

人白细胞介素-36 $\alpha$ 蛋白的二级结构及其 B 细胞抗原表位的预测

陈少英, 郑 坚, 牛青霞

(汕头大学医学院炎症与免疫性疾病研究所, 广东 汕头 515041)

**【摘要】** 目的 预测并分析人白细胞介素-36 $\alpha$ 蛋白的二级结构及其潜在的 B 细胞抗原表位。方法 以人 IL-36 $\alpha$ 蛋白的氨基酸序列为基础, 采用生物信息软件和互联网服务器预测人 IL-36 $\alpha$ 蛋白的二级结构及其亲水性、可及性和柔韧性, 根据预测结果综合分析 IL-36 $\alpha$ 蛋白可能的 B 细胞抗原表位。结果 IL-36 $\alpha$ 蛋白潜在的 B 细胞抗原表位位于 N 端 8~12、33~38、111~116 和 143~149 氨基酸区段。结论 预测了 IL-36 $\alpha$ 蛋白的二级结构和 B 细胞抗原表位, 为进一步研究 IL-36 $\alpha$ 的生物学活性部位及利用合成肽制备抗 IL-36 $\alpha$ 的多克隆抗体提供了理论依据。

**【关键词】** 白细胞介素-36 $\alpha$ ; 生物信息学; 二级结构; 表位

**【中图分类号】** R392.11 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)08-1097-03

**Prediction of the secondary structure and B-cell epitopes of human interleukin-36  $\alpha$ .** CHEN Shao-ying, ZHENG Jian, NIU Qing-xia. Institute of Inflammation and Immune Diseases, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To predict the secondary structure and B-cell epitopes of human interleukin (IL)-36 $\alpha$ . **Methods** Based on the IL-36 $\alpha$  amino acid sequence, the secondary structure, hydrophilicity, flexibility and accessibility indexes of human IL-36 $\alpha$  were analyzed with bioinformatics tool and network servers. Combined the results according to these methods, the B-cell epitopes of IL-36 $\alpha$  were predicted. **Results** The predicted B-cell epitopes of human interleukin-36 $\alpha$  were probably located in or adjacent to 8~12, 33~38, 111~116 and 143~149 aa in the N-terminal. **Conclusion** The secondary structure and B-cell epitopes predicted provide the basis for estimating the activity sites and developing antibodies against human IL-36 $\alpha$ .

**【Key words】** Interleukin-36 $\alpha$ ; Bioinformatics; Secondary structure; Epitope

白细胞介素-1 家族(Interleukin-1 family, IL-1F)的细胞因子与急性、慢性炎症有关, 在天然免疫应答中发挥重要的作用。IL-1 家族由 11 个成员组成, 即 IL-1F1~IL-1F11, 其中 IL-1F5、IL-1F6、IL-1F8、IL-1F9、IL-1F10 和 IF11 是通过分析序列同源性、蛋白质的三维结构、基因位点和受体结合特征发现并鉴定的细胞因子<sup>[1-2]</sup>, 2010 年上述细胞因子被重新命名为 IL-36Ra、IL-36 $\alpha$ 、IL-36 $\beta$ 、IL-36 $\gamma$ 、IL-38 和 IL-33<sup>[3]</sup>。

IL-36 $\alpha$ (曾被命名为 IL-1F6)主要表达于皮肤和上皮组织, 在免疫和炎症反应中发挥重要的作用。气道上皮细胞表达 IL-36 $\alpha$ , 炎症刺激可增加气道上皮细胞 IL-36 $\alpha$ mRNA 的表达。Ramadas 等<sup>[4]</sup>的研究显示 IL-36 $\alpha$ 刺激 CD<sub>11c</sub><sup>+</sup>细胞表达中性粒细胞特异性趋化因子 CXCL1、CXCL2 和 TNF $\alpha$ , 增加 CD40 的表达, 增强 CD<sub>11c</sub><sup>+</sup>细胞诱导 T 细胞增殖的能力。IL-36 $\alpha$ 还可诱导 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T 分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-17<sup>[5]</sup>。体内实验显示, 支气管灌注重组小鼠 IL-36 $\alpha$ 后, 可以引起野生型

