

- binding domain of skeletal muscle myosin light-chain kinase: indication of a conformational change in the central helix. *Biochemistry*, 1991, **30** (22): 5498~ 5504
- 6 Ikura M, Clore G M, Gronenborn A M, *et al.* Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science*, 1992, **256** (5057): 632~ 638
 - 7 Meador W E, Means A R, Quirocho F A. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of X-ray structure. *Science*, 1993, **262** (5113): 1718~ 1721
 - 8 Finn B E, Forsen S. The evolving model of calmodulin structure, function and activation. *Structure*, 1995, **3** (1): 7~ 11
 - 9 Chattopadhyaya R, Meador W E, Means A R, *et al.* Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 1992, **228** (6): 1177~ 1192
 - 10 Tarlor D A, Sack J S, Maune J F, *et al.* Structure of a recombinant calmodulin from *Drosophila melanogaster* at 2.2 Å resolution. *J Biol Chem*, 1991, **266** (38): 21375~ 21380
 - 11 Rao S T, Wu S, Satyshar K A, *et al.* Structure of *Paramecium tetraurelia* calmodulin at 1.8 Å resolution. *Protein Sci*, 1993, **2** (3): 436~ 447
 - 12 Vandonselaar M, Hickit R, Quail J W, *et al.* Trifluoperazine-induced conformational change in Ca²⁺-calmodulin. *Nature Struct Biol*, 1994, **1** (11): 795~ 801
 - 13 Cook W J, Walter L J, Walter M R. Drug binding by calmodulin: crystal structure of a calmodulin-trifluoperazine complex. *Biochemistry*, 1994, **33** (51): 15259~ 15265
 - 14 Zhang M, Tanaka T, Ikura M. Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nature Struct Biol*, 1995, **2** (11): 758~ 766
 - 15 Clore G M, Bax A, Ikura M, *et al.* Structure of calmodulin-target peptide complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 1993, **3** (10): 838~ 845
 - 16 Meador W E, Means A R, Quirocho F A. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science*, 1992, **57** (5085): 1251~ 1255
 - 17 Torok K, Whitaker M. Talking a long, hard look at calmodulin's warm embrace. *BioEssays*, 1994, **16** (4): 221~ 224
 - 18 James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: Just two faced or multi-faced? *Trends Biochem Sci*, 1995, **20** (1): 38~ 42
 - 19 Rhoads A R, Friedberg F. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*, 1997, **11** (2): 331~ 340
 - 20 Osawa M, Swindells M B, Tanikaw J, *et al.* Solution structure of calmodulin-W7 complex: The basis of diversity in molecular recognition. *J Mol Biol*, 1998, **276** (1): 165~ 176

Recent Advance in Calmodulin Structure Biology.

MA Li-Geng, SUN Da-Ye (Laboratory of Molecular Cell Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China); YAN Long-Fei (Laboratory of Biochemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China).

Abstract Calmodulin, a Ca²⁺ receptor, is an important constituent of cellular signal transduction systems. In recent years, much progress has been made on the three-dimensional structure of calmodulin, this leads the scientists to understand the mechanisms of the activation of calmodulin by Ca²⁺ and the interaction between calmodulin and its target enzymes. A concise description is given on the 3D structures of Apo-calmodulin, Ca²⁺-calmodulin and the complex of calmodulin with its target peptides and antagonists.

Key words calmodulin, three-dimensional structure, protein crystallography, nuclear magnetic resonance spectroscopy

不同视觉经验中 *zif268* 基因的表达模式

丁 沛 蔚 青 王 尧

(上海铁道大学基础医学院, 上海 200070)

摘要 *zif268* 基因编码一转录因子 ZIF268. 在发育的视皮层中, *zif268* 基因的表达模式受发育的调节. 在具有正常视觉经验的视皮层中, *zif268* 基因有较高水平的表达. 视觉废置后, 视皮层内该基因的表达水平显著降低. 通过视觉刺激可显著增强该基因的表达. 有关 *zif268* 基因表达模式的研究对于阐明该基因在哺乳动物视觉系统中的生理功能起到借鉴的作用.

