

可用来研究病毒的增殖与基因的表达。用于这一研究目的还有氯霉素乙酰转移酶和 β -半乳糖苷酶也已在家蚕中得到表达^[5]。

此外, BmNPV-家蚕系统还能用于生物农药的研制。如前田等(1991年)人工合成了一个编码澳洲蝎毒液的 AalT 毒素基因和家蚕毒素分泌信号前部序列, 然后把它插入 BmNPV 载体 pBK273 中, 在多角体蛋白启动子的控制下, 在感染的家蚕 BmN 细胞系和幼虫体中得到表达。试验表明血淋巴中表达的 AalT 蛋白具有杀虫活力^[19]。所以, 家蚕-BmNPV 表达系统用于杀虫基因的筛选, 对害虫防治的优化将提供新的手段。

目前, 世界上已有数百家大学或研究单位都在尝试用家蚕-BmNPV 系统生产各种有用的蛋白。可以预计, 到本世纪末下世纪初, 许多对人类十分有用的蛋白将会用家蚕系统进行大规模的商业生产。

参 考 文 献

- 1 Rohrmann G F. J Gen Virol, 1992; **73**: 749
- 2 Gonnet P, Devauchelle G C R. Acad Sci Ser II, 1987: 111
- 3 Vlak J M, Klinkenberg F A, Zaal K J M *et al.* J Gen Virol, 1988; **69**: 765
- 4 Maeda S, Kawai T, Obinata M *et al.* Nature, 1985; **315**:

592

- 5 Maeda S. Ann Rev Entomol, 1989; **34**: 351
- 6 Horiuchi T, Marumoto Y, Saeki Y *et al.* Agric Biol Chem, 1987; **51** (6): 1573
- 7 Sekine H, Fuse A, Tada A *et al.* Gene, 1988; **65**: 187
- 8 Marumoto Y, Sato Y, Fujiwara H *et al.* J Gen Virol, 1987; **68**: 2599
- 9 Morishita K, Sakano K, Takeda K *et al.* J Biochem, 1991; **109**: 36
- 10 Tada A, Fuse A, Sekine H *et al.* Virus Res, 1988; **9**: 357
- 11 Miyajima A, Schreurs J, Otsu K *et al.* Gene, 1987; **58**: 273
- 12 Hideki K, Tamura T, Kato Y *et al.* Anim Sci Technol, 1992; **63** (4): 349
- 13 Kobayashi J, Imanishi S, Inoue H *et al.* Cytotechnology, 1992; **8** (2): 103
- 14 Marumoto Y, Teruuchi T, Enjoh T *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1992; **56** (1): 13
- 15 Toru S, Ueda Y, Sato M. J Vet Med Sci, 1992; **54** (3): 563
- 16 储瑞银, 宓怡德, 吕鸿声等. 生物化学与生物物理学报, 1990; **22** (4): 385
- 17 Miyagawa K, Sakamoto H, Yoshida T *et al.* Oncogene, 1988; **3**: 383
- 18 Kopylova-Sviridova T N, Gorelova T V, Krauzova V I *et al.* Dokl Akad Nauk SSSR, 1990; **312** (6): 1507
- 19 Maeda S, Volarth S, Hanzlik T *et al.* Virology, 1991; **184**: 777

V 型 H^+ -ATP 酶的分子结构及其药理学意义

蔡惠罗

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要 V 型 ATP 酶广泛存在于细胞内膜系统, 如溶酶体, 内膜体, 高尔基体, 分泌颗粒等。V-ATP 酶水解 ATP, 建立跨膜质子电化学梯度 ($\Delta\bar{\mu}H^+$), 酸化细胞内外环境。研究证明 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 和酸化作用为细胞的内吞、外泌、膜流和物质转运等生理生化反应提供了必需的条件。V-ATP 酶在生命活动中的重要性和它的实际意义, 日益引起人们的兴趣与关注, 是当前 H^+ -ATP 酶家族中一个异常活跃的研究分支。

