

细胞因子总论

1. 引言

在免疫系统中,各种免疫细胞均能合成和分泌小分子的多肽类因子,它们调节机体的免疫调节功能,参与免疫细胞的增殖,分化和行使功能,这些因子统称为细胞因子(cytokine)。细胞因子除存在于免疫系统外,在机体的各个系统也广泛存在,发挥极为重要的生理调节作用,某些情况下可产生病理作用。与免疫有关的细胞因子主要包括淋巴细胞产生的淋巴因子、单核巨噬细胞产生的单核因子、白细胞介素(interleukin,IL)、干扰素(interferon,IFN)、集落刺激因子(colony stimulating factor,CSF)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)、趋化因子(chemokine)、转化生长因子 β (transforming growth factor β ,TGF β)等,它们在免疫系统中起着非常重要的调控作用,在异常情况下也会导致免疫病理反应。

1.1 研究历史

1957年,Issacs等人发现病毒感染的细胞产生一种因子,可抵抗病毒的感染,干扰病毒的复制,因而命名为干扰素,这是发现第一个细胞因子。但以后很长时间内,对细胞因子的了解只限于发现一些细胞培养上清液具有各种生物学活性,例如,分裂素或抗原刺激的T淋巴细胞培养上清含有T细胞生长因子(T cell growth factor,TCGF)、B细胞生长因子(B cell growth factor,BCGF)、T细胞替代因子(T cell replacing factor)活性;脂多糖(LPS)刺激的单核巨噬细胞可产生淋巴细胞活化因子(lymphocyte activating factor,LAF)、肿瘤坏死因子活性等,这主要是由于这些细胞因子的含量非常低,并且多种细胞因子同时存在,纯化困难,因而限制了对其进行结构和功能的研究。70年代末以来,随着分子生物学技术的发展,为细胞因子的研究提供了新的契机,利用cDNA克隆化技术,一个又一个的细胞因子结构被阐明,利用外源基因表达技术,可获得大量的重组细胞因子纯品,使细胞因子的功能研究获得明确的结果。在短短的十几年时间内,细胞因子研究领域获得惊人的成果,分子克隆成功并阐明结构与功能的细胞因子已达数百种,有上百种重组细胞因子在进行临床研究,治疗肿瘤,感染,造血功能障碍等疾病,其中数十种细胞因子或其抑制剂已被批准做为药物正式上市,一些细胞因子基因治疗的研究也已进入临床。

1.2 命名

1.2.1 白细胞介素(IL)

在1979年第二届淋巴因子的国际会议上,将介导白细胞间相互作用的一些细胞因子命名为IL,并以阿拉伯数字排列,如IL-1、IL-2、IL-3。以后不断有新的IL被命名,迄今已被命名到IL-27。表1介绍了近2年发现的新白细胞介素,可以预期,新的IL还可能被不断发现。目前的研究发现,许多IL不仅介导白细胞相互作用,还参与其它细胞的相互作用,如造血干细胞、血管内皮细胞、纤维母细胞、神经细胞、成骨和破骨细胞等的相互作用,在机体的多系统中发挥作用。

表1: 新白细胞介素的结构与功能

名称	结构	功能
IL-19	成熟区153个氨基酸,与IL-10有同源性;染色体1q32	对抗原呈递细胞具有调节和促增殖效应。活化Stat3,受体为IL20R1/IL20R2
IL-20	成熟区164个氨基酸,与IL-10有同源性;染色体1q32	结合IL-20R1/IL-20R2,重组IL-20小鼠腹腔注射可明显刺激中性粒细胞的移动;参与上皮细胞发

		育, 活化角质细胞 Stat3, 与牛皮癣有关
IL-21	成熟区 131 个氨基酸, 与 IL-2、IL-4、IL-15 空间结构同源, 受体包括 IL2R γ 链; 染色体 4q26-q27	促进骨髓 NK 细胞的增殖与分化, 与抗 CD40 抗体协同刺激 B 细胞的增殖, 与抗 CD3 抗体协同刺激 T 细胞的增殖。
IL-22	成熟区 146 个氨基酸, 与 IL-10 有同源性; 染色体 12q15	活化多种细胞系的 STAT1, 3, 包括 TP-10 (肾癌细胞系) 和 SW480 (肠癌细胞系)。促进炎症时的急性期蛋白产生; 结合 IL22R/IL10R2 OR IL22BP
IL-23	与 IL-12 有同源性, 异源双聚体, α 链为 p19, 含 189 个氨基酸, 与 IL-12 p35 同源性; 染色体 12q13; 其 β 链为 IL-12 的 p40.	经 Stat4 活化 PHA 刺激的 T 细胞, 促进其增殖和 γ 干扰素产生, 并诱导记忆性 T 细胞的增殖。
IL-24	与 IL-10 有同源性, 206 个氨基酸; 染色体 1q32	结合 IL-22R1/IL-20R2 or IL-20R1/IL-20R2, 活化 Stat3 信号转导途径, 促进肿瘤细胞凋亡
IL-25	与 IL-17 有同源性, 含 161 个氨基酸; 14 号染色体	TH2 细胞产生, 刺激 TH2 细胞功能, 参与速发型变态反应; 支持淋巴样细胞增殖, 刺激 FDCP2 的增殖
IL-26/A K155	与 IL-10 有同源性, 全长 171 个氨基酸; 染色体 12q15	T 细胞产生
IL-27	与 IL-12 有同源性, 异源双聚体, α 链为 p28, 与 IL-12 p35 同源; 其 β 链为 EB13,Y 与 IL-12 的 p40 同源.	由抗原呈递细胞活化早期阶段产生, 促进 naive T 细胞增殖, 与 IL-12 协同刺激 T 细胞的 γ 干扰素产生

1. 2. 2 集落刺激因子(CSF)

在进行造血细胞的体外研究中,发现一些细胞因子可刺激不同的造血干细胞在半固体培养基中形成细胞集落,这类因子被命名为 CSF。根据它们的作用范围,分别命名为 G-CSF(粒细胞 CSF)、M-CSF(巨噬细胞 CSF)、GM-CSF(粒细胞和巨噬细胞 CSF)和多集落刺激因子(multi-CSF,又称 IL-3),不同的 CSF 对不同发育阶段的造血干细胞和祖细胞起促增殖分化的作用,是血细胞发生必不可少的刺激因子。从广义来说,凡是刺激造血细胞的细胞因子都可统称为 CSF,例如刺激红细胞的红细胞生成素(erythropoietin,Epo)、刺激造血干细胞的干细胞因子(stem cell factor,SCF)、刺激胚胎干细胞的白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor,LIF)、以及刺激血小板的血小板生成素(thrombopoietin)等均有集落刺激活性。另外,CSF 也可作用于多种成熟的细胞,促进其功能,具有多相性的作用。

1. 2. 3 干扰素(IFN)

IFN 是最先发现的细胞因子,早在 1957 年,Issacs 等人发现病毒感染的细胞产生一种因子,可抵抗病毒的感染,干扰病毒的复制,因而命名为干扰素。根据其来源和结构,可将 IFN 分为 IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ ,它们分别由白细胞、纤维母细胞和活化的 T 细胞产生。IFN- α 为多基因产物,有十余种不同的亚型,但它们的生物活性基本相同。IFN 除有抗病作用外,还有抗肿瘤、免疫调节、控制细胞增殖、及引起发热等作用。

1. 2. 4 肿瘤坏死因子(TNF)

TNF 是一类能直接造成肿瘤细胞死亡的细胞因子,可直接诱导肿瘤细胞的凋亡,根据其来源和结构分为两种,即 TNF- α 和 TNF- β ,前者由单核巨噬细胞产生,后者由活化的 T 细胞产生,又名淋巴毒素 α (lymphotoxin α , LT α)。最近还发现了 TNF 家族的一些新成员,包括 LT β 、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) 等。TNF 除有杀肿瘤作用外,还可引起发热和炎症反应,大剂量 TNF- α 可引起恶液质,呈进行性消瘦,因而 TNF- α 又称恶液质素 (cachectin)。

1. 2. 5 趋化因子

趋化因子是一组具有趋化作用的细胞因子,能吸引免疫细胞到免疫应答局部,参与免疫调节和免疫病理反应。它们多为小于 100 个氨基酸的小分子多肽,根据结构可主要分为 4 个趋化因子亚家族:Cys-X-Cys (CXC)、Cys-Cys (CC)、Cys (C)、Cys-X₃-Cys (CX₃C) 亚家族。CXC 家族成员多数基因定位于第 4 对染色体,包括 IL-8、IP-10 (IFN inducible protein-10)、MGSA 等,CC 家族成员多数基因定位于第 17 对染色体,包括 MIP-1 α , β (macrophage inflammatory protein)、MCP-1 (macrophage chemotactic protein)、RANTES (regulated upon activation、normal T expressed and secreted) 等。C 家族只有一个成员 Lymphotactin, 基因定位于 1 号染色体。CX₃C 家族也只有一个成员 Fractalkine (neurotactin), 基因定位于第 16 对染色体。

2. 来源

2. 1 正常细胞来源

细胞因子主要由活化的免疫细胞合成和分泌。免疫细胞遭遇外来抗原或病原体后,因受到刺激而被活化,从而产生多种细胞因子,激发体内一系列生物应答过程,促进免疫功能的行使,最终达到清除异物、维持自身稳定的目的。淋巴细胞是细胞因子的最重要的产生细胞,特别是辅助性 T 细胞 (TH), 它的许多重要功能是通过分泌细胞因子来完成的。近年来发现,根据产生的 IL 种类不同,可将 TH 细胞分为 TH1 和 TH2 两种亚类细胞,前者主要分泌 IL-2、干扰素 γ 、肿瘤坏死因子 β ,后者主要分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13 等。IL-12 和干扰素 γ 可诱导 TH1 细胞的产生,IL-4 和 IL-10 可诱导 TH2 细胞的产生。进一步的研究发现,TH1 细胞主要介导细胞免疫功能,TH2 细胞主要介导体液免疫功能,两者间有相互抑制作用和此消彼长的关系。有关 TH1 和 TH2 的调节关系的发现为免疫调节理论提供了新的观点。除淋巴细胞外,单核巨噬细胞也是一些细胞因子的重要来源,包括 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、干扰素、肿瘤坏死因子 α 、CSF 等,单核巨噬细胞通过分泌这些因子对机体免疫系统产生调节作用。一些非免疫细胞,如内皮细胞、上皮细胞、纤维母细胞、神经细胞亦可产生某些细胞因子。这表明体内有多系统在通过分泌细胞因子来调控免疫系统。

2. 2 肿瘤细胞来源

体外研究发现,一些肿瘤细胞可持续性产生某些细胞因子,例如, Jurkat 细胞株在体外分泌较大量的人 IL-2,骨髓瘤细胞在体内体外均可分泌较大量的 IL-6,由于 IL-6 同时为骨髓瘤细胞的生长因子,因而可产生自分泌的现象,造成骨髓瘤细胞的失控生长,是多发性骨髓瘤的重要发病机理之一。此外,一些白血病细胞亦可分泌 CSF,产生自分泌现象,对白血病发病起促进作用。

2. 3 重组细胞因子

为研究细胞因子的结构与功能,必须要有大量的细胞因子纯品。过去,只能通过免疫细胞或肿瘤细胞株体外培养,从培养上清液中获取微量的细胞因子制剂,不但纯度很难保证,而且价格昂贵。80 年代以来,随着基因工程技术的发展,细胞因子的研究也进入基因水平。现在可以利用大肠杆菌、酵母菌、昆虫细胞、哺乳动物细胞等工程细胞大规模生产重组的细胞因子纯品,其产量、纯度、成本等指标均优于天然来源的细胞因子。这不仅大大促进了细胞因

