

人淋巴细胞中发现 2'-5'-三腺苷酸受体

尹桂山¹, 王桂香¹, 刘虹彬¹, 伦 怡², 孙兰英², 刘新垣²

(1. 河北医科大学 生化教研室, 中国河北 石家庄 050017;

2. 中国科学院 上海生物化学研究所, 中国上海 200031)

摘要: 通过合成的³H-PPPA2P5'A2P5'A(2'-5'P₃A₃)与人淋巴细胞进行结合反应, 结果表明: 人淋巴细胞质膜存在着2'-5'P₃A₃受体, 又通过用ATP、UTP与³H-2'-5'P₃A₃竞争抑制实验表明,³H-2'-5'P₃A₃与淋巴细胞膜受体的结合为特异性结合, 结合率受³H-2'-5'P₃A₃浓度、pH等因素影响。

关键词: 2'-5'-三腺苷酸(2'-5'P₃A₃); 淋巴细胞; 受体; 干扰素

中图分类号: Q73

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001)02-0130-03

Discovery of 2'-5'-Oligoadenylic Acid Receptor in Human Lymphocytes

YIN Gui-shan¹, WANG Gui-xiang¹, LIU Hong-bin¹,
LUN Yi², SUN Lan-ying², LIU Xin-yuan²

(1. Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China;

2. Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China)

Abstract: The existence of 2'-5' P₃A₃ receptor in human lymphocytes was found in the present experiment. ³H-2'-5' P₃A₃ was synthesized by poly(I) · poly(C) and interferon α 2b inducing the formation of 2'-5' oligoadenylic acid synthetase (2'-5' OASE) in rabbit peripheral blood mononuclear cells (PBMC) which catalyzed ³H-ATP as substrate. The result of competitive binding reaction of ³H-2'-5' P₃A₃ with ATP and UTP demonstrated that 2'-5' P₃A₃ binding to receptor of human lymphocytes had specificity and that the pH and the concentration of 2'-5' P₃A₃ affected the binding rate of ligand to receptor.

Key words: 2'-5' oligoadenylic acid; receptor; lymphocyte; interferon

(*Life Science Research*, 2001, 5(2): 130~132)

2'-5' P₃A₃ 是干扰素(IFN)作用于细胞后生成的一种以2'-5'磷酸二酯键连接的寡聚核苷酸, 由于它能介导和模仿IFN的作用成为研究IFN作用的关键物质。2'-5' P₃A₃通过何种机制表达IFN的作用, 成为人们研究的焦点。80年代中期, 李伯良、刘新垣发现, 大鼠巨噬细胞膜存在着2'-5' P₃A₃受体^[1], 并发现ATP对2'-5' P₃A₃与受体

的结合有拮抗作用^[2]。但2'-5' P₃A₃通过细胞膜受体发挥作用是普遍规律还是特定细胞的专一反应需要更多的实验证实, 另外, 人体细胞是否也和动物细胞一样具有2'-5' P₃A₃受体也是必须回答的问题。本研究以人的淋巴细胞为研究对象, 通过³H-2'-5' P₃A₃与它结合反应首次证实, 人的免疫细胞同样存在着2'-5' P₃A₃受体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

^3H -ATP (29.3Ci/mmol 为中国原子能科学 研究院产品, poly(I) · poly(C) 为天津生化制药 厂产品. 基因工程干扰素 $\alpha 2\text{b}$ 为上海华新生物高 新技术有限公司产品. PRM 1640 为 serva 产品. Percoll 为 phamacia 产品. DE-81 层析滤纸为 Whatman 产品. NP-49 为 pluka 产品. Ficoll-40 购自北京邦定生物医学公司. 动物为 2.5 kg 体重 的日本大耳白兔, 由华北制药集团提供.

