

- Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 465
- 6 Kneser U, Kaufmann P M, Feigel H, *et al.* Pancreatic islet cotransplantation for hepatotropic stimulation: morphologic and morphologic evaluation. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 483
 - 7 Beitbart A S, Grande D A, Mason J M. Bone repair using cultured periosteal cells retrovirally transduced with BMP-7 gene. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 469
 - 8 Sacks M S, Gloeckner D G. A constitutive model for processed intestinal collagen layer. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 487
 - 9 Stock U A, Sodian R. Influence of seeding techniques on cell-polymer attachment of biodegradable polymers-polyhydroxyalkanoates. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 466
 - 10 Satoshi Kaihara M D, Stephen Kim M D, Mark Benvenuto B S, *et al.* Survival and function of co-cultures hepatocytes with non parenchymal cells or sinusoidal endothelial cell on biodegradable polymers under flow conditions. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 494
 - 11 Burg K J L, Holder W D, Culbertson C R. Selection of seeding methods toward enhances vascularization of porous absorbable constructs. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 494
 - 12 Kim B S, Mooney D J. Cyclic mechanical strain regulates the structure and function of engineered smooth muscle tissue. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 489
 - 13 Bhatia S N, Balis U J, Yarmush M L, *et al.* Microfabricated co-cultures of hepatocytes. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, Tissue Engineering, 1998. 483
 - 14 Roland W D, Holder W D, Culbertson C R, *et al.* Optimizing cell time and seeding density on porous, absorbable constructs. In: Vacanti C A, Mikos A G, eds. The Second Bi Annual Meeting of the Tissue Engineering Society. United States of American: Mary Ann Liebert Inc, 1998. 497
 - 15 吴泽志, 邵开峰, 宋关斌, 等. 肝癌细胞在 IV 型胶原被衬表面的粘附特性. 中华医学杂志, 1999, 79 (5): 369~ 372
Wu Z Z, Shao K F, Song G B, *et al.* Natl Med J China, 1999, 79 (5): 369~ 372
 - 16 俞为群, 宋关斌, 吴泽志, 等. 不同细胞周期大鼠肝实质细胞癌细胞粘附特性研究. 生物物理学报, 1999, 15 (2): 431~ 435
Yu W Q, Song G B, Wu Z Z, *et al.* Acta Biophysica Sinica, 1999, 15 (2): 431~ 435

A Brief Introduction of Study on Tissue Engineering.

WANG Yuan-Liang, PAN Jun, CAI Shao-Xi
(Biological Engineering College, National Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering of the State Education Ministry of China, Chongqing University, Chongqing 400044, China).

Abstract Tissue engineering was brought forwards only ten years. It has gotten high recognition all over the world and has been regarded as “a new growth point of economy” by many country. They have invested a lot of money as well as people and have gotten a lot of harvest. In China, many research groups are doing the related studies too. The second biannual meeting of the tissue engineering society was held in Florida, USA and the newest results of tissue engineering research were delivered. Here summarized its research development and put forward that how to ensure the function of engineered tissue is a very important question.

Key words tissue engineering, reconstruction, tissue

三叶因子家族

口如琴 王 蔚 李令媛 茹炳根

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 三叶因子家族是一类具有特殊结构——P 结构域的蛋白质家族, P 结构域包含 6 个高度保守的半胱氨酸残基及精氨酸、甘氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基。半胱氨酸残基以 Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6 连接形成三个链内二硫桥。已发现多种含有 P 结构域的多肽, 其中最引人注目的是 TFF1/ pS2、TFF2/SP 及 TFF3/ITF, 在正常组织中其主要表达位点分别为胃基底和胃体 (TFF1/ pS2)、胃窦深部的小凹 (TFF2/ SP) 及小肠和大肠杯状细胞 (TFF3/ ITF)。TFF 可能具有维持粘膜屏障和促进溃疡治愈的功能。TFF 含有 α 折叠 (α -helix), β 片层 (β -sheet)。三叶因子家族多肽的作用机理仍处于猜测阶段, 现有与粘蛋白共同作用和与受体作用两种假说。

关键词 三叶因子家族, 表达位点, 结构, 功能, 作用机理

学科分类号 Q55

含三叶结构域多肽是由丹麦 Nova 研究院的 Thim 课题组于 1982 年在纯化猪胰岛素的废料中首先发现的^[1]. 以后陆续在人的胃肠道、鼠的小肠和蛙的皮肤^[2]中发现了含有三叶结构域的多肽, 这些多肽构成了一个新的蛋白质家族——三叶因子家族 (trefoil factor family, TFF).

