

- 20 Keller E T, Ershler W B. Effects of IL-6 receptor antisense oligodeoxynucleotides on *in vitro* proliferation of myeloma cells. J Immunol, 1995, **154**: 4091~ 4098
- 21 Klein B, Brailly H. Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. Immunology Today, 1995, **16**: 216~ 220

Interleukin 6 Signal Transduction and the Strategies in Treatment for IL-6-related Diseases. DUAN Jubao, WANG Jiaxi (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Interleukin 6 is a multiple function cytokine, playing an important role in modulating immune response, hematopoeisis, acute phase reaction and so on. On the other hand, over-expression of IL-6 relates to the pathogenesis and development of many kinds of diseases. IL-6 exerts its effect on the target cell through a two-chain receptor system, one is the ligand-binding chain (IL-6R) and the other is the signal transducer gp130. IL-6, IL-6R and gp130

interact through a heterohaxmer module, sequentially triggers the signal transduction within the cell. There exist two signal transduction pathways: Jak-STATs pathway and Ras-MAPK cascade pathway. Any factor that can block or interfere with the signal transduction of IL-6 will be a considerable strategy in treatment for IL-6 related diseases. These strategies include growth factors, monoclonal antibodies, antagonists, antisense gene and so on. The study on the pharmaceutical design and selection targeting to signal transduction of IL-6 will promote the treatment for IL-6-related diseases. The two-chain receptor system of IL-6 and its signal transduction have been reviewed, and the strategies in treatment for IL-6-related diseases have been elucidated.

Key words interleukin 6, signal transduction, IL-6-related diseases

血管内皮生长因子受体的结构与功能*

张 曼 周爱儒¹⁾

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

摘要 血管内皮生长因子 (VEGF) 受体是存在于血管内皮细胞, 介导内皮细胞增殖分化的跨膜受体. 研究较多的有两种 VEGF 特异受体: Flt 和 KDR. Flt 和 KDR 的基因结构及染色体定位已基本确定, 这二者均属 RTK III型受体, 结构相似. 细胞外区均有 7 个类似免疫球蛋白结构, 细胞内区催化域均有酪氨酸激酶插入区. 当 VEGF 与受体结合时, 引起受体自身的磷酸化, 发生细胞内反应. 在血管发生与生长、创伤修复、炎症、肿瘤和某些血管疾病中起重要作用.

关键词 血管内皮生长因子, 结构, 功能, 血管内皮生长因子受体

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是血管内皮的特异丝裂原, 具有促进内皮细胞增殖, 加速新血管形成的作用^[1]. 1992 年 Vries 和 Termain 分别证明了 Flt (the fms-like tyrosine kinase) 和 KDR

(kinase insert domain-containing receptor) 是 VEGF 的特异受体. VEGF 通过与受体特异结

* 国家教委博士点基金项目.
¹⁾ 北京医科大学生化与分子生物学系.
收稿日期: 1996-03-12, 修回日期: 1996-08-12

合, 发挥其生物效应. Flt 和 KDR 主要分布在正常组织中的血管内皮细胞, 均是跨膜受体, 属于 RTK (receptor tyrosine kinase) III型, 其共同特点是催化域内有酪氨酸激酶插入区, 该酪氨酸激酶的活性通过受体与配体结合而激活, 由于受体磷酸化而引起细胞内许多酶和其他反应. 在细胞的生长和分化中起重要作用, 是机体生长过程中的重要调节因素.

1 Flt

1.1 flt 基因

flt 基因是由 Matsushine 等于 1987 年鉴定的, 属于酪氨酸激酶家族的原癌基因, 是一类与细胞的生长和分化密切相关的受体基因, 位于染色体 13q¹², 全长 7680 bp, 其限制性酶切位点和开放阅读框如图 1 所示. 至少含有一个 123 bp 的外显子. 其编码的氨基酸序列与酪氨酸激酶族的激酶区具高度同源性. 其 65% 核苷酸与 V-ros 基因相一致. flt 基因中位于第 250~ 252 位的 ATG, 可能是此基因转录的起始密码, 因为: a. 从 1~ 249 位的核苷酸序列中富含 GC (大约占 80%), 这个特点与其他酪氨酸激酶的上游非编码区相似. b. 含有 250 ~ 252 位 ATG 的短序列 TCACCATGG 与 Kozak's 标准的哺乳类基因起始位点相一致. c. ATG 后的 21 个密码子编码较多的疏水氨基酸. 可能编码膜蛋白信号肽. d. 根据细胞外区半胱氨酸位置的比较, fms 基因家族中的起始点与这个 ATG 的位置一致^[2~ 4].

