

- 4 Hockenbery D, Nunez G, Milliman C *et al.* Nature, 1990; **348** (22): 334
- 5 Jacobson M D, Burne J F, King M P *et al.* Nature, 1993; **361** (28): 365
- 6 Vaux D L, Cory S, Adams J M. Nature, 1988; **335** (29): 440
- 7 Williams G T, Smith C A, Spooncer E *et al.* Nature, 1990; **343**: 76
- 8 Zhong L-T, Sarafian T, Kane D J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 4533
- 9 Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. J Immunol, 1993; **151** (2): 621
- 10 Nunez G, London L, Hockenbery D *et al.* J Immunol, 1990; **144** (9): 3602
- 11 Cuende E, Ales-Martinez J E, Ding L-Y *et al.* EMBO, 1993; **12** (4): 1555
- 12 Sentman C L, Shutter J R, Hockenbery D *et al.* Cell, 1991; **67**: 879
- 13 Allsopp T E, Wyatt S, Paterson H F *et al.* Cell, 1993; **73**: 295
- 14 Boise L H, Gonzalez-Garcia M, Postema C E *et al.* Cell, 1993; **74**: 597
- 15 Korsmeyer S J. Immunol Today, 1992; **13** (8): 285

hGM-CSF 基因及其调控研究进展

申葆荷 郭冬林 孙乃恩

(南京大学医药生物技术重点实验室, 南京 210008)

摘要 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 基因表达受到转录调控与转录后调控。5' 非转译区的一些顺式调控成分, 如 CATT (A/T) 重复序列, 富含 GC 序列, CK-1、CK-2、 κ B 特异序列与可诱导的 CsA 敏感增强子成分等在转录水平上调控 hGM-CSF 的表达。3' 非翻译区有一 62bp 富含 AU 序列, 它与 mRNA 的稳定性相关, 在翻译水平调控 hGM-CSF 的表达。细胞因子与一些刺激因子通过不同的机制作用于 hGM-CSF 基因, 从而影响 hGM-CSF 的产生与分泌。

关键词 人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子基因, 转录调控, 转录后调控

集落刺激因子 (CSF) 是一类由多种细胞分泌并影响多种细胞的生长、分化、生理功能的糖蛋白, 包括 G-CSF、GM-CSF、M-CSF 和 multi-CSF (IL-3)。在半固体琼脂中, 它们分别刺激骨髓细胞生成不同的集落。1973 年 Sheridan 与 Metcalf 在小鼠肺组织的条件化培养液中发现了粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)。人 GM-CSF (hGM-CSF) 可以刺激骨髓细胞生成粒细胞和巨噬细胞。关于 hGM-CSF 基因调控的研究, 有助于我们深入理解 hGM-CSF 在造血系统和免疫系统中的作用。

hGM-CSF 基因位于第 5 号染色体长臂 5q21—5q32。基因长 2.5kb, 有 3 个内含子, 4 个外显子^[1]。5' 非转译区含有一系列能调节转录的顺式成分, mRNA 的 3' 非翻译区有一段

62bp 的富含 AU 序列^[2]。

1 hGM-CSF 转录调控的顺式作用成分

hGM-CSF 基因编码区为 483bp, 包含起始密码子 ATG, 终止密码 TGA。5' 非编码区有帽子位点, TATA 盒, CATT (A/T) 重复序列, 富含 GC 区段, NF- κ B 结合序列, 细胞因子特异序列 CK-1, CK-2, 以及在 hGM-CSF 基因上游 3kb 左右环胞霉素 A 敏感的转录增强子序列, 这些基因上游的调控成分对 hGM-CSF 基因的转录起调控作用。

1.1 帽子位点

帽子位点是真核生物转录起始位点, 也是翻译起始复合物组装位点, 一致序列是 5' YY-

CAYYYYYY3', hGM-CSF 基因为 5' CC-CAGTACA3' [3], 下划线的A为转录起始点.

1.2 TATA 盒

TATA 盒大约位于-25 区, 5' GTG-TATTTAAG 3' 与一致序列 5' G(G/T)GTA-TA(A/T)A(T/A)(A/G)3' 相近 [3].

