

的电子吸收谱带不对称增宽,使藻类的光合作用天线系统在蓝、绿光区的更宽频域内吸收光子能量、更充分利用太阳光;同时,电子跃迁谱带增宽亦增大了发色团之间的光谱重叠积分,有利于发色团间的能量传递。但同时,由于藻胆素的开链四吡咯骨架较为柔顺,其构象涨落使无辐射弛豫跃迁几率增大。这可能是藻胆素的荧光量子产率比叶绿素略小的主要原因之一。

注意到高等植物中的天线色素叶绿素和胡萝卜素为闭链四吡咯体系。与藻胆素的开链四吡咯体系比较,叶绿素和胡萝卜素的分子骨架更加刚性。捕光天线系统中四吡咯体系的化学结构的演化,抑或是自然界中植物进化的一个象征。

在应用方面而言,由于发色团构象比较敏感地受蛋白质环境的影响,若能利用光谱学方法测量发色团构象的变化,则可由此判别不同的蛋白质环境,并有可能应用于蛋白质的标识。

### 参 考 文 献

- 1 van Grondelle R, Dekker J P, Gillbro T *et al.* Biochim Biophys Acta, 1994; **1187**: 1
- 2 Holzwarth A R. Physiol Plant, 1991; **83**: 518
- 3 Glazer A N. Biochim Biophys Acta, 1984; **768**: 29
- 4 Glazer A N. Biochim Biophys Acta, 1982; **36**: 173
- 5 Kratky C, Jorde C, Falk H *et al.* Tetrahedron, 1983; **39** (11): 1859
- 6 Baumann E, Schneider S, Gege P *et al.* Ber Bunsenges Phys Chem, 1989; **93**: 312
- 7 Zheng X G, Zhao F L, Wang H Z *et al.* Proc SPIE-Int Soc Opt Eng, 1994; **2137**: 570

- 8 Schirmer T, Bode W, Huber R. J Mol Biol, 1987; **196**: 677
- 9 Falk H, Müller N. Tetrahedron, 1983; **39** (11): 1875
- 10 Csatorday K, MacColl R, Csizmadia *et al.* Biochemistry, 1984; **23**: 6466
- 11 林启山, 张建平, 曾繁杰等. 植物生理学报, 1992; **18** (3): 253

**Conformation Variation and Its Effects on Optical Absorption of Phycobilin.** Zheng Xiguang, Wang Hezhou, Yu Zhenxin, Gao Zhaolan (State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China); Zhu Jinchang, Jiang Lijin (Institute of Photographic Chemistry, Academia Sinica, Beijing 100101, China).

**Abstract** Investigation into effects of conformation variation on optical absorption of phycobilins is important in photosynthesis research. It is found that the electronic excited-state of phycobilin exhibits a quasi-Boltzmann distribution due to inhomogeneous random variation of its conformation, and that the envelope of the vibronic absorption transition band can be described as convolution with the inhomogeneous random distribution of conformation variation. Inhomogeneous random distribution of phycobilin conformation variation results in asymmetric broadening of vibronic absorption transition band.

**Key words** photosynthesis, phycobilin, conformation, spectropic band broadening

## 白细胞介素-2 活化 DNA 结合因子的研究

朱锦芳 郑仲承 孙兰英 郭丽英 J. THEZE<sup>1)</sup> 刘新垣

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

**摘要** 用凝胶阻滞分析的方法,发现鼠T淋巴细胞系CTLL-2在白细胞介素-2(IL-2)刺激下可活化

<sup>1)</sup>Pasteur Institute, Paris. 收稿日期: 1995-10-26, 修回日期: 1996-03-20

一个 DNA 结合因子, 它与  $\gamma$ -干扰素活化序列 (GAS) 专一性结合, 命名这个 DNA 结合因子为白细胞介素-2 活化核因子 (IL-2-NAF). IL-2-NAF 的活化非常迅速, 不需要新的蛋白质合成, 并且它的活化程度随着 IL-2 刺激细胞的时间的不同而发生相应的变化. 进一步研究表明, IL-2-NAF 的活化过程是通过酪氨酸激酶的信号传递途径, 并且它本身的酪氨酸残基也被磷酸化, 酪氨酸残基的磷酸化为其结合 DNA 所必需. IL-4、 $\gamma$ -IFN 刺激 CTLL-2 细胞不活化与 GAS 专一性结合的因子. 而在 Hut-102 细胞中, IL-2、IL-4 均可活化 GAS 结合因子, 但活化程度较弱.

