

白细胞介素-1 的分子生物学

蔡仕英 马贤凯

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

提 要

本文先简述了 IL-1 的来源及生物功能, 接着对不同生物的 IL-1 α 、IL-1 β 前体蛋白进行了同源比较和分析, 然后就人类 IL-1 β 分子的结构与功能的关系及空间结构进行了探讨。

关键词 白细胞介素-1, 生物活性, 序列同源性, 结构与功能

白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 是一种主要由单核、巨噬细胞合成分泌的蛋白多肽。生物体内的 IL-1 有两种存在形式, 即 α 型和 β 型 (IL-1 α , IL-1 β)₁, 它们的一级结构虽然完全不同, 但却具有相同的生物活性。具有生物活性的成熟 IL-1 (M. W. 17kD) 是由胞内的 IL-1 前体蛋白 (M. W. 31kD) 剪切加工而成^[1-3]。

一、IL-1 的来源及生物功能

早在 1972 年, Gery^[4] 等发现人外周血单核细胞和小鼠脾脏巨噬细胞在细菌内毒素刺激下能分泌一类具有促进小鼠胸腺细胞对丝裂原的增殖反应能力的活性因子, 并定名为淋巴细胞激活因子 (lymphocyte activating factor, LAF)。后来研究表明, 它还具有调节 T、B 淋巴细胞活性的功能, 因此在 1979 年第二届国际淋巴因子讨论会后建议将 LAF 更名为 IL-1^[5]。现在发现体内至少有 20 余种细胞能分泌 IL-1, 这些细胞分布在全身各器官组织中, 分别具有不同的胚胎发育起源,^[6,7] 其中激活的单核——巨噬细胞是 IL-1 的主要来源。近年来, 分子免疫学、分子遗传学的发展, 大大促进了有关 IL-1 的分子生物学的发展, 人们对 IL-1 有了更广泛、深刻的认识, 发现它是一种具有多功能的淋

巴因子, 主要表现为: (1) 引起机体发热; (2) 诱导急性期变化; (3) 刺激关节细胞释放 PGE₂ 和胶原酶; (4) 增强 B 细胞对丝裂原和抗原的应答反应; (5) 激活 T 细胞诱导 IL-2 及 IL-2 受体的产生; (6) 诱导破骨反应; (7) 引发肌蛋白水解; (8) 刺激骨吸收; (9) 增强机体的抗肿瘤免疫应答效能; 此外, IL-1 的过量产生或分泌缺陷还与许多结缔组织病和自身免疫性疾病有关^[8,9]。可见, IL-1 在机体免疫调节网络中居十分重要地位 (如图 1), 且对许多免疫系统以外的细胞有一定调节作用。

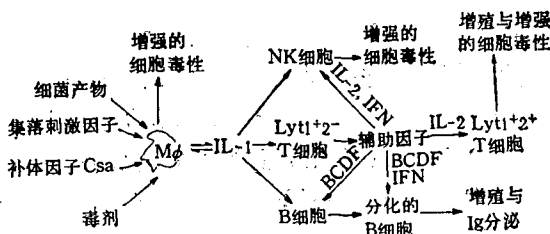


图 1 IL-1 的免疫调节功能

二、IL-1 前体的比较与分析

近年来的研究表明, 人、小鼠、兔和牛的 IL-1 均有两种存在形式, 即 α 、 β 型, 其中前三者的一级结构如图 2, 3, 4^[2,10] 它们具有如下特点: (1) 前体和成熟的 IL-1 的大小无种属差

异（前体约 267—271 氨基酸残基，成熟的约 153—158 氨基酸残基），且成熟分子的活性部位均在前体的 C-末端部分；（2）IL-1 α 和 β 前体蛋白均不具有经典的信号肽顺序；（3）前体蛋白中均无较明显的疏水区；（4）前体蛋白的剪切加工均发生在胞外或细胞膜上；（5）不同生物的同型 IL-1（即 α 型或 β 型）具有高度同源性，同种生物的不同型（即 α 型和 β 型）IL-1 的同源性却极小，如表 1^[2]。