1.3 CATT (A/T) 重复序列

hGM-CSF 上游-62 至-37 区段有 3 个这样的序列即 CATT-1、CATT-2、CATT-3; 在-175 位附近还有 CATT-4. 这 4 个序列均为同向重复序列. 突变结果证明 CATT-1 和 CATT-2 是丝裂原刺激 T 细胞表达 GM-CSF 所必需的 [4]. 它们可能作为转录因子的主要识别序列 [5]. 另外与丝裂原相同, T 细胞中 Tax (人淋巴细胞瘤病毒-1 反式激活因子) 通过 CATT-1、CATT-2 反式激活 GM-CSF 转录 [6]. TPA 激活转录亦需要 CATT 序列的存在. 在 IL-1、TNF- α 、LPS 等刺激下, CATT-3 和它与 CATT-2 之间的 14bp 序列参与内皮细胞, 淋巴细胞 hGM-CSF 基因的转录调控 [7].

1.4 CAAT 盒

在帽子位点上游-86bp 处有一个 9bp 序列 5' GGTAGTTCC 3' 与 CAAT 盒一致序列 5' GG(T/C/X)CAATCT 3' 接近 [3].

1.5 富含 GC 序列, 5' CCGCCC3' 或 5' CAC-CC3'

有些真核生物基因的有效转录需要这一序列. 在 hGM-CSF 的-72bp 处, mIL-3 的 TATA 盒上游, IL-2 转录起始位点上游均存在富含 GC 序列, hIFN- γ 基因没有此序列 [1].

1.6 细胞因子特异性序列 CK-1 (CLE-1), CK-2 (CLE-2)

hGM-CSF 上游-96bp 处的 5' GAGA-TTCCAG 3' 为 CK-1; -85 处 5' TCAGGTA 3' 为 CK-2. 在表达 hGM-CSF 的细胞中, CK-1 和 CK-2 分别与核蛋白 NF-GMa 和 NF-GMb 结合, CK-1 和 CK-2 对这二种核蛋白的结合互不依赖 [8,9].

1.6.1 CK-1 CK-1 的一致序列为 5' GRGNTTNCRN3', 在其他造血因子上也有,

如 IL-2、IL-3、G-CSF、IL-4、IL-5、IL-6 [19,20]. G-CSF 基因的 CK-1 可结合 NF-GMa (TNF α 或 IL-1 β 刺激的结果) 或 Tax, 只在成纤维细胞中而非 T 细胞中, CK-1 作为转录增强子; 对于 GM-CSF 基因, CK-1 虽然结合相同的蛋白 NF-GMa, 但是不与任何刺激因子发生反应. 由于 G-CSF 和 GM-CSF 的 CK-1 序列差异, 导致核酸-蛋白相互作用的改变, 表现为 CK-1 在不同基因的不同反应 [10]. K. Kaushansky [7] 用正常内皮细胞的试验表明, 在产生 GM-CSF 的细胞中, CK-1 虽然结合核蛋白, 但对转录无调控作用, 在不产生 hGM-CSF 的细胞中缺失 CK-1, 不影响启动子功能. 有关 CK-1 的作用下面还将提到.

1.6.2 CK-2 CK-2 在 CK-1 下游, NF-GMb 只在产生 GM-CSF 的细胞中存在, 不产生 GM-CSF 的细胞中 CK-2 与其它的核蛋白结合, CK-2 在 GM-CSF 和 IL-3 中保守, NF-GMb 不结合 G-CSF、IL-3 或 IL-5 的基因序列, NF-GMb 并非本底表达所需, PMA 能诱导 NF-GMb, 并伴有 GM-CSF 表达 [8,9]. Tax 蛋白反式激活 GM-CSF 表达, 在非静止 T 细胞, 反应成分是 CK-1 和靠近 CK-2 的富含 GC 区 [11].

1.7 κ B 特异序列

NF- κ B 结合的一致序列 5' GGGRC/A/TTYGCC 3' 存在于 IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、GM-CSF、INF- γ 基因的启动子区段, 与丝裂原激活的转录调控有关 [12]. GM-CSF 的 κ B 序列位于非编码链, 靠近并与 CK-2 部分重叠 (-75—-84) 5' GGGAAGTACC3'. -91—-101 5' GGAGATTCCAC3' 是 κ B 样序列, 以低亲和力被识别, 而此序列刚好是 CK-1 [13]. 在激活的 T 细胞中, NF- κ B 可以通过 κ B 序列反式激活 GM-CSF 的转录. 纯化的 NF- κ B 为异二聚体 p50/p65 [12].

1.8 在 hGM-CSF 基因上游-193—-179 的一段序列对转录有负调控作用 [14]

1.9 可诱导的环孢霉素 A (CsA) 敏感的增强子 [15]

hGM-CSF 和 IL-3 在染色体上邻近, 在 T

细胞中以 CsA 敏感的方式被诱导表达. 仅用基因启动子是无法解释这种调控方式的. 在 IL-3 基因下游、GM-CSF 基因上游 3kb 处有一可诱导的 DNase I 超敏位点 (DH site), 作为很强的 CsA 敏感的转录增强子.