1 三叶结构域及三叶因子家族

1982 年《Regulatory Peptides》发表了关于猪胰解痉多肽制备、性质、组织分布及药理学的文章^[1]. 同年在人乳腺癌细胞系 MCF-7 发现一个受雌激素调节的基因, 1984 年和 1985 年发表了该基因的全序列^[3]. 1988 年人们认识到两者之间的同源性. 同年从爪蟾皮肤中发现的具有四个与之同源的解痉蛋白前体的序列, 促使 Thim^[4]于 1989 年提出理论, 将此三种蛋白质命名为一种新的蛋白质家族: 三叶因子家族, 并将其相应的同源序列命名为 P 结构域.

P 结构域约由 50 个氨基酸组成其基本单元, 其中包括 6 个高度保守的半胱氨酸残基及精氨酸、甘氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基. 6 个半胱氨酸残基形成三个链内二硫桥, 其连接方式为: Cys1-Cys5, Cys2-Cys4, Cys3-Cys6, 不同于其他具有重要生物功能的分子. 半胱氨酸残基之间的氨基酸数目保持一定, 形成这样一个基本结构: CX_{6~7}RX₂CGY/FPX₆CX₄CCFX₇PWCF. 三个二硫桥形成三个环, 就像三片叶子一样, 故 P 结构域也被称为三叶结构域. 由于三叶肽蛋白质家族的成员来源不同, 因而其命名一直有些混乱, 1996 年科学组织委员会对哺乳动物三叶肽蛋白质家族进行了统一命名, 采用 TFF (**TreFoil Factor**) 体系. 不同的种属来源以小写字母标志于前^[5].

迄今为止已从哺乳动物和两栖类动物中发现多种含有 P 结构域的多肽. 表 1 列举了已知含 P 结构域的多肽和蛋白质. 家族中最引人注目的是乳腺癌相关肽 (TFF1 或 pS2)、解痉多肽 (TFF2 或 SP) 及小肠三叶因子 (TFF3 或 ITF). 相应从不同哺乳动物中得到的同一含 P 结构域多肽的类似物其同源性 (70%~90%) 高于从相同哺乳动物中得到的不同的含 P 结构域多肽 (30%~45%).

表 1 已知哺乳动物和两栖类动物中含有 P 结构域的多肽和蛋白质^[2,6]

肽	含 P 结构域数目	主要分泌位点
hTFF1/hpS2	1	胃
mTFF1/mpS2	1	胃
xP1	1	胃
hTFF3/hITF	1	小肠
rTFF3/rITF	1	小肠
hTFF2/hSP	2	胃
pSP	2	胰腺
mSP	2	胃
xP2	2	皮肤
xP4	4	胃
FIM-A. 1	4	皮肤
FIM-C. 1	6	皮肤
P75k	1	皮肤腺

注: h: 人; m: 小鼠; r: 大鼠; p: 猪; x: 爪蟾; FIM: 蛙外皮肤蛋白.