C57BL/6 小鼠和 IL-1 $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>小鼠肺部中性粒细胞浸润和肺部中性粒细胞特异性趋化因子 mRNA 表达的增加。最近的研究显示, 肿瘤内 IL-36 $\alpha$ 表达减少与肝癌患者的不良预后有关, 提示 IL-36 $\alpha$ 有可能成为肝癌患者预后的一个 Marker<sup>[6]</sup>。本文以 IL-36 $\alpha$ 的氨基酸序列为基础, 利用生物信息学方法, 预测 IL-36 $\alpha$ 蛋白的二级结构和 B 细胞抗原表位, 为抗 IL-36 $\alpha$ 抗体制备及结构与功能研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 IL-36 $\alpha$ 的氨基酸序列 IL-36 $\alpha$ 的氨基酸序列来自 NCBI 提供的蛋白数据库(ACCESSION: NP\_055255), 见图 1。

```
1 MEKALKIDTPQQGSIQDINHQQGSIQDINHIAVPRKDMSPVTIALISCRHVETLEKDRG
61 NPIYLGLNGLNCLMCAKVGDPQPTQLKEKDMDLYNQPEPVKSFLFYHSQSGRNSTFES
121 VAFPGWFLAVSSEGGCPILTQELGKANTTDFGLTMLF
```

图 1 IL-36 $\alpha$ 的氨基酸序列

1.2 人 IL-36 $\alpha$  二级结构的预测 采用 SOPMA 计算工具分析 IL-36 $\alpha$  蛋白的二级结构<sup>[7]</sup>。

1.3 人 IL-36 $\alpha$  B 细胞抗原表位的预测 以 7 个氨基酸残基为一组,分别按 Hopp & Woods 亲水性方案<sup>[8]</sup>、Emini 可及性方案<sup>[9]</sup>和 Bhaskaran-Ponnuswamy 柔韧性方案<sup>[10]</sup>进行单参数预测。综合各分析方法,取各参数预测结果的重叠区域,即为可能的 B 细胞抗原表位。

### 2 结果

2.1 人 IL-36 $\alpha$  二级结构分析结果 采用 SOPMA 服务器预测的 IL-36 $\alpha$  二级结构见图 2。结果显示:IL-36 $\alpha$  的二级结构由  $\alpha$ -螺旋(15.19%)、 $\beta$ -折叠(35.44%)、 $\beta$ -转角(7.59%)、无规则卷曲(41.77%)组成。IL-36 $\alpha$  蛋白的无规卷曲和  $\beta$ -转角主要位于第 7~13、26~28、33~41、48~52、56~61、68~71、78~83、97~104、110~116、121~125、130~137、142~150 位氨基酸(见图 2)。

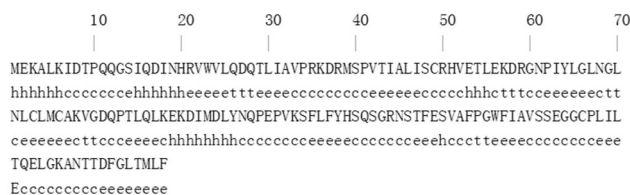


图 2 人 IL-36 $\alpha$  二级结构预测结果  
注:h: $\alpha$ 螺旋;e: $\beta$ -折叠;c:无规则卷曲;t: $\beta$ -转角

2.2 人 IL-36 $\alpha$  B 细胞抗原表位的单参数预测结果 IL-36 $\alpha$  的亲水性、可及性和柔韧性预测结果见图 3~图 5。应用不同的参数预测的 B 细胞抗原表位出现的位置有所不同(见表 1),但 8~12、33~38、111~116 和 143~149 肽段用多种参数分析得到了基本一致的结果,这些肽段可能为人 IL-36 $\alpha$  的 B 细胞抗原表位。