在 716bp Bgl I 限制片段上, 有 4 个转录因子 AP-1 结合位点, 其中 GM-170 与 GM-330 的 AP-1 结合序列与 AP-1 结合的一致序列 5' TGAGTCA 3' 完全吻合. GM-550 中 AP-1 成分被包含在一段与 IL-2 启动子远端 NFAT (被激活 T 细胞的核结合蛋白) 结合位点同源的序列内, 因此 NFAT 也参与 GM-CSF 基因的 CsA 敏感的激活过程. PMA 或 Ca^{2+} 离子载体诱导下, 4 个 AP-1 位点均结合重组的 c-Jun 蛋白 (AP-1 的一个组分), 与 AP-1 的结合力顺序是 GM170=GM330>GM550>GM400. NF-AT 可结合 GM170、GM330、GM550, 至少 GM550 作为强力可诱导的 CsA 抑制的增强子成分.

NFAT 的诱导以两个不同成分的组成为前提, 细胞原有的 NFATc 以可被 CsA 抑制的方式迁移至细胞核^[6], 在那里与新合成的非 CsA 抑制的 NFATn 结合, NFATn 是一种 AP-1 样因子, 包括 Fos 和 Jun, NFAT 可能与富含嘌呤的序列结合, 在这个序列中 est-样 5' GGA3' 核心序列可能是关键. 与 IL-2 的 NFAT 位点不同, GM170、GM330 与 GM550 的 NFAT 位点都能够不依赖 NFAT 而结合 AP-1, 因此这些位置可能代表另一种 NFAT 位, 它们在缺少 NFATc 的非 T 细胞中保持了一些增强子功能. 这个增强子在缺少 NFAT 但表达 GM-CSF 的细胞内起转录激活作用, 是个令人感兴趣的问题^[15,16]. AP-1 最初发现于 Hela 细胞, 能够特异识别 SV40 增强子成分与人金属硫蛋白的增强子. 能被佛波脂激活的细胞基因与病毒基因的转录调控区也有 AP-1 结合序列, 因此可能有许多蛋白能结合于 AP-1 成分^[17].

在细胞接受了一定的刺激因子作用后, 通过信号传递, GM-CSF 上游的这些顺式调控成

分被同时或各自激活, 由于不同组合而表现出不同的转录调控模式, 宏观上就是细胞因子间复杂的相互关系, GM-CSF 表达的组织特异性, 刺激因子的特异性. 在激活的 T 细胞中有两种蛋白, 一种与 p50/p65 的 NF- κ B 无区别, 另一种仅结合 κ B 序列的 3' 端, 并且能够结合 hGM-CSF 基因的 CK-1、mIL-2 的 NF-AT 结合位. 两种因子都具有 NFAT 特性, 即部分依赖新蛋白的合成和环孢霉素敏感. 比较 CK-1 与 κ B 的序列, 仅两个碱基不同, CK-1 因此可以与 NF- κ B 结合. κ B 特异序列、CK-1、NFAT 结合序列都具有四核苷酸序列 5' TTCC 3' (它的互补链 5' GGAA 3' 与上面提到的 est-样序列一致), 参与相关的反式因子的结合, 可以协同诱导 T 细胞激活基因的转录. 由 κ B 和 CK-1 序列都能结合一个 NFAT 样反式因子, 因而其调控潜在地对 CsA 敏感^[12].

2 富含 AU 序列影响 mRNA 的稳定性

1991 年, Bohjanen 等人^[13]发现 32kD 蛋白 (AU-B) 特异结合 5' AUUUA 3' 多拷贝重复序列, 且 AU-B 在静止细胞中不结合, 只有 TCR/CD3 复合物被激活的情况下 (如 TPA 激活) 才能结合而延长 mRNA 的半衰期. TPA 处理的 T 细胞 GM-CSF 的 mRNA 半衰期大于 3h, 而静止细胞中只有 45min. TPA 处理的 T 细胞 GM-CSF 的表达对 CsA 不敏感, 表明是转录后调控^[2]. G. Paul 发现 AU-B 因子高亲和特异结合 5' AUUUA 3' 重复序列需要 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} , 其它二价金属离子阻断 Mg^{2+} 依赖的 AU-B 因子结合活性, AU-B 因子在此是对 mRNA 起保护作用^[19]. 但是 1993 年 Bickel 等^[20]发现细胞内有分子量是 33000、39500、42000 三种蛋白结合 AU-序列, 其中分子量为 39500、42000 只有小鼠细胞内有, 分子量为 33000 是人与小鼠共有的, 佛波脂处理不影响蛋白的结合力与数量, 他们认为这些蛋白组成型表达, 可能在无刺激因子的情况下指导 mRNA 的降解. AU-B 因子到底是指导 mRNA 降解, 还是保护 mRNA 免受核酸酶的攻击, 将有待进

