

1990, **64**: 2309~ 2318

13 Johannsen E, KOH E, Mosialos G *et al.* Epstein Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 is mediated by J κ and Pu1. *J Virol*, 1995, **69**: 253~ 262

14 Hirai R, Suzuki T, Fujisawa J I *et al.* Tax Protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor κ B and induces nuclear translocation of transcription factor NF- κ B proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 3584~ 3588

15 Herrero JA, Mathew P, Paya C V. LMP-1 activates NF- κ B by targeting the inhibitory molecule I κ B α . *J Virol*, 1995, **69**: 2168~ 2174

16 Hammarskjold M L, Simurda M C. Epstein Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. *J Virol*, 1992, **66**: 6496~ 6501

17 Weiping C, Neil R C. Epstein Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF- κ B activity. *J Virol*, 1996, **70**: 4849~ 4853

18 Kieff E. Epstein Barr virus: increasing evidence of a link to carcinoma. *N Engl J Med*, 1995, **333**: 724~ 726

19 Hollyoake M, Stuhler A O, Farrell P *et al.* The normal cell cycle activation program is exploited during the infection of quiescent B lymphocytes by Epstein Barr virus. *Cancer Res*, 1995, **55**: 4784~ 4787

20 Cao Ya, Yi Sun, Poirier S *et al.* Isolation and partial characterization of transformation associated sequence from human nasopharyngeal carcinoma. *Mol Carcinogenesis*, 1991, **4**: 297~ 307

Progress in Molecular Biology of BNLF-1 Gene of EB Virus. MA Xianyong, CAO Ya, YAO Kaitai (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract The BNLF-1 gene located in U₅-TR region of Epstein-Barr virus genome encodes a latent membrane protein (LMP-1). As the protein can transform B cells and plays a key role in the carcinogenesis of EB virus, so it has become the “hot spot” of studying for the diseases relevance to EB virus, such as nasopharyngeal carcinoma, Burkitt's lymphoma, Hodgkins disease etc, and also the molecular biology of EB virus. A series of achievements have been achieved, the progress in following aspects are reviewed: 1. the structure and expressing regulation of BNLF-1 gene; 2. the structure and biochemical function of LMP-1 protein; 3. the biological function of LMP-1; 4. looking forward to the future.

Key words Epstein-Barr virus, BNLF-1 gene, expression and regulation, structure, function

nov 基因的研究*

曾宪春 蒋达和 李文鑫¹⁾
(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

B. PERBAL

(Laboratoire d'Oncologie virale et Moléculaire, Institut Curie, 91405-Orsay Cedex, France)

摘要 nov 基因是最近发现的一种新的细胞癌基因, 在细胞的增殖、癌变及胚胎发育过程中可能起着重要的调节作用. 文章综述了 nov 基因的发现、结构功能、表达调节特点以及与相关基因的关系.

关键词 nov 基因, 肾癌, Wilms 肿瘤, 细胞生长调节因子, 基因表达

自 80 年代初在人膀胱癌细胞株中发现人的癌基因以来, 癌基因的研究取得了许多激动人心的成就, 已经成为分子癌学研究中最活跃的领域之一. 癌基因的研究不仅使人们对肿瘤的癌变机理有愈来愈深入的了解, 而且其研究成果已逐步应用于临床诊断和治疗. 癌基因的

蛋白产物在正常细胞增殖和分化过程中, 尤其在胚胎发生过程中起着重要的调节作用^[1]. 本文介绍的是最近在肾癌细胞中发现的一种新

* 国家自然科学基金 (39470781) 和博士点基金资助课题.
¹⁾ 通讯联系人.
收稿日期: 1996-08-23, 修回日期: 1997-02-20

的细胞癌基因——nov 基因.

