

AA, AA 进一步转化为 PAF 或 TXB₂ 等, 成为 PMN 激活的信号分子, 最终表现为 PMN 趋化和粘附活性的增强。

参 考 文 献

- 1 颜光涛, 于 勇, 付小兵等. 中国应用生理学报, 1992; 8 (2): 184
- 2 Anderson B O, Moore E E, Banerjee A. J Surg Res, 1994; 56: 199
- 3 Forehand J R, Johnston R B, Bomalaski J S. J Immunol, 1993; 151 (9): 4918
- 4 Duane M S, Waite M. J Leuk Biol, 1992; 52: 670
- 5 Nelson R D, Oyie P G, Simmons R L. J Immunol, 1975; 115: 1650
- 6 Lorente D A. J Immunol Meth, 1978; 19: 47
- 7 Kishino J, Ohara O, Nomura K. J Biol Chem, 1994; 269 (7): 5092
- 8 Jacobson P B, Schrier D J. J Immunol, 1993; 151 (10): 5639
- 9 Vernon L P, Bell J D. Pharmac Ther, 1992; 54: 269

Regulation Role of Phospholipase A₂ Activation on Polymorphonuclear Neutrophil Chemotaxis and Adherence. Yan Guangtao, Hao Xiu hua, Li Zhenjia (*Clinical Basic Institute of*

medicine, Great Wall Hospital, Beijing 100853, China).

Abstract The experimental results show that chemotaxis and adherence of polymorphonuclear neutrophil (PMN) are promoted obviously by exogenous phospholipase A₂ and calcium ionophore (A23187). Furthermore, for the PLA₂ inhibitor p-bromophenacyl bromide (PBPB) and the PLA₂ antibody, the inhibitory effect on PLA₂-induced PMN chemotaxis and adherence is concentration dependent but they have no effect on A23187-induced PMN chemotaxis and adherence. This result indicates that PLA₂ induced chemotaxis and adherence of PMN may be inhibited by direct interaction between PLA₂ and PBPB or PLA₂ antibody. A23187 induced PMN chemotaxis and adherence is different from that induced by PLA₂.

Key words phospholipase A₂, neutrophil, chemotaxis, adherence

人白细胞介素-2 的两个部分拮抗剂*

王志勇 郑仲承 孙兰英 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 通过定点诱变技术得到 6 个生物活性剧烈下降的人白细胞介素-2 (IL-2) 突变体, 其中两个突变体即 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 可以在一定浓度范围内使 IL-2 的生物效应降低. 在对高亲和力 IL-2 受体 (IL-2R) 的竞争抑制实验中, 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 又表现了一定的竞争能力. 这些结果表明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 可部分拮抗天然 IL-2 的作用. 结合 IL-2 二级结构分析及对 IL-2 与 IL-2R 相互作用的已有认识, 可认为 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 的部分拮抗作用产生的原因在于替换残基在空间上对 IL-2 与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基结合微环境的轻微扰动, 干扰了 IL-2 有关残基与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基的结合, 但尚不能完全阻止其与 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基的结合.

关键词 白细胞介素-2 (IL-2), 白细胞介素-2 受体 (IL-2R), 定点诱变, 拮抗剂, 结构-功能

人白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 是第一个被发现和被认识的淋巴因子, 它与辅助 T 淋巴细胞上的 IL-2 受体结合而起重要作用. IL-2 分子有四个 α 螺旋和一个 β 折叠^[1], IL-2 受体 (IL-2R) 则由 α 、 β 、 γ 三个亚基组成. IL-2 结构与功能的研究表明: 20Asp 是与 IL-2R β 亚基结合的重要残基^[2], 38Arg 和 42Phe 是与 IL-2R α 亚基结合的残基^[3,4], 鼠 IL-2 中 141Gln 是与 γ 亚基结合有关的残基^[5]; 58Cys 和 105Cys 形成唯一的一对二硫键; 17Leu、56Leu、121Trp 和 124Phe 等也是为活性正常发挥所必需的残基, 对这些位点进行氨基酸取代可导致 IL-2 活性下降数十倍^[2,6]. 在 IL-2 与 IL-2R 的相互作用中, 单独 IL-2 和 IL-2R α 亚基的结合无法引起胞内信号传递, 而 IL-2 与 IL-2R β 亚基结合后可进一步与 γ 亚基结合而使信号得以传递^[7].