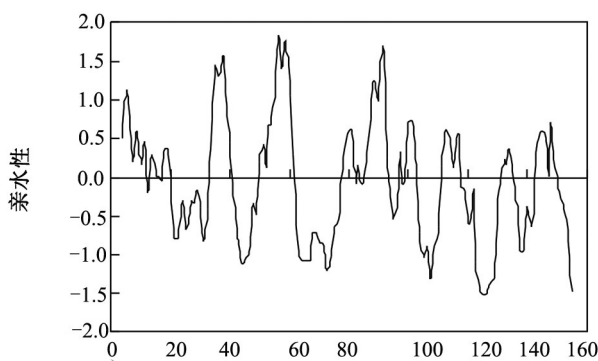


图 3 IL-36 $\alpha$  的亲水性分析

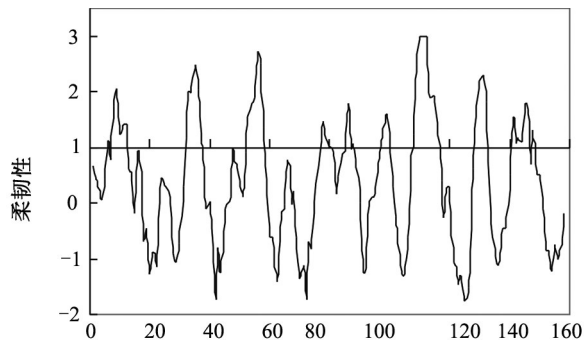


图 4 IL-36 $\alpha$  的柔韧性分析

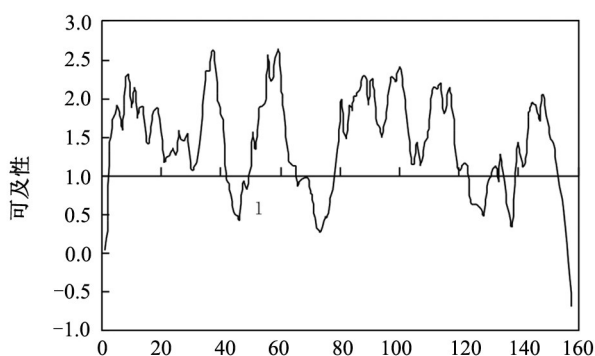


图 5 IL-36 $\alpha$  的可及性分析

表 1 应用不同方法预测人 IL-36 $\alpha$  B 细胞抗原表位的肽段位置

预测方法	表位区间
亲水性	4~11, 33~40, 50~61, 78~81, 86~93, 100~103, 111~117, 132~135, 143~149
柔韧性	8~12, 32~38, 53~58, 108~116, 129~132, 141~146
可及性	3~41, 50~65, 78~123, 140~153
二级结构	7~13, 26~28, 33~41, 48~52, 56~61, 68~71,
(无规则卷曲和 $\beta$ -转角)	78~83, 97~104, 110~116, 121~125, 130~137, 142~150

### 3 讨论

B 细胞表位是指抗原中可被 B 细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)或抗体特异性识别并相互结合的线性片段或空间构象型结构。应用生物信息学方法预测蛋白质的 B 细胞表位,并通过体外合成其肽段进行验证,是目前获得 B 细胞抗原表位肽段的重要方法。

本研究以人 IL-36 $\alpha$  的一级结构为基础,采用 ProScale、Bcepred 服务器上的相应软件和 SOPMA 软件,通过多参数分析预测人 IL-36 $\alpha$  的 B 细胞抗原表位。通过对二级结构、亲水性、柔韧性和可及性的综合分析,结果显示,人 IL-36 $\alpha$  蛋白可能的 B 细胞抗原表位位于 N 端 8~12、33~38、111~116 和 143~149 氨基酸区段,这些肽段具有较高的亲水性,在二级结构上位于或富含无规卷曲,符合表位分布的特点,并且与柔韧性参数和可及性参数预测的结果也相符。

由于 IL-36 $\alpha$  在炎症免疫过程中发挥重要作用,

## S100B 蛋白与帕金森病情分级的相关性研究

李雪莲, 朱飞奇, 陈俊斌, 陈 鹏

(汕头大学附属粤北人民医院神经内科, 广东 韶关 512026)

**【摘要】** 目的 探讨 S100B 蛋白水平与帕金森病临床分期的关系。方法 对符合入选标准的帕金森病患者作为帕金森病组(35 例), 登记病史及进行详细查体, 进行 Hoehn-Yahr 分期, 并用日常生活活动能力量表(Activity of Daily life, ADL)评定 PD 患者日常生活能力; 同时收集与帕金森病组年龄、性别、教育程度等相匹配的同期健康体检者作为对照组(35 名)。两组均测定空腹血 S100B 蛋白水平, 对结果进行相应的统计学分析。**结果** 帕金森病组血 S100B 水平明显高于对照组[(0.099 8±0.049 1) μg/L vs (0.050 3±0.039 5) μg/L] ( $t=4.653, P=0.000$ ); 帕金森病患者 Hoehn-Yahr 分期各期之间的血 S100B 水平相比较呈正相关( $r=0.812, P=0.000$ )。**结论** 血清 S100B 蛋白与帕金森病人 Hoehn-Yahr 分期及日常生活活动能力具有相关性, 可以作为反映病情严重程度的一个指标。

