

个峰值为单体 IL-6, 另一个则为双体 IL-6. 双体 IL-6 能与 IL-6 受体结合, 而且与受体结合亲和力高于天然的单体 IL-6.

如果在含有 IL-6 受体的细胞株中先加入双体 IL-6, 再加入高至 70 倍浓度的天然单体 IL-6 也不能竞争抑制双体 IL-6 与受体的结合. 但双体 IL-6 与单体 IL-6 在生物学活性方面差别并不大, 这一研究的意义还有待于进一步证实^[10]. 本室在现有的工作基础上, 成功地高效表达了人双体 IL-3 嵌合分子, 初步的活性结果表明, 双体 IL-3 对人骨髓细胞的集落刺激作用高于单体 IL-3 的作用. 这为开发新的高效造血因子提供了基础.

5 结 语

现有证据表明, 当细胞因子的嵌合分子做为一个单独的配体分子形式与受体结合时, 它可引起两个受体分子发生交联, 而受体分子形成同源双体或异源双体这对穿膜区的信号传导是非常重要的^[11]. 因此, 融合分子通过受体交联而引起一系列的生物学效应, 但这种效应的发挥与融合分子是否能形成各自正常的空间结构是紧密相关的. 如果两种细胞因子肽链之间发生相互作用而折叠在一起, 不能形成其天然的空间构型, 则将影响融合分子与受体的结合, 从而影响其生物学活性的发挥.

近几年来, 细胞因子在临床上得到了越来越

广泛的应用, 在肿瘤、感染、造血障碍等疾病中收到了良好的疗效. 因为机体很多功能是由细胞因子共同作用、共同协调的, 因此开发的新一代细胞因子融合分子可能更高效地发挥其药理学作用, 为临床疾病治疗提供新的有效药物, 同时为细胞因子与受体间的相互作用机制、细胞因子结构与功能间的关系等方面的研究奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Kiyokawa T, Wihams D P, Snider C *et al.* Protein Engineering, 1991; 4 (4): 463
- 2 Lee-Fong L, Murphy J R. Protein Engineering, 1991; 4 (8): 989
- 3 Aulio P, Alcamì J, Popoff M R *et al.* EMBO J, 1992; 11 (2): 575
- 4 Zwirner J, Weissenhorn W, Karlsson L *et al.* J Immunol, 1992; 148 (1): 272
- 5 智 刚, 候云德, 张德震等. 生物化学杂志, 1991; 7 (1): 89
- 6 Seno M, Hinuma S, Onda H *et al.* FEBS Lett, 1986; 199 (2): 187
- 7 Benson M, Hinuma S, Onda H *et al.* PNAS, 1991; 88: 5809
- 8 Kitamura T, Sato N, Arai K *et al.* Cell, 1991; 66: 1165
- 9 马大龙, 狄春辉, 庞 建等. 高技术通讯, 1991; 11: 26
- 10 Wijdenes J, Clement C, Klein B *et al.* Molec Immun, 1991; 28 (11): 1183
- 11 Kruse N, Tong H-P, Sebald W. EMBO J, 1992; 11 (9): 3237

vWF 的结构与功能

钱丽清 龚国胜* 吴圣楣

(上海儿科医学研究所, 上海 200092)

摘要 vWF 是体内一种分子量很大的糖蛋白, 其功能单位是 vWF 单体, 能与 Gp I b, Gp II b-III a, 胶原, FVIII 和肝素等结合而参与凝血与止血, 其缺陷将引起血管性假血友病.

关键词 vWF, 结构, 功能

血管性假血友病因子(von Willebrand factor, vWF)由血管内皮细胞及巨核细胞合成和分泌,是一种存在于血浆、内皮细胞表面和血小板 α 颗粒的糖蛋白^[1-3].体内vWF主要是以二硫键相连的二聚体形式存在,但也可聚合成多聚体,分子量高达百万至千万以上,其缺陷将引起血管性假血友病(von Willebrand disease, vWD)^[4].vWF可与胶原及血小板膜糖蛋白Gp I b和Gp II b-III a结合,在血小板粘附与聚集中起重要作用,与FVIII的结合使FVIII活性变得稳定.除此之外,vWF还可与肝素、培养的内皮细胞及平滑肌细胞基质结合.其基因位于12号染色体短臂(12P¹²),52个外显子长178kb,占人12号染色体近0.1%组成,最小的外显子长40kb,最大的外显子长1.4kb,后者编码整个A1及A2区,是vWF的重要功能区,也是vWD突变部位所在^[4,5].