多年来, 人们在研究 IL-2 自身结构与功能关系时, 一直希望这种基础理论研究可转化于应用, 比如找到可与其受体结合而又不发挥生物效应的 IL-2 拮抗剂, 因为这种 IL-2 拮抗剂在自身免疫疾病、抗移植免疫排斥反应等方面具有重要意义. 虽然寻找天然 IL-2 拮抗剂工作受到人们的注目, 但一直没有得到明确结果; 从目前报道看, 仅发现鼠 IL-2 的部分拮抗剂^[5].

我们试图寻找人 IL-2 的拮抗剂, 在获得的近 20 个 IL-2 突变体中, 有 6 个突变体活性下降显著, 其中 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 在 10^{-7} mol/L 时可比较显著地拮抗 10^{-10} mol/L 和 10^{-9} mol/L 天然 IL-2 对维持 CTLL-2 细胞生长的作用. 在用 Hut102 细胞进行的 IL-2 高亲和力受体竞争结合实验中, 也只有 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 具有一定的竞争能力. 这些说明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 确实可以部分拮抗天然 IL-2 的作用.

1 材料和方法

1.1 定点突变制取突变 IL-2

按 Kunkel 的 U-DNA 方法, 详见文献

[8].

1.2 DNA 序列测定

用 USB 公司的 Sequenase kit 及其所提供的方法.

1.3 天然及突变 IL-2 蛋白表达及纯化

天然及已突变 IL-2 基因克隆入表达载体 pLY-4 后转化 JF1125 菌, 30℃ 培养 3 h 后, 42℃ 热诱导基因表达, 发酵后制包涵体, 洗涤溶解去核酸后上 Sephacryl S-200 柱, 收集 IL-2 所在峰后, 复性, 冻干备用.

1.4 IL-2 生物活性测定

用 [³H]-TdR 掺入 IL-2 依赖性细胞株 CTLL-2 方法^[9], 标准品 (200 U/ml) 为 Boehringer Mannheim 公司产品.

1.5 受体竞争结合测定

用 IODOGEN 法碘标, 获得 ¹²⁵I-IL-2 (约 15 Ci/g). 对 Hut102 细胞用 RPMI 1640 洗三遍以除去内源 IL-2, 100 μ l 结合反应液 (RPMI 1640, 10% FCS, 20 mmol/L Hepes, pH7.2) 中含有 100 pmol/L ¹²⁵I-IL-2, 不同浓度的天然或突变 IL-2 (10^{-14} mol/L $\rightarrow$ 10^{-7} mol/L), 以及 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个 Hut102 细胞, 4℃ 保温 2 h 后, 加 0.5 ml 冰冷结合反应液终止反应, 转至 0.5 ml 油层 (80% 邻苯二甲酸二丁酯, 20% 橄榄油), 10 000 $\times$ g 离心 2 ~ 5 min, 以分开结合和游离配基, 用 γ 计数器计数, 每一样品做三个复份.

1.6 理化性质测定

圆二色性 (CD) 用带 DP-500N 微处理机的 Jasco J-500A 圆二色散仪在 25℃ 测定, 蛋白质浓度为 0.3 g/L; 荧光色谱测定, 用 F-4010 荧光分光光度计室温测定, 蛋白质浓度为 0.2 g/L.

2 结 果

2.1 突变 IL-2 蛋白纯化及活性比较

在我们获得的突变体中, 有 6 个突变体的活性比天然 IL-2 有显著的下降 (表 1). 这 6 个突变 IL-2 蛋白的纯化结果见图 1.

表 1 天然与突变 IL-2 生物活性比较

IL-2	突变位点 所处螺旋	比活/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	野生型
天然 IL-2	—	1×10^6	100
15Glu→Val	A	$<1 \times 10^4$	<1
21Leu→Thr	A	$<5 \times 10^4$	<5
57Gln→Glu	B	$<2 \times 10^4$	<2
62Glu→Arg	B	CND ¹⁾	
65Pro→Arg	B	$<2 \times 10^4$	<2
126Gln→Asp	D	$<5 \times 10^3$	<0.5

