

内,这在很大程度上影响了叶绿体表达体系的产业化进程.近年来,中国农业科学院生物技术中心叶绿体基因工程实验室,在完善叶绿体转化体系的基础上,开始进行外源基因在叶绿体中的表达量的研究: a. 筛选可在叶绿体中诱导表达的强启动子, b. 在启动子 5' 端和终止子 3' 端进行适当修饰,以增加 mRNA 的稳定性和提高 mRNA 的翻译能力, c. 外源基因表达盒的有效串连 (一般 3 个左右), d. 通过构建带有标签抗体基因的融合表达载体,在获得稳定的转基因植株后,分离叶绿体,将其破碎,混和物经过带有此抗体的亲和层析柱,再洗脱而得目的蛋白.

4 结 论

综上所述,利用植物叶绿体作为外源基因的表达体系,是植物分子生物学发展的新思路.植物细胞中含有多个叶绿体,而每个叶绿体中又含有多个基因组拷贝.如果将外源基因导入叶绿体基因组中,并达到同质化,该基因在细胞内的拷贝数将增加到大约10 000个.增加基因拷贝数并结合使用叶绿体中表达的强启动子,可以大大提高该基因的表达量.随着生物技术的发展,叶绿体生物反应器必将得到很大应用.

参 考 文 献

1 Ort D R, Youm C F. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996. 589~ 619
2 McBride K E, Svab Z, Schaaf D J *et al.* Amplification of a chimeric bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/technology*, 1995, **13** (4): 362~ 365
3 Guda C, Daniell H. Expression of a synthetic gene for biodegradable plastics in tobacco chloroplasts. *Plant Physiol*, 1996, **111** (2): Suppl~ 56
4 Wilfrid D, Josee Pagnier, Claude Poyart *et al.* Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature*, 1997, **386** (6620): 29~ 30

Expression of Foreign Gene in Chloroplast.
FAN Guo-chang¹⁾, ZHANG Zhong-lin, QIAN Kai-xian¹⁾, SHEN Gu-fang (*Biotechnology Research Centre, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China;* ¹⁾ *Department of Biosciences and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*).

Abstract The characterizations of chloroplast expressing system were described, and research progressing was also summerized, then put forward some questions about foreign gene expression in chloroplast, and give some ideas to resolve them.
Key words chloroplast, foreign gene expressing system, homoplasmy

白介素-6 细胞因子家族新成员: 心肌营养素-1

华 平 葛忠良

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 心肌营养素-1 (cardiotrophin-1, CT-1) 是一个新发现的白介素-6 家族细胞因子, 小鼠 CT-1 的 mRNA 长约 1.4 kb, 编码蛋白由 203 个氨基酸组成, 以 gp130 和 LIFR 为受体. CT-1 对心肌细胞既有肥大诱导作用, 又有保护作用; 能改变交感神经元的递质表型, 促进多巴胺神经元、睫状神经元和运动神经元的存活; 还能抑制骨髓白血病细胞 M1 的生长; 诱导肝细胞急性相反应; 小鼠腹腔注射给药可增加血小板、红细胞记数和血红蛋白浓度.

关键词 心肌营养素-1, 白介素-6, gp130, 心肌肥大

学科分类号 Q71

1 心肌营养素-1 的发现

心肌细胞肥大是心脏最重要的适应性反应之一。近年来,在寻找介导心肌肥大形成原因的过程中,人们发现任何因素引起的心肌肥大都同时存在有胚胎标志基因心房肽(ANF)的表达增加。这提示控制心脏胚胎发育的某种调节机制可能与心肌肥大的形成有关。此外,一些研究还发现,体外培养的定向于心肌细胞发育的胚胎样小体可以表现出自发性的收缩样活性,并表达 ANF 基因。这说明胚胎组织可能合成了某种控制定向于心肌细胞生长与分化的细胞因子。并进一步提示胚胎组织有可能成为分离具有促进心肌细胞生长的细胞因子的重要来源。