不同生物的同型 IL-1 的高度同源性与同种生物不同型 IL-1 的同源性极小的事实提示

人们，在进化过程中保持着两种独立的基因，而它们的蛋白产物却具有相同的生物功能。不同生物的 IL-1 α 同源性为 61—65%，IL-1 β 的同源性为 68—74%，这表明 IL-1 α 家族的蛋白比 IL-1 β 家族的蛋白进化得快。IL-1 α 前体的前 45 个氨基酸具有高度的保守性，而 IL-1 β 的成熟蛋白也表现出很好的保守性，这可能反应出两者的前体有不同的功能。另一方面 IL-1 α 与 IL-1 β 的同源性仅 27—33%，低于通常人们认为种属差异的同源性需大于 45% 的判据，这似乎意味着在脊椎动物进化前或进化过程中就已

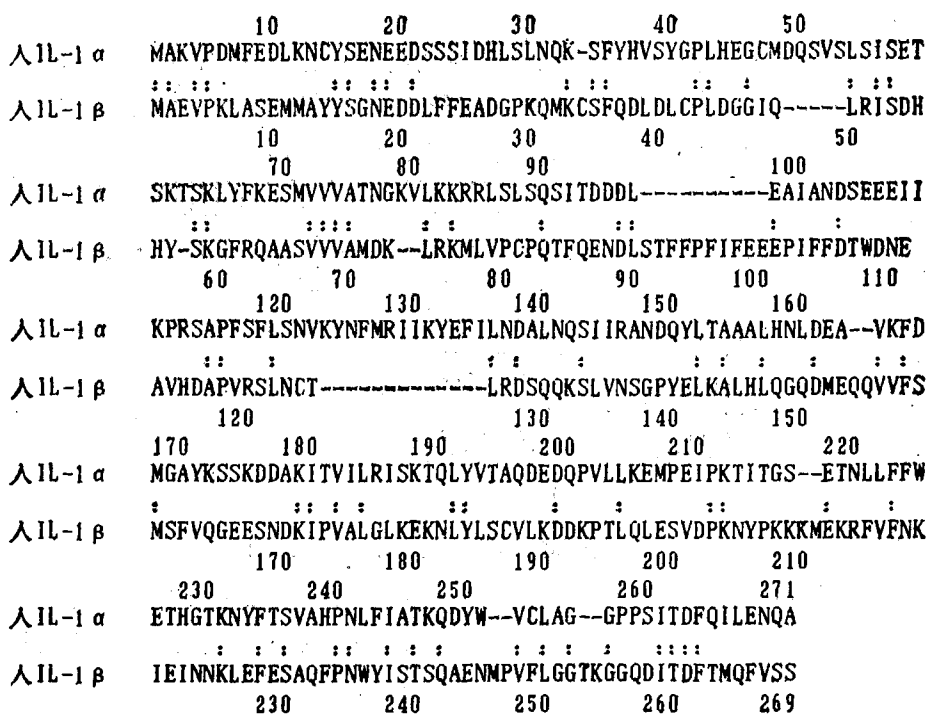


图 2 人 IL-1 α 和 β 氨基酸序列同源性比较

表 1 不同 IL-1 前体的序列同源性

	小鼠 IL-1 α	兔 IL-1 α	人 IL-1 α	人 IL-1 β
小鼠 IL-1 α		61 ¹⁾	61	28
兔 IL-1 α	61		65	33
人 IL-1 α	61	65		27
人 IL-1 β	28	33	27	

¹⁾ 该数值表示序列同源性百分数。
同源性百分数 = (相同氨基酸残基数 / 总氨基酸残基数) × 100

出现两种独立分化的基因^[2,3,11]。

有关 IL-1 前体是如何被加工处理的目前尚不清楚，但在 IL-1 α 家族中，约在第 85 位存在一个四碱性氨基酸区 Lys-Lys-Arg-Arg，为此，Lomedico 等提出了一个模型^[12]，认为该高电荷区为原始剪切位点，巨噬细胞释放的蛋白酶能剪切该位点，产生约 180 氨基酸残基的 C-末端片段，它形成一个耐蛋白酶的核，然后蛋白水解酶进攻新暴露出来的 N-末端，从而产生 N-末端参差不齐的成熟 IL-1 α 分子。有研究

