

研究快报

IL-2 部分拮抗剂可用于 IL-2 突变体对受体亚基结合能力的初步鉴定*

王志勇 郑仲承 徐静芬 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 用定点突变法分别得到了两个人白细胞介素-2 (IL-2) 的部分拮抗剂 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 以及一个为 IL-2 受体 α 亚基结合缺陷型的突变体 62Leu-IL-2, 当将 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 与 62Leu-IL-2 共同保温时, 62Leu-IL-2 的活性受到明显抑制, 对此现象机理的分析表明 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 可用于 IL-2 受体亚基结合缺陷型突变体的初步鉴定. 同时, 这一思路在其它受体-配基系统中具有一定的适用性.

关键词 白细胞介素-2 (IL-2), 白细胞介素-2 受体 (IL-2R), 拮抗剂, 受体亚基结合缺陷型

白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 在免疫系统中对多种细胞功能的发挥和调控起着关键的作用. 这些作用只有 IL-2 与效应细胞表面的特异 IL-2 受体 (interleukin-2 receptor, IL-2R) 结合后才能得以发挥, 因此寻找 IL-2 分子中与 IL-2R 发生相互作用的氨基酸残基位点在 IL-2 结构与功能研究中具有突出的地位, 也是研制新型 IL-2 的重要基础.

IL-2R 由三个不同亚基组成, 它们的组合表现出对 IL-2 具有低、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 亚基三者共存形成对 IL-2 的高亲和力受体形式 ($K_d=10^{-11}$ mol/L)^[1].

我们在研究人 IL-2 结构与功能关系中, 按照 Kunkel 的 U-DNA 方法, 对 IL-2 进行了一些定点突变. 并按本组自建方法纯化了天然 IL-2 及一些突变体, 用 [³H]-TdR 掺入 IL-2 依赖性细胞株 CTLL-2 方法测定了天然及突变

IL-2 的生物活性^[2].

在这些突变体中, 我们发现 62Glu 也是 IL-2 与 IL-2R α 亚基结合的氨基酸残基 (待发表), 用 Leu 替换 Glu 所得的突变体 62Leu-IL-2 与含有 IL-2R $\beta\gamma$ 亚基表现中亲和力受体形式的 MOLT- β 细胞结合正常 ($K_d=980$ pmol/L), 但不能与表现低亲和力受体形式的 MT-1 细胞结合. 同时 62Leu-IL-2 具有天然 IL-2 的 10% 左右的生物活性. 我们另外还发现 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 为 IL-2 的两个部分拮抗剂 (待发表), 它们具有与高亲和力受体的部分结合能力 (K_d 值在 10^{-10} mol/L 左右), 其结合强度要略强于中亲和力的结合强度 ($K_d=10^{-9}$ mol/L), 不过它们的生物活性不到天然 IL-2 的 1%.

许多 IL-2 的突变体仍有促进 T 细胞生长的生物活性, 但它们与 IL-2 各亚基的结合亲和力可能有所变化, 研究它们与不同 IL-2R 的结合力是分析 IL-2 结构与功能的重要方法. 我们

*国家“863”计划资助项目.

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-03-22

认为, 我们得到的两个部分拮抗剂可以用来快速并简便地判断那些表现活性的 IL-2 突变体是否为 IL-2R α 或 IL-2R β γ 亚基结合缺陷型. 其原理是 IL-2R α 或 IL-2R β γ 亚基结合缺陷型的 IL-2 突变体对测活细胞的结合分别只有中亲和力或低亲和力强度, 当将 IL-2 部分拮抗剂与这些突变体共同作用于测活细胞时, 由于 IL-2 部分拮抗剂可表现出强于中亲和力的结合能力而且生物活性很小, 它的竞争作用就可以减弱这些突变体与测活细胞的结合, 进而使它们的活性比无拮抗剂时更低; 而对于 IL-2R α 和 IL-2R β γ 亚基结合均正常的 IL-2 突变体来说, IL-2 部分拮抗剂的加入不可能使它们对细胞的促进生长作用下降. 所以通过观察部分拮抗剂的加入是否会引起有活性 IL-2 突变体的活性下降, 就可判断这些突变体与 IL-2R α 或 IL-2R β γ 亚基结合能力是否改变.