关键词 视皮层, *zif268*, 基因表达, 视觉发育

学科分类号 R739.41

zif268 是 Milbrandt 及 Lim 等分别于 1987 年克隆发现的. 其包括一内含子序列和两个外显子序列, 基因全长为 3.8 kb. *zif268* 编码一分子质量为 61 ku 的蛋白质 Zif268. 胞浆中的 Zif268 可被激活

为转录因子 ZIF268 而被转移至胞核中. ZIF268 具有三个连续的锌指结构, 其编码序列也是连续的,

收稿日期: 1997-12-23, 修回日期: 1998-07-08

位于 3' 端外显子内. 此锌指结构可与调节序列 GCGG/TGGGCG 结合, 进而调节基因的转录. *zif268* 在视皮层中的表达受神经营养素及神经递质的快速调节. 神经营养素或神经递质作用于特异的受体系统, 如: N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate NMDA) 受体- Ca^{2+} 载体复合体, 可导致 Ca^{2+} 内流, 激活磷脂酶 A_2 和某些激酶, 进而增强 *zif268* 的核内转录. 有较多实验表明, 视觉刺激能显著增强 *zif268* 在视皮层中的表达, 而视觉废置可使 *zif268* 的表达明显降低.

1 正常视觉经验中 *zif268* 的表达

1.1 *zif268* 在发育视皮层中的表达

在发育的视皮层中, *zif268* 基因的表达模式受发育的调节^[1,2]. 半周龄的幼猫, Zif268 的表达几乎完全定位在视皮层的 VI 层. 1 周时, 免疫活性细胞, 主要形成两条区带, 一条分布在 VI 层, 另一条分布在下 IV 层. 2.5 周时, Zif268 免疫活性细胞较广泛地分布于 IV 至 VI 层之间, 但 I 至 III 层则无 Zif268 的表达. 到 5 周龄时, Zif268 高度表达于视皮层各层的神经细胞中, 但在 I 层和 V 层中, 免疫标记较弱. 10 周龄的猫, IV 层的染色强度进一步下降, 如成年的猫一样, Zif268 免疫活性细胞几乎完全定位在 IV 层以上及以下各层中.

Worley 等^[3]通过观察大鼠发现, 在大鼠视皮层中 *zif268* mRNA 和蛋白质水平于出生后 11~16 d 之间明显升高, 到 21 d 时达到峰值. 另外, 在发育的猴视皮层中也观察到 Zif268 水平增高的现象. 从一些现象来看, 视觉信号的输入能引导 *zif268* 基因的表达, 而动物睁眼恰如此基因表达的开关. 现已公认, 正常视觉系统的形成必须依赖正常的视觉经验. 这提示, 在视皮层的成熟过程中, Zif268 可能通过调节某些基因的转录而发挥重要的作用.

1.2 *zif268* 在成年视皮层中的表达

在成年且具有正常视觉经验的视皮层中, Zif268 蛋白和 *zif268* mRNA 的表达水平均较高. Kaplan 等^[1,2]发现, 在猫的初级视皮层中, Zif268 蛋白于 II、III 和 VI 层中有高水平的表达, 而在 IV 层中表达水平较低. 但他们又注意到在与 V 层相毗邻的 IVb 层中, 有一窄的染色条带. 用 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 (methyl dihydro-dibenzocycloheptimine maleate) 处理动物后, *zif268* mRNA 和 Zif268 蛋白质的表达水平均显著下降. 通过阻断去

甲肾上腺素能输入, 也发现有 Zif268 表达水平降低的现象^[4].

在成年的猴视皮层中, *zif268* mRNA 和 Zif268 蛋白均高水平地表达于 II/III 层、IV 层的一部分和 VI 层之中^[5,6]. 在 IV 层中, 该基因的表达主要被限制在 IVC β 层, 在 IVC α 和 IVA 层中该基因表达较少. IVB 层的染色最浅, 通常仅见很少几个标记的细胞. 在初级视皮层中, Zif268 免疫活性细胞的数量多于纹状体外周的视觉区域. 用锥形细胞标记物微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2 MAP2) 和 SMI-32 对 Zif268 免疫活性细胞进行双标记, 发现各层的细胞均被同时染色. 但使用抑制性神经元标记物进行标记, 如使用微清蛋白 (parvalbumin), 则无此种同时染色现象. 另外, 用荧光黄染色后, Zif268 免疫活性细胞还总是表现出锥形的形态. 总之, 这些结果表明, Zif268 主要表达于猴视皮层活性神经细胞中的一亚细胞群中. 提示, ZIF268 在此亚细胞群中, 通过调节基因的转录而完成其生理功能.