	10	20	30	40	50	60
兔 IL-1 α	MAKVPDLFEDLNKCFSENEEYSSAIDHLSLNQKSFYDASYEPLHEDCMNKVSVLSTSETS					
人 IL-1 α	MAKVPMFEDLNKCYSENEEDSSSIDHLSLNQKSFYHVSYGPLEHGCMDQSVLSISSETS					
小鼠 IL-1 α	MAKVPDLFEDLNKCYSENEEYSSAIDHLSLNQKSFYDASYGSLHETCTDQFVSLRTSETS					
	10	20	30	40	50	60
兔 IL-1 α	VSPNLTQENVVAVTA---SGKILKKRRLSLNQPITDVLLETNVSDEEGIIKPRSVPYTFQR					
人 IL-1 α	KTSKLTFKESMYYVAT---NGKVLKKRRLSLSQSITDDLEAIANDSEEEIIKPRSAFVSFLS					
小鼠 IL-1 α	KMSNFTFKESRVTVSATSSNGKILKKRRLSFSEFTEDDLQSITHDLEETIQ-PRSAPTYQS					
	70	80	90	100	110	120
兔 IL-1 α	NMRYKYLRIIKQEFTLNDALNQSLVRDTSQYLRAPLQNLGDAVKFDMGVYMTSEDSIL					
人 IL-1 α	NVKYNFMRIIKYEFILNDALNQSIIRAN-DQYLTAALHNLDEAVKFDMGAYKSSKDDAK					
小鼠 IL-1 α	DLRYKLMKLVQRQKFMNDSLNQTIYQDVDKHYLSTTWLNDLQVEKFDMYAYSSGGDDSK					
	130	140	150	160	170	180
兔 IL-1 α	P-VTLRISQTPLFVSAQNEDEPVLLKEMPETPRIITDSESDILFFWETQGNKNYFKAAN					
人 IL-1 α	ITVILRISKTLQLYVTAQDEDQPVLLKEMPEIPKTIITGSETNLLFFWETHGTKNYFTSAH					
小鼠 IL-1 α	YPVTLIKISDSQLFVSAQGEDQPVLLKELPETPKLITGSETDLFFWKSINSKNYFTSAAY					
	190	200	210	220	230	240
兔 IL-1 α	PQLFIATKPEHLVHMARGLPSTDFQIS					
人 IL-1 α	PNLFIATKPEHLVHMAGGPSITDFQILENQA					
小鼠 IL-1 α	PELFIATKEQSQVHLARGLPSTDFQIS					
	250	260	270			

图3 兔、人和小鼠 IL-1 α 氨基酸序列同源性比较

结果支持这一模型^[11,12,13]。

三、人类 IL-1 β 的分子生物学

人体内的 IL-1 主要是以 IL-1 β 形式存在,所以在 IL-1 的大家族中,人们对人 IL-1 β 的研究最多,认识也最深刻。激活的单核细胞是 IL-1 β 的最丰富来源,其中 IL-1 β 的 mRNA 量约占 (polyA⁺) RNA 的 5%,是 IL-1 α mRNA 的 100 倍甚至更多^[8]。然而,IL-1 α 的特异活性却较 IL-1 β 高,Kronheim 等^[14]的实验结果表明在 *E. coli* 中表达的重组 IL-1 α 的活性是重组 IL-1 β 的三倍。人 IL-1 β 前体蛋白含有 269 个氨基酸残基,其氨基酸顺序如图 5 所示。有趣的是人 IL-1 β 前体并不具有生物活

性^[1,15],对此 Black 等^[16]和 Daria 等^[17]都进行了较深入的研究,他们用重组表达的人 IL-1 β 前体为材料,当在人 IL-1 β 前体中加入单核细胞膜时,发现有分子量为 17kD 的具有生物活性的 IL-1 β 存在,这说明体内 IL-1 β 前体的加工发生在细胞膜上。然后,他们又用纯化过的蛋白酶对人 IL-1 β 前体进行作用,发现不同蛋白酶剪切位点不同,产生的 IL-1 β 大小不同,其生物活性亦大不一样,如图 6 所示,剪切位点越靠近成熟 IL-1 β N-末端的产物,生物活性越高。由此可以推测,成熟 IL-1 β N-末端前的氨基酸残基可能在空间上阻碍其受体的结合或影响 IL-1 β 前体 C-末端部分的构象。

