

- 165.
- [22] Rubin, G. M., 1978, *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.*, 42: 1041—1046.
- [23] Fussell, C. A., 1975, *Chromosoma (Berl)*, 50: 201—210.
- [24] Lipps, H. J., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 4104—4107.
- [25] Oka, Y. and C. A. Thomas, 1987, *Nuc. Ac. Res.*, 15: 8877—8898.
- [26] Lundblad, V. and J. W. Szostak, 1989, *Cell*, 57: 633—643.
- [27] Harley, C. B. et al., 1989, *Nature*, 345: 458—460.
- [28] Wison, E. B., 1924, In *The Cell in Development and Heredity*, 3th edition, pp. 251—276, The Macmillan Co., New York.
- [29] Mathod, D. et al., 1984, *Nature*, 308: 414—421.
- [30] Shoeman, R. L. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 18744—18749.
- [31] Olins, A. L. et al., 1989, *J. Cell Biol.*, 109 (4): 317 a.
- [32] 汪国顺等, 1992, *实验生物学报*, 25: 185—189.

人嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8的研究进展

金冬雁, 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京, 100052)

细胞因子(cytokine)是由人体及动物体的各种细胞所产生的一类负责调节免疫反应强度与时相的低分子量(<80 kD)糖蛋白, 通常以自分泌或旁分泌的方式在一定的时间与空间内通过与受体结合而发挥极其强有力(一般在皮摩尔水平即有效)的作用。各种细胞因子既相互联系又相互拮抗, 构成细胞因子网络(cytokine network)^[1]。人嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8(neutrophil activating protein-1/interleukin-8, NAP-1/IL-8)是近年来阐明的一种新的细胞因子, 有关该因子的研究进展, 可从一个侧面反映目前有关细胞因子的研究方法、内容及特点。

一、NAP-1/IL-8的研究历史

传统的细胞免疫学根据嗜中性白细胞随环境中化学物质的浓度梯度进行定向移动的生物现象描述了嗜中性白细胞趋化因子的活性, 同样也描述了嗜中性白细胞活化因子及淋巴细胞活化因子的活性。在1987年间, 若干个不同的研究小组先后独立地阐明了嗜中性白细胞活化因子的一级结构。但由于各小组的研究出发点及沿袭用名不同, 因此造成同一种细胞因

子采用多种命名的情况。在文献中出现过的该因子曾用名包括: 单核细胞源性的嗜中性白细胞活化因子(monocyte-derived neutrophil activating factor, MDNAF)^[2]、单核细胞源性的嗜中性白细胞趋化因子(monocyte-derived neutrophil chemotactic factor, MDNCF)、嗜中性白细胞活化因子(NAF)^[3]、嗜中性白细胞活化蛋白-1(neutrophil-activating protein-1)、粒细胞趋化肽(granulocyte chemotactic peptide, GCP)^[4]、淋巴细胞源性的嗜中性白细胞活化肽(lymphocyte-derived neutrophil activating peptide, LYNAF)^[5]、T淋巴细胞趋化因子(T-lymphocyte chemotactic factor)^[6]等等。这些命名反映了该因子的多种活性、多种产生细胞及多种效应细胞, 但也造成一定的混乱与不便。有鉴于此, 1988年12月在伦敦召开的新嗜中性白细胞活化肽国际会议曾建议将该因子统一命名为白细胞介素-8^[7]。但由于发现该因子代表着结构及功能相似的一个蛋白质超家族, 因此白细胞介素-8的命名也受到质疑。随后提出了一个暂定名: 嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8(NAP-1/IL-8), 目前被多数文献所接受。

有关 NAP-1/IL-8 的研究工作是从它的纯化和鉴定开始的, 这方面的工作主要得益于蛋白质微量测序技术。最初的测序资料表明, NAP-1/IL-8 是一个 72 氨基酸的低分子量蛋白^[8], 随后用经过单克隆抗体亲和层析的样品进行测序, 又发现除 72 个氨基酸的成份外, 尚有另外几种成份, 其中两种在 N 端分别多出 7 个和 5 个氨基酸。实验结果表明, 72 氨基酸的成份是后两种成份的蛋白酶水解产物, 而三种成份都是 NAP-1/IL-8 分子不同的翻译后加工产物^[9]。