在猫的 IVb 层和猴的 IVC β 层, Zif268 表达较多可能与该部位外侧膝状核的特异性输入有关. 猫的 IVb 层接受的输入完全来自外侧膝状核的 X 细胞, 与此类似, 猴的 IVC β 层接受的输入来自外侧膝状核的小细胞层 (其细胞具有类 X 性质). X 细胞对静止的点或光栅以可预期方式反应, 反应表现为几乎是线性的空间总和, 而且具有持续反应的特性, 并与视觉刺激的时程相一致. 因此, 在这两层中, Zif268 的高度表达可能起因于投射到这两层的外侧膝状核神经细胞的持续反应的特性. 与此相对应的是, 猫的 IVa 层和猴的 IVC α 层既接受视丘的持续性 (X 细胞) 输入, 也接受视丘的短暂性 (Y 细胞) 输入, 这可用来解释为什么 Zif268 在这些层中的表达有所下降. 此外, Zif268 的表达在纹状体中多于纹状体外周视觉区域的现象也说明, 持续性的输入活动可能导致 Zif268 的表达.

2 异常视觉经验中 *zif268* 的表达

2.1 视觉废置

Worley 等^[3,7]用大鼠检测了单眼废置对 *zif268* 基因表达的影响. 活体注射河豚毒素, 2~4 h 后废置眼对侧初级视皮层中 *zif268* mRNA 和蛋白质水平均选择性地下降. 此效应主要发生在 IV 层, II/III 层和 VI 层中程度较轻. 通过黑暗饲养的方法也发现, 视觉废置后 4 d 或更长时间之后, *zif268*

mRNA和蛋白质水平均表现出大幅度的下降,虽然下降程度不如注射河豚毒素后那样剧烈,但分布的范围较广,既包括初级视皮层也包括邻近的相关皮层。

Chaudhuri 等^[5,6]用猴研究了单眼废置和双眼废置对 *zif268* 基因表达的影响。黑暗饲养 24 h 后,除 II 层可观察到一很深的免疫条带外,初级视皮层其余各层均表现出 Zif268 表达的显著下降。单眼废置后,可观察到一系列 Zif268 水平升高的眼优势柱,这些眼优势柱与 Zif268 水平降低的眼优势柱交错排列。Zif268 高度表达的眼优势柱对应于非废置眼,而 Zif268 表达下降的眼优势柱对应于废置的单眼,它们在空间上的排布与通过细胞色素氧化酶染色所获得的眼优势柱相一致。Chaudhuri 等还发现,单眼缝合后 3 h, Zif268 表达水平的下降就足以使眼优势柱被分辨清楚。更短时间的单眼废置(约 30 min)就足以使与废置眼相对应的眼优势柱中 *zif268* mRNA 表达水平降低,这种表达降低在各层中均清晰可见。

2.2 视觉刺激

成年大鼠在黑暗中饲养一段时间以后,再暴露于光线之下,其 *zif268* mRNA 及蛋白质水平显著增高^[3,7,8],在视觉刺激后 2 h Zif268 的表达达到峰值,然后逐渐降低,6 h 后恢复到正常水平。这种现象在幼年大鼠中更为明显。Kaminska 等^[9]通过凝胶移动延迟分析发现,在视觉刺激开始后的 45 min 内, ZIF268 的 DNA 结合活性明显增强。这些现象提示, Zif268 的表达及其生理活性具有视觉经验的依赖性。

Kaplan 等^[2]将幼猫和成年猫置于黑暗中饲养一周后,再于光线中暴露 1 h,然后检测视皮层中 Zif268 的免疫活性,发现这两组猫中 Zif268 的免疫活性均显著增强。在光线刺激 4 h 之后,成年猫视皮层中 Zif268 的表达模式已基本上类似于正常对照组。

