

3 彭敬, 梁云燕, 石永进. 两种第二信号系统在胃癌 MGC803 细胞增殖分化调节中的相互关系. 实验生物学报, 1993, **26** (3): 187~ 195

4 Grana X, Reddy E P. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, CDKs, growth suppresser genes and CKIs. *Oncogene*, 1995, **11**: 211~ 219

5 梁云燕, 王代树, 方家春. 一种高效率细胞同步化技术的改良与运用. 细胞生物学杂志, 1991, **13** (3): 137~ 140

6 Jacobsen A. Cellular cyclic AMP content independent of ascites tumor growth rate *in vivo*. *Eur J Cancer*, 1975, **11**: 203~ 204

7 Wolfman A, Macara I G. Elevated levels of diacylglycerol and decreased phorbol ester sensitivity in ras-transformed fibroblasts. *Nature*, 1987, **325**: 359~ 361

8 Plet A, Brion D E, Gerband P. Retinoic acid-induced rapid loss of nuclear cyclin AMP-dependent protein kinase in tetrastocarcinoma cells. *Cancer Res*, 1987, **47**: 5831~ 5834

9 Darbon J M, Feassus M I, Bayand F. Phorbol esters induce both intracellular translation and down regulation of protein kinase C in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, **137** (3): 1359~ 1366

10 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1953, **193**: 265~ 275

11 彭敬, 方家春, 王代树. 环六亚甲基双乙酰胺对人胃癌 MGC80-3 细胞诱导分化及 PKA-R II 与 PKC- α 亚基在细胞分布的变化. 生物物理学报, 1993, **9** (2): 196~ 202

12 王代树, 梁云燕, 彭敬. 在人胃癌 MGC80-3 细胞中 PKA-R II 和 PKC- α 两套信使激酶系统亚类对 *c-myc* 和 *c-H-ras* 表达的共调作用关系. 实验生物学报, 1996, **29** (3): 197~ 205

13 Andrey A. Cyclin AMP and regulation of gene expression. *Trends in Biochemical Sciences*, 1985, **10**: 97~ 98

14 Kiyokama H, Ichons V M, Rifkind R A *et al*. Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol*, 1994, **14** (11): 7195 ~ 7203

15 Constantinou A I, Squinto S P, Jungmann R A. The phosphoform of the regulatory subunit R II of cyclic AMP dependent protein kinase possesses intrinsic topoisomerase activity.

Cell, 1985, **42**: 429~ 437

16 Chefonleas J G, Boydoll W E, Means A R. Calmodulin and the cell cycle: involvement in regulation of cell cycle progression. *Cell*, 1982, **28**: 41~ 50

Effects of HMBA on cAMP-PKA and DAG-PKC Signal Pathways in the Cell Cycle of MGC80-3 Cells. GU Shanqing¹⁾, LIANG Yunyan, WANG Yuemin¹⁾, LI Baoyuan, WANG Jun, MA Yan, WANG Daishu (*Department of Cell Biology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034, China; ¹⁾ Laboratory of Oncology, Qingdao No. 6 People's Hospital, Qingdao 266033, China*).

Abstract Modulation of HMBA on cAMP-PKA and DAG-PKC signal pathways in the cell cycle of MGC80-3 cells showed that: 1. there were positive and negative regulation between them; 2. signal regulation was different in the cell cycle. G1 phase was the most sensitive one among the four phases, cAMP level and PKA activity were increased by 102% and 348%, respectively, as compared with the control; while DAG content and PKC activity were decreased by 51.45 and 32.3%, respectively, as against the control. G2 phase was the second sensitive phase. Effects of HMBA on the signal regulation in M phase were not found. Changes of signal transduction in S phase were different to others.

Key words cell cycle, signal transduction, HMBA

人白介素 6 受体胞外区三维结构的同源模拟*

孙涛 任蕴芳¹⁾ 鲁中正²⁾ 李松²⁾ 焦克芳²⁾ 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 IL-6 受体是造血因子超家族成员, 其胞外区细胞因子结合结构域 (CBD) 是受体结合配基和偶联 gp130 转导 IL-6 信号的功能域. 据预测, IL-6R 功能域的 β 片层折叠模式和人生长激素受体 (hGH-

* 国家自然科学基金资助课题 (39480025). ¹⁾ 论文撰写人.

