

研究报告

白细胞介素-2 镇痛功能位点的研究

徐 荻 蒋春雷 郑仲承 范佩芳 孙兰英 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

宋朝佑 由振东 王成海 路长林

(第二军医大学神经生物学教研室, 上海 200433)

摘要 白细胞介素-2 (IL-2) 是重要的免疫调节因子, 近来发现还有中枢镇痛作用. 用不同 IL-2 突变体测定其对大鼠痛阈的影响, 发现完全丧失免疫刺激作用的 20Leu-IL-2 (20Asp→Leu) 仍能显著提高大鼠的痛阈, 其作用强度与天然 IL-2 无显著差异, 而另一突变体 45Val-IL-2 (45Tyr→Val) 虽保留免疫学活性却不能提高大鼠的痛阈. 这些结果证明 IL-2 分子中具有镇痛作用与具有免疫作用的功能位点是相互独立的; IL-2 分子中第 45 位 Tyr 对 IL-2 镇痛作用的发挥起重要作用.

关键词 白细胞介素-2, 镇痛作用, 定位突变, 结构-功能关系, 中枢神经系统

白细胞介素-2 (IL-2) 是机体复杂免疫网络中起重要调节作用的淋巴因子之一, 它由辅助性 T 细胞所分泌, 又能参予 T 细胞诱导、分化, 并维持其增殖, 具有显著的免疫增强作用. 近十年来愈来愈多的证据表明免疫系统与中枢神经系统间有相互作用, 而 IL-2 在神经系统与免疫系统的相互作用中起极为重要的作用. Li 等^[1]报道 IL-2 能竞争性抑制阿片样物质对鼠脑阿片受体的特异性结合, 蒋春雷等^[2]发现 IL-2 具有中枢镇痛作用, 这一作用的发挥与阿片受体有关.

IL-2 通过与特异性的 IL-2 受体 (IL-2 R) 结合而介导免疫学活性. 对 IL-2 的结构功能研究发现, IL-2 分子中第 20 位 Asp 是与 IL-2 R β 亚基结合的重要残基^[3], 将这一残基突变, 若能同时破坏 IL-2 的三级结构, 则 IL-2 的免疫学活性完全丧失^[4]. 为了研究 IL-2 分子结构与镇痛功能的关系, 我们将 20 位 Asp 突变为 Leu, 同时还将与 IL-2 免疫活性无关的 45 位 Tyr 突变为 Val, 观察这些突变体免疫活性与镇痛活性的变化.

1 材料和方法

1.1 突变 IL-2 的制备

基因突变、表达及表达产物的纯化方法均同文献 [3].

1.2 IL-2 的活性测定

用依赖 IL-2 的小鼠 CTLL-2 细胞, 采用 ³H-TdR 参入法测定 IL-2 及其突变体的生物活性^[4]. IL-2 标准品购自 Boehringer 公司 (2.0×10^6 U/mg).

1.3 痛阈测定

1.3.1 动物 采用健康雄性 SD 大鼠, 体重 160—180g (上海计划生育研究所提供), 饲养温度为 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 6—18h 光照, 随机分组进行实验.

1.3.2 侧脑室埋管 动物用戊巴比妥钠 (35mg/kg) 麻醉后, 用平颅头位, 固定于江湾-C 型立体定位仪上, 以前囟为 0 坐标, 在向前 1.0mm, 向左 1.7mm, 深 3.5mm 处理植不锈钢

• 863 资助项目.

收稿日期: 1993-10-26, 修回日期: 1994-01-06

钢导管(外径 0.6mm),用 502 胶水和牙托粉固定,肌注青霉素钠(80000U/只,术后 3—5d 进行实验。

1.3.3 痛阈测定 用钾离子透入法引起大鼠甩尾反应为指标,引起痛反应时的电流强度为痛阈,测定侧脑室给药后不同时间大鼠痛阈的变化,共测定三次,以三次痛阈变化百分率的平均数为纵坐标,对给药后不同时间作图,以 t 检验作为显著性检验方法。对照组除不含 IL-2 (或其突变体)外,其余成分均与实验组相同。

