

Using Gene Trap Screen to Identify Developmentally Regulated Genes in Mammals. Zeng Yiqing, Sun Fangzhen (*Institute of Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*).

Abstract ES cells are early embryo-derived multipotential cells that can be genetically manipulated in tissue culture. Thus genetic modification can be introduced into the gene pool by injecting transfected ES cells into blastocysts. The unique advantage that ES cells offer is that

they can be screened in culture for rare genetic events prior to germline transmission and the desired genetic mutant can be produced. Recently, genes which are involved in mouse development can be identified using gene trap vectors in combination with ES cells. This new approach is very efficient for studying gene expression pattern during embryogenesis.

Key words ES cells, gene trap, developmentally regulated genes

多肽生长因子受体的研究进展

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 多肽生长因子受体是介导多肽生长因子对细胞的调控作用的膜结合糖蛋白。它们在结构上都可分成胞外区、跨膜区和胞内区三个区段。根据这些区域的结构特点, 特别是有无蛋白激酶结构域, 提出了新的分类方法; 并比较了各类生长因子受体信号转导的异同。

关键词 多肽生长因子受体, 结构, 分类, 信号转导

目前倾向于将细胞因子 (cytokine)、白细胞介素 (interleukin)、集落刺激因子 (clonystimulating factor) 等对细胞的生长增殖、分化具有调控作用的多肽, 统称为多肽生长因子^[1]。多肽生长因子受体是介导这些因子对细胞作用的关键成分。近年来基因克隆、定点突变和细胞转染等分子生物学技术手段的引入, 使得生长因子受体的研究取得了迅猛的发展。目前已经完成了 90 多种生长因子受体的分子克隆工作。

所有的多肽生长因子受体都是膜结合的 I 型糖蛋白, 它们在结构上可分成胞外的配体结合区、疏水氨基酸组成的单个跨膜区和胞内功能区; 近年来在胞内靠近跨膜区一侧, 又提出了近膜区这一概念。这些区域不同的结构特征是进行受体分类的依据。根据胞内是否含有蛋白激酶结构域, 我们将多肽生长因子受体分成

胞内含有蛋白激酶结构域的受体和胞内不含蛋白激酶结构域的受体两大类^[2]; 并进一步分成如下四类: 酪氨酸蛋白激酶型受体、丝/苏氨酸蛋白激酶型受体、造血受体超家族和 TNF 受体家族。下面按照上述分类, 对近几年来多肽生长因子受体的结构、功能的研究进展作一综述。

1 酪氨酸蛋白激酶型受体

这是最早被认识的多肽生长因子受体家族。目前已在哺乳动物中发现了 50 多种酪氨酸蛋白激酶 (TK) 受体, 除了一些生长因子如 EGF、FGF、NGF、PDGF 等的膜受体外, 还有一些结构类似的原癌蛋白。胞外配体结合区的不同特点, 使得它们分属于至少 14 种不

同的受体亚类^[3]. 表 1 总结了其中几类较大的 TK 型受体及其主要结构特征.

这些受体分子共同点是胞内的 TK 结构域. 这段长约 250 个氨基酸的激酶区, 含有至少 13 个绝对保守的残基. 其中近膜一侧的 Gly-X-Gly-X-X-Gly-X (15~20) -Lys 序列构

成了 Mg^{2+} /ATP 结合位点; 而远膜一侧的 His-Arg-Asp-Leu-Ala-Ala-Arg-Asn 构成了催化区域, 其中的 Asp 可能充当催化碱基. 对于这些受体胞外区中的结构域, 如免疫球蛋白 Ig 样重复序列、Ⅲ型层粘连蛋白 FN-Ⅲ 重复序列等的确切功能尚不清楚.

