

tion of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **87**: 1579~ 1586

8 Quinn T P, Peters K G, Vries C D *et al.* Fetal liver kinase I is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelial. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**: 7533~ 7537

9 Vermazen M D, Hulmes J D, Bohlen P *et al.* Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. Biochem Biophys Res Commun, 1994, **205**: 728~ 738

10 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Sieghahn A *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, Two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem, 1994, **269**: 26988~ 26995

11 Terma B, Khandke L, Bougher V M *et al.* VEGF receptor subtypes KDR and Flt show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. Growth Factor, 1994, **11** (3): 187~ 195

12 Millaner B, Voos S W, Schniurch H *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and Angiogenesis. Cell, 1993, **72**: 835~ 846

13 Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M *et al.* Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelial. Nature, 1995, **376**: 66~ 70

14 Brogi E, Schattteman G, Wu T *et al.* Hypoxia-induced peracine regulation of VEGF receptor expression. Circulation, 1995, **92**: 0531

15 Waltenberger J, Mayr U, Pentz S *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) represents a survival factor for hypoxic endothelium, potential role of the VEGF-receptor KDR for therapeutic angiogenesis. Circulation, 1995, **92**: 3602

16 Li J, Brown L F, Hibberd M G *et al.* VEGF and VEGF receptors expression in acute myocardial infarction model of angiogenesis. Circulation, 1995, **92**: 3428

17 Boockock C A, Charnock Gones B S, Sharkey A M *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Ntal Cancer Inst, 1995, **87** (7): 506~ 516

18 Bronwn L F, Olbrichd S M, Berse B *et al.* Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. J Immunol, 1995, **154** (6): 2801~ 2807

Structure and Function of VEGF Receptors.

ZHANG Man, ZHOU Airu (*Institute of cardiovascular basic research of Beijing medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Vascular endothelial growth factor receptors are the membrane-spanning receptors which were found in vascular endothelial cells and induce the proliferation and differentiaion of endothelial cells. There are two receptors which can specially bind with VEGF. They are Flt and KDR, the gene structures and locations in the chromosome of flt and KDR were identified. Both Flt and KDR are receptors of type III RTKs. Their structures are similar. There are seven immunoglobir-like sequence in extracellular domain. The catalytic domains in intracellular region were inserted by tyrosine kinase domains. Autophosphorylation was induced, which results in intracellular response. The VEGF reptors play an important role in angio-vascular, wound repair, inflammatory response, tumour growth and some cardiovascular diseases.

Key words vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor receptor, function, structure

昆虫抗菌蛋白基因转录调控研究的新进展

屠益增 蔡敏莺 屈贤铭

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 在自然或人为创伤和感染情况下, 昆虫能迅速产生各种类型的抗菌因子, 例如天蚕素 (cecropin), 果蝇抗菌蛋白 (diptericin), 天蚕抗菌蛋白 (attacin) 和防御素 (defensin) 等. 这些活性

多肽和蛋白从其被合成的脂肪体和某些血细胞中,分泌到血淋巴参与虫体对入侵物的免疫反应. 抗菌多肽和蛋白的诱导、表达及其协同作用于外源微生物,构成昆虫先天性防卫免疫系统中极为重要的环节. 近年的研究表明,昆虫的这种防卫免疫系统与哺乳动物急性期反应是相关的,特别是在有关基因表达的协调控制方面具有许多共同的基本特征.

关键词 核因子 NF- κ B, 背侧相关免疫因子, 果蝇免疫响应因子, 天蚕免疫响应因子

1 抗菌蛋白启动子的顺式调控元件

对于研究过的 *D. melanogaster*、*H. cecropia*、*M. sexta*、*S. peregrina* 和 *P. teranovae* 等昆虫,编码各种抗菌多肽和蛋白基因的转录动力学绝大部分是很相似的. 如果没有免疫刺激,这些基因不转录. 经创伤,注射微生物或其细胞表面成分,这些基因在 1~2 h 内迅速转录,12~48 h 转录速率达到峰值,随后转录减弱或终止. 各种免疫基因即使在同一昆虫中其表达的强度常常是有差异的. 从已克隆的抗菌蛋白基因来看,绝大多数基因是单拷贝的. 同一类多肽或蛋白的不同形式常排列成簇. 各种抗菌多肽和蛋白是以前体形式转录,在成熟蛋白前有一段信号肽和一段 2~35 个氨基酸残基的 Pro 序列^[1]. 但蜜蜂的一种主要抗菌肽 apidaecin,可能由不同基因构成的基因簇转录而来^[2].

