

TNF 家族成员 TALL-1 及其研究进展*

刘存仁**

(山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要 TALL-1 是 TNF 家族成员中最近发现的一个新型细胞因子, 由单核细胞和巨噬细胞产生. 人 TALL-1 由 285 个氨基酸残基组成, 而鼠 TALL-1 由 309 个氨基酸残基构成, 两者均为 II 型穿膜蛋白质. 人 sTALL-1 是长为 152 个氨基酸残基的胞外区片段, 对应于 C 端 134~285 位氨基酸残基. 重组人 sTALL-1 具有刺激 B 细胞增殖、激活 NF- κ B 和 JNK 以及抑制肿瘤细胞生长等生物学活性. 另外, TALL-1 在转基因鼠中的过量表达可引起严重的 B 细胞增生以及与狼疮有关的自身免疫性疾病. 因此, TALL-1 是一个具有多种生物学活性的细胞调控因子.

关键词 TALL-1, 细胞因子, 调控

学科分类号 R392

TNF (tumor necrosis factor) 家族成员是机体内产生的一类重要的细胞因子, 它们在细胞增殖、分化、凋亡以及免疫反应、炎症等一系列生理和病理反应过程中具有非常重要的调控作用^[1,2]. TALL-1 (TNF and apoptosis ligand-related leukocyte-expressed ligand 1) 是最近被发现和描述的一个新型细胞因子, 属于 TNF 家族的一个新成员^[3]. 重组人 sTALL-1 (soluble TALL-1) 不仅具有诱导 B 细胞增殖、肿瘤细胞凋亡和激活 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 等生物学活性, 而且在体内也具有重要的调控功能. 本文对 TALL-1 的分子和细胞生物学研究进展进行综述.

1 TALL-1 cDNA 的分子克隆及其编码蛋白的特点

Shu 等^[3]于 1999 年率先克隆了人 TALL-1 的 cDNA 编码序列. 几乎同时, 另外三个研究组也分别以 BLyS (B lymphocyte stimulator)^[4]、THANK (a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- κ B, and c-Jun NH₂-terminal kinase)^[5] 和 BAFF (B cell activating factor belonging to the TNF family)^[6] 不同命名报道了该细胞因子的 cDNA 克隆. 最长的人 TALL-1 cDNA 克隆由 1 090 个核苷酸组成, 其阅读框架为 858 个核苷酸, 5' 和 3' 非翻译区分别由 136 和 96 个核苷酸组成^[4]. 据此推测人 TALL-1 cDNA 可编码由 285 个氨基酸残基构成的蛋白质. 对其氨基酸序列进行分析表明, TALL-1 蛋白质为一种 II 型穿膜蛋白质, 分为胞内区、穿

膜区和胞外区三部分. 其 N 端 1~46 位氨基酸为胞内区片段, 47~73/77 位氨基酸为穿膜区片段, 其余为胞外区片段^[4,5], 这与绝大多数 TNF 家族成员的结构相似. 将其胞外区 144~285 位氨基酸序列与 TNF 家族成员 TNF、FasL (Fas ligand)、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) 和 LT- α (lymphotoxin- α) 对应区相比, 有大约 20%~25% 的氨基酸相同, 而与最近克隆的 TNF 家族成员 APRIL (a proliferation-inducing ligand)^[7] 比较则有约 35% 的氨基酸相同^[3]. 将 TALL-1 cDNA 基因在哺乳动物细胞 (HEK 293 和 CHO) 以及昆虫细胞 (Sf9) 中表达, 得到一种可溶形式的由 152 个氨基酸残基构成的蛋白质, 对应于胞外区 134~285 位氨基酸序列, 是可溶的 TALL-1 重组蛋白. 经计算其大小约 17 ku, 与推测的分子质量一致^[4]. 这可能代表了在体内生理条件下发挥调控作用的 sTALL-1. 此外, 经分析发现人 TALL-1 蛋白在 N124 和 N242 位有两个可能的 N-糖基化位点, 但体外表达研究证实, 只有 N124 位可进行糖基化^[6]. 因此, 人 sTALL-1 可能为非糖基化细胞因子.

