

# 人 LAK 细胞免疫效应分子 HMGN2 的鉴定\*

冯云 熊文碧 王国兴 黄宁 吴琦 鲍朗 李绚 王伯瑶\*\*

(四川大学华西医学中心基础医学与法医学院感染免疫研究室, 成都 610041)

**摘要** 为分离纯化人淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK) 小分子抗菌多肽, 应用制备尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳技术和反向高效液相色谱技术分离纯化人 LAK 细胞酸溶性提取物, 纯化出一个具抗菌活性的多肽 HLP-3p21. 蛋白质 N 端氨基酸测序、质谱精确分子质量测定、蛋白质印迹分析证明 HLP-3p21 为 HMGN2. 最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC) 试验证明 HMGN2 有抗大肠杆菌 ML-35p 氨苄青霉素耐药株、铜绿假单胞菌 ATCC27853、白色念珠菌 ATCC 10231 活性, 无抗金黄色葡萄球菌 ATCC25923 活性. 制备 HMGN2 多克隆抗体, 应用免疫荧光化学、酶联免疫吸附测定和蛋白质印迹方法对 HMGN2 进行定位分析, 证明单个核细胞经 IL-2 刺激成为 LAK 细胞时部分 HMGN2 由胞核转移至胞浆, 进而分泌到胞外. 提示 HMGN2 是 LAK 细胞一个新的免疫效应分子.

**关键词** LAK 细胞, HMGN2, 抗菌活性, 免疫活性多肽

**学科分类号** Q786

人淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphocyte-activated killer cells, LAK)/NK 细胞、CTL 细胞被认为是机体抗癌细胞系统和抗胞内微生物感染的主要免疫细胞群体. LAK 细胞亦是临床生物治疗恶性肿瘤最为重要的细胞<sup>[1]</sup>. LAK 杀菌作用主要通过两种途径实现: 一是直接的杀菌作用, 二是通过分泌的杀菌活性物质. LAK 细胞抗癌和抗微生物感染的效应分子具有多样性, 既包括大分子的穿孔素、颗粒酶、溶酶体成分, 也包括小分子的颗粒溶素、LL-37、 $\alpha$  防御素及一些未确定的成分<sup>[2-5]</sup>, 所以对 LAK 细胞效应分子及其作用机制的深入研究, 将会为开发新的免疫活性分子以及 LAK 细胞的临床应用奠定理论基础.

我们基于 NK、CTL 及其效应分子除可能具有抗肿瘤细胞特性外, 还可能直接杀伤病原微生物的最新研究进展, 借用 20 世纪 90 年代初 Lehrer 等<sup>[6]</sup>建立的极微量而又敏感的鉴定内源性抗菌肽活性的方法——琼脂糖弥散抗菌法, 从鉴定抗菌分子入手, 监控其分离纯化, 来筛选免疫活性肽.

我们从人外周血分离培养的 LAK 细胞的酸溶性提取物中, 筛选获得一高度纯化的抗革兰氏阴性菌的免疫活性分子 HLP-3p21, 经蛋白质 N 端氨基酸序列测定得到 N 端 10 个氨基酸残基与人非组蛋白 HMGN2 (high mobility group nucleosomal binding domain) N 端 10 个氨基酸序列相同, 质谱精确分子质量分析和蛋白质印迹 (Western blotting) 证明其具 HMGN2 分子特性.

高迁移率非组蛋白 (high mobility group chromosomal protein, HMG) 是脊椎动物和非脊椎动物细胞核中含量最丰富的非组蛋白家族<sup>[7]</sup>. 早期研究认为 HMGN2 与 DNA 复制和转录活性有关<sup>[8]</sup>, 现还未见该分子具有抗菌活性的报道. 本文报道人 LAK 细胞具抗菌活性的 HMGN2 的分离纯化、重组制品的抗菌活性及其在人 LAK 细胞的亚细胞定位.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂.** RPMI1640 培养基、蛋白质分子质量标准、Tris、Tricine, Gibco 产品; 丙烯酰胺、TEMED (Merck 公司); 琼脂糖、三氟乙酸、溶菌酶 (Sigma 公司); 乙腈, 色谱纯 (Fisher 公司); 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂; rIL-2 由四川省肿瘤研究所提供; 植物血凝素 (PHA) 购自广州医药工业研究所; 其余试剂为国产分析纯.

