

架对保持 mtDNA 拟核(nucleoid)的稳定是必需的,缺乏 Mmmlp 将导致“线粒体骨架”以及 mtDNA 的结构出现严重改变^[19]。但是,由于 Mmmlp 是线粒体外膜上的整合蛋白,而 mtDNA 位于线粒体基质中,它们是如何作用的呢?很可能包含 Mmmlp 的复合物与 mtDNA 是间接联系,通过一种或数种内膜蛋白与 mtDNA 作用,可也不排除 Mmmlp 或 Mmmlp 复合物的其他成员与 mtDNA 拟核直接作用的可能性,因为线粒体内膜蛋白 Tim23p 的氨基端就是穿过线粒体外膜而直接进入胞质溶胶中的^[20]。因而 Mmmlp 也可以相似的方式,通过横跨外膜和内膜进入线粒体基质中而与 mtDNA 建立联系,介导线粒体融合信号的传递,并在相邻线粒体接触位点的形成上扮演一定角色。

四、结 语

综上所述,线粒体融合是细胞内独特而复杂的过程,需要多种成分的参与和调节。Fzolg、Ugolp、Mmmlp 构成“融合装置”的一部分,它们在线粒体融合过程中既互相联系又发挥各自的功能,其中 Mmmlp 介导线粒体形状的维持,为融合提供一个稳定的环境;Ugolp 介导融合时的能量传递,可能在外膜融合与内膜融合的耦联中起一定作用;Fzolg 不仅参与融合线粒体间的锚定、激活“融合装置”,而且参与内膜融合,并充当耦联外膜融合与内膜融合的中介。不过,总的说来,对与线粒体融合有关的蛋白质掌握得还很不全面、对线粒体融合过程(尤其是膜脂与膜蛋白间的相互作用)了解得还很不具体,关于线粒体融合机制仍需做深入细致的研究。

参 考 文 献

- [1] 孟紫强、耿红、张波,2001,生命的化学,21(6):500-502.
- [2] 孟紫强、耿红,2002,癌变·畸变·突变,14(4):253-255.
- [3] Wallace DC,1992,Ann. Rev. Biochem.,61:1175-1212.
- [4] Reed JC,Green DR,2002,Molecular Cell,9(1):1-2.
- [5] Westermann B,2002,EMBO Rep.,3(6):527-531.
- [6] Suelmann R,Fischer R,2000,Cell Motil. Cytoskel.,45(1):42-50.
- [7] Yaffe MP,1999,Science,283(5):1493-1497.
- [8] Rapaport D,Brunner M,Neupert W,et al.,1998,J. Biol. Chem.,273(32):20150-20155.
- [9] Hermann GJ,Thatcher JW,Mills JP,et al.,1998,J. Cell Biol.,143(2):359-373.
- [10] 李静涵,线粒体,北京大学出版社,1988,8-20.
- [11] 孟紫强、耿红,2002,生命的化学,22(2):118-120.
- [12] Birky CW,2001,Annu. Rev. Genet.,35:125-148.
- [13] Jahn R,S dhof TC,1999,Annu. Rev. Biochem.,68:863-911.
- [14] Fritz S,Rapaport D,Klanner E,et al.,2001,J. Cell Biol.,152(4):683-692.
- [15] Yan L,Huang HW,2002,Science,297:1877-1879.
- [16] Sesaki H,Jensen RE,2001,J. Cell Biol.,152(6):1123-1134.
- [17] Burgess SM,Delannoy M,Jensen RE,1994,J. Cell Biol.,126(6):1375-1391.
- [18] Otsuga D,Keegan BR,Brisch E,et al.,1998,J. Cell Biol.,143(2):333-349.
- [19] Hobbs AE,Srinivasan M,McCaffery JM,et al.,2001,J. Cell Biol.,152(2):401-410.
- [20] Donzeau M,Kald K,Adam A,et al.,2000,Cell,101:401-412.