子的结构与功能研究,也促进了细胞因子作为生物应答调节剂治疗各种疾病的应用研究,为肿瘤、感染、造血障碍等疑难病症的治疗带来了新的希望。

3. 结构

绝大部分细胞因子为小分子的分泌型多肽,少数细胞因子能以膜结合的形式存在于细胞表面,如 TNF α 、LT β 、SCF 等。从肽链结构来看,多数细胞因子为单链结构,少部分细胞因子为同源双体结构,如 IL-5、IL-8、IL-10、M-CSF 等;此外,IL-12、IL-23、IL-27 等的结构比较特殊,为异源双体结构,两条肽链分别由不同的基因编码。从化学结构来看,绝大部分细胞因子为糖蛋白,含有不同程度的糖基侧链,但体内生物活性研究证明,多数细胞因子的糖基不影响发挥其功能,因而,大肠杆菌表达的重组细胞因子可取代天然来源的细胞因子用于结构和功能研究及临床应用。实验表明,细胞因子的糖基与它们的体内半衰期有较密切的关系。从一级结构来看,不同的细胞因子在氨基酸序列上有很大的差异,但它们的基因调控序列却有许多共同之处,这表明它们的基因表达受某些共同的因素调节。从染色体定位来看,一些细胞因子的基因是连锁的,如 IL-3、IL-4、IL-5、IL-9、IL-13、GM-CSF、M-CSF 等都位于第 5 对染色体长臂上,它们的缺失与某些白血病及造血功能不良有关。

细胞因子需与细胞表面的细胞因子受体相结合后才能发挥效应。近年来对细胞因子受体的研究越来越受到重视,大多数细胞因子受体基因已克隆化成功,对其结构和信号传递也已有初步的了解。细胞因子受体与其它膜表面受体一样,均由 3 个功能区组成,即膜外区(IL 结合区),跨膜区(疏水性氨基酸富有区)和膜内区(信号转导区)。细胞因子受体存在有单链,双链或三链不同形式的结构。最近的研究发现,一些细胞因子受体共同使用同一条多肽链,如 IL-3、IL-5 和 GM-CSF 共同使用同- β 链,IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15 等共同使用同一 IL-2 受体 γ 链;IL-6、IL-11、G-CSF、LIF、抑瘤素 M(oncostatin M)、睫状神经营养因子共同使用同一 gp130 蛋白(CD130)的受体链。

由于细胞因子在受体水平存在相似性,因而可能使用共同的信号转导途径,发挥类似的生物学效应。细胞因子通过其受体转导信号的过程是非常复杂的过程,多数细胞因子受体本身不包含内部的酪氨酸激酶活性,但与细胞因子结合后,首先引起的细胞内改变就是使多种细胞内蛋白包括细胞因子受体本身出现酪氨酸磷酸化。目前研究已发现有多种酪氨酸激酶参与细胞因子受体的信号转导,包括 Src 家族的 Lyn 和 Fyn, 非 Src 家族的 JAK1、JAK3、TYK2 等。JAK 激酶家族可进一步活化一些称为 STAT(signal transducers and activators of transcription)转录因子。STAT 蛋白以非活性形式存在于细胞浆内,一旦活化后出现酪氨酸磷酸化,即形成双体形式,进入核质,与 DNA 结合,起转录因子的作用。不同的 STAT 蛋白可参与不同细胞因子的信号转导,如 IFN α 活化 STAT1 和 STAT2;IL-3、IL-5 和 GM-CSF 活化 STAT5;IL-6 活化 STAT3 等。在核酸水平上,STAT 家族结合的 DNA 序列也已发现多与 GAS 序列有关,所谓 GAS 即 IFN γ 活化位点(gamma interferon activated site),为一种在 IFN γ 诱导基因启动子的调控元件。此外,在细胞因子受体信号转导中还涉及多种不同途径,其详尽机理尚有待进一步揭示。

根据细胞因子受体膜外区的氨基酸序列,可将其主要分为 5 个受体家族:

(一)造血生长因子受体家族(hematopoietic cytokine receptor,HPR)

大部分细胞因子如 IL-2、3、4、5、6、7、9、11、12、15、GM-CSF、Epo 等的受体均属于这一家族,其典型结构特点是含有 Trp-Ser-X-Trp-Ser(W-S-X-W-S)的五联保守序列,与细胞因子结合功能密切相关。

(二)Ig 超家族

IL-1 受体和 M-CSF 受体等属于这一家族,IL-6 受体同时含有 Ig 超家族和 HPR 家族两个

结构区。这一超家族的特点是均在膜外区含有 Ig 样的分子构型,每个 Ig 样功能区由 100 个左右的氨基酸组成,通过二硫键形成稳定的发夹样反平行的 β 片层折叠结构。

(三)TNF 受体家族

这类成员包括 Fas、CD40、NGFR (神经生长因子受体)、TNFRI (75KD,CD120a)、TNFRII (55KD,CD120b)等,它们均有 3-4 个由约 40 个氨基酸组成的 Cys 丰富区段,每一区段含 4-6 个 Cys,在 Fas 和 TNFRI 的膜内区存在有约 80 个氨基酸的死亡功能区(death domain),经活化后可转导凋亡信号,造成细胞的程序化死亡。

(四)干扰素受体家族

包括干扰素 α 和 β 受体、干扰素 γ 受体、IL-10 受体、IL-20 受体、IL-22 受体等,在它们的膜外区均有一段 200 个氨基酸组成的保守序列,含有 4 个 Cys。干扰素 α β 受体含 2 个这样的区域,而干扰素 γ 受体则只含 1 个这样的区域。

(五)趋化因子受体家族

大部分趋化因子结合的受体均属于 G 蛋白受体家族,其典型特征为具有 7 个穿膜区,胞内区有与 G 蛋白结合的结构,并在 C 末端含丝氨酸/苏氨酸,可产生磷酸化,参与信号转导。

4. 生物学活性

细胞因子具有非常广泛的生物学活性,包括促进靶细胞的增殖和分化,增强抗感染和细胞杀伤效应,促进或抑制其它细胞因子和膜表面分子的表达,促进炎症过程,影响细胞代谢等。细胞因子的这些作用具有多相性和网络性的特点,即每种细胞因子可与多种免疫细胞或非免疫细胞作用,每种免疫细胞可受多种细胞因子的调节,不同细胞因子之间具有相互协同或相互制约的作用,细胞因子本身受到体内多种因素的影响,由此构成了复杂的细胞因子免疫调节网络。

细胞因子在行使功能时具有高效性的特点,极微量(pmol)水平即可发挥生物学效应。细胞因子自其产生细胞分泌出来后,一般只作用于邻近的靶细胞,这种作用称为旁分泌(paracrine);或者作用于自身产生细胞,称之为自分泌(autocrine)。细胞因子的作用是一时性的,一般只在局部发挥作用,因此它与内分泌细胞产生的激素作用于远处靶细胞的方式是不相同的。不过,在临床上用重组细胞因子治疗疾病时,由于使用了药理剂量的细胞因子,它也可随血流分布全身,发挥药理学作用。归纳起来,细胞因子的生物学活性包括以下几方面:

4. 1.参与免疫应答

免疫细胞之间存在错综复杂的调节关系,细胞因子是传递这种调节信号的必不可少的信息分子。例如在 T-B 细胞之间,T 细胞产生 IL-2、4、5、6、10、13、干扰素 γ 等细胞因子刺激 B 细胞的分化,增殖和抗体产生;而 B 细胞又可产生 IL-12 调节 Th1 细胞活性和 CTL 活性。在单核巨噬细胞与淋巴细胞之间,前者产生 IL-1、6、8、10、干扰素 α 、TNF α 等细胞因子促进或抑制下 T、B、NK 细胞功能;而淋巴细胞又产生 IL-2、6、10、干扰素 γ 、GM-CSF、巨噬细胞移动抑制因子(MIF)等细胞因子调节单核巨噬细胞的功能。许多免疫细胞还可通过分泌细胞因子产生自身调节作用。例如 T 细胞产生的 IL-2 可刺激 T 细胞的 IL-2 受体表达和进一步的 IL-2 分泌,TH1 细胞通过产生干扰素 γ 抑制 TH2 细胞的细胞因子产生,而 TH2 细胞又通过 IL-10、IL-4 和 IL-13 抑制 TH1 细胞的细胞因子产生。通过研究细胞因子的免疫网络调节,可以更好地理解完整的免疫系统调节机理,并且有助于指导细胞因子做为生物应答调节剂(BRM)应用于临床治疗免疫性疾病。

在免疫细胞针对抗原(特别是细胞性抗原)行使免疫效应功能时,细胞因子是其中重要效应分子之一。例如 TNF α 和 TNF β 可直接造成肿瘤细胞的凋亡(apoptosis),使瘤细胞 DNA 断裂,细胞萎缩死亡;干扰素 α 、 β 、 γ 可干扰各种病毒在细胞内的复制,从而防止病毒扩散;LIF 可直接作用于某些髓性白血病细胞,使其分化为单核细胞,丧失恶性增殖特性。另有一些细胞

因子通过激活效应细胞而发挥其功能,如 IL-2 和 IL-12 刺激 NK 细胞与 CTL 的杀肿瘤活性等。与抗体和补体等其它免疫效应分子相比,细胞因子的免疫效应功能特点是作用强,持续时间短,在抗肿瘤,抗细胞内寄生感染,移植排斥等功能中起重要作用。

4. 2. 造血刺激功能

从多能造血干细胞到成熟免疫细胞的分化发育过程中,每一阶段都需要有细胞因子的参与,目前的研究表明,SCF 和 IL-3 是作用于最早阶段造血干细胞的细胞因子,GM-CSF 作用稍晚阶段的髓系造血祖细胞,G-CSF 作用于粒细胞系造血细胞,M-CSF 作用于单核系造血细胞,此外 Epo 作用于红系造血细胞,IL-7 作用于淋巴系造血细胞,TPO、IL-6、IL-11 作用于巨核系造血细胞,等等。由此构成了细胞因子对造血系统的庞大控制网络。某种细胞因子缺陷就可能引起相应血细胞的缺陷,如肾性贫血病人的发病就是肾脏产生 Epo 的缺陷所致,正因如此,应用 Epo 治疗这一疾病收到非常好的效果。目前多种刺激造血的细胞因子已成功地用于临床治疗血液病,有非常好的发展前景。

4. 3. 促进炎症反应

炎症是机体对外来刺激产生的一种病理反应过程,症状表现为局部的红肿热痛,病理检查可发现有大量炎症细胞如粒细胞,巨噬细胞的局部浸润和组织坏死,在这一过程中,一些细胞因子起到重要的促进作用,如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF α 等可促进炎症细胞的聚集,活化和炎症介质的释放,可直接刺激发热中枢引起全身发烧,IL-8 同时还可趋化中性粒细胞到炎症部位,加重炎症症状。在许多炎症性疾病中都可检测到上述细胞因子的水平升高。用某些细胞因子给动物注射,可直接诱导炎症现象,这些实验充分证明细胞因子在炎症过程的重要促进作用。基于上述理论研究结果,目前已开始利用细胞因子抑制剂治疗炎症性疾病,例如利用 IL-1 的受体拮抗剂(IL-1 receptor antagonist,IL-1ra)和抗 TNF α 抗体治疗类风湿关节炎等,已收到较好疗效。

4. 4. 其它

许多细胞因子除参与免疫系统的调节效应功能外,还参与非免疫系统的一些功能,例如 IL-8 具有促进新生血管形成的作用;M-CSF 可降低血胆固醇,IL-1 刺激破骨细胞,软骨细胞的生长;IL-6 促进肝细胞产生急性期蛋白等。这些作用为免疫系统与其它系统之间的相互调节提供了新的证据。

5. 细胞因子的临床意义

5. 1. 细胞因子与疾病的关系

正常情况下,细胞因子的表达和分泌受机体严格的调控,在病理状态下,细胞因子会出现异常性表达,表现为细胞因子及其受体的缺陷,细胞因子表达过高,以及可溶性细胞因子受体的水平增加等。