1995 年,美国的 Pennica 等正是利用这一研究思路,成功地克隆了一个与心肌细胞肥大相关的细胞因子,命名为心肌营养素-1 (CT-1)。他们首先从小鼠的囊胚内层细胞团中获取全能的胚胎干细胞,在缺乏成纤维细胞饲养层的培养条件下,胚胎干细胞分化为多细胞的胚胎样小体,然后建立胚胎样小体的 cDNA 真核细胞表达性文库,利用是否具有诱导体外培养的心肌细胞体积增大这一活性,对表达文库的分泌上清进行逐级缩小性筛选,最终从约 78 万个克隆中分离到一个分子质量约 21.5 ku 的新蛋白质。

2 CT-1 分子、受体和信号传导特点

序列同源性比较及结构分析表明,CT-1 属于 IL-6 细胞因子家族。该家族细胞因子在氨基酸序列上的同源性并不高(15%~25%),但在四级结构上都含有类似的 4 个两亲性 α 螺旋。

小鼠 CT-1 的 mRNA 长约 1.4 kb,其编码蛋白由 203 个氨基酸残基组成。大鼠和小鼠的 CT-1 分子之间氨基酸序列同源性为 94%,均含有一个半胱氨酸残基。人 CT-1 编码区由三个相隔 6~7 kb 的外显子组成。荧光原位杂交和体细胞杂交结果显示人的 CT-1 基因位于第 16 号染色体 p11.1 和 p11.2 之间^[1]。

CT-1 与 LIF 交叉竞争与 M1 细胞的结合可被抗 gp130 单克隆抗体所抑制。LIF-R β 亚基的拮抗剂也可完全阻断 CT-1 对 c-fos 原癌基因的诱导,说明 CT-1 受体包含 gp130 和 LIF-R β 。CT-1 作用于心肌细胞后,能迅速诱导 gp130 与 LIF-R 的酪氨酸磷酸化反应,说明受体酪氨酸磷酸化是 CT-1 信号级联反应的第一步^[2]。

尽管 CT-1 在心肌细胞内的信号传导只需 gp130 与 LIF-R β 亚基形成异源二聚体,但 CT-1 在神经细胞内的信号传递可能需要另一 α 亚基的参与。应用交联实验发现,碘标记的 CT-1 与成神经细胞瘤 SK-N-MC 细胞结合后可形成三条分子质量分别相当于 190~210 ku、130~150 ku 和 80 ku 的标记条带。前两条分子质量较大的蛋白质可分别与 LIF-R 和 gp130 的抗体发生免疫沉淀反应,所发现的 80 ku 则类似于 CNTF 受体成分中的 α 亚基。据推测,CT-1 可能首先与 gp190 和其 α 亚基结合,然后与 gp130 偶联形成三联体。但这一假设可能要在克隆 CT-1 α 亚基之后才能得到证实^[3]。

CT-1 在胞浆内的信号传导级联反应包括 Jak1、Jak2 和 Tyk2 的活化和磷酸化。Jak 蛋白活化后,使 gp130 胞浆区的酪氨酸残基磷酸化,进而暴露出一个停靠位置,供含有 SH2 (Src 同源区 2) 结构域的信号传递分子如 APRE/STAT3 结合上去。聚集的 STAT 蛋白发生酪氨酸磷酸化反应,并形成同源或异源二聚体,然后转移到胞核,与相应的 DNA 反应元件结合,激活靶基因的转录^[3]。

3 CT-1 的生物学作用比较

有关 CT-1 生物学作用的初步研究表明,CT-1 除了对其主要靶细胞心肌细胞有肥大诱导和保护作用外,还具有多种其他生物学效应。最新报道的 CT-1 体内生物学作用表明,小鼠腹腔注射给药可增加外周血血小板、红细胞记数和血红蛋白浓度。表 1 列出了 CT-1 与 IL-6 家族其他 5 个因子在体外生物学作用上的异同。

