

肽类生长因子的核受体研究

彭 勇 童坦君

(北京医科大学生物化学教研室, 北京 100083)

提 要

肽类生长因子 (GFs) 在细胞的增殖与分化, 以及肿瘤的发生与发展中起着重要作用, 而受体是 GFs 作用的关键环节。过去认为 GFs 受体仅存在于质膜, 本文就 GFs 细胞核受体的存在、起源及生物学意义的研究进展进行了简要介绍。

关键词 肽类生长因子, 受体, 细胞核

表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生的生长因子 (PDGF)、神经生长因子 (NGF) 等肽类生长因子 (GFs) 具有广泛的生物学功能, 在细胞的增殖与分化的调控以及肿瘤的发生与发展中起着重要作用^[1]。人们对 GFs 的生物学性质、作用机制等进行了广泛深入的研究, 目前较为流行的作用机制包括: 1) GFs 与质膜表面专一受体蛋白质相互作用, 形成 GFs-受体复合物, 诱导受体蛋白质变构和/或其它质膜蛋白质相互作用而活化; 2) 活化受体自身磷酸化或使细胞内其它物质磷酸化, 第二信使介导的酶学修饰调节而引起一系列复杂广泛的细胞效应; 3) C-激酶介导的负调控和 GFs-受体复合物经溶酶体介导的内化降解调控共同调节着 GFs 的生物学效应^[2,3], 至于作用的各详细环节尚有许多空白。最近有许多文献报道了 NGF、EGF、PDGF 等 GFs 的细胞核受体的存在, 并探究了其生物学意义, 推测 GFs 具有甾体激素样作用机制^[4], 现综合介绍于下。

一、GFs 的细胞核定位和核结合活性

对 GFs 的细胞核受体的研究始于对 NGF 的研究, NGF 是一种促进神经细胞生长的生长因子。1974 年, 有人将 NGF 注射到成年大鼠眼前房, 发现高位颈神经节神经元突触末端出现 NGF, 随后通过逆流轴浆运输转移到细胞

核, 增加酪氨酸羟化酶和多巴胺- β -羟化酶的活性和合成, 这一现象不能用质膜受体介导的作用机制解释。进一步观察表明存在两种 NGF 受体, 其 Triton-X-100 溶解性、NGF 结合特性和亚细胞定位互不相同; 这两种受体, 一种位于质膜、另一种可能位于细胞核内^[5]。随后, Andres^[6]等分析了鸡胚脊髓后根神经元细胞及其亚细胞组份与 NGF 的放射免疫结合性质, 发现 NGF 有两种结合位点, 一种结合位点在质膜上。能被 Triton-X-100 溶解, Scatchard 分析呈双曲线图形; 另一种结合位点定位于细胞核并与染色质紧密结合, 不能被 Triton-X-100 溶解, Scatchard 分析是一条直线; 进一步分析表明 NGF 的染色质结合活性与亚细胞组份或质膜的污染无关, NGF 的核转移和染色质结合性质具有特异性, 与 NGF 等电点接近的溶菌酶和细胞色素 c 等核外其它分子量接近的蛋白质并无明显的核转移和染色质结合活性。Yanker 等发现 NGF 在大鼠嗜铬细胞瘤细胞 (PC12) 中也具有核转移和细胞核结合活性, 不同的是 NGF 的核结合位点在核膜上, 并非染色质上^[7]。Savion 等通过使用溶酶体抑制剂氯喹啉和 Leupeptin, 首次报道了培养的牛角膜内皮细胞和粒细胞中存在着 EGF 的核转移现象、EGF 的核转移与溶酶体抑制剂呈明显的剂量-效应关系, 氯喹啉作用最明显, 当氯喹啉

浓度为 5×10^{-5} mol/L 时, EGF(20ng/ml) 与培养细胞作用 4 小时后核内即出现了 EGF, 24 小时达到高峰, 核内 EGF 量占细胞结合 EGF 量的 18%^[4]。到目前为止, 已有多篇文献报道了动物和人的多种组织细胞存在 NGF、EGF、PDGF 和胰岛素等 GFs 的核转移和核结合现象, 并且确认了相应核受体存在的可能性^[9,10]。