为了探索 IL-1 β 的活性部位,人们也作了

兔 IL-1 β	MATVPELTSEMMAYHSGNENDLFFPADGPNYMKSCFQDLDCPDDEGIQL	50
小鼠 IL-1 β	MATVPELNCMPFDS-ENLFFEVDGPQKMKGCFQTFDLGCPDESIQL	49
人 IL-1 β	MAEVPKLACEMPPFYSDNEDLFFEVDGPKQMKCSFQTFDLGPLDGGIKL	50
兔 IL-1 β	RISCQPYNKSFQVLSVVVALEKLRQKAVPCPQAFQDDGLRTFFSLIFEE	100
小鼠 IL-1 β	QISQQHINKSFRQAVSLIVAVEKLWQLPVSPWTFQDEDMSTFFSFIFEE	99
人 IL-1 β	RISDHHYSGKFRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPTFFQENDLSTFFPFIFEE	100
兔 IL-1 β	EPVLCNTWDDYSL--ECDA-VRSLHCRLQDAQKSLVLSGTYELKALHLN	147
小鼠 IL-1 β	EPILCDSWDDDDNLLVCDVP IRQLHYRLRDEQKSLVLSDPYELKALHLN	149
人 IL-1 β	EPIFFDTWDNEAY--VHDAPVRSNLCTLRDSQQKSLVMSGPYELKALHLN	148
兔 IL-1 β	AENLNQQVVF\$MSFVQGEESNDKIPVALGLRGKNLYLSCVMKDDKPTLQL	197
小鼠 IL-1 β	GQNINQQVIFSMSFVQGEPSNDKIPVALGLKGKNLYLSCVMKDGTPTLQL	199
人 IL-1 β	GQDMEQQVVF\$MSFVQGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSCVLKDDKPTLQL	198
兔 IL-1 β	ESVDPNRYPKKKMEKRFVFNKIEIKKLEFESAQFPNWIYSTSQTEYMPV	247
小鼠 IL-1 β	ESVDPKQYPKKKMEKRFVFNKIEVKSKEFESAEPNWIYSTSQAENKPV	249
人 IL-1 β	ESVDPKNYPKKKMEKRFVFNKIEINNKEFESAQFPNWIYSTSQAENMPV	248
兔 IL-1 β	FLGNSSGGQDLIDFSMEFVSS	268
小鼠 IL-1 β	FLGNSSG-QDIIIDFTMESVSS	269
人 IL-1 β	FLGGTKGGQDITDFTMQFVSS	269

图4 兔、小鼠和人 IL-1 β 氨基酸序列同源性比较

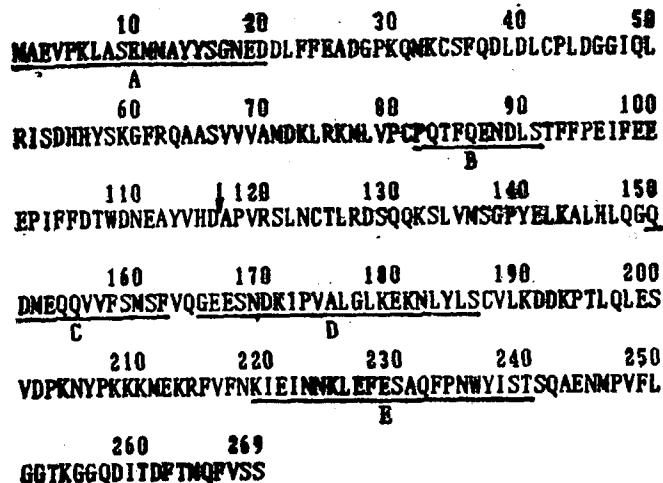


图5 人 IL-1 β 氨基酸顺序及活性部位预测区(A-E)

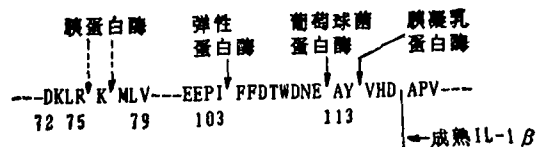


图6 不同蛋白酶剪切示意图

虚线箭头为胰蛋白酶最可能的剪切位点, 实线箭头为相应的酶的剪切位点 注: 弹性蛋白酶、胰蛋白酶、葡萄球菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶消化的产物活性分别是未消化前体蛋白活性的 7、10、300、500 倍

大量的努力。首先 Auron 等^[18]利用计算机通过分析。比较不同 IL-1 的同源性, 发现在 IL-1 中有 5 个保守区, 即 A—E 区, 人 IL-1 β 的五个区如图 5 所示, A 区 1—20; B 区 82—92; C 区 150—162; D 区 165—186; E 区 219—