2 结 果

2.1 突变体的制备

用寡核苷酸诱导的基因定位突变法,我们获得了 20Leu-IL-2(20Asp→Leu)和 45Val-IL-2(45Tyr→Val)的基因,它们的表达及纯化产物见图 1。天然 IL-2 用同样的表达、纯化方法同时制备。

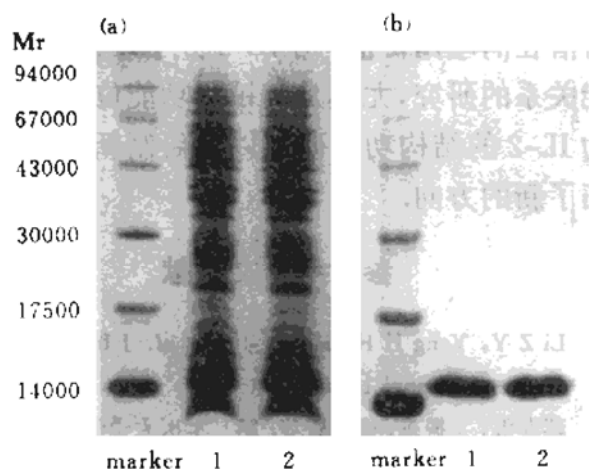


图 1 白细胞介素-2 的蛋白电泳分析

(a) IL-2 在 *E. Coli* JF1125 中的表达 (b) 纯化 IL-2。1: 20Leu-IL-2; 2: 45Val-IL-2。

2.2 突变 IL-2 的免疫学活性

为了研究 IL-2 分子的镇痛功能与免疫功能的位点间有无联系以及镇痛功能的活力中心,我们首先测定了 IL-2 突变体的免疫活性,发现 20Leu-IL-2 对小鼠 T 细胞的作用完全丧失,45Val-IL-2 的免疫活性变化不大,结果见表 1。

表 1 IL-2 及其突变体的生物学活性

IL-2 及其突变体	生物活性/%
野生型 IL-2	100
45Tyr→Val	90.9 (21.2) ¹⁾
20Asp→Leu	0

¹⁾ 括号内的数值为偏差 (S); $n=4$ 。

2.3 IL-2 发挥免疫功能与镇痛功能的位点是相互独立的

测定无免疫活性的 IL-2 突变体 (20Leu-IL-2) 对大鼠痛阈的影响,发现 120pmol/8 μ l 的 20Leu-IL-2 注射到大鼠侧脑室后,大鼠痛阈显著提高,其作用持续时间以及作用强度与相同剂量的天然 IL-2 对照组相比无显著差异,表明 20Leu-IL-2 的镇痛作用与天然 IL-2 相似,结果见图 2。该结果说明 IL-2 分子中具有免疫功能和镇痛功能的结构域是相互独立的。

