

免疫球蛋白基因的研究进展

吴 炯

(南京大学生物化学系)

提 要

本文介绍了近年来免疫球蛋白 (Ig) 基因的分子生物学研究概况。其中包括抗体的多样性产生机制与 Ig 基因家族成员重排、拼接和体细胞突变的关系, Ig 重链类别转换与其恒定区基因上游的 S 序列间重组的关系, 还有 Ig 启动子和增强子对 Ig 基因在 B 细胞中特异性转录的调控作用。最后简要概述了 Ig 超基因家族和其分子进化研究以及 Ig 的基因和发育工程研究状况。

近年免疫球蛋白 (Ig) 基因的分子生物学研究进展迅速。现在已初步解决了抗体的多样性 (Diversity)、Ig 基因的结构、特异性表达调节等分子免疫学问题; 同时 Ig 基因发育和遗传工程的研究为 Ig 基因的分子生物学增添了新的内容。本文拟就近年来这方面的研究状况作一概述。

一、抗体的多样性产生机制

抗体的多样性产生机制所要阐明的问题是机体免疫活性细胞如何用有限的 DNA 遗传结构去编码成千上万的多多样性抗体^[1]。在早期人们提出了两种学说来解释: 种质学说 (germ line theory) 认为机体种质 (精子和卵细胞) 中含有众多的抗体编码基因。而体细胞突变学说 (somatic mutation theory) 则认为机体细胞仅有有限的 Ig 编码基因, 但在抗体形成细胞 (AFC) 发育和分化过程中, 这些基因可发生突变。后来又有人提出了编码抗体的“两基因—多肽”理论, 认为抗体的免疫球蛋白重链和轻链的可变区和恒定区可能由分开的 DNA 片段编码。但当时对其基因结构并不十分了解。直到 1976 年, Tonegawa 及其同事才报道了第一个证据^[2]: 在小鼠胚胎细胞中抗体轻链可变区和

恒定区是由两个不同的 DNA 片段编码的, 并且两者位于同一染色体的不同位置上; 在抗体形成细胞 (如 MOPC 321 骨髓瘤细胞) 中则是两者连接在一起。这证明了 Ig 基因在抗体形成过程中发生了重排。

人们运用基因克隆和序列分析方法进一步弄清楚了一些 Ig 基因的结构。Ig κ 和 λ 链的 V 区实际上是由 2 个基因片段所编码, 分别称为 V 基因和 J 基因。编码其 C 区的基因称为 C 基因。J 基因位于 C 基因上游 1250bp 处, 这一间隔序列并不编码 Ig 轻链蛋白; 后来将其称为内含子。V 基因位于 J 基因的上游, 当抗体形成细胞成熟时, V 基因和 J 基因发生重排、连接到一起 (称为 V-J 重排), 然后转录成 V-J-C mRNA。mRNA 发生拼接除去 J 和 C 之间的内含子, 成熟的 V-J-C mRNA 即可翻译成 Ig 轻链蛋白。Ig 重链基因以类似的方式进行组装和表达。不同之处是它由一条染色体上 3 个 (轻链是由 2 个) 分开的 DNA 片段组装到一起而形成一完整重链 V 区编码序列。第 3 个片段称为 D 片段, 意为多样性 (diversity), 它位于 V 和 J 基因之间。V、D 和 J 基因之间重排称为 V-D-J 重排。

深入研究发现 V、D、J 和 C 基因都不是以

单拷贝基因方式存在,它们是以基因家族的方式存在。每一基因家族成员中各自互不相同。所以归纳起来抗体多样性产生机制有如下几点:

(1) 种质多样性 (germline diversity): 即上述的免疫活性细胞中含有多拷贝的 V、D 和 J 基因。据估计人的重链 V 基因有 80 个, J 片段有 6 个, D 片段有 50 个。轻链的 V 基因有 150 个, J 有 5 个。

(2) 组合多样性 (combinational diversity): 指由于不同的 V-J 或 V-D-J 重排组合所产生的多样性。V 基因只能与下一个 J (或 D) 不能与下一个 V 基因发生重排^[4]。这样多个 V、D、J 基因片段之间可产生众多组合。

(3) 连接多样性 (junctional diversity): 指在基因重组时, V、D 和 J 之间的连接不是很精确的, 连接点可以左右移动几个核苷酸, 甚至可以通过一些现在未知的机制产生新的氨基酸密码子^[3]。这些变化也可以产生多样性。

