

补体系统的进化

Evolution of the complement system

王长法, 张士瑾, 王勇军

(中国海洋大学 海洋生命学院细胞工程室, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q952 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)08-0055-04

动物免疫由先天性免疫和获得性免疫系统组成^[1]。先天性免疫是机体先天就有的, 而且始终存在的防御机制, 它们的作用没有特异性。获得性免疫力不是天生就有的, 而是个体在发育过程中接触抗原后而逐步发展而来, 它对诱发的抗原具有特异性。它最早出现在有颌鱼类中。获得性免疫系统区别于先天性免疫系统的主要成分包括免疫球蛋白(Ig), 主要组织相容性蛋白(MHC-I, MHC-II)和T细胞表面抗原(TCR)。到目前为止这些物质成分在鲨鱼和高等脊椎动物中都有发现^[2]。相比之下, 在最原始的脊椎动物如七鳃鳗和无脊椎动物如海胆、海星、海鞘和文昌鱼中发现了组成补体系统的有关成分如C3和因子B, 同时还能检测出补体活性^[3], 因此从进化的角度看, 补体作为相对独立的先天性免疫防御机制, 至少已存在600~700万年, 远远地早于特异性免疫的出现, 表明补体系统在进化上起源较早^[4,5]。近10年来研究已经基本理清了补体种系进化的脉络, 补体系统作为先天性免疫系统的一部分, 是和先天性免疫系统一起起源进化的。补体系统最早出现在后口无脊椎动物中^[6,7]。但仍有许多重要的问题没有得到解答, 如补体最早出现在哪一种物种, 替代途径和凝集素途径哪一条出现在先, 等等。作者简述了缺乏获得性免疫系统无颌脊椎动物和后口无脊椎动物体内补体系统成分、结构和功能在近年来的研究进展。

1 补体概述

补体(Complement)是免疫学研究中最古老的领域之一。到了高等哺乳动物, 补体系统已进化成为一个由补体成分、血浆补体调节蛋白、膜补体调节蛋白及补体受体等30多种糖蛋白组成的, 有着精密调控机制的复杂的蛋白质反应系统。多种病原微生物及抗原抗体复合物等可通过经典途径、替代途径或称旁路途径和凝集素激活途径等3条既独立又交叉的途径激

活补体, 产生的活性物质引起调理吞噬、杀伤细胞、介导炎症、调节免疫应答和溶解清除免疫复合物等一系列重要的生物学效应^[1]。

最早发现的是由抗原-抗体复合物激活的, 从C1q-C1r2-C1s2开始的经典途径, 它的激活需要 Ca^{2+} , Mg^{2+} 参与; 可被角叉藻聚糖、L-赖氨酸抑制, 它的作用具有特异性; 后来发现了不依赖抗体的从C3开始的替代途径, 它的激活只需要 Mg^{2+} 参与, 可被酵母聚糖、脂多糖、菊粉、甲胺、胍及硫氰酸钾特异性抑制, 反应过程中还需要P、B和D因子; 直到1995年后才鉴定明确了通过甘露糖结合蛋白(mannose binding protein, MBP)糖基识别的凝集素激活途径, 它的激活只需要 Ca^{2+} , 后2种激活途径作用效应无特异性。上述3条途径还共享一条终末途径, 由对C5补体成分活化开始, 并进而完成C6-C9成分的活化连锁反应。

2 七鳃鳗、海鞘、海胆和文昌鱼体内的原始的补体系统

2.1 C3(补体成分三)

C3是补体系统的中心成分, 补体激活3条途径中都需要C3的参与。在动物的基因组中出现C3基因是证明出现补体系统的主要标志。构成无脊椎动物C3和脊椎动物C3核苷酸和氨基酸序列分析比较显示: 二者都具有激活蛋白水解酶的能力, 都有硫酯键和 β - α -作用位点(β - α -processing site)。C3a结构