关键词 V-ATP 酶, 跨膜质子电化学梯度, 膜泡结构

动物细胞除包含遗传物质的细胞核和具有遗传半自主性的线粒体之外,丰富的内膜系统构成了功能多样的膜泡结构,将胞内空间分割为既有关联又相对独立的功能区域.膜泡结构的种类和数量因器官或组织的特化而异,但是它们在行使各自的生理功能时均需消耗由线粒体或糖酵解反应产生的高能化合物 ATP.已知细胞内有三种类型 ATP 酶: P 型、F 型和 V 型 ATP 酶^[1]. 现有资料表明 V-ATP 酶广泛存在于细胞内膜系统,如溶酶体,内膜体,高尔基体,精子顶体内膜,分泌颗粒等^[2],近年来在特殊功能的细胞质膜也发现有该酶的存在,如具有泌酸功能的肾间质细胞^[3]和破骨细胞^[4]. V-ATP 酶的功能之一是水解 ATP,建立跨膜质子电化学梯度 ($\Delta\mu H^+$),驱动物质的主动转运^[5];之二,泵出质子,调节细胞内外的 pH^[6].

1 V-ATP 酶的分子结构

V-ATP 酶的分子结构与线粒体 ATP 相似,由突出于膜外的催化 ATP 水解的头部和埋藏于膜内的疏水性 H^+ 通道两部分组成^[7](图 1).

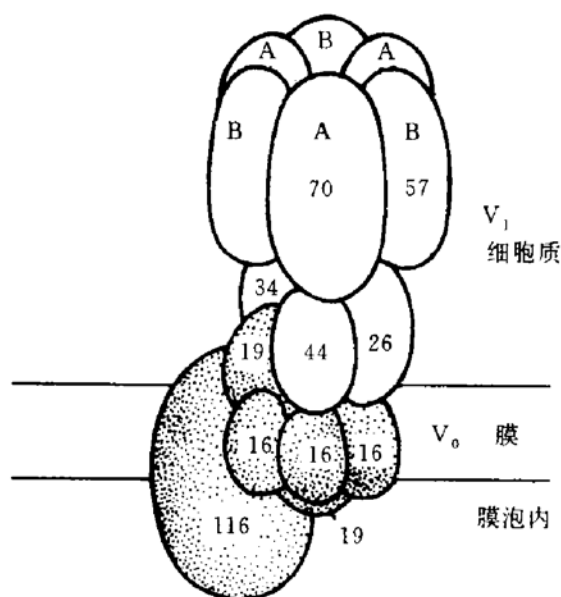


图 1 衣被膜泡 V-ATP 酶的结构模型

动物细胞 V-ATP 酶由 8—9 种分子量不

等的亚基组成: 3A, 3B, 1C, 1D, 1E, 6c, a (目前尚不清楚它的拷贝数) 及两个附属亚基 116kD, 39kD. 促溶剂 (chaotropic agents) 或低温处理可以使酶的头部与膜脱离, 构成头部的 A, B, C, D 和 E 亚基的分子量在 70 000 到 26 000 之间, 其中 A 亚基 (70kD) 是酶的催化反应中心, B 亚基 (57kD) 为调节亚基, C, D 和 E 亚基的功能目前尚不清楚. 最近在酵母 V-ATP 酶的研究结果表明, C 亚基是酶的催化部分与膜内疏水部分之间的联结亚基^[8]. V-ATP 酶的 A 亚基和 B 亚基对应于线粒体 ATP 酶的 β 亚基和 α 亚基, 它们之间有较高的结构同源性, 各自的催化亚基 (A, β) 的序列中均有结构相似的结合 ATP 的富甘氨酸片段^[9]. 膜内部分由 a, c, 116kD 和 36kD 亚基组成, a 和 c 亚基构成酶的质子通道, 是疏水性较强的脂蛋白, 溶于氯仿/甲醇混合液. V-ATP 酶的 c 亚基 (16kD) 与线粒体 ATP 酶的 c 亚基 (8kD) 的基因结构和序列分析资料表明, 亚基内有两段跨膜 α 螺旋结构的氨基酸序列是相同的^[10,11]. 已获得的分子生物学研究结果揭示两类酶的主要功能亚基可能来自共同的原始基因. V-ATP 酶水解活性可以被 Mg^{2+} 或 Ca^{2+} 激活, 但是重组实验表明去掉 116kD 和 39kD 亚基后的酶没有质子泵活性和 Mg^{2+} 激活的水解活力. 由此确认 116kD 亚基具有与 ATP 水解偶联的质子转移功能. 116kD 亚基是糖基化的膜蛋白. 该亚基由两部分组成: 亲水性氨基末端区域约 1/3 的氨基酸为带正电荷或负电荷的氨基酸, 疏水性羧基末端至少包含 6 个跨膜片段, 其中疏水性氨基酸的含量大于 50%, 表明 116kD 亚基的结构特性与质子转移功能的一致性. 39kD 亚基不含跨膜 α 螺旋结构, 与酶的膜内部分紧密结合, 与质子转移功能有关, 但它不是构成质子通道的亚基^[12]. V-ATP 酶是遗传保守性的酶, 酵母和牛嗜铬颗粒 V-ATP 酶亚基的序列分析结果显示, 它们之间的同源性高达 70%—80%; 哺乳动物牛和人之间的结构性差别则更小^[13].