胸腺素 α 原研究进展

曹俊霞 金礼吉 王 梅 安利佳*

(大连理工大学生物工程系 大连 116012)

摘 要 胸腺素 α 原(prothymosin alpha ProT α)是一种强酸性的蛋白,进化上高度保守,分布极其广泛。ProT α 氨基酸序列的特征除前28个氨基酸与胸腺素 α_1 完全相同外,ProT α 有明显的中心酸性区和亲核序列。ProT α 具有广泛的生物学活性,在细胞增殖、免疫调控和生殖活性等多方面起重要作用。

哺乳动物胸腺中有多种肽类激素,总称为胸腺激素。现已从小牛胸腺分离得到的胸腺激素有胸腺素(Thymosin)、胸腺体液因子(Thymic humoral fac-

tor)、胸腺生成素(thymopoietin, TP)和胸腺因子

*联系人。E-mail: Ljan@mail.dlptt.ln.cn

(Thymic factor)等。目前临床上试用的胸腺素主要是由小牛胸腺纯化而得的胸腺素组分 5 或叫胸腺素 F5(Thymosin fraction 5), 它含有 40 余种肽类, 分子量大小为 1 - 15kD, 具有免疫调控活性^[1]。胸腺素 α 原(prothymosin alpha, ProT α)是胸腺素 F5 的生物活性成份之一, 本文介绍人 ProT α 的结构、受体和转录后修饰以及生物学功能的研究进展。

一、ProT α 的结构及其受体

人胸腺素 α 原(ProT α)基因定位于第 2 号染色体上, 编码 109 个氨基酸, 因不含芳香族氨基酸, 故 280nm 处无吸收。从 ProT α 的一级结构来看, ProT α 的前 28 个氨基酸与 T α_1 (thymosin alpha 1) 完全相同(图 1), 因此最初认为 ProT α 是 T α_1 的前体,

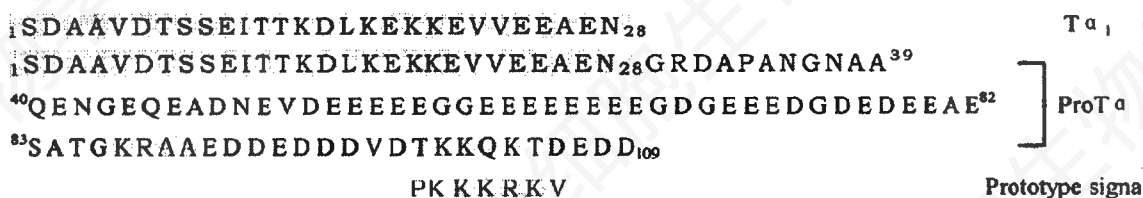


图 1 人 ProT α 氨基酸序列及其相关序列^[2]

ProT α 在体内以单体蛋白的形式存在, 通过 CD (圆二色, circular dichroism spectrum)、质谱、动态光波扫描和小角度 X-光衍射等都证明 ProT α 缺乏规则的二级结构^[2,6,7]。但由于 ProT α 的 N-末端被乙酰化且前 12 个氨基酸中有 10 个是稳定氨基酸, 因此不易被蛋白酶等物质降解^[2]。在凝胶过滤和 SDS-电泳时都能观察到 ProT α 多聚体, 这种多聚体的形成有助于 ProT α 对抗 SDS 的变性能力和 β -巯基乙醇的还原作用^[4]。缺乏二级结构可能是 ProT α 免疫原性较低的原因, 因此很难得到高效价的抗体, 这对通过免疫组化检测 ProT α 带来很多困难^[2]。ProT α 在水相中无构型, 但在类膜环境中能否形成部分构型仍是个未知的问题。假如 ProT α 的构型在类膜环境中发生改变, 在一定程度上就能解释这个蛋白虽缺乏外分泌信号但仍能通过质膜分泌的现象。如果 ProT α 在类膜环境中能形成部分构型, 可能是由于折叠在膜上的临近蛋白影响 ProT α 的构型, 从而相互作用的结果, 也可能是 ProT α 自身相互作用导致某种折叠而形成一定构型。也许正是由于 ProT α 富有多种构型上的变化, 才使 ProT α 能与多种受体结合, 但 ProT α 的构型因何种因素而发生改变现在仍不清楚。缺乏二级结构的一些蛋白与其他

而越来越多的证据表明它们是独立的两种物质。首先, ProT α 与 T α_1 的等电点不同, ProT α 的 PI 为 3.55 而 T α_1 的 PI 为 4.2^[2]。其次它们的受体不同。Terry 等^[3] 的研究表明 ProT α 与外周血细胞、淋巴细胞有亲和力 $K_d = 0.2 \text{ n mol/L}$ 的结合力, 而 T α_1 不与上述细胞结合。全身性红斑狼疮病人的细胞不识别 T α_1 而识别 ProT α ^[2], 说明 ProT α 与 T α_1 的受体是不同的。此外人工合成 ProT α 的片段(29 - 109 位氨基酸)可提高 T 细胞 E-花环形成率, 其作用比 T α_1 大^[4], 而且在保护小鼠免受白色念珠菌感染方面, ProT α 的作用比 T α_1 强, 说明 ProT α 除 N-端外的其他部分也有特定的生物活性^[5]。