Rakowicz-Szulczynska 等在不使用溶酶体抑制剂的前提下, 用培养的肿瘤细胞(人骨髓瘤细胞、结直肠癌细胞、黑色素瘤细胞)和人成纤维细胞进行了一系列 GFs 核受体分析。他们发现完整细胞中 NGF、EGF 和 PDGF 的核转移和染色质结合活性与相应膜受体的表达与否, 以及表达程度密切相关, 也与 GFs 和完整细胞作用时间呈明显正相关, 37℃ 为最适温度, 4℃ 时完全被抑制; 提纯后的细胞核或染色质与这些 GFs 的结合说明结合活性与膜受体污染无关, GFs 与染色质的结合活性是 GFs 的非降解性紧密地与染色质结合, 并因此而赋予染色质对 DNase II 的耐受性。限制性内切酶 EcoRI 酶切分析表明 GFs 是与染色质 DNA 的活性转录区结合, 此种结合不受高浓度盐溶液 (0.35mol/L 和 2mol/L NaCl) 抽提的影响。作者由此认为染色质 GFs 的特异结合位点——受体可能是一种具有基因表达调节作用的非组蛋白质^[11-13], 这一观点得到了其它研究者的支持。例如, 有人证实: (1) EGF 不与纯 DNA 结合, 纯 DNA 对 EGF 无吸附作用; (2) Triton-X-100 和 NP40 可消除核或染色质上附着的胞质标志酶活性的 95% 以上, 然而对 EGF 及 EGF 膜受体的单克隆抗体 (MAb 425 和 MAb Br15-6A) 与染色质的结合量并无影响^[14]。 (3) Yeh 等用抗 PDGF 的抗血清进行免疫荧光和蛋白质胶体金标记技术分析 PDGF 的超微结构定位, 结果发现猴肉瘤病毒转化的三种细胞染色质存在高荧光强度区, 正常对应细胞则为阴性; 用提纯的细胞核的免疫荧光分析以及硝酸纤维素膜固相免疫分析也表明染色质存在 PDGF 结合区^[15]。

总之, GFs 核转移和/或染色质结合活性

有关的研究都是通过以下两条途径进行的: 一是在体外在纯化核或染色质水平进行 GFs 结合分析。核或染色质的纯度可由相差显微镜、电子显微镜形态检查, 标志酶分析、去污剂处理、染色质组成分析等进行鉴定。其二是借助光学、电子显微镜、放射自显影、免疫细胞化学分析等进行超微结构定位。这两种途径中, 第一种途径较有说服力, 第二种途径亦有一定参考价值。

二、GFs 的核转移

GFs 经质膜、胞浆、核膜进入细胞核与染色质结合的全过程还不清楚。但已了解质膜 GFs 受体在其中起着重要作用, 因为 GFs 核转移和染色质结合活性与质膜受体表达的强度呈明显的正相关^[11]。且在实验体系中加入过量非标记的 GFs 可抑制标记的 GFs 的核转移^[12]。有人对 NGF 的核转移过程进行了系统的观察^[16]: 受体高表达的人骨髓瘤细胞 (HS294 和 A875) 与 NGF 作用 24 小时后, 细胞 NGF 总结合数分别是 43930 分子/细胞和 32150 分子/细胞, 其中染色质结合的 NGF 占其中的 10%; 然而质膜 NGF 受体低表达的结直肠癌细胞 (SW 707) 在同一条件下 NGF 总结合数仅为 1610 分子/细胞, 染色质结合的 NGF 为 735 分子/细胞, 不表达 NGF 质膜受体的结直肠癌细胞 (SW948) NGF 总结合数少于 380 分子/细胞, 染色质 NGF 结合阴性; 动态观察发现 NGF 核转移随时间延长而逐渐增加, 并表现专一性和非降解性特征; 进一步运用无细胞体系分析 NGF 核转移, 发现具有 NGF 质膜受体的细胞的质膜和胞浆部分对纯化核的 NGF 核内移有明显的抑制作用, 其它成分影响甚微。对胞浆抑制性成分进行核酸分子杂交, 证明其中存在着 mRNA; 过量非标记的 NGF 与胞浆预温育可解除其抑制效应, 抗 NGF 膜受体的单克隆抗体或环磷酸胺能拮抗胞浆的抑制效应, 因此推测胞浆的抑制效应物质是 NGF 膜受体的 mRNA 及其翻译产物的复合物, 它们与 NGF 的结合抑制着 NGF 的核转移。尽管 GFs 核