我们用实验验证了这一观念. 在人 IL-2 的众多突变体中, 不与 IL-2R β γ 亚基结合, 只与 IL-2R α 亚基结合正常而又表现活性的突变体还没有报道; 不与 α 亚基结合, 与 IL-2R β γ 亚基结合正常同时又表现活性的突变体则有

38Glu-IL-2、42Ser-IL-2 等^[3], 而我们获得的 62Leu-IL-2 也是这样一种突变体. 因此, 我们比较了 62Leu-IL-2 在加入或不加入 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 情况下对 CTLL-2 细胞生长的刺激作用, 结果见图 1, 可见 62Leu-IL-2 对 CTLL-2 细胞生长的刺激作用在 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 存在时受到明显的抑制, 其原因与我们所设想的一致, 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 与 IL-2R α β γ 三体复合物的结合力强于 62Leu-IL-2 而同时对 CTLL-2 没有多少激活作用.

这一结果表明人 IL-2 的部分拮抗剂 15Val-IL-2 或 126Asp-IL-2 可用于 IL-2R α 或 IL-2R β γ 亚基结合缺陷型的初步鉴定. 很明显, 这一方法有其优点, 比如, 不需放射性碘标记的天然或突变 IL-2 以进行受体结合能力测定, 也不需那些特殊的只表达 IL-2R α 或 IL-2R β γ 亚基的细胞株, 只要有常规的 CTLL-2 测活细胞株即可, 而且由于 CTLL-2 对 IL-2 依赖性极强, 对于那些表现活性的 IL-2 突变体来讲, 即使为粗菌表达物, 还没有进一步纯化, 也可用此两个部分拮抗剂迅速鉴定它们是否为受体亚基结合缺陷型, 当然, 本法并不能完全取代同位素标记技术, 它比较适合于筛选实验; 而且实验中两个部分拮抗剂以纯品为好, 因为这样部分拮抗剂的浓度调定后有利于实验的重复性. 另外, 这一思路也可适用于其它受体组成复杂的配基-受体系统中相关功能位点的判断.

参 考 文 献

- 1 Taniguchi T, Minami Y. Cell, 1993; 73: 5
- 2 Gillis S, Ferm N, Ou W *et al.* J Immunol, 1978; 120: 2027
- 3 Sauve K, Nachman M, Grace J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991; 88: 4636

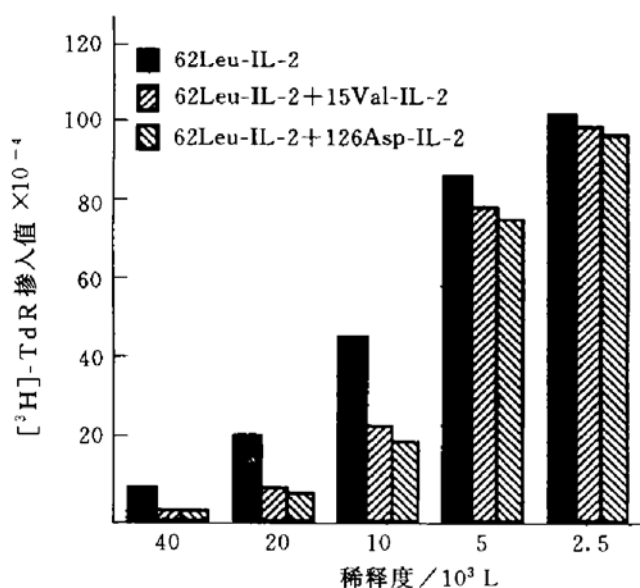


图 1 部分拮抗剂对 62Leu-IL-2 生物活性的抑制
实验中 62Leu-IL-2、15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 浓度均为 0.3 g/L; 15Val-IL-2 和 126Asp-IL-2 固定在 1:5000 稀释度, 62Leu-IL-2 则从 1:2500 开始倍比稀释至 1:40 000, 取 3 次实验平均值.

