

- Biophys. 1976; 177: 46
- 11 Montfort W, Villafranca J E, Monzingo A F *et al.* J Biol Chem, 1987; 262: 5398
- 12 Endo Y, Chan Y L, Lin A *et al.* J Biol Chem, 1988; 263: 7917
- 13 Sperti S, Brigotti M, Zamboni M *et al.* Biochem J, 1991; 277: 281
- 14 Cawley D B, Hedblom M L, Houston L L. Biochemistry, 1979; 18: 2648
- 15 Paleologue A, Reboud J P, Reboud A M. FEBS letter, 1986; 208: 373
- 16 Terao K, Uchiumi T, Endo Y *et al.* Eur J Biochem, 1988; 174: 459

# 潜活形式的转化生长因子 $\beta$ 的结构与功能

龙建银 王会信

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

**摘要** TGF $\beta$  是一类多功能的细胞增殖调控因子, 具有广泛的临床应用前景. 天然情况下分泌及重组表达出来的 TGF $\beta$  都以无活性的潜活复合物的形式存在, TGF $\beta$  潜活复合物的活化是控制 TGF $\beta$  生物功能的重要方式. 文章旨在对天然、重组形式的 TGF $\beta$  潜活复合物的分子结构及其生理条件下可能的活化机理作一综述.

**关键词** 转化生长因子, 潜活复合物, 活化机理

## 1 TGF $\beta$ 及其潜活形式

### 1.1 TGF $\beta$ 简介

转化生长因子 $\beta$  是一大类多功能的细胞生长、分化的调节蛋白, 该家族现包括至少 5 种 TGF $\beta$  ( $\beta_1$ — $\beta_5$ ) 和其他类似物质<sup>[1]</sup>. 它几乎存在于所有正常、癌变的细胞及组织中. 现已证明, 几乎所有细胞都能合成 TGF $\beta$  家族中这种或那种成员, 几乎所有正常细胞都有该家族成员的膜结合受体, TGF $\beta$  几乎参与了哺乳动物各种细胞的病理生理过程. 依靶细胞不同, TGF $\beta$  可执行促进/抑制增殖分化作用; 它在创伤愈合、胚胎发育、细胞外基质形成、骨的重建等方面也有重要作用. 此外, 它还参与免疫调节、神经系统的发育及营养等过程. 有专家估计, 该家族的主要成员 TGF $\beta_1$  有可能在五年内开始临床应用于创伤愈合、免疫抑制、骨髓保护、肿瘤抑制等方面.

### 1.2 TGF $\beta$ 的一级结构

TGF $\beta$  cDNA ( $\beta_1$ — $\beta_5$ ) 已被克隆并已在哺

乳动物细胞 COS, CHO 中表达成功. 活性 TGF $\beta_1$  是 25kD 的均二聚体, 由 2 个相同的 12.5kD 的肽链借一对二硫键交联起来. 成熟肽单体由 112 个氨基酸组成, 并以 390 个氨基酸的前体分子合成出来, 单体部分位于前体的羧基端<sup>[1,2]</sup>. 见图 1.

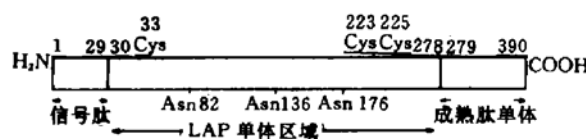


图 1 TGF $\beta_1$  前体的一级结构

TGF $\beta_1$  分泌之前进行的翻译后加工包括<sup>[3,4]</sup>: a. 信号肽酶切除 N 端 29 个氨基酸的信号肽; b. 糖基化 (在 3 个糖基化位点 Asn<sup>82</sup>, Asn<sup>136</sup>, Asn<sup>176</sup> 上添加唾液酸、甘露糖); c. 磷酸化 (在 Asn<sup>82</sup>, Asn<sup>136</sup> 的糖链中心的甘露糖上合成 Man-6-P (6-磷酸-甘露糖)); d. 蛋白酶水解

Arg<sup>278</sup>-Ala<sup>279</sup>, 释放出单体部分; e. 亚基装配(单体结合成均二聚体). 由于前体原区(30—278位)对维持 TGF $\beta$  的潜活状态有重要作用, 目前特将其二聚体形式称为潜活相关蛋白(LAP)<sup>[5]</sup>.