1 nov 基因的发现

MAV 病毒 (myeloblastosis-associated virus) 诱导的禽肾癌是研究人 Wilms 肿瘤的极好模型. Joliot 等^[2] 通过对 MAV 病毒诱导的不同发展阶段的 22 例鸡肾癌的研究发现, MAV 在细胞基因组中的整合位点各不相同. 他们克隆出肿瘤细胞 DNA 中临近前病毒基因组的细胞 DNA 片段制成 DNA 探针, 用该探针与正常鸡肾、鸡胚成纤维细胞 (chicken embryonic fibroblast, CEF) 及鸡肾癌组织中分离的总 RNA 进行 RNA 印迹分析. 结果表明, 这些探针中有一种探针 (即 HX1024) 在正常的 CEF 细胞中检测出一种 2.2 kb 的 mRNA, 该种 mRNA 在所有被检的肾癌细胞中均高水平表达. 这种 mRNA 相应的基因是一种还未被鉴定的新的细胞癌基因, 被定名为 nov 基因 (nephroblastoma-overexpressed gene).

2 nov 基因的表达特点

以 nov cDNA 为探针进行的 RNA 印迹分析表明, 2.2 kb mRNA 在高度发展的肾癌组织中超表达, 而在较早的发展阶段, 其表达程

度较低^[2]. 在 18 d 的正常鸡胚肾中, 2.2 kb nov mRNA 容易检测到, 随着发育过程的进行, 其表达水平逐步降至几乎检测不到; 至成年肾时, 表达则被完全抑制.

nov 基因在正常鸡体内的表达具有组织器官差异性^[2,3]. 在鸡胚中, nov 基因在脑和心脏中的表达水平较高, 而在肌肉和肠组织中的表达水平较低, 在肺、肝和卵黄囊中不表达. 对于成年鸡, nov 基因在肺中高水平表达, 在脑和脾组织中表达较少, 而在肌肉、肝和心脏中不表达.

3 nov 基因与 NOV 蛋白

鸡 nov 基因的基因组序列被分隔为 5 个外显子, 长约 5.3 kb. 人的 nov 基因 (novH) 也含有 5 个外显子, 长约 6.6 kb. 人和鸡 nov 基因结构见图 1.

nov 基因在人和小鼠中是高度保守的^[4]. 鸡和人 nov 基因的 1~5 外显子所编码的氨基酸序列之间分别具有 32%、68%、73%、85% 和 62% 的同源性. nov 基因在不同来源的培养的肿瘤细胞系中也是高度保守的 (李文鑫等, 待发表).

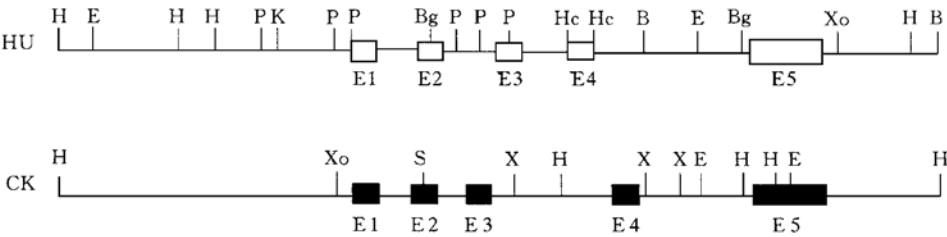


图 1 人和鸡 nov 基因组织结构

人 nov 基因 (novH) 位于染色体 8q24.1, 与 c-myc 基因相邻; 鼠 nov 基因位于 15 号染色体、3.5CM + / - 2.4CM 临近 hba-ps3 位点的位置, 与 c-myc 相距 5.7CM^[5].

人和鸡的 nov 基因分别编码 357 和 351 个氨基酸残基的两种蛋白质, 其氨基端是由外显子 1 编码的信号肽序列, 信号肽的断裂位置在

24 位的 Val 与 25 位的 Ser 之间. 由于 NOV 蛋白缺少作为跨膜蛋白必需的疏水区, 所以它很可能是一种分泌蛋白. nov 基因的第二个外显子编码 45/46 个氨基酸序列, 其中的 8 个氨基酸序列 (在人类是 GCSCCLVC, 在鸡是 GCGCCLVC) 具有与类胰岛素生长因子结合蛋白 (insulin-like growth factor-binding pro-

tein, IGFBP) 相一致的结构式^[3].