转移是非扩散性特异转移。但目前尚未发现胞浆存在 GFs 核转移蛋白,不过 Ross 发现不表达 NGF 质膜受体的 SW948 癌细胞的胞浆对 NGF 核转移有促进作用。尽管 GFs 核转移尚有很多不明之处,我们还是可以这样推测: GFs 通过膜受体介导而内化,通过溶酶体介导而解离或自我解离,使游离的 GFs 再生,游离的 GFs 一部分与胞浆新合成的受体及其 mRNA 的复合物结合,另一部分通过目前尚不清楚的方式进入细胞核,与染色质或其它核成份上的受体结合,表现出部分生物学效能。

三、细胞核 GFs 受体的性质和起源

人们对 GFs 质膜受体,特别是 EGF 质膜受体的结构和性质已有较清楚的认识,并已部分纯化和基因克隆。得到了膜受体的单克隆抗体^[3],而对核受体的生物化学性质了解甚微,文献报道的 GFs 核受体绝大多数定位于染色质上,少数可能在核膜上或核基质中^[7,10]。染色质 GFs 受体是一种 DNA 紧密结合蛋白质,属抗高浓度盐溶液抽提的非组蛋白^[12,17],用抗质膜 GFs 的单克隆抗体进行蛋白质印迹法和免疫沉淀技术分析表明染色质 GFs 受体蛋白质其分子量为 230—250 kD, HS294 人骨髓瘤细胞染色质 GFs 受体的蛋白质单体分子量为 75kD,单体通过次级键构筑成 230 kD 的寡聚体^[12,18]。尽管抗质膜受体的单克隆抗体能与核受体起反应,然而质膜受体和核受体是两种不同的蛋白质,抗质膜 NGF 和 EGF 受体的单克隆抗体 ME204 和 MAb425 分别对 NGF 和 EGF 与染色质的结合存在着竞争性抑制作用、而对 NGF 和 EGF 与膜受体的结合却无这种抑制作用,这说明在染色质受体上单克隆抗体与 GFs 的结合位点相同或空间结构上很接近。而在质膜受体上两者结合位点在空间结构上相距很远^[12]。核 GFs 受体存在着多态性,不同组织细胞的同一 GFs 核受体或不同 GFs 核受体在分子量、电泳迁移率等方面不尽相同,与质膜受体更不相同^[11,13]。

目前对核 GFs 受体起源还存在着争议,一

方面认为核受体是一种染色质的固有蛋白质^[12],因为:(1)无细胞体系中纯化的细胞核或染色质的 GFs 特异结合性质说明了核受体存在先于配体的诱导和内化;(2)核受体和质膜受体有着不同的结合性质和某些不同的生化性质;(3)核受体特异地存在于对 DNaseII 和 EcoRI 敏感区。另一方面则认为核受体和膜受体具有相同的蛋白质主体结构^[10],而表现出不同的特点是由于:(1)质膜受体合成后经过未知的结构修饰、进入胞核与染色质 DNA 结合;(2)分离纯化过程使染色质三维结构发生人为变化,GFs 与染色质这一半固体动态构型物质结合,改变了 DNA 与蛋白质或蛋白质与蛋白质的相互作用,最终使 GFs 与染色质上的由胞浆转移来的质膜受体的结合性质发生了改变;(3)内化的质膜受体经吞噬泡解偶联和其它修饰作用后进入细胞核,因而与质膜受体的原型不同。此外,目前还无法排除 GFs 在核转移前是否已经酶学修饰,而且经完整细胞进入核内与染色质结合的 GFs 的分子数达不到纯化染色质与 GFs 结合分析时所采用的浓度。总之,核受体的来源有待进一步研究。

四、核受体介导的 GFs 作用

GFs 经膜受体介导的生物学效能已得到了肯定。核受体在 GFs 信号传递中的作用尚在进一步研究中,从现有文献可以归纳为以下几点:

1. 核受体介导的核蛋白磷酸化

EGF 等 GFs 的质膜受体具有酪氨酸激酶活性,受体本身和专一底物蛋白质酪氨酸磷酸化修饰在 EGF 等的信号传递中起重要作用;有些 GFs 的信号传递由磷脂酰肌醇代谢介导(如 EGF、PDGF)。核蛋白的磷酸化与有丝分裂密切相关,如组蛋白的磷酸化能促细胞从 S 期经 G₂ 期进入有丝分裂状态,核基质蛋白的磷酸化在有丝分裂 M 期最为活跃。Scher^[19] 等发现 PDGF、纤维母细胞生长因子有促进 G₀ 期 ABAE 细胞进入有丝分裂期的效能,同时出现核蛋白磷酸化增强。与核蛋白磷酸化有关的激