关于各基因间重排、连接的机制问题现在还不完全清楚。值得注意的是已发现在 V、J 基因的两侧都分别有 7 个和 9 个核苷酸组成的非编码保守旁侧序列, 这就是所谓的 Ig 基因“7 体和 9 体规则” (7mer and 9mer rule)。V 和 J 基因可以通过两者间保守序列互补形成“茎-环”结构。在一些酶的作用下, 切掉中间的“环” DNA, 这样就通过染色体内重排将 V-J 连接到一起了。

在抗体多样性形成机制方面, 体细胞突变也起着非常重要的作用^[4]。有人证明浆细胞中 V_H 基因发生突变的频率比在同一细胞中非 Ig 基因发生突变的频率高得多。在免疫应答成熟过程中抗体亲和力成熟 (maturation of antibody affinity) 就是因为 Ig V 基因发生突变产生了多样性高亲和力抗体所致^[5]。Siekevitz 等人证明 Ig 重链 V 基因 (V_H) 在二次免疫应答中比在初次免疫中突变程度高。并且, 体细胞突变机制不仅使抗体的亲和力增加, 同时大量的突变发生还可以改变抗体的特异性^[6]。这

样机体通过体细胞突变机制可以产生一些基因组中原先并不编码的抗体。

二、Ig 重链类别转换机制

在 B 细胞成熟过程中 Ig 重链基因 DNA 要经历两种类型的基因重排: (1) 首先是前面已讲过 V_H、D 和 J_H 基因片段的重排以连接形成一个完整的 V 区编码基因; (2) 第二种重排为 V 区基因与不同的 C 基因一起重排、转录, 这一过程称为 Ig 重链的同种型转换 (isotype switch) 或类别转换 (class-switch)。已发现象 V、D、J 基因家族一样, C 基因也是由多拷贝基因组成了 C 区基因家族。Ig 重链类别的转换就是从该基因家族中选择不同的 C 基因表达, 其顺序为 $\mu \rightarrow \gamma^3 \rightarrow \gamma' \rightarrow \gamma^{2b} \rightarrow \gamma^{2a} \rightarrow \varepsilon$ 或 α 。这一问题也是近年来分子免疫学研究的热点。

利用不同分化阶段的 B 细胞系, 将它们的 Ig 重链 C 基因 (C_H) 组成进行 Southern 印迹分析和 DNA 序列测定。结果表明在那些发生类别转换的 B 细胞系中, 类别转换是由表达的 C_H 基因与 V_H-D-J_H V 区基的下游序列发生重组而产生的。在这一过程中同时除去了该 C_H 基因上游的其它 C_H 基因及间隔序列^[7]。这一机制称为环切除 (loop deletion)。进一步发现这是发生在转换序列 (switch sequence, S 序列) 内的。在每一 C_H 基因的上游有一 S 序列 (C_μ 例外), 它由一连串重复序列所组成, 其中重复序列由五核苷酸 (pentamer) 结构 TGAGC 和 TGGGG 组成^[8,9]。C_μ、C_ε 和 C_α 的 S 序列具有高度的同源性。这些基因的 S 序列决定了该序列的类别转换作用, 例如 S_ε 序列与 Ig E 表达调节有关^[10]。通过 S 区域的同源配对, 然后在一些特异性或非特异性重组酶 (recombinase) 的作用下发生 V_H·D·J_H 与不同的 C_H 基因进行基因内重组, 完成类别转换过程。

类别转换的调节可以在两个方面进行: 在分子水平, 由于类别特异性重组因子的参与, 使得各 C_H 基因表达转换有序进行; 在细胞水平, 由于 B 细胞受各种 B 细胞刺激因子的作用以及

与免疫活性细胞之间相互作用这些外在因素的影响,可以选择 B 细胞表达特定的同种类型的 Ig。新近发现一些免疫活性细胞因子可以调节合成抗体的 B 细胞进行类别转换。如 γ -干扰素可以促进小鼠 B 细胞向分泌 IgG_{2a} 进行类别转换,而 B 细胞刺激因子(BSF)则使其向 IgG₁ 和 IgE 进行类别转换^[11]。

三、Ig 基因细胞特异性表达的调节

Ig 基因表达调节研究的一个主要问题就是要阐明:为什么重排、组装好的完整 Ig 基因只在 B 细胞中进行转录表达?近年来的研究使这一问题的解决初见端倪。现已初步证明 Ig 基因在 B 细胞中的特异性表达是由 Ig 基因 DNA 调控序列与特异性细胞核内蛋白质因子(即转录因子)相互作用来进行调控的。这种特异性的 DNA 调控序列就是 Ig 基因的增强子和启动子结构。