表 1 多肽生长因子受体的主要类型

类别	主要亚类	主要成员	分子结构特点
酪氨酸蛋白激酶型受体	IGF 受体家族	Ins-R, IGF-Ⅰ-R	四聚体($\alpha_2\beta_2$), 胞外的两个 α 亚基富含 Cys, Ins-R 还有 3 个 FN-Ⅲ 结构
	EGF 受体家族	EGF-R, ErbB2, ErbB3, ErbB4	单链, 胞外有两个组成相似、富含 Cys 的结构域
	FGF 受体家族	FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3, FGFR-4	单链, 胞外有 2~3 个 Ig 样结构, 并有 1 个 FN-Ⅲ 结构
	PDGF 受体家族	PDGF-R(α, β), SCF-R, MCSF-R	单链, 胞外含 7 个(VEGF-R, Flk-1)或 5 个(其他成员)Ig 样结构
	VEGF 受体家族	VEGF-R, Flk-1	单链, NGFR 胞外有 Leu 富含区域, 并有 2 个 Ig 样结构
丝/苏氨酸蛋白激酶型受体	神经营养因子受体家族	NGFR(TrkA), TrkB, TrkC	单链, NGFR 胞外有 Leu 富含区域, 并有 2 个 Ig 样结构
	Ⅰ型受体家族	TGF β R-Ⅰ, BMPR-ⅠA, ⅠB, ActR-ⅠA, ⅠB(活化素受体)	胞外有 Cys 盒结构, 胞内近膜区有 GS 结构
造血受体超家族	Ⅱ型受体家族	TGF β R-Ⅱ, BMPR-Ⅱ, ActR-Ⅱ	胞外有 Cys 盒, 胞内羧端有富含 Ser 和 Thr 的尾巴
	生长激素受体家族	GH-R, PRL-R(催乳素受体)	单链, 胞外区有两重 FN-Ⅲ 结构, 4 个保守的 Cys 残基, 胞内近膜区有 1 个 WSXWS 结构(GH-R 无 WSXWS)
	EPO-R 受体家族	EPO-R, GCSF-R	共用 β_c 亚基, 其他同上(IL3-R 有 8 个保守的 Cys)
	IL-3 受体家族	IL3-R, IL5-R, GM-CSF-R	共用 gp130, 其他同上(IL6-R 还有 1 个 Ig 样结构)
	IL-6 受体家族	IL6-R, IL11-R, CNTF-R, LIF-R	共用 IL2-R- γ_c 亚基, 其他同上(IL7-R 只有 2 个 Cys)
TNF 受体家族	IL-2 受体家族	IL2-R(α, β), IL4-R, IL7-R	胞外区有 8 个保守的 Cys 残基, 但无 WSXWS 结构
	干扰素受体家族	IFN α/β -R, IFN γ -R, IL10-R	胞外区有长约 160 个残基的 Cys 富含区, 可分成 3~4 个重复片段
TNF 受体家族		TNFR(p55, p75), LNGFR	
		糖蛋白 CD40, CD30, Fas	

注:“其他同上”指胞外有 4 个保守的 Cys 残基, 胞内近膜区有 1 个 WSXWS 结构.

除了信号通路的某些下游分子, TK 类受体的信号转导机制已基本清楚. 一般认为, 配体结合到这类受体后, 受体胞外区的构象发生变化, 引起受体在细胞膜上的迁移、聚集, 并形成寡聚化的受体-配体复合物. 复合物内相互靠近的受体胞内激酶区, 发生分子间的交叉磷酸化而使受体得以活化^[4]. 受体的寡聚化活化, 是其信号转导的前提. 寡聚化活化后的受体对胞内底物分子的亲和力增强并对它们进行磷酸化活化, 从而将生长因子结合的信号逐步传向其他环节, 经一系列级联放大反应后最终传入核内.

目前仍不清楚自身磷酸化是如何启动的. 可能是单体形式的受体本身有较低的激酶活

性, 寡聚化后它足以对周围的受体分子发生磷酸化活化; 也可能是寡聚化后相互靠近的胞内区能诱导出具升高的激酶活性的构象. 磷酸化可以发生在激酶区保守的 Tyr 上, 但更多是发生在激酶区外的 Tyr 上.

现已发现 30 多种 TK 的胞内底物或靶蛋白^[3]. 它们基本分成三类: a. 可通过磷酸化直接调节活性的酶类, 如磷脂酶 C- γ (PLC- γ)、ras GTP 酶活性蛋白 (rasGAP)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)、酪氨酸蛋白磷酸化酶 (PTP) 等; b. 一些没有催化活性的适配分子 (adaptor) 和停泊蛋白 (docking protein), 如 Grb2、IRS-1 等; c. 一些参与膜和细胞骨架重排的结构蛋白, 如张力蛋白 (tensin) 和接触

蛋白 (cortactin). 几乎所有这些 TK 的底物分子都含有 1~2 个癌蛋白 Src 同源区-2 (SH2) 和/或癌蛋白 Src 同源区-3 (SH3) 结构, 此外最近发现一些底物蛋白还含有 pleckstrin 同源区 (PH) 区结构. 晶体结构分析表明, 底物蛋白中的这些 SH2、SH3 区可折叠成非常紧凑的球形结构, 并分别独立与受体胞内磷酸化活化的酪氨酸区域 (特别是其羧端 3~6 个残基) 和富含 Pro 的区域结合.