收稿日期: 2003-03-13; 修回日期: 2003-05-18

作者简介: 王长法(1967-), 男, 江苏淮安人, 助理研究员, 博士, 主要从事鱼类、鸡、文昌鱼等动物体液免疫因子研究, 电话: 0532-2032439, E-mail: wcf1967@yahoo.com.cn

区在海鞘和海胆体内是变化的,从七鳃鳗开始一直到高等脊椎动物体内都是保守的,该结果表明:C3a片段中过敏毒素(anaphylatoxin)活性在脊椎动物体内才出现。

从获得的C3基因全序列进化分析可知:海鞘、文昌鱼和海胆体内的C3基因是由共同祖先C3/C4/C5基因直接进化而来^[8],然而在七鳃鳗体内的C3基因形成了类似于高等脊椎动物体内的C3基因簇^[5]。C3和C4、C5在结构上是同源的,都是由系统发生上共同祖先血清蛋白水解酶抑制因子- α_2 -巨球蛋白(α_2 -macroglobulin)进化而来^[8],它们都包含一个能和靶分子共价结合或作用的硫酯键位点。从原口动物(两侧对称的多细胞非后口动物)体内就发现存在 α_2 -巨球蛋白^[9]。 α_2 -巨球蛋白基因在线虫基因组中以单拷贝形式存在^[6],而在果蝇基因组却以多拷贝形式存在^[7]。在线虫和果蝇基因组内却无C3/C4/C5基因存在,在海胆^[10]、海鞘^[11]、文昌鱼^[12]、七鳃鳗^[5]体内发现存在单个的类似的C3/C4/C5基因,明显和 α_2 -巨球蛋白基因部分序列相似,显示:C3和补体系统只存在于后口动物。张士瑾等^[3]运用绵羊抗人C3抗血清通过免疫比浊法首次测定了文昌鱼体液中的C3浓度,同时还提出人的C3和文昌鱼体液C3具有部分抗原相似性。

2.2 因子B

哺乳动物补体系统的B因子是构成补体替代途径的必需成分,它与C3在结构和组成上有同源性。B因子是表面束缚分子,能保护C3b,也称C3保护活化因子;在 Mg^{2+} 存在时能与C3b或者C3(H₂O)成分结合为C3bB(在固相上)或者C3(H₂O)B(在液相中),同时B因子还是酶原,位于分子的C端肽段具有酶活性。在无颌类脊椎动物和无脊椎动物体内分离出B因子的cDNA显示出相关蛋白的结构区的变异性。例如七鳃鳗体内B因子和有颌类脊椎动物的B因子及C2具有同样的结构区域^[13],而海胆体内的B因子^[14]有两个额外的短序列重复结构(short consensus repeats, SCR),海鞘体内的B因子^[15]也有两个额外短序列重复结构区域,同时还具有3个低密度脂蛋白受体区域。在人的补体系统中,低密度脂蛋白区域只出现在补体末端成分和因子I之中。除此之外,构成海鞘体内的B因子的丝氨酸蛋白酶区是AGY-类型。

这表明:在补体系统进化的早期发生广泛的外显子基因漂移。海鞘和海胆体内的B因子存在额外重复区域,它具有什么功能还不清楚。在这些生物体内的B因子和C3一样,是高等脊椎动物B因子和C2的共同祖先的直接进化产物。在海胆和海鞘体内出现B因

子提供了强有力的证据证明在这些动物体内存在补体的替代激活途径,因为B因子能通过反馈环有效地和C3结合。张士瑾等^[3]运用标准的补体替代途径溶血活性测定方法检测了文昌鱼体液的溶血活性,首次提出文昌鱼体液中存在类似于哺乳动物的补体替代途径溶血活性。

