

- 1990; **265**: 21279
- 10 Mandel M, Moriyama Y, Hulmes J D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 5521
- 11 Nelson H, Nelson N. FEBS Lett, 1989; **247**: 147
- 12 Perin M S, Fried V A, Stone D K *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 3877
- 13 Nelson N. Current opinion in cell Biology. USA: Current Biology Led ISSN Philadelphia, 1992; **4**: 654
- 14 Johns C A, Hilden S A, Madias E *et al.* Am J Physiol, 1988; **255**: F885
- 15 Groen B, Berden J A, Vandam K *et al.* Biochem Biophys Acta, 1990; **1019**: 121
- 16 Berbnascobu P, Rausch T, Strune I *et al.* J Biol Chem, 1990; **265**: 17428
- 17 Stone D K, Crider B P, Sudhof T C *et al.* J Bioenerg Biomember, 1989; **21**: 605
- 18 Forgac M. J Bioenerg Biomember, 1992; **24** (4): 341
- 19 Wassarman P M. Science, 1987; **235**: 553
- 20 Nelson N. Trends in Pharmacol Sci, 1991; **12** (2): 71
- 21 Blair H C, Teiteibaum S L, Ghishell R *et al.* Science, 1989; **245**: 855
- 22 Moriyama Y, Tsai H L, Futai M. Arch Biochem Biophys, 1993; **305** (2): 278

干扰素刺激基因 (ISGs) 的研究进展

李 洲 范启修

(中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要 干扰素刺激基因 (ISGs) 是干扰素作用机制研究的核心内容. 干扰素与受体结合后, 通过细胞内信号转换, 激活胞浆转录调控因子与 ISGs 调控序列上的 cis 元件结合而诱导基因表达.

关键词 干扰素 (IFN), 干扰素诱导应答元件 (ISRE), 干扰素刺激基因 (ISGs), 抗细胞增殖

干扰素 (IFN) 通过诱导细胞表达多种蛋白质而发挥多种生物学功能, 表达这些功能蛋白质的基因称作干扰素刺激基因 (IFN stimulated genes, ISGs). α/β -IFN 与 γ -IFN 与各自的受体结合, 通过不同信号转换途径, 激活自己的一套 ISGs 表达, IFN 作用信号在细胞内的转换和 ISGs 的表达调控及其产物的生物功能是 IFN 机制研究的核心内容. 本文拟将 α/β -IFN 刺激基因的激活与功能的研究进展作一综述.

1 ISGs 的 cis 作用元件

α -IFN 能诱导至少 20 种基因的表达, 分析这些基因的 5' 上游序列, 发现有两种 cis 元件与 ISGs 的激活有关.

1.1 Firedman/Stark (F/S) 同感序列^[1] 这是一长 28bp 的寡核苷酸片段, 中间有一几乎不变的 12bp 核心 (AGTTTCTC/tTCTC), 是通

过分析 MT II a (metallothionein II a) 基因, 两组 I 类 HLA 和一组 II 类 HLA 基因的上游序列发现的, 该 F/S 序列还存在于补体 B 基因, β -2 微球蛋白和小鼠 H-2 复合物基因的启动子内.

1.2 干扰素诱导应答元件 (ISRE)^[2] 这是通过功能检测方法从 ISGs 调控序列中找到的对 ISGs 表达具特异增强作用的寡核苷酸片段, 比 F/S 序列短, 有两个必需小段: 一是 GGAAA, 存在于 SV40 增强子核心区, 人免疫缺陷病毒长末端重复顺序 (HIV LTR), CMV 增强子, β -IFN 基因, PRD III 和 PRD II / NRD I 调控区和 α -IFN 的 VRE 序列中, 另一是 TGAAACT, 位于第一小段下游, 在 ISG₅₂ 和 ISG₆₋₁₄ 基因内均存在. 这两个小段共同构成

了 IFN 诱导的调控因子的识别位点. 因为两者中任一核苷酸发生突变, IFN 就不能刺激此基因的表达.