分子或受体相互作用时会产生三级结构, 以便执行其功能^[8], ProT α 可能也是通过这种途径发挥其功能。

ProT α 无信号肽, 表明它可能在胞内发挥作用, 但它又能通过质膜分泌, 比如在人血清中总 ProT α 含量占到 10%^[9], 因此不能排除它可能存在的胞外作用。ProT α 与免疫细胞有高亲和力^[10], Jose^[11] 的研究表明 Leu-Lys-Glu-Lys 短肽可作为功能序列, 而这一序列与 ProT α 的第 16 - 19 个氨基酸相同。研究发现在人成纤维细胞和鼠胸腺细胞中该序列可参与干扰素 α_2 、ProT α 和霍乱毒素 β 亚基的共同受体的竞争, 这表明 ProT α 与膜受体之间存在相互作用。ProT α 在外周血单核细胞中以宾主共栖形式存在^[11], Enkemann^[12] 报道 ProT α 似乎是 caspase3 的底物, 因为 ProT α 在凋亡过程中由于受到各种刺激而逐渐降解。Calvo 等^[13] 还发现 ProT α 可通过雌激素受体提高其转录活性, 说明 ProT α 亦存在胞内受体。

目前对于 ProT α 的结构及其与受体相互作用的了解仍非常有限, 但随着研究的不断深入必将推进对 ProT α 生物活性的进一步认识, 最终揭示 ProT α 的免疫调控机制, 并解释其参与原癌基因的调控及

抵御病毒感染的相关作用。

二、ProT α 与组蛋白的作用

ProT α 的突出特点是从第 40 个氨基酸至 82 个氨基酸含有大量的 Glu 残基,即中心酸性区(图 1)。Diaz 等^[14]发现 ProT α 和组蛋白的结合形式与多聚谷氨酸相似,因此认为 ProT α 与组蛋白的结合主要集中在中心酸性区。在细胞内 ProT α 与组蛋白 H1 特异结合并通过调控组蛋白和染色质之间的相互作用使染色体纤维重新折叠^[15-18]。Fernando 等^[6]提出的作用模型认为,ProT α 与组蛋白 H1 的相互作用,可激活非折叠状态的直径为 30nm 染色质纤维使染色质易于解螺旋,在此过程中 ProT α 结合 H1 并使之与 DNA 链分离,表明它可能作为被动的受体或载体分子发挥功能^[2](图 2)。ProT α 与组蛋白的结合表明 ProT α 在染色体结构的形成中起一定作用,而且很可能参与装配核小体。

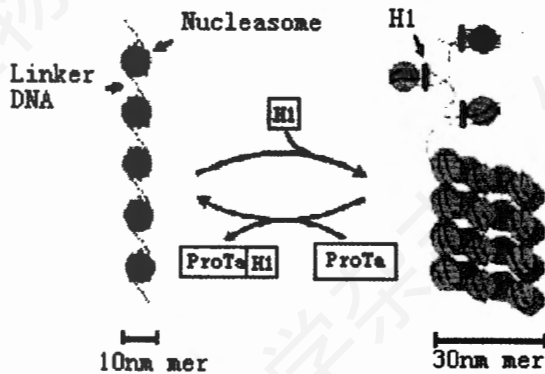


图 2 ProT α 与组蛋白 H1 作用的模型^[6]

三、ProT α 核定位及同源蛋白

ProT α 的分布与转录位点有关,它主要集中在细胞核“domain”(这些域大部分存在于细胞中并在有丝分裂时会消失)区,在有丝分裂期从染色体中释放出来^[19,20]。核定位对于细胞中蛋白的核输出是必须的^[21],分析 ProT α 与绿色荧光蛋白(GFP)融合后的亚细胞分布,证明 ProT α 的核定位信号可分为两部分,即 KRAA 和 KKQK(图 1)。Yui 等^[22]认为 KKQK 比 KRAA 更能代表 ProT α 的核定位信号(Nuclear Location Signal, NLS),其主要理由是:(1) ProT α 的 NLS 与 SV40T(猿猴病毒)抗原的 NLS 相似(图 1, Prototype signal);(2)核靶点定位于 ProT α 的 C-末端部分;(3)截掉了第 88-109 个氨基酸的 ProT α 在异源卵母细胞核内无积累。核转运机制从酵母到人类的进化上是保守的^[23-25],大量的实验证