Chaudhuri 等^[6,10,11]用猴在 mRNA 和蛋白质两种水平上检测了 *zif268* 的诱导。首先,成年猴在黑暗中饲养 24 h,然后将其一只眼暴露于光线之中,一组暴露 2 h,一组暴露 5 h。在这两组中,均观察到了高度表达 Zif268 和低度表达 Zif268 的眼优势柱。光照 2 h 组与光照 5 h 组对比可发现,前者在 IV 层的眼优势柱比后者清晰,而后者在其余各层的眼优势柱比前者清晰。其次,对成年猴和处于关键期的幼猴进行翻转遮盖实验,即单眼眼罩遮盖

3 h 后打开,同时遮盖另只眼 30 min。用原位杂交和免疫组织化学方法分别检测后,在两组动物中均得到两种不同的眼优势柱组合。在一种组合中,可见 Zif268 蛋白质水平的升高;在另一种组合中,可见 *zif268* mRNA 水平的升高。前者中,蛋白质水平升高的眼优势柱代表最初未遮盖的另只眼,而蛋白质水平较低的眼优势柱代表遮盖 3 h 的单眼;后者中, mRNA 水平升高的眼优势柱代表后来打开 30 min 的单眼,而 mRNA 水平较低的眼优势柱代表后来遮盖 30 min 的另只眼。

虽然有关 *zif268* 基因在视皮层的表达模式已较多的研究,但要详细阐明 *zif268* 在视觉系统中的生理功能仍需时日。

参 考 文 献

- 1 Kaplan I V, Guo Y H, Mower G D. Developmental expression of the immediate early gene EGR-1 mirrors the critical period in cat visual cortex. *Dev Brain Res*, 1995, **90** (1~2): 174~179
- 2 Kaplan I V, Guo Y H, Mower G D. Immediate early gene expression in cat visual cortex during and after the critical period differs between EGR-1 and fos proteins. *Mol Brain Res*, 1996, **36** (1): 12~22
- 3 Worley P F, Cole A J, Murphy T H, *et al.* Synaptic regulation of immediate early genes in brain. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1990, **55** (1): 213~223
- 4 Bhat R V, Braban J M. High basal expression of *zif268* in cortex is dependent on intact noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*, 1992, **227** (4): 447~448
- 5 Chaudhuri A, Cynader M S. Activity-dependent expression of the transcription factor Zif268 reveals ocular dominance columns in monkey visual cortex. *Brain Res*, 1993, **605** (2): 349~353
- 6 Chaudhuri A, Matsubara J A, Cynader M S. Neuronal activity in primate visual cortex assessed by immunostaining for the transcription factor Zif268. *Vis Neurosci*, 1995, **12** (1): 35~50
- 7 Worley P F, Christy B A, Nakabeppu Y, *et al.* Constitutive expression of *zif268* in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (12): 5106~5110
- 8 Nedive E, Fieldust S, Theill L E, *et al.* A set of genes expressed in response to light in the adult cerebral cortex and regulated during development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (5): 2048~2053
- 9 Kaminska B, Kaczmarek L, Chaudhuri A. Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex. *J Neurosci*, 1996, **16** (12): 3968~3978
- 10 Chaudhuri A, Larocque S, Nissarov J, *et al.* Different temporal patterns of immediate-early gene mRNA and protein expression allow multiple labeling strategies in visual cortex of monkey. *Soc Neurosci Abstr*, 1995, **21** (1): 1752
- 11 Chaudhuri A, Nissarov J. Multiple activity maps of primate visual cortex produced by sustained and transient expression of the immediate-early genes *zif268* and *c-fos*. *Soc Neurosci Abstr*, 1996, **22** (1): 1610

Expression Patterns of *zif268* Induced by Different Visual Experiences. DING Pei, WEI Qing, WANG Yao (Medical School, Shanghai Tiedao

University, Shanghai 200070, China).