相似的基因转录动力学和相似的基因结构提示抗菌多肽和蛋白基因具有相似的转录调控机制. Sun 等^[3]首先对所有已测定核苷酸序列的天蚕抗菌蛋白结构基因的上游区域进行比较分析,发现除 cecropin D 以外,其他基因都含有一段相似的序列. 这一序列与哺乳动物转录因子 NF- κ B 所结合的序列 (GGGRNYYCC) 是高度同源的. 随后在果蝇、麻蝇等昆虫大部分可诱导的抗菌蛋白基因的上游均找到这类 NF- κ B 相关模块. 其同源序列为 GGGRAYYYYY. 它们的位置通常靠近 TATA 框,距转录起始位点数十至数百个核苷酸,有的为两个或三个相邻,正逆向均有^[4].

NF- κ B 模块与抗菌蛋白的基因诱导表达之间的相关性的最直接证据来自果蝇的转基因株和体外培养的肿瘤样血细胞系 mbr-2 的转染

结果. 在转基因果蝇和转染的血细胞中,用 cecropin A1 基因上游 0.7 kb 区域 (内含一个 NF- κ B 模块),足以控制其下游的指示基因 lacZ 的可诱导的组织专一性表达^[5]. 切除这一 NF- κ B 模块导致基因不表达. 用天蚕的 attacin 基因上游的 NF- κ B 三连体可取代 cecropin A1 基因上游 0.7 kb 区域作为指示基因的有效启动子^[6]. 果蝇另一种抗菌蛋白 dipteracin 基因的 2.2 kb 上游区域也能在转基因果蝇幼虫中控制其下游 lacZ 的正常表达. 这一上游片段中间含一个 NF- κ B 模块,而在近 TATA 框前有两个 17 bp 的重复子,该重复子中间为 NF- κ B 相关序列: GGGGATTCCT. 这两个重复子在几种果蝇中是保守的^[7]. Kappter 等^[8]以 CAT 基因作为指示基因与 dipteracin 基因上游片段构建成杂合基因,在转入果蝇和 mbr-2 细胞后证实,当两个 17bp 的重复子用随机序列取代则脂多糖 (LPS) 诱导的转录活性完全丧失. 两个重复子有协同效应,以随机序列取代其中任一个,转录活性下降数倍;反之,增加重复子的拷贝数至 8 个则可增加数倍转录活性. 改变重复子的取向对活性有一定的影响. 将两个重复子之间的距离从天然的 79 个碱基对缩短至 20 个碱基对时,对诱导的氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 活力影响不大.

最近更为定量的转基因果蝇分析,不仅更确定了这两个重复子对 dipteracin 基因表达的作用是其他序列所不能替代的,而且揭示了在 dipteracin 基因近端启动子部位可能有其他调节元件的作用. 因为 17 bp 的重复子只能表现野生型的 2.2 kb 片段启动子活性的 5%~10%,或基因上游野生型 0.6 kb 片段启动子活性的 30%~50%. 由于在该 0.6 kb 区域内除 NF- κ B 相关的模块外,还有一些其他的序

列是类似于近年来在哺乳动物中陆续确立的调节元件, 如白细胞介素 6 调节元件 (IL6RE), 干扰素响应元件 (ICRE) 等等 (图 1a), Meister 等^[9]认为是这些调节元件与 NF- κ B 模块的相互作用, 使 0.6 kb 片段表现出比仅有 17 bp 重复子片段大 2~3 倍的调控能力. 另外, 在 0.6 kb 至 2.2 kb 之间也必定有些远距离调节元件, 包括一个已知的 NF- κ B 模块. 在 2.2 kb 以外的上游或下游的序列则对启动子活性无所贡献. 在抗菌蛋白上游存在各种类型顺式调节元件的现象可能是普遍的. 在昆虫 defensin 基因上游 2.7 kb 内, 除 NF- κ B 相关模块外, 还可找出 IL-6 调节元件、核因子 E-LAM 和肝性核因子 5 (HNF-5) 等等^[10] (图 1b). 这些也都是哺乳动物在急性期反应中涉及的有关蛋白的基因在启动子部位上特定序列, 即对各种调节因子的响应元件. 其中几种已经 DNA 酶印迹分析和凝胶转换分析显示可能在昆虫免疫响应中起作用^[11].