明脊椎动物蛋白衍生而来的 NLS 都能在非脊椎动物中起作用,但人类 ProT α 的 NLS 对酵母 importin α 亚基不起作用。ProT α 的核转运需要包含 NLS 的 importin α 亚基和除 NLS 以外的其他序列的共同参与,从而保证 ProT α 的 NLS 发挥作用。

拟胸腺素(parathymosin)与 ProT α 属于同一基因家族,该基因定位于人的第 17 号染色体上,含有 5 个外显子,编码 101 个氨基酸,分子量为 11.5 kD,是酸性蛋白。拟胸腺素能结合锌,因此推断 ProT α 有自身结合金属的能力。拟胸腺素与 ProT α 的 N-端氨基酸有 40% 的同源性^[19]。拟胸腺素 mRNA 在所有细胞中均有表达,基因表型具有保守性。在不同物种中拟胸腺素与 ProT α 均具有相似的中心酸性区,且都与 H1 相关,在 C-末端都有核定位信号,对 ProT α 是 KKQK,而对拟胸腺素是 KRQK。目前的研究表明它们是两种不同的酸性核蛋白,ProT α 与 RNA 合成有关而拟胸腺素与早期的 DNA 复制有关。

四、ProT α 的转录后修饰

1. ProT α 的磷酸化

在细胞增殖过程中,ProT α 的氨基末端可被酪蛋白激酶 2(CK-2)磷酸化^[26]。最近已分离出几种 ProT α 的特异蛋白激酶(ProT α -specific protein kinase, ProT α K),这些激酶负责 ProT α 的磷酸化。ProT α 的磷酸化位点主要集中在 Thr、Ser 残基,但 Glu 残基也可被磷酸化^[2,26]。目前为止,在已知的蛋白中 ProT α 是唯一 Glu 残基被磷酸化的蛋白。ProT α 的磷酸化依赖于细胞有丝分裂的激活^[26],提示 ProT α 与细胞生长调控有关。

2. ProT α 与 RNA 的结合

ProT α 在鼠的 Krebs I 细胞中与一个短的 RNA 片段相连^[27,28]。目前仅有几种蛋白与 RNA 是以共价复合物形式存在,最典型的例子是肿瘤抑制因子 P53 和 5.8S rRNA 形成的复合物^[29]。最近 Vartapetian 等^[30]在大肠杆菌中模拟 ProT α 与 RNA 分子的结合,证明复合体中含有部分 tRNA(tRNA^{Lys}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}和 tRNA^{Met})。因为哺乳动物的 ProT α 在细菌中仍有与 RNA 结合的能力,故推测 ProT α 存在一种自催化作用或其他功能基团可使 ProT α 与 RNA 结合。而与 ProT α 相连的细菌 tRNAs 可占有空余的 3'-末端和 5'-末端,这种结构效应影响蛋白的亚细胞定位。ProT α 上有许多 tRNA 结合位点,这些位点可能相互竞争结合 tRNA^[2,30](图 3)。

tRNA的结合位点主要集中在 ProT α 的两端,而且 C-末端比 N-末端的位点更利于结合 tRNA,ProT α 中心酸性区不与 tRNA 结合^[2,30,31]。ProT α 与 RNA 的结合提示 ProT α 参与了 RNA 的合成与代谢。

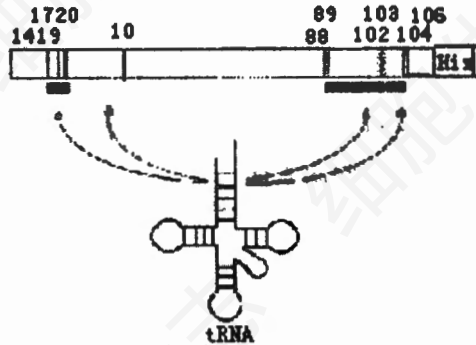


图3 ProT α 与 RNA 的结合位点^[36]

