

综述与专论

新的天然免疫保护分子

——PLUNC 家族蛋白*

周后德 李小玲 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410011)

摘要 在呼吸道上皮与消化道上皮的表面, 覆盖有一层由免疫保护分子所组成的蛋白质混合物, 在上皮组织与外界各种信号之间, 它们起着信号传递中介与信号执行分子的作用。我们新克隆的 NASG 基因为这一混合物添加了新的成员, 对其结构与功能分析表明: 它属于腭、肺及鼻咽上皮克隆 (PLUNC) 家族中 SPLUNC1 的全新转录本。目前发现人类 PLUNC 家族至少有 8 个以上成员, 分布在人类 20 号染色体大约 300 kb 的狭窄区域, 它们具有杀菌、渗透增强蛋白结构域, 在进化上高度保守, 每个成员分别在呼吸道上皮的不同部位特异性表达, 具有潜在的结合细菌脂多糖的功能, 能对外来物理及化学刺激做出反应, 以分泌蛋白的形式进入鼻咽分泌物或唾液中, 部分家族成员可能具有抗微生物、清除有害化学物质、抗肿瘤等多重功效。以上说明, PLUNC 家族可能是上呼吸道的一种新的天然免疫保护分子, 在维持上呼吸道的正常生理活动中起重要作用。

关键词 PLUNC 家族, 上呼吸道, 天然免疫保护分子

学科分类号 Q78

上呼吸道和上消化道是机体获取能量和养分的必经通路, 在维持机体正常的生命活动及功能中具有不可替代的作用。然而, 它们也是一个时刻面临危险与挑战的场所, 口腔、鼻腔、舌、软腭、鼻咽以及气管等无时无刻不在直接或间接接触着各种病原微生物及有害气体。温暖潮湿的环境、不间断的水和食物供应更有利于微生物的生存与繁殖。面对这一挑战, 机体依靠两种形式的防御体系来进行自我防卫, 即特定的天然防御系统和抗原识别的适应性免疫反应系统。暴露的上皮组织利用这些系统来识别、判断和抵御周围环境的侵害。如果构成这些系统的信息太少, 机体对病原体及有毒物质的反应能力将会丧失, 如果太多, 也会对机体造成过度的反应性损伤。

在生物体内, 构成天然防御系统的元件是多种多样的。上皮组织并非直接暴露在病原微生物及其他致病原中。在其表面, 覆盖着一层薄薄的由上皮组织本身所分泌的蛋白质混合物, 这些混合物能感受、结合、转运、降解及清除各种有害物质及其副产物。单在唾液中, 就已发现至少 12 种以上的抗微生物病原体的蛋白质^[1], 它们包括有糖蛋白如黏液素 (mucins)、凝集素 (agglutinin) 等, 酶如乳过氧化物酶 (lactoperoxidase)、溶解酵素 (lysozyme)、甲壳质酶 (chitinase) 及酶的抑制剂, 还包括有金属结合蛋白如转乳铁蛋白 (lactoferrin)、钙卫蛋白 (calprotectin) 及一些能直

接影响细菌细胞膜的肽类物质如富组蛋白 (histatins)、防御素 (defensins) 等。这些混合物不但能对外来信号进行检测与传输, 而且还能将所接受信号放大或缩小。通过不同的克隆策略, 我们及国外的一些实验室又为这一防御混合物添加了多个新的成员——PLUNC 样蛋白质家族^[2~4]。PLUNC 代表上腭 (palate)、肺 (lung) 及鼻咽上皮克隆 (nasal epithelium clone)。

1 PLUNC 家族成员及基因结构

PLUNC 这一命名首先使用在小鼠的同源基因上, 在人类, 至少发现有 8 个家族成员, 都位于人类 20 号染色体大约 300 kb 的狭窄区域——20q11 (图 1a)。而在所有物种中至少包含 14 个家族成员, 它们分别定位在人的 20 号、小鼠的 2 号、大鼠的 3 号染色体, 结构与 LBP 及 BPI 相似^[5]。由于它们由不同的研究小组克隆, 其命名也各异, 甚至同一个基因也有多种命名^[6]。根据其组织来源, Bingle 等^[7]将它们名称统一为 PLUNC, 并按照它们的大小分为两组, 一组为长片段的 PLUNC (long plunc, LPLUNC), 包括 484 个氨基酸的 LPLUNC1、458 个氨基酸的 LPLUNC2、463 个氨基