240. 接着 Rosenwasser 等^[19]用实验证实了这一点,结果如图 7,表 2。^[3]后来,Palaszynski^[20]为了更深入地认识 IL-1 β 的生物活性及其与受体结合的关系,合成了两段多肽,即人 IL-1 β 237—269 (称为 Y-33-S, 33 个氨基酸残基), 172—196 (称为 C-26-L, 26 个氨基酸残基)通过研究发现, Y-33-S 肽能同重组 IL-1 β 竞争与其受体结合,而 C-26-L 肽则不能,但两者均未表现出生物活性。这说明 IL-1 β C-末端氨基酸残基是其与受体结合的关键部位。最近 Diana^[21] 又利用单克隆抗体来研究 IL-1 β 的结构与功能的关系。他通过 IL-1 β 的不同单抗与其不同部位相结合从而抑制其生物活性方法来分析不同部位的氨基酸残基对其活性的影响,发现识别第 133—148 及 251—269 位氨基酸残基的单抗能完全抑制 IL-1 β 的生物活性;识别第 218—243 位氨基酸残基的单抗仅部分地抑制 IL-1 β 的生物活性;而识别第 148—192、163—171 位氨基酸残基的单抗并不抑制 IL-1 β 的生物活性。这一结果似乎与 Auron 所预测的活性部位不一致。

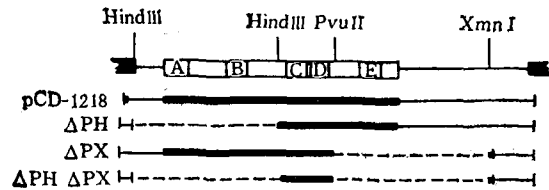


图 7 Okayama-Berg 真核表达质粒中的人 IL-1 β 前体基因图谱

水平线表示内切酶消化的不同缺失突变体,黑体线表示不同结构形式所转录的 mRNA,方框内为可翻译的氨基酸编码区,虚线为剪切掉的序列

现在有关实验室正进一步用定点突变方法研究 IL-1 β 的结构与功能的关系 Kamogashira 等^[22]首先将成熟 IL-1 β 的第 8 和 71 位的半胱氨酸残基定点突变为丙氨酸残基或丝氨酸残基,发现突变型 IL-1 β 和野生型 IL-1 β 的比活性相同,这表明在 IL-1 β 分子中,这两个半胱氨酸残基对其活性并非十分必要,它们也不形成二硫键。而 Huang 等^[23]则定点突变了成熟 IL-1 β N-末端的氨基酸残基,发现 N-末端

表 2 在 COS 细胞中表达的人 IL-1 β 活性

转染的 DNA	活性 (cpm)		比活
标准 IL-1	3153	—	—
空白对照	597	—	—
阴性对照	633	1.0	—
pCD-1218	4240	6.7	1.00
pCD-1218 Δ PH	3910	6.2	0.92
pCD-1218 Δ PX	2179	3.4	0.51
pCD-1218 Δ PH Δ PX	2284	3.6	0.54
背景 PHA(Δ cpm = 1075)			

氨基酸残基,尤其是第 4 位的碱性氨基酸精氨酸残基能介导 IL-1 β 与其受体的结合,在决定 IL-1 β 的生物活性中起重要作用。最近,Paul 等^[24]把成熟 IL-1 β 中第 27 及 138 位的赖氨酸残基突变成半胱氨酸残基,并对突变型 IL-1 β 的空间构象、特异活性及与受体结合的特征进行研究,结果表明突变型与野生型无明显差异。

人们利用 X-晶体衍射、圆二色谱等技术对人 IL-1 β 的空间结构、构象也进行了研究^[25,26],发现成熟 IL-1 β 是一个完全由 β -型折叠而形成的热力学稳定的球蛋白。由 12 个 β -折叠形成复杂的氢键网络,其结构核心可以形象地描述成一个四面体,它的边缘是由两个反平行的 β -折叠而成,疏水基团处在这种结构的内部,在多肽链中有一个 3 次重复的折叠, IL-1 β 的这种折叠方式与大豆胰蛋白酶抑制物的折叠方式非常相似。