Ig 启动子和增强子中都含有 Ig 八体核苷酸(Ig octamer)序列,至少有三种转录因子可对其进行识别和结合^[12]。Ig 基因在 B 细胞中特异性转录严格依赖于完整的该保守八体核苷酸序列存在。已发现上述三种因子中有一种(OTF-2A)只存在于淋巴细胞中^[13]。所以推测 OTF-2A 因子与 Ig 启动子或/和增强子中 Ig 八体核苷酸序列结合后可激活 Ig 基因在 B 细胞中进行特异性转录。

然而,也有人认为 Ig 启动子的作用仅决定了 Ig 基因转录的精确性和效率。它与 Ig 基因在 B 细胞中特异性表达可能关系不大^[14]。Ig 增强子可能在这一过程中起决定作用。有人用 DNA 结合保护实验研究了 Ig 重链增强子的调节作用。结果表明该增强子内有 5 个独立的蛋白因子结合区域,分别称为 E₁、E₂、E₃、E₄ 和 O。除去这 5 个区域中任何一个都可引起增强子活性降低^[15]。只有在 B 细胞中这些因子才能全部与其增强子特异序列结合,最终促进了 Ig 重链基因在 B 细胞中特异性转录。

在 κ 轻链基因增强子内也有 2 个不同的蛋白质因子结合区域^[16],分别称为 NF- κ B 因子

结合部位和 NF- κ E₂ 因子结合部位。NF- κ E₂ 因子存在于所有类型的哺乳类细胞中,而 NF- κ B 因子只存在于成熟的 B 细胞中。然而,后来也发现 NF- κ B 因子也以一种无活性形式存在于其它细胞中。甚至前-B 细胞中的 NF- κ B 因子也无活性,当用佛波酯(如 PMA)刺激和诱导时出现的 NF- κ B 因子才能表达其活性^[17]。所以说 NF- κ B 因子对于 Ig κ 链基因在 B 细胞中特异性表达是关键的。进一步,有人证明 NF- κ B 因子对于 κ 链基因的启动和建立(establishment)是必需的,但在启动以后对其转录的维持并不必要^[18]。

总之,Ig 基因在 B 细胞中特异性转录调节象其它组织特异性基因转录表达调节一样,关键在于特异性蛋白质-DNA 相互作用。这些起调节作用的蛋白质因子又是受什么机制调节呢?这是要进一步研究的问题。抗原/丝裂原(mitogen)可以通过一系列细胞信号传递途径,最后将这些蛋白质因子激活和/或诱导其表达,或者介导其它调节分子作用于这些蛋白质因子(如解除抑制因子的作用)。通过这些蛋白质因子的作用也可在 B 细胞不同的分化状态下使得 Ig 基因表达不同。

四、Ig 超基因家族及其分子进化

一组具有相似功能的同源基因组多基因家族(multi-gene family),而超基因家族(super-gene family)则是由许多多基因家族和序列相关(功能上不必相关,意味着在进化上来自一共同祖先基因)的单拷贝基因所组成。Ig 超基因家族是 Ig 重链和轻链多基因家族以及一些与 Ig 基因有同源结构的多基因家族和单拷贝基因所组成,其中包括:编码 T 细胞抗原受体的 α 、 β 、 γ 和 δ 多基因家族、编码 MHC I 类和 II 类分子的多基因家族以及编码参与淋巴细胞识别功能的 CD₂、CD₃、CD₄ 和 CD₈ 分子的基因和一些淋巴细胞表面抗原结构(Thy-1, OX-2 和 LFA-3)的编码基因,还有多聚 Ig 受体基因、细胞间粘连分子-1(ICAM-1)和神经细胞粘连分子(NCAM)以及髓脂相关糖蛋白

(MAG)的编码基因、甚至昆虫的神经生长相关蛋白 fasciclin II 的编码基因等都属 Ig 超基因家族成员^[19-21]。这些基因编码的产物具有重要的生理功能,涉及到参与从胚胎发育的调节到免疫应答中自我与异己的识别等广泛范围内的效应。由此可见 Ig 超基因家族具有惊人的进化多样性。然而,其所有的成员产物都含有一共同的结构——Ig 同源单位 (Ig homology unit)。每一 Ig 同源单位含大约 110 个氨基酸残基,其中有一二硫键将 65 个氨基酸连成环状结构,肽链按反平行 β -片层折叠,这样一个 Ig 同源单位就形成了一个保守的三维结构^[25]。所有成员的产物都是将这样的结构作为一种识别结构域 (recognition domain) 介导不同的相互识别作用^[22]。此外,从这些成员 DNA 外显子/内含子结构来看也有许多相似之处。所以说它们之间在分子进化上是有联系的。

