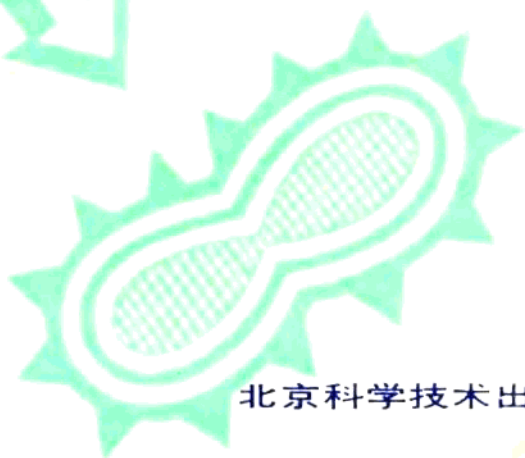
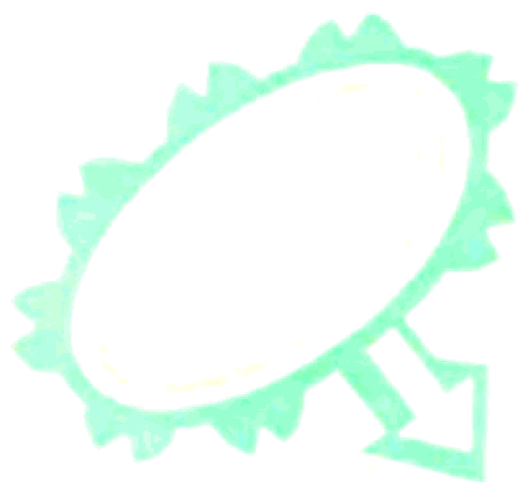


曹雪涛
编著

白细胞的 基础与临床 2



北京科学技术出版社

内 容 提 要

本书是一本有关白细胞介素2的专著。作者综合国内外大量的文献资料并结合自己的研究结果,系统介绍了白细胞介素2的来源、性质、结构、受体、诱生制备、检测方法、免疫调节作用,与其他细胞因子的关系及药理学,深入地论述了白细胞介素2激活的抗肿瘤效应细胞(包括LAK细胞和肿瘤浸润性淋巴细胞)的性质、制备技术和杀伤活性的测定方法、抗肿瘤作用的特点和机理、白细胞介素2/LAK细胞/肿瘤浸润性淋巴细胞临床治疗肿瘤患者的具体应用方法和效果。本书反映了国内外白细胞介素2基础研究和临床应用的最新成果。可供广大免疫学、肿瘤学、血液学、细胞学、分子生物学等有关科研工作者、大专院校师生、各科临床医师使用。

白细胞介素2的基础与临床

曹雪涛 编著

叶天星 孔宪涛 审阅

*

北京科学技术出版社出版发行

(北京西直门南顺城街12号)

同济大学印刷厂印刷

*

787×1092毫米 16开本 17.625印张 4插页 430千字

1990年12月第一版 1990年12月第一次印刷

印数 1--3 000册

ISBN7-5304-0858-5/R·125 定价:9.80元

前言

自从1976年由Morgan等发现白细胞介素2以来,人们在白细胞介素2的性质、结构、制备纯化、检测、生物学活性、临床应用等诸多研究方面取得了很大的进展,特别是1983年基因工程重组人白细胞介素2的问世,更加推动了白细胞介素2的基础研究和临床应用。现已证明,白细胞介素2在机体诸多免疫反应中起中心调节作用,它诱导形成的“淋巴因子激活的杀伤细胞”即LAK细胞和激活的肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)具有显著的抗肿瘤作用,将LAK细胞和TIL联合白细胞介素2过继免疫治疗肿瘤患者已取得了显著的临床效果。此种过继免疫疗法被誉为肿瘤免疫治疗的重大突破性进展。此外,用白细胞介素2治疗某些感染性疾病和免疫缺陷性疾病也取得了一定的疗效,可见,白细胞介素2是一种具有重大实际应用价值的生物制品。作者在从事这方面研究的过程中,深感此领域研究将成为免疫学、肿瘤学、细胞学、分子生物学等有关科研人员和临床医师的热门课题,基于此,作者曾尝试性地写过此方面的综述,但总觉得一漏万,遂想编写一本能够全面系统地从基础研究到临床应用的各个方面介绍白细胞介素2的专著,在导师叶天星教授和孔宪涛教授的鼓励和指导下,虽觉力微任重,终下决心,历时一年,尽心竭力,撰成拙作。

在本书的编写过程中,作者既参阅了国外有关白细胞介素2研究的新进展,也结合了国内的研究结果,力求使本书能够反映白细胞介素2研究的新成就。每章后面均附有原始文献,可供读者查阅参考。

承蒙叶天星教授和孔宪涛教授在百忙中抽时间逐句审阅本书各章节原稿并提出许多宝贵意见,特别是导师叶天星教授给予热情鼓励,提出编写的严格要求和出谋启示;本教研室杨嗣坤教授、徐志工副教授和全体同事们给予大力支持;美国国立卫生研究院Rosenberg博士、Wiltout博士、美国哈佛大学Kradin博士等国外知名学者提供最新研究资料,谨致谢意。此外,本校邹宜昌教授、曹金盛副编审、王建莉硕士、娄永华硕士在此书的编写过程中也做了大量工作,在此一并致谢。

我国免疫学老前辈、上海医科大学免疫学教研室林飞卿教授热心为此书作序,不胜感激。

虽然作者主观希望本书内容能对广大读者有所帮助,但由于经验不足,水平所限,拙著遗漏之处难免,诚恳地希望读者予以批评指正。

曹雪涛

一九九〇年九月于上海

第二军医大学免疫学教研室

序

白细胞介素 2 (Interleukin 2, IL-2) 是机体复杂免疫网络中起调节作用的最重要的淋巴因子。它能激活各种免疫细胞,特别是诱导 T 淋巴细胞的增生与发挥免疫效应,以及促进 B 淋巴细胞的免疫应答, NK 和单核巨噬细胞等的增生,产生细胞因子与免疫活性,其结果表现为抗肿瘤、抗感染,矫正免疫缺陷,破坏自身免疫耐性等,具有重大的实际应用价值。目前对 IL-2 的理论与实用的研究是免疫学领域中一个大热点。