并非所有 ISGs 均具备以上两种 cis 序列. ISRE 也不一定存在于 F/S 之中, 某些情况 F/S 序列包含了 ISRE, 而有时 ISRE 位于 F/S 之外.

2 胞浆转录调控因子与 ISGs 激活

已发现三组与 ISRE 特异结合的蛋白质, 分别被命名为 ISGF1 (C, C1); ISGF2 (M, C2); ISGF3 (E, C3). ISGF1 正常情况就存在并与 ISRE 核心区结合, α -IFN 对它的表达水平影响很小. ISGF2 经 IFN 作用数小时才被诱导出来, 阻断蛋白质合成可抑制其生成, 它对 ISGs 的激活起负调控作用. 过去发现的 IFN 应答因子 IRF1 和 IRF2 实际上分别是 ISGF1 和 ISGF2 的组成成分^[3]. 已经确认, α -IFN 直接诱导活化的转录调控蛋白是 ISGF3. ISGF3 由 ISGF3 α 和 ISGF3 γ 两部分组成, ISGF3 α 本身又是三个亚基的复合物, 三个亚基分子量分别为 84 000, 91 000 和 113 000, 84 000, 91 000 两亚基为同一基因 mRNA 经不同剪切后翻译而成, 113 000 亚基则是另一相关基因的表达产物^[4]. ISGF3 γ 的分子量为 48 000, 是与 ISRE 直接结合的组分. 这四种亚基均已纯化并得到了 cDNA 克隆, 相应的单抗也已制备出来. 在 IFN 作用于细胞之前, ISGF3 各亚基单独存在于胞浆内而没有活性, α -IFN 与细胞膜受体结合后数分钟, α 亚基形成三聚体被活化, 而后与 ISGF3 γ 亚基共同进入细胞核内与 ISRE 结合诱导该基因的表达^[5].

ISGF3 的活化原因是被磷酸化, C. Schindler 等^[6]分析比较了 ISGF3 α 三亚基的氨基酸序列, 发现均具有 SH2 结构域, 而 SH2 结构域通常是酪氨酸蛋白激酶的结合部位. 经 α -IFN 处理 Hela 细胞 6min 就观察到 ISGF3 α 三个亚基聚合一起, 且各亚基均有一酪氨酸位置被磷酸化. 加入酪氨酸蛋白激酶抑制剂能抑制 ISGF3 α 的聚合及 α -IFN 诱导的基因表达.

证明酪氨酸蛋白激酶参与了 α -IFN 诱导的转录调控因子的活化过程.

由于 α -IFN 受体的胞浆域很短, 本身没有酪氨酸蛋白激酶活性. V Laura 等^[7]将 tyk2 激酶基因导入一株对 α -IFN 不敏感的细胞内表达, 使该细胞株重新对 α -IFN 敏感. 表明 tyk2 是参与 α/β -IFN 信号转换, 使 ISGF3 α 磷酸化的酪氨酸蛋白激酶. tyk2 激酶最早由 R DallaFavera 等发现, 但当时并不知道它的具体功能. M David 等^[8]首次用无细胞系统分析 ISGF3 α 磷酸化和聚合过程, 表明 α 亚基的磷酸化和聚合必需在 α -IFN 与受体结合后的膜组成存在时才能完成, 即该酪氨酸蛋白激酶存在于质膜且很可能与 α -IFN 受体相连.

细胞因子的信号传递一直是一个引人注目的领域, 但进展缓慢, α -IFN 第二信号分子与 ISGF3 的活化之间还没有确切的联系. 以上有关 ISGF3 活化的实验证据给出了一条 α -IFN 信号传递的新通路 (图 1). 这一途径把 α -IFN 与膜受体结合后直到 ISGs 基因的表达调控完整直接地连接起来, 为研究细胞因子的信号传递提供了新的模型, 但 tyk2 蛋白激酶与 α -IFN 受体相联系的细节还有待进一步阐明, 该途径是否适用于其他无酪氨酸蛋白激酶受体的细胞因子还需实验验证. 目前已经证实 γ -IFN 的调控因子也是通过酪氨酸磷酸化被激活的^[6].