**【关键词】** 帕金森病; 血 S100B 蛋白; 临床分级

**【中图分类号】** R742.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2014)08-1099-03

**Rorrelation between S100B protein and the classification of Parkinson's disease.** *LI Xue-lian, ZHU Fei-qi, CHEN Jun-bin, CHEN Peng. Department of Neurology, Affiliated Yuebei People's Hospital of the Medical College of Shantou University, Shaoguan 512026, Guangdong, CHINA*

**【Abstract】 Objective** To study the correlation between serum S100B protein level and the clinical stages of Parkinson's disease (PD). **Methods** 35 patients with PD were enrolled as PD group, whose detailed physical examination and medical history were recorded and the Hoehn-Yahr stage of these patients were determined. Activity of daily life scale was performed to evaluate the activity of daily living of these patients. At the same period, 35 healthy people with matching age, gender and educational status of PD group were enrolled as control group. The limosis serum levels of S100B in both groups were detected and the results were statistically analysed. **Results** The levels of S100B protein in PD group (0.099 8±0.049 1) μg/L were significantly higher than that in control group (0.050 3±0.039 5) μg/L. The S100B protein levels from different Hoehn-Yahr stage had a positive correlation with the corresponding Hoehn-Yahr stage ( $r=0.812, P=0.000$ ). **Conclusion** The level of serum S100B protein is related to the Hoehn-Yahr stage of PD and the activity of daily living of patients. S100B can be used to determine the severity of PD.

**【Key words】** Parkinson's disease; Serum S100B protein; Clinical stages

基金项目: 韶关市医学科研基金(编号: Y14019)

通讯作者: 李雪莲。E-mail: xuelian.li66@163.com

并且与 T 细胞免疫, 特别是 CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T 细胞免疫应答的活化有关, 肿瘤内 IL-36α 表达减少与肝癌患者的不良预后有关, 因此, IL-36α 有可能成为治疗炎症性疾病和癌症的新靶点。本文结果为人工合成 IL-36α 的 B 细胞抗原表位, 进而制备抗 IL-36α 的抗体奠定了基础。

### 参考文献

[1] Van de Veerdonk FL, Netta MG. New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members [J]. *Front Immunol*, 2013, 8(4): 167.

[2] Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, et al. Four new members expand the interleukin-1 superfamily [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(2): 1169-1175.

[3] Dinarello C, Arend W, Sims J, et al. IL-1 family nomenclature [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 973.

[4] Ramadas RA, Ewart SL, Iwakura Y, et al. IL-36α exerts pro-inflammatory effects in the lungs of mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45784.

[5] Vigne S, Palmer G, Lamacchia C, et al. IL-36R ligands are potent

regulators of dendritic and T cells [J]. *Blood*, 2011, 118(22): 5813-5823.

[6] Pan QZ, Pan K, Zhao JJ, et al. Decreased expression of interleukin-36α correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(11): 1675-1685.

[7] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11(6): 681-684.

[8] Hopp TP. Protein surface analysis: methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites [J]. *J Immunol Methods*, 1986, 88(1): 1-18.

[9] Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, et al. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide [J]. *J Virol*, 1985, 55(3): 836-839.

[10] Bhaskaran R, Ponnuswamy PK. Positional flexibilities of amino acid residues in globular proteins [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1988, 32(3): 241-255.

(收稿日期: 2013-11-05)