²⁾ 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850. 收稿日期: 1996-07-23, 修回日期: 1996-12-05

R) 及 CD₄ 的晶体结构十分相似. 应用计算机同源模拟技术, 以 hGH-R 和 CD₄ 的三维结构为模板, 模建了 hIL-6R 功能域 (106~ 322 位) 的三维结构, 初步描述了其结构保守区的构象特征. 文章研究模建的 hIL-6R 三维结构模式为探讨可溶性 IL-6R 点突变的结果, 以及进行三维定量分析 IL-6R 胞外区功能域的构效关系提供了空间结构基础.

关键词 白介素 6 受体, 功能域, 同源模拟

白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 是一种典型的多功能细胞因子, 在免疫调控和机体防御中起重要作用, 而且 IL-6 的失调产生与临床上一些重要疾病的发生和转归密切相关. IL-6 的多种生物学效应都是通过靶细胞膜上的 IL-6 受体 (IL-6R) 来介导的. IL-6 发挥作用的第一步是结合到专一的 IL-6R 上, 进而与信号转导子 gp130 偶联, 把 IL-6 的信号传到胞内. 本文应用计算机图形同源模拟技术模建人 IL-6R 胞外区功能域的三维结构, 对阐明 IL-6R 功能域的构效关系和 IL-6R 胞外区结构修饰的生物学意义有重要价值, 也为研制 IL-6R 拮抗剂提供结构信息.

尽管近年对 IL-6R 功能域的空间结构预测有所报道, 但用 X 射线衍射晶体学方法或多维核磁共振方法来测定 IL-6R 功能域的三维结构尚未得以实现. 近年来发展起来的利用同源蛋白质的立体结构为模板进行空间结构的同源模建 (homology modeling) 是一种较为行之有效的途径.

人 IL-6R 和人生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR)、IL-4R 等均属于造血因子受体超家族, 该家族成员不仅具有高度的一级结构保守区, 而且具有空间结构的相似性^[1]. hIL-6R 的功能域正是该家族的保守结构域“细胞因子结合结构域” (the cytokine binding domain, CBD). 鉴于 GHR 胞外区 (hGHbp) 和人生长激素 (GH) 结合的复合物 hGH· (hGHbp)₂ 的三维结构已经用 X 射线衍射晶体学方法得以测定^[2], 而且作为受体相应配基的 GH 和 IL-6 的三维结构十分相似 (均为 4 股 α 螺旋结构的蛋白质)^[3], 这就使得我们应用同源模建技术来预测人 IL-6R 胞外区功能域的三维结构成为可能.

此外, 已有研究证明造血因子受体超家族成员之一的 IL-4R 的 β 片层的折叠拓扑学 (the folding topology) 与细胞表面粘附分子 CD₄ 的晶体结构中所见相同^[4], 而且 hGHbp 的 β 片层的折叠类似于 CD₄ 的第二个串形亚基的结构域 2^[5]. 因此, 我们不仅可以将 GHR 作为模板蛋白, 而且可将 CD₄ 的结构域 2 作为参照蛋白来进行人 IL-6 三维结构的计算机图形模拟研究.

1 模建方法

1.1 用“模式匹配”方式确定序列保守区

对 hIL-6R、hGHR、CD₄ 进行多序列对比 (alignment)^[6], 再用 CAMELEON 软件分别将 hIL-6R 和 hGHR、hIL-6R 和 CD₄ 进行“序列的双亲性模式匹配”, 确定其匹配序列 (the alignment sequence), 计算对比序列块的统计分数认为 hIL-6R 胞外段 CBD 和 GHR 的序列保守区 (sequence conservative region, SCR) 有 37% (复盖 74 个氨基酸残基).

1.2 同源模建 hIL-6R 主链的三维结构

分别以 GHR 和 CD₄ 的 β 片区为模板, 借助于 BIOSYM 软件, 根据 hGHR 或 CD₄ 保守区中的三维结构坐标, 为 hIL-6 的保守区残基赋坐标, 建立起 hIL-6R 主链 (骨架) 的三维结构.