1980 年发现了 IL-2 能诱导自身淋巴细胞成为“淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK)”,有明显的抗肿瘤作用。1983 年因基因工程重组人白细胞介素 2 (rhIL-2) 研制成功,为 IL-2 的基础和临床研究提供了方便。于是,有人试用 LAK 加 rhIL-2 给肿瘤患者作过继性治疗,获得可喜效果。1986 年,人们发现从实体瘤内分离出的淋巴细胞即肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 经 IL-2 激活后的抗肿瘤效果比 LAK 细胞强 50~100 倍。嗣后,有人用病人自身肿瘤浸润淋巴细胞加重组 IL-2 治疗肿瘤患者,结果显著提高了疗效,同时大大减少 IL-2 的用量与毒性副作用。另外,还证明 IL-2 可用于治疗某些感染病与免疫缺陷病。

近年来,IL-2 的基础理论和临床应用的发展很快,国内也有很多单位已开展了或正在准备开展这方面的研究,但是有关 IL-2 的理论与应用专著还未见到。曹雪涛博士在导师叶天星和孔宪涛教授的指导下,广泛收集国内外最新文献报道,与国外学者通讯联系,结合自身科研中体会,编写成《白细胞介素 2 的基础与临床》一书以供众多研究者的需要。我有幸阅读了此书原稿,深感此书的内容极其丰富与新颖,系统地论述了 IL-2 的性能、作用机理及其临床应用的效果和注意事项,相信必将有助于国内对 IL-2 基础理论研究和临床应用的提高。本书共分 11 章,前 7 章属基础理论,包括 IL-2 的分子生物学、受体、检测方法、制备与纯化、对免疫细胞的调节作用,与其它细胞因子的关系及 IL-2 的药理学。第 8 与 9 章是关于 LAK 细胞、IL-2 和 LAK 细胞的抗肿瘤作用,第 10 章是 IL-2 与 TIL 的制备及抗肿瘤作用,第 11 章是 IL-2 对感染及免疫缺陷的治疗作用。本书附有图表各百余幅和国内外参考文献近千篇,图文并茂,文字流畅,是一本很好的参考书,值得赞扬与推荐。尤其使我欣赏的是,本书作者曹雪涛同志现年仅 26 岁,在攻读硕士学位时期,他即以学习勤奋,善于钻研和成绩优异著称,被破格提前授与博士学位。我殷切希望有更多的有志青年努力献身我国的免疫学领域,取得更大的成就与贡献,特为之序。

林飞卿

上海医科大学免疫学教授

1990 年 10 月于上海

目 录

第一章 白细胞介素 2 的分子生物学	(1)
第一节 白细胞介素 2 的种类和理化性质	(1)
一、IL-2 的种类	(1)
二、不同种属间的 IL-2 的交叉反应性	(2)
三、IL-2 的理化性质	(2)
第二节 白细胞介素 2 的基因	(3)
一、IL-2 基因的克隆与表达	(3)
二、IL-2 基因的定位与结构	(5)
三、IL-2 基因表达的调控	(6)
四、IL-2 基因与其他因子基因的同源性	(8)
第三节 白细胞介素 2 的分子结构	(9)
一、IL-2 的一级结构	(9)
二、IL-2 的空间结构	(10)
三、IL-2 的结构与功能的关系	(11)
第四节 白细胞介素 2 作用的分子机制	(14)
一、T 细胞活化概述	(14)
二、IL-2 作用早期的分子机制	(16)
三、IL-2 作用晚期的分子机制	(18)
四、癌基因表达在 IL-2 诱导增殖反应中的作用	(19)
第二章 白细胞介素 2 受体	(23)
第一节 白细胞介素 2 受体的分子生物学	(23)
一、IL-2R 的 cDNA 克隆与表达	(23)
二、IL-2R 基因的定位与结构	(23)
三、IL-2R 的结构	(24)
第二节 白细胞介素 2 受体的理化性质和生物学活性	(27)
一、IL-2R 的种类	(27)
二、IL-2R 的理化性质	(28)
三、IL-2R 的生物学活性	(28)
第三节 白细胞介素 2 受体表达的调节因素	(30)
一、抗原/丝裂原对 IL-2R 表达的调节作用	(30)
二、细胞因子对 IL-2R 表达的调节作用	(30)
三、辅助细胞对 IL-2R 表达的调节作用	(31)
四、药物对 IL-2R 表达的影响	(31)
五、ADF 对 IL-2R 表达的调节作用	(31)

第四节 白细胞介素2受体的单克隆抗体	(32)
一、抗IL-2R单抗的制备	(33)
二、抗IL-2R单抗的分类	(33)
三、抗IL-2R单抗的应用	(35)
第五节 白细胞介素2受体的检测方法	(35)
一、IL-2吸收试验	(35)
二、直接结合试验	(35)
三、间接结合试验	(37)
四、ELISA法测定sIL-2R	(37)
第六节 研究白细胞介素2受体的生物学和临床意义	(38)
第三章 白细胞介素2的检测方法	(45)
第一节 检测所需细胞的种类、性质及其制备与保存方法	(45)
一、IL-2依赖性细胞株的培养	(45)
二、新鲜制备的IL-2反应性淋巴母细胞	(46)
三、检测细胞的冻存与复苏	(47)
第二节 白细胞介素2的生物学测定法	(48)
一、 $[^3\text{H}]$ TdR掺入法	(48)
二、微量酶检测法	(49)
三、活细胞染色法	(51)
四、活细胞计数法	(52)
五、生物学测定法的优缺点及应注意的问题	(52)
六、IL-2活性单位的计算方法	(53)
第三节 白细胞介素2的免疫学测定法	(55)
一、酶免疫测定法	(55)
二、放射免疫测定法	(57)
第四章 白细胞介素2的制备与纯化	(60)
第一节 白细胞介素2的细胞来源	(60)
一、产生IL-2的新鲜组织细胞	(60)
二、能产生IL-2的传代细胞株	(62)
第二节 白细胞介素2诱生的影响因素	(62)
一、选用的产生细胞的种类、新鲜程度及个体差异	(62)
二、淋巴细胞的浓度	(62)
三、诱导剂	(63)
四、单核巨噬细胞的浓度	(63)
五、培养基和血清的类型和浓度	(64)
六、培养的温度、时间和pH值	(64)
七、辐射	(64)
八、加用“辅助增强”细胞	(64)