帕金森病(Parkinson's disease, PD)是中脑黑质致密部多巴胺能神经元选择性凋亡,使黑质-纹状体通路DA释放减少,从而导致基底节神经调节功能的紊乱,出现PD经典的特征症状:进行性加重的静止性震颤、肌强直、运动迟缓、姿势步态异常。PD目前已成为全球性中老年人常见的一种神经系统变性疾病,在我国65岁人群中患病率达1.7%<sup>[1]</sup>,且患病率随年龄增大而增高,是中老年人致残的主要原因之一。研究发现S100B增高与神经系统变性疾病明显相关,并有研究表明血清S100B蛋白与帕金森病严重程度相关。本研究拟探讨中国帕金森病患者血清S100B水平,并比较其与病情严重程度的相关性。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 筛选2013年6月至2014年1月在我院住院的帕金森患者,诊断符合英国脑库的临床诊断标准<sup>[2]</sup>。排除标准:脑外伤、脑血管病、恶性肿瘤、中枢神经系统炎症性疾病以及Down's综合征、Alzheimer病等神经退行性病变病、精神分裂、抑郁症等影响血清S100B水平的患者。同时收集同期健康体检中心与PD组年龄、性别、教育程度等相匹配的健康体检者作为对照组。两组年龄、性别比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。由专门培训过的神经内科医生纳入符合诊断标准的病例,对病例的病史进行登记,并进行仔细查体,进行Hoehn-Yahr分级。并采用日常生活活动力量表(Activity of Daily life, ADL)评定PD患者日常生活能力,采用统一帕金森病评定量表(Unified Parkinson's disease Rating Scale, UPDRS)第Ⅲ部分评定患者运动能力。PD组及对照组均早晨空腹抽取肘静脉血5 ml,在自然状态下放置30 min后离心10 min,分离出血清,放入-70℃冰箱内冻存。待所有标本收集完毕后一次性测试。血清S100B蛋白使用人S100B蛋白定量酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒,购自上海西唐生物科技有限公司。

1.2 观察指标 ①PD组与对照组血清S100B水平比较;②根据Hoehn-Yahr分级比较各亚组间血清S100B水平的变化;③比较PD患者ADL评分与S100B之间的关系。

1.3 统计学方法 采用SPSS13.0统计分析软件进行分析。计量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用 $t$ 检验;多组间变量比较采用单因素方差分析;相关分析采用Spearman等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PD组与对照组血清S100B水平的比较

PD组血清S100B浓度为( $0.099\ 8\pm 0.049\ 1$ )  $\mu\text{g/L}$ ,明显高于对照组的( $0.050\ 3\pm 0.039\ 5$ )  $\mu\text{g/L}$ ,两组比较差异有统计学意义( $t=4.653, P=0.000$ )。

2.2 不同临床分级PD患者血清S100B水平比较 根据帕金森统一评定量表第五部分修订的Hoehn-Yahr分级将PD患者按疾病严重程度分为1~5级,其中1~2级为早期,2.5~3级为中期,4~5级为晚期。各期之间S100B水平比较差异有统计学意义( $F=22.937, P=0.000$ ),见表1。

期别	例数	S100B	F值	P值
早期(1~2级)	7	0.0580±0.0266		
中期(2.5~3级)	14	0.0759±0.0224	22.937	0.000
晚期(4~5级)	14	0.1446±0.0491		