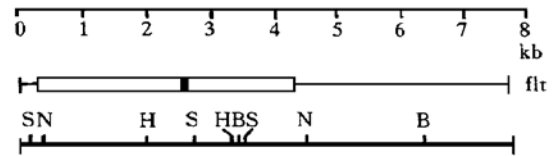


图 1 flt 基因

限制性酶切位点: B: Bg III; H: Hind III; N: Nco I; S: Sma I. □: 开放阅读框.

1.2 Flt 结构

Flt 是酪氨酸激酶家族的跨膜受体. 根据

已知 flt cDNA 的序列推测含 1338 个氨基酸, 分子质量约 150 ku, 结构如图 2. Flt 包括三个部分: a. 细胞外区: 由 758 个氨基酸组成, 包括疏水导段和 7 个类似免疫球蛋白的结构, 其中半胱氨酸的分布及其形成的分子内二硫键决定了其与配基结合的部位, 半胱氨酸的分布与 c-fms 基因家族非常相似, 存在高度同源 (54% ~ 60%). 细胞外区肽链比 fms 家族约长 220 个氨基酸. b. 跨膜区: 由 22 个氨基酸组成, 连接富含碱性氨基酸的 Arg-Lys-Met-Lys-Arg 序列. c. 细胞内区: 由 558 个氨基酸组成, 此区中含有 66 个氨基酸的酪氨酸激酶插入区, 它决定了受体的功能特异性. 第 834~ 839 位的残基序列是 Gly-X-Gly-X-X-Gly, 第 861 位赖氨酸是 ATP 结合位点, 第 1053 位的酪氨酸可能是自身磷酸化位点^[2, 5].

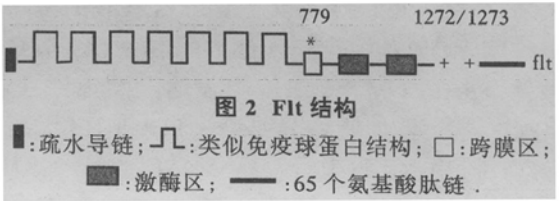


图 2 Flt 结构

■: 疏水导链; □: 类似免疫球蛋白结构; □: 跨膜区; ■: 激酶区; —: 65 个氨基酸肽链.

1.3 Flt 是 VEGF 的特异受体

Vries 等^[2]将 flt cDNA 和 PDGF 受体的 cDNA 分别构建到 psv7d 载体中, 然后转染到 COS 细胞中表达, 发现¹²⁵I-VEGF 与表达 flt 的 COS 细胞高亲和力结合, PDGF-BB, b-FGF 与之无竞争抑制, 而¹²⁵I-VEGF 与转染 PDGF 受体 cDNA 的 COS 细胞无结合反应, 由此表明 Flt 是 VEGF 的特异受体.

继而将全长的 flt cDNA 在体外转录, 并将带帽的 mRNA 注射入爪蟾卵母细胞中, 再加入 VEGF 共同孵育, 发现注射了 flt mRNA 的卵母细胞的钙流量比原来增加 5 倍, 而加入 PDGF 则无此反应. 用同样的方法将水注入卵母细胞再加入 VEGF 或 PDGF 均无此反应. 另外, 用 VEGF 刺激表达 flt 的爪蟾卵母细胞, 可引起受体酪氨酸的磷酸化. 这些结果说明, VEGF 可激活 Flt 活性, Flt 是 VEGF 发