Schneider 等^[6]在克隆人 TALL-1 cDNA 的同时也报道了小鼠 TALL-1 cDNA 的全长序列. 该序列共有 1 710 个核苷酸, 包括由 930 个核苷酸组成的

* 国家教育部留学回国人员基金资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-8564524, E-mail: Liucr@sdu.edu.cn

收稿日期: 2000-09-25, 接受日期: 2000-11-03

阅读框架, 可编码由 309 个氨基酸残基构成的蛋白质. 另外, 该序列其 5' 和 3' 非翻译区分别含有 216 和 564 个核苷酸, 均比人 TALL-1 cDNA 序列非翻译区为长. 将人和鼠 TALL-1 cDNA 所编码的蛋白质序列进行对比, 可见后者较前者为长, 然而两者序列具有很高的同源性. 其穿膜区 31 个氨基酸残基中竟有 22 个相同, 为 71%. 而将人 sTALL-1 蛋白的 144~285 位氨基酸序列与鼠 TALL-1 蛋白对应片段进行比较, 在 142 个氨基酸残基中有 124 个相同, 为 87%. 人和鼠 TALL-1 蛋白具有很高的同源性, 表明两者可能具有相似的生物学活性.

2 TALL-1 基因表达的组织和细胞分布

为了解人 TALL-1 的体内表达特性, 以人 TALL-1 cDNA 为探针, 对人各种不同组织和细胞系来源的 mRNA 进行了 RNA 杂交, 结果表明, 人 TALL-1 在外周血白细胞、脾脏、淋巴结、胸腺、骨髓、肺、胎盘、小肠和胰腺组织中表达, 其中外周血白细胞表达水平最高. 而在肝、脑、肾、骨骼肌等组织中未检测到表达. 对细胞系的检测结果表明, HL60 细胞表达水平较高, K562、A549 和 G361 细胞具有低水平表达. 而在 HeLa、MOLT4、Raji 和 SW480 细胞中未见表达^[4,5]. 采用反转录 PCR 技术进行的分析结果显示, 外周血单核细胞和巨噬细胞表达 TALL-1, 而且其表达水平受到 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) / ionomycin 负调控^[3]. 为了在蛋白质水平进一步确定表达 TALL-1 的细胞类型, 采用 TALL-1 特异的单克隆抗体和流式细胞仪技术, 对正常血细胞进行了分析. 结果表明, 仅有单核细胞表达 TALL-1, 而且 IFN- γ 与单核细胞体外作用 3 d, 可使 TALL-1 表达提高 4 倍. 然而正常血液淋巴细胞以及激活的 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞均未检测到 TALL-1 表达^[4].

3 TALL-1 的生物学功能

重组人 sTALL-1 不仅具有在体外能够刺激 B 细胞增殖和肿瘤细胞凋亡等作用, 而且在体内也具有重要的生物学功能, 现分别予以叙述.

3.1 对 B 细胞的作用

B 细胞是一类重要的免疫细胞, 由 B 系祖细胞经过细胞增殖、分化和成熟一系列过程形成成熟的 B 细胞, 在抗原的刺激下形成抗体分泌细胞. 目前已发现许多细胞因子在其增殖、分化和成熟过程中

具有重要的调控作用. 为了探讨重组人 sTALL-1 对 B 细胞的作用, Moore 等^[4]以人扁桃体 B 细胞为材料, 在 SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan I) 或抗人 IgM 抗体的共刺激下, 发现 sTALL-1 以剂量依赖方式能显著促进 B 细胞增殖. 另外, 人 sTALL-1 与 SAC 一起能够诱导小鼠脾脏 B 细胞的体外增殖, 然而对小鼠骨髓分离的表面 Ig 阴性的未成熟 B 细胞无作用. 表明人 sTALL-1 仅对成熟 B 细胞有作用且无特异性. Khare 等^[8]从 B6 小鼠分离 B 细胞在体外对人 sTALL-1 的活性进行研究, 发现 sTALL-1 能够以剂量依赖方式单独刺激 B 细胞增殖, 其 ED_{50} 约为 3 μ g/L. 采用 10 μ g/L 浓度的 sTALL-1 处理, 则使 B 细胞增殖较对照提高 10 倍. 而与抗 IgM 抗体一起作用, 可使 B 细胞增殖较对照增加 320 倍. 由此可见, 人 sTALL-1 是一个 B 细胞生长的强共刺激因子.