一步的研究. 富含 AU 序列作为转录后调控的底物是肯定的, PKC 激活剂 (cyclohexin-mide, NaF) 甚至于 IL-1 β 、IL-7 都能通过富含 AU 序列来稳定 mRNA, 但 TNF α 诱导的 GM-CSF mRNA 的稳定性, 不依赖于富含 AU 序列.

综上所述, GM-CSF 基因 5' 非转录区包含对转录作用正调控与负调控的成分, 以及可诱导的能结合核蛋白的区域, 而这些核蛋白的表达是细胞特异或刺激因子特异的^[14]. 位于基因下游非翻译区的 mRNA 3' 端有一富含 AU 的序列, 可能不利于 mRNA 的稳定性, 从而在转录后水平上对 GM-CSF 的表达进行负调控^[7].

参 考 文 献

- Miyatake S, Otsuka T, Yokota T *et al.* EMBO J, 1985; **4**: 2561
- Nickel M, Cohen R B, Pluznik O H. J Immunol, 1990; **145**: 840
- Kaushansky K, O' Hara P J, Berkner K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; **83**: 3101
- Nimer S, Franzer J, Richards J *et al.* Mol Cell Biol, 1990; **10**: 6084
- Nimer S, Morita E A, Martis M J *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8**: 1979
- Nimer S. New Biol, 1991; **3**: 997
- Kaushansky K. J Immunol, 1989; **143**: 2525
- Shannon M F, Gamble J R, Vadas M A. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; **85**: 674
- Shannon M F, Occhiodoro F S, Ryan G R *et al.* Colloq INSERM, 1989; **179**: 73
- Kuczek E S, Shannon M F, Pell L M *et al.* J Immunol, 1991; **146**: 2426
- Miyatake S, Seiki M, Yashida M *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8**: 5581
- McClaffrey P G, Jain J, Jamieson C *et al.* J Biol Chem, 1992; **267**: 1864
- Schreck R, Baeurle P A. Mol Cell Biol, 1990; **10**: 1281
- Kelso A, Metcalf D. Advances in Immunology, 1990; **48**: 69
- Cockerill P N, Shannon M F, Bert A G *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 2466
- Angel P, Imagawa M, Chiu R *et al.* Cell, 1987; **49**: 729
- Curran T, Franza B R J. Cell, 1988; **55**: 395
- Bohjanen P R, Petryniak B, June C H *et al.* Mol Cell Biol, 1991; **11**: 3288
- Multer J C, McCrory W A, Wilson M *et al.* Enzyme, 1991; **44**: 203
- Bickel M, Iwai Y, Pluznik D H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89**: 10001

超声在生物技术中应用的研究进展

冯 若 赵逸云* 李化茂** 王 进

(南京大学声学研究所, 南京 210093)

摘要 超声波应用于生物技术是一个比较新的研究领域. 许多研究发现, 在有酶或细胞参与的情况下, 一些过程可在超声作用下被激活. 一般来说, 较低强度的超声波可以通过改进反应物的质量传输机制, 提高酶及固定酶的催化活性或加速细胞的新陈代谢过程. 文中举例讨论了近年来超声在生物技术中应用的研究进展及前景.

关键词 超声, 空化, 生物技术

作为一种机械能量形式, 超声技术已广泛用于工业、化学与化工、医疗等领域^[1]. 生物技术是当前最为引人注目的前沿学科之一, 它的广阔发展与应用必将会极大地影响与改变人类的社会生活. 因此, 探索各种科学技术向生物

技术领域渗透的可能性, 正引起广大科技工作

* 云南大学化学系, 昆明 650091.

** 吉安师专物理系, 吉安 343005.

收稿日期: 1993-10-22, 修回日期: 1994-01-14

The Regulation of Immunoglobulin Gene Transcription. Zhang Wenfa. (*Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 482—486

Immunoglobulin (Ig) gene expression is a B-cell-specific and developmental-stage-specific event. Several factors are involved in Ig gene transcription, including Oct 2, NF- κ B and helix-loop-helix (HLH) proteins. The regulation of Ig gene transcription by these three kinds of protein factors are focused.