1.3 联结 β -折叠股的 loop 区构象

对两个保守区之间的无规卷曲 loop 区 (即非保守区主链结构), 则参考 Chothia 等的规范法则, 将每个 loop 从蛋白质数据库 (PBD) 中进行选择, 使 loop 的末端和所联结的片层之间的构象具有最小的 rms 值, 而与 IL-6R 具有最大的序列相似性, 将带有不合适骨架角或范德华氏碰撞均排除逐出^[7,8].

1.4 确定侧链组合构象及能量极小化

统计研究表明, 蛋白质中每个氨基酸残基的侧链的取向只能有几种可能的构象^[9], 在预测 hIL-6R 过程中, 合理的侧链组合构象采用侧链转动文库 (a side chain rotamer library) 查找方式, 系统地搜索了所有可能侧链构象的组合, 通过对每个构象组合进行非键相互作用能量的计算, 寻找出优势构象的侧链组合. 再进行能量优化: 先用 Amber 力场优化搭建出的结构间的各接口处的不合理键长和扭曲二面角; 再对 loop 区、保守区中的大的斥力和张力分步松弛计算; 常温下 (300K) 对末段及 loop 区进行 10 ps 的有距离约束分子动力学优化, 接着对全分子进行 30 ps 的常温有约束分子动力学优化 (约束条件为: 二硫键、氢键的距离约束, 保守区中 C_α 原子的谐性限制; 对 WSEWS 及 QPDPP 肽段, 前 20 ps 将其固定, 后 10 ps 将其放开, 只加谐性限制); 然后 300K, 50 ps 无约束分子动力学计算; 最后, 分子力学方法能量极小化, 以消除范德华氏碰撞, 提高侧链堆积效果及氢键的形成.

1.5 模建两个 CBD 的绞链区

最后, 根据 hGHR 的两个 CBD 之间的连接信息来模建 hIL-6R 的双桶绞链处, 连接肽为214~ 220位的7个氨基酸残基的一个半环环.

整个模建过程基本上在 SGI INDIGO 图形工作站上用 BIOSYM 软件包, 在 Insight II 界面下的 Homology, Discover 完成, 少量分析用 GOLDKEY, PCGENE 软件.

2 结果和讨论

2.1 hIL-6R 胞外区的三维结构特征

从模建出的 hIL-6R 三维结构模型上看, 能量优化后的结构仍保持双桶状结构. β 折叠之间有一些氢键维持, 每个桶的 7 个 β 折叠股分内外二层, 四个保守的半胱氨酸残基均位于 N 端 β 折叠片的内侧层. 两桶之间的峡谷有近 90° 夹角, WSXWS 主型框架 (305~ 307 位) 定位于双桶之间的绞链区外侧, 可能对两桶之间的峡谷夹角有重要贡献 (图 1). GHR N 端

有 6 个半胱氨酸残基形成三对二硫键结构, 而 hIL-6R 胞外区 N 端的四个高度保守的半胱氨酸

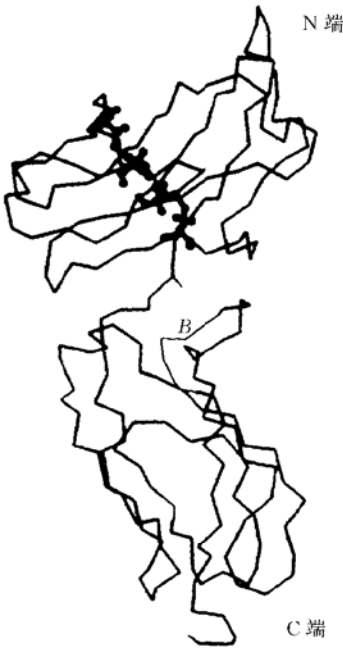


图 1 hIL-6 受体胞外区功能域 (106~ 322 位) 的三维结构模式图
四个保守的半胱氨酸残基 (A →) 均位于 N 端 β 折叠片的同一侧面; WSXWS 主型框架 (B) 位于 C 端 β 折叠片的 loop 区 (处于双桶的绞链区).