5. 1. 1 细胞因子及其受体的缺陷

包括先天性缺陷和继发性缺陷两种病理情况,例如一种先天性的性联重症联合免疫缺陷病人(XSCID),表现为体液免疫和细胞免疫的双重缺陷,一出生就必须在无菌罩中生活,往往在幼儿期因感染而夭折。现已发现这种患者的 IL-2 受体 γ 链缺陷,由此导致 IL-2、IL-4 和 IL-7 的功能障碍,使免疫功能严重受损。细胞因子的继发性缺陷往往发生在感染,肿瘤等疾病以后,如人类免疫缺陷病毒(HIV)感染并破坏 TH 后,可导致 TH 细胞产生的各种细胞因子缺陷,免疫功能全面下降,从而表现出继发性免疫缺陷综合症(AIDS)的一系列症状。

5. 1. 2 细胞因子表达过高

在炎症,自身免疫病,变态反应,休克等疾病时,某些细胞因子的表达量可成百上千倍的增加,例如类风湿关节炎的滑膜液中可发现 IL-1、IL-6、IL-8 水平明显高于正常人,而这些细胞因子均可促进炎症过程,使病情加重,应用细胞因子的抑制剂有可能治疗这类炎症性细胞因子

水平升高的疾病。

5. 1. 3 可溶性细胞因子受体水平升高

细胞膜表面的细胞因子受体可脱落下来,成为可溶性细胞因子受体,存在于体液和血清之中,在某些疾病条件下,可出现可溶性细胞因子受体的水平升高,这类分子可能结合细胞因子,使其不再与膜表面的细胞因子受体结合,因而封闭了细胞因子的功能。

5. 2. 细胞因子在疾病治疗的应用

目前,利用基因工程技术生产的重组细胞因子做为生物应答调节剂(BRM)治疗肿瘤,造血障碍,感染等疑难病症已收到了良好疗效,成为新一代的药物。重组细胞因子做为药物具有很多优越之处,例如细胞因子为人体自身成分,可调节机体的生理过程和提高免疫功能,在很低剂量即可发挥作用,因而疗效显著,副作用小,是一种全新的生物疗法,已成为某些疑难病症不可缺少的治疗手段。重组细胞因子的主要适应症包括肿瘤、感染(如肝炎,AIDS)、造血功能障碍、创伤、炎症等。表 2 介绍了目前已经被批准上市细胞因子药物。

表 2. 已批准上市的细胞因子基因工程药物

名称	适应症
IFN α	白血病、Kaposi 肉瘤、肝炎、癌症、AIDS
IFN γ	慢性肉芽肿、生殖器疣、过敏性皮炎、感染性疾病、类风湿关节炎
G-CSF	自身骨髓移植、化疗导致的粒细胞减少症、AIDS、白血病、再生障碍性贫血
GM-CSF	自身骨髓移植、化疗导致的血细胞减少症、AIDS、再生障碍性贫血、
Epo	慢性肾衰导致的贫血、癌症或癌症化疗导致的贫血、失血后贫血
IL-2	癌症、免疫缺陷、疫苗佐剂
IFN β	多发性硬化症
IL-11	放化疗所致血小板减少症
干 细 胞 因 子 (SCF)	与 G-CSF 联合应用于外周血干细胞移植
EGF	外用药治疗烧伤、溃疡
BFGF	外用药治疗烧伤、外周神经炎
PEG-IFN α	长半衰期的 IFN α
PEG-G-CSF	长半衰期的 G-CSF

此外,由于在病理情况下,一些细胞因子表达过高,导致炎症性的病理作用,因而细胞因子抑制剂用于治疗炎症、自身免疫病、移植排斥、休克等(表 3)

表 3. 进入临床实验的细胞因子抑制剂

名称	公司	适应症	临床阶段
可溶性 IL-1 受体 (干粉吸入剂)	Immunex	哮喘	I/II 期

可溶性 IL-1 受体 (注射剂)		急性髓样白血病	I 期
IL-1 受体拮抗剂	Ameigen	败血性休克(试验中止),类风湿关节炎	上市
可溶性 IL-4 受体	Immunex	哮喘	I/II 期
抗 IL-4 人源化抗体	SmithKline	哮喘	II 期
抗 IL-5 人源化抗体	SmithKline	哮喘	II 期
可溶性 TNF 受体 II-Fc 融合蛋白	Immunex	类风湿关节炎, 慢性心衰	上市, I 期
可溶性 TNF 受体 I-Fc 融合蛋白	Hoffmann-La Roch	休克,类风湿关节炎,多发性硬化症	II/III 期
抗 TNF α 单抗 (infliximab)	Centocor	Crohn's Disease	上市
TNF α 合成抑制肽 (RDP58)	SangStat Medical Co.	Crohn 's 病	II 期
人源化抗 HER2 (EGFR2)单抗	Genentech	乳腺癌转移	上市
DAB ₃₈₉ -IL-2 (IL-2 免疫毒素)	Seragen	T 细胞淋巴瘤 I 型糖尿病,严重类风湿关节炎,牛皮癣,HIV 感染	上市 I/II 期
DAB ₃₈₉ -EGF	Seragen	肿瘤	I/II 期
人源化抗 VEGF 单 抗	Genentech Inc.	晚期肺癌, 肠癌	III 期
抗 VEGFR2(KDR) 嵌合抗体	Albert LoBuglio	转移性肠癌	I 期
可溶性 VEGF 受体 (VEGF Trap)	Regeneron	实体瘤和非何淋巴瘤	I 期
人源化抗 IL-8 抗体 (ABX-IL8)	Abgenix	Severe psoriasis	I/II 期临床 II 期临床失败
人源化抗 EGF 抗 体 (ABX-EGF)	Abgenix	化疗失败的转移性肠癌 (2.5mg/kg weekly over an 8-week treatment cycle)	II 期临床
IL13-PE38QQR (IL-13 免疫毒素)	NeoPharm, Inc	肾癌	I 期临床
TNF α 反义寡核苷 酸	Isis	类风湿关节炎, 牛皮癣	II 期临床
抗 eotaxin 抗体 (CAT-213)	Cambridge Antibody	变态反应	I 期临床
抗 IL-15 人源抗体 (HuMax IL15)	Genmab	类风湿关节炎	I/II 期临床
抗 IL-2R (CD25) 人源化抗体 (Zenapax)	Protein Design Labs	慢性哮喘	II 期临床
TRAIL-R1 mAb	HGS	晚期癌症	I 期临床

I ¹³¹ 标记BlyS (LymphoRad)	HGS	多发性骨髓瘤	I 期临床
--	-----	--------	-------

5.3. 细胞因子的检测

细胞因子检测是判断机体免疫功能的一个重要指标,因而具有重要的实验室研究价值,同时还可能在临床上有多实用价值,包括许多疾病的诊断,病程观察,疗效判断及细胞因子治疗监测等,例如,在新生儿感染时,大量研究发现,IL-6 是最先出现的感染指标,甚至比常规的 C 反应蛋白指标还要提前,因而具有非常重要的早期诊断价值,有助于早期治疗和降低死亡率;再如,在类风湿关节炎时,通过检测细胞因子 TNF α 、IL-1 β 、IL-6 水平可观察抗风湿药物的客观疗效。但是,由于细胞因子在体内的含量甚微,给细胞因子的检测带来困难。目前细胞因子的主要检测方法包括:

5.3.1 依赖性细胞株

一些肿瘤细胞株必须依赖于细胞因子方能在体外增殖,如 CTLL 细胞株依赖 IL-2;FDC-PL 细胞株依赖于小鼠 IL-3;TF-1 细胞株依赖于人 IL-3 和人 GM-CSF,因而可利用这些依赖细胞株检测相应的细胞因子。这种方法敏感性高,但并非所有细胞因子都能找到相应的依赖株,而且多数依赖株的特异性不如免疫学技术,容易受干扰因素的影响,因而不宜于临床标本的检测,主要适用于重组细胞因子的质量控制。

5.3.2 功能检测

利用一些细胞因子的功能特性,可建立相应的活性测定方法,如干扰素的抑制病毒感染效应、肿瘤坏死因子对 L929 细胞的杀伤作用、趋化因子的趋化实验等。这样的方法敏感性高,但特异性较差,容易受一些干扰因素的影响。

5.3.3 免疫测定

利用抗原抗体反应的原理,制备出抗细胞因子的单克隆抗体或多克隆抗体,可进行细胞因子的免疫检测。这种方法的优点是特异性强,操作简便,缺点是灵敏度不够,且不能代表活性测定结果。从目前的国际发展趋势来看,已研制出了高灵敏度、高特异性、高度配套的细胞因子检测试剂盒,可测出 10pg/ml 水平的细胞因子,可满足临床检测的需要,因而其应用范围正在扩大,有非常良好的发展前景。此外,近年来新的细胞因子免疫检测的技术在不断建立,如细胞内细胞因子的荧光检测、酶联免疫斑点实验(ELISpot)等。

5.3.4 分子杂交试验

利用分子生物学技术,制备出细胞因子的基因探针,可通过分子杂交技术检测细胞内细胞因子 mRNA 的表达,这是一种高度敏感和高度特异的检测技术,目前在实验室研究中使用较广,其缺点是操作较为繁琐,测定结果只能代表细胞因子基因的表达,而不能代表活性细胞因子的水平。

5.3.5 RT-PCR 技术

PCR(polymerase chain reaction)技术是一种高效的基因体外扩大技术,目前 PCR 技术已用于细胞因子的检测中:首先将细胞因子产生细胞的 RNA 提取出来,再经逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板,在细胞因子特异性引物的引导下,即可进行 PCR 扩增。这种技术是迄今最敏感的细胞因子检测技术,操作也较简便,缺点与分子杂交实验类似,并且不容易对细胞因子表达水平进行定量。

(马大龙)

趋化因子研究进展

趋化因子 (chemokines, chemoattractant cytokines) 是能使细胞发生趋化运动的小分子细胞因子, 所谓趋化运动是指细胞向高浓度刺激物方向的定向运动。趋化因子结构和功能相似, 分子量多在 8-12KD 之间, 对嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞等多种细胞均有趋化作用。趋化因子受体是能够特异性结合趋化因子的细胞膜蛋白, 属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体超家族。近年来, 趋化因子及其受体的研究越来越受到重视, 已经证明它们在机体发挥重要的生理和病理效应, 在炎症、肿瘤、自身免疫病、变态反应、AIDS 等疾病中均有趋化因子及其受体的参与, 重组趋化因子、趋化因子及其抗体的拮抗剂已经进入临床研究, 成为新的生物治疗热点。

1. 趋化因子及其受体的命名

自从 1987 年第一个趋化因子 IL-8 被正式命名后, 在 10 多年的时间内, 近 50 种趋化因子得以发现, 成为目前最大的细胞因子亚家族。趋化因子分子量较小, 绝大多数趋化因子在氨基酸序列上都有 4 个保守的半胱氨酸, 根据前两个半胱氨酸的相对位置不同, 可以分为四大类: CXC 趋化因子 (α 趋化因子), 前两个半胱氨酸之间有一个非保守氨基酸相隔; CC 趋化因子 (β 趋化因子), 前两个半胱氨酸相邻; C 趋化因子 (γ 趋化因子), 只有第二和第四个半胱氨酸; CX₃C 趋化因子 (δ 趋化因子), 前两个半胱氨酸被其它 3 个非保守氨基酸隔开。早期发现的趋化因子多根据其来源、靶细胞、结构特征不同而命名, 不同实验室克隆的同一个趋化因子多有两个以上名称, 比较混乱。为了便于交流, 从 1999 年开始, 国际命名委员会在趋化因子的结构基础上, 对趋化因子及其受体进行了统一命名, 即用 CXCL_n、CCL_n、CX₃CL_n、XCL_n 分别代表 CXC、CC、CX₃C 和 C 家族的不同成员, 其中 L 为配体即 Ligand, n 为不同的数字。迄今发现的 CC 趋化因子为 CCL1-CCL28, CXC 趋化因子为 CXCL1-CXCL16, CX₃C 趋化因子目前只有 CX₃CL1 一个成员, C 趋化因子有 XCL1 和 XCL2 两个成员。与其他细胞因子相似, 趋化因子通过与相应的受体结合而发挥作用, 趋化因子受体的命名规则与趋化因子相似, 不同之处在于用 R 即受体 Receptor 代替 L。目前发现的 CC 趋化因子受体为 CCR1-CCR11, CXC 趋化因子受体为 CXCR1-CXCR6, CX₃C 和 C 趋化因子受体目前各只有一个成员, 分别为 CX₃CR1 和 XCR1 (1)。各趋化因子及其受体的名称、曾用名及其主要特点请参考北京大学人类疾病基因中心网站: <http://gene.bjmu.edu>。