1.2 方 法

1.2.1 $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 的合成 实验用 $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 的 合成法参照 poly(I) · poly(C) 诱导法^[3]进行. 简 要过程为: 将双链 poly(I) · poly(C) 1 mg 溶于生 理盐水后耳静脉注射入受试兔体内, 24 h 后再肌 肉注射 300 万单位基因工程 IFN $\alpha 2\text{b}$, 自注射 poly (I) · poly(C) 48 h 后, 股动脉取血, 用 1/10 血量 的 ACD 抗凝剂(含柠檬酸, 柠檬酸钠, 葡萄糖)抗 凝, 用 peroll 比重离心法分离出单核巨细胞 (PBMC), 再用 3 倍体积的 TBS 缓冲液(15 mmol/L tris-HCl, pH7.6, 126 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L MgCl₂, 0.05 mmol/L CaCl₂, 0.01% 葡萄糖)洗 PBMC 3 次, 最后将 PBMC 悬浮于 TBS 中制成 1:10 的细胞匀浆, 用 冯云峰等人^[3]的方法测 PBMC 匀浆中 $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 合成酶 ($2'-5' \text{OASE}$) 活性, 将含 $2'-5' \text{OASE}$ 的 PBMC 匀浆与含底物 ^3H -ATP 的反应体系(20 mmol HEPES, 50 mmol KCl, 8 mmol MgAc₂, 7 mmol/L β -ME, 6 mmol/L ^3H -ATP, 20% 甘油, pH7.2)在 37 °C 保温 2 h, 冷却停止. 用 DE-81 层 析纸, 以 0.25 mol/L NH₄HCO₃ 为展剂分离生成 的 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$, 在暗室中紫外投射仪上确定 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 斑点的位置, 剪下 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 斑点纸 区用 TBS 缓冲液将 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 溶出, 取一定量 的溶出液滴于微孔滤膜上, 70 °C 烘干后, 于液体 闪烁计数器上测放射强度(cpm 值), 以判定 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 的合成情况. 将 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 溶出液冷 冻干燥获得 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 干品, 备用.

1.2.2 淋巴细胞的分离 肘静脉取血 5 mL, 肝 素抗凝, 用生理盐水将血稀释 1 倍后于离心管中 用 Ficoll-400 淋巴细胞分离液 2 000 r/min 离心 分离出淋巴细胞.

1.2.3 淋巴细胞膜的制备 按黎荣松等人的方

法^[4]进行.

1.2.4 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓度对 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜 受体结合的影响 在固定膜浓度(每管 3 μg)条 件下(其它条件同文献[4]), 观察了 4.0, 6.0, 8. 0, 10.0, 12.0 mmol/L 五种不同 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓 度的结合率.

1.2.5 ATP、UTP 对 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结 合的影响 为了探讨结合的特异性, 在上述反应 体系中分别加入 1×10^{-7} mol/L 的 ATP 和 UTP, 观察它们对 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结合的影响, 其它条件同文献[4]和[5].

1.2.6 pH 值对 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结合的影 响 在总反应体积 0.1 mL 内含膜蛋白 3 μg , ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 8 mmol/L(其它条件同文献[4]), 观察 了 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 五种不同 pH 条件 下 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体的结合情况.

1.2.7 B/F 的分离与结合率的计算 反应到时 后, 加入冷的 PBS 终止反应. 于微孔滤膜上抽滤 将 B(^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ -膜受体结合复合物)与 F(未 与受体结合游离存在的 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$)分离. 滤膜 于 70 °C 烘干后放入 5 mL 闪烁液中, 在液体闪烁 计数器上测每分钟脉冲数(cpm).

$$\text{结合率} / \% = \frac{\text{各测定管 cpm} - \text{空白管 cpm}}{\text{总(B+F)cpm} - \text{空白管 cpm}} \times 100\%$$

2 结 果

2.1 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓度对结合率的影响(图 1)

由图 1 可见, 在 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓度较低时, 配 体-受体结合量随 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓度升高而增加, 但当 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 浓度达到 8 mmol 以上时, 结 合率基本上不再增加, 表明细胞表面受体全部被 配体占据, 结合达到饱和.

2.2 结合的特异性

在反应体系加入 ATP 和 UTP 后发现, ATP 对 ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与受体的结合有轻微抑制作用, 而 UTP 则对二者的结合几乎无影响(图 1). 结果 表明, ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与淋巴细胞表面受体的结合 是特异性结合.

2.3 pH 值对结合反应的影响

实验结果发现, ^3H - $2'-5' \text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体的结 合受 pH 值影响. pH 7.0 时结合率最高, 低于或 高于这一 pH 值结合率均下降(图 2).

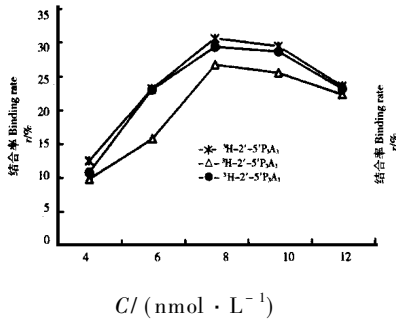


图1 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 浓度和 ATP、UTP 对 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结合的影响

Fig. 1 The effect of $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ concentration, ATP and UTP on binding of $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ to membrane receptor

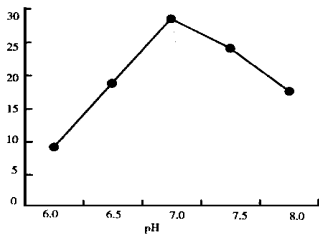


图2 pH 值对 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结合的影响

Fig. 2 pH effect on binding of $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ to membrane receptor