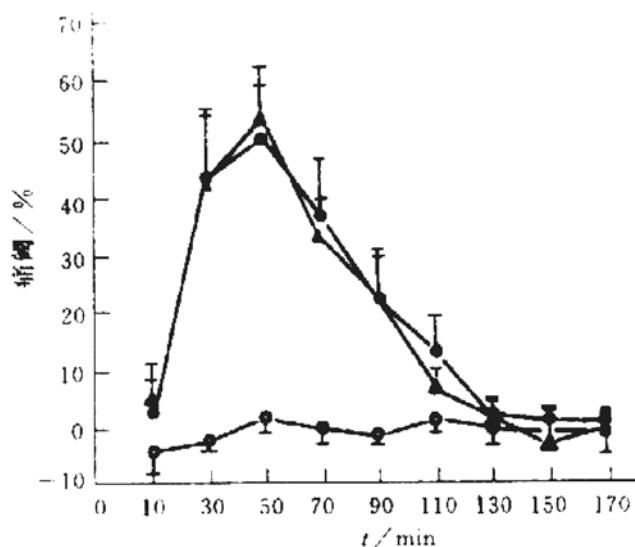


图 2 20Leu-IL-2 对大鼠痛阈的影响

—○—: 对照, —●—: 注射 120pmol 的 20Leu-IL-2, —▲—: 注射 120pmol 的 IL-2。

2.4 45Tyr 与 IL-2 的镇痛作用有关

将 IL-2 突变体 45Val-IL-2 (45Tyr→Val) 以 240pmol/8 μ l 的剂量注射到大鼠侧脑室,测定其对痛阈的影响,结果在 170min 内大鼠的痛阈无明显变化,与天然 IL-2 对照组相比 (剂量为 120pmol/8 μ l) 有显著差异 (见图 3),说明 45Tyr 的突变显著影响了 IL-2 的中枢镇痛作

用, 即 45Tyr 与 IL-2 的镇痛作用有关.

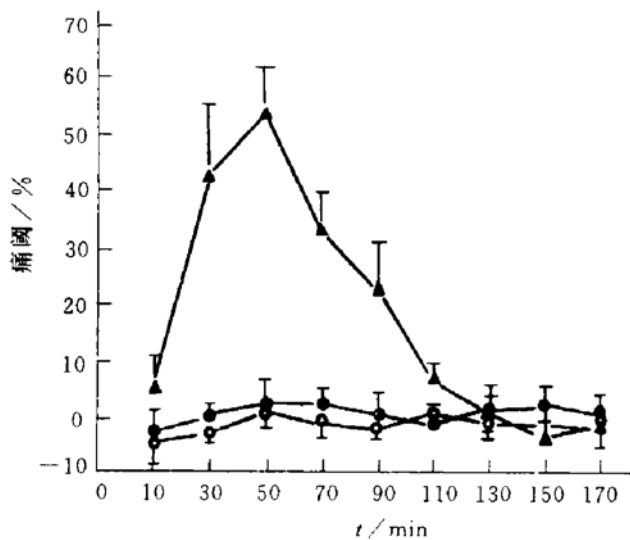


图 3 45Val-IL-2 对大鼠痛阈的影响

—○—: 对照, —●—: 注射 240pmol 的 45Val-IL-2, —▲—: 注射 120pmol 的 IL-2.

3 讨 论

IL-2 是重要的细胞免疫因子, 同时对中枢神经系统也有调节作用. 最近蒋春雷等^[2]报道 IL-2 能显著提高大鼠的痛阈, 此作用能被纳洛酮所拮抗. Li 等^[1]也发现 IL-2 能竞争性抑制阿片样物质对鼠阿片受体的特异性结合, 这些都提示 IL-2 镇痛作用这一新发现的功能与阿片受体有关. 为了研究 IL-2 分子结构与镇痛功能的关系, 我们首先要明确 IL-2 与镇痛功能有关的结构域与其免疫功能结构域是否一致. IL-2 通过与其受体 (IL-2R) 结合而产生免疫增强作用, IL-2R 含 α 、 β 和 γ 3 个亚基, 其中 β 和 γ 亚基与传递信号有关. 我们制备的突变体 20Leu-IL-2 由于丧失了与 β 亚基结合的 20Asp, 而且空间结构也发生了变化, 可能同时破坏了 IL-2 与 γ 亚基的结合^[6], 因而完全丧失了刺激 T 细胞增殖的作用, 但该突变体仍具有提高大鼠痛阈的作用, 其作用程度与天然 IL-2 相仿, 表明

IL-2 分子中免疫功能位点与镇痛功能位点是相互独立的, 这两个不同的结构域各自与不同的受体结合, 分别介导免疫增强和中枢镇痛作用.

内源性阿片肽分子有一共同的一级结构: Tyr-Gly-Gly-Phe, 其中 Tyr 与 Phe 两个残基为活性所必需, 而 IL-2 分子中有一区域结构与此相似, 即 42Phe-43Lys-44Phe-45Tyr, 因此我们将 45Tyr 进行突变, 改为 Val, 所得突变体仍有显著的免疫学活性, 但对大鼠却无明显的镇痛作用, 这一结果既进一步证实 IL-2 分子的镇痛功能位点与免疫功能位点不同, 又说明 45Tyr 可能是 IL-2 具有镇痛作用的关键残基. IL-2 分子中其它残基与镇痛功能的关系正在进一步研究中.