不同的 TK 底物蛋白对受体胞内磷酸化活化的酪氨酸残基亲和力不同, 这是利用 TK 类受体的生长因子多功能性的一个重要原因. 如 PDGF β 受体激酶区外的 8 个酪氨酸残基磷酸化活化后分别负责结合 8 种不同的底物蛋白^[5]. 不同的 TK 底物蛋白被活化后, 可启动不同的信号通路. 如 PLC- γ 被活化后, 可产生第二信使二酯酰甘油和三磷酸肌醇, 分别活化蛋白激酶 C 和 Ca^{2+} ; rasGAP 的活化则可启动 ras 通路. ras 下游效应分子分别是 Raf-1、促分裂原活化蛋白激酶激酶 (MAPKK)、促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK), MAPK 可作为转录因子进入核内, 调节早期反应基因 pim-1、c-fos、c-myc 的表达^[6]. 这条通路目前已在绝大多数 TK 类受体中发现.

2 丝/苏氨酸蛋白激酶型受体

这是迄今最为复杂的受体家族, 它又是由两类结构上不太相关的 I 型受体家族和 II 型受体家族组成 (表 1). 这一受体家族的相应配体都是 TGF β 超家族的成员, 包括 TGF β 、活化素、骨形态发生蛋白 (BMP) 等, 因而又称为 TGF β 受体超家族^[7]. 它们的胞外区很短, 约为受体分子的 1/5; 并有若干 Cys 富含区. 受体胞外近膜侧都有长约 9 个氨基酸残基组成的 Cys 盒, 保守序列为 Cys-Cys-X (4~5)-Cys-Asn; 胞内有丝/苏氨酸蛋白激酶 (STK) 区域. II 型受体分子稍大一些, 其胞外区 Cys 盒上游还有 6~9 个可变的 Cys 残基, 胞内区的羧基端有一个富含 Thr 和 Ser 的尾巴; I 型受体分子间的保守性高于 II 型受体,

其胞外区 Cys 盒上游有 7 个间距保守的 Cys 残基; 胞内近膜区有一个高度保守的 Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly 序列 (GS 结构).

关于这类受体的信号转导所知甚少, 仅以 TGF β 为例说明胞内初始信号的产生机制. TGF β 有三类受体, 分别称为 I、II、III 型受体. III 型受体即 β -蛋白聚糖, 它只是结合并呈递 TGF β 配体分子, 并不直接传递信号. I 型、II 型受体虽然各自都能结合配体, 单独存在时却都没有功能, 二者在 TGF β 信号转导中缺一不可. 目前认为, TGF β 受体的信号转导需要 I 型和 II 型受体的异二聚体复合物^[7]. II 型受体是 TGF β 的原发受体, 它是组成型的具有 STK 活性的受体. TGF β 配体结合到 II 型受体后, 导致 I 型受体向 II 型受体的迁移和聚集, 形成 I 型受体-II 型受体-TGF β 复合物. II 型的 STK 激酶对 I 型受体的 GS 结构中的 Ser 残基实行磷酸化, 从而活化了 I 型受体的 STK 激酶^[8]. 后者负责对胞内底物蛋白实现磷酸化, 并将信号传递到胞内. 对于家族中的活化素受体和 BMP 受体^[9], I 型和 II 型受体的异二聚体也是信号转导的功能形式.

3 造血受体超家族

这是目前数量最大的受体家族. 由于它们的配体都是细胞因子, 又称为细胞因子受体超家族. 这类受体分子的结构特点主要集中在胞外区. 根据受体的亚基组成及是否利用公用的信号转导子, 将它们分成五个亚类^[10] (表 1). 它们的共同结构特征是胞外 4 个保守的 Cys 残基以及胞外近膜区的 Trp-Ser-X-Trp-Ser 序列 (WSXWS 结构); 从基因水平看, WSXWS 结构中两个 Ser 的密码子几乎绝对保守, 限为 AGC 和 AGT, 这是区别于其他含 WSXWS 结构的蛋白的特征.