### 1.3 TGF $\beta$ 的潜活形式

与绝大多数生长因子不同的是, 从血小板中释放和大多数细胞中分泌的 TGF $\beta$  都是以无生物活性的潜活形式(latent form)出现的, 它是活性 TGF $\beta$  与其他调节蛋白结合而形成的复合物. 这种潜活 TGF $\beta$  复合物(LTGF $\beta$ )不能结合细胞表面的 TGF $\beta$  受体, 不被 TGF $\beta$  特异的抗体识别, 也不能诱导 TGF $\beta$  特有的生物反应(如抑制 NRK 细胞生长)<sup>[6]</sup>. 重组表达的 TGF $\beta$  也以潜活形式存在<sup>[7]</sup>. LTGF $\beta$  可在体外被活化成活性 TGF $\beta$ . 生理条件下 LTGF $\beta$  的活化可能是控制 TGF $\beta$  生物功能的方式. 对 LTGF $\beta$  结构组成的了解, 有助于推断其活化机理.

## 2 TGF $\beta$ 潜活复合物的结构组成

图 2 简要概括了不同来源 TGF $\beta$  潜活复合物的结构.

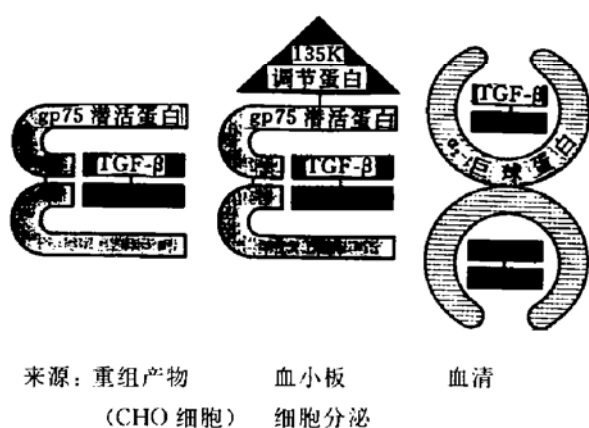


图 2 不同来源 LTGF $\beta$  复合物的结构<sup>[1]</sup>

### 2.1 天然情况

**2.1.1 血小板及某些细胞** 从人血小板、大鼠血小板、人成纤维细胞等提纯的 LTGF $\beta_1$  以及 BSC-40 细胞分泌的 LTGF $\beta_2$ , 都由三部分组成. a. 125—160kD(血小板来源)或 70—190kD

(人成纤维细胞来源)的 TGF $\beta_1$  调节子(或结合蛋白 TGF $\beta_1$ -BP). 目前对其功能尚未全弄清楚; 但普遍认为它不是维持 TGF $\beta_1$  潜活状态所必需的主要成分, 因为纯化或重组的 TGF $\beta_1$ -BP 并不能直接结合 TGF $\beta_1$  而使之失活. 对体外重组表达的 TGF $\beta_1$ -BP 的以及结构的分析表明, 它具有多个 EGF 样重复序列, 可能为潜活复合物定位到靶器官并进行活化提供导向作用<sup>[8]</sup>. b. 75kD 二聚体形式的潜活相关蛋白 LAP. 它与 TGF $\beta_1$ -BP 以一对二硫键交联并与 TGF $\beta_1$  以非共价键联结. 这种相互作用足以掩盖 TGF $\beta_1$  的受体结合位点和抗原决定簇. 目前普遍认为, 正是 LAP 与 TGF $\beta_1$  这种相互作用导致 TGF $\beta_1$  的潜活状态. 这已得到体外单独表达的 LAP 的实验支持<sup>[4]</sup>. c. 25kD 的二聚体成熟肽 TGF $\beta_1$ .