**1.1.2 细胞及菌株.** 白细胞混悬液, 由成都市中心血站提供. 大肠杆菌 ML-35p 氨苄青霉素耐药株、铜绿假单胞菌 ATCC27853、白色念珠菌 ATCC 10231、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 均为本室

\*纽约中华医学会基金 (CMB) (98-681) 和国家自然科学基金资助项目 (30300127).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 028-85503159, E-mail: wangby@mail.sc.cninfo.net

收稿日期: 2005-01-04, 接受日期: 2005-03-28

保存.

## 1.2 方法

**1.2.1 人 LAK 细胞培养.** 参照免疫学常用实验方法<sup>[9]</sup>分离人外周血单个核细胞. 用 RPMI1640 完全培养基(含 r-IL2 100U/ml, PHA 100 mg/L) 进行培养, 7 天后离心收集细胞和上清. 人 LAK 细胞用 5% 乙酸匀浆提取酸溶性初提物, 透析后冷冻干燥, -20℃ 保存备用.

**1.2.2 HLP-3(human lymphocyte peptide)的制备及分离纯化.**

人 LAK 细胞酸溶性提取物抗菌活性初筛: 参照 Lehrer 方法<sup>[6]</sup>, 对人 LAK 细胞酸溶性提取物进行酸性尿素 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis, AU-PAGE), 电泳完毕后, 取出凝胶, 用 10 mmol/L PBS 洗涤, 5 min × 3, 铺于底层培养基 (含 3% 大豆培养基, 1% 琼脂糖, 10 mmol/L PBS 及对数生长期细菌 10<sup>6</sup> 个 /ml) 上, 放于 37℃ 孵箱孵育 3 h, 弃凝胶, 铺上层营养琼脂, 37℃ 孵育过夜.

制备性 AU-PAGE 分离 HLP-3: 取 LAK 酸溶性提取物, 按 Panyim 方法<sup>[10]</sup>进行制备酸性尿素 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 切割下 HLP-3 条带, 电泳洗脱, 透析冻干, -20℃ 保存备用.

**1.2.3 反向高效液相色谱分离 HLP-3.** 0.1% 三氟乙酸 → 60% 乙腈 0~60 min 线性梯度, 检测波长 214 nm, 流速 1 ml/min, 收集洗脱液 1 ml/管, 冷冻干燥, 溶于 0.01% 乙酸待做抗菌活性鉴定.

**1.2.4 HLP-3p21 的 N 端氨基酸序列测定及质谱精确分子质量测定.** HLP-3p21 的 N 端氨基酸序列测定采用 Edman 降解法, 由北京大学生命科学院测定, 其质谱精确分子质量测定由上海基康生物技术有限公司完成.

**1.2.5 重组载体的构建及其重组 HMGN2 多肽的分离纯化.**

根据 GenBank HMGN2 cDNA 序列 (登录号: X96735) 设计两对特异引物: P1 5' AAC GGA TCC TTT GCC CTG CTG 3'; P2 5' CCA GGA TCC GGC ACA CAC TAG 3'. 引物由 Gibco 公司合成.

总 RNA 提取及 RT-PCR 扩增: LAK 细胞总 RNA 的提取按 RNA 纯化试剂盒操作说明进行. RT-PCR 反应条件如下: 50℃ 保温 30 min, 使 mRNA 逆转录为 cDNA, 94℃ 预变性 2 min, 然后进行 30 个 PCR 循环 (94℃ 30 s, 58℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 45 s), 最后在 68℃ 继续延伸 7 min.

重组载体构建按常规方法进行, 使用原核表达载体 pGEX-1λT.

GST-HMGN2 融合蛋白的分离纯化用亲和层析方法, 使用 Bulk and Redipac GST Purification Modules 试剂盒, 按其使用说明进行. 取纯化的 GST-HMGN2 融合蛋白用凝血酶进行酶切 (酶切条件: 室温, 18 h), 作反相高压液相色谱分离 HMGN2 肽, 冻干保存, 作 AU-PAGE、Ticine SDS-PAGE 分析, 测定蛋白质浓度.

**1.2.6 NP-1 和 HNP-1 的提取.**

兔 α 防御素 1 (NP-1) 的提取方法如下: 取一只 250 g 左右新西兰大耳白兔, 腹腔注射 300 ml 1% 酪蛋白, 16 h 后腹腔注射 300 ml 0.01 mol/L PBS (含 4 U/ml 肝素) 后取腹腔渗液, 1 000 r/min 离心 10 min 收集白细胞, 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 5% 乙酸充分匀浆, 20 000 g 离心 30 min, 收集上清, 冻干.

人 α 防御素 1 (HNP-1) 的提取方法如下: 收集人浓痰, 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 5% 乙酸充分匀浆, 20 000 g 离心 30 min, 收集上清, 冻干.