这类受体的胞内虽不含蛋白激酶区, 但在胞内近膜区有较低的相似性. 如在绝大多数受体近膜区中发现了富含 Pro 的“盒 1”结构, 其保守序列为 Al-Ar-Pro-X-Al-Pro-X-Pro 或 Ar-X-X-X-Al-Pro-X-Pro (Al 为脂肪族氨基酸, Ar

为芳香族氨基酸)。胞内的近膜区对受体的功能和致有丝分裂作用 (mitogenesis) 密切相关。此外, 胞内远膜一侧也有一定的相似性。

人们早已知道, 虽然这类受体不含蛋白激酶结构域, 利用这类受体的细胞因子也能很快诱导胞内底物蛋白及受体本身的酪氨酸磷酸化。通过定点突变, 人们发现这类受体偶联配体结合和蛋白酪氨酸磷酸化的能力需要胞内近膜区的序列。现已证明, 这种偶联作用是通过该近膜区结合并活化胞内 JAK 蛋白激酶家族而实现的^[11]。JAK 是胞内的一类新型酪氨酸蛋白激酶, 其分子量为 120~140 ku, 不含任何 SH2 或 SH3 结构, 并含有两个相连的激酶结构域, 其中羧端的结构域是具有催化活性的酪氨酸蛋白激酶, 而氮端的结构域缺乏几个为催化活性所必需的残基, 可能没有激酶活性, 其功能尚不确定。目前已经发现了四种 JAK 家族的成员, 它们负责结合不同的细胞因子受体。最新研究表明, 与 JAK 结合的是胞内近膜区的“盒 1”结构^[12]。

对于生长激素受体亚类 (单亚基受体), 配体结合后引起受体的二聚化活化, 导致受体胞内近膜区对 JAK2 蛋白激酶的亲和力增强, 并使其结合到配体-受体复合物上。JAK2 上自身磷酸化位点的交叉磷酸化使其蛋白激酶活性得以活化, 从而对胞内底物蛋白和受体分子实现磷酸化。对于多亚基的受体系统, 情况比较复杂, 配体结合后可激活 2~3 种 JAK 蛋白, 它们与受体形成异多聚复合物。

近年来在胞内还发现了一类新的转录因子, 称为信号转导子和转录激活子 (signal transducer and activator of transcription, STAT), 它们可将细胞因子的信号从受体直接传递到细胞核内, 从而调节特定基因的表达。这是一种新型的信号传导通路^[13]。STAT 是一个正逐渐被认识的蛋白家族, 目前至少已经发现了 6 个结构相似的成员。STAT 的分子量为 85~115 ku, 分子间高度保守的是羧端的 SH2 结构和 SH2 结构羧端的 Tyr 残基, 此外还有保守性不高的 SH3 结构, 分子内尚未发

现保守的 DNA 结合区。STAT 蛋白的活化需要磷酸化和二聚化。活化过程中 STAT 先与受体短暂结合, 二聚化后离开受体, 穿过核膜并结合到特定序列的 DNA 上。已经证明, STAT 可作为 JAK 的直接底物而被磷酸化活化^[14]。

磷酸化活化的 JAK 除了直接活化 STAT 将信号传向核内, 还能通过磷酸化活化受体, 使含 SH2 结构的适配分子 (如 SHC 和癌蛋白 Src 激酶家族等) 或酶结合到受体胞内的远膜区, 启动其他信号通路^[9]。如 SHC 的结合和磷酸化活化可以启动经典的 ras 通路, 这是大多数细胞因子所共同的; 而造血细胞磷酸化酶 (HCP) 的结合则使受体和配体发生解离。

4 TNF 受体家族

该家族的成员不多, 除了两个 TNF 受体 (p55 和 p75) 和低亲和力 NGF 受体 (LNGFR) 外, 还有一些结构类似的跨膜糖蛋白^[15], 它们的结构特点见表 1。家族中的胞外区的重复序列可能是从较小的祖先分子通过基因复制进化而来的。此外, p55 和 Fas 的胞内区各有一个致死结构, 可能与 TNF 的细胞毒性有关。

TNF 受体家族的信号机制尚不清楚。TNF α 和 TNF β 都以三聚体形式存在。TNF β 与 p55 复合物的晶体结构分析表明, 配体结合可引起受体的三聚化。这表明 TNF 受体很可能也是通过寡聚化而活化的。TNF 的信号转导可能需要 G 蛋白、丝氨酸激酶和酪氨酸激酶的参与^[16]。最近在胞内发现了一类新型分子 TRAF (TNF 受体相关因子), 它们能与 p75 的胞内区结合, 可能充当 TNF 受体的信号转导子^[17]。但 TRAF 的活化方式、下游的效应分子及在整个受体家族的适用性尚需进一步验证。

5 多肽生长因子的共同信号通路

多肽生长因子受体活化后, 在细胞内启动多种反应, 包括蛋白激酶活化、蛋白质磷酸

化、 Na^+/H^+ 离子交换和 Ca^{2+} 内流、蛋白质和 DNA 合成增加等, 最终导致细胞生长、分化和分裂。以前人们认为, 生长因子及其受体在细胞内的信号系统是一个复杂的信号网络。但最近人们发现多肽生长因子受体信号通路的许多相似之处。