**2.1.2 血清中<sup>[1]</sup>** 血清中, TGF $\beta_1$  可与  $\alpha_2$ -M ( $\alpha_2$ -巨球蛋白)结合, 但结合后其活性几乎完全丧失. 从血清中纯化的 LTGF $\beta_1$  是 750kD 的二聚体, 单体由一分子的  $\alpha_2$ -M 和两分子成熟的 TGF $\beta_1$  组成. 人们推测, 血清中  $\alpha_2$ -M 通过与 TGF $\beta$  形成复合物这样一种机制, 来限定过量活性形式 TGF $\beta$  的局部作用.

### 2.2 重组情况下

与天然组织、细胞分泌的 TGF $\beta$  不同, 在 CHO, COS 细胞以及人 293S 细胞中表达的 TGF $\beta_1$ <sup>[7]</sup>, TGF $\beta_2$ <sup>[9,10]</sup> 的潜活复合物, 除 LAP 和成熟肽外, 不存在第三类蛋白(如 TGF $\beta_1$ -BP). 这种复合物中 LAP 的两条链通过两对二硫键连接, 并与 TGF $\beta_1$  借非共价键相连成 90—110kD 的复合物. LAP 的单体则不能结合 TGF $\beta_1$ . 可见, 二聚体形式的 LAP 足以使 TGF $\beta$  维持潜活状态.

## 3 LTGF $\beta_1$ 的活化、调控机理

### 3.1 LTGF $\beta_1$ 活化调节的重要性

由于 TGF $\beta$  受体存在于大多数细胞类型中, 加上 TGF $\beta$  家族本身的复杂性和多效性, 对 TGF $\beta$  的活性控制就显得格外重要. 通过形成潜活复合物, 可以限制 TGF $\beta$  的活性, 避免不

必要的 TGF $\beta$  引起的应答。事实上, 生理条件下的活性 TGF $\beta_1$  只能起局部作用, 仅限于其合成部位; 一旦离开分泌源细胞, TGF $\beta_1$  就将迅速被细胞表面广泛的结合蛋白或组织间液中的  $\alpha_2$ -M 所结合而失活。与此相反, LTGF $\beta_1$  比 TGF $\beta_1$  具有长得多的质膜半衰期<sup>[5]</sup>, 很长时间内仍限定在循环系统内而不被降解。这样, LTGF $\beta_1$  就能从合成部位扩散, 循环到达较远的靶器官。可见, 通过形成潜活复合物, 活性 TGF $\beta_1$  可从自分泌/旁分泌作用方式转变为内分泌样的方式。

由此可见, 对潜活 TGF $\beta$  的活性控制是保证机体正常生理反应的途径。

### 3.2 体外活化 LTGF $\beta$ 的方式

天然、重组来源的 LTGF $\beta$  都必须经过活化才能具有显著的 TGF $\beta$  活性。表 1 总结了 LTGF $\beta_1$  的体外活化方式:

表 1 LTGF $\beta_1$  的体外活化方式

活化因素	方式、条件	参考文献
pH	pH<3.5 或 pH>12.5	[6]
加 热	95℃, 5min	[4]
增溶剂	SDS (0.02%) 或 豚 (8mol/L)	[6]
蛋白水解酶	纤溶酶	[11]
	组织蛋白酶 D	
体外共培养	内皮细胞/周皮细胞	[12]
	内皮细胞/平滑肌细胞	[12—13]
	活化的成骨细胞	

### 3.3 生理条件下的活化机理

在上述体外的活化方式中, 极端 pH, 加热及增溶剂等都不大可能在体内出现。理论上分析, 体内 LTGF $\beta$  的活化机理可能是: 局部区域释放蛋白水解酶或特异活化因子, 它们引起 LTGF $\beta$  复合物的不稳定性水解或解离; 或者 LTGF $\beta$  复合物与靶细胞表面蛋白或胞外基质相互作用, 最终释放出活性 TGF $\beta$ <sup>[8]</sup>。因此, 最近两年来这方面的工作, 集中在寻找可能的活化因子或结合蛋白, 事实上, LAP 和/或纤溶酶可能承担这样的角色。

#### 3.3.1 潜活相关蛋白 LAP

如前所述, LAP 与 TGF $\beta_1$  的相互作用导致了 TGF $\beta_1$  的潜活形式出现。越来越多的证据显示, LAP 与 TGF $\beta_1$  形成的潜活复合物的稳定性 (结构完整性) 是至关重要的。