2 哺乳动物三叶肽的表达

由于 pTFF2/pSP 首先在猪胰脏中被分离出来, 且其含量极高 (100 mg/kg), 胰脏一度被认为是三叶肽的主要表达部位^[1]. 后来的研究证明猪是胰脏中唯一明显表达三叶肽的物种. 在正常情况下, 三叶肽的主要表达位点是在胃肠道, 且具有区域和细胞选择性. TFF1/pS2 在正常组织中主要由胃窦和胃体的隐窝及表层上皮的粘膜细胞产生, 其次在小肠、结肠及乳腺表皮中也有低水平表达. hTFF2/hSP 和 rTFF2/rSP 主要在胃窦深部的小凹中表达, 而 pTFF2/pSP 除在胰脏的腺细胞中表达外, 也在胃和十二指肠的粘膜细胞以及空肠和回肠的上皮细胞中表达. TFF3/ITF 主要由小肠和大肠杯状细胞表达且分泌到肠表面^[7]. 另外 RNA 印迹表明 hTFF3/hITF 也在结肠、空肠、十二指肠及回肠表达, 在肾中也有表达^[2]. 而在乳腺、肝脏、脾脏、肌肉、心脏及睾丸中没有表达. 原位杂交表明 rTFF3/rITF 主要在十二指肠和结肠中表达. 1995 年 Joseph 等从大鼠脑的各个区域提取 mRNA, 从中得到 rP1. B cDNA. 其序列与 rITF 除个别碱基不同外, 其余完全一致. 从而证明 rP1. B 即 rITF. RT-PCR 及核糖核酸酶保护分析表明脑表达 rP1. B, 且在皮质脑干细胞和小脑 rP1. B 低水平表达. 由于 mRNA 表达与免疫组化分析 rP1. B 肽平行存在因而认为 rP1. B 在神经细胞中合成. 这是三

叶肽在神经细胞中表达的首例报道。之后人们又在人和大鼠的下丘脑中分别检测到 TFF3/ITF 和 TFF1/pS2 的表达。三叶肽是否是一种新的神经肽尚有待进一步的研究^[8]。

另外, 三叶肽也存在于它们正常表达位点之外的各种肿瘤细胞中^[9]。在 68% 的乳腺癌中能检测到 TFF1/pS2 的 mRNA。另外在胃癌、胰腺癌、大肠癌、子宫癌、卵巢癌、膀胱癌、前列腺癌中 TFF1/pS2 也有表达。最近在乳腺癌组织中也检测到了 TFF3/ITF 的表达。hTFF2/hSP 在胃癌中呈弥散型表达。

当胃肠道发生溃疡后, TFF1~3 表达的组织专一性消失。TFF1/pS2 和 TFF2/SP 在肠道内表达量大大增加, 而 TFF3/ITF 在胃内的表达量也大大增加。且在胃溃疡的动物模型中三叶肽的表达是高度诱导的。在冰醋酸诱导的大鼠溃疡模型中, 当 40 d 溃疡基本愈合后, 溃疡周围组织中 TFF3/ITF 免疫活性增加了上千倍, rTFF2/rSP 增加了 4 倍。免疫学检测表明愈靠近溃疡, 三叶肽表达水平愈高, 而离溃疡愈远, 其表达水平愈低。相反在用醋酸诱导的大鼠小肠绒毛膜溃疡模型中 rTFF2/rSP 的表达水平增加程度远远高于 TFF3/ITF。另外, 在与溃疡相关的胃转化组织和 Crohn's 病中, 往往也表达三叶肽^[2]。