2 V-ATP 酶与细胞的酸化

膜泡内的酸度变化与细胞的内吞, 外泌和膜流 (membrane traffic) 的运行有关. V-ATP 酶水解 ATP 泵入质子, 建立跨膜质子电化学梯度, 进而酸化膜泡内环境. 不同生理功能的膜泡结构其内环境的酸度是不同的. 已知溶酶体的酸度为 pH4.6—5.0^[6], 内膜体 (endosomes) 为 pH5—6^[14]. 酸度差别主要受控于: a. V-ATP 酶建立的 $\Delta\bar{\mu}H^+$, 即 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 的两个组分 $\Delta\psi$ 与 ΔpH 之比. 溶酶体膜依赖于 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 的氯离子通道的活性较高, 氯离子进入膜泡, 降低了质子泵带来的高膜电位, 从而加速质子运转, 使 ΔpH 达到 2.0 单位. 内膜体对钾离子的通透性较高, 进入的钾离子通过提高膜电位 $\Delta\psi$, 降低质子流速, 使 ΔpH 维持在 0.5 单位. 此外, 质子滑落 (slip) 机制^[15]对 $\Delta\psi$ 与 ΔpH 的比值也有一定的调节作用. b. 酶的异构化, 如 cDNA 的分析结果表明, 人脑和肾的 B 亚基的结构不完全相同; 某些细胞器膜内部分的 116kD 亚基交替性的结合^[16]. c. 酶的含量之差^[17].

笼蛋白衣被膜泡 (clathrin-coated vesicles) 是受体介导的内吞和细胞内蛋白质及酶的转移的一种中介结构^[1] (图 2).

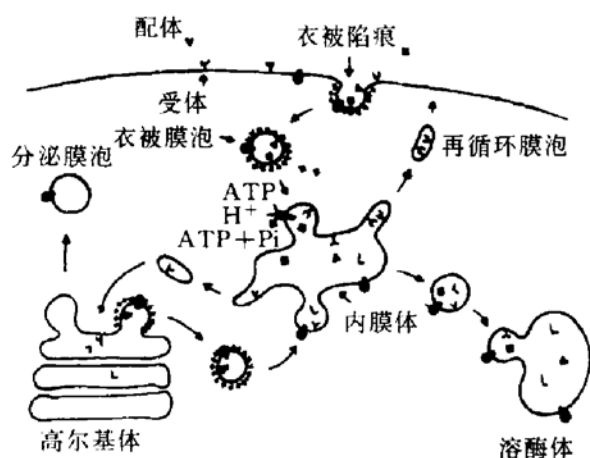


图 2 动物细胞膜泡酸化的功能示意图

■: 低密度脂蛋白 (LDL); ▼: 表皮生长因子 (EGF); +: 笼蛋白; ●: V-ATP 酶; Y: LDL 受体; Y: EGF 受体; L: 溶酶体酶; T: 甘露糖 6-磷酸受体.