由于酸化是通过离子强度的变化导致氢键等非共价键的破坏而最终引起 LTGF $\beta_1$  的活化, 人们相信 LAP 与 TGF $\beta_1$  间的非共价相互作用是导致潜活的原因。对 LAP 区域 3 个 Cys 残基的定点突变研究表明, Cys<sup>33</sup> 与成熟 TGF $\beta_1$  内 Cys 可能涉及共价交联, Cys<sup>223</sup>, Cys<sup>225</sup> 是 LAP 二聚体形成的主要维持力量<sup>[14]</sup>。此外, LAP 区域的糖基对 LTGF $\beta_1$  潜活的维持亦有重要贡献。参与潜活维持作用的糖类有 Man-6-P 和唾液酸<sup>[15]</sup>。最近又发现, 体外牛主动脉内皮细胞/牛平滑肌细胞共培养系统中 LTGF $\beta_1$  的活化, 可被 Man-6-P 和抗 Man-6-P 受体 IgG 特异性抑制<sup>[13]</sup>; 因此与 Man-6-P/IGF II R (Man-6-P 和 IGF II 的双功能受体, 存在于多种靶细胞上) 的结合是活化 LTGF $\beta_1$  所必需的。在 LAP 区域还存在多个碱性切割位点, 可被蛋白水解酶特别是纤溶酶攻击。如纤溶酶活化 LTGF $\beta_1$ , 就是通过对 LAP 区域的水解, 降解前体分子使 LTGF $\beta_1$  的构象发生改变并释放出 TGF $\beta_1$ <sup>[3]</sup>。

综上所述, LAP 与 TGF $\beta_1$  的相互作用可能涉及共价的二硫键、非共价键, 其中的糖类 (Man-6-P 和唾液酸) 亦有不可忽视的贡献。对 LAP-TGF $\beta_1$  潜活复合物结构的某些微小破坏, 都将导致 TGF $\beta_1$  的解离。

#### 3.3.2 共培养条件

许多体外培养的均一细胞都能分泌 LTGF $\beta_1$ , 但两种不同类型的细胞 (参见表 1) 共培养时, 大多数 LTGF $\beta_1$  活化为活性 TGF $\beta_1$ 。共培养系统的活化反应能力与两类细胞共培养的时间有关 (>12h)。活化反应的条件为, 细胞/细胞相互接触 (或挨得很近)、体外补充纤溶酶或尿激酶等纤溶酶原激活剂。

外源的 TGF $\beta_1$  能减少蛋白酶、胶原酶、纤溶酶原激活剂 (PA) 的合成, 同时刺激胶原酶

抑制物、纤维蛋白酶原激活剂抑制物 (PAI) 的合成. 体外共培养条件下 LTGF $\beta_1$  的活化, 可能是细胞内 PA-纤溶酶系统的变化, 这是一个自我反馈调节的系统过程<sup>[11]</sup> (参见图 3).

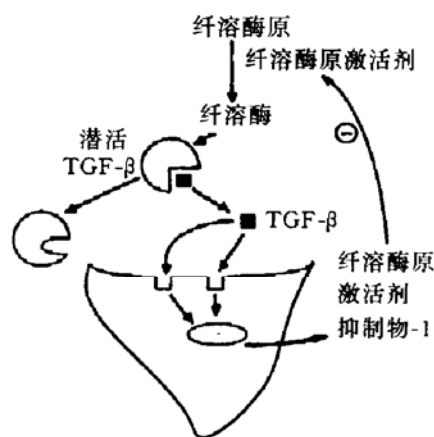


图 3 纤溶酶活化 LTGF $\beta$  的可能方式<sup>[11]</sup>

### 3.3.3 可能的活化因子

特别要引起注意的是纤溶酶的作用. 纤溶酶能活化成纤维细胞分泌的 50%—60% 的 LTGF $\beta_1$ ; 纤溶酶亦能活化重组 CHO 细胞中的 LTGF $\beta_1$  或人血小板来源的 LTGF $\beta_1$ ; 共培养条件下 LTGF $\beta_1$  的活化也离不开纤溶酶. 因此, 纤溶酶可能是生理条件下各种来源的 LTGF $\beta_1$  的有力活化因子<sup>[3]</sup>.