**关键词** 白细胞介素-2, 信号传递, 凝胶阻滞分析,  $\gamma$ -干扰素活化序列

白细胞介素-2 (IL-2) 是一个重要的免疫调节细胞因子. 它具有导致 T 细胞的活化与增殖, B 细胞的生长与分化, 促使 LAK 细胞产生等作用. 另外, 它还有促使成熟 T 细胞程序性死亡的负调节作用. 这些作用的发挥都是通过 IL-2 与靶细胞表面受体结合后, 活化一系列信号分子, 最终导致一系列基因的表达来实现的. 关于 IL-2 的信号传递的研究已有许多报道<sup>[1,2]</sup>. 研究较为清楚的已知途径包括三条: 一是通过 Src 酪氨酸激酶诱导 c-fos/c-jun 的表达, 二是诱导 c-myc 的表达, 三是诱导 bcl-2 的表达 (受 rapamycin 抑制). 在上述途径涉及到的原癌基因的启动子区没有本论文报道的 IL-2-NAF 的结合位点. 这就预示着 IL-2 对 IL-2-NAF 的活化是通过另外一条信号传递途径. 这条途径也与酪氨酸磷酸化有关. 至于 IL-2-NAF 促使何种基因的表达正在研究之中.

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞培养

鼠 CTLL-2 细胞株用含 10% 小牛血清、100 IU/ml IL-2 的 RPMI 1640 培养液在 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养.

### 1.2 细胞刺激及核蛋白提取

细胞传代 24 h 后, 洗去 IL-2, 在无血清培养条件下饥饿 8 h (细胞密度为  $1 \times 10^5$ /L), 刺激时 IL-2 用量为 300 IU/ml. 抑制剂在 IL-2 刺激前 20 min 加入, 用量分别为 H-7 50  $\mu$ mol/L, HA-1004 50  $\mu$ mol/L, 星形孢菌素 (staurosporine) 1  $\mu$ mol/L. 放线菌酮在刺激前 1 h 加入, 用量为 10 mg/L. IL-2 刺激 20 min

后, 按文献 [3] 少量快速抽提核蛋白. 简单步骤如下: 细胞 ( $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ ) 离心后, 用 1.5 ml 生理盐水悬浮, 装入微量离心管, 12 000 r/min 离心 10 s, 用 400  $\mu$ l 冷的缓冲液 A (10 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸 pH 7.9, 1.5 mmol/L 氯化镁, 10 mmol/L 氯化钾, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2 mmol/L 苯甲基磺酰氟) 悬浮, 冰浴 10 min, 振荡 10 s, 离心 10 s, 去上清后加入 20 ~ 100  $\mu$ l 缓冲液 C (20 mmol/L 羟乙基哌嗪乙磺酸 pH 7.9, 25% 甘油, 420 mmol/L 氯化钠, 1.5 mmol/L 氯化镁, 0.2 mmol/L 乙二胺四乙酸, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 5 mg/L pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin) 冰浴 20 min (蛋白酶抑制剂在临用前加入), 12 000 r/min, 4℃ 离心 2 min, 吸取上清, 速冻 -70℃ 保存. 蛋白浓度测定用 Bradford 法. 放线菌酮购自上海伯奥公司, 其他抑制剂均购自美国 Calbiochem 公司. IL-2 购自 GIBCO-BRL 公司.

### 1.3 探针制备

$\gamma$ -干扰素活化序列 (GAS), c-sis 诱导元件 (sis-inducible-element, SIE), 血清效应元件 (serum-responsive-element, SRE) 寡核苷酸由上海细胞研究所合成, 序列为: IRF-1 (interferon-regulatory-factor-1) 启动子区的 GAS: 5'-AGCTTACAACAGCCTGATTTCCCGAAATGACGGCA-3', 3'-ATGTTGTCTGGA-CTA AAGGGGCTT TACTGCCGTTCTGA-5'. c-fos 启动子区的 SIE: 5'-AGCTTCAGTTCCCGTCAA TCA-3', 3'-AGTCAAGGGCAGTTAGTTCGA-5'. c-fos 启动子区的 SRE: 5'-

AATTGGATG TCCATATTA GGACATCTG - 3', 3'-CCTACAGGTATAATCCTGTAGACT-TAA-5'. 相应的两条单链寡核苷酸退火形成双链. 标记用 Klenow 酶补平方法使 3'端掺入同位素  $\alpha$ - $^{32}$ P-dATP, 乙醇沉淀两次回收. GAS 经克隆测序证明序列完全正确.