Primary Determination on Receptor Subunit Binding Ability of IL-2 Mutants by IL-2 Partial Antagonists. Wang Zhiyong, Zheng Zhongcheng, Xu Jingfen, Liu Xinyuan

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Two partial antagonists of human interleukin-2 (IL-2): 15Val-IL-2, 126Asp-IL-2 and an IL-2 receptor α subunit binding deficient mutant 62Leu-IL-2 have been obtained by site-directed mutagenesis. 62Leu-IL-2 could exhibit significant stimulation on CTLL-2 cells. When 15Val-IL-2 or 126Asp-IL-2 was incubated together with CTLL-2 cells in addition to 62Leu-IL-2, the stimulative ability of

62Leu-IL-2 was distinctly inhibited. In consideration with the interaction of IL-2 with IL-2 receptor subunits, 15Val-IL-2 or 126Asp-IL-2 can be used for the primary determination on receptor subunit binding ability of IL-2 mutants. Furthermore, this idea may also be applied in some other ligand-receptor systems.

Key words interleukin-2 (IL-2), interleukin-2 receptor (IL-2R), antagonist, receptor subunit binding deficiency

(上接第 354 页)

障碍。本实验结果显示, 高苯丙氨酸血症大鼠学习记忆能力降低与脑内单胺类递质含量降低的结果一致, 提示苯酮尿症智力障碍可能与大脑皮层及其突触体中单胺类递质含量降低相关。

参 考 文 献

- 1 Vorhees C V, Butcher R E, Berry H K. *Biobehav Rev*, 1981; **5**: 177
- 2 Crafts S. *Neuropsychologia*, 1992; **30** (4): 341
- 3 Cotman C W. *Method in Enzymology*, Part A. 1974; **31**: 446
- 4 万福生, 南国华. *江西医学院学报*, 1992; **32** (2): 117
- 5 张 蕾. *贵阳医学院学报*, 1992; **17** (1): 1
- 6 张均田 (徐叔云主编). *药理实验方法学*, 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 1992: 661
- 7 Greengard O, Wolfe J. *Biochem Pharmacol*, 1987; **36** (6): 965
- 8 Sandler M. *J Inherited Metal Dis*, 1982; **5** (supple 2): 65
- 9 黎海带, 李希成. *中国药理学报*, 1992; **13** (2): 146
- 10 Brass C A, Greengard O. *Biochem J*, 1982; **208** (3): 765
- 11 张中启, 罗质璞. *中国药理学通报*, 1994; **10** (2): 81
- 12 李长宏, 刘 焯. *中国医院药学杂志*, 1992; **12** (12): 564

Study of the Brain Monoamine Transmitter in Hyperphenylalaninemia Rats. Wan Fusheng, Nan Guohua (*Department of Biochemistry,*

Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China).

Abstract The Sprague-Dawley rats with postnatal 3 d were collected. The hyperphenylalaninemia was induced by intraperitoneal injection with phenylalanine. Fluorospectrophotometry was applied to quantive determination of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in the cerebral cortex and its synaptosome of the rats. Behavior in the rats was observed by Y-maze learning. The results showed that compare with the control, the contents of NE, DA and 5-HT were decreased over 38.6%~67.4% in the cortex of the hyperphenylalaninemic rats and decreased over 51.9%~70.2% in the synaptosome of the cortex. Y-maze learning ability in the rats was decreased apparently. The results suggest that the mental retardation of PKU is in close correlative with decrease of some monoamine transmitter contents in the cortex and its synaptosome.

Key words hyperphenylalaninemia, mental retardation, monoamine transmitter, behavior determination, compatative study