2.3 凝集素激活途径相关丝氨酸蛋白酶-MASPs

MASPs意指与结合甘露糖的凝集素相关联的丝氨酸蛋白酶(mannan-binding lectin-associated serine protease)。在人类中至少存在4种蛋白质形式,分别为MASP-1^[16],MASP-2^[17],MASP-3^[18]和sMAP/Map19^[19,20],分别由两个基因发育而来。sMAP是由MASP-2截去C末端形成的。在鲤鱼中存在两种不同的C末端截去方式^[21]。所有的MASPs除sMAP外都是丝氨酸蛋白酶,MASP-2和MASP-3的丝氨酸蛋白酶区和C1r、C1s具有至少3个共同点。第一,在编码丝氨酸蛋白酶区的基因组内内含子缺失;第二,二硫键,又称为组氨酸环,缺失;第三,丝氨酸激活位点由AGY编码区编码(这里Y特指C或T),而不是由通常的TCN区编码(这里N特指A、G、C,或T)。而MASP-1却含有通常的丝氨酸蛋白酶区。MASP-1和MASP-3是由单一基因经不同裂解方式形成丝氨酸蛋白酶区,编码区有内含子的编码生成MASP-1,编码区内不含内含子的生成MASP-3^[18]。

七鳃鳗体内含有单个MASP基因,它含有AGY-类型的丝氨酸蛋白酶区;而海鞘体内MASP基因却含有TCN-类型的丝氨酸蛋白酶区^[22]。从七鳃鳗和海鞘体内能分离出MASP表明凝集素途径是比较古老的补体激活途径。从低等脊椎动物的基因组分析来看,七鳃鳗、鲨鱼和鲤鱼的MASPs似乎都是MASP-3类型^[23]。怎样从低等生物的一种MASP进化成为哺乳动物的4种MASP?目前人们认为:第一,原始的MASP-1基因通过插入一个活化的缺失内含子的丝氨酸蛋白酶区而突变成MASP-1/MASP-3基因;第二,此基因通过基因复制形成MASP-2基因;第三,MASP-2基因经进一步的复制形成C1r和C1s基因。至于进化的什么阶段发生基因复制目前还不清楚。

2.4 甘露糖结合凝集素(Mannan-binding lectin, MBL)

甘露糖结合蛋白也称为甘露糖结合凝集素(MBL),从海鞘中已分离出MBL^[24]。该蛋白是由43 ku的单体组成的多聚体形式存在。在脊椎动物的血

清中,主要以三聚体和四聚体的形式存在,每个亚单位有3条链,其结构类似于C1q分子。该蛋白N端(氨基端)的氨基酸序列结构和胶原(collagen)相似。通过对MBL一级结构分析,特别是多糖识别区域的研究表明:在海鞘体内存在多个凝集素补体途径所需成分的基因。人们进而推论补体系统的激活存在第三条途径——凝集素激活途径,它的出现早于有抗体参与的补体激活的经典途径^[17]。

3 补体功能

对低等动物补体系统功能方面的研究存在着许多困难,比如成分的不相容性。因而有关其补体系统功能方面研究报道较少。七鳃鳗血清中的C3是七鳃鳗体内的吞噬细胞吞噬兔红细胞的基本因子,但C3却和血清天然溶解兔红细胞的溶血活性无关^[25]。海鞘体内的C3具有调理活性,它能增强海鞘体腔血细胞对外界颗粒的吞噬作用。海鞘的体腔液也能增强体腔血细胞对酵母细胞的吞噬作用,但用抗海鞘C3的抗体对海鞘体腔液进行预处理后,体液的这种作用消失^[11]。Nonaka等近来从海鞘中得到整合素(integrin) α -和 β -亚单位的cDNA克隆。用抗整合素 α -亚单位的抗体处理能抑制C3处理后导致的体腔细胞吞噬作用的增强^[26],表明这些亚单位是构成C3受体的有关成分。调理活性也是哺乳动物补体系统一个很重要的功能,然而哺乳动物的补体系统还具有其它功能如导致溶膜复合物的形成,急性炎症的诱导和对获得性免疫力的调控。在无颌类的后口动物中由于缺乏获得性免疫,因而肯定缺乏对获得性免疫能力的调控作用。但形成溶膜复合物、诱导急性炎症这二种功能应该具备。在头索动物文昌鱼体内已发现存在C6样的基因,该基因功能与形成溶膜复合物相关^[12]。