表 1 CT-1 与 IL-6 家族其他细胞因子的生物学作用的比较

	因 子					
	IL-6	IL-11	LIF	OM	CNTF	CT-1
导致该因子发现的生物学活性	诱导 B 淋巴细胞分泌免疫球蛋白	刺激浆细胞瘤的生长	对骨髓白血病细胞的生长抑制作用	对黑色素瘤细胞系的抑制作用	促进睫状神经元的存活	诱导心肌细胞肥大
造血系统	促骨髓瘤增殖 促血小板生成 促造血祖细胞增殖 促进卵巢切除小鼠的骨吸收 抑制骨髓白血病细胞系生长	促骨髓瘤增殖 促血小板生成 促造血祖细胞增殖 促进体外培养体系中破骨细胞的形成	促骨髓瘤增殖 促血小板生成 促造血祖细胞增殖 促进体外培养体系中破骨细胞的形成 抑制骨髓白血病细胞系生长	促骨髓瘤增殖 促血小板生成 促造血祖细胞增殖 抑制骨髓白血病细胞系生长	促骨髓瘤增殖	抑制骨髓白血病细胞系生长
胚胎干细胞	无	无	维持多能性	维持多能性	维持多能性	维持多能性
肝细胞	急性相蛋白合成增加	急性相蛋白合成增加	急性相蛋白合成增加	急性相蛋白合成增加	急性相蛋白合成增加	急性相蛋白合成增加
心肌细胞	无	诱导肥大	诱导肥大	诱导肥大	诱导肥大	诱导肥大
神经元	促进胆碱能神经元存活 促进垂体激素的分泌 促进 PC12 细胞向神经元形态分化	促进一种垂体细胞系分化	促进胆碱能神经元分化 促进运动神经元和交感神经元的存活	促进胆碱能神经元分化	促进胆碱能神经元分化 促进胆碱能及运动神经元存活 促进星形胶质细胞分化	促进胆碱能神经元分化 促进胆碱能及多巴胺能神经元存活 促进运动神经元的存活

4 结 语

CT-1 是 IL-6 细胞因子家族中一个新发现的多功能细胞因子，目前有关 CT-1 基因结构、受体组成及 CT-1 对不同组织细胞的生物学作用的研究已经相继展开。该因子的克隆成功是体外生物学活性检测方法与表达文库相结合的一个成功范例。实验研究表明，这种研究思路尽管工作量大，但对那些具有分泌性表达特点和成熟的体外活性检测方法的未知蛋白的克隆是可行的。gp 130 分子在机体各器官的分布十分广泛，这也决定了 CT-1 生物学效应的广泛性，但目前的研究提示，其靶器官主要是心脏。CT-1 基因的表达最早出现在早期胚胎的心管，并一直局限于心肌组织中，直到胚胎发育的晚期，才开始表达于骨骼肌和肝脏等组织。而且在成年小鼠的心肌组织中，CT-1 仍维持高水平的表达。这些均提示 CT-1 在心

肌组织的发生、发育与分化过程中可能起着重要的作用。今后的工作将主要是加强 CT-1 生物学功能研究的深度与广度，重点是 CT-1 在心脏疾患中的病理学意义的研究。此外，CT-1 基因敲除小鼠模型的建立对进一步弄清 CT-1 在胚胎生长、形态发生以及维持成年动物体内生理性稳态中的意义将起十分重要的作用。

参 考 文 献

1 Pennica D, Swanson T A, Shaw K J *et al.* Human cardiotrophin 1 protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization. *Cytokine*, 1996, **8** (3): 183~ 189

2 Wollert K C, Taga T, Saito M *et al.* Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series via gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J Biol Chem*, 1996, **271** (16): 9535~ 9545

3 Robledo O, Fourcin M, Chevalier S *et al.* Signaling of the cardiotrophin 1 receptor: evidence for a third receptor component. *J Biol Chem*, 1997, **272** (8): 4855~ 4863

Cardiotrophin-1, the New Member of the Interleukin-6 Cytokine Family. HUA Ping, GE Zhong-liang (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Cardiotrophin-1 is a novel member of the interleukin-6 cytokine family. Mouse CT-1 mRNA is about 1.4 kb in length, and the encoded protein contains a 203-aa open reading frame. It utilizes gp130 and LIFR as the signal transducing receptor components. As a multi-functional cytokine, it induces cardiac myocyte hypertrophy and promote cardiac myocyte sur-

vival. It can induce a phenotypic switch in rat sympathetic neurons and promote the survival of dopaminergic neurons, ciliary neurons and motoneurons. It can also inhibit the growth of the mouse myeloid leukemia cell M1, and induce liver acute phase response. The chronic administration of CT-1 to mouse increases platelet counts, red blood cell counts and haemoglobin concentration.

Key words cardiotrophin-1, interleukin-6, gp130, cardiac hypertrophy