* 国家十五科技攻关项目 (2002BA711A03) 及国家自然科学基金资助项目 (30300205)。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

收稿日期: 2004-03-22, 接受日期: 2004-04-29

酸的 LPLUNC3、大于 469 个氨基酸的 LPLUNC4, 它们都含有 15 个或 16 个外显子; 另一组为短片段的 PLUNC (short plunc, SPLUNC), 包括 256 个氨基酸的 SPLUNC1、249 个氨基酸的 SPLUNC2 及 253 个氨基酸的 SPLUNC3, 它们包含有 9 个外显子 (图 1b)。近来在这一区域克隆的 BASE 也可归纳为 SPLUNC 家族成员。我们通过对这一区域的序列分析与预测, 发现还可能存在至少 2 个 LPLUNC 家族成员, 在人类基因组草图上标记为假基因。PLUNC 家族内的同一基因, 又有多个不同的转录本, 如 SPLUNC1, 根据其非翻译区的不同, 就有 NASG、Spurt、lunx 等不同的转录本。我们分析了 NASG 基因 3' 末端的 UTR 序列, 发现在鼻咽组织中, NASG 存在有 3 种不同的非翻译序列^[8]。

在该家族中, 内含子的大小和间距高度的保守 (图 1c), 提示该家族共同产生于过去的某些基因进化事件中^[9]。然而, 这些邻近基因的 DNA 及氨基酸序列的同源性或相似性非常低, 其核苷酸序列只有 16% ~ 18% 匹配, 其氨基酸序列也只有 15% ~ 40%

的相似, 这种序列上的模糊性很难使人相信它们属于同一个基因簇。但所有家族均有保守的亮氨酸结构, 只有 BASE 因第 6 号和第 7 号外显子的连接方式发生改变, 造成了第二个保守的亮氨酸丢失。

与其他基因家族相比, 人类 PLUNC 家族在基因结构方面的一个显著特点就是所有家族成员都集中位于 20 号染色体上不到 300 kb 的一段狭窄区域, 这与人类基因组 30 亿个碱基对相比, PLUNC 家族所占据的是一段极其微小的范围。小鼠的 PLUNC 家族也集中在 2 号染色体上一段不到 400 kb 的区域, 而已知其他的基因家族大部分分散于不同的染色体且不会如此集中。说明在哺乳动物的漫长进化过程中, PLUNC 家族并没有因染色体断裂 (breakage) 而改组 (reshuffled), 就连小鼠的 PLUNC 基因家族也是集中位于 2 号染色体, 这种同一个基因家族在两个物种间组织形式上的紧密对应关系有利于诠释两物种进化过程中的亲缘关系, 并有利于进一步的基因功能研究。