酶包括酪氨酸激酶。最先报道的胞核酪氨酸激酶存在于核基质,底物是分子量为 68 kD 的核基质蛋白。核膜也已发现存在酪氨酸激酶活性,专一底物也是 68 kD 的蛋白质,这种底物蛋白质与核基质的 68 kD 的酪氨酸激酶底物似乎是同种蛋白质^[20]。如果核受体与质膜受体相似,也具有酪氨酸激酶活性,则 GFs 介导的核受体激活、核蛋白磷酸化与细胞的有丝分裂可能有密切关系,在细胞的有丝分裂过程中起直接的调控作用。本研究室曾发现 EGF 能使染色质结合的以非组蛋白为底物的蛋白激酶活性升高,并与细胞的恶性表型呈正相关,显示了染色质水平 EGF 的磷酸化调节作用^[21]。目前,我们就 GFs 染色质受体的性质及其功能相关性进行更深一步的探讨,并取得初步结果。

2. 核受体介导的基因调控

EGF 等 GFs 具有改变基因表达水平和染色质结构的功能^[16]。DNA 酶对染色质 DNA 的识别部位多是转录活性区,而 EGF、NGF、PDGF 和纤维母细胞生长因子的核受体也存在于转录活性区,GFs 的结合使染色质 DNA 对 DNaseII 的耐受性增加,这提示 GFs 与核染色质受体的结合直接参与基因调控过程,调节基因增强子区或促进子区的活性^[11,12]。NGF 和 PDGF 与染色质的结合对 SW707 结直肠癌细胞总 RNA 和核蛋白体 RNA(rRNA)合成有明显影响,NGF 起抑制作用,PDGF 起促进作用,NGF 有消除 PDGF 促进总 RNA 和 rRNA 合成作用的能力,这显示不同的 GFs 因与染色质不同部位的受体结合、改变了 DNA 局部构象,直接调节着基因表达^[11,12]。Bouche 等报道纤维母细胞生长因子与染色质的结合启动了 rRNA 合成,与上述结果相吻合^[23]。

拓扑异构酶通过影响 DNA 的螺旋度而调节 DNA 的复制和转录活性。Basu^[24] 等报道 EGF 能增加拓扑异构酶的活性,这种拓扑异构酶活性与一种和 EGF 受体共纯化的蛋白质密切相关,推测这种蛋白质就是 EGF 受体的蛋白质水解产物。此外,拓扑异构酶活性受蛋白质激酶磷酸化调节,拓扑异构酶的酪氨酸

残基磷酸化后,通过磷酸化的酪氨酸残基与缺口 DNA 的 5' 端结合。核受体有可能通过这一途径改变 DNA 的空间结构,调节基因表达^[24]。

3. GFs 核受体与肿瘤

EGF 质膜受体表达水平的升高与细胞转化密切相关^[25]。骨髓瘤细胞(HS294 和 A875)、结直肠癌细胞(SW707)的染色质 NGF 受体数目明显升高,亦与肿瘤转化相关^[11]。甾体激素染色质受体的两个功能区与 erb-A 癌基因产物同源,据推测 NGF 核受体可能也是一种癌基因产物^[12]。PDGF 和 V-sis 癌基因产物在猴肉瘤病毒(SSV)转化的三种细胞的细胞核中明显增加,而正常对应细胞的细胞核中却未能检出,这说明核内 PDGF 或 V-SiS 产物在 SSV 的细胞转化中起着作用^[15]。已知 EGF 受体的某些单克隆抗体能激活质膜受体的酪氨酸激酶活性,但并不出现 DNA 合成增加,而 EGF 质膜受体的另一些单克隆抗体(如 MAb425)对上皮癌 A431 细胞的生长有抑制作用,却并不诱导质膜受体酪氨酸激酶活性的增加。这提示 EGF 质膜受体酪氨酸激酶活性不是 EGF 诱导细胞增殖的唯一关键环节,EGF 的核转移、染色质 EGF 受体的存在以及 EGF 核受体介导的信号传递、直接调节基因的表达可能是得到上述实验结果的内在原因^[18]。NGF 的核转移和染色质结合活性对 PC12 细胞的增殖有抑制作用,并可促进细胞的分化,这可能与 NGF 直接调节 rRNA 基因表达、抑制 rRNA 合成有关^[16,22]。Jiang 等通过研究 EGF 和胰岛素的核转移和染色质结合过程^[26],认为 GFs 和某些癌基因产物在核转移和基因调节过程中具有相似的机理,影响着肿瘤的发生和发展。