以上冻干样品分别用 Bio-gel 分子筛层析、反向高压液相色谱分离纯化, tricine-SDS-PAGE 分析, 可获得纯度较高的 NP-1 和 HNP-1.

**1.2.7 HMGN2、NP-1 和 HNP-1 抗菌活性检测.** HMGN2、HNP1-3、NP-1 抗菌活性检测采用最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 和最小杀菌浓度 (minimal bactericidal concentration, MBC) 方法<sup>[11]</sup>. HMGN2、HNP1-3、NP-1 稀释浓度分别为: 500、250、200、150、100、50、25、12.5、6.25 和 3.13 mg/L. 每个试验重复 3 次, 每次试验做 3 复孔.

**1.2.8 免疫新西兰大白兔制备抗体及其纯化.**

抗体的制备<sup>[12]</sup>: 用纯化的 GST-HMGN2 融合蛋白常规免疫家兔, 每次免疫剂量为 400 μg, 溶于 1 ml 生理盐水中, 首次于 Freuds 完全佐剂等体积充分混合, 对新西兰大白兔 (2.5 kg, 雄性) 颈部皮下多点注射, 2 周后以同样的抗原剂量于 Freuds 不完全佐剂乳化后增强免疫, 其后每隔 10 天免疫 1 次, 共免疫 4 次, 最后一次以不含佐剂的纯抗原 200 μg 从静脉免疫, 7 天后常规动脉放血, 制备血清.

抗体的纯化: 利用正辛酸 - 硫酸铵分步沉淀法纯化抗体<sup>[13]</sup>.

抗血清的抗体滴度测定: 采用间接酶联免疫吸附测定法测定, 按常规操作。

**1.2.9 免疫荧光化学检测 LAK 细胞中 HMGN2 的分布.** 培养单个核白细胞和 LAK 细胞, 取  $1.5 \times 10^6$  细胞接种于六孔板中, 离心涂片后用多聚甲醛固定, 按常规的免疫荧光操作步骤进行: 抗 HMGN2 的多克隆抗体按 1:100 稀释, 羊抗兔 IgG-FITC 按 1:1 000 稀释, 激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.10 酶联免疫吸附测定法检测 LAK 细胞培养上清中的 HMGN2 含量.** 包被  $100 \mu\text{l}$  单个核白细胞和 LAK 细胞的培养上清, 加入按 1:200 稀释的 HMGN2 多克隆抗体, 对照孔加同样稀释倍数的免疫前兔血清, 辣根过氧化物酶标羊抗兔抗体使用效价 1:1 000, 加底物 DAB 显色, 终止反应后于酶标仪 590 nm 处测定 A 值。

**1.2.11 蛋白质印迹 (Western-blot) 检测 LAK 细胞培养上清中的 HMGN2 含量.** 把 5 ml 收集的单个核白细胞和 LAK 细胞培养上清冻干, 用纯化后的多克隆抗体分别对单个核白细胞上清、LAK 细胞培养 2 天上清、LAK 细胞培养 8 天上清和纯化的 HMGN2 对照蛋白进行 Western-blot, 样品经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干转移至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h, 加经过正辛酸-硫酸铵纯化后的抗体, 4℃ 过夜, PBS 洗涤 3

次, 加抗兔 IgG-HRP, 室温反应 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加底物 DAB 显色。

## 2 结 果

### 2.1 LAK 细胞酸溶性组分 HLP-3p21 分离纯化

电泳凝胶琼脂糖弥散抗菌试验结果显示, LAK 细胞酸溶性初提物有 4 种主要成分, 第 1 条为组蛋白条带, 第 2、3、4 条带分别命名为 HLP-1、HLP-2、HLP-3。这 4 条带都具有抗菌活性 (图 1)。用胶回收的方法回收其中的 HLP-3。HLP-3 高压液相色谱图见图 2, 其中第 21 min 收集组分命名为 HLP-3p21, HLP-3p21 为一单峰, 抗菌试验显示其抗菌活性较强, Tricine-SDS-PAGE 银染显示其纯度较高, 表观分子质量约为 14 ku。

