

# 衰变加速因子——补体激活途径中的一个膜调节蛋白

汪 策

(同济医科大学病理生理教研室, 武汉)

## 提 要

衰变加速因子 (DAF) 是补体激活途径中的一个重要膜调节蛋白。主要存在于红细胞、粒细胞、单核细胞、淋巴细胞及血小板表面上。能阻止两条途径 C3 及 C5 转化酶的装配并加速其衰变。在 C3 及 C5 转化酶的调控中起到了中心作用。其缺乏与疾病——阵发性睡眠性血红蛋白尿 (PNH) 有密切关系。

补体激活的两条途径中,有许多调节蛋白都是作用于 C3 及 C5 转化酶而发挥作用,如补体第一型受体 (CR1)、I 因子、C4 结合蛋白 (C4bp)、H 因子、衰变加速因子 (Decay-accelerating factor, DAF) 等。除 CR1 和 DAF 存在于细胞膜上外,其他均存在于血清中。其中 DAF 能影响两条途径中 C3 及 C5 转化酶的装配并加速它们的自身衰变,与上述调节因子一道共同控制着补体活化的程度,为一重要的膜调节蛋白。并且,DAF 的缺乏与阵发性睡眠性血红蛋白尿 (PNH) 有关。近年来关于 DAF 的报道有增多的趋向,本文拟讨论有关 DAF 的研究进展及其与 PNH 的关系。

## 一、DAF 的分布及理化性质

Hoffmann<sup>[1,2]</sup> 于 1969 年首先描述了人类的能抑制补体活性的糖蛋白,它存在于人类红细胞膜上,不久,从兔体内也将其提取出来。当时并不知道它为何物,后来才阐明这种物质实际上是 DAF 与 CR1 两种不同分子的混合物。

直到 1980 年, Burge 等<sup>[3]</sup>才从豚鼠红细胞基质中将 DAF 真正分离出来,称作 DAF-S (S 代表 Stroma, 基质);随后,人类 DAF 也相继从红细胞膜及其它细胞中分离或检出<sup>[4,5,7,8]</sup>。迄今,DAF 已在正常人几乎所有的循环血细胞 (红细胞、多形核白细胞、单核细胞、淋巴细胞及血小板)表面上发现<sup>[3,4,7]</sup>,但却不表达于 NK 细胞上<sup>[18]</sup>。1986 年, Asch 等<sup>[8]</sup>借抗 DAF 单抗、间接免疫荧光及荧光活化细胞分类器 (FACS) 发现 DAF 还表达于人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 上,其荧光密度几乎为外周血细胞的 4—7 倍,平均每个内皮细胞上有  $3.3 \times 10^5$  个 DAF 分子;将融合的 HUVEC 用 <sup>35</sup>S 标记,发现 DAF 可在其中合成,这是第一次发现 DAF 在骨髓外来源的细胞上合成和表达,这可能与保护内皮细胞免受补体介导的损伤有关。此外,DAF 还广泛地存在于各种组织的上皮细胞和外分泌腺细胞,各种分泌物如唾液、尿液中,在豚鼠还发现于血清中。DAF 广泛地分布,特别是存在于与补体密切接触的细胞表面上,反映了其重要的生物学意义<sup>[21]</sup>,将于后述。

[21] Blobel, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, **77**, 1496.

[22] Friedlander, M. et al.: *Nature*, 1985, **318**, 338.

[23] Mize, N. K. et al.: *Cell*, 1986, **47**, 711.

[24] Davis, N. G. et al.: *Cell*, 1985, **41**, 607.

[本文于 1987 年 6 月 16 日收到]

人类 DAF 可用 PAS、过碘酸 Schiff 试剂染色,是一内在 (intrinsic) 细胞膜表面糖蛋白分子。近年来发现,蛋白质与某些膜磷脂是以共价形式结合的,主要磷脂成分为磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 此与信号传递有关,但 DAF 是否与 PI 结合,尚不清楚。红细胞上 DAF 分子量为 74,000—75,000<sup>[4,19]</sup>, 多形核白细胞 (PMN) 上约 84,000,单核细胞, T、B 淋巴细胞上约 75,000—80,000。DAF 为单链,  $\beta$ -迁移率。存在于 PMN、单核细胞及血小板上的 DAF 与荧光抗 DAF 抗体作用后,荧光染料呈单峰分布,反映这些细胞上 DAF 的表达是相同的、均匀的;而淋巴细胞群上染料分布不均一,表明其上 DAF 抗原表达不均一<sup>[7]</sup>。