4 nov 基因与分泌型生长调节因子基因的相关性

NOV 蛋白在结构上与 CEF₁₀、CYR₆₁、FISP₁₂和 CTGF 等四种基因的表达产物高度相关, 它们的氨基酸序列之间有 50% 的同源. 后四种蛋白参与了细胞增殖的控制, NOV 蛋白与它们一起代表了一个分泌型生长调节因子新家族^[2]. 这些蛋白的氨基端均含有 IGFBP 一致序列. 另外这些蛋白均含有大量的 Cys 残基, 以及 3 个其他的功能区^[6]: VWC (参与寡聚化)、TSP1 (与基质大分子相互作用) 和 C 端区 (参与二聚化).

尽管 CEF₁₀/CYR₆₁、FISP₁₂/CTGF 及 novH 在结构上紧密相关, 但是它们属于不同的转录调节过程. 在人皮肤成纤维细胞中, CTGF 的表达受血清因子的促进; 在 NIH3T3 细胞中, 作为立即早期基因的 FISP₁₂, 它的表达也可被血清所诱导; 在 CEF 细胞中, 血清处理同样可增加 CEF₁₀的表达水平; CYR₁₆也属于立即早期基因, 在小鼠 NIH3T3 细胞系中它的表达可被血清、PDGF (platelet-derived growth factor)、FGF (fibroblast growth factor) 和 TPA 等激活. nov mRNA 的表达水平受血清的促进并不明显, 这表明 nov 并不是一个立即早期基因.

Li (李文鑫) 等^[7]研究了 nov 和 CTGF 基因在多种肿瘤细胞中的表达. 对源于人神经胶质瘤的 24 个细胞系中 novH 和 CTGF 的表达情形的分析表明, 这两种基因的表达并无相关性. 对 CTGF、FISP₁₂和 novH 的启动子区域分析结果显示, CTGF 和 FISP₁₂启动子区域高度同源, 但与 novH 启动子则无明显同源性. 以上结果表明, novH 和 CTGF 这两个基因的表达具有不同的调节方式. 因为 novH 和 CTGF 分别对细胞的生长起着负、正调节因子作用, 并且表达 novH 的神经胶质瘤细胞系并不致癌, 所以这两个基因的不同表达可能是决定细胞分化阶段和一些肿瘤细胞系恶化程度的关

键因素.

CYR₆₁蛋白质存在于细胞外基质和细胞表面; FISP₁₂和 CTGF 也是一种外分泌蛋白, 分泌到培养基中. Perbal 等^[8]研究显示, NOV 蛋白存在于 CEF 细胞外基质. 李文鑫等所作的研究也证明了这一点 (待发表).

5 nov 基因功能研究

CTGF/FISP₁₂和 CYR₆₁/CEF₁₀是立即早期基因, 它们的表达产物参与了细胞增殖的调控. CTGF 具有细胞趋化作用和有丝分裂活性, 是 TGF- β 处理过的人皮肤成纤维细胞所产生的一种主要的自分泌生长因子^[9]; CYR₆₁在小鼠胚胎软骨形态发生期间对细胞的生长和分化中起关键作用, 特别是 CYR₆₁的表达与间质细胞的分化有着实质性的关联.

尽管 nov 不是一个立即早期基因, 但是它在结构上与这个家族的其他成员密切相关, 因此 NOV 蛋白可能也参与了细胞增殖和分化的调控. 为了直接研究 nov 基因产物的功能, Joliet 等^[2]构造了含有 nov 基因全长或截短序列的 RSV 逆转录病毒表达型载体, 它具有完全的复制能力. 用这种含有 nov 基因截短或全长序列的病毒的前病毒 DNA 分别转染正常的 CEF 细胞, 结果表明, 氨基端截短了的 NOV 蛋白在 CEF 中的表达可导致正常 CEF 形态学上的转化; 相反, 如果用表达全长 nov 的逆转录病毒前病毒转染 CEF 细胞, 那么细胞不再生长^[2]. 这表明, 在 CEF 中全长 nov 的表达对细胞的生长具有抑制作用. 所以, nov 是一种生长抑制基因, 而其蛋白氨基端的截短才导致 nov 以癌基因的形式被激活.

Li (李文鑫) 等^[7]对 24 种人神经胶质瘤细胞中 nov 的表达进行 RNA 印迹分析表明, 有五种表达 novH 的细胞系, 在裸鼠中不致癌; 相反有的细胞系不表达 novH mRNA 却又是致癌的. 这与 nov 的生长负调节作用相一致.