近几年来,分子免疫学的发展使人们对机体的免疫调控有了深入、广泛的了解,深刻地认识到 IL-1 在机体免疫调节网络中所处的重要地位和所起的作用,使曾一度被冷落的有关 IL-1 的分子生物学得到了迅速发展,从而也促进了免疫学的进步。目前,人们对有关 IL-1 的许多东西还不清楚。如为什么人、兔、小鼠和牛等生物在进化过程中保留了两种功能相同而结构不同的基因,以及它们的起源问题; IL-1 的活性部位以及不同氨基酸残基在其活性中所起的作用问题;前体 IL-1 的加工过程问题;等等。相信随着研究的全面展开和不断深入,人们会对这些问题有更深刻的了解和认识。

参 考 文 献

- 1 March C J, Mosley B, Larsen A *et al.* *Nature*(London), 1985; 315: 641
- 2 Lomedico P T, Gubler U, Mizel S B. *Lymphokines*, 1987; 13: 139
- 3 Auron P H, Webb A C. *Lymphokines*, 1987; 14: 33
- 4 Gery L, Gershon R K, Waksman B H. *J Exp Med*, 1972; 136: 128
- 5 Aarden L A. *J Immunol*, 1979; 123: 2928
- 6 Wcod D D. *The Reticuloendothelial System*, 1983; 6: 201
- 7 Dinarello C A. *Interleukin-1 Rev Infect Dis*, 1984; 5: 51
- 8 Dinarello C A. *The pharmacology of lymphocytes*, 1988; 85: 215
- 9 董强刚. 生理科学进展, 1987; 18: 203
- 10 Mori S, Goto F, Goto K *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 150: 1237
- 11 Young P R, Sylvester D. *Protein Engineering*, 1989; 2: 545
- 12 Lomedico P T, Gubler U, Hellmann C P *et al.* *Nature* (London), 1984; 312: 458
- 13 Van-damme J, De Ley M, Opdenakker G *et al.* *Nature* (London), 1985; 314: 266
- 14 Kronheim S R, Cantrell M A, Deeley M C *et al.* *Bio Technology*, 1986; 4: 1078
- 15 Mosley B, Urdal D L, Prickett K S *et al.* *J Biol Chem*, 1987; 262: 2941
- 16 Black R A, Kronheim S R, Cantrell M *et al.* *J Biol Chem*, 1988; 263: 9437
- 17 Daria H, Lee W R, Philip S *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 1689
- 18 Auron P E, Rosenwasser L J, Matsushima K *et al.* *J Mol Cell Immunol*, 1985; 2: 169
- 19 Rosenwasser L J, Webb A C, Clark B D *et al.* *Proc Natl Sci USA*, 1986; 83: 5243
- 20 Palaszynski E W. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; 147: 204
- 21 Diana B. *Prog Leukocyte Biol*, 1988; 8: 197
- 22 Kamogashira T, Masui Y, Ohmoto Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 150: 1106
- 23 Huang T T. *Prog Leukocyte Biol*, 1988; 8: 191
- 24 Paul W, Pierre G, Shaw A R *et al.* *Eur J Biochem*, 1989; 179: 565
- 25 Craig S, Schemeissener U, Wingfield P, Pain R H. *Biochemistry*, 1987; 26: 3570
- 26 John P. *Biochem Soc Trans*, 1988; 16: 949

【本文于 1989 年 8 月 29 日收到】

包技术、包种源、包销路、包设备——笼养林蛙

北京市星火技术研究所常年举办“立体笼养林蛙”技术培训。

林蛙具有很高的营养价值,是理想的天然补品,林蛙油和肉不仅是餐桌上美味佳肴;蛙油还是我国传统的出口药品,在国际市场上享有很高的声誉,供不应求。

立体笼养林蛙,占地面积小(1立方米可养殖林蛙

1020只),投资少(一个笼 m^3 20元),见效快(m^3 六个月可产蛙油3.5斤,国家回收价328元/斤,产值可达千元以上)。是我所最新推出的一项新型养殖技术,是城乡家庭和企事业单位发展养殖业的最佳途径。

培训班开学时间:每月5日、15日、25日,包教包会,安排食宿,费用自理。

技术培训费:单位1500元;个人600元,若需帮助建特种养殖场,建场费1万元。

联系人:[北京867信箱20816组,邮政编码100024,李群]