最近, Lublin 等<sup>[19]</sup>在研究红细胞及单核细胞分化的细胞系 HL-60 时发现, DAF 有分子量分别为 43,000 及 46,000 的两种形式,继续研究得知分子量为 43,000 的是 DAF 前体,它含有一个 N-甘露糖侧链,在进入高尔基体的中心区前,此前体通过翻译后修饰 (具体机制不详,可能涉及加入单个 N-乙酰半乳糖胺残基 GalNAc 和脂质附着) 形成分子量为 46,000 的中间产物,此过程无 N-糖化,两者内部的二硫键数目无异。然后,加入多个涎化 (Sialylated) 的 O-寡糖侧链,并且 N-甘露糖侧链转变为复合型 (Complex type),最终在膜上形成了分子量为 74,000 (红细胞上) 及 80,000 (白细胞上) 的成熟 DAF。红细胞与白细胞上分子量的差异是由于不同细胞中翻译后修饰的情况不同所致。

近年来,发现了某些膜内在蛋白的疏水性氨基酸与脂质双层之间相互作用的新机制:即这些蛋白质与磷脂酰肌醇共价结合,如乙酰胆碱脂酶 (AChE), Thy-1 抗原, 锥虫变体表面糖蛋白 (VSG)。PI 的主要部分为 1, 2-甘油二酯。此结构与信号传递有关。1986 年, Medof 等用 PI 特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 与红细胞温育,检出膜上能释放 20% 的 DAF 抗原, DAF 于是失去了疏水性。表明 DAF 是共价结合于 PI 上的。DAF 结合部分是 C 末

端,此区包含葡萄糖胺、乙醇胺,含量与红细胞膜上 AChE 中相似。

## 二、DAF 的生物学活性

补体激活过程中,由抗原-抗体复合物等与 C1q 相结合,通过 C1r 将 C1s 变为有活性的丝氨酸蛋白酶,它可将 C4 裂解为 C4a 及 C4b,前者为一弱过敏毒素,后者大部分存于液相,小部分 C4b 结合至靶细胞膜上与 C2 结合,再在 C1s 作用下裂出 C2b, C4b2a 即第一途径的 C3 转化酶。在第二途径中,开始液相 C3 受 H<sub>2</sub>O 分子亲核攻击形成具有 C3b 样活性的 C3(H<sub>2</sub>O),它与 B 因子和 Mg<sup>++</sup> 形成复合物,其中 B 因子被 D 因子裂解出 Ba 后,形成了 C3(H<sub>2</sub>O)Bb; 这是第二途径的最初的 C3 转化酶,可低速度将 C3 裂解为 C3a 及 C3b。后者通过分子内的硫酯键可共价结合于生物活性颗粒上,此时再受血清中 B 因子与 D 因子作用形成阳性反馈环路,高速形成 C3bBb 复合物,此即第二途径放大 C3 转化酶。C3bBb 不稳定,当加入备解素 (P) 后,形成稳定的 C3 转化酶 (C3bBbP)。两条途径中的 C3 转化酶均可将 C3 裂解为 C3a 及 C3b。当 C4b2a 与 C3bBb 在 C3b 存在的情况下可分别形成 C4b2a3b 及 C3bBb3b,即 C5 转化酶,引起下一步级联反应。

最初仅知 DAF 能抑制补体的活性,现知这种活性主要是通过抑制 C3 及 C5 转化酶而起作用。

(一) DAF 能加速两条途径 C3 及 C5 转化酶的衰变<sup>[5,11,12,14]</sup> DAF 能将 C2 及 B 因子从 C4b2a 及 C3bBb 中分离出来,并促使它们的自身衰变。当 C3 转化酶加入 DAF 后,其半寿期会缩短。人类 C4b2a 的半寿期在 30℃ 时为 28 分钟,加入 15  $\mu$ g/ml 浓度的 DAF 时,其半寿期降至 13 分钟;当加入浓度为 30mg/ml 的 DAF 后,降至 9 分钟。DAF 促 C4b2a 衰变的作用比促 C3bBbP 衰变的作用强 5 倍,这与另一膜调节蛋白 CR1 正好相反,CR1 对 C3bBbP 的作用较 CR1 对 C4b2a 的作用要强 10 倍;抗