图 2 hIL-6R 胞外区细胞因子结合结构域四个保守半胱氨酸残基形成的两对二硫键的空间结构
A: 121~ 132 键长约 0.2 nm, 两面角 Xss 为 79° ~ 83°; B: 165~ 176 键长约 0.2 nm, 二面角 Xss 为 78° ~ 101°.

酸残基 (121、132、165、176) 形成二对二硫键结构 (残基 121~ 132, 165~ 176), 两个二硫键键长约 0.2 nm、二面角 χ_{ss} 在 90° 附近 (图 2).

2.2 hIL-6R 三维模式的残基兼容性检测

为了检验同源模建的 hIL-6R 三维结构的可信度, 应用 profile-3D^[10] 进行了兼容性检测, 图 3 给出了 hIL-6R 的检测图. 从中可以看到建模结构中不兼容的残基很少 (检测分数 $S < 0$), 从统计学经验来看, 说明所建模的结构在物理、结构性质上有较高的可信度.

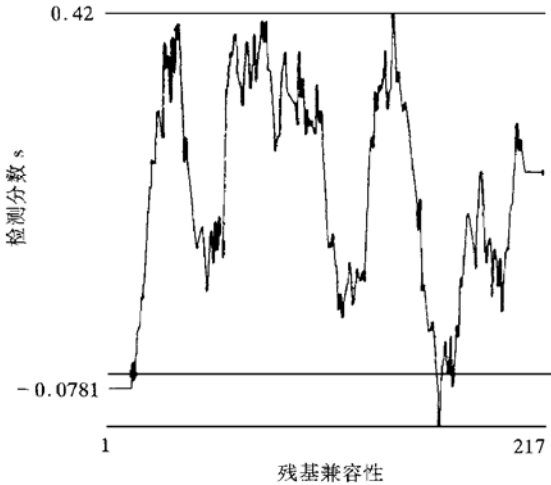


图 3 Profiles 3D 检测 hIL-6R 三维结构模式的自身氨基酸序列兼容图

2.3 hIL-6R 三维模式的静电势曲面分析

我们又用 Delphi 模块作 hIL6R 的静电势曲面图^[11], 结果显示, 双桶绞链区处于负电区, 而双桶两端多处于正电区. 进而, 鉴于 IL-6 和 G-CSF 高度同源, 我们以 G-CSF 的晶体结构为模板, 按上述同样方法模建了 hIL-6 的三维结构 (4 个 α 螺旋束结构), 也用 Delphi 模块作 hIL-6 的静电势曲面图, 结果发现所模建的 hIL-6 的静电势曲面两端处于负电区, 而中间处于正电区, 表明模建的 hIL-6R 与 hIL6 的静电势曲面存在一定的静电势匹配关系.

2.4 对 hIL-6R 结合 IL-6 的位点预测

从所模建的三维结构看, IL-6 分子通过嵌入 IL-6R 张开的峡谷而相互作用, 提示在二

个桶上都有结合位点. 根据 Yawata 等^[12] 的研究结果, 我们将他们的点突变实验结果放置此结构上, 可看出 39 个对结合 IL-6 至关重要的阳性突变点大部分集中在双桶的内侧 (有 23 个位于双桶的绞链区), 所以很可能 hIL6 结合在此部位; 另有 6 个对 IL-6 信号转导起关键作用的阳性突变点远离双桶的绞链区, 其作用可能是维持 hIL6R 偶联 gp130 的特定构效结构, 而不直接参与结合 hIL6.

3 小 结

本研究在 SGI 图形工作站, 应用 HO-MOLOGI 等软件同源模建了人 IL-6R 胞外区功能域的三维结构, 并从其 3D-profile 的结构合理性、其静电势区与 IL-6 的匹配, 以及对受体结合 IL-6 至关重要的阳性突变点在模型上的合理性, 说明了本文同源模建的 hIL-6R 胞外区三维结构有较好的可信度.

我们打算进一步分析可溶性 hIL-6R 在水溶液中结构性质的变化. 并在此基础上, 一方面进行某些定点突变的构象预测, 探讨其构/效关系; 另一方面拟应用 DOCKING 软件和分子动力学模拟技术, 分析受体-配基对接时的转化状态, 以寻找 IL-6R 胞外区功能域中受体/配基结合时起重要作用的结合区残基及信号区残基的空间特征.

