要的。近来, 我们观察到 LPS 介导的免疫调变伴随有 IL-12 产生, 这不仅表明, 上述信号通路和 IL-12 分泌有关, 而且提示, IL-12 参与了免疫调变效应。

五、细胞内感染对细胞信号的影响

诸多的细胞内微生物, 以损害细胞内信号的完整性, 致使巨噬细胞去激活(deactivatin)。例如, 感染有分枝杆菌的巨噬细胞, 对 IFN- γ 细胞因子反应低下和分枝杆菌细胞壁的成分有关。从结核分枝杆菌分离纯化的 Lipoarabino-mannan, 具有抑制 PKC 活性的功能, 导致 IFN- γ 诱导 γ 1, HLA-DRA 的基因表达和抗微生物、抗肿瘤活性的缺陷。此外, 结核分枝杆菌外层一种特殊类脂成分脑苷脂 (Sul fatide), 会使 PKC 活性下降, 抑制呼吸爆破和杀微生物, 杀肿瘤的能力。

巨噬细胞受利什曼原虫感染, 或吞噬了疟原虫感染的红血球后, 导致 Ca²⁺ 信号和/或 PKC 依赖的细胞信号的障碍。前者抑制了抗原呈递, 呼吸爆破, c-fos, MHC-II 基因表达和 IL-1 的产生。后者抑制细胞吞噬和超氧离子生成^[33]。

上述例子说明, 细胞内病原体感染导致巨噬细胞的去激活。尽管尚无文献报道感染的巨噬细胞信号传导的损害是否引起 IL-12 分泌的障碍, 估计这种可能性是存在的。

六、其它

1. 产生 IL-12 的细胞

自 1989 年首先报告 IL-12 以来, IL-12 已证明由单核细胞、巨噬细胞、嗜中性细胞、树突细胞和产生抗体的 B 淋巴细胞产生。

2. LPS 诱导人髓细胞, 单核细胞白血病细胞株产生 IL-12

鉴于人单核细胞是产生 IL-12 的一类主要细胞, 因此研究者们饶有兴趣地研究了人髓母细胞株(KE-1 和 Ti-1), 前髓细胞(HL-60 和 ML-3) 和单核细胞白血病细胞株(U 937 和 THP-1)产生 IL-12 的能力和分化诱导的关系。研究表明, 上述六个细胞株中, 有三个细胞株(HL-60, ML-3 和 THP-1) 通过 DMSO 处理后, LPS 能显著刺激它们产生 IL-12。实验指出, ML-3 细胞经 DMSO 处理 24 hr, 随后 LPS 作用 18 hr, 引起了 IL-12 p 40 的 mRNA 显著表达。

应用通常的分化诱导剂维生素 A 酸, 1 α , 25(OH)₂D₃, IFN- γ 进行观察, ML-3 的分化状态与 IL-1 β 与 TNF- α 分泌相关, 相反 IL-12 的表达不呈相应关系。

实验指出, IFN- γ 能增强 LPS 对 IL-12 的诱导, 提示它在体内有可能在感染期间调节免疫反应^[36]。而 IL-10 和类固醇激素(地塞米松)抑制了人髓样细胞株 IL-12 的产生。上述人髓样细胞株无疑为 IL-12 基因表达的调节控制提供了良好模型。

3. IL-12 产生的信号通路

本文介绍激活巨噬细胞的信号通路, 并指出脂多糖(LPS)的免疫调变效应和 IL-12 的产生, 与 PKC- α , - ϵ 的转位, Ras-Raf-1-MAPK-cPLA 2 激活相关。金黄葡萄球菌是 IL-12 的很强诱导剂, 它与巨噬细胞受体作用后诱导 IL-12 产生的信号通路和 LPS 介导的信号途径有什么异同, 有待研究阐明。了解 IL-12 产生的信号控制机理有助于指导未来的临床实践。

4. IL-12 的治疗

研究表明, IL-12 有可能用来治疗感染疾病, 肿瘤和 IgE 介导的过敏反应和抗辐射效应。与 IL-2 相比, IL-12 在肿瘤的治疗中更为有效和有较好的治疗指数。IL-12 在体内的稳定性, 有可能使 IL-12 成为未来细胞因子用以临床治疗中的一个佼佼者。应该指出, 象其它细胞因子一样, 过高的剂量, 不当的注射途径和部位以及错误的注射时间会给机体带来毒性伤害和负面效果。

为了克服以上缺点, 采用基因治疗的方法, 可能另辟蹊径。例如, 运用 IL-12 转染同种同基因或同种异基因的纤维母细胞, 随后注入肿瘤或其它部位可抑制肿瘤的生长。