第三节 天然人白细胞介素 2 的制备与纯化	(65)
一、利用人 PBL 制备、纯化天然人 IL-2	(65)
二、利用人扁桃体淋巴细胞制备、纯化天然人 IL-2	(69)
三、从 IL-2 粗制上清中去除丝裂原的几种简易方法	(70)
第四节 重组白细胞介素 2 的制备与纯化	(72)
一、制备纯化 rIL-2 的一般步骤	(73)
二、rIL-2 的变性与复性	(73)
三、rIL-2 制备纯化方法举例	(74)
第五节 利用高产白细胞介素 2 的细胞株制备白细胞介素 2	(75)
一、利用 Jurkat 细胞制备 IL-2	(75)
二、利用 ML A144 细胞制备 IL-2	(76)
三、利用 EL-4 细胞制备 IL-2	(77)
第五章 白细胞介素 2 对免疫效应细胞的调节作用	(80)
第一节 白细胞介素 2 对 T 细胞的调节作用	(80)
一、IL-2 促进 T 细胞增殖	(80)
二、IL-2 对 T 细胞杀伤活性的体外诱导作用和体内增强效应	(84)
三、IL-2 诱导 T 细胞分泌细胞因子	(87)
第二节 白细胞介素 2 对 B 细胞的调节作用	(87)
一、IL-2 对 B 细胞的直接作用及机理	(87)
二、其他细胞因子或药物对 IL-2 促进 B 细胞功能的影响	(89)
第三节 白细胞介素 2 对单核巨噬细胞的调节作用	(90)
一、激活的单核巨噬细胞能够表达 IL-2R	(90)
二、单核巨噬细胞表达的 IL-2R 的种类和性质	(91)
三、IL-2 对单核巨噬细胞功能的调节	(91)
第四节 白细胞介素 2 对 NK 细胞的调节作用	(93)
一、IL-2 促进 NK 细胞的增殖	(93)
二、IL-2 能增强 NK 细胞的杀伤活性	(93)
三、其他细胞因子和抗 CD16 单抗对 IL-2 激活 NK 细胞的影响	(97)
四、IL-2 调节 NK 细胞的作用途径——IL-2R β 链(p75)	(98)
第六章 白细胞介素 2 与其他细胞因子的关系	(102)
第一节 白细胞介素 2 与白细胞介素 1 的关系	(102)
一、IL-1 概述	(102)
二、IL-2 与 IL-1 的关系	(104)
第二节 白细胞介素 2 与白细胞介素 3 的关系	(106)
一、IL-3 概述	(106)
二、IL-2 与 IL-3 的关系	(107)
第三节 白细胞介素 2 与白细胞介素 4 的关系	(109)

一、IL-4 概述	(109)
二、IL-2 与 IL-4 的关系	(110)
第四节 白细胞介素 2 与白细胞介素 5 的关系	(112)
一、IL-5 概述	(112)
二、IL-2 与 IL-5 的关系	(113)
第五节 白细胞介素 2 与白细胞介素 6 的关系	(115)
一、IL-6 概述	(115)
二、IL-2 与 IL-6 的相互诱导	(116)
三、IL-2 与 IL-6 能协同促进细胞增殖	(117)
四、IL-2 与 IL-6 协同诱导 CTL 形成	(118)
第六节 白细胞介素 2 与白细胞介素 7 的关系	(119)
一、IL-7 的分子生物学	(119)
二、IL-7 的生物学活性及其与 IL-2 的关系	(119)
第七节 白细胞介素 2 与干扰素之间的关系	(121)
一、干扰素概述	(121)
二、IL-2 与 IFN 的关系	(122)
第八节 白细胞介素 2 与肿瘤坏死因子的关系	(124)
一、TNF 概述	(124)
二、IL-2 与 TNF 的关系	(125)
第九节 白细胞介素 2 与克隆刺激因子的关系	(131)
一、CSF 概述	(131)
二、IL-2 与 CSF 的关系	(135)
第十节 白细胞介素 2 与转化生长因子 β 的关系	(136)
一、TGF- β 概述	(136)
二、IL-2 与 TGF- β 的关系	(138)
第七章 白细胞介素 2 的药理学	(144)
第一节 白细胞介素 2 的代谢动力学	(144)
一、IL-2 的半衰期和血中浓度	(144)
二、延长 IL-2 半衰期的方法	(146)
三、外源性 IL-2 的体内组织分布	(149)
四、肾脏在 IL-2 体内代谢中的作用	(150)
第二节 白细胞介素 2 抑制物	(150)
一、IL-2 抑制物的种类、性质和作用	(150)
二、IL-2 抑制物的检测	(153)
三、IL-2 抑制物的临床意义	(153)
第三节 白细胞介素 2 的副作用	(154)
一、IL-2/LAK 疗法副作用的表现和发生机理	(154)
二、预防和处理	(158)