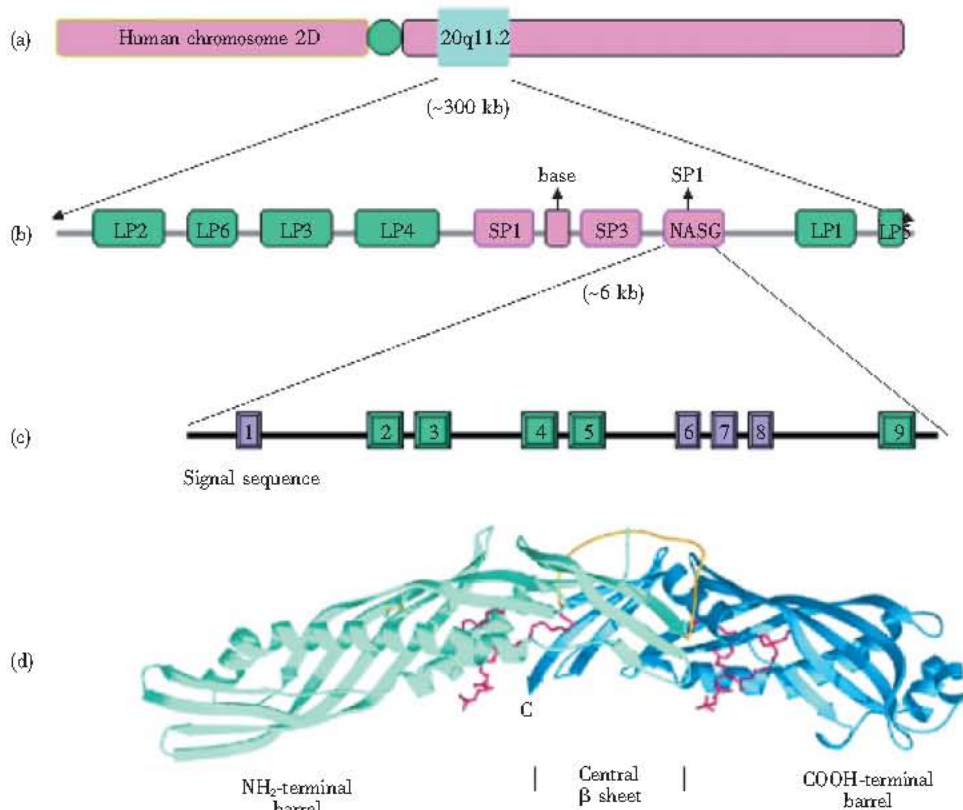


Fig. 1 Gene and protein structures of the human plunc family

图 1 人类 PLUNC 家族的基因及蛋白质结构模式图

(a) 人类 PLUNC 基因定位在染色体 20q11.2; (b) 至少 8 个人类的 PLUNC 家族成员被发现; (c) 我们所克隆的 NASG (SPLUNC1) 的外显子剪接方式; (d) PLUNC 家族蛋白具有与 BPI 相似的三维折叠结构, 其中 NASG 蛋白对应的为 N 端绿色的桶样结构。

2 PLUNC 家族的蛋白质结构

由于准确的蛋白质三维结构有待于通过晶体衍射等实验确定, PLUNC 家族的三维结构目前只能通过生物信息学预测. 分析表明, PLUNC 家族成员在其 5'端均具有 19 个氨基酸的信号肽序列, 因而他们可能是一种分泌性的蛋白质. 通过蛋白质的三维结构预测并与已知蛋白质结构数据库进行匹配, PLUNC 蛋白与人类的其他两个蛋白质家族具有相似性, 即杀菌\渗透增强蛋白 (bactericidal\ permeability-increasing protein, BPI) 和脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 家族, 胆脂转移蛋白 (cholesterol ester transfer protein, CETP) 及磷脂转移蛋白 (phospholipid transfer protein, PLTP) 家族. 如将该蛋白质的氨基酸链、蛋白质的极性与疏水性全部考虑在内, 在 6 000 个已知结构的蛋白质中, 只有 BPI 及 LBP 的折叠与他们相近. LPLUNC 均含有两个 BPI 结构域, 而 SPLUNC 只含有一个 BPI 结构域, 该 BPI 结构域对应的是 BPI 分子三维结构上位于 N 端的桶状结构^[10] (图 1d), 正是这种桶状结构, 形成了一个疏水的口袋, 允许脂溶性的物质如细菌脂多糖与之结合. 几乎所有 PLUNC 家族成员与 BPI 家族成员都含有两个高度保守的半胱氨酸, 这两个半胱氨酸能在分子之间形成稳固的共价键, 有利于结合脂多糖. 该蛋白质家族不同成员的细胞内定位可能不同, 我们对从鼻咽上皮组织中克隆的 SPLUNC (NASG) 蛋白进行分析, 发现有 33.3 % 位于细胞外, 33% 位于线粒体, 22% 位于内质网, 还有 11% 位于细胞内的小泡, 将该基因与绿色荧光蛋白相连进行细胞内定位, 发现荧光信号均匀分布于胞浆及胞核内^[11].