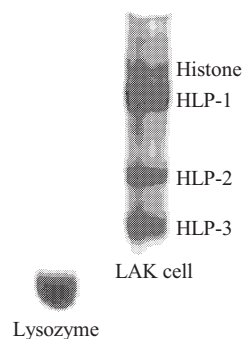


Fig.1 Antimicrobial components of LAK cell acid-lysate

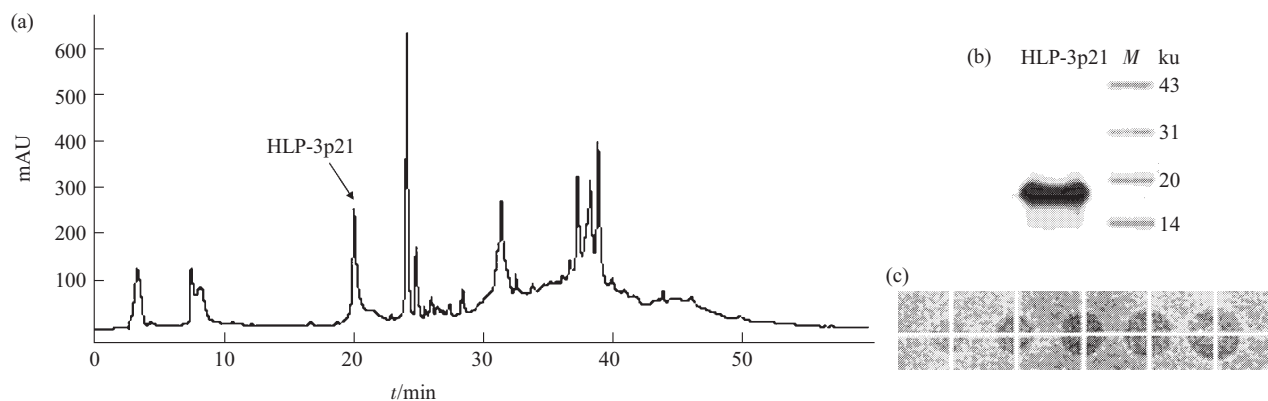


Fig.2 HPLC profile of HLP-3

(a) Tricine-SDS-PAGE of HLP-3p21; (b) Antibacterial activity of HLP-3p21.

**2.2 N 端氨基酸序列测定、质谱精确分子质量测定和 Western blotting 结果证明 HLP-3p21 是 HMGN2**

对 HLP-3p21 进行 N 端氨基酸序列测定, 第 1 至 10 位氨基酸分别为脯氨酸 (Pro, P), 赖氨酸 (Lys, K), 精氨酸 (Arg, R), 赖氨酸 (Lys, K), 丙

氨酸 (Ala, A), 谷氨酸 (Glu, E), 甘氨酸 (Gly, G), 天冬氨酸 (Asp, D), 丙氨酸 (Ala, A), 赖氨酸 (Lys, K)。经 NCBI-Blast 中 nr 数据库检索分析, 该序列与 HMGN2 的 N 端 10 个氨基酸残基相同。

对 HLP-3p21 进行质谱分析 (图 3), 其分子质量为 9274.04 u, 与 HMGN2 相同。

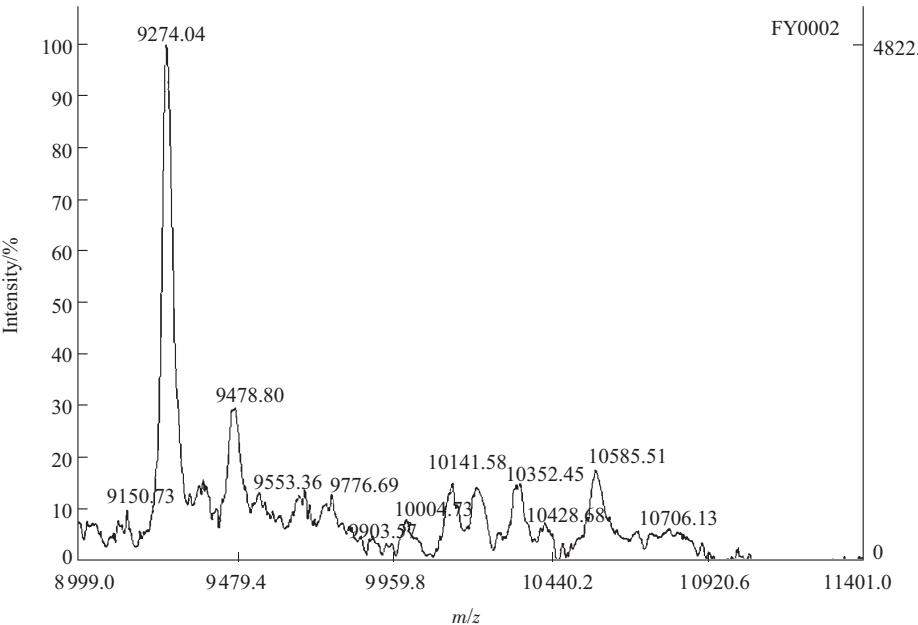


Fig.3 Mass spectrum of HLP-3p21

对 HLP-3p21 用 HMGN2 多克隆抗体做 Western blotting, 结果显示 HLP-3p21 蛋白条带处有较强的杂交信号(图 4).