笼蛋白 (细胞骨架蛋白的自组结构) 在质膜下方形成凹陷痕, 选择性地集中膜表面受体-配体复合体, 进而形成笼蛋白衣被膜泡, 进入胞浆, 衣被随之消失, 转变为无包被的内膜体. 配体-受体在内膜体发生解离, 受体回到质膜表面, 配体向胞内各自的靶位转移. 受体介导的物质转运是细胞进行物质交换的重要方式, 但也是某些病毒、毒素侵入细胞的一种途径. 形态学和分子生物化学研究证明, 内膜体是从衣被膜泡演化而来, 衣被膜泡受体携带的胞外配体或胞内新合成的蛋白和酶均在内膜体发生解离, 此时, 内膜体的 V-ATP 酶的质子泵功能为受体与配体的解离提供了适宜的酸性环境. 笼蛋白衣被膜泡及脱衣被的内膜体, 均有 V-ATP 酶, 为什么只有内膜体的 V-ATP 酶表现质子泵活性, 发挥酸化内环境的作用, 而衣被膜泡的 V-ATP 酶则处于不活化状态. 虽然这与衣被膜泡在内吞过程中的携带功能是协调的, 但是, 什么因素在控制着酶的功能和谐地表现呢? 这是一个不十分清楚的问题. 免疫细胞化学的结果表示, 衣被膜泡 V-ATP 酶并非没有质子泵功能, 但可能缺少一或一个以上的亚基, 如被视作调节质子转移功能的 116kD 亚基^[18].

神经递质吸收是生物能转换和利用的典型例子. 神经末梢含有丰富的突触小泡, 突触小泡依赖于 V-ATP 酶建立的 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 驱动递质运载体, 完成递质吸收过程. 不同递质对 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 两个组分的利用情况不同. 谷氨酸吸收依赖于 $\Delta\psi$, 儿茶胺类递质依赖于 ΔpH , GABA 和甘氨酸依赖于 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 的两个组分^[18]. 目前对 $\Delta\bar{\mu}H^+$ 偶联的递质吸收及递质释放, 再吸收的分子机制尚了解甚少. 脑组织 V-ATP 酶集中于突触小泡, 其活性高于其它组织 20 倍^[17]. 由此可见 V-ATP 酶在大脑信息贮存和传导中的重要性.

3 V-ATP 酶的药理学意义

V-ATP 酶的药理学意义是基于对酶的生理功能的了解. 表 1 列举了不同膜泡结构的

V-ATP 酶的生理功能.

表 1 V-ATP 酶的功能多样性

细胞或膜泡结构	功 能	可能引起的功能失调
高尔基体	检送蛋白质进入细胞器膜	蛋白质或酶的排出
胰岛 β 细胞分泌颗粒	胰岛素原的转化	糖代谢
突触小泡	神经递质的吸收	精神失调
嗜铬颗粒	儿茶胺的吸收	心脏功能
血小板颗粒	5-羟色胺的吸收	血凝
溶酶体	调节腔内 pH	内含物降解障碍
内膜体	受体再循环	受体介导的物质吸收
顶体	酸化卵子透明区带	受精
肾间质细胞	泌酸	尿的 pH
破骨细胞	骨质吸收	骨组织发育, 骨质再吸收

V-ATP 酶是遗传保守性的酶, 基因编码上的缺陷会产生无活性的酶. 有迹象表明, 位于溶酶体的 V-ATP 酶可能与溶酶体的遗传病有关. 目前认为, 溶酶体内物质降解障碍不仅仅起因于水解酶的缺陷. 在精细胞, 尚未发现有顶体缺陷型的 V-ATP 酶及与此有关的不孕症. 但是, V-ATP 酶在卵子受精时的重要性却是不容忽视的^[19]. V-ATP 酶在受精和胚胎形成期非常活跃. 顶体反应时, 精子顶体向在卵细胞结合位点的透明区带释放蛋白水解酶样的头粒蛋白 (acrosin), 并由位于顶体内膜的 V-ATP 酶泵出质子, 为蛋白水解反应提供适宜的酸性环境. 这种局部酸化效应也是保证单精子受精的重要生理条件^[20]. 根据 V-ATP 酶在顶体反应中的作用, 药物学家试图从中和酸性 pH 或抑制酶活性的角度设计阻断受精过程的药物.

骨组织中的破骨细胞具有消化骨基质, 营

养骨细胞的功能. 破骨细胞由溶酶体向骨基质释放蛋白水解酶, 质膜褶边区 V-ATP 酶泵出质子, 为蛋白水解反应和无机盐的分解提供必要的酸性环境^[21]. 但是在某些情况下, 过度的酸化会造成骨质分解, 引起骨质疏松. 通过药物控制破骨细胞的酸化速度是缓解骨质疏松的治疗手段.