2.3 PD患者血清S100B与Hoehn-Yahr分级之间相关性分析 将PD组患者按Hoehn-Yahr分级分组,血清S100B水平与帕金森病严重程度分期存在正相关性( $r=0.819, P=0.000$ ),见图1。

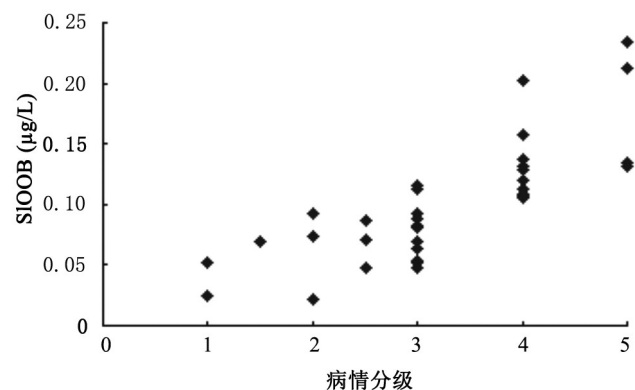


图1 S100B与PD病情分级的相关性

2.4 PD组患者日常生活能力评分(ADL评分)与血清S100B相关性分析 ADL与S100B呈负相关,即随着血清S100B水平升高,日常生活能力下降,病情愈严重( $r=0.812, P=0.000$ ),见图2。

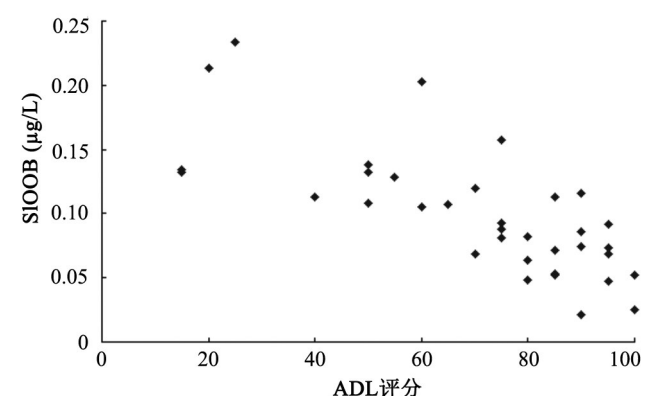


图2 S100B与ADL评分的相关性

### 3 讨论

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是1817年由James Parkinson率先描述的一种疾病<sup>[1]</sup>。随着社会的老龄化,PD人群迅速膨胀,给社会和家庭造成沉重的经济和精神负担。现代研究认为PD是一种多因素影响的神经退行性疾病,呈慢性进展,当患者出现临床症状时神经元损害往往已经达到了不可代偿的阶段,PD患者黑质多巴胺神经元数目减少到50%以上及纹状体多巴胺递质含量减少到80%以上才会出现临床症状<sup>[4]</sup>。S100B蛋白由Moore<sup>[5]</sup>于1965年首次在牛脑中发现,为一种EF-手型(螺旋、环、螺旋)钙结合蛋白。由于S100B主要(96%)存在于脑组织中,被认为是脑(神经胶质细胞)特异性蛋白,是脑神经胶质细胞完整性的特异标记蛋白<sup>[6]</sup>。其作为一种神经营养因子,适量表达可对脑组织起到营养保护作用,但表达过量则可加速神经系统炎症疾病的恶化,导致神经系统功能紊乱,并与神经症状的严重程度成正比。刘卫芳等<sup>[7]</sup>研究认为脑梗死患者S100B水平与神经功能缺失程度相关。Liu等<sup>[8]</sup>发现过表达S100B会导致小鼠的运动协调能力下降,5-羟色胺水平下调,而多巴胺水平上升,认为S100B很可能是参与PD发生发展的重要蛋白。

本研究结果表明,PD患者血清S100B与正常对照组存在显著差异,Sathe等<sup>[9]</sup>研究发现PD患者脑脊液中S100B水平明显高于正常对照,而血清S100B差异无统计学意义,可能与入组样本本身病情严重程度有关。由于我国医疗条件限制及百姓对帕金森病认识不足,导致就诊时患者病情较严重,本研究入组患者以中晚期为主,当影响到血脑屏障的结构与功能时,S100B蛋白可以通过受损的血脑屏障进入血液,血浆浓度明显增高。PD患者血清S100B水平与Hoehn-Yahr分级呈明显正相关,而与ADL呈明显负相关,这与Debora等<sup>[10]</sup>的研究结果相同,即随着病情严重程度增加血清S100B升高。这可能提示神经元及

胶质细胞发生损伤,星形神经胶质细胞的大小和数量均会增加,从而释放较多的S100B蛋白。

因此,通过本次临床研究我们发现,检测血清S100B蛋白作为反映PD患者病情严重程度的神经生化指标是可行的,说明S100B可能是评估PD疾病进展的一个潜在的指标蛋白,对判断PD患者病情的严重程度、评估预后具有重要参考价值。尚不能确定其能否早期诊断的神经生化指标,需扩大样本量更一步研究。

### 参考文献

- [1] Zhang ZX, Roman GC, Hung Z, et al. Parkinson's disease in China prevalence in Beijing, Xi'an, and Shanghai [J]. *Lancet*, 2005, 365: 595-597.
- [2] 陈生弟, 乐卫东, 陈先文, 等. 帕金森病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 138-139.
- [3] 贾建平, 崔丽英, 王伟. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 273-280.
- [4] 吴江, 贾建平, 崔丽英. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 245-253.
- [5] Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, 19(6): 739-744.
- [6] Schefer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology [J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 134-140.
- [7] 刘卫芳, 马文静, 张俊豪, 等. 急性脑梗死患者血清S100蛋白B及胶质纤维酸性蛋白的变化及其临床意义[J]. *临床内科杂志*, 2013, 1: 33-35.
- [8] Liu JL, Wang HL, Zhang LF, et al. S100B transgenic mice develop features of Parkinson's disease [J]. *Archives of Medical Research*, 2011, 42(1): 1-7.
- [9] Sathe K, Maetzler W, Lang JD, et al. S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- $\alpha$  pathway [J]. *Brain*, 2012, 135 (Pt 11): 3336-3347.
- [10] Debora VS, Adriano BL, Daniele F, et al. S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2005, 1(1): 39-43.

(收稿日期:2014-02-18)