## 4 结 语

生理条件下 TGF $\beta$  都以潜活复合物形式存在, 这是 TGF $\beta$  成熟肽与潜活相关蛋白、TGF $\beta$  调节蛋白相互作用的结果. LTGF $\beta$  通过分泌、旁分泌或内分泌方式作用到达靶器官时, 必须先进行活化, 成为成熟肽, 才能执行其多种生理功能. 可以想象, 活化是 LTGF $\beta$  与靶细胞相互作用的结果. 但是, 由于 TGF $\beta$  的广泛分布及其靶细胞的广谱性, 目前, 对于这种活化的具体方式, 仍然没有统一的认识. 实际上,

体内 TGF $\beta$  的活化很可能不是单一的模式, 而是多种机制协同作用的结果. 这样, 针对不同靶细胞的类型、特点, 存在不同的活化方式, 以保证 TGF $\beta$  适合于发挥其多方面的生理作用.

医疗途径下 LTGF $\beta$  可能比活性 TGF $\beta_1$  更适合应用于临床. 阐明 LTGF $\beta$  在体内的活化机理, 对更好地应用 LTGF $\beta$  (而不是 TGF $\beta$ ), 尽量减少副作用, 无疑是至关重要的.

## 参 考 文 献

- 1 Roberts A B, Sporn M B. In: Sporn M B *et al.* eds. *Peptide growth factors and their receptors*, Berlin: Springer-Verlag, 1990; 417
- 2 Derynck R, Jarrett J A, Chen E Y *et al.* *Nature*, 1985; **316**: 701
- 3 Lyons R M, Gentry L E, Purchio A F *et al.* *J Cell Biol*, 1990; **110**: 1361
- 4 Gentry L E, Nash B W. *Biochemistry*, 1990; **29**: 6851
- 5 Wakefield L M, Winokur T S, Hollands R S *et al.* *J Clin Invest*, 1990; **86**: 1976
- 6 Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C *et al.* *J Biol Chem*, 1988; **263**: 6407
- 7 Gentry L E, Webb N R, Lim G J *et al.* *Mol Cell Biol*, 1987; **7**: 3418
- 8 Tsuji T, Okada F, Yamaguchi K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**: 88351
- 9 Madisen L, Farrand A L, Lioubin M N *et al.* *DNA*, 1989; **8**: 205
- 10 Madisen L, Lioubin M N, Finerty J R *et al.* *Growth Factors*, 1991; **5**: 317
- 11 Lyons R M, Keski-Oja J, Moses H L. *J Cell Biol*, 1988; **106**: 1659
- 12 Sato Y, Lyon T R, Moses H *et al.* *J Cell Biol*, 1990; **111**: 757
- 13 Dennis P A, Rifkin D B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**: 580
- 14 Brunner A M, Marquardt H, Malacko A R *et al.* *J Biol Chem*, 1989; **264**: 13660
- 15 Miyazono K, Heldin C-H. *Nature*, 1989; **338**: 158

**Code Domains and Their Potential Functions.**

Lao Weide. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 13

Various sequence blocks, due to their specific primary sequence box, and/or a curved helical DNA conformation, and/or a non- $\beta$ -helical DNA structure, can be organized in the corresponding higher order structures, and behave as functional sequence domains recognized and bound by specific proteins. They may be defined as "code domains". Code domains are genetically instructive for specific molecular interactions or processes, important not only in nucleus during interphase and during cell division, but also in differential gene expression during development and differentiation.

**Key words** code domain, chromatin superstructure, centromere, telomere, nuclear matrix, homeobox gene, differentiation and development

**Structure and Function of Respiratory Chain Enzyme System.** Xu Jianxing. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 18

The studies in this lab on the enzyme system of respiratory chain were reviewed briefly. Two inhibitors which affect simultaneously on three Q-related enzymes of complex I, II and III were synthesized. They could be an useful tools in the studies of ubiquinone reactions in respiratory chain. The direct interaction between TTFA inhibitive site of  $\text{QH}^+ \rightarrow \text{QH}_2$  of complex I and cytochrome  $b_{562}$  of complex III was found. This kind of interactions may play some roles in modulating the electron transfer from complex I to complex III. The maxi-

mum reconstitutive activity of lipid-depleted succinate-cytochrome c reductase with mixed phospholipids PC : CL : PE = 2 : 2 : 1 were obtained, this means not only the lipid but also thier composition were important for regulating the enzyme activiy of respiratory chain.