3 PLUNC 家族的潜在功能

3.1 表达的组织特异性

无论是通过生物信息学的电子杂交方法, 还是高通量的组织芯片或多组织的 cDNA 微阵列检测, 都表明 PLUNC 基因家族表达的组织特异性. 他们集中表达在鼻咽、口腔、鼻腔、呼吸道及消化道. 在口腔中, 主黏液腺、副黏液腺、上腭、舌乳头都可有 PLUNC 家族成员表达. 我们利用 76 种组织膜, 对克隆的鼻咽组织相对特异性基因 NASG (SPLUNC1) 进行表达谱分析发现: NASG 在气管、鼻咽组织中有较高水平的表达, 其次为唾液腺和

肺, 在其他组织中未见明显表达. 而利用同一张膜对 MGC14597 (LPLUNC1) 检测时, 发现它在气管组织中有较高水平的表达, 其次为肺, 在唾液腺、十二指肠和胃低表达, 在其他组织中未见明显表达. 因而表明长片段的 PLUNC 家族成员与短片段的 PLUNC 家族成员的组织表达谱略有差异. 研究表明, 不同物种间 PLUNC 的表达也稍有不同. 在小鼠中, SPLUNC1 表达于鼻、上呼吸道及胸腺, 而在大鼠中则表达于鼻咽部、肺、胸腺及唾液腺等区域. 对牛、大鼠、小鼠的 PLUNC 家族其他成员研究表明, 他们的表达已延伸到消化道等上皮组织中, 其中一个研究得较多的是腮腺分泌蛋白 (parotid secretory protein, PSP), 小鼠的 PSP 属短片段的 PLUNC 家族成员, 目前已初步将它归结为 SPLUNC2^[12], 它由腮腺分泌到唾液中并可进入消化道, 因而 PLUNC 家族蛋白还有可能在口腔以外的消化道中起重要作用. 值得一提的是, SPLUNC1 的 NASG 转录本虽然在正常鼻咽组织中表达, 但在鼻咽癌组织中表达下调或缺失; SPLUNC1 的另一转录本 LUNX 在非小细胞性肺癌中却表达上调, 而且能在该肿瘤的早期转移淋巴结中检测到, 因而 Iwao 等^[13]认为 LUNX 是一个非小细胞性肺癌淋巴结早期转移的潜在的分子标志. Egland 等在乳腺癌组织中克隆了一个位于 20q11 的潜在瘤基因 BASE, 它只在乳腺癌组织中及唾液腺中表达, 在正常乳腺组织中没有表达, 目前已将该基因纳入 PLUNC 家族. 造成这种同一基因在不同组织中的作不同甚至截然相反的原因可能有二, 一是 SPLUNC1 的不同转录本的作用不同, 二是 SPLUNC1 的作用存在组织的特异性.

3.2 结合脂多糖

PLUNC 家族蛋白的折叠方式与 BPI 及 LBP 极为相似, BPI、LBP 又能与革兰氏阴性细菌细胞壁上的脂多糖 (内毒素) 特异性地结合, PLUNC 家族是否也具有同样的功能呢? 由于 PLUNC 家族蛋白在鼻腔冲洗液中含量非常高, 占鼻腔冲洗液总蛋白的 1% 左右, 因而 Ghafouri 等^[14]利用脂多糖包被的试管从鼻腔冲洗液中吸附出能与脂多糖结合的蛋白质, 并将这些蛋白质分离, 经二维电泳后质谱分析, 发现在鼻腔冲洗液中有 5 种可与脂多糖结合的蛋白质, 其中有 2 种为 PLUNC 蛋白, 另外 3 种为 PLUNC 蛋白的异构体. 这 3 种异构体的分子质量为 25 ~ 27 ku, 等电点为 5.3 ~ 5.1. 但是, Campos 等^[15]从原代培养的呼吸道上皮细胞中纯化出的

PLUNC 蛋白, 在体外却不能与 LBP 竞争性结合脂多糖, 而对照组的多粘菌素 B (polymyxin B) (一种已知的 LBP-LPS 结合抑制剂) 却能抑制 LBP 与脂多糖竞争性结合. Geetha 等^[16] 报道在大鼠 GH4C1 细胞中表达的重组 PSP 还具有杀灭铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的作用. 因而, 鼻咽、口咽部和支气管所表达的 PLUNC 结合 LPS 的特性也可能存在差异, 但目前尚没有足够的证据来证明.