为了解人 sTALL-1 的体内生物学活性, 采用 BALB/c 小鼠按 2 mg/kg 体重剂量注射人 sTALL-1, 每天注射 2 次连续 4 天. 可见实验小鼠其脾脏结构发生了改变, 白髓区扩大, 红髓区内有核细胞数量增加. 动脉周围淋巴鞘中的 B 细胞区增大, 中央动脉周围的 T 细胞区也被适量的 CD45R⁺ 的 B 细胞侵入. 采用流式细胞仪对脾脏细胞进行分析, 结果显示, 实验小鼠其脾脏中 CD45R^{dull}, Ly6D^{bright} B 细胞数量较对照小鼠增加了约 10 倍. 另外对小鼠血清抗体进行了测试, 可见 IgM 和 IgA 水平分别比对照增加 5 倍和 2 倍, 而 IgG 没有变化^[4]. 可见人 sTALL-1 在小鼠体内具有使 B 细胞扩增和促进浆细胞产生 Ig 的活性.

3.2 激活 NF- κ B 和 JNK

U937 细胞是人髓系细胞来源的细胞系, 将不同浓度的人 sTALL-1 加入到培养体系中, 处理不同时间后取样检测, 结果表明, 人 sTALL-1 以浓度和时间依赖方式激活 NF- κ B, 这与 TNF 家族成员许多细胞因子能够激活 NF- κ B 一致^[10]. 小于 10 pmol/L 浓度的细胞因子可足以激活 U937 细胞的 NF- κ B, 在 1 nmol/L 时作用 60 min 就可达到最高峰. 若用抗 sTALL-1 的多克隆抗体预先处理 sTALL-1 则失去激活 NF- κ B 的功能. 另外, 用胰蛋白酶预先消化或用加热法使 sTALL-1 变性均完全使其丧失功能^[5]. 可见 sTALL-1 是激活上述反应特异的蛋白质性质的细胞因子.

此外, 该细胞因子还以相同的方式激活 U937 细胞的 JNK (c -Jun NH₂-terminal kinase) 活性. 在

其 10 pmol/L 浓度时, JNK 活性增加 2.5 倍, 浓度达 1 nmol/L 时, 活性提高 4.4 倍, 浓度再增加, 活性反而降低. 作用时间为 60 min 时, JNK 活性最高, 然后活性逐渐减低^[5]. 显示其激活作用是瞬时进行的.

3.3 细胞毒效应和 Caspase-3 激活

NF- κ B 和 JNK 的激活是细胞对 TNF 作用的早期反应, 随后出现细胞毒作用. 为了确定 sTALL-1 对肿瘤细胞的细胞毒效应, Mukhopadhyay 等^[5]采用多个肿瘤细胞系对 sTALL-1 的活性进行了探讨, 并与 TNF 进行比较. 结果表明, 人 sTALL-1 以剂量依赖方式对 U937、PC-3、HT-29、HeLa、MCF-7 和 A293 细胞均具有抑制其生长的作用, 与 TNF 的细胞毒效应相同. 另外通过分析 PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) 的降解发现, sTALL-1 与 U937 细胞作用 2 h 能够激活细胞的 Caspase-3, 但效果较 TNF 为低. 然而 sTALL-1 在体内是否具有抗肿瘤的活性仍有待于研究.

3.4 在自身免疫性疾病中的作用

为深入探讨 TALL-1 在体内的生物学功能, Khare 等^[8]和 Mackay 等^[9]分别克隆小鼠 TALL-1 全长序列并采用转基因技术获得转基因小鼠. 反转录 PCR 技术测试表明, 所转基因在受体鼠中表达. 然后, 对不同发育时期转基因鼠进行系统分析. 结果表明, 8 周龄转基因鼠的脾、淋巴结和小肠派伊尔氏结增大, 淋巴滤泡的体积和数量均有增加, 其中的 B 细胞数量明显增加. 采用流式细胞仪对肠系膜淋巴结细胞组成分析显示, B 细胞所占比例增加 100%^[8]. 转基因鼠外周血中 B 细胞所占比例也有显著提高^[9]. 由此可见, TALL-1 转基因鼠表现出严重的 B 细胞增生特征. 为了探讨 B 细胞增生的机理, 将 3 月龄转基因鼠脾脏 B 细胞作体外培养, 5 d 时, 有 70% 的 B 细胞仍存活, 而对照小鼠来源的 B 细胞仅有 15% 存活. 9 d 后, 仍有 50% 的转基因鼠 B 细胞存活^[8]. 显示 TALL-1 转基因鼠中 B 细胞具有更长的存活期.