**Key words** ubiquinone, inhibitor, interaction

**Progress in Topography of Ribosomal RNA and RNA N-Glycosidase Research (I).** Zhang Jinsong, Liu Wangyi. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 23

Studies on ribosomal RNA topography play an important role toward elucidation of the functional roles of rRNAs in protein synthesis. RNA N-glycosidases are a group of ribosome-inactivating proteins which inactivate ribosomes by hydrolyzing the N—C glycosidic bond of a special adenylic acid in rRNA and releasing the adenine. Ricin A-chain is the first determined RNA N-glycosidase which has been studied in the greatest detail. Up to the present, 25 glycosidases have been characterized. The action site of RNA N-glycosidases lies in the  $\alpha$ -sarcin domain of 28S rRNA. Treatment of RNA N-glycosidases induces conformational change of ribosomes and leads to the inactivation.

**Key words** ribosome topography, ribosome-inactivating protein (RIP), RNA N-glycosidase, trichosanthin

**Latent Forms of Transforming Growth Factor- $\beta$ : Structure and Function.** Long Jianyin, Wang Huixin. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys.*

(China). 1994; 21 (1): 27

As a family of multifunctional cell-proliferation regulating factor, TGF- $\beta$  has great potential in clinical application. Both naturally secreted and recombinantly expressed TGF- $\beta$  are existed in the inactive form of latent complex. Activation of latent TGF- $\beta$  complex is an important pathway of modulating the biological function of TGF- $\beta$ . This review concerns on the molecular structure of both natural and recombinant latent TGF- $\beta$  complexes, and their possible activation mechanisms under physiological conditions.

**Key words** transforming growth factor- $\beta$ , latent complex, activation mechanism

**Lipid Containing Protein**. Pan Huazhen. (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 31

Proteins anchored in membrane by fatty acids or glycosylphosphatidylinositol have been found in a wide variety of cells. Recent evidence shows that the function of these proteins widely related with immunology and signal transduction. This review summarizes the progress in the past few years concerning the structure, biosynthesis and functions of these proteins.

**Key words** lipid containing protein, palmitic acid, myristic acid, glycosylphosphatidylinositol, structure, biosynthesis, function

**Progress in the Studies on Gene Mutations of Factor VIII**. Geng Jieping, Qi Zhengwu, Chen Zhu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 36  
 Human factor VIII is an important cofactor in the intrinsic blood coagulation. Hemophilia A

is the most common severe inherited bleeding disease due to the deficiency or abnormality of factor VIII. Factor VIII gene has been successfully cloned and expressed in eukaryotic cells that promotes the studies on the gene mutations of factor VIII widely and thoroughly. This article introduces the recent progress about this field, and new techniques used in researches. The study on gene abnormalities of factor VIII can be regarded as an excellent example both in depth and width for researches of the congenital diseases.

**Key words** coagulation factor VIII, hemophilia A, gene mutations

**Gene Expression Specifically in Mammary Glands of Transgenic Animals**. Chen Ruihuan. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 42

Heterogeneous genes express specifically in mammary glands of transgenic animals is established recently in gene engineering. The milk protein genes and their fusion fashions with heterogenous genes, the necessary elements and the possible factors which effect the expression of the recombinant genes in transgenic animals are introduced.

**Key words** milk protein genes, transgenic animals, mammary-gland-specific gene expression

**Progression in p53 and Rb Gene Methylation**. Yang Heping, Zhou Airu, Tang Jian. (*Department of Cardiopulmonary Endocrine, Beijing Medical University, Beijing 100083*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (1): 48  
 Progress in p53 and retinoblastoma (Rb) gene methylation is introduced. CpG dinucleotides are the hot spots of DNA methylation and mu-