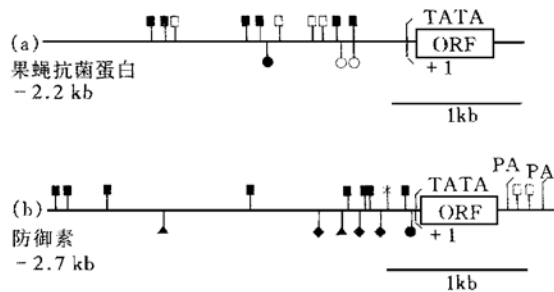


图 1 果蝇抗菌蛋白基因上游类似于哺乳动物免疫基因响应元件的顺式调控元件

□: 白细胞介素 6 调节元件; ▲: 核因子 ELAM1; ▮: 核因子白细胞介素 6; ●: 核因子 κ B; ▤: 肝性核因子; ▮: 干扰素响应元件; ○: 核因子 κ B 相关 17 bp 重复子.

2 转录调节因子

核因子 NF- κ B 最先是在哺乳动物成熟 B 淋巴细胞中发现的. 当它与免疫球蛋白 κ 轻链蛋白基因上一段特定的序列 GGGACTTCC (称为 NF- κ B 结合模块) 结合后, 可增强该基因的表达. 随后发现 NF- κ B 存在于多种细胞中, 参与急性期反应蛋白基因的表达调控或调

节细胞因子和细胞表面受体的可诱导性表达. NF- κ B 通常以无活性的前体形式存在于细胞质, 本身有三个不同的蛋白亚基构成: 一个 50 ku 的 DNA 结合蛋白 (p50), 一个 65 ku 的效应蛋白 (p65) 和一个抑制蛋白 I κ B. 与 I κ B 的结合制约了 NF- κ B 向核内转移. 几种细胞外的刺激能解除这种制约. 例如在淋巴细胞中, 肿瘤坏死因子 (TNF) 和白细胞介素 1 (IL-1) 与跨膜受体的结合会引起 I κ B 的磷酸化而从 NF- κ B 的复合受体上解离. 活性的二聚体 p50/p65 就能移至核内, 作为反式作用因子与基因启动子部位特定的模块专一结合而增强基因的转录^[12]. cDNA 克隆显示 NF- κ B 属于 rel 基因家族, 这一基因家族产物具有 DNA 结合的二聚化功能^[13].

昆虫抗菌蛋白的基因转录中涉及了 NF- κ B 相关的顺式作用元件, 自然引起广泛的兴趣并促使寻找相应的反式作用因子. 第一个纯化的是天蚕免疫响应因子 (CIF), 为二个 65 ku 亚基的二聚体. CIF 能专一地结合在 NF- κ B 模块上. 当天蚕用 LPS 等免疫基因诱导物处理后, 才能在其脂肪体细胞核内和胞浆提取物中发现活性的 CIF^[14]. 同样, 用 LPS 刺激果蝇血细胞系 mbr-2 能激活果蝇免疫响应因子 (DIF), 它具有 CIF 类似的性质. 这二种因子均能与哺乳动物 NF- κ B 竞争性结合相同的 DNA 模块. 其 DNA 与蛋白复合物具有类似的电泳迁移率. 而且, CIF 的 DNA 结合能力受 NF- κ B 抗体的抑制. Ip 等^[13]从果蝇中克隆了一个新的 Rel/NF- κ B 家族成员: 背侧 (dorsal) 相关免疫因子 (Dif), 很可能是 mbr-2 细胞中发现的果蝇免疫响应因子 (DIF) 的一种. Dif 在正常情况下位于幼虫脂肪体细胞质中, 当虫体受细菌感染或创伤诱导后, Dif 在细胞核内积聚并结合到抗菌蛋白基因启动子部位的 NF- κ B 相关的模块上. 抗 Dif 的抗体能封闭这一结合.