阿片样物质不仅具有中枢镇痛作用, 而且近来研究发现还有外周镇痛作用, 特别是在局部组织炎性肿胀时, 其镇痛作用更明显 (赵志奇, 个人通讯). 因此 IL-2 的镇痛作用的发现有着潜在的应用价值. 对 IL-2 分子结构与镇痛功能关系的研究, 尤其是其镇痛功能位点的发现, 为 IL-2 的结构功能研究以及研制新型 IL-2 开拓了新的方向.

参 考 文 献

- 1 Li Z Y, Yang H H, Huang J Q *et al.* J Interferon Res, 1990; 10 (Suppl 1): 141
- 2 蒋春雷, 尤振东, 徐 获等. 第二军医大学学报, 1993; 14 (3): 封三
- 3 Collins L, Tsien W H, Seals C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 7709
- 4 徐 获, 蒋春雷, 石 颖等. 生物化学与生物物理学报, 1994; 26: 1
- 5 Stern A S, Pan Y-C E, Urdal D L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1984; 81: 871
- 6 徐 获, 蒋春雷, 曹 雷等. 生物化学与生物物理学报 (在印刷中)

structure formation is the foundation of protein folding initiation. The paper presents the solution conformation of protein fragment and methods of conformation elucidation, and De novo design of peptide with secondary structure. Also, the application of these achievements in constructing the theoretical model of folding initiation and progress on research of protein folding initiation up to date are detailedly reviewed.

Key words framework model, secondary structure, de novo design, folding initiation

Peptide Library and Its Applications in Molecular Recognition. Qi Jie, Lu Zhibin, Wang Yuhong, Li Wei. (*Department of Molecular Biology, Jilin University, Changchun 130023*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (6): 513—517

Peptide library is a collections of peptides. The peptides display on the N-terminal of p III or p VIII coat protein of bacteriophage through gene cloning. This might be used in the fields associated with molecular recognition, such as: drug design, selection of enzymes inhibitor, vaccines selection, interaction of proteins, etc. Peptide library technique is a lately developed technique with high practical and theoretical value. Peptide library birth, development and potential applications in the future are reviewed.

Key words molecular recognition, peptide library, gene cloning

The Analgesic Domain of Interleukin-2. Xu Di, Jiang Chunlei, Zheng Zhongcheng, Fan Peifang, Sun Lanying, Liu Xinyuan, Song Chaoyou, You Zhendong, Wang Chenghai, Lu Changlin. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog.*

Biochem. Biophys. (China). 1994; 21 (6): 518—520

Interleukin-2 (IL-2) is an important immune regulator. Recently it is found that IL-2 is also an analgesic molecule. Using the potassium iontophoresis as pain stimulus to induce tail-flick and taking the intensity of current (mA) at the moment of the response as the pain threshold (PT), it is reported that mutant 20 Leu-IL-2 (20Asp→Leu), which could not bind to the β subunit of IL-2 receptor and thus had no immune activity, could increase the PT of the rats, indicating that the analgesic and the immunal functions be related to two different domains in IL-2 molecule. Mutant 45Val-IL-2 (45Tyr→Val), which had immunal activity, had no analgesic effect, suggesting that the 45Tyr be crucial for the analgesic effect of IL-2 and the analgesic domain be located around the 45Tyr.

Key words interleukin-2, site-directed mutagenesis, analgesia, structure-function studies, central nervous system

Characterization and Distribution of the Antigen Recognized by Breast Carcinoma McAb AF9. Cai Guiying, Zeng Wenjie. (*Department of Biochemistry, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; 21 (6): 521—523

A preliminary study was made on the characterization and distribution in human tissues of AF9-recognized antigen. The results demonstrated that the antigen is a complex protein composed of carbohydrate, lipid and protein and susceptible to heating to 100°C. The determinant of AF9-recognized antigen was not present in the ferritin and carcinoembryonic antigen. Western blotting revealed that AF9-rec-