3 讨论

在了解了 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 能介导和模仿干扰素的作用之后,人们即开始研究 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 的作用机制。早期的方法是通过微注射或高渗等方法将 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 引入靶细胞之内,发现它在细胞内能模仿干扰素功能,即抗病毒、抗肿瘤以及免疫增强等作用。自 1985 年李伯良、刘新恒^[1]发现巨噬细胞膜表面存在 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 受体之后,人们对 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 作用有了新的认识,但要想全面、深入地了解 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 的作用途径和机制,仍需回答以下 3 个问题:1) $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 经膜受体发挥作用是否有普遍性,也就是其他细胞膜是否有 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 受体;2) 以往的研究均是以动物细胞为对象,而人的细胞,特别是人的免疫细胞是否也有 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 受体;3) $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 作用于膜受体之后如何将信息传递到细胞内。尹桂山等人研究了 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 作用于巨噬细胞膜受体之后细胞膜及细胞内发生的变化,发现 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 作用于膜受体之后,细胞膜腺苷酸环化酶(AC)活性增强^[6],细胞内 cAMP 和 cGMP 水平升高^[7,8]。这些研究结果提示,外源性 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 的作用可能与某些激素的作用模式相

同,即首先作用靶细胞膜特异的受体,之后引起细胞膜相关酶的活性改变,在经细胞内第二信使类物质(如 cAMP)的信息传递,经一系列生物化学变化而最终表现出抗病毒、抗肿瘤等生物作用。

本研究首次发现人的免疫细胞膜存在 $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 受体,并发现 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体的结合率受 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 浓度的影响,在低 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 浓度时,结合率随 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 浓度的增高而增高,但当 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 高至某一个限度时,其浓度再增高结合率也不再增加,表明二者的结合具有饱和性,这和酶与底物的结合以及底物对酶促反应速度的影响相类似。

本研究也发现,ATP 对 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体的结合具有竞争抑制作用,这与李世武、刘新垣的报道相一致^[2],说明 ATP 与 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 有共同的膜受体,或二者的受体结构相似,具有交叉反应。本实验还观察了 UTP 对 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 与膜受体结合的影响,结果未发现二者有竞争作用,表明 UTP 不同于 ATP,其受体与 $^3\text{H}-2-5\text{P}_3\text{A}_3$ 受体不同。

参考文献(References):

- [1] LI Bao-liang, LIU Xin-yuan. Mechanism of interferon action—structural requirement of ligand and cellular specificity of PPPA2 P5 A2 P5 A [J]. Scientia Sinica (series B), 1985, 28 (8): 844-853.
- [2] 李世武,刘新垣. 干扰素功能表达机理—ATP 对 PPPA2 P5 A2 P5 A 受体的拮抗作用[J]. 中国科学(B辑) (LI Shi-wu, LIU Xin-yuan. Mechanism of interferon action ATP against PPPA2 P5 A2 P5 A receptor [J]. Scientia Sinica (series B), 1987, (11): 1181-1187.
- [3] 冯云峰,杨开宇. 兔 $2-5$ 寡腺苷酸合成酶的诱导形成[J]. 生物化学与生物物理学报 (FENG Yun-feng, YANG Kai-yu. *In vivo* induction of rabbit $2-5$ -oligoadenylate synthetase [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica), 1997, 29(3): 235-242.
- [4] 黎荣松,姚曼华,刘新垣. 巨噬细胞膜上 PPPA2 P5 A2 P5 A 受体研究[J]. 生物化学与生物物理学报 (LI Rong-song, YAO Man-hua, LIU Xin-yuan. The study on PPPA2 P5 A2 P5 A receptor in macrophages membrane. Acta Biochimica et Biophysica), 1990, 22(5): 497-503.
- [5] 尹桂山,王桂香,刘静芳,等. $2-5$ -三腺苷酸对巨噬细胞膜腺苷酸环化酶活性的影响[J]. 生物化学杂志 (YIN Gui-shan, WANG Gui-xiang, LIU Jing-fang, et al. Study on the mechanism of interferon action: the effect of $2-5\text{P}_3\text{A}_3$ on the activities of AC and cAMP-PDE in macrophages [J]. Chinese Biochemical Journal), 1993, 9(1): 37-41.
- [6] YIN Gui-shan, DU Xiu-qian, WANG Gui-xiang, et al. Study on the mechanism of interferon action (11)—effect of PPPA2 P5 A2 P5 A on the level of cAMP and cGMP in macrophages [J]. Science in China (series B), 1989, 32(8): 970-975.