DAF 抗体不影响 CR1 的活性,反之,抗 CR1 也不影响 DAF 的活性。因而,尽管 DAF 与 CR1 同为红细胞膜上内在的糖蛋白,但在物理化学、免疫化学上的特性均有区别。

新近 Pangburn<sup>[42]</sup> 阐明了 DAF、CR1 及 H 因子促 C3 转化酶衰变作用位点的差异: DAF 主要作用于 Bb 或 C2a 片段,而 CR1 及 H 因子主要作用于 C4b 或 C3b 片段。DAF 结合 Bb 的能力比结合 C3b 的能力强 50%,并且 DAF 结合 C3b 的能力比 CR1 及 H 因子结合 C3b 的能力要小得多。

最近报道<sup>[47]</sup>, DAF 与另一糖蛋白 gp<sup>970</sup> 功能互补, DAF 有促补体衰变作用,无辅因子活性,在红细胞上可表达;而 gp<sup>970</sup> 正相反,有辅因子活性却无促衰变作用,在红细胞上不表达。从红细胞中分离出来的 DAF 能重新嵌入红细胞膜,并保留其功能活性<sup>[8]</sup>,高(低)密度脂蛋白能阻止这种嵌入,但不抑制已嵌入的 DAF 的生物学活性。这为治疗某些 DAF 缺乏性疾病(如 PNH)提供了可能性。

**(二) DAF 能阻断两条途径 C3 及 C5 转化酶的装配** 以前认为, DAF 的主要功能是加速 C3 转化酶的衰变,因而称之为衰变加速因子。1984 年, Medof 等<sup>[11]</sup>指出, DAF 的主要作用是阻止两条途径 C3 及 C5 转化酶的装配,而非促衰变作用。作者将人红细胞 DAF 纯化后,加至绵羊红细胞(SRBC)膜, DAF 即结合其上,虽经反复冲洗或置于高渗盐中,也不能将其冲洗掉。且 DAF 仍保留活性,这不仅为研究 DAF 的功能提供了良好方法,而且还为治疗 DAF 缺乏症提供了可能。作者发现,将 DAF 加至 EA 时,并不干扰 C1 和 C4 在 SRBC 上沉着,而是抑制了 C2,即 C3 和 C5 转化酶在 SRBC 上的装配被阻断。当膜上有 70 个 DAF 分子时,就能明显地阻止 C4b2a 的装配,这种抑制活性不因 C2 浓度增加而消失。Kinoshita<sup>[9]</sup>提出 DAF 与 C4b 或 C3b 结合(而不与它们的降解产物 C4d 和 C3dg 结合),竞争地阻止了 SRBC 对 C2 或 B 因子的摄取,或者使 C2 及 B 因子不能形成有酶活性片段 C2a 及 Bb。DAF

在这个过程中,没有改变 C4b 及 C3b 的结构,并且 DAF 的功能是可逆的。Medof 认为, DAF 在邻近其活性部位处有一疏水区,在纯化状态, DAF 聚集在一起,因其活性部位不完全在外部或由于分子变构作用,故表现为无活性或低活性,当结合至膜上后,重建原来构象,遂与 C3b 或 C4b 结合,发挥作用。

DAF 仅调节其所在的细胞膜上的 C3 及 C5 转化酶,而不影响邻近细胞或底物如细菌、免疫复合物上转化酶的形成及稳定性,这不同于 CR1。因而, DAF 在阻止宿主细胞免受自身补体级联反应的放大过程引起损伤中起到了中心的作用。

### 三、DAF 与阵发性睡眠性血红蛋白尿

阵发性睡眠性血红蛋白尿(Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)是一种慢性获得性血管内溶血性疾病,临床上主要以睡眠时发生间歇性血红蛋白尿及发生周期性溶血性贫血为特征。

早年, Ham 就发现 PNH 患者体内的红细胞对自身补体成分异常敏感。后来报道,这些红细胞的异常是由于骨髓克隆异常所致。直到 1983 年, Nicholson-Weller 及 Pangburn 等<sup>[13,14]</sup>用免疫沉淀方法证实, PNH 患者红细胞对补体的异常敏感主要是由于其红细胞膜上补体调节蛋白 DAF 缺乏所致。这种患者的红细胞分为三型:第一型为补体正常敏感型,其发病似乎与补体无关,目前很难下结论;第二型为红细胞中度敏感型(对补体溶血的敏感性为正常细胞的 3—5 倍),它吸附抗 DAF 抗体的能力仅为正常细胞的 10%,提示此型红细胞为 DAF 部分缺乏;第三型为补体高敏感型(敏感性为正常细胞的 10—15 倍),红细胞完全不能吸附抗 DAF 抗体,提示此型红细胞为 DAF 完全缺乏。PNHII 及 III 型细胞都缺乏 DAF,如用 DAF 处理 II 型细胞,则恢复对补体正常的敏感性,说明 II 型细胞对补体溶血与缺乏 DAF 有关,用 DAF 处理 III 型细胞对补体敏感性没影响,说明 III 型细胞除缺乏 DAF 外,可能