从上述四类受体的活化不难发现, 配体的结合引起了受体的寡聚化活化。寡聚化组装既有精确性, 又不失灵活性。受体的寡聚化很可能是受体活化的普遍机理^[5]。

最近发现, 利用 TK 类受体的生长因子, 如 EGF、PDGF、M-CSF, 也能激活 STAT 蛋白家族的成员 (STAT1 和/或 STAT3)^[18]。目前尚不清楚 STAT 是被 TK 直接激活还是通过 JAK 间接活化的。从目前的了解看, JAK-STAT 信号通路和经典的 ras 通路至少是 TK 类受体和细胞因子受体的共同信号通路^[14] (图 1)。当然, 这一模型还需其他受体的进一步验证。

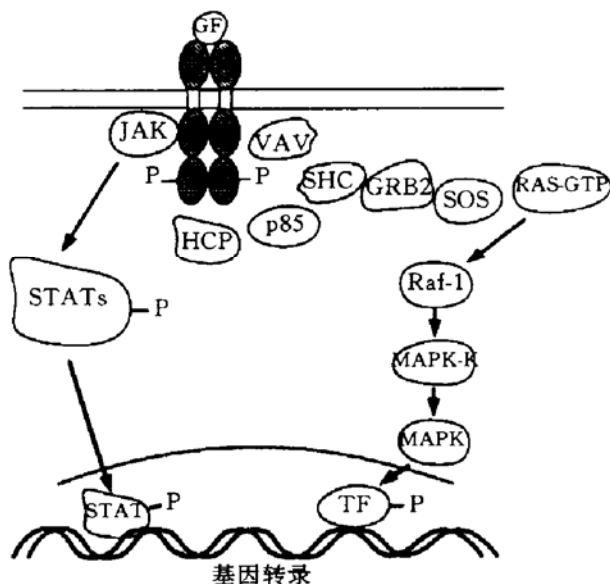


图 1 生长因子的可能共同信号通路

参 考 文 献

- 1 Sporn M B, Roberts A B. Peptide growth factor and their receptors. Berlin: Springer-Verlag, 1990: 1~25
- 2 孙志贤主编. 现代生物化学理论与研究技术. 北京: 军事医学科学出版社, 1995: 117~141
- 3 Geer P, Hunter T, Lindberg R A. Annu Rev Cell Biol,

1994; 10: 251

- 4 Ullrich A, Schlessinger J. Cell, 1990; 61: 203
- 5 Heldin C H. Cell, 1995; 80: 213
- 6 Marshall C J. Cell, 1995; 80: 179
- 7 Massague J, Attisano L, Wrana J L. Trends in Cell Biol, 1994; 4: 172
- 8 Wrana J L, Attisano L, Wieser R *et al.* Nature, 1994; 370: 341
- 9 Rosenzweig B L, Imamura T, Okadome T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92: 7632
- 10 Ihle J N, Witthuhn B A, Quelle F W *et al.* Annu Rev Immunol, 1995; 13: 369
- 11 Taniguchi T. Science, 1995; 268: 251
- 12 Tanner J W, Chen W, Young R L *et al.* J Biol Chem, 1995; 270: 6523
- 13 Schindler C. Receptor, 1995; 5: 51
- 14 Ihle J N, Kerr I M. Trends in Genet, 1995; 11: 69
- 15 Smith C A, Farrah T, Goodwin R G. Cell, 1994; 76: 959
- 16 Foxwell B M J, Barret K, Feldmann M. Clin Exp Immunol, 1992; 90: 161
- 17 Rothe M, Wong S C, Henzel W J *et al.* Cell, 1994; 78: 681
- 18 Darnell J E J, Kerr I M, Stark G R. Science, 1994; 264: 1415

Progress in the Studies of Peptide Growth Factor Receptors. Long Jianyin, Wang Huixin (Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract Peptide growth factor receptors are membrane-bound glycopeptides that regulate the action of peptide growth factors on their target cells. Their peptide backbones could be divided into three segments: extracellular region, transmembrane region and intracellular region. According to the structural characteristics in these regions, especially the existence of protein kinase domain in the intracellular region, a new method of peptide growth factor receptors classification is postulated. The signal transduction pathways of these receptors are also compared.

Key words peptide growth factor receptors, structure, classification, signal transduction