第四节 白细胞介素 2 的适用范围	(158)
一、用于治疗肿瘤、免疫缺陷和某些感染性疾病	(158)
二、通过抑制 IL-2 生物学效应以治疗移植排斥、自身免疫性疾病和 某些炎症反应	(159)
第五节 白细胞介素 2 的应用途径和剂量	(159)
一、全身应用	(159)
二、局部应用	(162)
第八章 LAK 细胞	(171)
第一节 LAK 细胞的性质	(171)
一、LAK 细胞的命名及其特性	(171)
二、IL-2 对 LAK 细胞的激活作用	(174)
第二节 LAK 细胞抗肿瘤活性的调节因素	(175)
一、细胞水平上调 LAK 活性的因素	(176)
二、分子水平上调 LAK 活性的因素	(178)
第三节 LAK 活性的测定方法	(182)
一、靶细胞的制备	(182)
二、4 小时 ^{51}Cr 释放法	(183)
三、 $[^3\text{H}]$ TdR 释放法	(184)
四、LDH 释放法	(185)
五、 Eu^{3+} 荧光测定法	(185)
六、克隆形成测定法	(186)
七、ATP 生化发光法	(187)
第四节 LAK 细胞的制备与冻存	(188)
一、以往的常规方法	(188)
二、简便、自动化制备 LAK 细胞的方法	(189)
三、增强 LAK 活性和增加 LAK 细胞数量的方法	(189)
四、用中空纤维细胞培养技术大量扩增 LAK 细胞	(191)
五、用无血清培养基制备 LAK 细胞	(193)
六、A-LAK 的制备	(193)
七、利用胎儿胸腺、肝脏和脾脏制备 LAK 细胞	(196)
八、用肿瘤引流淋巴结制备 LAK 细胞	(197)
九、用骨髓制备 LAK 细胞	(198)
十、LAK 细胞的冻存	(199)
第五节 外源性 LAK 细胞的体内分布	(200)
一、外源性 LAK 细胞过继输入体内后在主要器官的分布情况	(201)
二、LAK 细胞与 T 细胞的体内分布的比较	(202)
三、外部因素对 LAK 细胞体内分布的影响	(202)
第六节 LAK 细胞杀伤肿瘤细胞的机制	(203)
一、杀伤细胞溶解靶细胞的作用机制概述	(203)

二、LAK 细胞识别肿瘤细胞的分子机制	(203)
三、LAK 细胞杀伤肿瘤细胞的形态学和分子机制	(205)
第九章 白细胞介素 2 和 LAK 细胞的抗肿瘤作用	(211)
第一节 白细胞介素 2 和 LAK 细胞抗肿瘤作用的实验研究	(211)
一、肿瘤过继免疫疗法概述	(211)
二、IL-2 的抗肿瘤作用	(212)
三、联合应用 LAK 细胞和 IL-2 的抗肿瘤作用	(213)
四、IL-2/LAK 细胞与化疗药物之间的协同抗肿瘤作用	(218)
第二节 白细胞介素 2 和 LAK 细胞的临床抗肿瘤效果	(222)
一、临床应用的历史与现状	(222)
二、单用 IL-2 的临床治疗效果	(227)
三、联合应用 IL-2 和 LAK 细胞的临床治疗效果	(228)
四、联合应用 IL-2 和其他细胞因子的临床治疗效果	(233)
五、联合应用 IL-2 和环磷酰胺的临床治疗效果	(234)
第十章 白细胞介素 2 激活的肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)	(237)
第一节 肿瘤浸润性淋巴细胞的免疫学特性	(237)
一、肿瘤原位的 TIL 的免疫学特性	(237)
二、新鲜分离的 TIL 的免疫学特性	(238)
三、IL-2 培养后的 TIL 的免疫学特性	(241)
第二节 肿瘤浸润性淋巴细胞的分离与培养	(242)
一、TIL 的分离、培养的方法和效果	(243)
二、增强 TIL 扩增能力的方法	(247)
第三节 肿瘤浸润性淋巴细胞抗肿瘤作用的实验研究	(250)
一、TIL 的体内外抗肿瘤作用	(250)
二、TIL 与 LAK 细胞抗肿瘤作用的比较	(258)
第四节 白细胞介素 2 激活的肿瘤浸润性淋巴细胞治疗晚期肿瘤患者的 临床效果	(261)
第十一章 白细胞介素 2 对感染和免疫缺陷的治疗作用	(264)
第一节 白细胞介素 2 与病毒性感染	(264)
一、IL-2 对 HSV 感染的治疗作用	(264)
二、IL-2 对慢性活动性肝炎的治疗效果	(265)
三、IL-2 对其他病毒性感染的治疗作用	(266)
第二节 白细胞介素 2 与细菌和寄生虫感染	(267)
一、IL-2 与细菌感染	(267)
二、IL-2 与寄生虫感染	(267)
第三节 白细胞介素 2 与免疫缺陷	(268)
一、免疫缺陷概述	(268)
二、IL-2 对严重联合型免疫缺陷病的治疗效果	(269)
三、IL-2 对 AIDS 的治疗效果	(269)