根据以上试验结果, 我们判断 HLP-3p21 为 HMGN2.



Fig.4 Western blot analysis of HLP-3p21

**2.3 HMGN2 基因大肠杆菌表达载体的构建及重组蛋白的分离**

分离培养人 LAK 细胞, 提取细胞总 RNA, 分别用 F1、F2 作为引物, RT-PCR 扩增 HMGN2 的成熟肽 cDNA 片段 (图 5), 并在其两端加上限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 的酶切位点, 经 1.5% 琼脂糖电泳检查分别为一条约 350 bp 的条带, 与预计扩增片段大小相符. 将此片段用 *Bam*H I 酶切后, 与 *Bam*H I 酶切后脱磷酸化的原核表达载体

pGEX-1 $\lambda$ T 连接, 获得重组质粒 pGEX-1 $\lambda$ T-HMGN2. 测序结果说明其插入片段序列与 GenBank 登录的 HMGN2 的 cDNA 序列相符.

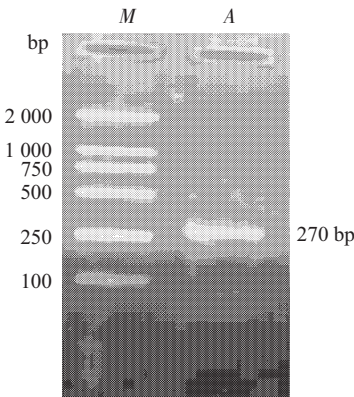
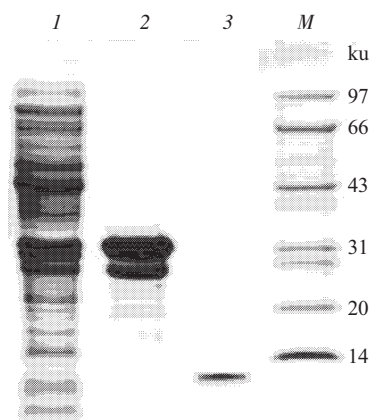


Fig.5 The fragment of HMGN2 cDNA  
M: DNA marker; A: HMGN2 cDNA.

重组 HMGN2 与原核表达质粒 pGEX-1 $\lambda$ T-HMGN2 转化大肠杆菌 JM109, 用 1 mmol/L IPTG 可诱导 GST-HMGN2 融合蛋白的高效表达, 亲和层析法获得高纯度融合蛋白, 其分子质量约为 36 ku, 与预测大小相符. 凝血酶酶切后从融合蛋白中切出阳离子蛋白 HMGN2, 用反相高压液相色谱纯化出 HMGN2 多肽, Tricine-SDS-PAGE 显示所提取的蛋白质纯度高, 其分子质量约 9 ku, 与预测大小相符 (图 6).





**Fig6 SDS-PAGE of recombinant HMGN2**

1: total proteins of recombinant *E.coli* (HMGN2); 2: GST-HMGN2 fusion protein; 3: purified HMGN2; M: protein marker

## 2.4 HMGN2 抗菌谱

HMGN2、HNP1-3、NP-1 抗菌活性用 MIC 和 MBC 方法检测, 每个试验重复 3 次, 每次试验做 3 复孔. 从抗菌实验结果(表 1)来看, HMGN2 有显著抗大肠杆菌 ML-35p 和绿脓杆菌 ATCC 27853 活性, 有抗白色念珠菌 ATCC 10231 的活性, 但无抗金黄色葡萄球菌活性. HMGN2 与抗菌肽 NP-1、HNP-1 的抗菌活性相当. 且盐敏感实验表明 HMGN2 在 0.3 mol/L NaCl 存在时失去抗菌活性, 说明 HMGN2 的抗菌活性具有盐敏感性, 这是一些抗菌肽的重要特征之一, 与抗菌肽 NP-1 和 HNP-1 相同.

纯化的 HMGN2 与 NP-1、HNP-1 抗菌活性实验结果见表 1.