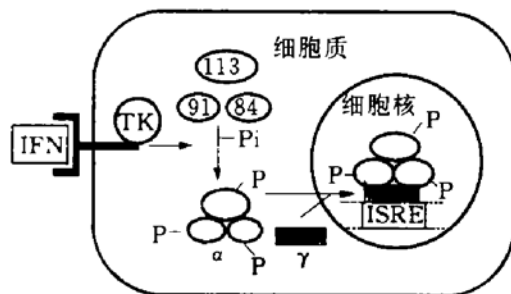


图 1 IFN 通过酪氨酸蛋白激酶诱导 ISGs 表达

3 ISGFs 的重要表达产物

干扰素诱导的 ISGFs 表达多种产物发挥不同生物学功能, 抗病毒抗细胞增殖是 IFN 作

用的两个最主要的方面, IFN 抗肿瘤的功能基础是抑制细胞增殖, 而有关 IFN 抑制细胞增殖的机制仍未阐明. 下面就参与 α/β -IFN 抗病毒抗细胞增殖的 ISGs 表达产物及其研究进展作一介绍.

3.1 IFN 抗病毒蛋白 (AVP)

IFN 主要诱导了三组蛋白质参与了抗病毒过程, 即 2', 5' 寡腺苷酸合成酶 (2', 5' -OAS), Mx 蛋白和 P^{68} (又称 DAI) 激酶, 其中 IFN 诱导出的 2', 5' -OAS 和 P^{68} 激酶是无活性的, 需经细胞内双链 RNA (dsRNA) 激活方能发挥作用, 各种 ATP 的作用机理见图 2.

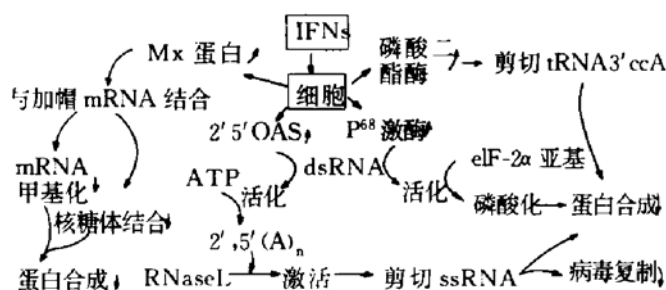


图 2 ISGs 表达的 AVP 抗病毒作用机理

2', 5' -OAS 是 IFN 抗病毒的经典途径, 已被普遍肯定, 不少实验室将此酶作为 IFN 发挥功能的生化指标, 刘新垣等对 2', 5' -寡聚核苷酸 (2', 5' - (A)_n, $n \geq 3$) 的作用机制进行了系统而深入的研究.

Mx 蛋白在鼠中有两种, Mx1 和 Mx2. Mx1 被 IFN 诱导出来后聚集在细胞核内, 能使细胞特异地抗流感病毒, 而 Mx2 无此功能. 人 Mx 蛋白也分成两种, MxA 和 MxB. IFN 诱导出的 MxA 出现在胞浆里, 能抗流感和口炎疱疹病毒, 未发现 MxB 有抗病毒活力^[9]. 所有 Mx 蛋白都有能与 GTP 结合的共有顺序, 且小鼠 Mx1 和人 MxA 本身就有 GIP 酶活力. Mx 的 C 末端还具有亮氨酸拉链结构. α -IFN 能敏感地诱导单个核细胞和 A549 肺癌细胞株产生 MxA 蛋白, γ -IFN 却不能. 高剂量 IFN- α 处理单个核细胞, 4h 后 MxA 的 mRNA 升高 10 倍, 24—48h MxA 蛋白水平则升高 10 倍以

上. 该蛋白很稳定, 体内半寿期约 2—3 天, 单核细胞的基础表达水平比淋巴细胞高^[10].