第一章 白细胞介素 2 的分子生物学

1976 年, Morgan 等^[1]首次发现在丝裂原刺激的淋巴细胞培养上清或称条件培养基(Conditional medium, CM)中存在一种因子,它能够选择性地维持 T 淋巴细胞在体外长期生长,人们将该因子称为 T 细胞生长因子(T cell growth factor, TCGF)。除此之外,人们发现 CM 中还存在其他生物学活性,如辅助刺激胸腺细胞增殖的活性、激活 T 细胞的活性等等。于 1979 年在瑞士召开的第二届国际淋巴因子会议上,专家们认为上述活性均是由辅助性 T 细胞(T_H)释放的同一种因子介导的,为了统一命名,专家们规定将联系白细胞间相互作用的因子统称为白细胞介素(Interleukin, IL),将由激活的 T 细胞产生的、在淋巴细胞间起相互作用的因子即以往的 TCGF 称为白细胞介素 2(Interleukin-2, IL-2),将由激活的巨噬细胞产生的、以往称为淋巴细胞激活因子(Lymphocyte activating factor, LAF)命名为白细胞介素 1(Interleukin-1, IL-1)。随着研究的不断深入,人们发现除了激活的 T 细胞外,其他多种组织细胞也可产生 IL-2,而且 IL-2 除了作用于 T 细胞外,还可作用于多种免疫效应细胞,包括 B 细胞、巨噬细胞、NK 细胞,并能诱导产生新型的杀伤细胞即淋巴因子激活的杀伤细胞(Lymphokine-activated killer cells, LAK),特别是 1983 年基因重组 IL-2 的问世,使得 IL-2 的研究取得了更大的进展,目前,IL-2 已被应用于治疗肿瘤、免疫缺陷和感染性疾病并取得了显著的效果。有人应用 IL-2 或其受体的单克隆抗体治疗移植排斥和自身免疫性疾病也已观察到初步的疗效,预计在未来的几年中,有关 IL-2 的基础研究和临床应用还将取得更大的进展。

第一节 白细胞介素 2 的种类和理化性质

一、IL-2 的种类

目前,人们已从人和猴、牛、马、猪、兔、狗、羊、鸡、猫、豚鼠、大鼠、小鼠等的淋巴细胞中诱导出 IL-2。根据诱导、制备时的细胞来源不同,人们将 IL-2 大体上分为天然 IL-2 和非天然 IL-2 两类。

(一)天然 IL-2

由正常的 IL-2 产生细胞所产生。人天然 IL-2 主要用人外周血淋巴细胞(PBL)、扁桃体淋巴细胞、脾脏细胞等制备。牛天然 IL-2 主要从牛 PBL 中诱导。鼠天然 IL-2 主要从鼠脾脏细胞诱导提取。

(二)非天然 IL-2

非天然 IL-2 可来源于某些白血病细胞、淋巴瘤细胞和某些病毒转化的细胞,例如,人白

血病 Jurkat 细胞、鼠淋巴瘤 EL-4 细胞经适当诱导剂刺激后均可产生高水平的 IL-2。感染 HTLV-Ⅲ 的人 T 淋巴细胞可自发分泌 IL-2。长臂猿淋巴瘤 MLA-144 细胞不需任何诱导剂刺激也能持续分泌高水平的 IL-2。对非天然 IL-2 研究最多的是利用基因工程的方法用大肠杆菌、酵母、某些哺乳类动物细胞(如 COS-7)表达并制备重组 IL-2。目前,人们已成功地制备并纯化到了大量的人、牛、鼠的重组 IL-2。

二、不同种属间的 IL-2 的交叉反应性^[2]

虽然不同种属来源的 IL-2 都具有相同的生物学活性,但它们之间的作用范围存在一定的差异,表现在高等动物的 IL-2 可作用于低等动物的细胞,而低等动物的 IL-2 不能作用于高等动物的细胞。也就是说,不同种属间的 IL-2 的交叉反应性存在下行性规律,如表 1-1 所示。

表 1-1 不同种属间的 IL-2 的交叉反应性

IL-2 的种属	IL-2 检测细胞的种属										
	人	猴	牛	马	猪	兔	狗	羊	鸡	大鼠	小鼠
人 ^a	+	+	+	+	+	+		+		+	-
猴	+	+									-
牛			+								-
马				+							-
猪	-				+			+			-
兔	-					+					-
狗							+				-
羊								+			-
鸡									+		-
大鼠 ^b	-	-	-	-						+	-
小鼠	-	-					+			-	-

注: a: 人 IL-2 还可作用于猫和豚鼠的细胞

b: 大鼠 IL-2 对猫和豚鼠的细胞无作用

三、IL-2 的理化性质^[3,4]

IL-2 是一种糖蛋白。人、猴和大鼠的 IL-2 都是以单股多肽链形式存在的,其分子量为 19~20 KD(用凝胶过滤法测得)或 15~17 KD(用 SDS-PAGE 测得)。小鼠 IL-2 的分子量为 30~40 KD(用凝胶过滤法测得),它是由分子量为 15~17 KD 的亚基经非共价键联结而成的二聚体。

各种来源的 IL-2 均具有明显的疏水性,此性质可用于 IL-2 的纯化。像其他淋巴因子一样,分泌型 IL-2 的分子大小和电荷多少具有不均一性,此差异取决于细胞来源和诱导的方

法。现已证明, IL-2 的这种不均一性是由于糖基成分(尤其是涎酸)不同所致。人 IL-2 多肽链中含有等量的酸性氨基酸和碱性氨基酸, 其等电点在 pH 7 左右; 鼠 IL-2 多肽链中含有 20 个酸性氨基酸、14 个碱性氨基酸, 故其等电点偏酸。有关人和小鼠 IL-2 较详细的理化性质参阅表 1-2。