对 8 周龄转基因鼠血清进行了测试, 可见血清球蛋白较对照增加 1 倍以上, 血清中 IgM、IgG、IgA 和 IgE 均有显著增加. 另外, 8 周龄转基因鼠血清中开始出现抗核抗原和抗 dsDNA 的自身抗体. 且自身抗体随转基因鼠生长而增加. 同时也检测到抗组蛋白的自身抗体. 在此基础上, 对不同月龄转基因鼠肾脏进行分析, 可见, 5 月龄鼠肾中形成了

免疫复合物沉积, 60% 以上的肾小球出现沉积. 免疫组织学分析发现, 沉积物中含有一定量 IgG 和大量的 IgM, 同时也含有 IgA 和 C3. 到 8 月龄时, 肾小球明显增大, 伴随出现结缔组织沉积, 沉积物中 IgG 含量增加, 80% ~ 90% 的肾小球受影响, 表明转基因鼠出现肾衰^[8]. 以上特征与狼疮模型小鼠和系统红斑狼疮病人的情况相似. 由以上分析可见 TALL-1 在狼疮样自身免疫性疾病形成中很可能具有重要的调控功能. 然而, TALL-1 在系统红斑狼疮病人发病过程中是否具有表达调控失调仍需要进一步研究.

综上所述, TALL-1 是 TNF 家族中的一个新型细胞因子, 由单核细胞和巨噬细胞产生. 人和鼠 TALL-1 分别由 285 和 309 个氨基酸残基组成, 为 II 型穿膜蛋白质. 重组人 sTALL-1 在 B 细胞增殖、肿瘤细胞凋亡、NF- κ B 和 JNK 的激活以及小鼠体内均具有重要的调控功能. 随着 TALL-1 受体及其信号转导机制的阐明, 人们对 TALL-1 的作用机理及其在体内的调控作用会有更深入的认识.

参 考 文 献

- 1 Smith C A, Farrah T, Goodwin R J. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation, and death. *Cell*, 1994, **76** (6): 959~962
- 2 Nataga S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, **88** (3): 355~365
- 3 Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogen. *J Leukoc Biol*, 1999, **65** (5): 680~683
- 4 Moore P A, Blvedere O, Orr A, *et al.* BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 1999, **285** (5425): 260~263
- 5 Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, *et al.* Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- κ B and c-Jun kinase. *J Biol Chem*, 1999, **274** (23): 15978~15981
- 6 Schneider P, MacKay F, Steiner V, *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, 1999, **189** (11): 1747~1756
- 7 Hahne M, Kataoka T, Schroter M, *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med*, 1998, **188** (6): 1185~1190
- 8 Khare S D, Sarosi I, Xia X-Z, *et al.* Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (7): 3370~3375
- 9 Mackay F, Woodcock S A, Lawton P, *et al.* Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*, 1999, **190** (11): 1697~1710
- 10 Baeuerle P, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell*, 1996, **87** (1): 13~20

Progress on TALL-1, A Member of Tumor Necrosis Factor Family^{*}

LIU Cur-Ren^{**}

(School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract TALL-1 (tumor necrosis factor and apoptosis ligand-related leukocyte-expressed ligand 1), a member of the TNF family, is a novel cytokine identified recently. The human and mice TALL-1 consist of 285 and 309 amino acids, respectively. It was shown that TALL-1 is a type II transmembrane protein which is produced in monocytes and macrophages. A soluble form of human TALL-1 (sTALL-1) has a extracellular domain composed of 152 amino acids which corresponds to C-terminal 134~ 285 site of amino acids. The recombinant human sTALL-1 is functionally involved in stimulating B cell growth, activating NF- κ B (nuclear factor-kappa B) and JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), and inhibiting tumor cell growth. Moreover, the overexpression of TALL-1 in transgenic mice can result in severe B cell hyperplasia and autoimmune lupus-like disease. Therefore, TALL-1 functions as a potent regulatory factor *in vivo* and *in vitro*.

Key words TALL-1, cytokine, regulation

^{*} This work was supported by a grant from Ministry of Education of China.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-531-8564524, E-mail: Liucr@sdu.edu.cn

Received: September 25, 2000 Accepted: November 3, 2000