3.3 对外来刺激物的反应性

PLUNC 表达在鼻咽、口咽及呼吸道上皮的前沿, 时刻会面对着各种刺激物的挑战. 除能与细菌的脂多糖结合外, PLUNC 是否能与病毒、支原体、衣原体等微生物的有机成分结合尚不得而知. 有研究表明, 外界刺激性气体或液体能影响 PLUNC 的表达. 利用二维电泳及质谱分析技术, Ghafouri 等^[14] 从鼻腔冲洗液中鉴定出两种形式的 PLUNC 蛋白质, 其分子质量分别为 24.8 ku 和 25.1 ku, 等电点 (pI) 分别为 5.4 和 5.5. 其中 24.8 ku、pI 5.4 的蛋白质在健康人鼻腔冲洗液中表达相对丰富, 而吸烟者及长期暴露在环氧化物中的工人其鼻腔冲洗液中的 PLUNC 蛋白分泌显著下降, 说明长期的外界刺激可以导致 PLUNC 表达的下降. 同样利用二维电泳联合基质辅助激光解析飞行质谱技术, Lindahl 等^[17] 从正常人从事二甲基苯并蒽 (DMBA) 工作的工人与鼻腔冲洗液中分离出差异表达基因 PLUNC, 发现从事 DMBA 工作的工人 Plunc 的基础表达量要比正常人低. 但将这两组人分别再短暂暴露在 DMBA 或有机酸酐 (organic acid anhydrides, OAA) 中 2 h 后, PLUNC 表达水平在 DMBA 工人中显著增加, 为其基础水平的 3~20 倍, 而其在正常人中的表达反而下降. 如果再增加暴露时间, 使这两组人都长期暴露在上述气体中, 则 PLUNC 的表达均下降. 说明在由于长期受到刺激性化学物质刺激的上呼吸道病变患者, Plunc 可以作为一种对化学刺激的应激因子而分泌到鼻腔分泌物中, 从而有利于机体清除这些有害的刺激物. DMBA 工人 PLUNC 的基础表达水平低可能为对 PLUNC 表达的一种负反馈调节. 然而, 在支气管灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid) 中, 并没有检测到其表达. Bingle 等^[18] 也发现, 佛波醇酯 (phorbol ester) 或 γ 干扰素 (interferon γ) 都能使上呼吸道的 PLUNC 表达降低. 以上说明, PLUNC 主要参与了上呼吸道对化学物质或炎性刺激的反应.

3.4 PLUNC 家族蛋白作用的靶分子及参与的信号通路

通过前面的综述, 我们可以概括出四点: 一是部分 PLUNC 蛋白具有结合脂多糖的作用并可抑制细菌的生长; 二是部分 PLUNC 蛋白可能与肿瘤的发生、发展及转移有关; 三是上皮组织中 PLUNC 的表达受炎性刺激物或其他刺激物的调节; 四是从 PLUNC 蛋白家族具有 BPI 样的三维折叠, 可以预测到它们可能参与同 BPI/LBP 类似的信号转导通路. BPI 与 LBP 具有相似的结构及相同的大小, 在天然免疫反应中它们的作用相反. LBP 的 N 端具有结合 LPS 的能力, 它们一旦结合, BPI 就能将 LPS 运送给其受体分子 CD14. CD14 具有双向作用, 在血清中, CD14 能独立结合 LBP 上的 LPS, 而在细胞表面, CD14 通过结合 LBP 转运来的 LPS, 然后与 toll 样受体 (toll-like receptor, TLRs) 家族的跨膜蛋白形成复合物, 从而启动信号传导的级联反应. LBP/CD14/TLR 复合物的最终作用造成炎性因子的表达增加, 这些炎性因子包括肿瘤坏死因子、白细胞介素及一氧化氮等. BPI 虽然也能结合 LPS 并直接具有杀菌作用, 但其在体内的主要作用是中和 LBP 在免疫反应中所介导的炎性因子的释放. 它能与 LBP 竞争性地结合 LPS, 从而阻止 LPS 与 LBP 结合所启动的级联反应. PLUNC 家族包含有 SPLUNC 及 LPLUNC 两种, 它们之间的作用是否也象 BPI 与 LBP 一样, 能竞争性地与 LPS 或其他物质结合呢? 这种信号传导所启动的级联反应导致的炎性因子如肿瘤坏死因子的释放是否参与肿瘤的发生发展呢? 所有这些预测都有待于科学的实验验证.