1 vWF的结构

vWF cDNA全长8900bp^[4,5],有一个编码2813个氨基酸残基的阅读框架,其产物是309kD的vWF前体,首端的22个氨基酸残基是典型的信号肽,其后744个残基是81kD的vWAg II(图1),这个蛋白在内皮细胞内切下来,与vWF一起贮存在Weibel-Palade氏体,在巨核细胞和血小板 α 颗粒也存在.vWAg II的具体功能不清楚,可能与多聚体的形成有关,在有些vWD中有vWAg II的缺失.有趣的是,它含有一个Arg-Gly-Asp(RGD)序列,这个序列存在于Gp II b-III a结合蛋白内.vWF前体C端2050个氨基酸残基是成熟vWF.

成熟vWF含有2050个氨基酸残基($^{1-2050}_{\text{Ser-Lys}}$),有5种不同的结构区:A区含有193—220个氨基酸残基,有3个连续拷贝A1,A2和A3,位于肽段 $^{497-1111}_{\text{Glu-Gly}}$;B区含25—35个氨基酸残基,有2个拷贝,位于肽段 $^{1533-1636}_{\text{Cys-Val}}$;C区含116—119个氨基酸残基,也有2个拷贝,位于肽段 $^{1637-1899}_{\text{Asn-Lys}}$,两个D区分布

于A区的两侧,位于肽段 $^{79-367}_{\text{Val-Cys}}$ 及 $^{1171-1440}_{\text{Val-Cys}}$,近N端还有与D区有部分同源性的D'区,含46个氨基酸残基,位于肽段 $^{25-70}_{\text{Cys-Gly}}$.vWF的结构如图1示.Cys残基在分子中的分布类似于FVIII及FV主要集中于分子的两侧,A区仅有6个Cys残基,而两侧B区及D'区却有163个Cys残基.vWF单体通过稳定的C段二硫键相连成二聚体,二聚体再通过N端较弱的二硫键形成多聚体.单体是其功能的结构基础,多聚体只是同时提供多个相同功能的重复拷贝以提高其功能.vWF单体中有22个糖基化位点,其中12个是Asp,10个是Thr,与Cys残基分布相似,它们大多位于分子的两端,而在肽段 $^{916-1469}_{\text{Thr-Asn}}$ 之间有一个大的间区,其中8个Thr糖基化位点位于肽段 $^{300-485}_{\text{Thr-Thr}}$ 及 $^{705-724}_{\text{Thr-Thr}}$ 内.

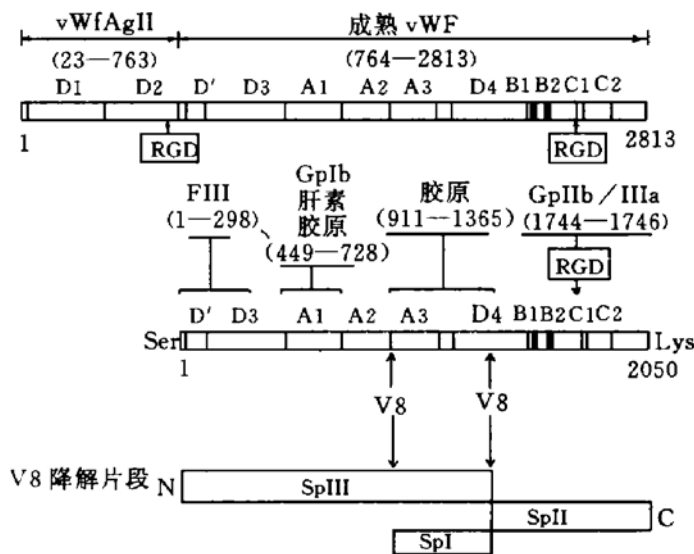


图1 vWF的结构与功能结合区

有人对碳水化合物侧链尤其是唾液酸的作用进行了研究,把经唾液酸苷酶催化后形成的唾液酸-vWF加到血小板丰富的血浆中,它能使血小板聚积,而这种反应与瑞斯托霉素无关^[6-8].应用抗Gp II b-III a单克隆抗体发现唾液酸-vWF随机性与Gp I结合,导致血小板的激活与释放并使Gp II b-III a暴露于膜的表面,接着在Ca²⁺存在的条件下,纤维蛋白原和唾液