¹⁾CND: 检测不到任何活性。

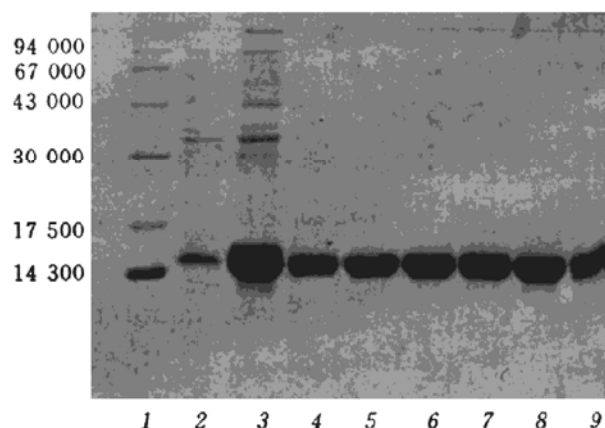


图 1 IL-2 (s) 蛋白纯化示意图

1: 标准蛋白分子量; 2: 粗菌表达物; 3: 包含体内含物; 4~9: 纯品 IL-2。

2.2 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 对天然 IL-2 的部分拮抗功能

从表 1 可看出这 6 个突变 IL-2 活性显著下降, 对它们进行浓度与活性关系研究, 发现 15Val-IL-2、62Arg-IL-2 和 126Asp-IL-2 即使在高浓度 (10^{-7} mol/L) 时也不会对 IL-2 依赖性 CTLL-2 细胞的生长产生很大影响; 而 21Leu-IL-2、57Gln-IL-2 和 65Arg-IL-2 则随着自身浓度的升高表现出可逐渐促进 CTLL-2 细胞的生长, 在 10^{-7} mol/L 浓度时, CTLL-2 细胞 $[\text{H}]$ -TdR 的掺入可达最大值的 30%~40%。

一个理想的 IL-2 拮抗剂应当是能够与天然 IL-2 竞争结合 IL-2R, 但却不能激活靶细胞

增殖, 这样它才能起到免疫阻碍作用。由于天然 IL-2 在 10^{-10} mol/L 到 $6 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 浓度范围内可表现出对 CTLL-2 刺激的剂量效应关系, 10^{-8} mol/L 附近即可表现出最大活力, 为此, 我们固定 15Val-IL-2, 62Arg-IL-2 和 126Asp-IL-2 的浓度为 10^{-7} mol/L , 观察它们对不同浓度 ($10^{-7} \sim 10^{-10} \text{ mol/L}$) 天然 IL-2 活性的影响, 结果见图 2。可见当天然 IL-2 为 10^{-10} mol/L 时, CTLL-2 细胞 $[\text{H}]$ -TdR 的掺入为最大值的 15% 左右, 10^{-7} mol/L 的 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 的加入可使其 $[\text{H}]$ -TdR 掺入降至 1% 以下, 天然 IL-2 为 $6 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 时, CTLL-2 细胞 $[\text{H}]$ -TdR 的掺入为最大值的 31%, 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 存在又可使 CTLL-2 细胞 $[\text{H}]$ -TdR 的掺入下降至 12%~14%, 这说明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 确实可部分拮抗天然 IL-2 对 CTLL-2 细胞的刺激作用, 不过此时天然 IL-2 浓度 (10^{-9} mol/L 、 10^{-10} mol/L) 大大低于突变体 IL-2 的浓度 (10^{-7} mol/L) 小 100~1000 倍, 但同样情况下 62Arg-IL-2 则没有这种拮抗能力。