2. 趋化因子的分类

2.1 根据蛋白质一级结构进行分类

2.1.1 CXCL

在 CXCL 家族趋化因子中, 前两个半胱氨酸被一个非固定氨基酸隔开, 根据该家族趋化因子第一个半胱氨酸前是否有 ELR (Glu-Leu-Arg, 谷氨酸-亮氨酸-精氨酸) 功能区, 可分为 ELR 趋化因子和非 ELR 趋化因子。ELR 趋化因子包括 CXCL8/IL-8、CXCL1, 2, 3/ GRO- α , β , γ 、CXCL5/ ENA-78、CXCL6/ MCP-1 和 CXCL7/ NAP-2, 绝大多数 ELR 趋化因子对嗜中性粒细胞有强烈的趋化活性, 但不能趋化单核细胞; 非 ELR 趋化因子包括 CXCL4/ PF4、CXCL10/ IP-10、CXCL9/MIG、CXCL12/ SDF, 这些趋化因子是淋巴细胞或造血细胞的高效趋化剂, 对嗜中性粒细胞没有趋化作用。实验证实: CXC 家族趋化因子参与血管形成, 其中绝大多数 ELR CXC 趋化因子能够直接趋化内皮细胞, 促进血管的生成; 而非 ELR CXC 趋化因子则对血管的生成起抑制作用 (2)。CXCL16 为 2001 年新克隆的趋化因子, 以膜结合形式表达于在抗原呈

递细胞表面,与CX3CL1相似,有穿膜区,在适当的外界条件下,可以分泌到细胞上清中(3)。大多数CXC家族趋化因子基因位于4号染色体q21上。

2. 1. 2 CC趋化因子

CC趋化因子的第一个和第二个半胱氨酸相邻,趋化谱较宽,对单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、T淋巴细胞、树突状细胞、自然杀伤细胞均有趋化作用,有些CC趋化因子对中性粒细胞也有一定的趋化作用(4)。多数CC趋化因子有4个保守的半胱氨酸,而CCL15/Lkn-1, CCL21/SLC/6CKine等是近年来发现的含有6个保守的半胱氨酸的CC家族趋化因子,该类因子除了原有的4个半胱氨酸外,在C末端又多了一对半胱氨酸。大多数CC趋化因子位于17号染色体, CCL17/TARC和CCL22/STCP-1基因位于16号染色体,与CX3CL1/Fractalkine连锁,说明它们可能在进化上与其它CC趋化因子的亲缘性较远(5)。

2. 1. 3 C趋化因子

目前发现的C家族趋化因子成员有XCL1/lymphotactin和XCL2/lymphotactin β 两种,它们只有趋化因子所具有的第二个和第四个半胱氨酸,对T淋巴细胞、B淋巴细胞和自然杀伤细胞有明显的趋化作用,其基因定位于1号染色体。

2. 1. 4 CX₃C趋化因子

CX3CL1/Fractalkine/neurotactin是人CX₃C家族趋化因子的唯一成员,属于膜结合型趋化因子。它的结构特殊,其cDNA编码397个氨基酸残基,包括信号肽(24个氨基酸),趋化因子功能区(37个氨基酸),17个粘蛋白样重复单位(241个氨基酸),穿膜区(19个氨基酸)和胞浆区(37个氨基酸)。膜结合型神经趋化素能趋化单核细胞和T淋巴细胞,但对中性粒细胞无趋化作用;体外表达的神经趋化素的趋化因子功能区在体内外均能趋化中性粒细胞。神经趋化素基因与CCL17/TARC和CCL22/STCP-1连锁,位于16号染色体。

2. 2 根据趋化因子的细胞来源分类

几乎所有的细胞在一定条件下,均可产生趋化因子,根据产生模式不同,趋化因子又可分为组成性表达趋化因子/淋巴组织趋化因子,和诱导性表达趋化因子/炎性趋化因子。

2. 2. 1 组成性表达趋化因子/淋巴组织趋化因子

胸腺、淋巴结和其他淋巴组织固有性高表达的趋化因子为组成性表达趋化因子,主要包括CXCL12/SDF-1、CCL25/TECK、CCL17/TARC、CCL21/SLC、CCL19/ELC、CCL22/STCP-1等,这些趋化因子主要在淋巴组织和淋巴器官中高表达,又称淋巴组织趋化因子,例如:CCL22/STCP-1由胸腺和淋巴管产生,CXCL12/SDF-1在胎肝和骨髓基质细胞中高表达,对T淋巴细胞、B淋巴细胞和树突状细胞的分化、发育、增殖和定位起重要的调控作用。

2. 2. 2 诱导性表达趋化因子/炎性趋化因子

是指在脂多糖等外源性和IL-1、TNF- α 等内源性炎性因子刺激下产生的趋化因子。绝大多数趋化因子均为诱导性表达,主要包括CXCL7/NAP-2、CXCL10/IP-10、CXCL6/GCP-2、CXCL8/IL-8、CCL2,8,7,13/MCP1,2,3,4、CCL11/Eotaxin等。这些趋化因子在炎症反应时高表达,又称炎性趋化因子。如单核吞噬细胞和内皮细胞在脂多糖或IL-1、TNF- α 的刺激下,可产生多种炎性趋化因子,有重要的防御功能,但当炎症反应过度时,会对自身的细胞产生破坏作用,导致自身免疫病的发生。

关于趋化因子的来源分类并不绝对,如CCL2/MCP1为诱导型表达趋化因子,但在某些肿

瘤中，却为组成性表达；CCL22/STCP-1 在淋巴组织中为组成性表达，但也可以诱导型方式表达。一些其他细胞因子如 IGF-1, HGF 等具有趋化活性，但其主要作用不是趋化作用，不列为趋化因子。

3. 趋化因子受体及信号传导

3.1 趋化因子受体及分类

与其它细胞因子相似，趋化因子通过与相应的受体结合而发挥作用。根据结合配体的不同，趋化因子受体可分为四类：CXC趋化因子受体（CXCR），CC趋化因子受体（CCR），CX₃C趋化因子受体（CX₃CR）及XC趋化因子受体（XCR）。趋化因子与受体结合，具有不同的特异性。根据结合配体的特异性不同，趋化因子受体可分为三类：特异性趋化因子受体，一种受体只能结合一种配体，例如CXCR4 仅能结合CXCL12/SDF-1；共享性趋化因子受体，一种受体能结合CC趋化因子家族或CXC家族中多个成员，但不能结合跨家族的趋化因子，大多数的趋化因子受体属于此类；杂合性趋化因子受体，即既能与CC家族趋化因子结合，也能与CXC家族趋化因子结合，DARC（Duffy血型抗原，红细胞趋化因子受体）是此家族的唯一成员，DARC是疟原虫的受体。

3.2 趋化因子受体的特点

趋化因子受体属于G蛋白偶联受体超家族（GPCRs, G-protein coupled receptors），胞内区与G蛋白偶联。G蛋白由 $\alpha\beta\gamma$ 三个亚单位组成， $\beta\gamma$ 亚单位通常形成紧密的二聚体，共同发挥作用。不同G蛋白结构上的差别，主要表现在 α 亚单位上， α 亚单位的多样性实现了G蛋白对多种功能的调节。不同的 α 亚单位都有GTP结合位点和GTP酶活性，当外环境中不存在趋化因子等激动剂时，G蛋白的三个亚单位呈聚合状态， α 亚单位与GDP结合，当趋化因子与受体结合时，GTP取代GDP，与 α 亚单位结合，同时形成游离的 $\beta\gamma$ 二聚体，分别活化下游效应物。

3.3 趋化因子的信号传导

尽管目前对趋化运动有了一定程度的了解，但细胞按浓度梯度向高浓度刺激物方向定向移动的精确机制尚不甚清楚。绝大多数趋化因子能够激活G蛋白敏感的磷脂酶C，导致3,4,5-三磷酸激醇的产生和胞内钙离子水平的提高。然而，在某些细胞的趋化运动中，并检测不到钙离子水平的提高，这提示可能有其它生化改变在趋化过程中起更为重要的作用。研究报导，有些趋化因子能够抑制腺苷酸环化酶，活化MEK和ERK-1/2, NF- κ B, 在有些趋化因子的活化过程中，发现STAT1, STAT3的转录水平明显升高。

趋化因子与受体结合后的信号转导途径以IL-8/CXCL8的研究最为深入，IL-8/CXCL8受体的 α 亚单位为百日咳毒素敏感的G α I（6）。当外环境中不存在IL-8时，G蛋白的三个亚单位呈聚合状态， α 亚单位与GDP结合；当IL-8与受体结合时，GTP取代GDP，与 α 亚单位结合，同时形成游离的 $\beta\gamma$ 二聚体， $\beta\gamma$ 二聚体活化两条主要信号传导途径中的酶：磷脂酶C β 2、 β 3（phospholipase C β 2 and β 3, PLC β 2 and 3）和肌醇磷脂-3激酶（phosphatidylinositol-3-OH kinases, PI-3K）。PLC活化后，水解细胞膜上磷酸肌醇酯，产生三磷酸肌醇（IP3）和甘油二酯（DAG），三磷酸肌醇促使胞内储存钙的释放，引起胞内钙离子浓度的快速升高，甘油二酯活化PKC。PI-3K活化后，快速产生大量的3,4,5三磷酸激醇，活化蛋白激酶B（protein kinase B, PKB）。近来研究表明： $\beta\gamma$ 亚单位二聚体还能导致MAP激酶的活化，具体机制尚在研究之中；而 α 亚单位的作用不仅是通过与GTP或GDP的结合调控 $\beta\gamma$ 亚单位二聚体而发挥间接作用，还能通过活化酪氨酸激酶而发挥作用。当GTP

水解后, $G\alpha GDP$ 与 $\beta\gamma$ 二聚体重新结合, 结束信号转导过程 (7)。

3.4 趋化因子受体表达谱

趋化因子受体有其相对特异的表达谱, 如 CXCR4 主要表达于单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞, CCR3 主要表达于嗜酸性粒细胞, DARC 只表达于红细胞表面。有些病毒也能编码趋化因子受体, CMV 病毒 US28 开放读码框架编码的趋化因子受体 (CMV CKR) 能与 MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 等多种 CC 趋化因子结合, 提示它们可能参与病毒逃避宿主免疫监督过程。此外, 绝大多数趋化因子富含碱性氨基酸, 可与细胞表面糖蛋白的硫酸肝素结合, 非特异性地结合到细胞表面。

4. 趋化因子的生物学活性

趋化因子通过与其受体结合而发挥作用, 趋化因子与受体的作用具有多样性, 绝大多数趋化因子都有一种以上受体, 而同一受体可识别多种配体, 一种细胞可产生多种趋化因子, 不同的细胞可表达相同的趋化因子或趋化因子受体。趋化因子及其受体的多样性决定了其生物活性的广泛性。