酸-vWF 竞争性与暴露于膜表面的 Gp II b-III a 结合, 结果导致血小板聚积^[9, 10]. 在先天性纤维蛋白原缺陷病人, vWF 可代替纤维蛋白原与 Gp II b-Gp III a 结合同样可使血小板聚积. 但唾液酸-vWF 是否是通过这种机理在血小板间起桥梁作用仍然存在争论.

2 vWF 的功能

在瑞斯托霉素存在的条件下, vWF 能与血小板膜 Gp I b 结合引起血小板粘附与聚积. 在 Bernard 综合症, 由于血小板缺乏 Gp I b, vWF 不能与血小板结合. vWF 的一个 116kD 的胰蛋白酶含 A1 区的水解片段能够抑制瑞斯托霉素引起的血小板聚集. 对这一片段进一步降解到 53—55kD 的多肽, 它仍具有相似的功能. 金黄色葡萄球菌蛋白酶 V8 从 D4 区把 vWF 切两个肽段, 即 N 端的 Sp III (Ser^{1-1365}) 和 C 端的 Sp II ($\text{Glu}^{1366-2050}$)^[11, 12] (图 1). Sp III 含有 Gp I b 及胶原的结合位点. 用枯草杆菌蛋白酶把 Sp III 降解成 33 和 28kD 片段, 它们仍能与血小板或胶原结合^[13]. 最近, vWF 的一个胰蛋白酶水解的 48/52kD 二聚体能与 Gp I b 结合, 它能够抑制瑞斯托霉素诱导的 vWF 或唾液酸-vWF 引起的血小板聚集. 另外, 用蛋白酶去掉 48/52kD 二聚体的 C 端产生一 46kD 片段与 48/52kD 二聚体一样具有与血小板 Gp I b 结合的能力, 这一 46kD 片段来源于 vWF 肽段 $\text{Val}^{449-728}$ ^[13].

凝血酶或 ADP 刺激的血小板能与 vWF 结合, 这是通过另一个糖蛋白 Gp II b-III a 而起作用的. Glanzmann 血小板功能不全的病人, 由于 Gp II b-III a 缺陷, 凝血酶不能促成这种结合. 可见, vWF 可通过两个膜结合位点即 Gp I b 和 Gp II b-III a 与血小板结合, 前者主要涉及到血小板与血管壁的粘附; 后者主要是血小板聚集时在血小板间起桥梁作用, 在 vWD 时有缺陷. vWF 的金黄色葡萄球菌蛋白酶 V8 的水解片段 Sp I 能与凝血酶激活的血小板结合. Sp I 的嗜热菌蛋白酶水解片段 80kD 二聚

体与 Gp II b-III a 的结合能被特异性抑制 vWF 与 Gp II b-III a 结合的单克隆抗体所阻断^[14]. 用胰蛋白酶对 vWF 进行降解, 产生一系列片段, 其中最小的一个 80kD 片段能与上述单克隆抗体反应, 同时这个片段也能与能识别 vWF C 末端的单抗反应^[15]. 这些资料皆说明结合区不是位于 vWF C 端大于 40kD 区域. vWF 与 Gp II b-III a 的结合能特异性被多肽 Arg-Gly-Asp (-Ser) 《-RGD (S)》阻断^[16, 17], 含有这一序列的多肽也能抑制纤维结合蛋白和纤维蛋白原与血小板膜 Gp II b-III a 的结合, 这一序列在 vWF 也存在, 位于肽段 $\text{Arg}^{1744-1746}$ Asp, 距 C 端约 300 个残基. 很有可能, 这一序列也是 vWF 结合 Gp II b-III a 的结合位点^[18].