最早确定的昆虫 Rel 家族成员是果蝇的背侧蛋白 (dl). 它的最初功能涉及胚胎早期发育中决定背腹极性. 但由于其信号传递途径与哺乳动物免疫系统的激活途径具有相关性而重

新被引起注意. 近年发现 dl 也在脂肪体中表达^[15]. 而昆虫与免疫相关的、可诱导的多肽和蛋白大都是以脂肪体内合成为主的. 与 Dif 相同, dl 在体外能与 NF- κ B 相关的模块结合; 在 mbr-2 转化细胞中, dl 能序列专一地激活含这类模块的启动子所控制的指示基因. dl 与 Dif 均具有自我调节功能. 在蛋白质一级结构上, dl 与 Dif、NF- κ B P₆₅亚基的 Rel 结构功能域中有近一半的氨基酸残基相同. 与其他的 Rel 蛋白相似, dl 与其抑制蛋白 cactus (I κ B 类似物) 结合, 以无活性形式存在于细胞质. 受外界因素刺激后, 一种胞外蛋白 spaetzle 受蛋白酶降解激活, 结合到跨膜受体 toll 上, 引发了胞内级联反应, 使 cactus 解离. 活性的转录因子就向核内转移. 这一信号传递途径中的 toll 受体与哺乳动物免疫系统中激活 NF- κ B 的白细胞介素 1 (IL-1) 受体是同源的^[16]. 已有证据表明果蝇抗真菌蛋白 drosocin 基因的表达是通过 dorsal 途径调控的. Toll 基因的突变将增加果蝇形成黑化的肿瘤的频率, 显示病理性质的免疫系统激活. 所以, 昆虫免疫反应中至少有些信号传递途径很可能与 NF- κ B 和 dl 的激活途径是相似的^[17] (图 2).

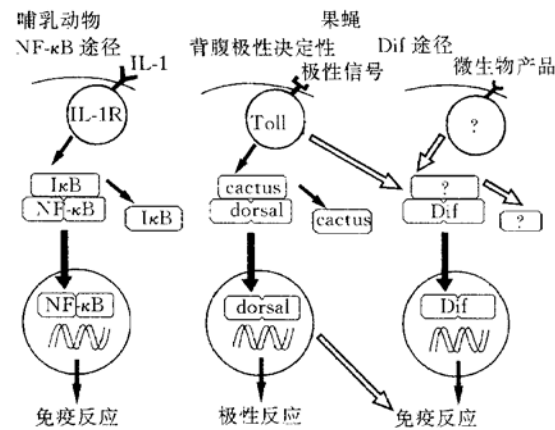


图 2 果蝇与哺乳动物免疫基因调控信号传递途径比较

在果蝇血细胞系 mbr-2 中, 已发现有 toll 基因的转录. 在共转染的 mbr-2 细胞中, 外源性的 toll 活性突变体 toll^{10B} 能成倍地增强

cecropin A1 的转录活性. 但是, toll 的激活途径与 LPS 对 cecropin A1 的诱导途径是不同的, 尽管两者的作用均依赖于 cecropin A1 基因启动子部位的 NF- κ B 相关模块^[18]. 果蝇 cecropin 基因和 dipterecin 基因的表达不需要 dl 的活性, 即 dl 不能单独调控这些抗菌蛋白的转录. 这些基因很可能受其他核因子 (例如 Dif) 的调控, 或者是多种因子的协同作用. 这样的调控和协同作用, 加上 Dif、CIF 等各种转录调节因子本身与相应的 NF- κ B 相关模块等序列的专一性亲和能力的差异, 使昆虫体内各种抗菌多肽和蛋白基因的表达呈现既是可诱导的, 又是组织专一性的和强弱不一的. 进一步阐明 dl 与 Dif 的关系、toll 受体及它们在免疫蛋白基因调控中的作用必然有助于解开昆虫免疫系统的奥秘.

从上述主要是果蝇几种抗菌蛋白基因调控中所涉及的顺式作用元件和反式作用因子来看, 不仅揭示了昆虫抗菌蛋白基因转录调控的复杂性, 而且也显示了在先天性免疫方面, 昆虫和哺乳动物之间存在着共同性. 由于昆虫实验操作较便利, 特别是果蝇, 用遗传学方法结合现代转基因技术和体外细胞系的应用为昆虫免疫研究提供了极有效的手段. 随着日益增加的昆虫免疫与高等动物免疫的内在联系的发现, 昆虫免疫的深入研究, 除其本身意义外, 也必将促进人类对免疫问题的总体认识.