表 1-2 IL-2 的理化性质

理化性质	小鼠 IL-2	人 IL-2
分子量(凝胶过滤法测得)	30 KD	15 KD
等电点(括弧内为 IL-2 来源)	3.9~5.0 (EL-4, LBRM) 3.9~4.9 (脾脏)	6.8~8.2 (正常 PBL, 扁桃体淋巴细胞) 8.2 或 7.9 (Jurkat) 4.5 (CTCL)
保持稳定的 pH 值范围	2.0~9.0	2.0~9.0
从 DEAE 纤维素柱上洗脱下的盐浓度	185 mmol/L	45 mmol/L
从羧甲基 Sepharose 上洗脱下的盐浓度	50 mmol/L	225 mmol/L
对蛋白酶(胰酶、糜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、亮氨酸氨基多肽酶)的敏感性	敏感	敏感
对核酸酶(DNA 酶、RNA 酶, 48℃, 8 h)的敏感性	不敏感	不敏感
对神经氨酸酶的敏感性	不敏感	不敏感
对热的稳定性: 56℃, 1 h	稳定	稳定
37℃, 12 h	稳定	稳定
70℃, 15 min	稳定	稳定
70℃, 1 h	不稳定(完全失活)	不稳定(完全失活)
在尿素中的稳定性:		
2 mol/L 尿素(22℃, 4.5 h)	稳定	稳定
8 mol/L 尿素(22℃, 4.5 h)	不稳定	不稳定
对还原作用的敏感性:		
0.25 mol/L 2-ME (pH 8, 4.5 h)	不敏感	不敏感
0.05 mol/L DTT (pH 8, 4.5 h)	不敏感	不敏感
在 SDS 中的稳定性:		
0.1% SDS (70℃, 10~15 min)	稳定	稳定
0.1% SDS (70℃, 30 min)	较稳定	较稳定
0.1% SDS (70℃, 45 min)	不稳定(完全失活)	不稳定(完全失活)

第二节 白细胞介素 2 的基因

一、IL-2 基因的克隆与表达

人们在此方面的研究工作首先是从 IL-2 mRNA 的分离与表达开始的。用常规方法从 Con A 激活的 T 细胞中提取 RNA, 经过寡聚(dT)-纤维素柱得到 poly(A)⁺RNA 即 mRNA。将此 mRNA 微注射入非洲爪蟾的卵母细胞(Xenopus laevis oocytes)中, 发现此异源 mRNA

能指导宿主细胞大量合成 IL-2。将从 PHA 刺激的人外周血 T 淋巴细胞分离到的 mRNA 进行蔗糖梯度离心,发现其中的 10~12 S mRNA 与 IL-2 合成有关。用 PHA 刺激人扁桃腺淋巴细胞 12 小时后可分离到两种 mRNA,一种是 10~10.5 S mRNA,另一为 13~13.5 S mRNA,前者含有约 80% 的 IL-2 mRNA 活性。mRNA 的分离与表达技术为人们进行 IL-2 基因 cDNA 克隆与表达奠定了基础^[5,6]。

1983 年 3 月,日本人 Taniguchi 等^[7]首次成功地将人 IL-2 基因 cDNA 克隆化。他们从 Con A 激活的 Jurkat-111 细胞(一种人的白血病 T 细胞株,从 Jurkat-FHCRC 克隆而来)提取出高活性的 IL-2 mRNA 作为模板逆转录出单链 cDNA,然后经末端脱氧核苷酸转移酶催化,在此 cDNA 末端连接上一些 dCMP 残基,再以寡聚(dG)12~18 作为 DNA 聚合酶 I 的引物,合成双链 cDNA,又经蔗糖密度梯度离心法分离出此 cDNA 片段,通过 G-C 加尾

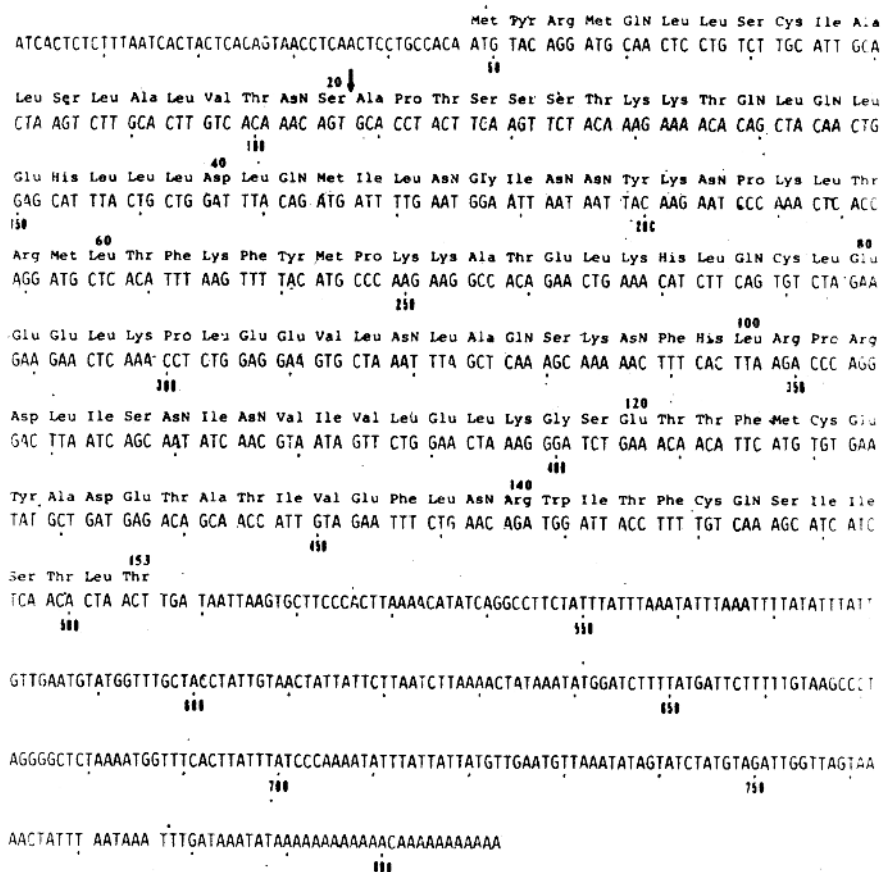


图 1-1 质粒 pIL2-50A 的核苷酸顺序和推导出的 IL-2 多肽链的氨基酸顺序。箭头表示信号肽连接的部位,它可被信号肽酶裂解。上面的数字是氨基酸的序号,下面的数字是核苷酸的序号。