五、关于 ProT α 作用的研究

1. ProT α 与肿瘤

原癌基因 myc 家族由 C-myc, N-myc 和 L-myc 等组成,彼此间具有同源性,它们对细胞的增殖、分裂、凋亡及肿瘤转移有重要影响^[32]。ProT α 基因的转录受 C-myc E-box (CACGTG) 的调控。免疫组化研究发现在结肠癌和乳腺癌组织中,ProT α 的表达量比邻近正常组织高,在肝癌组织中也有过表达^[2]。Hidefumi^[32] 的研究表明,ProT α mRNA 表达水平与神经母细胞瘤中 N-myc mRNA 水平成正相关,且与预后相关,ProT α mRNA 表达水平越高病人的存活可能性就越大。增加 ProT α 的表达,可使 ProT α 与其他生物因子共同起到类似开启细胞死亡信号的正向作用。因此,ProT α 可能是神经母细胞瘤中 N-myc 的靶点,但其在神经母细胞瘤中的确切作用仍有待进一步的研究。

ProT α 在疾病早期可刺激淋巴因子激活的杀伤细胞 (lymphokine activated killer cells, LAK) 活性,这种作用是通过增加淋巴细胞与肿瘤靶细胞的结合进而增加 IFN- γ (干扰素- γ) 和 IL-2 (白介素-2) 的分泌来实现的^[33]。ProT α 单独使用或与 IL-2、IFN- γ 联合使用都会提高抗肿瘤活性。单独使用 ProT α 时可刺激 TNF- α (肿瘤坏死因子- α) 和 IL-1 β (白介素-1 β) 的分泌,并且降低 PGE₂ (前列腺素) 和 TGF- β (转化生长因子- β) 的水平,而 ProT α 与 IL-2 结合使用,可增加 NK 细胞 CD56、CD16/56 和 CD25 及 CD18/11a 粘附分子的表达。在 IFN- γ 存在的条件下,ProT α 主要通过增加 CD54 (细胞粘附分子配体) 的

表达,刺激单核细胞与集结的肿瘤细胞结合,以上结果可能为 ProT α 作为抗肿瘤免疫治疗提供依据。

2. ProT α 与 DNA 疫苗

Shiau 等^[34] 的研究表明,ProT α 可提高非病原大肠杆菌为载体的 DNA 疫苗的功效,也可提高以沙门氏菌和霍乱菌为载体的假狂犬病口服 DNA 疫苗的免疫保护效应,说明 ProT α 对 DNA 疫苗的功能起辅助作用。利用基因重组技术将乙肝表面抗原 S 基因片段、内核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 片段和 ProT α 基因片段,构建成 DNA 质粒 pCI-S-IRES-ProT α , 并将该质粒转染成纤维细胞 NIH3T3, 结果发现不仅能检测到 S 片段 RNA 的表达,而且也能检测到其抗原,因此构建的质粒可作为 DNA 疫苗,用于免疫动物的实验^[35]。

3. ProT α 与生殖活性的新发现

过去的研究认为 ProT α 可能只存在于包括人类在内的哺乳动物中^[2,36],但 Francesco 等^[37] 在两栖动物中发现了 ProT α 。他们在青蛙的孕产期发现了 ProT α 的转录和表达,且其表达量随生殖细胞的成熟而逐步达到高峰,尤其是在初级精母细胞 (SPCs I) 和次级精母细胞 (SPCs II) 胞质中的表达量极高,这意味着 ProT α 可能参与了减数分裂过程。

综上所述,目前对于 ProT α 的研究主要集中在 ProT α 与受体之间的相互作用和 ProT α 的免疫调节机制以及参与细胞增殖过程中的分子生物学机制等。ProT α 的表达量很高,与热激蛋白 (Hsp90)、肌球蛋白轻链和核糖体蛋白等居于蛋白表达量最高基因之列^[38],且其基因型复杂,作用机理尚不清楚,因此有必要进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hooper J., et al., 1975, *Ann NY Acad Sci.*, 249: 125-144.
- [2] Alicia P., et al., 2000, *Peptides*, 21:1433-1446.
- [3] Terry W., et al., 2000, *Cancer Letters*, 155:121-127.
- [4] 郑金来等, 1998, 国外医学免疫学分册, 21(4):210-214.
- [5] Shiau A. L., et al., 2001, *Vaccine*, 19:3947-3956.
- [6] Fernando S., et al., 1999, *The Inte. Jour. Bioch. & Cell Bio.*, 31:1243-1248.
- [7] Gast K., et al., 1995, *Biochemistry*, 34:13211-13218.
- [8] Stan R L., et al., 1995, *Curr Opin Struct Biol.*, 5:

- 103 - 113.
- [9] Panneerselvam C., et al., 1987, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**:4465 - 4469.
- [10] Molinero P., et al., 2000, *Neuroimmunol.*, **103**:180 - 188.
- [11] Jose M. C., et al., 1996, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **224**:140 - 146.
- [12] Enkemann S. A., et al., 2000, *Cell Physiol.*, **182**: 256 - 268.
- [13] Calvo J. R., et al., 1989, *Gene Pharmacol.*, **20**:503 - 505.
- [14] Diaz J. C., et al., 1996, *Biochim. Biophys.*, **1296**: 219 - 227.
- [15] Karetsou Z., et al., 1998, *Nucleic Acids Res.*, **26**: 3111 - 3118.
- [16] Lukashov D. E., et al., 1999, *FEBS Lett.*, **451**:118 - 124.
- [17] Haritoo A. A., et al., 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **82**:343 - 346.
- [18] Cristina D. J., et al., 1996, *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1296**:219 - 227.
- [19] Katerina V., et al., 2000, *Experimental Cell Research*, **257**:152 - 161.
- [20] Douglas G. W., et al., 2001, *Neurobiology of Aging*, **22**:957 - 966.
- [21] Yuri P. R., et al., 1997, *FEBS Letters*, **413**:135 - 141.
- [22] Yui R., et al., 1996, *FEBS Letters*, **397**:215 - 218.
- [23] Nakielny S., et al., 1999, *Cell*, **99**:677 - 690.
- [24] Gorlich D., et al., 1994, *Cell*, **79**:767 - 778.
- [25] Enenkel C., et al., 1995, *Biol. Chem.*, **270**: 16499 - 16502.
- [26] Antonio P. E., et al., 2000, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **208**:111 - 118.
- [27] Vartapetian A. B., et al., 1988, *FEBS Lett.*, **232**:35 - 38.
- [28] Makarova T., et al., 1989, *FEBS Lett.*, **257**: 247 - 250.
- [29] Fontoura B. M. A., et al., 1992, *Cell. Biol.*, **12**: 5145 - 5151.
- [30] Vartapetian A., et al., 1997, *RNA*, **3**:1173 - 1181.
- [31] Rubtsov Y. P., et al., 1997, *FEBS Lett.*, **413**: 135 - 141.
- [32] Hidefumi S., et al., 2001, *Cancer Letters*, **168**: 191 - 195.
- [33] Eckert K., et al., 1997, *Int. J. Immunopharmac.*, **19**:493 - 500.
- [34] Shiau A. L., et al., 2001, *Vaccine*, **19**:3277 - 3284.
- [35] 臧国庆等, 2001, 上海第二医科大学学报, **21**:193 - 195.
- [36] Mark W. T., et al., 1998, *Protein expression and purification*, **13**:383 - 388.
- [37] Francesco A., et al., 2002, *Mechanisms of Development*, **110**:213 - 217.
- [38] Adams M. D., et al., 1995, *Nature*, **377**:173 - 174.

FasL-Fas: 免疫豁免还是炎症?

刘照平

(上海第二医科大学 上海市免疫学研究所 上海 200025)

摘要 FasL, 又称死亡配体, 与其受体 Fas 分子(Fas)结合, 能诱导 Fas 阳性细胞的凋亡。免疫豁免区组织中组成性表达的 FasL 被认为是介导免疫豁免的关键分子, 一些肿瘤细胞也表达 FasL, 被认为是用来逃脱免疫攻击的手段。然而, 最近大量设想利用 FasL 来诱导异体移植的耐受却得出了相反的结果, FasL 引起严重的炎症反应使得移植排斥更为迅速。这使得人们对于 FasL 在介导免疫豁免中的作用提出了异议。本文就最近几年 FasL 的研究进展, 对这些非淋巴细胞表达的 FasL 在机体维持免疫豁免及诱发炎症中的关系作一讨论。

一、Fas、FasL 的分子特征^[1]

Fas(又称 APO-1, CD95)是 I 型跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子(TNF)/神经生长因子(NGF)受体超家族, 其胞外结构域含有 3 个富含半胱氨酸的重复序列。它广泛表达于 B 细胞、活化的 T 细胞、肝细

胞和卵巢上皮细胞等多种类型细胞上。当其与相应抗体或天然配体 FasL 以三聚体形式结合后通常能诱发快速的细胞凋亡。FasL 属于 II 型细胞膜表面糖蛋白, 分子量为 40kD, 是 TNF 超家族成员, 在某