IGF 和 IGFBP 在细胞生长调节中的作用已被广泛阐明. NOV 蛋白很可能代表了一种

新型的 IGFBP, 它可能是通过将 IGF 运送到细胞靶位点, 或通过粘附 IGF 而调节它的释放和供给来行使自己的调控功能. 值得注意的是, IGF II 表达水平的上升常与 Wilms 肿瘤的发生相关. 这表明, 参与肿瘤发生的基因可能编码转录 (调节) 因子来调节 IGF II 基因的表达, 或编码一些蛋白质参与 IGF II 加工或运输过程的调节. nov 基因可能就属于这类基因.

6 nov 基因表达的调节研究

Li (李文鑫) 等^[7]的研究表明, 人神经胶质瘤细胞中 CTGF 与 FISP₁₂ 启动子高度同源, 它们与 novH 启动子无明显同源性, 说明它们的表达具有不同的调节机制.

对代表 Wilms 肿瘤 (Wilms' tumor, WT) 不同的组织学类型的肿瘤组织 RNA 样品进行的 RNA 印迹分析显示, novH 和 WT₁ mRNA 的表达量呈现相反的关联^[4]. Werner 等^[10]也发现在 Wilms 肿瘤中 WT₁ 和 IGF II 的表达量之间存在这种反式关联. 据报道, WT₁ 在体外可以抑制几种启动子的活性. 根据以上研究结果, 我们认为 nov 的表达可能受 WT₁ 表达产物的抑制.

为了弄清 nov 基因表达的组织特异性和时序调节的关键信号, Martinerie 等 (待发表) 分析了人和鸡正常和肿瘤组织中 NOV 启动子及转录起始位点结构. 结果表明, 人和鸡肾癌中 nov 基因转录水平的上升, 主要是由于转录激活或 nov mRNA 转录物的高稳定性. 为了弄清 WT₁ 蛋白是否参与了 nov 基因表达的调节, 他们作了共转染实验, 将人 293 和 HeLa 细胞同时用二种载体共转染, 一种载体是报道载体, 在这种载体中 CAT 基因受 nov 启动子序列的控制; 另一种载体表达 WT₁ 或 WT₁+KTS 蛋白. 研究结果表明, WT₁ 蛋白能够抑制人 nov 启动子的活性. 染色体缺失等实验表明, 对 nov 启动子活性的抑制并不牵涉 WT₁ 蛋白与启动子某一部分序列的直接粘附, 而是涉及到 WT₁ 蛋白与另外的调节因子的相互作用.

另外, 张颖等^[11]研究了 Vero 细胞质因子对 HICMA (人小肠癌转移腹水细胞系) 细胞中 nov 基因表达的影响. 结果发现, HICMA 细胞经 Vero 胞质总蛋白作用后, nov 的表达水平显著降低. 其作用机理有待进一步研究.

7 NOV 蛋白的体外表达

B. Perbal 实验室已将鸡肾癌的 nov cDNA 克隆至 pCIK 载体, 蒋达和等^[12]在此基础上将鸡 nov cDNA 外显子 4 和部分外显子 3、5 的序列亚克隆至 pET-3d 载体, 在大肠杆菌中表达出 NOV 蛋白的部分多肽. 它为制备 NOV 蛋白的单克隆抗体和进一步研究 nov 表达调控打下了基础.

8 小 结

nov 基因的研究使人们对肾癌及 Wilms 肿瘤的癌变机理有了更深入的了解. NOV 具有潜在的 IGFBP 活性, 可以调节 IGF II 的生物活性. 所以, 在 IGF 依赖型细胞中, NOV 可能就是通过对 IGF 多肽生物活性的影响来实现对细胞生长的抑制. NOV 蛋白与 IGFBP 家族的另一些成员如 CTGF 代表了一类细胞生长负和正调节因子, 而当 nov 基因被截短时, 其 NOV 蛋白缺少 IGFBP 区域, 由此导致 IGF II 加工、运输及活性调节等过程的失常, 进而引起肾细胞的生长失控和癌变. 详尽机理有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Bishop J M. Enemies Within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell*, 1981, **23**: 5~ 6
- 2 Joliet V, Martinerie C, Dambrine G *et al.* Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type I-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol*, 1992, **12**: 10~ 21
- 3 Perbal B. Contribution of MAV-I-induced nephroblastoma to the study of genes involved in human Wilms' tumor development. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1994, **5** (6): 589~ 613
- 4 Martinerie C, Huff V, Joubert I *et al.* Structural analysis of the human nov proto-oncogene and expression in Wilms tumors. *Oncogene*, 1994, **9**: 2729~ 2732
- 5 Martinerie C, Viegas-Pequignot E, Guenard I *et al.* Phys-

ical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene*, 1992, **7**: 2529~ 2534