4.1 对粒细胞和单核吞噬细胞的作用

趋化因子与受体结合后, 数秒钟内即可观察到细胞形态的改变。细胞骨架结构发生改变, 伸出许多伪足, 便于细胞游走。趋化因子的作用导致整合素表达上调, 细胞活化, 白细胞在进入组织前粘附到血管内皮细胞。其他的快速变化还包括胞内钙离子水平升高, 超氧化物和生物活性脂的产生, 胞浆颗粒的释放。如嗜中性粒细胞和单核细胞, 释放蛋白酶; 嗜碱性粒细胞释放组织胺; 嗜酸性粒细胞释放细胞毒性蛋白等。中性粒细胞在机体发挥着重要的防御功能, 包括 IL-8/CXCL8、ENA-78/CXCL5 在内的多数 CXC 家族趋化因子不但能趋化中性粒细胞, 而且能活化中性粒细胞, 引起胞内钙离子浓度的增加, 细胞发生形态改变, 脱颗粒、呼吸爆发, 增强细胞粘附和杀伤病原体的能力。单核吞噬细胞在多细胞生物体内发挥防御功能, CC 家族趋化因子所有成员和 CX_3C 趋化因子均能趋化单核吞噬细胞, 其广泛的作用谱能保证机体在防御病毒细菌等病原生物感染及清除组织损伤产物时, 有足够的单核吞噬细胞集中到反应部位, 维持机体的稳定。

4.2 对淋巴细胞及免疫应答的作用

4.2.1 B 淋巴细胞

趋化因子及其受体在 B 淋巴细胞的分化、发育、定位中发挥着关键作用。胚胎期, B 淋巴细胞在肝脏中发育, 出生后迁移到骨髓。CXC 趋化因子 SDF-1/CXCL12 在胎肝和骨髓中高表达, 其受体 CXCR4 在造血祖细胞及 B 淋巴细胞前体细胞中高表达。CXCR4 或 SDF-1 基因敲除小鼠的 B 淋巴细胞发育严重受损, 骨髓的髓系造血功能几乎完全缺陷, 并有心脏发育异常。给 CXCR4 基因敲除小鼠输入正常功能和数量的 B 淋巴细胞前体细胞, 不能弥补由 CXCR4 基因缺陷所造成的异常, 因此, SDF-1/CXCL12 和 CXCR4 在 B 淋巴细胞发育中作用是不可替代的。

B 淋巴细胞在骨髓内发育成熟后, 未接受外来抗原的刺激, 为天然 B 淋巴细胞 (naïve B cells)。天然 B 淋巴细胞高表达 CXCR4 和 CCR7, 在 SDF-1/CXCL12、SLC/CCL21、ELC/CCL19 及其他分子作用下, 穿过高内皮静脉, 定位于淋巴结的滤泡状 B 淋巴细胞区。

4.2.2 T 淋巴细胞

T 淋巴细胞在胸腺内发育成熟, SDF-1/CXCL12 和 TECK/CCL25 能够调控 $CD4^+CD8^+$ 双阳性 T 淋巴细胞的发育, 但 SDF-1/CXCL12 和 CXCR4 基因敲除小鼠的 T 淋巴细胞发育正常, 可能因为

TECK/CCL25 在早期胸腺的发育中起更为重要的作用。在从CD4⁺CD8⁺双阳性T淋巴细胞向CD4⁺/CD8⁺单阳性T淋巴细胞的分化过程中, MDC/CCL22、SLC/CCL21、ELC/CCL19 发挥重要作用。这些趋化因子能趋化单阳性T淋巴细胞, 而对双阳T淋巴细胞不发生反应。

淋巴细胞在胸腺内经过阳性选择和阴性选择后, 发育成熟, 未受外来抗原刺激, 为天然 T 淋巴细胞(naïve T cells, T_n)。天然 T 淋巴细胞高表达 CXCR4 和 CCR7, 在 SDF-1/CXCL12 SLC/CCL21、ELC/CCL19 和其他分子的作用下, 穿过高内皮静脉, 定位于淋巴结的 T 淋巴细胞区, 与树突状细胞相互作用, 产生免疫应答, 天然 T 淋巴细胞活化。免疫应答局部细胞因子种类的不同, 决定了活化 T 淋巴细胞的极化方向。树突状细胞分泌的 IL-12 通过 CD40 促使活化 T 淋巴细胞向 Th1 细胞极化, 天然 T 淋巴细胞分泌的 IL-4 在树突细胞分泌的 IL-6 的作用下促使活化 T 淋巴细胞向 Th2 细胞极化。有些组织产生高水平的 TGF-β, 抑制活化 T 淋巴细胞向 Th2 细胞极化, 使活化的 T 淋巴细胞维持在半天然状态(a semi-naïve state, T_{sn})。极化的 T 淋巴细胞表达不同的趋化因子受体, Th1 细胞高表达 CXCR3、CCR1、CCR2 和 CCR5; Th2 细胞高表达 CCR3、CCR4 和 CCR2, 他们分别在不同的免疫应答过程中发挥作用。

4.2.3 树突状细胞(Dendritic cells, DC)

树突状细胞是一种强有力的抗原呈递细胞, 不成熟 DC 活动性很强, 能有效摄取和加工抗原, 定位于非淋巴组织。接触活性信号后 DC 成熟, 并进入淋巴组织, 趋化因子在 DC 的迁移和功能成熟过程中发挥重要作用。不成熟 DC 表达 CCR1、CCR2 和 CCR5 等多种炎性趋化因子受体, 在炎症反应时, 迅速聚集到炎症反应区域, 摄取抗原、活化并产生大量的趋化因子, 趋化更多的不成熟 DC 到反应部位。伴随大量趋化因子的产生, DC 下调非成熟阶段高表达的炎性趋化因子受体, CCR7 和 CXCR4 表达上调, 伴随功能成熟。淋巴管上皮细胞高表达 SLC/CCL21, 与 CCR7 结合, 成熟 DC 进入淋巴管, 在 ELC/CCL19 的作用下定位于 T 淋巴细胞区。

4.2.4. 免疫应答

在机体抵御外来异物入侵的过程中, 需要天然免疫应答和适应性免疫应答共同合作。趋化因子对于免疫细胞向感染部位的聚集是必不可少的, 对于天然免疫应答向获得性免疫应答的转变也是必须的。天然免疫刺激通过 TLRs 活化组织中常驻巨噬细胞和树突状细胞, 导致多种趋化因子的产生, 调控树突状细胞表面趋化因子受体的表达。

这些趋化因子和趋化因子受体表达水平的改变, 彼此相互协调, 使得负载抗原的树突状细胞从局部组织进入淋巴组织, 活化天然 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞, 启动适应性免疫应答。TLRs 活化后, 后续产生的趋化因子引导活化的 T 淋巴细胞回到外来抗原进入、启动天然免疫应答的组织中。

除此之外, 在再次免疫应答中, 抗原特异性应答产生的趋化因子使天然免疫细胞进入炎症部位, 通过天然免疫效应细胞进一步促进适应性免疫应答。因此, 趋化因子及其受体在协调天然性免疫应答和适应性免疫应答使其成为互不可分的一个整体的过程中发挥重要的作用(8)。

4.3 造血细胞

趋化因子对造血干/祖细胞的增殖和迁移发挥重要调控作用。人 MIP-1/CCL3、MCP-4/CCL13、TECK/CCL25 等 25 种趋化因子对髓系造血前体细胞有抑制作用, 但人 MIP-1/CCL3 与 GM-CSF 和 M-CSF 协同增加骨髓造血, 对早期增殖潜能较高的干/祖细胞起抑

制作用,而对相对成熟、增殖潜能低的造血干/祖细胞起促进作用或不起作用。SDF-1/CXCL12还能趋化造血前体细胞,促进B淋巴细胞前体细胞的发育,Eotaxin/CCL11和IL-5能促进嗜酸性粒细胞前体细胞的发育和成熟(9)。

5. 趋化因子的研究方法

5.1 趋化实验

趋化因子最基本的功能是引起特定细胞的趋化运动,但高剂量和低剂量趋化因子都没有促迁移作用,只有有一定剂量范围的趋化因子才有趋化作用。对其活性的检测可采用体内和体外两种方法。体内实验:将趋化因子注射到局部组织,观察注射部位炎细胞的浸润情况,但较繁琐;体外实验中最常用的方法是Boyden小室法:通常用48孔的趋化小室进行实验,该小室分为两层,上层放细胞,下层放待检测因子,两层之间有聚炭膜隔开,根据趋化细胞的种类不同,采用不同孔径的聚炭膜和趋化时间。一般嗜中性粒细胞选用3 μ m孔径膜,趋化反应进行30分钟;单核细胞和淋巴细胞选用5 μ m孔径膜,趋化90分钟;然后洗掉非特异结合细胞,固定染色,显微镜下观察。计数膜上或下层孔中的细胞数,通常在高倍镜下每孔随机选5个视野,计数,取平均值。趋化活性通常以趋化指数表示(chemotactic index, CI),趋化指数是指实验组细胞数与对照组细胞数的比值,一般比值在2以上有意义。

5.2 钙流实验

趋化因子与受体结合后可引起胞内钙离子水平快速升高,因此,可通过检测细胞内钙离子浓度的变化反映趋化因子的活性。将待检靶细胞与Indo-1 AM或Fura-2 AM等荧光探针孵育,它们是钙离子螯合剂EGTA的衍生物,对钙离子有较高的特异性亲和力,进入细胞内后与钙离子结合,通过荧光分光光度计,检测荧光强度的变化,间接反应胞内钙离子浓度的变化。

此外,还可用嗜中性粒细胞弹性蛋白酶,或葡萄糖醛酸酶释放检测和呼吸爆发实验,检测CXC趋化因子的活性;用骨髓造血干细胞集落形成实验检测MIP-1 α 和MIP-1 β 的活性;组织胺释放实验检测CC趋化因子的活性。

6. 趋化因子cDNA的克隆技术

早期的趋化因子的克隆多数是通过蛋白质到核酸这条传统途径进行的。即首先发现一种具有趋化活性的蛋白质,进行蛋白质序列测定,推测其可能的mRNA序列,设计寡核苷酸探针杂交筛选cDNA文库或基因组文库,获得编码区甚至全基因序列;或构建新蛋白产生细胞的表达文库,进行活性筛选得到克隆后,进行序列分析,得到新趋化因子的核苷酸序列和蛋白序列。但这些方法费时、耗力。随着基因克隆化技术的迅速发展和人类基因组计划的趋于完成,大量趋化因子得以从核酸到蛋白质途径发现。迄今已利用cDNA的大规模测序技术发现了许多趋化因子;通过减数杂交、差异显示等方法也可筛选到特异表达或高表达的趋化因子;另外,利用趋化因子之间有较高同源性这一特性,用已知趋化因子序列在Genbank的EST数据库中进行同源性比较和EST拼接(计算机克隆),是克隆新趋化因子的快捷方法。

综上所述,趋化因子的研究在近年有了重大发展,其功能已不仅限于趋化作用,而是在机体的各种生理和病理条件下均发挥重要作用,对其进行深入的结构与功能研究,将具有重要的理论意义和应用价值。

参考文献

- (1) Chemokines-linking receptors to response, Malcolm L. Wastson, Immunology

2002, 105 121-124

- (2) Alain P. Vicari, Christophe Caux Chemokines in cancer, Cytokine and Growth Factor Reviews 13 (2002) 143-154
- (3) Matloubian M, David A, Engel S, Cyster JG A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. Nat Immunol. 2000 Oct;1(4):298-304
- (4) Maureen N. Ajuebor and Mark G. Swain Role of chemokines and chemokine receptors in the gastrointestinal tract, Immunology 2002 105 137-143
- (5) 韩文玲, 马大龙 趋化因子及其受体, 免疫学新进展 297-326 人民卫生出版社 2002年1月。
- (6) M.Baggiolini Chemokines in pathology and medicine Journal of Internal Medicine 2001;250:91-104)
- (7) Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. Nature Immuno 2001;2:116-22
- (8) Andrew D Luster. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity Current Opinion in Immunology 2002, 14:129-135
- (9) Hal E. Broxmeyer Regulation of Hematopoiesis by Chemokine Family Members International Journal of HEMATOLOGY 2001,74:9-17