Alison 等用冷冻探针法诱导大鼠胃溃疡, 损伤发生 0.5~2 h 后, TFF2/SP 首先表达, 随后

TFF3/ITF 表达, TGF α 和 EGF 的表达发生在最后。该实验中没有研究 TFF1/pS2 的表达情况, 说明三叶肽是机体对损伤作出的迅速反应。

3 三叶肽的空间结构

pTFF2/pSP 和 rTFF1/rpS2 的物理结构已经 NMR 光谱和 X 射线结晶分析阐明。pTFF2/pSP 具有独特的四级结构, 两个三叶结构域的三维结构非常相似, 均由相当紧凑的肽段和环构成。每个三叶结构域含有一对反平行的 β 片层, 在其上部和下部各有一个短的 α 螺旋。其二极结构元件排列方式为: helix(*)-loop(I)-loop(II)-helix(α 1)-strand(β 1)-loop(III)-strand(β 2)。三对二硫键将这些元件锁定, 形成一个核心, 三个环从核心向外伸出。TFF2/SP 两结构域通过 helix(*) 形成一小的接触面, 并与结构域连接区和 C 端的肽链通过次级键相互作用稳定 TFF2/SP 的空间结构^[10]。单体 rTFF1/rpS2 的三维结构与 pTFF2/pSP 非常相似, 只是其 N 端不存在 helix(*)。在三叶结构域的 loop2 和 loop3 之间, 高度保守的氨基酸残基环绕肽骨架形成一个 0.8~1.0 nm 的沟槽^[11]。此沟槽是否具有结合粘蛋白寡糖侧链的能力尚需进一步证明。该区也可能是三叶肽与其受体或转运蛋白的结合位点。另外, pTFF2/pSP 的晶体结构中不存在均聚二聚体形式而在溶液中二聚体并不存在。图 1 给出了 pTFF2/pSP 的三维结构^[10,11]。

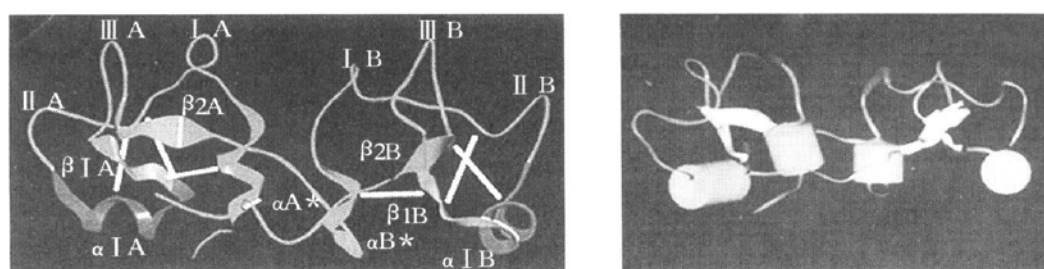


图 1 pTFF2/pSP 的三维结构

4 三叶肽的基因结构

使用 PCR 技术, 在细菌人工染色体 (BAC) 库中克隆筛选, 分离大的基因组 (110 kb) 重组子, 证明人的三种三叶肽基因均定位于 21 号染色体长臂 (21q22.3) 中长度为 55 kb 的片段内。其排列顺序如图 2。进一步证明了 Thim 提出的含有多个三叶结构域多肽的编码基因是由一个共同祖先通过基因复制而来的假说。

TFF1/pS2 基因转录起始位点上游 29 bp 有一 TATA box。在 -72 和 -639 位含有两个 CAAT 因子及 -12 位的可能的 SP1 结合位点。启动子的雌激素响应元件 (ERE) 位于 -428~-332 位, 此区还含有 TPA、EGF 和 C-Ha α ras 和 C-jun 蛋白的增强子。定位突变表明 ERE 为 -405~-393 之间的 13 bp, 与已知的 EREs 相似。大鼠 TFF3/ITF 的 5' 侧含有: a. RNA 酶结合位点; b. TATA box 及 220 bp 富含 AT 区, 此区含有 pit-2 同源盒结构

域; c. 15 倍重复的 dC-dA 寡核苷酸, 可形成 Z-DNA. 人的 TFF3/ITF 不含有富含 AT 区和 TATA box. RTFF3/rITF 与 hTFF3/hITF 5' 区仅

有 -60 bp 的序列具有 85% 的保守性. 其余序列没有显著的保守性, 因而这 60 bp 定点保守序列可能在 TFF3/ITF 表达调控中起重要作用^[12].