#### 1.4 凝胶阻滞分析

按文献 [4], 10  $\mu$ g 核总蛋白与 2  $\mu$ g 多聚脱氧次黄嘌呤-多聚脱氧胞嘧啶[poly(dI-dC)] 25 $^{\circ}$ C 结合 20 min 后, 加入 20 000 计数/min 探针, 25 $^{\circ}$ C 结合 25 min. 4 $^{\circ}$ C 1  $\times$  TBE 电泳 (250 V) 2.5~3 h. 抽干, 放射自显影. 核蛋白的酪氨酸去磷酸化用酪氨酸磷酸酯酶 (PTPase) 37 $^{\circ}$ C 处理 0.5 h. 磷酸酪氨酸抗体 (Anti-P-Tyr) 干扰实验中, Anti-P-Tyr 在结合反应前 1 h 加入到核蛋白中, 并 4 $^{\circ}$ C 保温 1h 以上. Poly (dI-dC) 购自 Pharmacia 公司. PTPase 和 Anti-P-Tyr 购自美国 Calbiochem 公司.

## 2 结 果

### 2.1 IL-2 激活与 GAS 专一性结合因子

凝胶阻滞分析电泳可看到, IL-2 刺激

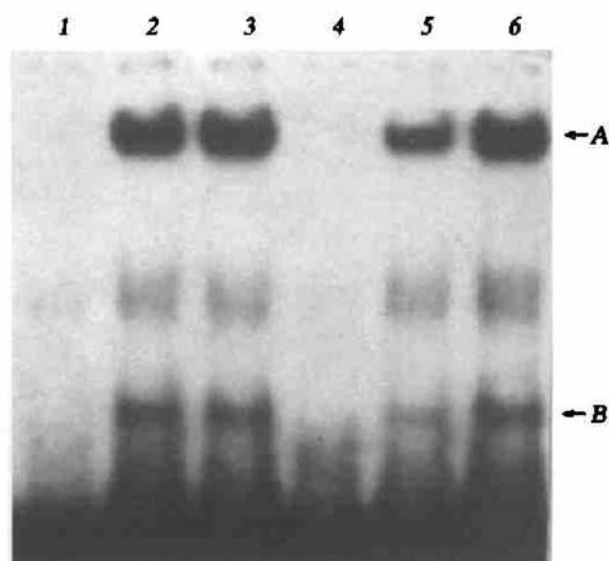


图 1 IL-2 活化 IL-2-NAF

1: 不刺激; 2、3: IL-2 刺激; 4: IL-2 刺激 + 过量的冷 GAS; 5: IL-2 刺激 + 过量的冷 SIE; 6: IL-2 刺激 + 过量的冷 SRE; A: 高分子质量条带; B: 低分子质量条带.

CTLL-2 20min 比不刺激的情况下多出一条很强的与同位素标记的 GAS 探针结合的条带 (图 1 中泳道 2, 3 的条带 A), 用冷的过量 100 倍于探针的 GAS 竞争, 此条带消失, 用过量的与 GAS 同源性较好的 c-fos 启动子区的 SIE 不能完全将其竞争掉, 而用与 GAS 不同源的 SRE 则完全不能竞争, 说明 IL-2 刺激 CTLL-2 细胞后可活化产生与 GAS 专一性结合的 DNA 结合因子, 我们命名它为 IL-2-NAF (图 1).

### 2.2 IL-2 活化 IL-2-NAF 的时间过程

IL-2 活化 IL-2-NAF 的反应过程是十分迅速的. 在 IL-2 刺激 CTLL-2 1 min 后即可看到有少量的 IL-2-NAF 被活化, 并随着刺激时间的增加而逐渐增强, 在 1 h 左右达到最强, 然后开始减弱 (图 2).