## 海洋环肽研究进展

蹇敦龙\* 龙康侯

(中山大学化学系, 广州)

### 提 要

近几年从海洋生物中分离到的环肽都具有强烈的生理活性, 而引起了人们的广泛注意, 日本、美国、德国及我国的一些课题组都在从事这方面的研究工作, 而且取得了显著的成果。分离到了近二十个环肽, 其中大多数都确定了结构, 并进行了全合成研究。

近几年从海洋中分离到的环肽几乎都有强烈的生理活性, 引起了人们极大的关注。且有意识的去分离海洋环肽, 这必将促进海洋生物

化学, 海洋药学的发展, 本文就近几年海洋环

\* 通讯联系人。

还缺乏防御攻膜复合体 (MAC) 攻击的调节物质。对正常红细胞, 如用抗 DAF 抗体处理后, 其对 C3 转化酶的衰变能力与 PNH 患者体内红细胞上 DAF 对 C3 转化酶的衰变能力一样缓慢。

本文经赵修竹教授审阅, 特致谢。

### 参 考 文 献

PNH 患者在临床上常伴全血细胞减少或/和发育不全、血栓形成和非淋巴细胞白血病, 提示这种获得性缺乏的克隆并非限于红细胞。体外发现, PNH 患者循环血中有异常的白细胞、血小板及骨髓前体细胞。1985 年, Nicholson-Weller<sup>[16]</sup> 研究了四例 PNH 患者, 直接阐明了这些患者体内粒细胞、单核细胞及血小板上缺乏 DAF 抗原。并提出是由于多能干细胞异常造成的。但淋巴细胞却未见异常 (逃避)。由于 PNH 患者体内红细胞、粒细胞、单核细胞及血小板上 DAF 的表达有缺陷, 因而缺乏对补体活化中的 C3 转化酶的调控, 致使上述细胞对自身补体的溶解活性的敏感性增强, 造成红细胞被补体介导而引起溶血。有关 DAF 与 PNH 的关系不断有报道, 进一步弄清它们之间的关系无疑会对 PNH 的预防及诊治提供帮助。

- [1] Hoffmann, E. M. *Immunochemistry*, 1969, 6, 391.
- [2] Hoffmann, E. M.: *Immunochemistry*, 1969, 6, 405.
- [3] Burge, J. et al.: *J. Immunol.*, 1980, 124, 1516.
- [4] Burge, J. et al.: *Fed. Proc.*, 1981, 40, 1016.
- [5] Nicholson-Weller, A. et al.: *J. Immunol.*, 1982, 129, 184.
- [6] Kinoshita, T. et al.: *J. Exp. Med.*, 1985, 162, 75.
- [7] Nicholson-Weller, A. et al.: *Blood*, 1985, 65, 1237.
- [8] Asch, A. S. et al.: *J. Exp. Med.*, 1986, 163, 221.
- [9] Kinoshita, T. et al.: *J. Immunol.*, 1986, 136, 3390.
- [10] Pangburn, M. K. et al.: *J. Exp. Med.*, 1983, 157, 1971.
- [11] Medof, M. E. et al.: *J. Exp. Med.*, 1984, 160, 1558.
- [12] Pangburn, M. K.: *J. Immunol.*, 1986, 136, 2216.
- [13] Nicholson-Weller, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 5066.
- [14] Pangburn, M. K. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 5430.
- [15] Burge, R.: *Immunol Today*, 1986, 7, 27.
- [16] Nicholson-Weller, A. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 1985, 312, 1091.
- [17] Seya, T. et al.: *J. Exp. Med.*, 1986, 163, 837.
- [18] Nicholson-Weller, A. et al.: *J. Immunol.*, 1986, 137, 1275.
- [19] Lablin, D. M. et al.: *J. Immunol.*, 1986, 137, 1629.

[本文于 1987 年 5 月 3 日收到]