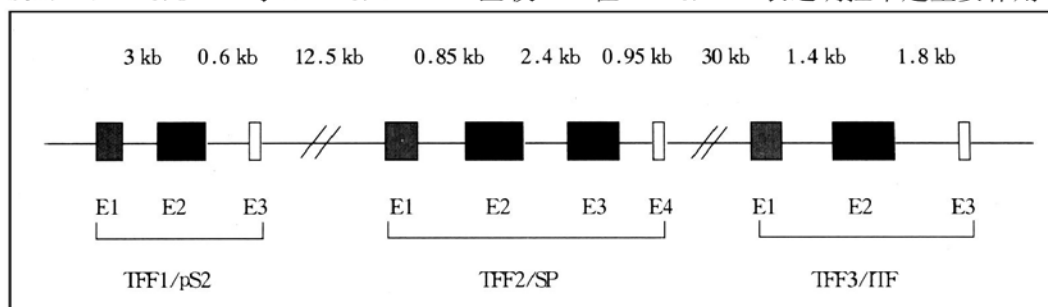


图 2 TFF 的基因结构

5 哺乳动物三叶肽的功能

尽管三叶肽蛋白质家族二级结构与其他生长因子不同, 但因为 EGF 家族、类胰岛素生长因子 I 和 II 都含有三个链内二硫桥, 人们一开始就提出三叶肽蛋白是生长调节因子的假说. 早先的实验表明, pTFF2/pSP 作为生长因子能够促进乳腺癌细胞系 MCF-7 和结肠癌细胞系 HCT 的增殖, 其发挥作用的最低浓度为 100 nmol/L, 这一浓度较之标准生长因子的作用浓度高 100~1 000 倍^[1]. 后来的实验证明只有在外源谷胱甘肽存在下, pTFF2/pSP 才能作为生长因子对 MCF-7 细胞发挥作用. 但最近的研究表明 hTFF2/hSP 和 hTFF3/hITF 及 rTFF3/rITF 都不能显著改变人结肠癌细胞系 HT-29、CaCO₂、T84 和非转化小鼠小肠表皮细胞系 IEC-6 和 IEC-17 的增殖^[2].

pTFF2/pSP 在体外能抑制平滑肌的收缩, 在体内能抑制小肠蠕动并在胰酶、胰凝乳蛋白酶和 HCl 存在下保持其解痉功能. 皮下注射和口服 pTFF2/pSP 能有效地抑制小肠蠕动. 口服 pTFF2/pSP 能有效地抑制五肽促胃酸激素诱导的胃酸分泌. 尽管此两者之间的关系尚未确定, 但可以肯定 pSP 在腔中自然分泌位点中有重要功能^[1].

人的各种肿瘤往往过量表达三叶肽, 人们一直在探索肿瘤形成和三叶肽之间的关系. 即肿瘤形成导致三叶肽的过量表达还是三叶肽的过量表达是导致肿瘤形成的一个因素. 转基因鼠乳房组织过量表达 TFF1/pS2 并不导致乳腺增生和发育异常^[13]. 给乳猪饲喂含高浓度 TFF1/pS2 的牛奶也未见其生长优势. TFF1/pS2 基因敲除的 5 个月小鼠肠道发生腺瘤的变化, 且有 30% 表现出多位点癌变, 因而 TFF1/pS2 被认为是一种肿瘤抑制因子, 尽管它

在乳腺癌中过量表达. 当然要充分说明 TFF1/pS2 和其他三叶肽在肿瘤抑制中的作用还需要更多的证明^[14].

已有许多的实验证明, 三叶肽在胃肠道的保护和修复过程中发挥重要的作用^[2]. 口服和皮下注射 TFF3/ITF 和 hTFF2/hSP 能预防和治疗吲哚美辛、乙醇和消炎痛引起的大鼠胃溃疡, 使大鼠溃疡指数不同程度地下降. 提前口服 TFF1/pS2 或同时口服 TFF1/pS2 和阿斯匹林能够产生几乎相同的结果. 离体实验也证实了三叶肽的保护作用. 牛磺胆酸和油酸能够破坏单层细胞屏障的完整性而使甘露醇进入细胞. 在加入损伤剂之前, 将三叶肽单独或与胃肠道衍生的粘蛋白一起加入结肠或小肠单层细胞中, 均能显著地减轻损伤试剂对细胞屏障的完整性的破坏, 并且三叶肽和粘蛋白在行使功能时表现出一定的协同性. 且不同来源的 TFF3/ITF 或 TFF2/SP 并无显著差异. TFF3/ITF 基因敲除小鼠生长正常, 无腹泻和便血, 粘膜结构正常, 但表皮细胞移动减慢. 缺失 TFF3/ITF 基因的小鼠饮用硫酸葡聚糖钠水溶液后, 50% 因大面积结肠炎出现腹泻和便血而死. 野生型仅有 10% 便血, 5% 死亡. 将重组 TFF3/ITF 经口灌胃给缺失 TFF3/ITF 基因的小鼠后, 能够恢复正常的粘膜修复功能. 说明 TFF3/ITF 在维持肠粘膜屏障中起重要作用.