4 基因复制

基因复制在补体系统的进化过程中起着非常重要的作用。在脊椎动物进化过程中整个基因组发生复制人们普遍认为共发生2次^[27]。由于构成经典途径的成分和构成替代途径、凝集素途径的成分是是一一对应的:例如C1q与MBL;C1r和C1s与MASP-1和MASP-2;C2与Bf;C4与C3^[28]。因而人们认为补体的经典途径是由补体替代途径和凝集素途径经基因组广泛复制后进化而来。补体系统基因复制可能是彼此独立的事件。也有可能由于整个基因组的广泛复制或多倍化导致补体系统部分基因同时发生复制。

近年来从海胆中克隆到C3和B因子样的基因,从尾索动物体内分离出C3,MBP和MASPs分子,证明

补体作为一种相对独立的先天性免疫防御机制,早在无脊椎动物体内就已存在。并且提示最早进化出现的补体是旁路途径和凝集素途径,但二者之中谁是最早出现者,尚无定论。无脊椎动物补体系统仅有少数几个成分,包括C3、D因子、B因子、MASP和MBP,没有终末补体成分和C1分子。说明其有限的功能仅能涉及补体的调理作用和吞噬作用。在以后的进化过程中,经基因复制、外显子移位,加上或缺失一些其他蛋白的结构模块,形成新的补体成分,最终形成补体分子结构和功能方面的多样性和复杂性。

在补体系统进化过程中到了有颌脊椎动物时基因发生复制,从 α_2 -巨球蛋白基因特化出C3, C4, C5三个基因^[29]。现在还有待搞清楚的是基因复制的时间是在软骨鱼类出现之前发生还是在软骨鱼类出现之后才发生。

5 结语

脊椎动物中的溶胞体系是补体系统,但在无脊椎动物中的原口动物和后口动物已发现有类补体因子或补体C3b受体蛋白,然而还没有充分的证据表明这些类补体因子就是脊椎动物补体的祖先。在棘皮动物中已证明带有C3b受体的吞噬细胞以及一些类似于补体特征的体液溶胞系统。由此推测补体活化的替代途径可能在比较高等的无脊椎动物中已经产生了。

推测补体替换途径在高等无脊椎动物中出现的另一事实是抗体最早产生于低等脊椎动物,而补体活化的替换途径不需要抗体的介入,所以从进化上看补体活化的替换途径是最早出现的补体活化途径。补体活化的经典途径一定是在抗体出现以后,因为它需要抗原与抗体复合物启动活化的识别成分C1q,而在进化上介于两条途径之间的可能是凝集素途径。进一步研究可能说明在补体进化过程中凝集素途径或替代途径谁是最早出现者。

参考文献:

- [1] 于善谦,王洪海,朱乃硕,等. 免疫学导论[M]. 北京:高等教育出版社,1999. 68-87.
- [2] Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, et al. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system [J]. *Trends Genet*, 1997, 13: 90-92.
- [3] Zhang S C, Wang C F, Wang Y J, et al. Presence and characterization of complement-like activity in the amphioxus *Branchiostoma belcheri tsingtauense* [J]. *Zoological Science*, 2003, 20: 1207-1214.