P^{68} (DAI) 是 IFN 诱导的一种丝氨酸蛋白激酶, 它使细胞肽链延伸因子 (eIF-2 α) 第 51 位丝氨酸磷酸化, 导致蛋白合成受阻, 从而阻止病毒的包装. 最近由于发现该酶具有抑制细胞增殖的作用而受到极大重视, 成为 IFN 抗细胞增殖研究的热点.

3.2 IFN 抗细胞增殖蛋白

尽管仍有资料报道 2', 5' -OAS 参与了 IFN 抗细胞增殖, 如 G. Rysiechi 等^[11]将 2', 5' -OAS 基因转入 Ta8 细胞系内表达, 使转化细胞表现强烈的抗病毒活性, 其中一亚克隆还伴随一定程度的增殖抑制, 但大量证据表明 2', 5' -OAS 与 IFN 抗细胞增殖无关. 目前有关 IFN 抗细胞增殖机制的研究主要在两个方面有了新进展.

a. P^{68} (DAI) 蛋白激酶对细胞生长的负调控作用 Chong 等^[12]将 P^{68} 激酶基因转入啤酒酵母细胞进行表达, 使该酵母细胞的生长受到抑制, 由于人和啤酒酵母细胞的 eIF-2 有 80% 的氨基酸序列相同, 若将转入的 P^{68} 激酶的末端进行修饰, 或者将酵母细胞的 eIF-2 α 亚基上第 51 位丝氨酸置换, 则可消除 P^{68} 激酶对啤酒细胞生长的抑制作用. 这是人 P^{68} 激酶通过细胞 eIF-2 α 的 Ser-51 位磷酸化抑制细胞生长的直接证据. P^{68} (DAI) 激酶可能是肿瘤抑制基因的产物, 因为将突变的无活性的 P^{68} 基因转入 3T3 细胞表达, 然后将此细胞植入裸鼠, 就能使裸鼠产生癌变, 而转入野生型的有功能的 P^{68} 基因则不引起癌变, 表明失活的 P^{68} 以某种方式干扰了正常 P^{68} 抑制细胞生长的功能^[13]. P^{68} 激酶除了使 eIF-2 α 磷酸化外, 还能使 Histone H2B 磷酸化^[14], 同时能通过使抑制蛋白 I- κ B 磷酸化调节转录控制因子 NF- κ B 的活性^[15]. 提示 P^{68} 的生长抑制功能不单是通过 eIF-2 α 的翻译后修饰实现, 还涉及了基因的转录调控环节.

b. IFN 诱导的新膜蛋白质与抗细胞增殖有关 Knight 等^[16]从 β -IFN 处理的人 Daudi

细胞膜上部分纯化了一新的 17kD 蛋白质, 将此组分加到 Daudi, Namalva 和 Hela 细胞, 未经 IFN 处理就能抑制这些细胞增殖. 未经 β -IFN 处理过的 Daudi 细胞的相应组分却没有生长抑制作用, 以 I^{125} 标记实验证明此蛋白质位于细胞外表面, 从对 IFN 敏感的小鼠 S6745 细胞中也分析到了一分子量为 16 000 的 IFN 诱导蛋白, 而不敏感的 R10 和 3C18 细胞中则没有. 另有一些膜蛋白在 Daudi 细胞中被 α/β -IFN 诱导出来, 分子量分别为 16 000 (P^{16}), 20 000 (P^{20}) 和 106 000 (P^{106}), IFN 不能诱导产生 P^{16} 和 P^{106} 的细胞也不能抑制其增殖.

如将对 α/β -IFN 不敏感的肿瘤细胞移植入小鼠体内, 再给小鼠注射 α/β -IFN, 就能抑制植入的肿瘤细胞的增殖; 将 IFN 不敏感的小鼠 1210 细胞系, Esb 肿瘤细胞和 Fried 红白血病细胞与正常的对 IFN 敏感的小鼠肝细胞和胚胎成纤维细胞共培养, IFN 的加入就能抑制上述不敏感的肿瘤细胞的增殖^[17]. 可能 α/β -IFN 诱导敏感细胞表达的新膜蛋白质以直接接触抑制方式抗不敏感细胞的增殖.