在测出 NAP-1/IL-8 的氨基酸序列之后短短不到 1 年, 即已获得 NAP-1/IL-8 的全长 cDNA 克隆, 并对其 cDNA 及蛋白质的序列进行了深入细致的比较和分析^[10]。序列资料表明: NAP-1/IL-8 分子的 N 端是带有疏水核的信号

肽, 72 个氨基酸的成熟 NAP-1/IL-8 带有 4 个 Cys(分别位于 7、9、34 和 50 位), 无 N-糖基化位点。序列同源性比较的资料指出, NAP-1/IL-8 属于由多种结构与功能相似的蛋白所组成的一个蛋白质超家族^[11,12]。这一超家族又可进一步细分为两个家族。在第一家族中, 前面两个 Cys 之间有一个残基相隔(成为 Cys-X-Cys 的模式); 而在第二家族中, 前面两个 Cys 相互毗邻(即 Cys-Cys)。每个家族内部的氨基酸序列同源性在 25—55% 之间, 而两个家族之间的同源性则在 21—31% 之间, 序列中最为保守的是 Cys 的位置。有关该超家族的成员及其在一级结构上的特点可参见图 1。该超家族各成员的生物学功能, 主要体现在细胞特异性的趋化、宿主防御及炎症反应中。

NAP-1/IL-8 氨基酸序列的阐明及其



图 1 趋化性细胞因子超家族成员间的序列对仗^[12]

序列的上方是已知的二级结构单位的示意图, 其中的箭头表示 β -折叠中向上或向下的残基, 实心和空心圆点则分别表示 α -螺旋中的疏水和亲水残基。h 表示人 (human), r 表示大鼠, m 表示小鼠, ha 表示中国仓鼠。

cdna 的克隆成功为 NAP-1/IL-8 的合成与表达奠定了基础。由于这一蛋白较小, 因此人工获得该蛋白的途径主要有三条, 一是多肽的化学合成, 二是 cDNA 的修饰(剔除信号肽编码序列)与表达, 三是基因的合成与表达。循上述三条途径开展的工作^[7,13-15], 很快为大量获得重组及合成的 NAP-1/IL-8 铺平了道路。大量纯化的天然、合成及重组 NAP-1/IL-8 的获得, 促成了抗 NAP-1/IL-8 单克隆抗体的

制备和应用^[16], 也为精确、细致地研究 NAP-1/IL-8 的生物学功能提供了必不可少的材料。

利用重组 NAP-1/IL-8 已证明 NAP-1/IL-8 的作用具有相对的细胞特异性, 其效应细胞包括嗜中性白细胞、T-淋巴细胞^[6]乃至黑色素瘤细胞^[17], 但它对单核细胞和血小板没有作用。又利用放射性标记的寡核苷酸探针或 NAP-1/IL-8 的 cDNA 进行 Northern 印迹

杂交,检测 NAP-1/IL-8 的特异性 mRNA,表明只要进行适当的刺激,单核吞噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞、肝细胞、尘细胞及内皮细胞也可以产生 NAP-1/IL-8^[18]。利用重组的以及高度纯化的天然 NAP-1/IL-8 进行各种体内及体外试验,表明 NAP-1/IL-8 对嗜中性白细胞的作用与 C5a 及甲酰-Met-Leu-Pro(FM-LP)的作用相类似,其中包括趋化活性、诱导形态变化的活性、脱颗粒活性(释放的嗜天青颗粒中含有维生素 B12 结合蛋白、乳酸脱氢酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、弹性蛋白酶及其他酶)及呼吸爆发活性(即形成超氧化物及 H₂O₂ 的活性)^[19]。NAP-1/IL-8 还可以诱导暴露于 IL-3 的嗜碱性白细胞释放组胺和白细胞三烯 C4。也就是说,在 IL-3 存在下, NAP-1/IL-8 具有组胺释放因子的活性,并可介导依赖于 IgE 的超敏反应^[20]。体外试验提示, NAP-1/IL-8 抑制白色念珠菌生长的活性是通过活化多形核白细胞而实现的,这一途径不依赖于氧,但很可能由 GTP-结合蛋白(G 蛋白)所介导^[21]。由于 NAP-1/IL-8 的作用并没有种属特异性,因此可以在多种实验动物中研究它的活性。它可以在家兔中引起早发型皮肤过敏反应,导致血浆渗出及广泛的嗜中性白细胞浸润^[22]。