挥生物活性的介导物质。

2 KDR

2.1 KDR 的确定

Terman 等^[6]于 1991 年根据 RTK III 型受体的结构特点 (催化区有稳定的激酶插入片段), 用 PCR 的方法以 RTK III 共有的稳定序列 HRDLAARNV 为反义引物, 用只有 RTK III 型才具有的特定序列 NLLGACT 为正义引物, 扩增人内皮细胞中的 cDNA 片段, 然后将此 PCR 产物的亚克隆装入质粒载体, 测序, 通过与已知 DNA 序列比较, 发现了以前从未报道过的与 RTK 同源的序列。因其是具有激酶插入区的受体, 因此命名为 KDR。

KDR 基因位于人的 4 号染色体, 4q^{31.2~q³²}, 其 mRNA 为 7.0 kb, 在 5' 端有 2 560 bp 的开放阅读框。KDR 的完整编码部分包含 4 068 个核苷酸, 翻译 1 356 个氨基酸的蛋白质。将 KDR 基因克隆入修饰的 pcDNA1 表达载体, 并在 CMT-3 细胞中表达, 发现¹²⁵I-VEGF 与此类细胞特异结合, PDGF-BB 无竞争抑制作用。其解离常数 (K_d) 为 75 pmol/L, Scatchard 分析每个细胞存在约 175 000 个受体^[7,8]。

2.2 KDR 的结构

KDR 具有与 Flt 相似的结构, 也包括三部分: a. 细胞外区: 由 262 个氨基酸组成, 此区中含有与配基结合的典型的细胞外结构, 即有 9 个 N 连接糖基位点和 9 个调节空间结构的半胱氨酸。半胱氨酸的位置决定了其类似免疫球蛋白的结构。b. 跨膜区: 与 Flt 相似, 只有一个跨膜区, 由 25 个氨基酸组成。c. 细胞内区: 由 567 个氨基酸组成, 具有 ATP 识别序列 Gly-X-Gly-X-X-Gly。第 365 位的赖氨酸是 ATP 结合位点, 第 951、996、1054 和 1059 位的 4 个酪氨酸残基参与磷酸化反应。催化区与其他 RTK III 型有 55%~59% 同源, 而 C 端的 170 个氨基酸链是特异的^[6,9]。

3 Flt 与 KDR 的区别

Flt 和 KDR 都属于 RTK III 型受体, 具有

相似的结构, 但也存在一些差别: a. 亲和力不同: 体外培养的人脐静脉内皮细胞 (HVEC) Flt 与 VEGF 结合的解离常数约为 9 pmol/L, 而 KDR 与 VEGF 结合的解离常数约为 770 pmol/L。b. 传导途径不同: 当 VEGF 与 Flt 受体结合, 引起表达 Flt 的 PAE (porcine aortic endothelium) 细胞中 Src 家族的 Fyn 和 Yes 磷酸化明显增加。而 VEGF 与表达 KDR 的 PAE 细胞相结合无此反应。VEGF 与 Flt 和 KDR 结合, 引起的受体磷酸化作用, KDR 强于 Flt。c. 介导的细胞反应不同: VEGF 与表达 KDR 的 PAE 细胞结合, 引起细胞形态变化, 细胞膜皱增加, 肌动蛋白合成增强, 有丝分裂增多, 具有趋化性等, 而表达 flt 和未转染的 PAE 细胞则无上述变化^[10], 表明两种受体介导的生物功能有不同之处。d. 对肝素反应不同: 对仅表达 KDR 的 ABAE (bovine aortic endothelium) 和黑色素瘤 WM35, 肝素促进 VEGF 与 KDR 的结合, 对只表达 Flt 的 SK-MEL-37, 肝素抑制 VEGF 与 Flt 的结合, 而在既表达 Flt 又表达 KDR 的黑色素瘤细胞 WM9, 肝素则表现出双向性, 即低浓度的肝素抑制 VEGF 与受体的结合, 高浓度的肝素促进其结合^[11]。

4 VEGF 受体介导的生物效应

4.1 KDR 在血管发生和生长中起重要作用

KDR 在鼠类中的同源产物是 Flk^[7], Millaner 等^[12]分析了 flk-1 mRNA 在小鼠胚胎的不同发育阶段的表达情况, 发现在胚胎 9.5~18.5 d 之间, flk-1 在毛细血管生长丰富的部位如心室、肺、脑膜中高表达, 而在脑、肝和含细胞较少的骨中表达较少。在胚胎 11.5 d, 发源于神经周血管丛的第一个血管胚芽开始快速侵入无血管的神经外胚层。此期神经周血管丛和血管胚芽中 flk-1 表达明显增加, 原位杂交显示 flk-1 mRNA 在血管胚芽的增殖内皮细胞中表达明显增加。