α -IFN 处理 MDBK 细胞后, 能降低内皮生长因子(EGF)刺激的细胞增殖, 受体分析表明, α -IFN 使 MDBK 细胞上 EGF 受体数减少, 同时 EGF 与受体的亲和性降低^[18]. 以 α -IFN 处理敏感的 Raji 细胞能大大降低血清生长因子刺激的细胞膜的磷脂转换, 同时引起 DNA 合成和细胞增殖的下降, 对 IFN 不敏感的 J-6-1 细胞不能产生上述变化^[19]. 由于细胞磷脂转换的加速发生在生长因子增殖信号传递的早期, 因而 IFN 诱导的新膜蛋白可能对增殖信号的启动产生影响, 进一步确定这些新膜蛋白质的生化结构与功能, 是这一领域亟待解决的课题.

α/β -IFN 是细胞因子网络中重要的负性调节因子, 已经历了 40 年历史, 在基础研究和临

床应用都积累了丰富的资料. 综上所述, 由于分子生物学技术和方法和广泛应用, 在诱导基因表达的信号转换和抑制细胞增殖机制两方面的研究也有了新突破, 开拓了新的前景. 相信随着对 ISGs 研究的深入, 必将有力促进细胞因子信号传递的研究, 同时对肿瘤治疗及发病机理的研究也会作出新的贡献.

参 考 文 献

- 1 Friedman R L, Stark G R. *Nature*, 1985; **314**: 637
- 2 Kerr I M, Stark G R. *FEBS Lett*, 1991; **285**: 194
- 3 Stark G R, Kerr I M. *J IFN Res*, 1992; **12**: 147
- 4 Fu X-Y, Kessler D S, Veals S A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 8555
- 5 Kessler D S, Veals S A, Fu X-Y *et al.* *Gene Dev*, 1990; **4**: 1753
- 6 Schindler C, Shuai K, Darnell J E *et al.* *Science*, 1992; **257**: 809
- 7 Laura V, Marc F, Stark G R *et al.* *Cell*, 1992; **70**: 313
- 8 David M, Larner A C. *Science*, 1992; **257**: 813
- 9 Palvlovic J, Haller O, Staeheli D *et al.* *J Virol*, 1993; **66**: 2564
- 10 Ronni T, Melem K, Malygin A *et al.* *J Immunol*, 1993; **150**: 1715
- 11 Rysiecki G, Gewert D R, Williams B G R *et al.* *J IFN Res*, 1989; **9**: 618
- 12 Chong, K L, Feng L, Schappert K *et al.* *EMBO J*, 1992; **11**: 1553
- 13 Koromilas A E, Roy S, Barber G N *et al.* *Science*, 1992; **257**: 1685
- 14 Hovanessian A G. *J IFN Res*, 1989; **9**: 641
- 15 Kumar A, Huque S J, Hiscott J *et al.* *J IFN Res*, 1992; **12** suppl. 1: S207
- 16 Vignaux F, Jr E K, Gresser I *et al.* *J IFN Res*, 1991; **11**: 123
- 17 Yasui H, Proietti E, Vignaux F *et al.* *Cancer Res*, 1990; **50**: 3533
- 18 Zoon K C, Karasaki Y, Zunedden K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**: 8226
- 19 李 洲, 范启修, 吴克复. *中华血液学杂志*, 1993; **14**: 639

system

The Fine Myofilament of Myofibril of Striated

Musale: Connectin. Chen Ming. (Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 403—406

In the myofibril of striated muscle, there are three myofilaments: thick, thin, and fine myofilaments. Titin (connectin) is a giant elastic contractile protein, with molecular weight of 3000 kD and length of 0.9 μm , and forms fine myofilament extended from M-line to Z-line in the myofibril. It may play roles in maintaining thick myofilament in the middle of sarcomere, acting as molecular template for assembly of thick myofilament, and modulating the myosin activity.