致谢 我们在工作中得到生物工程研究所王国力博士的许多帮助, 谨此致谢.

参 考 文 献

1 Cosman D . The hematopoietin receptor superfamily . Cytokine, 1993, 5: 95~ 98
2 de Vos A M, Ultsch M, Kossiakoff A A *et al.* Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science, 1992, 255: 306 ~ 312
3 Ehlers M, Grotzinger J, deHon F D *et al.* Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. J Immunol, 1994, 153: 1744~ 1753
4 Bamborough P, Grant G H, Hedgecock C J R *et al.* A computer model of the interleukin 4/ receptor complex. Proteins: Struct Func Gen, 1993, 17: 11~ 19

- 5 Wang J, Yai Y, Garrett T P *et al.* Atomic structure of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* (London), 1990, **348**: 411~ 418
- 6 Schuler G D. A workbench for multiple alignment construction and analysis. *Proteins: Struct Func Gen*, 1991, **9**: 180 ~ 187
- 7 Chotnia C, Lesk A M, Tramontano A *et al.* Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* (London), 1989, **342**: 877~ 883
- 8 Shenkin P S, Yarmush D L, Fine R M *et al.* Predicting antibody hypervariable loop conformation. I. Ensembles of random conformations for ringlike structures. *Biopolymers*, 1987, **26**: 2053~ 2085
- 9 Summers N L, Carlson W D, Karplus M. Analysis of side chain orientations in homologous proteins. *J Mol Biol*, 1987, **196**: 175~ 198
- 10 Luthy R, Bowie J U, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 1992, **356**: 83~ 85
- 11 Gilson M K, Honig B H. Calculation of electrostatic potentials in an enzyme active site. *Nature* 1987, **330**: 84~ 86
- 12 Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S *et al.* Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J*, 1993, **12**: 1705~ 1712

Homology Modeling of the Functional Domain of the Extracellular Region of Human IL-6 Receptor. SUN Tao, REN Yunfang, LU Zhongzheng¹⁾, LI Song¹⁾, JIAO Kefang¹⁾, SHEN Beifen (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* ¹⁾*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military*

Medical Sciences, Beijing 100850, China).

Abstract Interleukin-6 receptor (IL-6R) is a member of the hematopoietin receptor superfamily which has its common conservative structure “the cytokine binding domain (CBD)”. CBD is the functional domain of the extracellular region of IL-6R, because only this domain of IL-6R is responsible for IL-6 binding and for IL-6 signal transduction through gp130. It is proposed that the β -sheets folding motif of the IL-6R CBD is very similar to that seen in the crystal structure of human growth hormone receptor (hGH-R), which also belongs to the cytokine receptor family, and CD4. By means of computer-guided homology modeling techniques, the three-dimensional (3D) structures of hGH-R and CD4 were used as template protein to predict the 3D-structure of the functional domain (residue 106 ~ 322) of hIL-6R. The characteristics of the conservative structure-conformation in CBD of hIL-6R were described. The model may provide for the interpretation of the results obtained with introducing site-directed mutation into soluble IL-6R and the 3D-quantitative analysis on the structure-function relationship of IL-6R functional domain.

Key words IL-6 receptor, functional domain, homology modeling

柠檬酸铁对过亚硝酸根硝化酪氨酸反应的影响

廖力夫 何玉媛 刘传湘 袁亚莉 李贵荣

(衡阳医学院基础化学教研室, 衡阳 421001)

摘要 由一氧化氮和超氧阴离子迅速反应生成的过亚硝酸根 (ONOO^-) 是一种强细胞毒性物质. 使含酚基物质如酪氨酸等硝化, 是过亚硝酸根损伤生物系统的重要途径之一. 研究了柠檬酸铁和草酸铁对过亚硝酸根硝化酪氨酸反应的影响. 在生理 pH 条件下柠檬酸铁和草酸铁对硝化反应无影响. 在弱酸性条件下柠檬酸铁和草酸铁可催化硝化反应. 对 pH 影响铁配合物在硝化反应中的催化活性的原因进行了讨论.

关键词 过亚硝酸根, 硝化, 酪氨酸, 柠檬酸铁, 草酸铁