在胚胎 14.5 d, 神经外胚层高度血管化, 其 flk-1 mRNA 高表达。在产后 4 d, 血管内

皮细胞增殖和新血管生长达最高程度, flk-1 mRNA 表达也最高. 相反, 在成熟的脑中, 血管生长已经停止, flk-1 mRNA 表达很少且主要局限在脉络丛. 由此表明 flk-1 与血管发生和生长密切相关.

4.2 Flt-1 对细胞间联系的影响

Flt-1 在血管发生过程中对正常内皮细胞之间, 以及细胞与间质之间的联系起重要调节作用. Fong 等^[13]将 flt-1 基因编码信号肽的外显子去掉, 用 LacZ 和 Neo^r 基因取代, 造成鼠胚胎基因的靶向突变, 发现靶向突变的纯合子鼠胚胎, 虽然在胚胎和胚胎外 (胎膜) 能形成内皮细胞, 但细胞排列异常而变成异常的血管腔, 进一步影响其他血管结构的建立, 使其功能丧失, 最终至使中胚期胚胎死于宫腔内. 因此 flt 在内皮细胞之间及其与间质之间的调节, 起重要的控制作用.

4.3 VEGF 受体在心血管系统中的作用

Brogi 等^[14]发现在培养的人脐静脉和微血管内皮细胞, 缺氧可使细胞与¹²⁵I-VEGF 结合增强 3 倍, Scatchard 分析发现这是由于 KDR 受体数增加, 而亲和力无变化. Waltenberger 等^[15]进一步证明缺氧条件下, VEGF 诱导内皮细胞有丝分裂的敏感性增加是由于 KDR 的酪氨酸磷酸化作用增强. 缺氧使 VEGF 的生物效应增强不仅通过 VEGF 的增加, 也通过其受体数量增加和受体的功能增强, 由此表明 VEGF 受体对血管内皮细胞功能和血管再生的重要调节作用. 另外, Li 等^[16]制备了大鼠心脏动脉梗塞模型, 发现梗塞早期 (1 h) 整个心脏的 VEGF、flk-1 和 flt-1 的 mRNA 表达均增加, 与正常相比分别增加了 275%、375% 和 400%, 梗塞 1 d 后, 左室心肌 flk-1 和 flt-1 的 mRNA 表达的增加只局限在梗塞周围区域, 右室心肌两受体的表达增加程度高于 VEGF 的表达.

4.4 在肿瘤生长中的作用

Boockock 等^[17]用原位杂交和免疫组化方法检测了 Flt 和 KDR 在原发性卵巢癌和转移卵巢癌中的表达, 并应用 RT-PCR 和酶联免疫

方法分析了 flt 和 KDR 在来源于卵巢癌腹水内皮细胞中的表达, 结果发现 flt 只在肿瘤血管中表达, 而在肿瘤细胞中无表达, 而 KDR 不仅在肿瘤的血管内皮而且在原发性肿瘤细胞中也有表达. 另有报道^[18]flt-1 和 KDR 在恶性中枢神经系统肿瘤的内皮细胞中也表达, 而在正常中枢神经系统脑血管中无表达. 表明 flt-1 和 KDR 在肿瘤的生长和新血管形成起重要作用.

4.5 其他

KDR 和 flt mRNA 在胚胎鼠的中肾和后肾期及成年鼠的肾脏中, 以及肾小球内皮细胞和小管毛细血管中均有表达, 推测二者参与了肾的发育和生长^[11]. Flt 和 KDR 还参与了迟发型过敏反应^[18]等病理过程.