Lotze 实验室应用 IL-12 遗传工程技术, 将小鼠 IL-12 的 p 40 和 p 35 基因转染到纤维母细胞, 能以剂量依赖方式有效抑制甲基胆蒽诱发肉瘤 MCA 207 的生长。此外, 将载有 IL-12 基因的纤维母细胞植入肿瘤免疫原性低下的 MAC 102 和 MC 38 肉瘤的对侧腋下, 配合低剂量的 IL-2 注射, 能显著降低肿瘤的肺转移。组织学检查发现, 在消退的肿瘤内伴随有 CD 4⁺ 和 CD 8⁺T 细胞和巨噬细胞的存在。在每周 IL-12 治疗时, 检查肝、肾指标, 表明肝和肾的功能正常。上述三个肿瘤的治疗研究表明, 应用 IL-12 基因工程技术是安全、有效的。

鉴于上述实验的成功, 源于逆转录病毒, 包装有人的 IL-12 p 40 和 p 35 基因质粒已转染肿瘤患者皮肤纤维母细胞, 每周接种到患者的乳癌, 黑色素瘤和头颈部肿瘤部位⁽⁶⁾, 可以预料其疗效不久将会报道。

据统计, 全世界血吸虫病患者约为 2.5 亿。每年新感染结核和疟疾的患者分别为 8 百万和 3—5 亿, 其它象利什曼病和爱滋病的患者也分别有一千二百万和一千四百万之多。鉴于 IL-12 在实验动物中的显著治疗和预防效果, 很有可能在不久的将来, IL-12 在临床的免疫预防和抗感染治疗中作出重要贡献。

七、小 结

1. IL-12 是 70 kDa 杂二聚体结构的细胞因子, 由两个共价连接的 p 35 和 p 40 分子组成。

2. IL-12 促进外周血淋巴细胞和 NK 细胞的成熟和激活。IL-12 和 IFN- γ 合作, 促进 Th 1 (抗原特异协助 T 1 细胞, 主要产生 IFN- γ 和 IL-2) 细胞的增殖和分化。IL-12 也能诱导经 IL-2 刺激的 B 细胞分化。

3. IL-12 能诱导休止和激活的 CD 4⁺T 细胞, CD 8⁺T 细胞和 NK 细胞产生 IFN- γ 。

4. IL-12 增强激活的 NK 细胞和 T 细胞的增殖, 增强 NK/LAK 细胞的细胞溶解效应和特异 CTL 反应。

5. IL-12 能协同 IL-2, PHA, 抗 CD 3, 共同刺激分子佛波酯增强 T 细胞的增殖。

6. IL-12 作为一种佐剂, 在促进对抗原免疫的 Th 1 细胞的发育中起重要作用, 并很显著地抑制产生 IL-4 的 Th 2 细胞的生长和发育。

7. IL-12 具相当的治疗潜能, 已显示对细胞内病毒、细菌和寄生虫有良好的治疗效果。

8. IL-12 遗传工程的抗肿瘤治疗表明经 IL-12 基因制备的纤维母细胞体内注射后, 能抑制可触诊的肿瘤和带瘤小鼠已有的肺转移。应用含人 p 40, p 35 基因源于逆转录病毒的质粒转染人纤维母细胞瘤后已用于临床病人的肿瘤治疗。

参 考 文 献

- [1] Hall, S. S. IL-12 at the crossroads. 1995, *Science*, 268: 1432—1434.
- [2] Trinchieri, G., and Scott, P. 1994 The Role of Interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunology Today*, 15: 460—463.
- [3] Trinchieri, G. 1995, Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate

- resistance and antigen-specific adaptive immunity *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 251—276.
- [4] Lavigen, L. M., Scohopf, L. R., Chung, C. L., and Sypek, J. P. 1995, Effect of rm IL-12 on in vivo cytokine response of C 57 BL/6 mice systemically infected with *C. albicans*. The 9th International Congress of Immunology, 23—29 July, 1995, San Francisco, California USA, Abstract Book, 5302.
- [5] Turpin, J. A. and Lopez-Berestein G. 1994, Differentiation, maturation, and activation of monocytes and macrophages: functional activity is controlled by a continuum of maturation. pp 72-97 In: *Mononuclear Phagocytes in Cell Biology*, Edited by G. Lopez-Berestein and J. Klostergaard, CRC Press.
- [6] Zitvogel, L., Tahara, H., Robbins, P. D., Storkus, W. J., Clark, M. R., Nalensnik, M. A., and Lotze, M. T. 1995, Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12 Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J. Immunol.*, 155: 1393—1403.
- [7] Wynn, T. A., Cheever, A. W., Jankovic, D., Poindexter, R. W., Caspar, P., Lewis, F. A. and Sher, A. 1995, An IL-12 based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*. 376: 594—596.
- [8] Skeen, M. J Miller, M. A., and Ziegler, H. K. 1995. In vivo regulation of murine macrophage IL-12 production. The 9th International Congress of Immunology, 23—29 July, 1995, San Francisco, California USA, Abstract Book, 473.
- [9] Brunda, M. J., Luistro, L., Hendrak, J. A., Fountoulakis, M. Garotta, G., and Gately, M. K. 1995, Role of interferon- γ in mediating the antitumor efficacy of interleukin-12. *J. Immunotherapy*. 17: 71—77.
- [10] Gately, M. K. 1993, Interleukin-12: a recently discovered cytokine with potential for enhancing cell-mediated immune responses to tumors. *Cancer Investigation* 11: 500—506.
- [11] Kobayashi, M., Fitz L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trichieri, G. 1989, Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 170: 827—846.
- [12] Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M., Kelleher, K., Hermann, S. H., Clark, S. C., Azzoni, L., Chan, S. H., Trinchier, G., and Perussia, B. 1991, Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.*, 146: 3074—3081.
- [13] Stern, A. S., Podlaski F. J., Hulmes J. D., Pan Y. E., Quinn P. M., Wolitzky A. G., Familletti P. C., Stremlo D. L., Truitt T., Chizzonite R., and Gately M. K. 1990, Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87: 6808—6812.
- [14] Sieburth, D., Jabs, E. W., Warrington, J. A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., Kelleher, K., Huebner, K., Wasmuth, J. J., Wolf, S. F. 1992, Assignment of gene encoding a unique cytokine (IL-12) composed of two unrelated subunits to chromosome 3 and 5. *Genomics*. 14: 59—62.
- [15] Gearing, D. P., and Cosman, D. 1991, Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor. *Cell*, 66: 9—10.
- [16] Merbery, D. M., Wolf, S. F., Clark, S. C. 1992, Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family. *Immunology Today*, 13: 77—78.
- [17] Brunda, M. J. 1994, Interleukin-12. *J. Leukocyte Biology*, 55: 280—288.
- [18] Chua, A., Chizzonite, O. R., Desai, B. B., Truitt, T. P., Nunes, P., Warrior, R. R., Presky, D. H., Levine, J. F., Gately, M. K., and Gubler, U. 1994, Expression cloning of a human IL-12 receptor component A new member of the cytokine receptor superfamily with

- strong homology to gp 130. *J. Immunol.*, 153: 128—136.
- [19] Desai, B. B., Quinn, P. M., Wolitzky, A. G., Mongini, P. K. A., Chizzonite, R., and Gately, M. K. 1992, IL-12 receptor. II Distribution and regulation of receptor expression. *J. Immunol.*, 148: 3125—3132.
- [20] Pignata, C., Pignata, C., Jasbinder S., Cossette L., Felech S. L., and Rotz J. 1994, Interleukin-12 induce tyrosine phosphorylation and activation of 44-kD Mitogen-Activated Protein Kinase in human T Cells. *Blood*, 83: 184—190.
- [21] Bacon, C. M., McVicar D. W., Ortaldo, J. R., Rees, R. C., O'Shea, J. J. and Johnston, J. Interleukin 12(IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK 2 and TYK 2; Differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. 1995, *J. Exp. Med.*, 181: 399—404.
- [22] Bacon, C. M., Johnston, J. A., Petricoin, III E. F., McVicar, D. W., Ortaldo J. R., Rees R. C., Larner A. C., and O'Shea J. J. 1995, Interleukin-12 signal transduction; Involvement of JAK kinases and STAT proteins. The 9th International Congress of Immunology, 23—29 July, 1995, San Francisco, California USA, Abstract Book, 1835.
- [23] Chehimi J., Starr S., Frank I., Rengaraju M., Jackson S. J., Llanes C., Kobayashi M., Perussia B., Youg D., Nickbarg E., Wolf S. F., Trinchieri G. 1992, Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and HIV-infected patients *J. Exp. Med.*, 175: 789—796.
- [24] Yanagida, T., Tetsuya Y., Kato, T., Igarashi, O., Inoue, T. and Nariuchi, H. 1994, Second signal activity of IL-12 on the proliferation and IL-2 R expression of T helper cell-1 clone. *J. Immunol.*, 152: 4919—4928.
- [25] Hass, W., Pereira, P., and Tonegawa, S. 1993, Gama/Delta cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 11: 637—685.
- [26] Sheen, M. J. and Ziegler, H. K. 1995, Activation of $\gamma\delta$ T cells for production of IFN- γ is mediated by bacteria via macrophage-driven cytokines IL-1 and IL-12. *J. Immunol.* 154: 5832—5841.
- [27] Chan, S. H., Kobayashi, M., Santoli, D., Perussia, B., and Trinchieri, G. 1991, Mechanisms of IFN- γ Induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2. *J. Immunol.*, 148: 92—98.
- [28] Wu, C. Y., Warriar, R., Carvaial, D., Chua, A., Minetti, L., Mongini, P., Chizzonite R., Tresky, D., Gubler, U., and Gately, M. 1995 Biological function and distribution of human IL-12 R β chain. The 9th International Congress of Immunology, 23—29 July, 1995, San Francisco, California USA, Abstract Book, 1771.
- [29] Jelinek, D. F., and Braaten, J. K. 1995, Role of IL-12 in human B lymphocyte proliferation and differentiation. *J. Immunol.*, 154: 1606—1613.
- [30] Jacobsen, S. E., Veiby, O. P., and Smeland, E. B. 1993, Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 178: 413—418.
- [31] Dybedal, I. S., and Jacobsen, S. E. W. 1995, IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor. *J. Immunol.*, 154: 4950—4664.
- [32] Parlman, E., Heinzl F. P., Hazlett, F. E., and Kazura, J. W. 1995, IL-12 modulation of T helper to the Filarial Helminth, *Brugia Malayi*. *J. Immunol.* 154: 4658—4664.
- [33] Reiner, N. E. 1994, Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. *Immunology Today*, 15: 374—381.
- [34] Hamilton, T. A., Ohmori, Y., Tebo, J. M., Narumi, S., and Tannenbaum, C. S. 1994, Transmembrane and intracellular signaling events in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. pp 83—97. In: *Macrophage-Pathogen Interaction*. Edited by Zwilling, B. S. and T. K. Eisenstein. Marce Dekker Inc.
- [35] Eilers, A., Georgellis, D. Klose, B.,

Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A., Wilks, A. F., and Decker, T. 1995, Differentiation-regulated serine phosphorylation of STAT 1 promotes GAF activation in macrophages. *Mol. Cell Biol.*, 15: 3579—3568.

[36] Kubin, M., Chow, J. M., and Trichieri,

G. 1994, Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor α , and IL-1 β production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 83: 1847—1855.

核骨架与真核基因复制起点

何明亮 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所 200031)

(中科院上海生命科学联合开放实验室)

一、核骨架

核骨架(nuclear scaffold)又名核基质(nuclear matrix, NM),是细胞核内一种动态亚组分结构,其功能是将DNA组织成相对独立的区域(domain),并为其提供专一性的转录、复制及RNA加工的控制位点^[1]。它在形态上为一种细胞核内不溶的骨架网络^[2],包括核纤层(lamina)、内层蛋白纤维颗粒、残留的核仁和核孔复合体^[3]。它普遍存在于真核细胞中,维持了细胞核的基本形态^[3]。

1. 核骨架的基本成分

核骨架是用非离子去垢剂处理细胞核,抽提掉核膜后再用DNase I轻度消化,随后用盐去掉几乎全部组蛋白和绝大部分非组蛋白,留下一个类似细胞核的残存结构^[2]。它包含占细胞核总蛋白10%左右的非组蛋白。核骨架似乎深埋入中等纤维(intermediate filaments)网络之中,通过核纤层与细胞质直接相连^[4]。

核纤层是核骨架中最稳定的结构,主要为分子量60—80 Kd的蛋白家族组成。其中以lamin A、B、C为主,它们属中等纤维蛋白超基因家族,在核膜下形成规则的纤维蛋白网孔,纤维直径为10 nm^[6]。核内lamin的种类

和比例随细胞的类型和分化状态而发生变化^[5,7]。Lamin的磷酸化导致有丝分裂时核纤层的崩解。LaminB总是与核膜结合,是中等纤维在核膜上的固着位点^[8]。核孔复合体总是与核纤层结合在一起,为一组GlcNAc-O-Ser和GlcNAc-O-Thr糖修饰蛋白,包适gp 190、gp 62等。另外还有210、180、145、130、100、63、58、54和45 Kd等一系列蛋白。这些核孔蛋白的主要功能是完成核内与细胞质内生物大分子的物质交换。

核骨架在真核细胞染色质空间组织、基因复制、基因表达调控、RNA加工和转运过程中都起着极其重要的作用^[9,10]。单向和双向凝胶电泳发现,除拓扑异构酶II(TOP II)以外,内层网络(internal network)还包含数百种低丰度的非组蛋白,其中80%以上为酸性蛋白。许多已经确定的核骨架结合蛋白与复制起始调控有关,包括:

(1) 与信号传导有关的细胞调控蛋白^[11-13]

包括癌基因产物c-myc、v-myc等;抑癌基因产物Rb、p 53;病毒蛋白;SV-40 T抗原;腺病毒E1A、E1B蛋白;多瘤病毒VP1、VP2蛋白等。另外蛋白激酶C、钙调蛋白(CaM)、热休克蛋白(hsp),cAMP反应元件结合蛋白