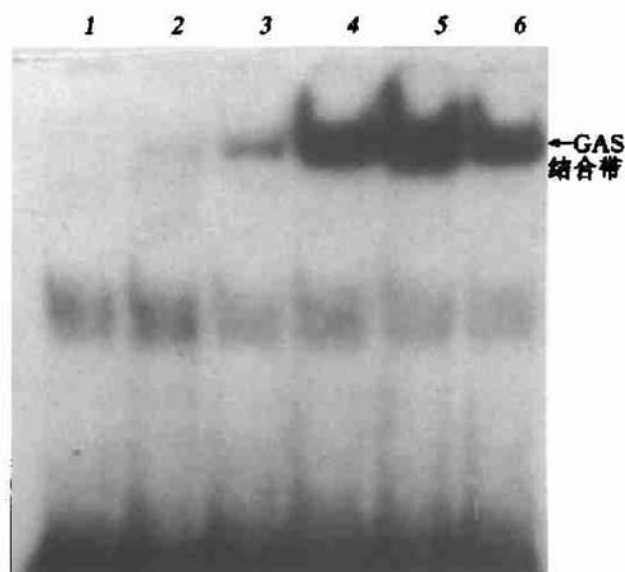


图 2 IL-2-NAF 被活化的时间过程

1: 不刺激; 2: 刺激 1 min; 3: 刺激 5 min; 4: 刺激 20 min; 5: 刺激 60 min; 6: 刺激 120 min.

### 2.3 活化过程与蛋白质合成的关系

在放线菌酮抑制蛋白质合成的情况下, IL-2 仍能活化 IL-2-NAF, 证明 IL-2-NAF 的活化不需要合成新的蛋白质, 而是已有的蛋白质直接被活化 (图 3).

### 2.4 磷酸化抑制剂对活化的影响

在 H-7, HA-1004 (蛋白激酶 A、蛋白激

酶 C 抑制剂) 的存在下培养细胞, IL-2 仍能活化 IL-2-NAF, 而在 Staurosporine (广谱的抑制剂) 存在下培养细胞, IL-2 则不能活化 IL-2-NAF, 说明 IL-2 活化 IL-2-NAF 的途径很可能是通过酪氨酸磷酸化 (图 4)。

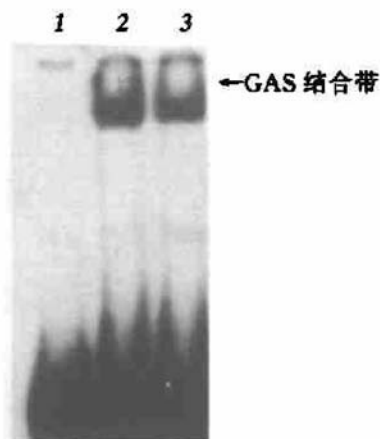


图 3 放线菌酮对 IL-2-NAF 活化的影响

1: 不刺激; 2: 刺激; 3: 刺激 + 放线菌酮。

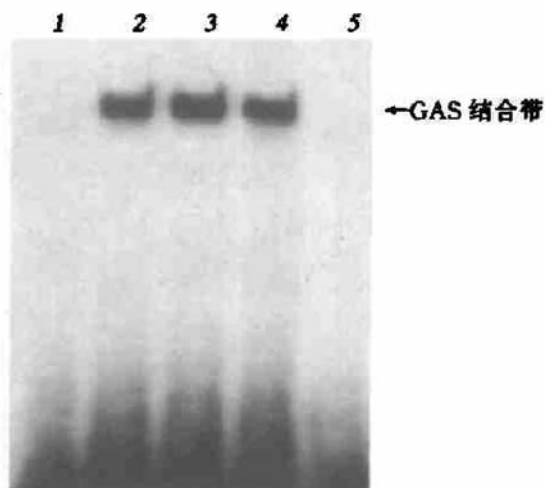


图 4 蛋白激酶抑制剂对 IL-2-NAF 活化的影响

1: 不刺激; 2: 刺激; 3: 刺激 + H-7; 4: 刺激 + HA-1004; 5: 刺激 + staurosporine。

## 2.5 酪氨酸磷酸化为活性所必需

为进一步证实 IL-2-NAF 的活化是通过酪氨酸磷酸化, 我们研究了 IL-2-NAF 本身的酪氨酸磷酸化情况。磷酸酪氨酸抗体 (Anti-P-Tyr) 干扰实验发现加入不同量的 Anti-P-Tyr, IL-2-NAF 结合 GAS 的活性被不同程度抑制,