(韩文玲)

趋化因子与疾病

细胞因子是在免疫和炎症反应中起重要作用的小分子蛋白质，包括白细胞介素、肿瘤坏死因子、生长因子和趋化因子等。趋化因子是能使细胞发生趋化运动的一类细胞因子，其结构相似，绝大多数趋化因子含有 4 个保守的半胱氨酸，根据前两个半胱氨酸的相对位置不同，趋化因子可分为 CXC (α)、CC (β)、C (δ) 和 CX3C (γ) 4 个亚家族，C 代表半胱氨酸，X 代表任意氨基酸。趋化因子受体属于 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体超家族，分为 CXC 受体、CC 受体、C 受体和 CX3C 受体。趋化因子及其受体在炎症、肿瘤、自身免疫病、变态反应、AIDS 等过程中发挥重要作用，已有多种趋化因子相关产品进入临床研究，有望为肿瘤和某些炎性疾病的治疗提供新的思路和方法。

1. 趋化因子与肿瘤

趋化因子在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要而复杂的作用，有些趋化因子能促进肿瘤的增殖，促进血管形成，诱导肿瘤细胞移动和粘附内皮细胞，加速肿瘤的扩散和转移；有的趋化因子能抑制肿瘤细胞生长，抑制血管形成，激发机体特异性和非特异性免疫应答，抑制肿瘤的生长和转移。MCP-1 能趋化肿瘤细胞系 FABU，并能促进其增殖。IL-8 促进血管生成，为肿瘤的生长提供营养，并为血道转移提供可能。IP-10、PF4、MIG 能抑制血管生成，减少肿瘤组织的血液供应，抑制肿瘤生长。而转入 MCP-1 基因的 CHO 细胞在裸鼠体内不能形成肿瘤，未转基因的细胞则能形成肿瘤。IP-10、RANTES、TCA3 等能抑制肿瘤生长，并能对肿瘤的再次攻击产生免疫应答，肿瘤接种部位有大量的单核巨噬细胞和淋巴细胞浸润，说明它们的抗癌作用是由单核巨噬细胞和淋巴细胞的免疫作用介导的。

2. 趋化因子与哮喘

包括哮喘在内的过敏性疾病的一个重要特征是嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和淋巴细胞的浸润。早期研究发现，RANTES 和 MCP-3 趋化嗜酸性和嗜碱性粒细胞，释放组织胺和白三烯，在过敏性疾病中起重要作用。近来研究发现，Eotaxin 在哮喘的发病起关键性作用，Eotaxin 主要由气道上皮细胞产生，肥大细胞也可产生，它与 CCR3 特异结合后发挥作用。嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、肥大细胞和 Th2 细胞均表达较高水平的 CCR3，Eotaxin 趋化靶细胞到反应部位，并引起不同效应。首先，Eotaxin 可促进嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞脱颗粒，释放嗜酸性粒细胞氧化酶、组织胺、白三烯等炎性介质，导致黏膜水肿、分泌物增加等症状的出现；另外，Eotaxin 还能促进肥大细胞的前体细胞向肥大细胞分化。更为主要的是，Eotaxin 能促进肥大细胞的成熟，Th2 产生 IL-4、IL-5，进一步活化嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞等效应细胞，促进 IgE 的产生。Eotaxin 与 IL-5 协同刺激髓系前体细胞向嗜酸性粒细胞分化，在过敏反应发作时促进嗜酸性粒细胞从骨髓大量进入血液循环，导致嗜酸性粒细胞在局部的大量浸润，并出现嗜酸性粒细胞血症。Eotaxin 基因敲除小鼠或用抗 Eotaxin 的中和抗体进行治疗，能极大降低过敏反应时的症状和嗜酸性粒细胞血症。

3. 趋化因子受体与 HIV 感染

在 HIV-1 病毒感染机体的过程中，趋化因子受体起着不可缺少的作用。众所周知，CD4 分子是 HIV-1 病毒的主要受体，但表达人 CD4 分子的小鼠细胞并不感染 HIV-1 病毒，说明在 HIV-1 感染过程中，除 CD4 分子外，还需要其它分子的协同作用。研究发现，CCR5 和 CXCR4 (fusin) 等趋化因子受体可作为 HIV-1 病毒的共受体。

3.1 HIV-1 病毒的分类及感染过程

根据病毒感染靶细胞所需要的共受体的不同, HIV-1 病毒主要可分为三类, 以CCR5 为共受体的嗜巨噬细胞病毒(M-tropic virus); 以CXCR4 为共受体的嗜T淋巴细胞病毒(T-tropic virus); 既能以CCR5, 又能以CXCR4 为共受体的双嗜性病毒(Dual-tropic virus); 此外, 某些特殊的HIV毒株还可以CCR2、CCR3 作为感染的共受体。在HIV-1 感染机体的过程中, 可能有HIV-1 毒株的进化过程。HIV-1 血清阳性个体早期检出的是嗜巨噬细胞病毒, 后期在CD4⁺T 淋巴细胞数量大幅度下降, AIDS症状出现后, 血清中主要是嗜T淋巴细胞病毒, 感染过程中还有双嗜性HIV-1 病毒的存在。

CCR5: 与其他趋化因子受体相似, 有四个胞外区的七次跨膜蛋白, 一个氨基端结构域和三个胞外环状区。氨基端结构域和第二个胞外环状区, 是病毒感染的两个功能性结合域。其配体 RANTES、MIP-1 能够阻断嗜巨噬细胞病毒 HIV-1 的感染, CCR5 缺失突变(编码区缺失 32 个碱基, 引起移码突变, mRNA 翻译提前终止, 突变体缺少最后三个跨膜区, 成为无功能性共受体) 人群对嗜巨噬细胞 HIV-1 病毒有很强的抵抗性。

CXCR4 与 CCR5 不同, CXCR4 的氨基端结构域在 HIV-1 感染中的作用并不重要, CXCR4 的第一个和第二个胞外区, 尤其是第二个胞外区在 HIV-1 的感染过程中起关键作用, 该区域也是其配体 SDF-1 的结合区, 因此, SDF-1 可阻断 CXCR4 依赖性 HIV-1 病毒的感染。

双嗜性 HIV-1 病毒感染靶细胞时依赖 CCR5 的氨基端结构域和 CXCR4 的第一个、第二胞外区。嗜巨噬细胞 HIV-1 病毒在以 CCR5 为共受体时, 衣壳糖蛋白获得突变, 能够与 CXCR4 的胞外区相互作用, 但仍保留与 CCR5 氨基端结构域相互作用的能力, 成为双嗜性病毒; 随着作用时间的延长, 逐渐丧失了与 CCR5 相互作用的能力, 成为嗜 T 淋巴细胞性病毒。病毒的这种进化过程, 说明嗜 T 淋巴细胞 HIV-1 病毒是由嗜巨噬细胞 HIV-1 病毒进化而来的。

3.2 HIV-1 病毒感染的生物防治

HIV-1 病毒感染靶细胞时, 病毒糖蛋白 gp120 与 CD4 分子和共受体相互作用, 导致膜融合, 病毒进入细胞, 感染病毒的细胞在细胞膜表面表达 gp120 分子。基于此研究, 通过基因工程的方法使狂犬病病毒、滤泡状口腔炎病毒表达 CXCR4 和 CD4 分子而成为猎手病毒(hunter viruses), 它们与 HIV-1 病毒感染细胞表面的 gp120 结合, 快速复制, 特异杀伤病毒感染细胞。

趋化因子受体是 HIV-1 病毒感染的共受体, 因此, 可设计相应的拮抗剂来阻断病毒感染。首先是基于蛋白质水平的拮抗剂, 例如: 对 RANTES 的 N 末端进行修饰, 形成的 AOP-RANTES (aminooxypentane RANTES) 可强烈抑制 HIV-1 病毒的感染; 另外, Murarakami 设计了与 SDF-1 有相似结构的 18 个氨基酸残基的寡肽 T22, 作为 CXCR4 的拮抗剂; Doranz 则设计了富含 9 个精氨酸残基的寡肽 ALX40-4C, 这种强阳离子化合物可抑制嗜 T 淋巴细胞和双嗜病毒与带负电荷的 CXCR4 胞外区的接触。趋化因子与受体结合后, 能快速下调相应受体的表达, 这与其抗病毒作用有关。因此, 将 CXCR4 和 CCR5 滞留在内质网, 阻断其在细胞表面表达, 可抑制病毒感染; 另外, 也可将内质网的滞留序列(KDEL), 放在 MIP-1 及 RANTES 和 SDF-1 的 C 末端, 使其滞留在细胞内, 与新合成的 CCR5 或 CXCR4 结合, 形成细胞内复合物, 阻止其在细胞表面表达, 抑制病毒感染。趋化因子受体的表达、内化和再循环在 HIV 感染中发挥重要作用。AOP-RANTES 与 CCR5 结合后, 快速降低膜表面的受体, 并能抑制内化的 CCR5 再循环到细胞表面, 而天然 RANTES 没有这种抑制作用。

4 趋化因子与其它疾病

趋化因子与急、慢性炎症性疾病和自身免疫病密切相关。机体在病毒、细菌脂多糖等外源刺激或 IL-1、TNF、IFN 等内源刺激作用下产生大量的趋化因子, 趋化白细胞到炎性部位,

并活化白细胞，显然趋化因子和趋化因子受体在抵御病原体感染过程中发挥着关键作用。在细菌性上呼吸道感染中细菌刺激呼吸道上皮细胞产生 IL-8，IL-8 趋化嗜中性粒细胞并使之活化，清除细菌。在实验性 EAE、多发性硬化症和类风湿关节炎中都有 MCP-1 的产生。在动脉粥样硬化中，内皮细胞和平滑肌细胞产生 MCP-1，趋化中性粒细胞和单核细胞到反应局部，粘附内皮细胞导致局部损伤和动脉粥样硬化形成。

5 重组 MPIF-1 的临床应用

肿瘤化疗机制在于化疗药能够杀死生长较快的细胞，化疗药不能区分敌我，杀死肿瘤细胞的同时，也能杀死分裂增生活跃的正常细胞，如粘膜上皮细胞和造血干/祖细胞，出现一系列副作用。造血干/祖细胞数量和功能的正常对于各种血细胞的更新是必需的。化疗药杀死造血干/祖细胞，导致外周血中红细胞、血小板、单核细胞和各种粒细胞极大减少，出现骨髓抑制，这是化疗药普遍存在的副作用。如不能尽快恢复，患者会出现生命危险。

1996 年，美国 HGSI 公司通过大规模随机测序，在人类主动脉内皮细胞 cDNA 文库中，克隆到髓样造血祖细胞抑制因子 (MPIF-1) 的 cDNA 序列。对其编码蛋白质进行结构和功能分析表明，MPIF 与 MIP-1 α 有 51% 的同源性，除了具有趋化功能外，更重要的是 MPIF-1 对骨髓定向造血干细胞有强烈的抑制作用，因此将 MPIF-1 定义为一种新的 CC 家族趋化因子，基于 MPIF-1 的造血抑制活性，推测其可能具有造血保护作用。HGSI 的科学家们在对 23 种趋化因子和白细胞介素进行高通量的体内外研究后发现，在对肿瘤患者进行常规化疗时，MPIF-1 能够保护造血干/祖细胞免受化疗药物的毒性作用。目前，其作用机制还不清楚，可能是通过抑制造血干/祖细胞的增殖和分化而达到这一效果的。HGSI 公司对其进行了快速而高效的应用研究。临床前研究表明，MPIF-1 对造血干/祖细胞的抑制作用是可逆的，化疗结束后，MPIF-1 能促进白细胞和血小板数量及功能的恢复，利于患者康复。此项研究已进入 II 期临床。研究对象为接受固定化疗方案的乳腺癌和卵巢癌患者。最近根据美国人类基因组科学公司 (HGS) 宣布的消息，髓样造血抑制因子 (MPIF) 因临床疗效不理想，而终止作为单一制剂治疗造血功能障碍的临床实验。