vWF 与胶原结合在止血中显得重要, 暴露于血流的胶原引起血小板的粘附与聚集, 起到有效的止血作用. vWF 与胶原的结合区域位于金黄色葡萄球菌蛋白酶 V8 水解片段 Sp III 上. 同样, 通过胰蛋白酶水解证实, 胶原结合区位于分子 C 端 240kD 水解片段, 对后者进一步降解到 48kD, 它还能与胶原结合^[12]. 用枯草杆菌蛋白酶对 Sp III 进一步降解产生两个能与胶原结合的 23kD 及 26kD 片段. 从这两种酶的水解片段分析可以推断胶原结合区位于 Gp I b 与 Gp II b-III a 结合区之间^[14]. 除 Sp I, Sp III 外, 来源于 Sp III C 端的一个较小的 Sp I 片段也能与胶原结合, 于是胶原的结合位点定位于肽段 $\text{Gly}^{911-1365}$ ^[19]. 与上述结果矛盾的是胰蛋白酶水解的 52/48kD 片段 ($\text{Val}^{449-728}$) 含有胶原结合区, 这一片段与含有 Gp I b 结合区的片段相同^[20]. 最近, 用溴化氰降解 vWF, 2 个溴化氰肽段 ($\text{Glu}^{542-622}$ Met, $\text{Lys}^{948-998}$ Met) 能够抑制 vWF 与 III 型胶原的结合, 同时也能直接与胶原结合. 能抑制 vWF 与 III 型胶原结合的单抗能选择性与二个溴化氰肽段结合, 这二个肽段分别含有 A1, A3 重复序列. 它们都与 vWF 与胶原的结合有关^[21].

vWF 与血管壁的结合不仅仅是有赖于血管壁 III 型及 I 型纤维蛋白胶原, 还可能通过内

皮细胞及平滑肌细胞基质而起作用. 体外证明能抑制 vWF 与胶原结合的抗 vWF 单克隆抗体并不影响 vWF 与内皮细胞及平滑肌细胞基质的结合; 反之, 能抑制 vWF 与内皮细胞及平滑肌基质结合的抗 vWF 单抗对 vWF 与胶原的结合没有影响. 这些资料表明, vWF 与细胞基质的结合还存在一个不明的机制. 至于 vWF 与培养的细胞基质结合的区域, 现在知道的尚少, 可能位于 C 端—80kD 片段内^[22], 但没有更精确的实验数据.

vWF 还可与肝素结合, 其结合区位于金黄色葡萄球菌蛋白酶 V8 水解片段 Sp III 内^[12], 最近的研究进一步证明该结合区域位于肽段^{449—728} Val—Lys, 它同时含有 Gp I b 及胶原结合区^[23].

vWF 与 FVIII 结合可使 FVIII 活性稳定, 其部位位于 FVIII—80kD 轻链内^[24]. 据说 vWAg II 是 FVIII 结合的唯一受体^[25], 这一结论是化学计算推导得出的. 平均每 100 个 vWF 单体结合一个 FVIII, 而 vWAg II 约占 vWF 链组成的 1%. 而 vWF 能与 12—15 倍的正常量 FVIII 结合, 如果 vWAg II 是 FVIII 的唯一受体, 这似乎是不可能的. 实验证明成熟 vWF N 端部分^{1—272} Ser—Arg 是 FVIII 结合的位点.

参 考 文 献

- 1 Jaffe E A, Hoyer L W, Nachman R L. J Clin Invest, 1973; **52**: 2757
- 2 Nachman R, Levine R, Jaffe E A. J Clin Invest, 1977; **60**: 914
- 3 Wagner D D. Annu Rev Cell Biol, 1990; **6**: 217
- 4 Ginsburg D, Watter Bowie E J. Blood, 1992; **79**: 2507
- 5 Verweij C L, de Vries C J M, Distel B *et al*. Nucleic