- [4] Smith L C, Azumi K, Nonaka M. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 42: 107 – 120.
- [5] Nonaka M, Takahashi M. Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey, Implication for the evolution of thioester containing proteins [J]. *J Immunol*, 1992, 148: 3290 – 3295.
- [6] The C. Elegans sequencing consortium: Genome sequence of the nematode *C. elegans* a platform for investigating biology [J]. *Science*, 1998, 282: 2012 – 2018.
- [7] Adams M D, Celniker S E, Holt R A, *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster* [J]. *Science*, 2000, 287: 2 185 – 2 195.
- [8] Sottrup-Jensen L, Stepanik T M, Klistensen T, *et al.* Common evolutionary origin of α_2 -macroglobulin and complement components C3 and C4 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 9 – 13.
- [9] Iwaki D, Kawabata S, Miura Y, *et al.* Molecular cloning of limulus alpha - 2-macroglobulin [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 242: 822 – 831.
- [10] Al-Sharif W Z, Sunyer J O, Lambris J D, *et al.* Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 [J]. *J Immunol*, 1998, 160: 2 983 – 2 997.
- [11] Nonaka M, Azumi K, Ji X, *et al.* Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* [J]. *J Immunol*, 1999, 162: 387 – 391.
- [12] Suzuki M M, Satoh N, Nonaka M. C6-Like and C3-Like molecules from the Cephalochordate, amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates [J]. *J Mol Evol*, 2002, 54: 671 – 679.
- [13] Nonaka M, Takahashi M, Sasaki M. Molecular cloning of a lamprey homologue of the mammalian MHC class III gene, complement factor B [J]. *J Immunol*, 1994, 152: 2 263 – 2 269.
- [14] Smith L C, Shih C S, Dachsenhausen S G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system [J]. *J Immunol*, 1998, 161: 6 784 – 6 793.
- [15] Ji X, Namikawa-Yamada C, Nakanishi M, *et al.* Molecular cloning of complement factor B from a solitary ascidian: unique combination of domains implicating ancient exon shufflings [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49: 43 – 43.
- [16] Sato T, Endo Y, Matsushita M, *et al.* Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose – binding protein [J]. *Int Immunol*, 1994, 6: 665 – 669.
- [17] Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover C M, *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement [J]. *Nature*, 1997, 386: 506-510.
- [18] Dahl M R, Thiel S, Willis A C, *et al.* Mannan-binding lectin associated serine protease 3 (MASP-3) -A new component of the lectin pathway of complement activation [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49: 79 – 79.
- [19] Takahashi M, Endo Y, Fujita T, *et al.* A truncated form of mannose-binding lectin associated serine protease (MASP) -2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway [J]. *Int Immunol*, 1994, 11: 859 – 863.
- [20] Stover C M, Thiel S, Lynch N J, *et al.* The rat and mouse homologues of MASP-2 and MAP-19 components of the lectin activation pathway of complement [J]. *J Immunol*, 1999, 163: 6 848 – 6 859.
- [21] Endo Y, Takahashi M, Nakao M, *et al.* Two lineages of mannose-binding lectin associated serine protease (MASP) in vertebrates [J]. *J Immunol*, 1998, 161: 4 924 – 4 930.
- [22] Ji X, Azumi K, Sasaki M, *et al.* Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan-binding protein-associated serine protease from a urochordate: the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 6 340 – 6 345.
- [23] Nagai T, Mutsuro J, Kimura M, *et al.* A novel truncated isoform of the mannose-binding lectin associated serine protease (MASP) from the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Immunogenetics*, 2000, 51: 193 – 200.
- [24] Nair S V, Pearce S, Green P L, *et al.* A collectin-like protein from tunicates [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2000, 125: 279 – 289.
- [25] Nonaka M, Fuji T, Kaidoh T, *et al.* Purification of a lamprey complement protein homologous to the third component of the mammalian complement system [J]. *J Immunol*, 1984, 133: 3242 – 3249.
- [26] Miyazawa S, Nonaka M. Cloning and characterization of ascidian integrin subunits that function as a complement receptor type 3 [J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49: 3 – 3.
- [27] Ohno S. Evolution by gene duplication [M]. New York: Springer-Verlag, 1970.
- [28] Nonaka M, Kuroda N, Naruse K, *et al.* Molecular genetics of the complement C3 convertases in lower vertebrates [J]. *Immunol Rev*, 1998, 166: 59 – 65.
- [29] Volanakis J E. Overview of the complement system [A]. Volanakis J E, Frank M M. In the human complement system in health and disease [C]. New York: Marcel Dekker, Inc, 1998. 9 – 32.

(本文编辑:刘珊珊)