加入无关抗体 (Anti-IL-2) 则结合不受影响。用 PTPase 处理核蛋白, 发现 IL-2-NAF 结合活性消失, 在 PTPase 处理核蛋白的同时加入其抑制剂正钒酸钠 (5 mmol/L), 则 IL-2-NAF 结合活性仍然存在。说明 IL-2-NAF 本身的酪氨酸残基被磷酸化, 并且酪氨酸磷酸化为其结合 DNA 所必需 (图 5, 6)。

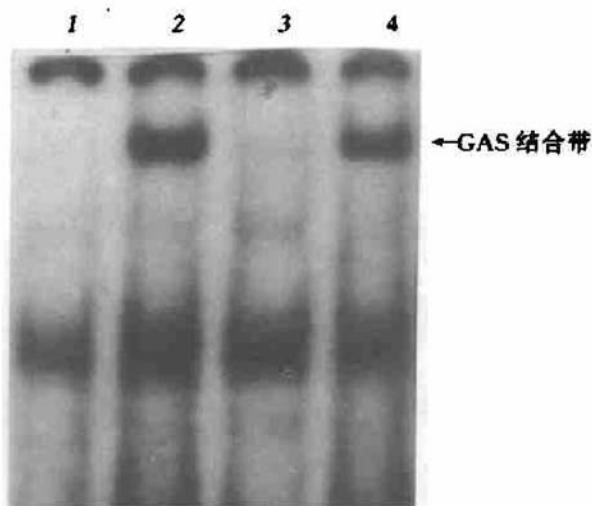


图 5 酪氨酸磷酸酶对 IL-2-NAF-DNA 复合物的影响

1: 不刺激; 2: 刺激; 3: 刺激 + PTPase 处理; 4: 刺激 + PTPase 处理 + 正钒酸钠。

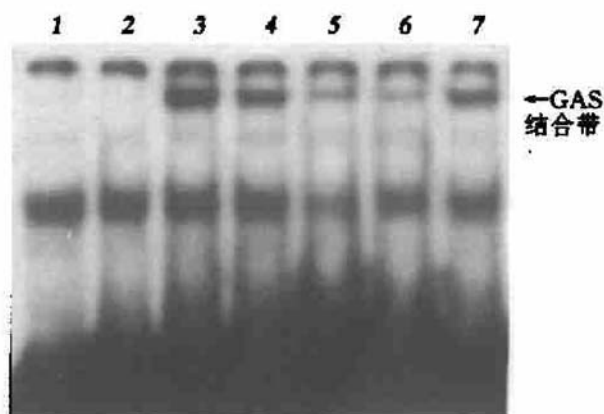


图 6 磷酸酪氨酸抗体对 IL-2-NAF-DNA 复合物的影响

1: 不刺激; 2: 不刺激 + 1 μg Anti-P-Tyr; 3: 刺激; 4: 刺激 + 1 μg Anti-P-Tyr; 5: 刺激 + 2 μg Anti-P-Tyr; 6: 刺激 + 5 μg Anti-P-Tyr; 7: 刺激 + 5 μg Anti-IL-2。

## 2.6 IL-4、IFN-γ 的作用

IL-2、IL-4 和 γ-IFN 刺激 CTLL-2 细胞均

能活化与 SIE 专一性结合的因子, 但只有 IL-2 能活化与 GAS 专一性结合的因子 (图 7).

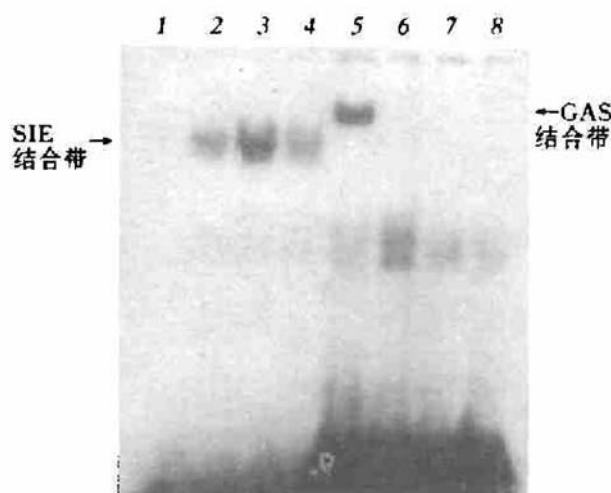


图 7 IL-2、IL-4 和  $\gamma$ -IFN 对不同 DNA 结合因子的不同活化作用

1~4: 探针是 SIE; 5~8: 探针是 GAS; 1, 8: 不刺激; 2, 7:  $\gamma$ -IFN 刺激; 3, 6: IL-4 刺激; 4, 5: IL-2 刺激.