NAP-1/IL-8 与其他细胞因子(IL-1、TNF、IL-3、CSF 等)及其他炎症反应介质(如白细胞三烯)之间存在密切的联系。IL-1 β 和 TNF- α 都是产生 NAP-1/IL-8 的刺激原^[22]。(早期关于 IL-1 的细胞趋化活性的报道可能是由于制剂中残存的 NAP-1/IL-8 的作用),从某种意义上说, NAP-1/IL-8 也是它们的效应分子。正是基于这样的认识,我们认为 NAP-1/IL-8 能够在生物治疗的某些方面起到与 TNF 及 IL-1 β 相近的作用。

此外,在脉管炎、类风湿性关节炎、肺气肿及成人呼吸困难综合征等疾病中,也观察到 NAP-1/IL-8 的作用^[18]。对 NAP-1/IL-8 在生理及病理条件下的表达情况进行深入研究,将有助于揭示它的病理学意义。

二、NAP-1/IL-8 的基因组序列和细胞受体

了解一个细胞因子的氨基酸序列之后,阐明其基因表达与调控的原理以及该因子与细胞受体的相互作用,就成为探索其作用及调控原理的重要课题。而克隆该因子的基因组序列、研究该因子与受体相结合的热力学和动力学特性及克隆其细胞受体基因,都是其中一些基本的研究方法。

就在 NAP-1/IL-8 的 cDNA 克隆成功后不久,有关其基因组 DNA 克隆的工作就已见诸报道^[24]。NAP-1/IL-8 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成,只有一套 CAT 框和 TATA 框,在所有剪接点都可以找到典型的 GT 和 AG 共有序列。基因的 5' 侧翼区在总体上与其他受 IL-1 和 TNF 影响的细胞因子基因的 5' 侧翼区并不相似。由于 5' 侧翼区尚未见在大多数血细胞生成素类细胞因子(如 IL-2、IL-3、GM-CSF 及 G-CSF 等)基因相应区段中相当保守的“GPuGPuTTPyCAPy”序列,故提示 NAP-1/IL-8 应不属此类因子。在 NAP-1/IL-8 基因组 DNA 的 5' 侧翼区内发现若干种核因子的潜在结合位点,并已表明 NAP-1/IL-8 基因的转录可能确实通过其中的某些结合位点进行调节。NAP-1/IL-8 基因组 DNA 的 5' 侧翼区中还含有其他一些调节元件。其中包括增强子核心序列、热激反应元件及糖皮质激素反应性序列元件的核心序列。研究资料表明,糖皮质激素对 NAP-1/IL-8 的表达确有调控作用。有关 NAP-1/IL-8 基因组结构的研究,为阐明其表达与调控的机理提供了大量有价值的信息,同时也为认识不同的细胞因子及活性分子之间的协同或拮抗作用提供了一定的依据。

利用氯胺-T 法对 NAP-1/IL-8 进行放射性碘化,研究它与细胞受体的相互作用,结果表明效应细胞上具有特异性或选择性的 NAP-1/IL-8 受体。碘化的 NAP-1/IL-8 在结合后迅速内化,随后被溶酶体酶类所降解并从细胞

中释放^[25]。通过稳态结合实验测定人嗜中性白细胞上 NAP-1/IL-8 受体数目及亲和力(K_d 值)的结果在不同的文献中有所出入^[23-27], 但可以肯定确实存在亲和力不同的 NAP-1/IL-8 受体。又已发现, 在 37℃下, NAP-1/IL-8 可以在 10 min 内反馈抑制其受体的表达, 抑制的幅度在 90%以上^[25]。