关于 VEGF 受体的研究发展很快. 近来又有人发现 Flt-4, Tie 和 Tek/Tie-2 也是内皮细胞特异的酪氨酸激酶受体, 都具有信号传导所必需的酪氨酸激酶活性. Flt-4 在胚胎发育期静脉和淋巴内皮中有表达, 而在成年期只限于淋巴管内皮细胞中表达, Tie 和 Tie-2 在小鼠胚胎中的新血管生成和血管发育中起重要作用. 关于它们的功能等其他问题尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 张 曼, 周爱儒. 血管内皮生长因子的结构与功能. 病理生理杂志, 1996, 3: 255~257
- 2 Vries C D, Escobedo J A, Veno H *et al.* The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, 255: 989~991
- 3 Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A *et al.* Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, 1990, 5: 519~524
- 4 Matsushime H, Yoshida M C, Sasaki M *et al.* A possible new member of tyrosine kinase family, human flt sequence is highly conserved in vertebrates and located on human chromosome 13. *Jpn J cancer Res (Gann)*, 1987, 78: 655~661
- 5 Satoh H, Yoshida M C, Matsushime H *et al.* Regional localization of the human c-ros-1 on 6q²² and flt on 13q¹². *Jpn J cancer Res (Gann)*, 1987, 78: 772~775
- 6 Terman B I, Carrien M E, Kovacs E *et al.* Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 1991, 6: 1677~1683
- 7 Terman B I, Vermazen M D, Carrien M E *et al.* Identifica-

tion of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **87**: 1579~ 1586

8 Quinn T P, Peters K G, Vries C D *et al.* Fetal liver kinase I is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelial. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90**: 7533~ 7537

9 Vermazen M D, Hulmes J D, Bohlen P *et al.* Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. Biochem Biophys Res Commun, 1994, **205**: 728~ 738

10 Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Sieghahn A *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, Two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol Chem, 1994, **269**: 26988~ 26995

11 Terma B, Khandke L, Bougher V M *et al.* VEGF receptor subtypes KDR and Flt show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. Growth Factor, 1994, **11** (3): 187~ 195

12 Millaner B, Voos S W, Schniirch H *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and Angiogenesis. Cell, 1993, **72**: 835~ 846

13 Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M *et al.* Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelial. Nature, 1995, **376**: 66~ 70

14 Brogi E, Schattteman G, Wu T *et al.* Hypoxia-induced peracine regulation of VEGF receptor expression. Circulation, 1995, **92**: 0531

15 Waltenberger J, Mayr U, Pentz S *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) represents a survival factor for hypoxic endothelium, potential role of the VEGF-receptor KDR for therapeutic angiogenesis. Circulation, 1995, **92**: 3602

16 Li J, Brown L F, Hibberd M G *et al.* VEGF and VEGF receptors expression in acute myocardial infarction model of angiogenesis. Circulation, 1995, **92**: 3428

17 Boocock C A, Charnock Gones B S, Sharkey A M *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. J Ntal Cancer Inst, 1995, **87** (7): 506~ 516

18 Bronwn L F, Olbrichd S M, Berse B *et al.* Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions. J Immunol, 1995, **154** (6): 2801~ 2807

Structure and Function of VEGF Receptors.

ZHANG Man, ZHOU Airu (*Institute of cardiovascular basic research of Beijing medical University, Beijing 100083, China*).

Abstract Vascular endothelial growth factor receptors are the membrane-spanning receptors which were found in vascular endothelial cells and induce the proliferation and differentiaion of endothelial cells. There are two receptors which can specially bind with VEGF. They are Flt and KDR, the gene structures and locations in the chromosome of flt and KDR were identified. Both Flt and KDR are receptors of type III RTKs. Their structures are similar. There are seven immunoglobir-like sequence in extracellular domain. The catalytic domains in intracellular region were inserted by tyrosine kinase domains. Autophosphorylation was induced, which results in intracellular response. The VEGF reptors play an important role in angio-vascular, wound repair, inflammatory response, tumour growth and some cardiovascular diseases.

Key words vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor receptor, function, structure

昆虫抗菌蛋白基因转录调控研究的新进展

屠益增 蔡敏莺 屈贤铭

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 在自然或人为创伤和感染情况下, 昆虫能迅速产生各种类型的抗菌因子, 例如天蚕素 (cecropin), 果蝇抗菌蛋白 (diptericin), 天蚕抗菌蛋白 (attacin) 和防御素 (defensin) 等. 这些活性