## 2.7 Hut102 细胞株中的活化

在人细胞株 Hut102 中, IL-2 和 IL-4 均能刺激活化 GAS 结合因子, 但是它们的活化程度较弱 (图 8).

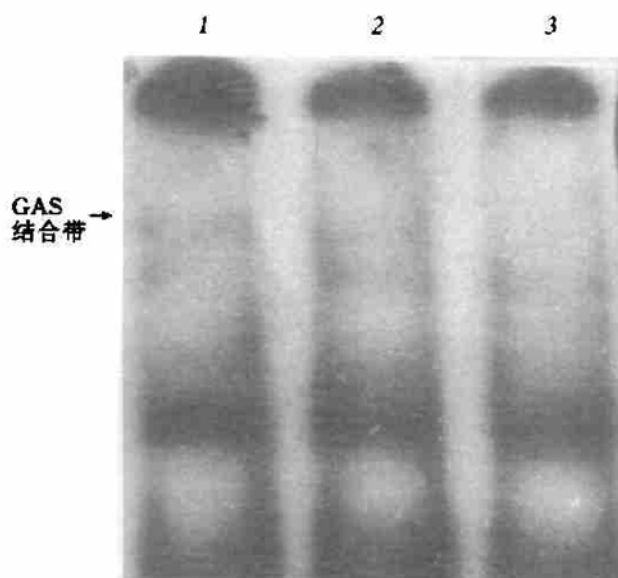


图 8 IL-2 和 IL-4 在 Hut102 细胞株中对 GAS 结合因子的活化

1: IL-4 刺激; 2: IL-2 刺激; 3: 不刺激.

## 3 讨 论

我们的研究表明, a. IL-2 能活化 GAS 结合因子 (IL-2-NAF); b. IL-2-NAF 的活化过程迅速, 与蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC) 及蛋白合成无关, 与酪氨酸激酶有关; c. IL-2-NAF 的活化机制是其酪氨酸残基被磷酸化. 这些与 JAK-STAT 途径的基本特征相同. JAK-STAT 途径最初是在干扰素 (IFN) 信号传递研究中发现的<sup>[5]</sup>. 它的基本特征是在信号传递过程中只需 JAK (Janus kinase) 和 STAT (signal transducer and activator of transcription), 不需要其他的信号分子参与. 此途径具体过程为: 细胞因子与其受体相互作用后, 受体形成二聚化或多聚化, 使结合于受体膜内区的 JAK 酪氨酸激酶被激活, 从而磷酸化 STAT 蛋白的酪氨酸部位, 磷酸化的 STAT 蛋白产生二聚化, 并转位到核内, 与 GAS 或相关的调控序列结合, 从而实现基因表达调控. 最近的一些研究表明许多细胞因子都与 JAK-STAT 途径有关. 有文献报道<sup>[2,6]</sup>, 在转 IL-2 受体基因的 BAF-BO3 细胞株及人的 T 淋巴细胞中, IL-2 可活化 STAT5. 而我们发现的 IL-2-NAF 是否是 STAT 家族中新的一员或已被发现的成员都值得深入研究.

我们另外发现, IL-2 刺激 CTLL-2 细胞可产生两条 GAS 结合条带, 分子质量较小的那条重复性不是很好 (图 1), 如果在 DNA 与蛋白质相互结合过程中, 加入破坏蛋白质之间相互作用的脱氧胆酸钠, 可发现大分子质量条带消失, 而产生较为微弱的小分子质量条带 (数据未给). 我们推测, IL-2 刺激产生的 IL-2-NAF 可能为一个多种蛋白质的复合体, 其中有一蛋白质组分直接与 GAS 结合, 而其单独的结合能力较弱, 当另有其他蛋白质与其共同作用时就形成了 IL-2-NAF, 且与 GAS 的结合力大大增强. 这种推测正在进一步用蛋白质核酸印迹、蛋白质印迹、紫外交联及 DNA 亲和柱分离纯化来证实.