参 考 文 献

- 1 Hoffmann J A. Innate immunity of insects. Curr Opin Immun, 1995, 7: 4~ 10
- 2 Casateels-Josson K, Capaci T, Casteels P *et al.* Apidaecin multipeptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. EMBO J, 1993, 12: 1569~ 1578
- 3 Sun S C, Lindstrom I, Lee J Y *et al.* Structure and expression of the attacin genes in *Hyalophora Ceceopia*. Eur J Biochem, 1991, 196: 247~ 254
- 4 Hultmark D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects: a model for innate immunity. Trends Genet, 1993, 9: 178~ 183
- 5 Reichhart J M, Meister M, Dimarcq J L *et al.* Insect immunity: developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterecin promoter. EMBO J, 1992, 11:

1469~ 1477

6 Engstrom Y, Kadalayil L, Sun S C *et al.* κ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila*. J Mol Biol, 1993, **232**: 327~ 333

7 Meister M, Georgel P, Lemaitre G *et al.* Immune gene expression in *Drosophila*. In: Hoffmann J A eds. Perspectives in immunity: the insect host defense. France: Landes Company, 1994: 167~ 182

8 Kapppler C, Meister M, Lagueux M *et al.* Two 17 bp repeats nesting a κ B-related sequence confer inducibility to the dipterecin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila*. EMBO J, 1993, **12**: 1561~ 1568

9 Meister N, Braun A, Kappler C *et al.* Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* defines several functional domains in the dipterecin promoter. EMBO J, 1994, **13**: 5959~ 5966

10 Dimarcq J L, Hoffmann D, Meister M *et al.* Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene and insect defensin. Eur J Biochem, 1994, **221**: 201~ 209

11 Georgel P, Meister N, Kappler C *et al.* Insect immunity: the dipterecin promoter contains multiple functional regulatory sequences homologous to mammalian acute phase response elements. Biochem Biophys Res Commun, 1993, **197**: 508~ 517

12 Beg A A, Finco T S, Nantermet P V *et al.* Tumor necrosis factor and interleukin 1 lead to phosphorylation and loss of I κ B α : a mechanism for NF- κ B activation. Mol Cell Biol, 1993, **13**: 3301~ 3310

13 Ip Y T, Reach M, Engstrom Y *et al.* Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. Cell, 1993, **75**: 753~ 763

14 Sun S C, Faye I. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear-factor κ B. Eur J Biochem, 1992, **204**: 885~ 892

15 Reichhart J M, Georgel P, Meister M *et al.* Expression and nuclear translocation of the rel/NF- κ B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. C R Acad Sci [III] 1993, **316**: 1218~ 1224

16 Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a

member of the Toll/ IL-1 receptor family. Biochem Biophys Res Commun, 1994, **199**: 144~ 146

17 Lemaitre B, Meister M, Govind S *et al.* Functional analysis and regulation of nuclear import of Dorsal during the immune response in *Drosophila*. EMBO J, 1995, **14**: 536~ 545

18 Rosetto M, Engstrom Y, Baldari C T *et al.* Signals from the IL-1 receptor homolog, Toll, can activate an immune response in a *Drosophila* hemocyte cell line. Biochem Biophys Res Commun, 1995, **209**: 111~ 116

The Development of Transcription Regulating of Insects Antibacterial Polypeptide. TU Yizeng, CAI Mingyng, QU Xianming (*The Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China*).

Abstract In response to bacteria or trauma, insects produce a battery of antibacterial peptide or polypeptide such as cecropin, dipterecin, attacin and defensin, the synthesis of which are induced in the fat body and secreted into the hemolymph where they act synergistically to kill the invading microorganisms. The insect host defence system shares common basic characteristics of the mammalian acute phase response, especially in the aspect of the coordinating gene expression, where similar *cis*-regulatory and inducible transactivator appear to play major roles.

Key words NF- κ B, dorsal related immunity factor, *drosophila* immunoresponsive factor, *cecropia* immunoresponsive factor

核酸内切酶在细胞凋亡中的作用

邓友平 肖培根

(中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094)
(中国协和医科大学)

摘要 核酸内切酶在形成细胞凋亡的典型特征——DNA 片段化中, 发挥着直接的重要作用. 介绍了已知的参与细胞凋亡的二价金属离子依赖性和非依赖性核酸内切酶种类, 其中二价金属离子依赖性主要有 nuc18、DNase I、Ca²⁺ / Mg²⁺ 核酸内切酶、Ca²⁺ / Mn²⁺ 核酸内切酶、DNaseV、nuc58 和 nuc40;