在 Ig 超基因家族进化的最初阶段,该基因的一个祖先基因可能编码一种细胞表面蛋白,它含有的外显子可以编码一前导肽 (leader peptide) 和一 Ig 同源单位和一个跨膜区域。如果该基因发生部分重复,这样就形成了一个含有祖先 V 区外显子和 C 区外显子的基因,这就是原始的 Ig 轻链基因。现在观察到 V 和 C 之间很少序列上的同源性,各自已经过广泛的多样性变化。然而在两者之间在一些保守氨基酸残基位置、三维结构上还有许多相似之处。所有的 Ig 超基因家族成员产物的 Ig 同源单位有的与 C 区相似程度大,有的与 V 区相似程度大。它们可能都是在进化过程中分别由原始的 C 和 V 基因演变而来。在 Ig 超基因家族进化过程中 DNA 重排和体细胞突变是很重要的,这可以发生在单核苷酸、基因、基因家族等不同的水平。至今,B、T 在细胞中 Ig 基因和 T 细胞受体 (TcR) 基因仍然保留着高频率的 DNA 重排和体细胞突变。

五、Ig 的基因和发育工程

Ig 的基因工程研究的目的和任务就是要制造用于临床的第二代抗体^[24]。由于制造人单克

隆抗体技术上的困难以及人单克隆抗体亲和力和低等缺点,同时为了避免小鼠单克隆抗体在人体内的“免疫毒性”作用,有人用基因工程方法将编码小鼠抗体 V 区的基因与编码人抗体恒定区的基因连接在一起,然后将该杂合基因插入载体中,在骨髓瘤细胞/酵母中可以表达嵌合抗体。该嵌合抗体克服了上述人和鼠抗体的缺点。也有人将 Ig V 区基因与一些酶或毒素基因连接在一起,从而可以得到具有特异功能的改造抗体。最近,有人成功地用基因工程生产了另一种抗体——单链抗体,它是由一连接肽连接 Ig 重链和轻链的可变区而成。单链抗体有分子小、高度稳定、无免疫毒性和成本低等优点。

将 Ig 基因导入小鼠受精卵中,再将该受精卵植回小鼠“假孕”子宫内,让其发育成成熟小鼠。这种小鼠可以表达转染的外源 Ig 基因,被称为 Ig 转基因小鼠 (transgenic mouse)^[23]。有人将这一过程称为 Ig 的发育工程。这一方面为免疫缺陷的基因治疗提供了线索。更重要的是,Ig 转基因小鼠为研究 Ig 基因的重排、表达调节,类别转换,等位基因互斥等许多分子免疫学问题提供了一种全新的技术。相信由于转基因小鼠的应用将有助于解决许多免疫学难题。

本文承蒙朱德煦教授审阅、特此致谢

参 考 文 献

- [1] Marx, J.: *Science*, 1987, 233, 484.
- [2] Hozumi, N. & Tonegawa, S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976, 73, 3628.
- [3] Heller, J. et al.: *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 637.
- [4] Wysocky, L. J. et al.: *J. Exp. Med.*, 1987, 166, 1.
- [5] Caren, D. M. & Gearhart, P. J.: *Fed. Proc.*, 1987, 46, 1381.
- [6] Siekevitz, M. et al.: *Cell*, 1987, 48, 757.
- [7] Strevnegger, N. J. & Abbott, J.: *EMBO J.*, 1986, 5, 95.
- [8] Hummel, M. et al.: *J. Immunol.*, 1987, 138, 3539.
- [9] Borjillo, G. U.: *J. Immunol.*, 1987, 139, 1326.
- [10] Gritzmacher, C. A. & Liu, F. T.: *J. Immunol.*, 1987, 139, 603.
- [11] Snapper, C. M. & Paul, W. E.: *Science*, 1987, 236, 1237.
- [12] Muller, M. M. et al.: *Nature*, 1988, 336, 544.