法将此 cDNA 片段插入到 pBR322 质粒的 Pst I 作用位点上,再将这种杂交质粒转化大肠杆菌 K-12 株 X1776,从而制得 IL-2 cDNA 文库。应用 mRNA 杂交翻译试验(mRNA hybridization translation assay)筛选 IL-2 cDNA 文库,得到了一株含 IL-2 cDNA 的质粒 p3-16。p3-16 质粒中 cDNA 插入子长度为 650 bp,明显短于 11.5 S mRNA 相应的 DNA 基因长度,以 650 bp 的 IL-2 cDNA 片段为探针,筛选出一株含较长插入子(880 bp)的 cDNA 克隆 pIL-2-50A。pIL-2-50A cDNA 仅与 Jurkat-111 细胞产生的、大小与 IL-2 mRNA 相一致的 mRNA 杂交,其核苷酸序列如图 1-1 所示,除了少数几个核苷酸外,pIL-2-50A cDNA 插入子包含有 IL-2 mRNA 全部长度。

为了证实 pIL-2-50A cDNA 确实编码人 IL-2 多肽链,选用含有 Pst I 单一作用位点的 pCE-1 质粒做为载体,将 pIL-2-50A 的 cDNA 插入子用 Pst I 处理后插入到 pCE-1 的 Pst I 作用位点上,构成 pCE IL-2 质粒,在 Pst I 作用位点的上游有 SV₄₀ 启动子,所以在构建的 pCE IL-2 质粒中,IL-2 结构基因在适当的宿主细胞如猴肾细胞系 COS-7 中可以从 SV₄₀ 启动子开始转录。将 pCE IL-2 质粒转化 COS-7 细胞,2~3 天后,此细胞的培养上清中可检测出一定的 IL-2 活性,此培养上清能在体外维持 T 细胞的生长,且此活性可被抗 IL-2 抗体中和。可见,pIL-2-50A cDNA 确实编码具有生物活性的人 IL-2。

仅仅比 Taniguchi 等人迟了数月,比利时学者 Devos 等(1983)^[8]也成功地将从人脾细胞的 IL-2 基因 cDNA 克隆化并在大肠杆菌中表达出高活性的人 IL-2。

二、IL-2 基因的定位与结构

人 IL-2 基因为单拷贝基因,定位于第 4 号染色体长臂上 q26-28 处,由 4 个外显子和 3 个内含子组成,总长度为 5.1 ± 0.5 kb。第一个外显子含有 5' 端非编码的 47 bp 和编码 IL-2 最初 49 氨基酸残基的 147 bp,这 49 个氨基酸残基含有前 20 个氨基酸残基组成的信号肽。第二和第三个外显子分别含有 60 和 144 个核苷酸,编码 20 和 48 个氨基酸残基。第四个外显子含有编码最后 36 个氨基酸残基的 108 bp 和 3' 端非编码的 280 bp。三个内含子的长度分别为 91、2292 和 1364 bp。人 IL-2 基因编码 153 个氨基酸残基组成的 IL-2 前体多肽,在 IL-2 分泌成熟过程中,N 端的 20 个氨基酸残基的信号肽被切除,故成熟的人 IL-2 为 133 个氨基酸残基的多肽链。

将小鼠 IL-2 基因与人 IL-2 基因进行比较,发现两者具有高度同源性,在核苷酸水平,两者基因编码区有 70% 同源性,在 5' 端有 85% 同源性。小鼠 IL-2 基因也含有 3 个内含子,其大小和位置与人 IL-2 基因中的内含子相似。该基因编码一个 169 个氨基酸残基的多肽链,在分泌过程中,由 N 端 20 个氨基酸残基组成的信号肽被蛋白酶水解切除,故成熟的鼠 IL-2 为 149 个氨基酸残基的多肽链。另外,鼠 IL-2 cDNA 编码区有一段特别的序列,即由 12 个编码谷氨酰胺的 CAG 重复排列组成,而人 IL-2 cDNA 中无此序列,这一重复序列究竟有什么生物学意义尚不清楚。

三、IL-2 基因表达的调控

(一) DNA 水平的调控

正常人 T 淋巴细胞的 IL-2 基因只有在受到白细胞介素 1 (Interleukin-1, IL-1) 和特异性抗原或有丝分裂原的诱导后才得以表达、转录合成 IL-2 mRNA, 在无上述诱导剂作用时则不表达; 但某些细胞如感染 HTLV-II、HTLV-III 的 T 淋巴细胞即使未受到诱导剂作用也能自发合成 IL-2, 说明这些细胞中 IL-2 基因是持续性表达的; 也有一些细胞如感染 HTLV-I 的 T 淋巴细胞的 IL-2 基因不能表达, 即存在“闭锁”现象。对上述细胞的 IL-2 基因进行比较, 发现这些细胞中的 IL-2 基因均为单一拷贝, 且不存在重排和多态性。由此提示这些细胞 IL-2 基因表达不同可能与这些细胞 IL-2 基因的精细结构存在差异有关。

尽管对 IL-2 基因的结构和酶作用位点已有所研究, 但目前对 IL-2 基因的精细结构如操纵区尚不了解。根据上述不同细胞 IL-2 基因的表达存在差异的结果, Arya 等 (1987)^[9] 提出了一种正负双相调控学说 (见图 1-2), 他认为 IL-2 基因有两个功能相反的操纵区: 正相调节区 (增强子-启动子) 和负相调节区 (衰减子-阻遏子), 当诱导物 (Inducer) 与正相调节区相互作用后则启动转录、合成 mRNA; 当抑制物 (Suppressor) 与负相调节区相互作用后则阻止转录, 不合成 mRNA。如果正相调节区发生变异而成为持续性表达或者负相调节区发生变异而失去功能时, 则细胞能自发合成 IL-2, 但其正相调节区仍可与诱导物相互作用, 故仍能受诱导物作用而提高表达; 当正相调节区变异失去功能或负相调节区发生变异成为优势时, 则转录停止或闭锁。总之, 正相和负相调控之间相互平衡的结果决定着 IL-2 基因的表达程度。