三叶肽能够促进细胞的迁移^[15]. 利用大鼠小肠表皮细胞系 IEC-6 单层细胞用刀片刮伤作为细胞培养修复模型, 加入三叶肽后能提高损伤细胞的修复, 促进细胞向损伤边缘的移动. 但与其他细胞因子和生长因子不同, 加入抗 TGF- β 抗体后, 三叶肽仍能促进损伤的修复, 而其他细胞因子和生长因子在加入抗 TGF- β 抗体后, 不能促进损伤的修复.

三种三叶肽之间的空间结构如此相似, 它们的

功能是否可以相互替代呢? 口服三种三叶肽都可以防止胃肠道损伤因子对胃肠道的损伤, 结论似乎是肯定的. 但基因敲除动物模型中, 敲除三种三叶肽中的任何一种, 而不影响其他两种三叶肽的表达, 都会对模型动物产生不同程度的影响^[16]. 说明三种三叶肽在体内可能具有自己独特的功能, 不能相互替代.

最新的文献报道, 三叶肽可促进单核细胞的迁移. 也可诱导细胞通过 NOS2 途径产生 NO^[17]. 还可作为海马组织的趋化因子.

6 三叶因子家族蛋白的作用机理

已有多篇报道探讨关于三叶因子家族蛋白质的作用机理, 现主要有两种假说^[2].

一种假说认为三叶肽与粘蛋白共同作用形成稳定的胶状复合物, 以抵抗胃肠道酸流、蛋白酶的降解和机械损伤^[18]. 支持此机理的实验证据有: a. 向处于溶解状态的粘蛋白纯品中加入 TFF3/ITF 或 TFF2/SP 后, 粘蛋白的粘性显著增加. b. 三叶肽和粘蛋白各自均能促进细胞损伤的修复, 但两者共同作用时, 其修复功能大大提高, 而非粘蛋白则不能促进三叶肽对损伤的修复. c. 免疫印迹反应时, 除有约 50 ku 的蛋白质带外, 还有一高分子蛋白质带, 不能进入分离胶, 人们认为这是三叶肽与粘蛋白形成的复合体. d. 三叶肽与粘蛋白由相同的细胞产生, 损伤发生时二者的表达量同时上调.

另一种假说认为三叶肽通过与受体相互作用来行使其功能. 皮下注射剂量少至 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的三叶肽就能表现出保护作用, 这说明靶位点附近存在有三叶肽的特异受体或转运蛋白. Frandsen 等曾在大鼠小肠上皮细胞膜上观察到 pSP 专一性结合受体, 其结合解离常数 $K_d = 130 \text{ nmol}/\text{L}$, 其结合可抑制 cAMPase 活力^[11]. *E. coli* 表达的 ITF- β 半乳糖苷酶融合蛋白, 专一性结合于结肠隐窝、胃小凹和上皮细胞、肾收集管. 静脉注射 ¹²⁵I 标记的 pTFF2/pSP 后, 绝大部分放射性被胃吸收, 并特意结合于胃粘膜颈细胞和幽门腺上. 且这种结合可被非标记的 pTFF2/pSP 所取代. 因而人们认为存在专一性的配体受体相互作用.