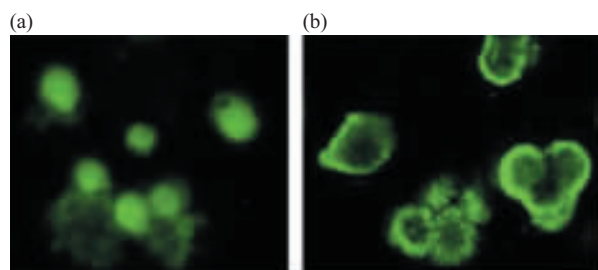
**Table 1 Antimicrobial activities of recombinant HMGN2**

| Peptides |            | <i>E.coli</i> ML-35p | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | <i>Candida albicans</i><br>ATCC 10231 |
|----------|------------|----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| HMGN2    | MIC (mg/L) | 12.5                 | 25                                          | 100                                   |
|          | MBC(mg/L)  | 25                   | 50                                          | 150                                   |
| HNP1-3   | MIC (mg/L) | 12.5                 | NT                                          | NT                                    |
|          | MBC(mg/L)  | 25                   | NT                                          | NT                                    |
| NP-1     | MIC (mg/L) | 6.25                 | 12.5                                        | 25                                    |
|          | MBC(mg/L)  | 12.5                 | 25                                          | 50                                    |

NT means not tested.

## 2.5 HMGN2 细胞定位

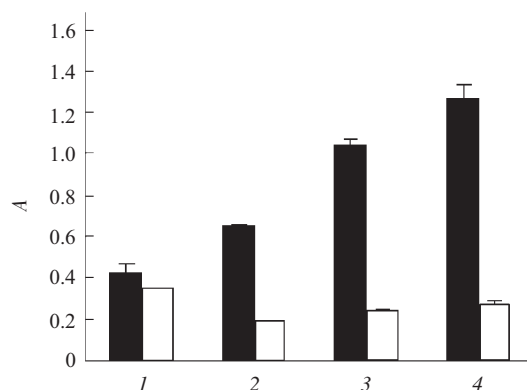
免疫荧光化学分析结果见图 7, 在单个核白细胞中仅胞核显示荧光信号, 而经 IL-2 刺激后的 LAK 细胞在胞浆和胞核均出现荧光, 其中胞浆的荧光较强. 这说明经 IL-2 刺激后, 部分 HMGN2 由胞核转移至胞浆.



**Fig.7 Confocal micrograph showing HMGN2 distribution in LAK cells**

(a) resting mononuclear leukocytes; (b) LAK cells (after 2 day stimulation).

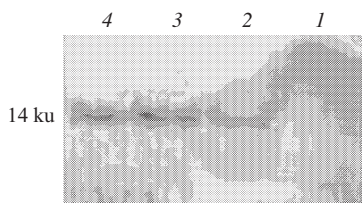
用 ELISA 方法检测 LAK 细胞培养上清 HMGN2 含量, 结果见图 8, LAK 细胞 8 天培养上清和 2 天培养上清中 HMGN2 的含量比单个核白细胞中 HMGN2 的含量明显升高.



**Fig.8 ELISA detection of HMGN2 in the culture supernatant of mononuclear leukocytes and LAK cells**

■: anti-HMGN2 serum; □: pre-immunized serum. 1: medium; 2: mononuclear leukocytes; 3: the supernatant of 2 day-cultured LAK cells; 4: the supernatant of 8 day-cultured LAK cells.

用 Western-blot 检测 LAK 细胞培养上清中的 HMGN2 含量, 结果见图 9, LAK 细胞 8 天培养上清浓缩样品、2 天培养上清浓缩样品和 HMGN2 蛋白有明显的杂交信号, 而单个核白细胞培养上清的浓缩样品无杂交信号。



**Fig.9 Western blot analysis of concentrated culture supernatants of mononuclear leukocytes and LAK cells**

1: concentrated culture supernatant of mononuclear leukocytes; 2: concentrated culture supernatant of LAK cells ( 2 days ); 3: concentrated culture supernatant of LAK cells ( 8 days); 4: HMGN2; M: protein marker.

### 3 讨 论

人 LAK 细胞 /NK 细胞、CTL 细胞被认为是机体抗癌细胞系统和抗胞内微生物感染的主要免疫细胞群体. LAK 细胞亦是临床生物治疗恶性肿瘤最为重要的细胞<sup>[1]</sup>. LAK 杀菌作用主要通过两种途径实现: 一是直接的杀菌作用, 二是通过分泌的杀菌活性物质. LAK 细胞抗癌和抗微生物感染的效应分子具有多样性, 既包括大分子的穿孔素、颗粒酶、溶酶体成分, 也包括小分子的颗粒溶素、LL-37、 $\alpha$ -防御素及一些未确定的成分<sup>[2-5]</sup>. 本文应用一系列微量肽分离纯化与分析技术以及体外抗菌的微量检测法, 从体外培养的人 LAK 细胞酸溶性提取物中筛选到一个对革兰氏阴性菌有较强抗菌作用的多肽分子, 经 N 端氨基酸序列测定、质谱分子质量测定和 HMGN2 多克隆抗体免疫印迹分析确定该分子为 HMGN2. 制备的重组 HMGN2 的抗菌检测显示, 其抗菌活性与人中性粒细胞防御素 HNP 相当.