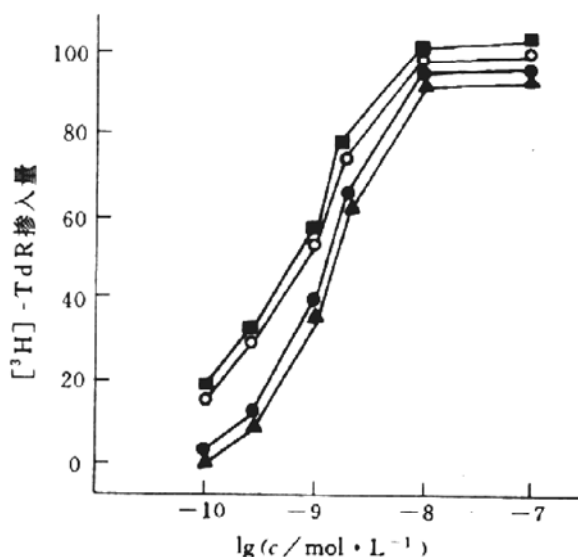


图 2 不同突变 IL-2 对天然 IL-2 的拮抗作用实验

○—○: IL-2; ●—●: 15Val-IL-2; ▲—▲: 126Asp-IL-2; ■—■: 62Arg-IL-2。

2.3 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 对高亲和力 IL-2 受体的竞争结合能力

为了进一步阐明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 对天然 IL-2 存在的部分拮抗作用及其可能机制, 我们用可表达高亲和力 IL-2 受体的 Hut102 细胞为材料, 进行了 15Val-IL-2, 126Asp-IL-2, 62Arg-IL-2 和天然 IL-2 对高亲和力 IL-2 受体的竞争结合实验, 结果见图 3, 非标记的天然 IL-2 随浓度升高可表现出正常的抑制作用; 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 突变体对 ^{125}I -IL-2 与受体结合的竞争抑制作用不如天然 IL-2 强, 而 62Arg-IL-2 则对天然 IL-2 根本不具有竞争能力. 这说明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 两突变体仍保留部分与高亲和力受体的结合能力. 前面已证明它们失去激活 CTLL-2 细胞的活性, 这可能就是此两突变体能部分拮抗天然 IL-2 生物效应的原因所在.

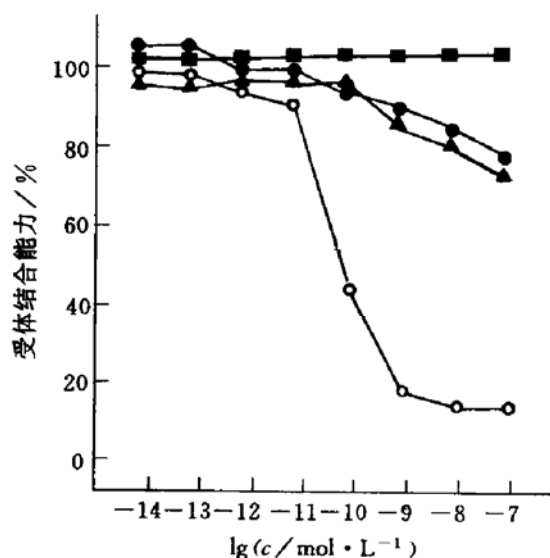


图 3 不同突变 IL-2 对高亲和力 IL-2 受体细胞的竞争结合抑制作用

○—○: IL-2; ●—●: 15Val-IL-2; ▲—▲: 126Asp-IL-2; ■—■: 62Arg-IL-2.

2.4 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 的理化性质研究

在肯定了 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 对天然 IL-2 具有部分拮抗作用之后, 我们对这两个突变体的理化性质作了一些研究. 15Val-IL-

2 和 126Asp-IL-2 的 CD 谱和荧光发射图谱分别见图 4a 和图 4b, 图 4a 显示 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 的螺旋含量下降, 即其空间结构与天然 IL-2 有所不同; 在 IL-2 分子中, 只有一个 Trp 分子为 121Trp, 它在空间上与 A 螺旋靠近, 处于疏水环境中, 它的荧光发射波长为 335nm 左右, 这一疏水环境对 IL-2 的 20Asp 与 IL-2R β 亚基结合必不可少^[6], 图 4b 显示此两突变 IL-2 并未改变 121Trp 的疏水环境.

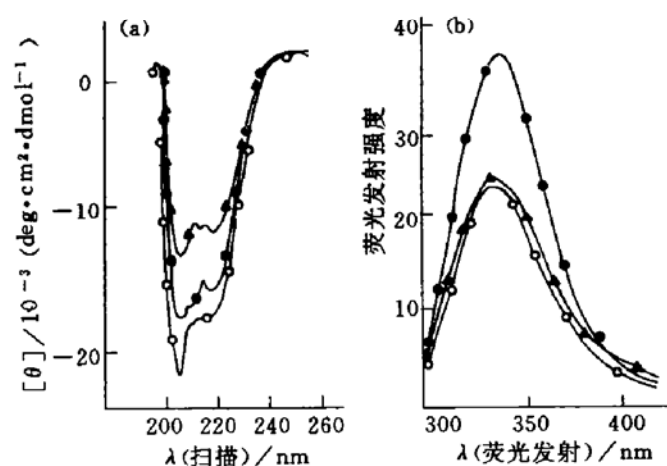


图 4 人 IL-2 部分拮抗剂与天然 IL-2 的理化性质比较

(a) 圆二色性谱; (b) 荧光发射图谱. ○—○: IL-2; ●—●: 15Val-IL-2; ▲—▲: 126Asp-IL-2.