近年来有关三叶肽作用的信号传导机制的研究日益增多. TFF3/ITF 能够迅速诱导 β -连环蛋白^[19], EGF 受体的酪氨酸发生磷酸化, 降低胞外信号相关蛋白激酶 (ERK) 的活性和诱导 ERK 中酪氨酸的磷酸化, 拮抗 TGF- α 对 ERK 活性的增强

作用. 酪氨酸专一和双重专一的磷酸化酶抑制剂可解除 TFF3/ITF 的作用. 表明 TFF3/ITF 通过激活酪氨酸专一或双重专一的磷酸化酶途径抑制 ERK 和 MAPK 信号传导途径^[20].

参 考 文 献

- 1 Jorgensen K H, Thim L, Jacobsen H E, *et al.* Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP): I. preparation and initial chemical characterization of a new polypeptide from porcine pancreas. *Regulatory Peptides*, 1982, **3** (1): 207~219
- 2 Sands B E, Podolsky D K. The trefoil peptide family. *Annu Rev Physiol*, 1996, **58**: 253~273
- 3 Jakowlew S B, Breathnach R, Jeltsch J-M, *et al.* Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res*, 1984, **12** (6): 2861~2878
- 4 Thim L A. New family of growth factor-like peptides trefoil disulphide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP), and frog skin peptides (spasmolysins). *FEBS Lett*, 1989, **25** (1): 85~90
- 5 Wright N A, Hoffmann W, Otto W R, *et al.* Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF) -domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett*, 1997, **408** (7): 121~123
- 6 Taupin D R, Pang K C, Green S P, *et al.* The trefoil peptides spasmolytic polypeptide and intestinal trefoil factor are major secretory products of the rat gut. *Peptides*, 1995, **16** (6): 1001~1005
- 7 Podosky D K, Lynch-Devaney K, Stow J L, *et al.* Identification of human intestinal trefoil factor: goblet cell-specific of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem*, 1993, **268** (9): 6694~6702
- 8 Probst J C, Zetzsche T, Weber M, *et al.* Human intestinal trefoil factor expressed in human hypothalamus and pituitary: evidence for novel neuropeptide. *The FASEB J*, 1996, **10** (13): 1519~1523
- 9 Lefebvre O, Chhenard M P, Masson R, *et al.* Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*, 1996, **274** (5285): 259~261
- 10 Carr M D, Bauer C J, Gradwell M J, *et al.* Solution structure of a trefoil motif containing cell growth factor, porcine spasmolytic protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (7): 2206~2210
- 11 Polshakov V I, Tomas A F, Westley B, *et al.* NMR-based structural studies of the pNR2-2/pS2 single domain trefoil peptide: similarities to porcine spasmolytic peptide and evidence for a monomeric structure. *Eur J Biochem*, 1995, **233** (3): 847~855
- 12 Seib T, Blin N, Hilgert K, *et al.* The three human trefoil genes TFF1, TFF2, and TFF3 are located within a region of 55 kb on chromosome 22q22.3. *Genomics*, 1997, **40** (1): 200~202
- 13 Tomastto C, Wolf C, Rio M-C, *et al.* Breast cancer protein pS2 synthesis in mammary gland of transgenic mice and secretion into milk. *Mol Endocrinol*, 1989, **3** (10): 1579~1584
- 14 Plachard R J, Marchbank T, Goodlad R A, *et al.* Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (7): 2137~2142
- 15 Dignass A, Devaney K L, Kindon H, *et al.* Trefoil peptides promote epithelial migration through a transforming growth factor β -independent pathway. *J Clin Invest*, 1994, **94** (1): 376~383
- 16 Mashimo H, Wu D C, Podosky D K, *et al.* Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 1996, **274** (5285): 262~265
- 17 Tan X D, Liu Q P, Hsueh W, *et al.* Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelia cells and induces nitric oxide production:

- priming and enhancing effects of mucin. *Biochem J*, 1999, **338** (pt3): 745~ 751
- 18 Kindo H, Pothoulaakis C, Thim L, *et al.* Trefoil peptides protect intestinal epithelia monolayer/barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*, 1995, **109** (2): 516~ 523
- 19 Kanai M, Mullen C, Podolsky D K. Intestinal trefoil factor induces inactivation of extracellular signal regulated protein kinase in intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (1): 178~ 182
- 20 Taupin D, Wu D C, Jeon W K. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate early genes: EGF receptor and MAP kinase dependent interregulation. *J Clin Invest*, 1999, **103** (9): R31~ 38

Trefoil Factor Family. KOU Ru-Qin, WANG Wei, LI Ling-Yuan, RU Bing-Gen (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Science, Peking University, National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China*).

Abstract Trefoil factor family (TFF) peptides have a special domain called trefoil domain. Trefoil domain contains highly conserved cysteine, arginine, glycine,

tryptophane, phenylalanine and a unique three-loop structure which is formed by intrachain disulfide bonds between six conserved cysteine residues in the 1 ~ 5, 2 ~ 4, 3 ~ 6 position. Three most important TFF peptides are TFF1/pS2, TFF2/SP (spasmolytic polypeptide) and TFF3/ITF (intestinal trefoil factor). The ectopically expressed sites of them are body and fundus of stomach, deep foveolar pits of gastric antrum and goblet cell of small and large intestine, respectively. TFF may play an important role in both maintaining the barrier function of mucosal surfaces and facilitating healing after injury. The structures of TFF peptides are very compact and contain α -helix, β -sheet. The mechanism of TFF is not clear and two hypotheses were proposed which were co-working with mucin or receptor.

Key words trefoil factor family, expression sites, structure, function, mechanism

Ras-GTP-Raf 复合物及其信号传导的分子机制*

李兆育¹⁾ 邹伟 崔肇春

(大连医科大学生物化学教研室, 大连 116027)

摘要 Ras-GTP-Raf 复合物是 RTKs 介导的 Ras 通路的一个关键环节, 在 Ras-GTP-Raf 复合物中信号传递的分子机制是 Ras-GTP-Raf 复合物作为一个整体开关信号传导、启动信号放大级联反应及可能导致肿瘤发生。此外, PKC 介导的 Raf 的激活也必需有 Ras-GTP-Raf 复合物的存在。

关键词 信号传导, Ras-GTP-Raf 复合物, 肿瘤

学科分类号 Q73

在目前已知的所有细胞中具有一条高度保守的信号传导通路, 其中包括 RTKs、Ras、Raf、Mek、和 ERK, 也称之为 Ras 通路。它可使转录因子磷酸化而使之激活, 从而介导细胞的分化、增殖、存活及原癌基因的转化。

近年来由 Ras 和 Raf 介导的信号传导及它们之间的作用是研究的热点之一。但是以前的研究更多地注重蛋白质本身的独立作用, 把其单独看成是细胞生长和原癌基因转化的关键, 割裂了它们之间的关系, 甚至推断有的信号传导越过 Ras 而直接作用于 Raf^[1]。然而, 近几年的研究更侧重于以 Ras-GTP-Raf 复合物的形式把其放在信号通路中考

虑^[2,3]。Hallberg 等^[4]在研究 RTK 介导的信号传导通路时发现, 用抗 Ras 的单克隆抗体 Y13-238 免疫沉淀 Ras 的同时沉淀中还有 Raf, 而且 Raf 具有活性, 从而提出 Ras-Raf 复合物的概念。此前已证实 Ras 以 Ras-GTP 结合形式与 Raf 结合, 因此该复合物应该称之为 Ras-GTP-Raf 复合物。尤其最近的研究证实, 不仅在 RTKs 介导的通路中 Ras-GTP-Raf 复合物发挥重要作用, 而且 PKC 介导的

* 国家自然科学基金资助项目 (39670809)。

¹⁾ 大连大学医学院生物化学教研室, 大连 116622。

Tel: (0411) 7300666-2353, E-mail: zhylee1971@yahoo.com

收稿日期: 1999-07-19, 修回日期: 1999-12-02