Abstract The gene *zif268* codes for a transcription factor ZIF268. The expression pattern of *zif268* in developing visual cortex is regulated. *zif268* is highly expressed in adult visual cortex which experienced normal visual input. After visual deprivation, the expression level of *zif268* is strongly down-

regulated, while visual stimulation can significantly increase the expression level of *zif268*. The studies concerning the expression pattern of *zif268* offer further insight into the physiological functions of *zif268* in the mammalian visual system.

Key words visual cortex, *zif268*, gene expression, visual development

凋亡调控基因 BCL2 家族研究的新进展

刘陶文¹⁾

(桂林医学院生物工程研究所, 桂林 541004)

摘要 凋亡的调控是细胞生理死亡和肿瘤发生的重要机制. 对各种刺激诱导下细胞凋亡机制的分析有助于深入了解肿瘤细胞生物学及发现新的治疗对策. 凋亡调控基因 BCL2 家族成员可分为凋亡阻遏基因和凋亡促进基因. 这些基因编码的蛋白质分子通过组成和/或影响同二聚体与异二聚体的不同比例而介导其对细胞存活的生物学效应.

关键词 凋亡, BCL2 家族, 机制, BCL2/BAX

学科分类号 Q7

抗凋亡基因 BCL2 家族的发现开辟了新一类癌基因——凋亡调控基因的新纪元^[1]. 不同于一般的癌基因与抑癌基因, 凋亡基因的生物学效应是调控细胞存活期, 而不影响细胞增殖. 已知 BCL2 家族至少包括 10 个成员, 成员之间通过组成同二聚体、异二聚体而促进或抑制凋亡, 从而与肿瘤消长关系密切^[2].

1 BCL2

BCL2 家族的主要代表, 通过多种途径介导凋亡.

1.1 BCL2 的作用需要一完整的膜结构

BCL2 的羧基端为疏水性, 含有一个由 19 个氨基酸伸展成的跨膜结构. 亚细胞组分分析、免疫荧光及共聚焦显微研究显示 BCL2 是一个 26 ku 的胞内膜蛋白, 其分布依细胞类型而定, 在造血细胞表达水平最高, 常位于线粒体、光面内质网及核膜. BCL2 的羧基末端作为信号锚 (signal anchor) 序列插入线粒体外膜, 其胞浆多肽部分对蛋白酶敏感. 缺乏信号锚序列的 BCL2 抗凋亡功能不完全, 但仍可与 BAX 结合成异二聚体. BCL2 功能的发挥依赖于其在亚细胞膜的定位. BCL2 氨基末端的大部分暴露于胞浆, 借此可与胞浆蛋白或其他同时锚定在线粒体的 BCL2 样分子相互作用. BCL2 可阻

遏因缺乏线粒体 DNA 而不能携带电子传递的细胞凋亡, 从而提示 BCL2 的功能并不需要一个完整的电子传递/氧化磷酸化链^[3].

1.2 BCL2 能抑制氧化剂诱导的凋亡

内质网、线粒体外膜及核膜是活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生部位. 而 BCL2 也正存在于这些部位, 这促使人们探讨 BCL2 与 ROS 在细胞凋亡中的作用关系, 进而观察到 BCL2 能抗 H₂O₂、t-丁基或甲萘醌 (menadione) 对细胞凋亡的诱导. 在低浓度时, 这些氧化物主要是通过凋亡途径杀死细胞. 此外, BCL2 可拮抗某些降低胞内还原型谷胱甘肽含量的制剂诱发的凋亡^[4]. 上述结果提示 ROS 可能涉及能被 BCL2 阻遏的细胞凋亡途径. 近来研究反映抗氧化剂损伤为 BCL2 抗凋亡的原理之一, 但在此途径中 BCL2 是直接或间接作用仍未知.

1.3 BCL2 影响细胞内钙内流

观察 BCL2 功能的另一方面是其存在于内质网, 而后者与胞内钙自稳的调节有关. Ca²⁺ 影响凋亡, 因为某些核小体 DNA 的降解为钙依赖性,

¹⁾ 现工作单位: 广西壮族自治区第二人民医院肿瘤血液学研究所, 桂林 541002.

收稿日期: 1998-01-02, 修回日期: 1998-06-08