最近, 采用表达克隆的策略分离到编码高亲和力和低亲和力的人 NAP-1/IL-8 受体的 cDNA, 表明两种受体在氨基酸水平上的同源性和为 77%, 而与人 FMLP 及 C5a 受体的同源性则在 30%左右, 而且这些受体均为 G 蛋白偶联受体超家族的成员, 含有 7 个穿膜结构域^[26,27]。相信 NAP-1/IL-8 受体基因的克隆将有助于全面揭示这一因子的作用机理。

三、NAP-1/IL-8 的构象

要阐明蛋白质结构与功能的关系, 光有一级结构资料尚不够, 必须得到必要的构象资料。研究蛋白质晶体结构的主要实验方法是 X 射线衍射技术。对于像 NAP-1/IL-8 这样的低分子量蛋白, 还可以利用二维核磁共振(NMR) ¹H-NMR 来研究它在溶液中的构象。

在构象研究实验中, 得到足够量的高纯度重组 NAP-1/IL-8 同样是先决条件。已经测定重组 NAP-1/IL-8 在溶液中的 ¹H-NMR 谱, 并对 NMR 谱进行了顺序排布, 解出了 NAP-1/IL-8 的二级结构^[28]。据推算, NAP-1/IL-8 单体含有 3 股反平行 β -折叠, 在 4 个 Cys 之间形成两对二硫键, 其中 Cys 7 与 Cys 34 之间形成右手盘绕的二硫键, 而 Cys 9 与 Cys 50 之间形成左手盘绕的二硫键。该分子的 N 端活动性较强, 而 C 端是长段 α -螺旋(57-72 残基)。又表明, NAP-1/IL-8 在溶液中形成双体, 其界面主要由 6 对主链氢键所维系。在此基础上, 利用 NMR 并进行复杂的模拟退火运算, 解出了 NAP-1/IL-8 的整个高分辨的三维结构^[29]。NAP-1/IL-8 双体在溶液中的三维结构含有两段对称的反平行 α -螺旋, 长约 2.4nm,

相隔约 1.4 nm, 其下面则是由 6 股反平行 β -折叠所组成的平台。整个结构与人 I 类组织相容性抗原 HLA-A 2 的 $\alpha 1/\alpha 2$ 结构域相似。NAP-1/IL-8 的 α -螺旋区呈现明显的两亲性特点, 是一段近乎理想化的两亲性螺旋。其中的疏水点, 性氨基酸侧链形成 α/β 界面的主要部位。而亲水性残基则暴露于溶剂一面。NAP-1/IL-8 双体中的两段 α -螺旋很可能形成细胞受体的结合位点。值得注意的是, 同一超家族其他成员在 α -螺旋区中同样表现出两亲性特点。以 NAP-1/IL-8 在溶液中的构象为模型进行分子替换, 已经在 0.16 nm 的分辨率上解出了 NAP-1/IL-8 的 X-射线衍射晶体结构^[30], 经比较溶液和晶体中的结构, 认为三维结构上相近并位于环区的 N 端 4—9 残基和 His 33 所在的 β 折叠转弯部位在整个超家族中都比较保守, 可能与受体结合有关。这与前述观点有所矛盾。

NAP-1/IL-8 的构象资料, 不但有助于认识该蛋白质结构与功能的关系而且为 NAP-1/IL-8 及其他趋化性细胞因子的蛋白质工程研究奠定了基础。

有关 NAP-1/IL-8 的基础理论研究, 已经为它在生物治疗中的应用潜力描述了大致的轮廓。作者认为, 尽管讨论 NAP-1/IL-8 的实际应用可能尚为时过早, 但现在可以预期这一细胞因子可能在抗感染(特别是抗细菌及抗真菌感染)和抗肿瘤治疗, 以及新型蛋白质佐剂、导向药物和新型高效抗炎药物的研制等方面得到进一步的研究和应用。但值得指出的是, 任何一种细胞因子的作用都有其特殊性、局限性甚至两面性, NAP-1/IL-8 也不例外。根据实际需要联合应用包括 NAP-1/IL-8 在内的多种细胞因子进行生物治疗, 可能是更为合理和可行的途径, 也值得进行深入的研究。