3 讨 论

研究 IL-2-IL-2R 相互作用分子机制的一个主要目的是弄清它们的结合过程和胞内信号激活过程能否彼此相互独立, 因为, 能够结合 IL-2 受体但不传导细胞增殖信号的 IL-2 类似物 (或突变体) 有可能成为非常有效的免疫抑制剂. 由于 IL-2R 由三个不同亚基组成, 不同亚基的组合又可表现出对 IL-2 结合具低、中、高三种不同的亲和力形式: 单独 IL-2R α 亚基可成为对 IL-2 的低亲和力受体形式 ($K_d = 10^{-8}$ mol/L), IL-2R β 和 γ 亚基可组成对 IL-2 的中亲和力受体形式 ($K_d = 10^{-9}$ mol/L), 而 IL-2R α 、 β 和 γ 亚基三者可表现对 IL-2 的高亲和力受体形成 ($K_d = 10^{-11}$ mol/L). 因此对拮抗

剂来讲,所结合的 IL-2 受体究竟是哪种或哪些亚基的组合形式就非常耐人寻味. 在人 IL-2 和鼠 IL-2 蛋白的结构-功能研究中,相继发现了一些可特异地只与 IL-2R α 或 IL-2R β 相结合且活性又很低的 IL-2 突变体,但是即使这些突变体 IL-2 的浓度比可表现生物作用的天然 IL-2 的浓度高 500~5000 倍,它们也不会对天然 IL-2 刺激 CTLL-2 细胞生长的作用产生任何影响. 由此可见,只与 IL-2R α 低亲和力受体或 IL-2R β 中亲和力受体正常结合,而活性很小的 IL-2 突变体并不能起拮抗剂作用,因此一个理想的拮抗剂应当是能够与高亲和力 IL-2 受体结合,但又不表现多少活性的类似物.

Zurawski 等^[10]对鼠 IL-2 结构与功能关系的研究中,采用了缺失、盒式突变体和定点突变等多种手段,在 5 年多的时间里获得了几百个鼠 IL-2 的突变体或类似物. 最终观察到 141Asp-IL-2 在 200~2000 倍过量浓度时对野生型 mIL-2 具有轻微的拮抗作用^[5,10],并认为 141Gln 是 mIL-2 与 IL-2R 中 γ 亚基相互作用的位点. 这一位点的突变使 mIL-2 对 IL-2R α 结合正常,对 IL-2R β 复合体的亲和力下降,但并没有完全丧失,这使得突变体 141Asp-IL-2 在 IL-2R α 、 β 、 γ 亚基均存在的具高亲和力受体的鼠 HT2 细胞表现的亲和力($K_d=10^{-10}$ mol/L 左右)要比中亲和力($K_d=10^{-9}$ mol/L)强,但比高亲和力($K_d=10^{-11}$ mol/L)弱^[5].

由于人 IL-2 与鼠 IL-2 蛋白具有 56% 的同源性,因此鼠 IL-2 的研究对人 IL-2 的研究有一定的借鉴作用. 在我们对 IL-2 的研究中,选择的 19 个位点分布在 A, B, C, D 四个 α 螺旋(本文只列出了 6 个活性下降显著的突变体),除了 126Gln 这一与鼠 141Gln 对应的位点外,对其他位点的取代无论在人或鼠 IL-2 中均没有研究报道,而其中的 15 位 Gln 非常有意思,它在鼠 IL-2 中对应点为鼠 IL-2 特有的一连串 12 个 Gln.

我们发现的 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 这两个部分拮抗剂,从拮抗能力讲 126Asp-IL-2 比 15Val-IL-2 稍强一些,但两者仍处于同一

数量级,它们在自身浓度为 10^{-7} mol/L 时不表现为多少活性,却可部分抑制 10^{-10} ~ 10^{-9} mol/L 天然 IL-2 的效应;而鼠 141Asp-IL-2 在 2×10^{-7} mol/L 时,可部分抑制 5×10^{-11} ~ 10^{-9} mol/L 鼠 IL-2 的效应^[5];可见人 IL-2 和鼠 IL-2 的这些部分拮抗剂突变体在作用浓度范围方面差异并不大.