任何信号传递途径都存在细胞的差别. 对

于 GAS 结合蛋白的活化, IL-2 和 IL-4 对不同细胞株有不同的反应. 在 CTLL-2 细胞中, IL-2 对 GAS 结合蛋白有较强的活化, 而 IL-4 却没有. 在 Hut102 细胞中, IL-2、IL-4 对 GAS 结合蛋白的活化较弱. 而对于单核细胞, IL-4 能活化 GAS 结合蛋白, 而 IL-2 却不能<sup>[7,8]</sup>. 这些细胞株差异的原因可能与不同细胞利用不同的信号分子有关.

我们看到 IL-2-NAF 可与 IRF-1 启动子区的 GAS 有强的结合, 但通过 RNA 印迹, 发现 IRF-1 的转录在 IL-2 刺激 1~4 h 后未有增强, 反而有所减弱. 尽管我们观察到 IL-2 刺激 CTLL-2 24 h 后 IRF-1 转录有明显的增强, 但时程与 IL-2-NAF 结合 GAS 的时程不符 (数据未给). IRF-1 的转录增强与 IL-2-NAF 的关系还有待进一步探讨. 尽管一些细胞因子如 IL-3、IL-4 等, 它们对 GAS 结合蛋白活化的生理意义还未搞清楚, 只知与细胞分裂无关, 另外一些细胞因子如  $\gamma$ -IFN、IL-6 却可通过 GAS 结合蛋白开动有关基因, 从而发挥其生理作用. 我们下一步的工作希望能找到 IL-2 通过 IL-2-NAF 来调控的基因.

### 参 考 文 献

- 1 Minami Y, Kono T, Miyazaki T *et al.* Annu Rev Immunol, 1993; 11: 245
- 2 Miyazaki T, Liu Z J, Kawahara A *et al.* Cell, 1995; 81: 223
- 3 Andrews N C, Faller D V. Nucleic Acids Research, 1991; 19: 2499
- 4 Pine R, Canova A, Schindler C. The EMBO Journal, 1994; 13: 158
- 5 Shuai K. Current Opinion in Cell Biology, 1994; 6: 253
- 6 Lin J X, Migone T S, Tsang M *et al.* Immunity, 1995; 2: 331
- 7 Schindler C, Kashleva H, Permis A *et al.* The EMBO Journal, 1994; 13: 1350
- 8 Lamer A C, David M, Feldman G M *et al.* Science, 1993; 261: 1730

### Studies on Activation of a DNA-binding Factor

**Induced by Interleukin-2.** Zhu Jinfang, Zheng Zhongcheng, Sun Lanying, Guo Liying, J. THÈZE<sup>1)</sup>, Liu Xinyuan (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031, China; <sup>1)</sup>Pasteur Institute, Paris, France*).

**Abstract** Assayed by gel retardation, it is shown that IL-2 treatment on CTLL-2 causes formation of a DNA-binding factor that strongly recognizes a DNA sequence termed gamma-interferon activation site (GAS). This DNA binding factor is named as IL-2 nuclear-activated factor (IL-2-NAF). The activation of IL-2-NAF is rapid and does not require protein synthesis. The level of IL-2-NAF activity increases within minutes of IL-2 stimulation and reaches maximum at 1 hour, then begins to decrease. Activation of IL-2-NAF is sensitive to an inhibitor for tyrosine protein kinase (TPK), but not to those specific for PKA or PKC. Moreover, protein tyrosine phosphatase (PTPase) or antibodies specific for phosphotyrosine (Anti-P-Tyr) can block the formation of IL-2-NAF-DNA complex. This demonstrates that activation of IL-2-NAF requires tyrosine phosphorylation. IL-4 or  $\gamma$ -IFN treatment of CTLL-2 causes activation of common DNA-binding factors that recognize SIE (*sis*-inducible element), but seems to have no effect on any DNA-binding factor that recognizes GAS. Thus, IL-2, IL-4 and  $\gamma$ -IFN induce their signals to nucleus by different pathways in CTLL-2. The data also show that treatment of Hut-102 cell with IL-2 or IL-4 can weakly activate a DNA-binding factor specifically to recognize GAS.

**Key words** interleukin-2, signal transduction, gel retardation assay, gamma-interferon activation site