作者在神经阻断剂和局部麻醉剂作用机理的研究报导, 氟哌丁 (haloperidol), 氯丙嗪 (chlorpromazine) 和普鲁卡因 (procaine) 等药物依赖于 V-ATP 酶建立的跨膜质子电化学梯度进入突触小泡, 泡内浓度高达给药浓度的 100 倍. 药物对酶的 ATP 水解活力没有影响, 但因消除跨膜质子电化学梯度而抑制了递质向突触小泡的主动转运. 因此, 当作用电位触发递质释放时, 神经阻断剂取代递质进入突触间隙, 阻断神经信息的传导. 目前临床使用的神经阻断剂和局部麻醉剂均为弱碱性亲脂类化合物, 凭借 V-ATP 酶的活力, 这类药物可以象儿茶胺类递质一样进入突触循环^[22].

V-ATP 酶是当前 H^+ -ATP 酶家族中的一个十分活跃的研究分支, 它在生命活动中的重要性和它的实际意义日益引起人们的兴趣与关注. 预计在 V-ATP 酶与信息贮存传导方面的深入研究将会对高级神经活动的分子机理做出重要贡献.

参 考 文 献

- 1 Forgac M. *Physiol Rev*, 1989; **69** (3): 765
- 2 Al-Awqati Q. *Annu Rev Cell Biol*, 1986; **2**: 179
- 3 Hirsch S, Strauss A, Masood K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; **85**: 3004
- 4 Baron R, Neff L, Louvord O *et al.* *J Cell Biol*, 1985; **101**: 2210
- 5 Schuldiner S, Fishkes H, Kanner B I *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978; **75**: 3713
- 6 Mellman I, Fuchs R, Helenius A *et al.* *Annu Rev Biochem*, 1986; **55**: 663
- 7 Nelson N. *Biochem Biophys Acta*, 1992; **1100**: 109
- 8 Beltran C, Kopecky J, Pan Yuching E *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 774
- 9 Takeyama M, Ihara K, Moriyama Y *et al.* *J Biol Chem*,

- 1990; **265**: 21279
- 10 Mandel M, Moriyama Y, Hulmes J D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 5521
- 11 Nelson H, Nelson N. FEBS Lett, 1989; **247**: 147
- 12 Perin M S, Fried V A, Stone D K *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 3877
- 13 Nelson N. Current opinion in cell Biology. USA: Current Biology Led ISSN Philadelphia, 1992; **4**: 654
- 14 Johns C A, Hilden S A, Madias E *et al.* Am J Physiol, 1988; **255**: F885
- 15 Groen B, Berden J A, Vandam K *et al.* Biochem Biophys Acta, 1990; **1019**: 121
- 16 Berbnascobu P, Rausch T, Strune I *et al.* J Biol Chem, 1990; **265**: 17428
- 17 Stone D K, Crider B P, Sudhof T C *et al.* J Bioenerg Biomember, 1989; **21**: 605
- 18 Forgac M. J Bioenerg Biomember, 1992; **24** (4): 341
- 19 Wassarman P M. Science, 1987; **235**: 553
- 20 Nelson N. Trends in Pharmacol Sci, 1991; **12** (2): 71
- 21 Blair H C, Teiteibaum S L, Ghishell R *et al.* Science, 1989; **245**: 855
- 22 Moriyama Y, Tsai H L, Futai M. Arch Biochem Biophys, 1993; **305** (2): 278

干扰素刺激基因 (ISGs) 的研究进展

李 洲 范启修

(中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要 干扰素刺激基因 (ISGs) 是干扰素作用机制研究的核心内容. 干扰素与受体结合后, 通过细胞内信号转换, 激活胞浆转录调控因子与 ISGs 调控序列上的 cis 元件结合而诱导基因表达.