Key words immunoglobulin gene, Oct 2, NF- κ B, HLH proteins

Research Advances on Zinc Participating in Genetic Regulation. Wang Yingjie, Xu Abing. (*Department of Biological Science and Biotechnology, Hangzhou University, Hangzhou 310012*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 486—491

The effects of zinc on genetic regulation are extensive and conspicuous. It was shown that zinc participates in genetic regulation mainly through affecting the regulation of gene expression, the structure and function of chromatin, the conformation of DNA and the biosynthesis of nucleic acid. The mechanisms of zinc acting in these processes were discussed as well.

Key words zinc, chromatin, nucleic acid, gene expression

Protein Splicing and a New Kind of Mobile Genetic Element. Lu Baisong, Huang Peitang. (*Molecular Genetic Center Academic of Military Medicine Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 491—494

Several cases of protein splicing have been found recently which is different from so called RNA splicing. The peptides which are excluded from premature proteins are called "protein intron". Some of the protein introns have endonuclease activity and the DNA fragments coding for protein introns have defined a new kind of mobile genetic element. The discovery, mechanism and evolution of protein introns are focused.

Key words protein splicing, protein intron, mobile genetic element

Programmed Cell Death and bcl-2 Gene. Yu Yongtao, He Fuchu. (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*. 1994; **21** (6): 495—497

Programmed cell death (PCD), unlike the other form of cell death (necrosis), is an active process of cellular suicide. It plays an important role in embryogenesis, tumorigenesis and clonal selection in the immune system. bcl-2, a potential physiological regulator of PCD, can not block all kinds of programmed cell death mediated by various stimuli. bcl-X, a recently found gene which encodes two different proteins, takes an important part in both positive and negative regulation of PCD. bcl-2 is regarded as a member of the third category oncogenes because its blocking of PCD results in tumorigenesis.

Key words programmed cell death (PCD), bcl-2 gene, bcl-X gene, oncogene

Advance in Current Research of Human GM-CSF Gene and the Regulation of Its Expression. Shen Baohe, Guo Donglin, Sun Naien. (*Department of Biochemistry, National Labo-*

ratory of Pharmaceutic Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210008). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 497—500

The expression of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene is finely regulated at the levels of both transcription and post-transcription. The transcriptional regulation involves some *cis*-active elements, such as the CATT (A/T) repeat sequence, GC-rich sequence, CK-1, CK-2, κ B specific sequence and inducible CsA-sensitive enhancer, which are all located in the 5'-untranscriptional region of the hGM-CSF gene. At the post-transcriptional level, a 62bp AU-rich sequence located at 3'-untranslation region of the mRNA is related to the stability of hGM-CSF mRNA. These mechanisms can up or down regulate the production of hGM-CSF when the cells receive the signals from the stimuli of cytokines and other stimulating factors.

Key words hGM-CSF gene, transcriptional regulation, post-transcriptional regulation

The Advance of Application of Ultrasound to Biotechnology. Feng Ruo, Zhao Yiyun, Li Huamao, Wang Jin. (*Institute of Acoustics Nanjing University, Nanjing 210093*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 500—503

The application of ultrasound to biotechnology is one of the new interesting research fields. A number of studies has shown that some biochemical processes can be activated by ultrasound in the presence of enzymes and cells. Generally, lower intensity ultrasound can increase the activity of enzymes and immobilised enzymes or improve the metabolism of cells by the improvement of mechanism of mass-transfer of substrates. The advance and future of

applications of ultrasound to biotechnology is discussed by some examples given.

Key words ultrasound, cavitation, biotechnology

The Advances in Red Blood Cell Glycophorins Research. Mao Jianping, Sun Zhixian. (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 504—508

Glycophorin (GP or sialoglycophorin)-A, B, C and D constitute a group of red blood cell (RBC) transmembrane proteins. GPA carried the M- and N-blood group antigens. GPB represents the Ss. and U antigens. GPC and GPD exhibit the Gerbich receptors. Some homologous peptide sequences exist in four of the GPs, but extensive similarities are within GPA and GPB family, GPC and GPD family as well. Because of its abundant sialic acid content, GPA plays a critical role in preventing and minimizing interactions of RBC to RBC, and of RBC to other cells in circulation. Binding of a ligand specific for GPA induces profound changes in membrane material behavior. GPC has a important role in regulating RBC shape, membrane deformability and membrane mechanical stability. The functions of GPA and GPC are associated with band 3 and 4.1 proteins respectively.

Key words erythrocyte, glycophorin, transmembrane protein

Secondary Structure Formation: Framework Model of Protein Folding Initiation. Hu Hongyu, Du Yucang, Lu Zixian. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 508—513

Framework model emphasizes that secondary