摘 要

人嗜中性白细胞活化蛋白-1/白细胞介素-8是近年来阐明的一种新的细胞因子, 本文按照该因子的研究历史综述了有关它的氨基酸

序列测定、cDNA 克隆、基因合成与表达及生物学功能等方面的研究概况,并介绍了其基因组序列、细胞受体及构象方面的最新进展。

参 考 文 献

- [1] Balkwill, F. R. & Burke, F., 1989, *Immunol. Today*, 10: 299.
- [2] Yoshimura, T. et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9233.
- [3] Peveri, P. et al., 1988, *J. Exp. Med.*, 167: 1547.
- [4] Van Damme, J. et al., 1989, *Eur. J. Biochem.*, 181: 337.
- [5] Gregory, H. et al., 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 883.
- [6] Larsen, C. G. et al., 1989, *Science*, 243: 1464.
- [7] Furuta, R. et al., 1989, *J. Biochem.*, 106: 436.
- [8] Walz, A. et al., 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149: 755.
- [9] Yoshimura, T. et al., 1989, *Mol. Immunol.*, 26: 87.
- [10] Matsushima, K. et al., 1988, *J. Exp. Med.*, 167: 1883.
- [11] Wolpe, S. D. & Creami, A., 1989, *FASEB J.*, 3: 2565.
- [12] Gronenborn, A. M. & Clore, G. M., 1991, *Protein Engineering*, 4: 263.
- [13] Lindley, I. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9199.
- [14] Tanaka, S. et al., 1988, *FEBS Letters*, 236: 467.
- [15] 金冬雁等, 1992, *中国科学*, 9: 951.
- [16] Sticherling, M. et al., 1989, *J. Immunol.*, 143: 1628.
- [17] Ji Ming Wang, et al., 1990, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169: 165.
- [18] Baggolini, M., et al., 1989, *J. Clin. Invest.*, 84: 1045.
- [19] Wymann, M. P. et al., 1987, *J. Biol. Chem.*, 262: 12048.
- [20] Dahinden, C. A. et al., 1989, *J. Exp. Med.*, 170: 1787.
- [21] Djeu, J. Y. et al., 1990, *J. Immunol.*, 144: 2205.
- [22] van Damme, J. et al., 1988, *J. Exp. Med.*, 167: 1364.
- [23] Strieter, R. M. et al., 1989, *Science*, 243: 1467.
- [24] Mukaida, N. et al., 1989, *J. Immunol.*, 143: 1366.
- [25] Samanta, A. K., 1990, et al., *J. Biol. Chem.*, 265: 183.
- [26] Holmes, W. E. et al., 1991, *Science*, 253: 1278.
- [27] Murphy, P. M. et al., 1991, *Science*, 252: 1280.
- [28] Clore, G. M. et al., 1989, *J. Biol. Chem.*, 264: 18907.
- [29] Clore, G. M. et al., 1990, *Biochemistry*, 29: 1689.
- [30] Baldwin, E. T. et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 502.

Ly-1 B 淋 巴 细 胞

丛 英 姿

(山东大学生物系 济南, 250100)

自 Lanier 等^[1]发现鼠类 B 淋巴瘤表达 ly-1 抗原和 Manohar 等^[2]在正常鼠类脾脏中发现携带 Ly-1 抗原分子的 B 细胞后, 对 Ly-1 B 细胞及其人类相当的细胞——CD 5 细胞的研究引起了广泛的关注和兴趣。本文报道了近年来对 Ly-1 B 细胞的研究进展。

一、ly-1 B 细胞的发现

Cantor 和 Boyse^[3]于 1975 年首次确定 Ly-1 是鼠类淋巴细胞表面糖蛋白。最初认为它主要在 T 辅助细胞上表达, 后来发现所有 T 细胞都表达 Ly-1^[4], 因而认为 Ly-1 是 T 细胞