- Acads Res, 1985; **13**: 4699
- 6 Vermynen J, Donati M B, de Gaetano F *et al*. Nature, 1973; **244**: 167
- 7 Vermynen J, de Gaetano F, Donati M B *et al*. Br J Haemato, 1974; **126**: 645
- 8 Vermynen J, Bottechia D, Szpilman H. Br J Haemato, 1976; **134**: 321
- 9 DeMarco L, Girolami A, Russell S *et al*. J Clin Invest, 1985; **75**: 1198
- 10 Gralnick H R, Williams S B, Collier B S. J Clin Invest, 1985; **75**: 29
- 11 Demarco L, Girolami A, Zimmerman T S *et al*. J Clin Invest, 1986; **77**: 1272
- 12 Sixma J J, Sakariassen K S, Stel H V *et al*. J Clin Invest, 1984; **74**: 736
- 13 Girma J-P, Kalafatis M, Titani K *et al*. Biochemistry, 1986; **25**: 3156
- 14 Girma J-P, Kalafatis M, Pietu G *et al*. Blood, 1986; **67**: 1356
- 15 Fujimura Y, Titani K, Holland L Z *et al*. J Biol Chem, 1986; **261**: 381
- 16 Plow E F, Pierschbacher M D, Ruoslahti E *et al*. Proc Natl Acad Sci USA, 1985; **82**: 8057
- 17 Haverstick D M, Cowan J F, Yamada K M *et al*. Blood, 1985; **66**: 946
- 18 Vereij C L, Diergaarde P J, Hart M *et al*. EMBO J, 1986; **5**: 1839
- 19 Kalafatis M, Takahashi Y, Girma J P *et al*. Blood, 1986; **68**: 348
- 20 Pareti F I, Gujimura Y, Girma J P *et al*. J Biol Chem, 1986; **261**: 15310
- 21 Roth G J, Titani K, Joyer W *et al*. Biochemistry, 1986; **25**: 8357
- 22 de Groot PhG, Sixma J J. Proceedings Annecy, 1986
- 23 Fujimura Y, Titani K, Holland L Z *et al*. J Biol Chem, 1987; **262**: 1734
- 24 龚国胜, 陈 竺, 王振义. 遗传, 1993; **15** (1): 41
- 25 Fay P J, Kawai Y, Wagner D D *et al*. Science, 1986; **232**: 995

Current Researches on Recombinant Fusion Proteins Comprising Dimeric Cytokines. Liu Jie, Ma Dalong. (*Department of Immunology, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 194

Cytokines play an important role in the immune regulation. Among the different cytokines, there can be either synergy or suppression effects. Based on the network effects of the cytokines, researchers have designed and constructed by genetic engineering and protein engineering techniques some novel cytokines comprising dimeric cytokine proteins, which exhibited multiple bioactivities. Such molecules could be used for the researches on the immune regulation as well as the clinical applications.

Key words cytokine, protein engineering, fusion protein

The Structure and Function of vWF. Gong Qian Liqing, Guosheng, Wu Shengmei. (*Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 196

von Willebrand factor (vWF) is a high molecular weight multimeric glycoprotein and is absent or abnormal in von Willebrand disease (vWD). The essential information for its function resides in the monomer. vWF participates in thrombosis and haemostasis through interacting with Gp I b, Gp II b-III a, collagen, FVIII and heparin.

Key words vWF, function, domain

The Contractile Proteins and Regulatory Mechanism of the Crustacean Striated Muscle. Chen Ming, Zhong Yongmei. (*Shanghai Insti-*

tute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 200

Myofilament arrangement, contractile proteins, and Ca^{2+} -dependent regulatory mechanisms between the crustacean and vertebrate striated muscles are different. The ratios of the thick to thin myofilament of vertebrate striated, crustacean fast and slow muscles are 1 : 2, 1 : 3 and 1 : 6 respectively, as well as the myofilament arrangement also differ from one another. The molecular assembly of the crustacean thick myofilament composes of myosin and paramyosin are different from that of the vertebrate striated muscle. The thin myofilament comprises actin, tropomyosin, and troponin. The molecular weight of troponin T is relatively high, and troponin C has only single Ca^{2+} -binding site. The thin and thick myofilament regulatory mechanisms coexist in the crustacean striated muscle.

Key words striated muscle, myofilament arrangement, contractile proteins, thick myofilament regulation, thin myofilament regulation

The Past and Present of Investigation on Plant Actins. Liu Xiong, Yan Longfei. (*College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (3): 203

Actin widely occurs in plant cells as an important cytoskeleton element. It is involved in many key cellular activities. The structure, function and properties of plant actin are described here.

Key words actin, plant microfilament, intracellular movement

Crystal Growth of Membrane Proteins. Zou