(二) 转录水平的调控

转录水平的调控是 IL-2 基因表达的主要调控机制。1984 年, Efrat 等^[10] 用 PHA 刺激人扁桃腺淋巴细胞, 然后于不同时间从细胞中提取 mRNA, 将 mRNA 微量注射于非洲爪蟾的卵母细胞中, 检测细胞产生的 IL-2 活性, 结果发现, 用 PHA 诱导 4 小时后即出现 IL-2 mRNA, 随后 IL-2 mRNA 活性呈一 S 形曲线升高, 16 小时后 IL-2 mRNA 水平急剧下降, 如图 1-3A 所示。在诱导 4 小时后加入初始转录抑制物 DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuransylbenzimidazole), 发现直至诱导 22 小时后

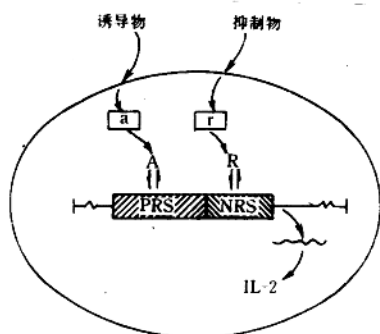


图 1-2 IL-2 基因表达的调节模式

PRS: 正相调节区; NRS: 负相调节区

仍无 mRNA 合成, 但当在诱导 20 小时后再加入 DRB 时, 则对 IL-2 mRNA 水平无明显影响, 证明在 IL-2 mRNA 水平下降过程中再无新的 mRNA 合成, 表明 IL-2 mRNA 水平下降是由于 mRNA 转录停止所致。根据上述结果推算, 人 IL-2 mRNA 的功能半衰期为 15~20 小时。图 1-3B 表明从 mRNA 水平推算的 IL-2 活性与实际在培养液中检测到的 IL-2 活性之间相关性极好, 也表明了图 1-3A 中所表示的确实是细胞内活性 IL-2 mRNA 的水平。

(三) 转录后水平的调控

图 1-4 表示了不同诱导条件下 IL-2 活性产生的动力学。从图中可以看出,在 PHA 诱导 4~20 小时之间加入亚胺环己胺(Cycloheximide, CHX, 可与 80 S 核糖体结合,阻止肽键形成,是一种专一的真核细胞蛋白质合成抑制剂), IL-2 的活性显著高于单用 PHA 诱导的 IL-2 活性,这种 CHX 对 IL-2 的超诱导作用表现在即使 IL-2 极早地诱导产生,也能使产生的 IL-2 活性显著提高 15 倍。但当在诱导 4~20 小时内加入 DRB 时,则 CHX 介导的 IL-2 超诱导作用被阻断,当 DRB 于诱导 48 小时后加入时,则不影响 CHX 的超诱导作用,表明 CHX 的超诱导作用仍依赖于新的转录。图 1-5 表示了 CHX 对活性 IL-2 mRNA 的超诱导现象,CHX 可使活性 IL-2 mRNA 水平显著升高,例如至诱导 20 小时时可升高 7.5 倍,至 48 小时时可升高 30 倍。在 CHX 加入 4 小时后就可使活性 IL-2 mRNA 水平增加 6 倍以上,表明 CHX 敏感的超诱导机制在诱导早期就已发挥作用,当诱导 18 小时后即活性 IL-2 mRNA 水平下降时再加入 CHX,仍可使活性 IL-2 mRNA 水平显著性急剧升高,但去除 CHX 后则活性 mRNA 合成迅速停止,水平逐渐下降。

Kaempfer 等(1987)^[1] 提出了蛋白抑制因子调控学说解释上述的 IL-2 和 IL-2 mRNA 的超诱导现象,他认为 IL-2 基因表达在一定的范围内受到某种蛋白抑制因子的控制,CHX 解除此蛋白抑制因子的作用后即可引起超诱导作用。由于超诱导作用在诱导早期就已很明显,说明蛋白抑制因子在 IL-2 基因表达开始后不久即发挥作用,即使在诱导晚期阶段加入 CHX 仍能使活性 IL-2 mRNA 显著增多,去除 CHX 后立即出现抑制作用,由此可见,IL-2 基因表达受到此蛋白抑制因子的严格调控。此外,某些通过不同的作用机制影响翻译过程而抑制蛋白质合成的药物如 T-2 毒素、稀疏霉素(Sparsomycin)、密旋霉素(Pactamycin)均能像 CHX 一样介导 IL-2、IL-2 mRNA 的超诱导现象,从而更加支持了 IL-2 基因受蛋白抑制因子调控的学说。

除了上述 CHX 敏感的 IL-2 基因表达调控机制外,还有一种 CHX 不敏感的即不依赖于蛋白合成的 IL-2 基因调控机制,此机制负责 IL-2 基因转录的关闭。

CHX 敏感的蛋白抑制因子的作用机理并不是通过抑制 IL-2 基因的初始转录过程,因为

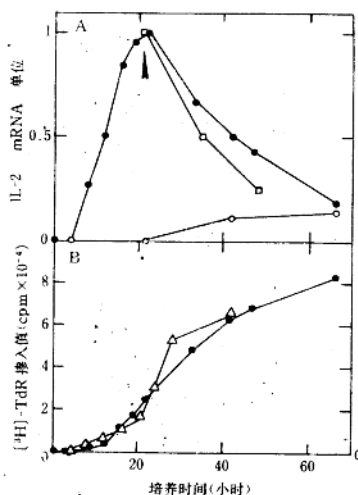


图 1-3 A: 用 PHA 刺激的人扁桃体淋巴细胞中 IL-2 mRNA 的形成动力学
 ● 正常诱导过程
 ○ 诱导 4 小时后加入 DRB (40 μ mol/L)
 □ 诱导 21 小时后加入 DRB (箭头指向)
 B: ● 根据 A 中 mRNA 水平推算的 IL-2 活性
 △ 实际检测到的 IL-2 活性