6 重组 MIP-1 α 变异体的临床应用

MIP-1 α 是 CC 家族趋化因子，有骨髓抑制活性，在肿瘤化疗过程中，可保护造血干细胞免受化疗药物的影响。但 MIP-1 α 易于形成大分子量多聚体，给临床应用带来不便。通过基因工程的方法，将 26 位天门冬氨酸突变为丙氨酸，得到 MIP-1 α 的变异体 BB-10010。BB-10010 在生理条件下以单体形式存在，可溶性好，具有与 MIP-1 α 相同的功能，便于进行体内研究。动物实验表明，对正在接受细胞毒性药物化疗的小鼠，BB-10010 能阻断造血干细胞进入 S 期，使其维持在静止状态，减弱药物对造血功能的影响。在化疗后的恢复过程中，BB-10010 能增强造血干细胞的自我更新能力。目前，BB-10010 已进入 II 期临床研究，研究对象为接受标准 FAC 化疗方案的乳腺癌患者。结果发现，患者对 BB-10010 有很好的耐受性，BB-10010 本身虽然是一种造血抑制因子，但它并没有加重患者的骨髓抑制，经过 6 个疗程化疗后，接受 BB-10010 治疗的患者，外周血嗜中性粒细胞比对照组明显增多，骨髓粒单集落形成细胞的动员能力比对照组高 5 倍。虽然 BB-10010 的远期治疗效果正在研究之中，但趋化因子突变体无疑为肿瘤生物治疗提供了新的思路和方法。

7 抗 IL-8 抗体的临床应用

IL-8 是较早发现的CXC家族趋化因子, 能趋化嗜中性粒细胞、T淋巴细胞和嗜碱性粒细胞。在银屑病、风湿性关节炎等多种炎症性疾病中, IL-8 趋化嗜中性粒细胞等多种免疫细胞到病变部位, 促进这些细胞活化, 引起过度炎症反应。在银屑病患者中, 病变组织的IL-8 表达水平比正常组织高 150 倍。IL-8 的致病机理复杂: 它能趋化炎性细胞到病变部位并促进这些细胞活化; 是病变组织表皮细胞增殖的生长因子; 另外, IL-8 有强大的促血管生成作用, 为病变组织提供营养, 并引起局部炎症。在美国, 约有 400-500 万银屑病患者, 重症患者需全身应用免疫抑制剂, 有严重的毒副作用。如果能够阻断IL-8 的作用, 可起到治疗或缓解病情的作用。人源化的抗IL-8 单克隆抗体ABX-IL-8 在银屑病的应用研究中, 在对 33 位中度到重症银屑病患者中的I期临床研究中ABX-IL-8 取得了良好的效果, 已进入II期临床, 但是最近, 据Yahoo生物技术新闻报道, 美国Abgenix 公司开发的治疗银屑病抗白细胞介素-8 人源抗体药物ABX-IL8, 因IIb期临床实验效果不佳而终止开发。在风湿性关节炎中, ABX-IL-8 还在进行临床实验研究。

参考文献

1. Jose Carlos Gutierrez-Ramos, Clare Lloyd and Jose Angel Gonzalo. Eotaxin: from an eosinophilic chemokine to a major regulator of allergic reactions. *Immunology Today*, 1999, 20(11): 500-504
2. Richard Horuk. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunology Today*, 1999, 20(2): 89-94
3. Marshall A. HGS launches "first genomics product in clinic. *Nat Biotechnol*. 1998 Fed; 16(2) 129
4. Mark J. Clemons, Ernest Marshall, Jan Durig. A Randomized Phase II Study of BB-10010 (Macrophage Inflammatory Protein-1 α) in Patients With Advanced Breast Cancer Receiving 5-fluorouracil, Adriamycin, and Cyclophosphamide Chemotherapy. *Blood*, 1998, 92(5) 1532-1540
5. Nicholas W. Lukacs, Sandra H. P. Oliveira and Cory M. Hogaboam. Chemokines and asthma: redundancy of function or a coordinated effort? *J Clin Invest*, October 1999, Volume 104, Number 8, 995-999
6. Alain P. Vicari, Christophe Caux. Chemokines in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002 (13) 143-154
7. Thersa J. Reape, Pieter H. E. Groot. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999, (147) 213-225.
8. Mehrdad Matloubian, Anat David, A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nature Immunology* 2000, (1) 298 - 304

(王露)

一个新的多功能细胞因子—趋化素样因子(CKLF)

细胞因子是在免疫和炎症反应中起重要作用的小分子蛋白质,包括白细胞介素、肿瘤坏死因子、生长因子和趋化因子等。趋化因子是能使细胞发生趋化运动的一类细胞因子,其结构相似,绝大多数趋化因子含有4个保守的半胱氨酸,根据前两个半胱氨酸的相对位置不同,趋化因子可分为CXC(α)、CC(β)、C(δ)和CX3C(γ)4个亚家族,C代表半胱氨酸,X代表任意氨基酸。趋化因子受体属于7次跨膜的G蛋白偶联受体超家族,分为CXC受体、CC受体、C受体和CX3C受体。趋化因子及其受体在炎症、肿瘤、自身免疫病、变态反应、AIDS等过程中发挥重要作用,已有多种趋化因子相关产品进入临床研究,有望为肿瘤和某些炎性疾病的治疗提供新的思路和方法。目前,趋化因子研究已渗透到生命科学的各个领域,发现新的趋化因子并对其进行深入研究将具有重要的理论意义和应用价值。

随着现代分子生物学技术尤其是生物信息学技术的迅速发展,大量新的趋化因子得以发现。目前国际上克隆到的人类趋化因子约有50种,趋化因子受体已近20种。为了克隆新细胞因子,我们利用IL-10是一种广谱的细胞因子合成抑制剂的原理,推测被IL-10所抑制的分子很可能还有其它未被发现的新细胞因子,因而建立了一条新的技术路线:利用抑制性减数杂交技术(SSH),以PHA刺激的U937细胞为tester,以PHA刺激同时IL-10抑制的U937细胞为driver进行减数杂交,研究IL-10抑制的U937细胞表达基因,进行EST比较和拼接,得到的差异表达基因中可能有新的细胞因子候选基因^[1]。通过这一技术,我们首次成功克隆了一个新细胞因子,命名为趋化素样因子1(chemokine like factor-1, CKLF-1),并发现其至少存在其它3种不同的变异体,分别命名为CKLF-2, 3, 4^[2]。研究表明,CKLF1具有广谱的趋化活性、骨髓细胞增殖刺激活性;CKLF2能促进细胞增殖和分化,并有抑制凋亡作用。在CKLFs序列的基础上,利用生物信息学技术,从EST数据库成功克隆了至少4个与CKLF2有同源性而且在染色体上成基因簇形式存在的新基因趋化素样因子相关蛋白1-4(Chemokine-like factor related protein1-4, CKLF-RP1-4)。因此,CKLF代表一个有重要功能的新基因超家族^[3]。

CKLF1全长cDNA包括530个碱基,有一个编码99个氨基酸的完整开放读码框架。Northern blot分析发现,CKLF1约为0.6kb,其在PHA刺激的U937细胞中的表达可被IL-10部分抑制。CKLF-2, 3, 4分别编码152、67、和120个氨基酸,它们与CKLF1有相同的氨基端和羧基端。人类基因组数据库检索发现,CKLF基因位于16号染色体,由4个外显子和3个内含子组成,内含子和外显子交界处序列符合真核细胞剪接规律。CKLF1, 2, 3, 4有共同的外显子1和4,选择性拥有外显子2和3,这进一步证明它们为同一基因的不同剪接形式。CKLF1-4的表达谱较广,其中CKLF1, 2的表达水平较高,而CKLF3的表达水平最低。

CKLF1蛋白分子量为10.9KDa,是高度疏水的碱性蛋白质,有两个连续半胱氨酸的特征性结构,但计算机分析它与其它CC家族趋化因子之间没有明显同源性;手工排序发现,CKLF1与位于16号染色体上的CC家族趋化因子TARC和STCP-1在CC附近有数个关键的氨基酸相同。CKLF1蛋白没有N糖基化位点,SignalP分析发现其没有典型的信号肽切割位点。通过CKLFs亚细胞定位和Western blot分析发现,CKLF1, 3为分泌性蛋白,而CKLF2, 4则主要以膜结合形式存在。

为了研究CKLFs的生物学活性，我们构建了真核表达载体pcDI-CKLF1和pcDI-CKLF2，转染COS-7细胞，用微孔穿膜法对转染细胞上清进行趋化活性分析，发现CKLF1对中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞有明显的趋化活性。同时，将pcDI-CKLF1裸质粒注射到BALB/c小鼠肌肉中，研究其体内活性。注射质粒10天后，取注射部位肌肉组织，切片，染色。与空载体对照组相比，pcDI-CKLF1组小鼠肌肉切片中有明显的细胞浸润增多现象。特殊染色和形态学观察发现CKLF1在体内能够趋化嗜中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞，与体外趋化结果一致。CKLF1除了引起注射局部细胞浸润增多外，还引起骨骼肌细胞核居中排列等肌肉组织再生现象^[2]。此外，pcDI-CKLF1注射小鼠肺部炎症病变明显，支气管变形，管腔内有脱落的上皮和渗出物，肺组织充血水肿，炎细胞浸润，与哮喘发病后期的病理改变非常相似^[4]。CKLF-1转基因小鼠的肺部病变也非常明显，表现为肺组织内炎细胞聚集，肺泡隔增厚、充血、水肿，与注射CKLF-1真核表达质粒小鼠的肺部改变十分相似，而其它器官的改变不明显(待发表资料)。目前，尚没有发现其它单一因子能引起如此明显的病理改变，这提示CKLF-1在呼吸系统炎症性疾病的发病过程中可能起重要作用。将来利用CKLF-1的拮抗剂，有可能起到治疗作用。CKLF-1除了具有广谱的趋化活性外，还能够促进骨骼肌原代肌卫星细胞和造血干/祖细胞的增殖，促进人骨髓细胞集落形成^[5]。

CKLF-2是CKLF-1的全基因产物，其趋化作用很弱，但骨骼肌刺激活性较强。为研究其对骨骼肌细胞的作用，我们建立了稳定表达CKLF-2的小鼠肌母细胞系C2C12，发现其增殖明显加速，倍增时间缩短；CKLF-2除了具有促C2C12细胞增殖活性外，还能促进C2C12细胞分化，在高血清培养条件下，CKLF-2/C2C12细胞融合加速，肌管增多；同时，肌细胞分化的特异性分子肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)和生肌素(myogenin)的表达水平明显增加。CKLF-2的这种既能促进骨骼肌细胞增殖，又能促进其分化的作用，与胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor I, IGF-1)的作用类似。另外，CKLF-2还能促进3T3细胞增殖；拮抗撤血清引起的3T3细胞凋亡(待发表资料)。

根据人CKLFs的蛋白质和核酸序列，我们利用生物信息学技术成功克隆了大鼠的CKLF1, 2, 各编码98和151个氨基酸, 在GenBank中的登录号为AF253064和AF253065; 克隆了小鼠的CKLF2, 4, 各编码152和120个氨基酸, 在GenBank中的登录号为AY047360和AY046597。大鼠和小鼠CKLF2与人CKLF2在蛋白质水平上的同源性分别为62%和59%，这表明CKLFs在进化过程中比较活跃。大鼠CKLF1, 2和小鼠CKLF2, 4与人CKLFs的剪切形式完全相同，它们的特征性结构是CX3C，而不是CC；另外，人CKLFs的表达谱较广，而大鼠和小鼠的CKLFs则在睾丸组织中特异性高表达。目前研究发现，大鼠CKLF1与人CKLF1相似，对嗜中性粒细胞、淋巴细胞和单核细胞有明显的趋化活性，并且能与CCR4反应；而CKLF2的趋化活性不明显。小鼠CKLF2与人CKLF2相似，同样能促进C2C12细胞的增殖和分化。小鼠原代肌卫星细胞诱导分化后，mCKLF2的表达水平明显增高，其变化与肌细胞分化特异性分子肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)和肌酸激酶(myosin creatine kinase, MCK)的变化一致。这进一步证明CKLF2在骨骼肌的分化发育过程中起重要的作用^[7]。