Key words connectin (titin), fine myofilament, myofibril, striated muscle

Production of the Useful Protein in the Silkworm Using the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Expression Vector. Zhang Yuqing. (Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 406—410

More and more foreign genes have been expressed in the silkworm larvae or silkworm cell lines using the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) as a expression vector. The expressed products involve in many fields such as pharmaceuticals, medical diagnosis, vaccine production and biological control. The characteristics of BmNPV and its genome structure, characteristics of polyhedrin gene, construction of recombinant BmNPV and its expression in the silkworm larvae and cell line, and efficiency of production for the foreign gene products expressed in the silkworm-Bm-

NPV system and application of the expressed product were described systematically in the review.

Key words silkworm, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, gene expression, recombinant virus, expression vector

Structure and Phamacology of V-ATPase. Cai Huiluo. (Institute of zoology, Academia Sinica, Beijing 100080). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 410—414

V-ATPases are present in large numbers of organelles including lysosomes, endosomes, golgi complex and several secretory granules in animal cell. The function of V-ATPase is to generate protonmotive force and to cause limited acidification of the internal space of vacuolar system and extracellular compartments at the expense of ATP. The acidification and the electrochemical H^+ gradient formed by V-ATPase serve an improtant function in endocytosis, exocytosis, membrane traffic and transport systems of cells. In the families of H^+ -ATPases, increasing attention is being given to V-ATPase, about which much has been learned in recent years.

Key words V-ATPase, electrochemical proton gradient $\Delta\mu\text{H}^+$, vacuolar system

Progress of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) Research. Li Zhou, Fan Qixiu. (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (5): 414—417

Interferon-stimulated genes (ISGs) is the central part of the research on interferon (IFN) function mechanism. After IFN binds to its receptor, through signal transducing in cyto-

plasm. activates the special transcription factors to attach the *cis*-elements existing on the upstream of ISGs in nucleus and then induces gene expression. The paper reviewed mainly on the signalling pathway and the products which play antiproliferative action of ISGs expression.

Key words interferon (IFN), IFN-stimulated genes (ISGs), IFN-stimulated response elements (ISRE), antiproliferation

cDNA Cloning of Dopamine Receptors. Xing Cheng. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 418—421

Molecular cloning studies on five types of dopamine receptors were summarized. The five types of dopamine receptors are members of family of the G protein-coupled receptors, and divided into two classes by pharmacologic and biochemical criteria: (a) D₁R and D₅R mediating the activation of adenylyl cyclase through G protein (G_s) and (b) D₂R, D₃R, D₄R, inhibiting the activation of adenylyl cyclase through the G protein (G_i). The gene structure, distribution of their mRNA in the brain and location on chromosomes between the two classes of dopamine receptors were compared.

Key words dopamine receptors, cDNA cloning of dopamine receptors, dopamine receptor genes

Fluorescence Digital Imaging Using a Charge-Coupled Device Camera and Its Biological Applications. Hu Kunsheng. (*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 421—425

A system, using a cooled slow-scan charge coupled device camera attached to a fluorescence microscope, allows a series of images to be stored, up to 500 fluorescent spots (labelling particles) per image can be identified by position and intensity. The movement of the spots can be traced. The tracking method allows the mobility to be analysed. The receptors of influenza virus and low density lipoprotein on fibroblast have three different types of motion: random motion, directed motion and motion limited to a domain. The high sensitivity of the system leads to short exposures and little photobleaching during the observations. The measurement principle of this system and its biological applications were described.

Key words charge-coupled device, fluorescence imaging, lateral diffusion, motion track, cell fussion

Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Some Tumors. Xiu Bo, Yu Xin, Li Huifang, Zhou Airu. (*Department of Biochemistry, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (5): 426—429

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a specific mitogen on endothelial cells and promotes angiogenesis. It has been identified that VEGF is very closely linked to the growth of solid tumors. With Dot blot technique, expression of the VEGF mRNA in cancers of stomach, kidney, bladder and colon are investigated. The results showed that the expression of the VEGF mRNA is higher in tumors than in peritumors. There is significant expression of VEGF mRNA in SGC-7901 cells after adding TPA 4h. Human bladder carcinoma cell line BIU-87 transfected with antisense N-ras exon 1 DNA fragment inhibit VEGF