HMG 蛋白 (high mobility group chromosomal protein) 是脊椎动物和非脊椎动物的细胞核中含量最为丰富的非组蛋白家族, 这一家族的成员普遍存在于高等真核生物中, 目前 HMG 蛋白分为三个亚家族: HMG-1/-2、HMG-I/Y/C、HMG-14/-17. HMGN2 属于 HMG-14/-17 家族, 分子质量约为 9.2 ku, 共由 90 个氨基酸残基组成<sup>[7]</sup>. HMGN2 基因的编码序列在各物种中具有高度的保守性, 具有看家基因的特点, 说明 HMGN2 可能在生物的进化和

细胞功能中起到重要作用<sup>[7]</sup>. 以前的研究<sup>[14,15]</sup>认为 HMGN2 结合于染色体的特异部位, 是染色体纤维构成必不可少的一部分, 与核小体结合, 在功能上, HMGN2 与 DNA 的复制与转录活性有关. HMGN2 能解开致密染色体的折叠结构从而有利于复制和转录的启动和效率的提高. 还有一些研究资料表明 HMGN2 在胚胎发育及器官发生中起重要作用<sup>[16]</sup>. 但关于 HMGN2 蛋白的一些新的研究进展, 提示它可能具有更为复杂重要的功能.

Hock 等<sup>[17]</sup>通过免疫荧光细胞化学技术分析 HMGN2 的细胞定位, 发现 HMGN2 仅在细胞周期中核膜形成后才进入细胞核中. Spieker 等<sup>[18]</sup>对 25 株瘤进行了分析, 认为人染色体 1p 区域具有多个瘤抑制基因, 1p36 这一区域的染色体异常与多种肿瘤的发生有关, HMGN2 基因恰恰定位于 1p36.1, 提示该分子很可能具有抗癌活性. Porka 等<sup>[19]</sup>实验证明, HMGN2 N 端 31 个氨基酸残基能结合骨髓上皮原生细胞和肿瘤血管内皮细胞. Boman 实验室对人皮肤水疱液抗菌成分进行分析, 分离出人  $\alpha$  防御素 (HNP1、HNP2、HNP3)、溶菌酶和抗菌肽 LL-37. 另外还分离获得 HMGN2, 但他们未检测 HMGN2 是否具有抗菌活性, 仅认为是细胞裂解后释放出来的细胞核成分<sup>[20]</sup>. 本文首次发现 HMGN2 具抗菌活性, 并发现人单个核白细胞经 IL-2 刺激形成 LAK 细胞时 HMGN2 向胞浆转移和分泌到细胞外, 提示 HMGN2 不仅是一个核蛋白, 而且可能是 LAK 细胞一个新的免疫效应分子. 最近, Fernandes 等<sup>[21]</sup>从鱼皮肤分泌的黏液中分离到一个新抗菌肽, 也是 HMG 家族成员.

另外, 值得一提的是, HMG 另外一个家族成员 HMG1 原来也认为是一个核蛋白, 但现在已经确定 HMG 1 是一个功能很复杂的分子, 现已确定为一个有毒的细胞因子, 在内毒素休克后期起关键致死作用. 它由活化的单核细胞和巨噬细胞释放, 活化了下游细胞因子的释放, 参与内毒素休克的致死发展<sup>[22,23]</sup>.

关于 HMGN2 的免疫学功能的研究正在进一步进行中.

### 参 考 文 献

- 1 Grimm E A, Mazumder A, Zhang H Z, *et al.* Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Med Exp*, 1982, **155** (6):1823-1841
- 2 Edwards K M, Davis J E, Browne K A, *et al.* Anti-viral strategies of

- cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunology & Cell Biology*, 1999, **77** (1): 76~89
- 3 Andersson M, Gunne H, Agerberth B, *et al.* NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO Journal*, 1995, **14** (8): 1615~1625
  - 4 Pena S V, Hanson D A, Carr B A, *et al.* Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol*, 1997, **158** (6): 2680~2688
  - 5 Agerberth B, Charo J, Werr J, *et al.* The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 2000, **96** (9): 3086~3093
  - 6 Lehrer R I, Roseman M, Haarwig S S L, *et al.* Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial peptides. *J Immuno Meth*, 1991, **137** (2): 167~172
  - 7 Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high- mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol*, 1999, **19** (8): 5237~5346
  - 8 Postnikov Y V, Herrera J E, Hock R, *et al.* Cluster of nucleosomes containing chromosomal protein HMG-17 in chromatin. *J Mol Biol*, 1997, **274** (4): 454~465
  - 9 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000. 153~154  
Zhu L P, Chen X Q. Experimented Hethods of Immunology. Beijing: People's Military Medical Press, 2000. 153~154
  - 10 Panyim S, Chalkey R. High resolution acrylamide gel eletrophoresis of histone. *Arch Biochem Biophys*, 1969, **130** (1): 337~341
  - 11 Oren Z, Lerman J C, Gudmundsson G H, *et al.* Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J*, 1999, **341** (3): 501~508
  - 12 董志伟, 王 炎. 抗体工程. 第二版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002. 264  
Dong Z W, Wang Y. Antibody Engineering. Beijing: Peking Union Medical College Press, 2002. 264
  - 13 Mckinney M M, Parkinson A. A simple no-chromatographic procedure to purify imunoglobulins from serum and ascitic fluid. *J Immunol Methods*, 1987, **96** (2): 271~278
  - 14 Tremethick D J, Hyman L. High mobility group protein 14 and 17 can prevent the closed packing of nucleosomes by increasing the strength of protein contacts in the linker DNA. *J Biol Chem*, 1996, **271** (20): 12009~12016
  - 15 Vestner B, Bustin M, Gruss C. Stimulation of replication efficiency of a chromatin templ by chromosomal protein HMG-17. *J Biol Chem*, 1998, **273** (16): 9409~9414
  - 16 Mohamed O A, Bustin M, Clark H J. High-mobility group protein 14 and 17 maintain the timing early embryonic development of DNA sequence. *J Biol Chem*, 2001, **229** (1): 237~249
  - 17 Hock R, Scheer U, Bustin M. Chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17 are released from mitotic chromosomes and imported into the nucleus by active transport. *J Cell Biol*, 1998, **143** (6): 1427~1436
  - 18 Spieker N, Beitsma M, Van Sluis P, *et al.* An integrated 5-Mb physical, genetic, and radiation hybric map of a 1p36.1 region implicated in neuroblastoma pathogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, **27** (2): 143~152
  - 19 Porka K, Laakkonen P, Hoffman J A, *et al.* A fragment of the HMEN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(11): 7444~7449
  - 20 Frohm M, Gunne H, Bergman A C, *et al.* Biochemical and antibacterial analysis of human wound and blister fluid. *Eur J Biochem*, 1996, **237** (1): 86~92
  - 21 Fernandes J M, Saint N, Kemp G D, *et al.* Oncorycin III : a potent antimicrobial peptide derived from the nonhistone chromosomal protein H6 of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochem J*, 2003, **373** (2): 621~628
  - 22 Yang H, Wang H, Tracey K J. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock*, 2001, **15** (4): 247~253
  - 23 Czura C I, Wang H, Tracey K J. Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res*, 2001, **7** (4): 315~321

## Identification of HMGN2 as an Effector Molecule of Human LAK Cells\*

Feng Yun, Xiong Wen-Bi, Wang Guo-Xing, Huang Ning, Wu Qi, Bao Lang, Li Xuan, Wang Bo-Yao\*\*

(Research Unit of Infection and Immunity, West China School of Preclinical and Forensic Medicine,

Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract** An antimicrobial polypeptide was isolated and purified from the acid soluble proteins of human LAK cells. Its N-terminal amino sequence was identical to HMGN2 (high mobility group nucleosomal binding domain 2). Mass spectrum identification and Western blotting analysis also indicated its individual character of HMGN2. The antimicrobial assay showed that MICs of the recombinant HMGN2 against *E.coli* ML-35p (an ampiciline-resistance strain), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Candida albicans* ATCC 10231 were 12.5, 25, and 100 mg/L respectively. In contrast, the recombinant holo-HMG-17 was inactive against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The immunocytochemistry staining, ELISA, and Western blotting revealed that HMGN2 was present in the cytoplasm of mononuclear leukocytes and released to the extracellular environment when stimulated with IL-2. The results indicated that HMGN2 was a new effector molecule of human LAK cells.

**Key words** LAK cells, HMGN2, antimicrobial activity, bioactive polypeptide

---

\*This work was supported by grants from The China Medical Board of New York Inc. (98-681), and The National Natural Sciences Foundation of China (30300127).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-28-85503159, E-mail: wangby@mail.sc.cninfo.net

Received: January 4, 2005 Accepted: March 28, 2005