关键词 干扰素 (IFN), 干扰素诱导应答元件 (ISRE), 干扰素刺激基因 (ISGs), 抗细胞增殖

干扰素 (IFN) 通过诱导细胞表达多种蛋白质而发挥多种生物学功能, 表达这些功能蛋白质的基因称作干扰素刺激基因 (IFN stimulated genes, ISGs). α/β -IFN 与 γ -IFN 与各自的受体结合, 通过不同信号转换途径, 激活自己的一套 ISGs 表达, IFN 作用信号在细胞内的转换和 ISGs 的表达调控及其产物的生物功能是 IFN 机制研究的核心内容. 本文拟将 α/β -IFN 刺激基因的激活与功能的研究进展作一综述.

1 ISGs 的 cis 作用元件

α -IFN 能诱导至少 20 种基因的表达, 分析这些基因的 5' 上游序列, 发现有两种 cis 元件与 ISGs 的激活有关.

1.1 Firedman/Stark (F/S) 同感序列^[1] 这是一长 28bp 的寡核苷酸片段, 中间有一几乎不变的 12bp 核心 (AGTTTCTC/tTCTC), 是通

过分析 MT II a (metallothionein II a) 基因, 两组 I 类 HLA 和一组 II 类 HLA 基因的上游序列发现的, 该 F/S 序列还存在于补体 B 基因, β -2 微球蛋白和小鼠 H-2 复合物基因的启动子内.

1.2 干扰素诱导应答元件 (ISRE)^[2] 这是通过功能检测方法从 ISGs 调控序列中找到的对 ISGs 表达具特异增强作用的寡核苷酸片段, 比 F/S 序列短, 有两个必需小段: 一是 GGAAA, 存在于 SV40 增强子核心区, 人免疫缺陷病毒长末端重复顺序 (HIV LTR), CMV 增强子, β -IFN 基因, PRD III 和 PRD II / NRD I 调控区和 α -IFN 的 VRE 序列中, 另一是 TGAAACT, 位于第一小段下游, 在 ISG₅₂ 和 ISG₆₋₁₄ 基因内均存在. 这两个小段共同构成

system

The Fine Myofilament of Myofibril of Striated Muscle: Connectin. Chen Ming. (*Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 403—406

In the myofibril of striated muscle, there are three myofilaments: thick, thin, and fine myofilaments. Titin (connectin) is a giant elastic contractile protein, with molecular weight of 3000 kD and length of 0.9 μm , and forms fine myofilament extended from M-line to Z-line in the myofibril. It may play roles in maintaining thick myofilament in the middle of sarcomere, acting as molecular template for assembly of thick myofilament, and modulating the myosin activity.

Key words connectin (titin), fine myofilament, myofibril, striated muscle

Production of the Useful Protein in the Silkworm Using the *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a Expression Vector. Zhang Yuqing. (*Suzhou Sericulture College, Suzhou 215151*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 406—410

More and more foreign genes have been expressed in the silkworm larvae or silkworm cell lines using the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) as a expression vector. The expressed products involve in many fields such as pharmaceuticals, medical diagnosis, vaccine production and biological control. The characteristics of BmNPV and its genome structure, characteristics of polyhedrin gene, construction of recombinant BmNPV and its expression in the silkworm larvae and cell line, and efficiency of production for the foreign gene products expressed in the silkworm-Bm-

NPV system and application of the expressed product were described systematically in the review.

Key words silkworm, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, polyhedrin gene, gene expression, recombinant virus, expression vector

Structure and Pharmacology of V-ATPase. Cai Huiluo. (*Institute of zoology, Academia Sinica, Beijing 100080*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 410—414

V-ATPases are present in large numbers of organelles including lysosomes, endosomes, golgi complex and several secretory granules in animal cell. The function of V-ATPase is to generate protonmotive force and to cause limited acidification of the internal space of vacuolar system and extracellular compartments at the expense of ATP. The acidification and the electrochemical H^+ gradient formed by V-ATPase serve an important function in endocytosis, exocytosis, membrane traffic and transport systems of cells. In the families of H^+ -ATPases, increasing attention is being given to V-ATPase, about which much has been learned in recent years.

Key words V-ATPase, electrochemical proton gradient $\Delta\mu\text{H}^+$, vacuolar system

Progress of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) Research. Li Zhou, Fan Qixiu. (*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (5): 414—417

Interferon-stimulated genes (ISGs) is the central part of the research on interferon (IFN) function mechanism. After IFN binds to its receptor, through signal transducing in cyto-