对高亲和力 IL-2R 的竞争抑制实验表明 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 两突变体确可表现出一定的竞争能力. 由于只具有中亲和力受体结合能力的 IL-2 突变体 42Lys-IL-2 并不能表现明显的竞争^[4],所以这两个突变体对高亲和力 IL-2R 的结合能力虽不如天然 IL-2,但必定比天然 IL-2 与单纯的中亲和力受体 IL-2R β 之间的结合要强. 从这一点出发,结合两突变体的空间结构变化分析,我们认为:此两突变体 IL-2 与 IL-2R α 亚基的结合正常,而与 IL-2R β 的结合则有一定缺陷,比如结合较慢而解离较快,使其与 IL-2R β 的结合不如天然 IL-2 那样稳定. 这样,在竞争拮抗实验和高亲和力受体竞争抑制实验中,突变 IL-2 浓度远大于天然 IL-2 时,才可与 IL-2R β 结合通过占位去与低浓度天然 IL-2 竞争. 但又因结合速率慢稳定性弱而不能完全阻止结合速率快稳定性强的天然 IL-2 发挥生物效应,况且其自身与 IL-2R β 亚基的结合也会表现轻微活性,因此只可能表现为部分拮抗功能. 当然 15Glu, 126Asp 也极可能就是直接参与 IL-2R β 或 IL-2R γ 亚基结合的残基,但这需要用更为精细的对不同亲和力受体的结合实验来进行研究才可阐明.

参 考 文 献

- 1 Mott H R, Driscoll P C, Campbell I D *et al.* Biochemistry, 1992; 31: 7741
- 2 Collins L, Tsien W H, Ju G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 7709
- 3 Weigel U, Meyer M, Sebald W. Eur J Biochem, 1989; 180: 295
- 4 Sauve K, Nachman M, Grace J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 4636
- 5 Zurawski S M, Imler J L, Zurawski G. EMBO J, 1990;

- 9: 3899
- 6 Grace J, Collin L, Patricia L K *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 5723
- 7 Voss S D, Leary T P, Robb R J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 2428
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 15-74
- 9 Gillis S, Ferm N, Smith K A. J Immunol, 1978; 120: 2027
- 10 Zurawski S M, Vega F, Zurawski G *et al.* EMBO J, 1993; 12: 5113

Two Partial Antagonists of Human Interleukin-2. Wang Zhiyong, Zheng Zhongcheng, Sun Lanying, Liu Xinyuan (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China*).

Abstract Using site-directed mutagenesis method, six human interleukin-2 (IL-2) mutants with markedly reduced bioactivities were obtained, among them two mutants 15Val-IL-2 and 126Asp-IL-2 could decrease

the biological effect of wild-type IL-2 in a specific concentration range. In assays of competition inhibition to high-affinity IL-2 receptor (IL-2R), 15Val-IL-2 and 126Asp-IL-2 exhibited significant competitive abilities once again. These results showed that 15Val-IL-2 and 126Asp-IL-2 could partially antagonize the function of wild-type IL-2. Taking the analysis of IL-2 secondary structure and the knowledge of interaction between IL-2 and IL-2R into consideration, it may be concluded that the partial antagonism of 15Val-IL-2 and 126Asp-IL-2 lies in that substitution slightly disturb the tertiary binding microenvironment of IL-2 and IL-2R $\beta\gamma$ subunits, thus interfering the binding of relevant IL-2 residues with IL-2R $\beta\gamma$ subunits which yet is insufficient to totally disrupt such binding.

Key words interleukin-2 (IL-2), interleukin-2 receptor (IL-2R), site-directed mutagenesis, antagonist, structure-function

用于立体视检测的微机软件包的设计*

金贵昌 张景芝 周桂荣 郑竺英

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 为了快速、方便、准确地检测人的立体视功能, 根据双眼视差原理, 设计了用于立体视检测的微机软件包称为立体视检测 (SVT)。利用该软件可在彩色屏幕 (VGA) 上产生静态等视差图 (图中各部分的视差不随空间位置的变化而改变)、变视差图、以及在深度上的正弦波状起伏图形。叙述了设计原理和程序框图; 报导了用 SVT 软件包对视力正常和异常儿童的立体视检测结果并讨论了其临床应用价值。

关键词 随机点立体图, 立体视检测, 软件包

20 世纪 60 年代初 B. Julesz^[1]首次用计算机产生随机点立体图对 (RDS), 其后 RDS 被用于视觉感知研究和立体视检测。在立体视检测方面, 国内出版了“立体视觉检查图”^[2], 其中大部分是 RDS 图, 它虽有携带方便、成本低廉

的特点, 但是因其印刷在纸上, 其图形和视差值以及排列顺序都是固定的, 对某些被试者存

* 北京市自然科学基金和中国科学院神经科学前沿课题的开拓重大项目资助。

收稿日期: 1994-12-05, 修回日期: 1995-04-11