总之,GFs 胞核受体的存在及其研究进展表明 GFs 或许也存在甾体激素样作用机制,与质膜受体介导的作用机制并存,互相补充,在细胞的生长与分化、细胞的转化与癌变过程中起着调节作用。关于这类核受体及其功能的研究还很肤浅,有待进一步深入。

DNA 肿瘤病毒 SV40 的细胞转化特性

柯 杨

(北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室, 北京 100034)

提 要

SV40 是被广泛应用于肿瘤研究的 DNA 肿瘤病毒。本文简述了它的一般生物学特性, 根据大量研究报道着重归纳了 SV40 在体外转化细胞的特性及其转化机制, 并展望了 SV40 转化蛋白在癌变机理、细胞分化等研究中的进一步应用。

关键词 SV40, 细胞转化, 癌变

肿瘤病毒为研究分析真核细胞分子生物学和细胞转化提供了一个简单而又非常有用的模式。由于病毒利用宿主细胞的酶和其它机制复制自身, 通过观察病毒的复制、转录及蛋白合成可以对复杂的细胞生物过程有所了解。更重要的, 病毒中少数转化蛋白功能的研究深化了人们对细胞转化、恶变机制的认识。

与肿瘤相关的 DNA 病毒分为五大类: 多瘤病毒, 乳头状瘤病毒、腺病毒、疱疹病毒及肝炎 B 病毒^[1]。SV40 属于其中的多瘤病毒组。60

年代初在美国因其造成腺病毒疫苗的污染而被发现, 并最终从猴肾中分离出来。因为 SV40 随着腺病毒疫苗接种了当时大批的美国学生和军人, 其生物活性及致癌性的研究受到了广泛的重视。目前它是 DNA 肿瘤病毒中被人们了解最透彻和应用最广的病毒之一。

一、SV40 的一般生物特性^[2]

SV40 是小双链环状 DNA 病毒, 颗粒直径 45nm, 含 88% 蛋白质及 12% DNA。基因组

参 考 文 献

- 1 许立成, 童坦君. 生理科学进展, 1988; 19: 36
- 2 Williams L T. *Science*, 1989; 243: 1564
- 3 吴平, 童坦君. 生理科学进展 1990; 21: 50
- 4 Goldfine I D *et al.* *Mol Cell Biochem*, 1982; 48: 3
- 5 Stoeckel K *et al.* *Brain Res*, 1976; 109: 271
- 6 Andres R Y *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 2785
- 7 Yanker B A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 1269
- 8 Savion N *et al.* *J Biol Chem*, 1981; 256: 1149
- 9 Wong K Y *et al.* *Biochemistry*, 1988; 27: 375
- 10 Burwen S J, Jones A L. *TIBS*, 1987; 12: 159
- 11 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 3728
- 12 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1986; 140: 174
- 13 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Cancer Res*, 1988; 48: 7200
- 14 Marchisio P C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980;

- 77: 1656
- 15 Yeh H J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 2317
- 16 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Mol Carcinogenesis*, 1989; 2: 47
- 17 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1989; 653: 690
- 18 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1989; 208: 456
- 19 Scher C D *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1979; 560: 217
- 20 Ajiro K *et al.* *J Biol Chem*, 1983; 258: 4534
- 21 黄平, 童坦君. 生物化学杂志, 1989; 5(1): 503
- 22 Rakowicz-Szulczynska E M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 163: 649
- 23 Bouche G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 7660
- 24 Basu M *et al.* *Nature (London)*, 1985; 316: 640
- 25 Gill G N *et al.* *Mol Cell Endocrinol*, 1987; 51: 169
- 26 Jiang L W *et al.* *J Cell Biol*, 1988; 106: 13

[本文于1990年4月9日收到, 6月15日修回]