参 考 文 献

- 1 LeClair E. Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *J Dent Res*, 2003, **82** (12): 943~949
- 2 Zhang B, Nie X, Xiao B, *et al.* Identification of tissue-specific genes in nasopharyngeal epithelial tissue and differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, **38** (1): 80~90
- 3 Weston W M, LeClair E E, Trzyna W, *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *J Biol Chem*, 1999, **274** (19): 13698~13703
- 4 Sung Y K, Moon C, Yoo J Y, *et al.* Plunc, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. *J Biol Chem*, 2002, **277** (15): 12762~12769
- 5 Bingle C D, Craven C J. Comparative analysis of the PLUNC

- (palate, lung and nasal epithelium clone) protein families. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 4): 806~809
- 6 Wheeler T T, Haigh B J, McCracken J Y, *et al.* The BSP30 salivary proteins from cattle, LUNX/PLUNC and von Ebner's minor salivary gland protein are members of the PSP/LBP superfamily of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1579** (2~3): 92~100
 - 7 Bingle C D, Craven C J. PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upperairways and nasopharynx. *Hum Mol Genet*, 2002, **11** (8): 937~943
 - 8 张必成, 朱诗国, 向娟娟, 等. 鼻咽癌表达下调基因 NASG 3' UTR 可变剪接分析及其在多种肿瘤中表达. *癌症*, 2003, **22** (5): 477~480
Zhang B C, Zhu S G, Xiang J J, *et al.* *Chinese Journal of Cancer*, 2003, **22** (5): 477~480
 - 9 Bingle C D, Leclair E E, Havard S, *et al.* Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci*, 2004, **13** (2): 422~430
 - 10 Beamer L J. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 4): 791~794
 - 11 张必成, 吕红斌, 周后德, 等. 人鼻咽组织特异性表达基因 NASG 编码产物在细胞中的融合表达. *生命科学研究*, 2003, **7** (1): 84~88
Zhang B C, Lü H B, Zhou H D, *et al.* *Life Science Research*, 2003, **7** (1): 84~88
 - 12 Ball W D, Mirels L, Hand A R. Psp and Smgb: a model for developmental and functional regulation in the rat major salivary glands. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 4): 777~780
 - 13 Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, *et al.* Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*, 2001, **91** (4): 433~437
 - 14 Ghafouri B, Kihlstrom E, Stahlbom B, *et al.* PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 4): 810~814
 - 15 Campos M A, Abreu A R, Nlend M C, *et al.* Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, **30** (2): 184~192
 - 16 Geetha C, Venkatesh S G, Dunn B H. Expression and anti-bacterial activity of human parotid secretory protein (PSP). *Biochem Soc Trans*, 2003, **31** (Pt 4): 815~818
 - 17 Lindahl M, Stahlbom B, Tagesson C. Identification of a new potential airway irritation marker, palate lung nasal epithelial clone protein, in human nasal lavage fluid with two-dimensionalelectrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight. *Electrophoresis*, 2001, **22**: 1795~1800
 - 18 Bingle C D, Bingle L. Characterisation of the human plunc gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1493** (3): 363~367

PLUNC Family: Novel Class of Innate Immune Protective Molecules in Upper Airway*

ZHOU Hou-De, LI Xiao-Ling, LI Gui-Yuan**

(Cancer Research Institute, XiangYa School of Medicine, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract Epithelial surfaces of the upper alimentary tract and upper respiratory tract are swarming with protein compounds that protect itself from many kinds of damages. These compounds are consisted of innate immune molecules. From the structure and functional predication, the new member is added, plunc family, to the compounds. They are located at a narrow area less than 300 kb of human chromosome 20, including at least eight members. All the members of the family have the BPI domain and a signal peptide at the N-terminal. The sequences are highly conserved in human, mouse and rat, each expressed at the different sites of the airway epithelial, tongue, von Ebner gland and parotid gland. Some of them can be detected in the nasal lavage fluid. They may function to protect epithelial surfaces from pathogenic micro-organism and harmful gases, the wrong expression will lead to host tissues destruction and tumorigenesis.

Key words PLUNC family, upper airway, innate immune protective molecules

* This work was supported by grants from The Special Funds of Major State Basic Research of China (2002BA711A03) and The National Natural Sciences Foundation of China (30300205).

** Corresponding author. Tel: 86-731-4805383, E-mail: Ligy@xysm.net

Received: March 22, 2004 Accepted: April 29, 2004