6 Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett*, 1993, **327**: 125~ 130

7 Li Wenxin (李文鑫), Martinier C, Zumkeller W *et al.* Differential expression of nov H and CTGF in human glioma cell lines. *J Clin Mol Pathol*, 1996, **49** (2): 91~ 97

8 Perbal B. Caracterisation et expression du proto-oncogene nov humain dans les tumeurs de Wilms. *Bull Cancer*, 1994, **81**: 957~ 961

9 Igarashi A, Okochi H, Bradham D M *et al.* Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell*, 1993, **4**: 637~ 645

10 Werner H, Re G G, Drummond I A *et al.* Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms' tumor gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **89**: 5828~ 5832

11 张颖, 曾宪春, 李文鑫. Vero 细胞中肿瘤细胞生长抑制及 nov 表达调控因子的初步研究. *武汉大学学报 (自然科学版)* (生物工程专刊), 1996, 139~ 145

12 蒋达和, 李文鑫. 鸡肾癌 nov 基因亚克隆及表达. *武汉大学学报 (自然科学版)*, 1994, **40** (6): 99~ 102

Studies on nov Gene. ZENG Xianchun, JIANG Dahe, LI Wenxin (*School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*); B. PERBAL (*Laboratoire d'Oncologic Virale et Moleculaire, Institut Curie, 91405 Orsay Cedex, France*).

Abstract nov gene is a novel cellular oncogene which might play an important role in cell proliferation, oncogenesis and embryonic development. The discovery, structure and function, expression and regulation of the nov gene, and the relation to its relevant genes are described.

Key words nov gene, nephroblastoma, Wilms' tumor, regulator of cell growth, gene expression

FK-506 结合蛋白对钙释放通道的调控

孙俊辉 朱培阁

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 细胞内自由钙作为一种重要的细胞信使广泛地参与细胞生理功能调控. 胞内钙库 (内质网系和肌浆网系) 对调节细胞内自由钙水平起着重要的作用. 钙库膜上的钙释放通道 (ryanodine 受体和三磷酸肌醇受体) 受许多因素调控, 其中之一就是新近研究得相当多的 FK506 结合蛋白. 免疫抑制剂 FK506 能特异地结合钙库上一种分子质量为 12 ku 左右的蛋白, 这种 FK506 结合蛋白与钙释放通道形成一种紧密连接的复合体, 在正常生理情况下对钙释放通道起着十分重要的调控作用.

关键词 胞浆自由钙, 钙释放通道, FK506, FK506 结合蛋白, 细胞信号转导

细胞内自由钙作为一种重要的细胞信使广泛地参与调控细胞的生理功能. 胞内钙库 (内质网系和肌浆网系) 对调节细胞内自由钙水平起着重要的作用. 细胞的内质网系或肌浆网系是胞内钙库的主要成分, 其膜上的钙释放通道和钙泵 (Ca²⁺-ATPase) 分别起着释放钙库中的贮钙到胞浆及将胞浆自由钙泵回钙库的作用. 已知钙释放通道主要有两种类型, 根据与它们特异性结合的配体分别命名为 ryanodine 受体 (RyR) 和三磷酸肌醇受体 (IP₃R), 这

两类受体又分为多种亚型^[1]. 钙释放通道的活动受许多因素的调控^[2,3]. 本文将着重介绍新近研究得相当多的细胞内一种能与免疫抑制剂 FK506 特异性结合的蛋白——FK506 结合蛋白 (FKBP), 及其对钙释放通道的调控和可能机制.

1 FK506 与 FK506 结合蛋白

免疫抑制剂被广泛用于防止器官移植中可