(下转第 425 页)

生理学家和药物学家的共同协作才能完成,而这样的协作团体国际上正在逐渐形成,而且已取得初步的结果^[23]。

我们近两年来也对胃($H^+ + K^+$)-ATPase开展了一些探讨性的研究,并在两方面有了一定的结果(待发表)。(1)从纯化方面,我们用一种疏水性质的 T-Gel 对 one-step 梯度离心纯的猪($H^+ + K^+$)-ATPase 微囊体,在疏水层析柱上作了进一步的纯化,将很难分离的 Mg^{2+} -ATPase 大部份从($H^+ + K^+$)-ATPase 中除掉。另外,我们摸索了在国际上尚少成功报道的大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 的制备方法,在实验室现有的条件下制备出较高活力的($H^+ + K^+$)-ATPase,从而研究了 ATP 浓度、pH 及 K^+ 对大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 活力以及胃囊泡主动质子转运速度的影响。(2)在胃酸调节和胃病机理方面,我们选用大白鼠作为模型动物,对由消炎痛引起的急性胃粘膜病变与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase 活力的关系进行了初步探讨。整体和离体实验结果皆表明,消炎痛对大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 有抑制作用。而对萎缩性胃炎有显著疗效的“维酶素”可使有急性胃粘膜病变的大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase 活力恢复到正常水平,但其如何与胃($H^+ + K^+$)-ATPase 作用及其对胃粘膜病变的药理机理还不甚清楚,有待于进一步的研究。

参 考 文 献

[1] Forte, J. G. et al.: *J. Cell Physiol.*, 1974, 69, 293.

(上接第 420 页)

- [13] Scheidereit, C. et al.: *Cell*, 1987, 51, 783.
- [14] Maniatis, T. et al.: *Science*, 1987, 236, 944.
- [15] Gerster, P. et al.: *EMBO J.*, 1987, 6, 1323.
- [16] Sen, R. & Baltimore, D.: *Cell*, 1986, 46, 705.
- [17] Briskin, M. et al.: *Science*, 1988, 242, 1036.
- [18] Atchison, M. & Perry, R. P.: *Cell*, 1987, 48, 121.
- [19] Harrelson, A. L. & Goodman, C. S.: *Science*, 1988, 242, 700.

- [2] Lee, J. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 60, 825.
- [3] Saches, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7690.
- [4] J. J. H. M. de, pont and S. L. Bonting: *Structure and Mechanism of Gastric K, H-ATPase*, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam New York, Oxford, 1982.
- [5] Wolosin, J. M.: *Am. J. Physiol.*, 1985, 248, G595.
- [6] Forte, J. G. et al.: *Bioscience*, 1985, 35, 38.
- [7] Ito, S. et al.: *Gastroenterology*, 1977, 73, 889.
- [8] Smolka, A. et al.: *Am. J. Physiol.*, 1983, 245, G589.
- [9] Forte, J. G.: *Gastroenterology*, 1977, 73, 941.
- [10] Saches, G. et al.: *Gastric Secretion, In Intern. Rev. Physiol., Gastrointestinal Physiology*, University Park Press, Baltiwores, U. S. A. 1977, 12, 147.
- [11] Wolosin, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 3149.
- [12] Saccomani, G. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 465, 311.
- [13] Chang, H. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1977, 464, 313.
- [14] Smolka, A. et al.: *Am. J. Physiol.*, 1983, 245, G598.
- [15] Saccomani, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 7727.
- [16] Gary, E. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 16788.
- [17] Smolka, A.: *Gastroenterology*, 1986, 90, 532.
- [18] Robert, A. Farley, et al.: *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 3899.
- [19] Edwin, Raban, et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 1434.
- [20] Saches, G. et al.: *Physiol. Rev.*, 1978, 58, 106.
- [21] Ray, T. K. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1978, 443, 451.
- [22] Bonting, S. L. et al.: *Biochem. Soc. Transact.*, 1980, 8, 40.
- [23] Elander, B. et al.: *Scand. J. Gastroenterol.*, 1986, 21, 268.
- [24] Wolosin, J. M. et al.: *J. Membr. Biol.*, 1983, 71, 195.

[本文于1988年6月30日收到]

- [20] Dustin, M. L. et al.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 213.
- [21] Anderson, P. et al.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 199.
- [22] Nossal, G. J. V.: *Immunol. Today*, 1988, 9, 286.
- [23] Benoist, C. et al.: *Immunol. Today*, 1986, 7, 138.
- [24] William, G.: *Trends in Biotechnol.*, 1988, 6, 36.
- [25] Hood, L. et al.: *Cell*, 1985, 40, 225.

[本文于1988年6月30日收到]