综上所述,我们成功克隆了一个新的有重要功能的基因家族趋化素样因子超家族,其中,CKLF有四种变异体,CKLF1,3是分泌性蛋白质,CKLF2,4为膜蛋白。CKLF1具有连续两个半胱氨酸的特征性结构,定位于16号染色体,与TARC和STCP-1有低水平的同源性。在目前发现的所有CC家族趋化因子中,只有TARC和STCP-1定位于16号染色体上;重组CKLF1在体内外具有广谱的趋化活性,CKLF1能够与CCR4反应,而CCR4同时也是TARC和STCP-1的受体;FRN是目前发现的唯一一种CX3C趋化因子,也是膜结合型趋化因子,其基因与TARC

和 STCP-1 在 16 号染色体上紧密连锁, 而大鼠和小鼠 CKLFs 的特征性结构为 CX3C。这提示 CKLF 与 TARC、STCP-1 和 FRN 在进化上具有一定的相关性。CKLF2 能够促进细胞增殖、分化, 抑制细胞凋亡, 提示 CKLF 在机体的生理和病理作用中具有重要意义, CKLF-RP1-4 的成功克隆表明 CKLF 可能代表一个新的基因超家族, 对这个家族基因进行深入研究将具有重要的理论意义和潜在的应用价值。此外, 我们建立的克隆新细胞因子的技术路线可能对其它因子的发现具有借鉴意义。

参考文献:

1. 韩文玲, 李莹, 张颖妹, 马大龙等。利用抑制性减数杂交技术 (SSH) 研究 IL-10 抑制表达的新基因。中华微生物学和免疫学杂志 (2): 128-131.
2. Wenling Han, Yaxin Lou, Junmin Tang, et al: Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity. Biochem J. 2001, 357, 127-135
3. Wenling Han, Peiguo Ding, Mingxu Xu, et al. Cloning of CKLF-RP1-4, 4 novel members of CKLF family located as a cluster on chromosome 16. Hugo International Conference. 2002, Shanghai, P. R. China
4. Yaxia Tan, Dalong Ma, Wenling Han, et al, Chemokine-Like Factor 1, A Novel Human Cytokine, Contributes To The Airway Remodeling In Asthma The Asthma International Conference, 2001, Chicago, U. S. A.
5. 韩文玲, 芮珉, 陈英玉, 等。趋化素样因子 (CKLF1) 对骨髓细胞增殖活性的研究。中国医学科学院学报, 2001, 23(2):119-122
6. Donglan Xia, Yaxin Lou, Wenling Han, et al: Overexpression of Chemokine-like factor 2 promotes the proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells. Biochemical and Biophysical Acta, 2002, in press.
7. 夏东岚 陈英玉 韩文玲等。人趋化素样因子 2 (CKLF2) 对 BALB/C 3T3 细胞的促增殖和抗凋亡作用研究。中华微生物学和免疫学杂志, 待印刷。
8. Wenling Han, Donglan Xia, Yaxin Lou, et al. Stimulating effect of chemokine like factors (CKLFs) on skeletal muscle cells. Cell Biology International 2001(25), 1053-1054.

(韩文玲)

趋化因子生物活性的测定

1.基本原理:

趋化因子的趋化作用没有种属特异性,趋化因子的靶细胞主要有中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、树突状细胞和成纤维细胞等。(以 IL-8 为例)

IL-8 是典型的 CXC 家族趋化因子,对嗜中性粒细胞和 T 淋巴细胞有趋化作用。由于它的趋化作用没有种属特异性,因此,可以用豚鼠嗜中性粒细胞代替人嗜中性粒细胞对其进行活性检测。

趋化因子诱导的细胞移动方式有两类:

化学增活现象,指增强细胞的随机运动,琼脂糖小滴化学动力实验是检测这种活性的比较简易,快速,重复性好的方法。

趋化性,指诱导细胞向趋化因子化学浓度高的方向移动。琼脂糖中的趋化实验和微孔小室中的趋化实验则是常用的测定细胞因子趋化活性的方法。

微孔小室中的趋化实验:

微孔小室中的趋化实验是根据靶细胞(单核巨噬细胞,中性粒细胞或淋巴细胞等)能够趋化性主动迁移,穿过一定孔径的滤膜而设计的。滤膜将小室分隔成上下两部分。靶细胞在上面,趋化因子在下面,趋化因子通过滤膜形成梯度,细胞则沿着梯度穿过膜孔,黏附在膜的下面,染色并计数滤膜下表面的细胞数即可测出趋化因子的趋化能力。

趋化材料和趋化时间的选择:

趋化滤膜的材料和孔径需根据靶细胞的大小选择;中性粒细胞用 $3\mu\text{m}$ 孔径的 PVDF 聚碳酸膜 (Polycarbonate membranes),趋化时间为 30 分钟;单核细胞用 $8\mu\text{m}$ 孔径的 PVDF 聚碳酸膜,趋化时间为 90 分钟;粘附力弱的淋巴细胞则用下表面复以明胶或纤粘素的 $5\mu\text{m}$ 或 $8\mu\text{m}$ PVDF 聚碳酸膜,以免淋巴细胞穿过膜后落入下室,趋化时间为 180 分钟。

趋化因子浓度的确定:

由于趋化因子的特异活性非常高,某些趋化因子在较高浓度时促进细胞趋化的作用反而降低,所以待测样品常需连续稀释(5 倍或 10 倍系列稀释)以获得最适剂量的趋化结果。每次实验都需设好对照,因为不同来源或不同活力靶细胞的趋化能力差异很大。

趋化因子活性的表达方式有三种,其中最常用的是用趋化指数表示,趋化指数 (chemotactic index, CI) 是指细胞迁移到待测样品液的数目和迁移到对照液的数目的比值。

2.试剂和材料:

纯化的 IL-8

0.17% D(+)-糖原/生理盐水

17%D(+)-Glycogen

红细胞裂解液:

0.17M Tris 0.16M NH_4Cl

注射器,离心管,移液器,Tip 头
解剖器械(剪刀,镊子,止血钳)
趋化小室,趋化滤膜,细胞刮子
计数板,显微镜,玻璃片

将 10ml 0.17M Tris加至 90ml 0.16M NH₄Cl中，调至PH7.2
甲醇，Gimsa染色液 Hank's使用液 RPMI1640
豚鼠中性粒细胞

3.实验程序:

一. 豚鼠嗜中性粒细胞的制备:

- 1) 取成年豚鼠 1 只，腹腔注射含 0.17%糖原的生理盐水，13 小时后，用 PBS 缓冲液冲洗腹腔，收集腹腔液，1500rpm/min 10min,弃上清。
- 2) 轻轻弹起沉淀，用 3-5ml PH 7.2 的 37°C预温的 (Tris-NH₄CL) 红细胞溶解液，充分吹散，作用 3-5 分钟，立即加入 10-15ml serum-free RPMI1640,吹打均匀，1500rpm/min 5min,弃上清，再加入serum-free RPMI1640,离洗两次。得到豚鼠嗜中性粒细胞，纯度可达 97%以上。
- 3) 将纯化后的嗜中性粒细胞溶在serum-free RPMI 1640 中，细胞计数，调整细胞浓度为 5×10^5 /ml，备用。

二. 样品的准备:

- 1) 将纯化的IL-8 用PBS分别稀释为 1000ng/ml,100ng/ml,10ng/ml,1ng/ml,0.1ng/ml。同时用稀释IL-8 的PBS作阴性对照。(样品加入小室前最好放入室温平衡或 37°C培养箱中预温，以免加样时出气泡)。

三. 准备底层小室，加样:

- 1) 将趋化小室底层板放水平台上，NP 标记位于右下方。
- 2) 将稀释好后预温的样品加入孔中，使液面微微隆起，每孔 27μl，(国产板每孔 25μl)，每个样品 3 个复孔。为防止样品过度蒸发，整个加样过程应不超过 5 分钟。
- 3) 将适当孔径的滤膜取出，在滤膜的一角剪去 1mm 的小角，缺角对着 NP 标记，分别用镊子夹住滤膜两端，水平下降，中间部位最先接触小室液面，将膜平放在加完样的底层板上。
- 4) 铺上硅胶垫，装上上层板，硅胶垫的缺角及上层板的 NP 标记位于右下方。装上螺丝，拧紧装置。

四. 加入细胞:

- 1) 将已稀释好的细胞悬液加入上层小孔中，每孔 50μl，加样时微量加样器 Tip 贴着小孔壁，Tip 末端恰好位于滤膜稍上方垂直快速加样，避免孔底滞留气泡，(注意这一步加样过程中一定不要有气泡形成)。
- 2) 检查上层液体中是否有气泡，一个比较简便的方法是观察小孔凸的反射光，如果小孔上方有一个异常大的凸液面，通常表明有滞留气泡。解决的办法是用 Tip 将孔中的液体吸干净，重新加样。

五. 孵育:

将趋化小室放入 37°C 5%CO₂孵箱中，孵育 30 分钟。

六. 取出滤膜, 清洗, 染色:

- 1) 取出滤膜, 拧下螺帽, 将整个小室倒置, 托着上层板的四角, 将小室慢慢地水平放在纸巾上, 卸下层板。
- 2) 清洗, 迁移细胞现位于滤膜朝上的一面, 此面称为细胞面, 另一面为非细胞面, 用镊子夹起滤膜的一角, 然后用大塑料夹夹住滤膜这一端距边缘 1mm 的宽度, 拎起滤膜, 迅速用塑料夹夹住滤膜另一端。在盛有 PBS 缓冲液的平皿中沾湿非细胞面, 注意细胞面不要接触到 PBS。
- 3) 在细胞刮上刮去非细胞面上的细胞, 靠近大夹子处的滤膜先接触细胞刮, 在与细胞刮成 30 度角方向轻轻上拉, 该过程重复两次。
- 4) 固定, 小心将滤膜浸入甲醇中, 室温 3 分钟, 将滤膜取出, 用塑料夹夹住, 自然干燥。
- 5) 染色, 将固定后的滤膜在 Gimsa 染色液中染色 30 分钟, 自来水冲洗, 置于玻片上, 显微镜下观察。
- 6) 计数, 在高倍镜下, 每孔随机选取 5 个视野, 累积细胞数, 算出三个复孔的平均值。作为该稀释度的迁移细胞数。

IL-8 组趋化的细胞数与缓冲液对照组中趋化细胞数的比值即为趋化指数, 趋化指数大于 2 有意义。

七. 技术要点:

- 1) 分离纯化嗜中性粒细胞时, 要仔细认真, 保证细胞活力。
- 2) 每次做实验均要设阴性对照, 用真核细胞转染上清做趋化实验时, 要设空载体转染上清做阴性对照。
- 3) 向趋化小室下孔中加样品时, 上样量要适中, 使之能够形成稍微隆起的液面, 既能防止气泡形成, 又可以防止样品发生交叉污染。
- 4) 每个样品要做三个复孔。
- 5) 放膜时, 要对准位置, 否则, 过多调整位置时易发生样品间的交叉污染。
- 6) 洗膜时, 注意不要把细胞面与非细胞面弄反。
- 7) 不同趋化因子的趋化谱不同, 用不同细胞做趋化反应时, 应选用不同孔径的滤膜、不同的细胞浓度和不同的趋化时间。
- 8) 做实验前要把小室处理干净。

(张颖妹)