

此参与调节 B 细胞 IgG 重链亚型分化。RelB 基因剔除的小鼠不能分化产生 IgE、IgA 和 IgG1。在机体早期发育阶段,剔除 RelA 基因的小鼠胚胎因肝细胞凋亡导致死亡;剔除 I κ B α 基因的小鼠虽然胚胎发育正常,但出生后 7 天死于大面积的皮肤炎。此外, NF- κ B 激活调控的基因中还包括诸如 NCAM (neural cell adhesion molecule)、VCAM (vascular cell adhesion molecule)、MHC I、II 等因子, NF- κ B 在中枢神经系统结构可塑性(NCAM 是其主要调节因子)、风湿性关节炎(VCAM 表达是其临床指标)中也发挥了相当重要的作用。

四、NF- κ B 作为临床治疗靶目标的前景

NF- κ B 在细胞生命活动中的重要作用,使它成为许多疾病临床治疗的靶目标。纤维肉瘤细胞 HT1080 在遭受离子辐射及化疗药物柔红霉素(Daunorubicin)刺激时,如果 NF- κ B 活性提高就会增强肿瘤细胞对药物的抗性,因此,如能抑制 NF- κ B 活性,那么极低剂量的离子辐射或化疗药物就可杀死纤维肉瘤细胞 HT1060^[20]。EBV 病毒把正常 B 细胞转化为淋巴瘤细胞的过程需要 NF- κ B 的活化,通过抑制 NF- κ B 活性可诱导癌细胞凋亡,从而在 EBV 病毒引发的癌变治疗中发挥重要作用^[13]。此外,有多种早已广为使用的消炎药物也是 NF- κ B 的抑制剂,如具有广谱药理学作用的阿司匹林 Aspirin、哮喘病治疗中的常用药糖皮质激素(glucocorticoids)、抗风湿药水杨酸钠(Sodium Salicylate)等等。

目前药物合成家试图根据 NF- κ B 的调控途径,拓宽这些药物的治疗范围,用于治疗神经变性疾病^[21]。但是,这些都必须清楚地了解 NF- κ B 的作用途径及其生理功能的前提下进行。

参 考 文 献

- [1] May M J., et al., 1998, *Immunol Today*, **19**:80-88.
- [2] Jacobs M D., et al., 1998, *Cell*, **95**:749-758.
- [3] Rothwarf D M., et al., 1999, *Science's STKE*, **26**:1435-1439.
- [4] Mercurio F., et al., 1997, *Science*, **278**:860-866.
- [5] Mercurio F., et al., 1999, *Mol Cell Biol*, **19**:1526-1538.
- [6] Pando M P., et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**:21278-21286.
- [7] Turpin P., et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**:6804-6812.
- [8] Karin M., et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**:27339-27342.
- [9] Delhase M., et al., 1999, *Science*, **284**:309-313.
- [10] Stancovski I., et al., 1997, *Cell*, **91**:299-302.
- [11] Chen C., et al., 2000, *Mol Cell Biol*, **20**:2687-2695.
- [12] Hong S Y., et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**:18022-18028.
- [13] Cahir-McFarland E D., et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**:6055-6060.
- [14] Joneson T., et al., 1999, *Mol Cell Biol*, **19**:5892-5901.
- [15] Mayo M W., et al., 2000, *Reviews on Cancer Online*, **1470**:M55-M62.
- [16] Perkins N D., et al., 1997, *Science*, **275**:523-527.
- [17] Sheehy A M., et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**:8708-8716.
- [18] Sha W C., et al., 1998, *J Exp Med*, **187**:143-146.
- [19] Ponnappan U., et al., 1998, *Frontiers in Bioscience*, **3**:152-168.
- [20] Antwerp D J V., et al., 1998, *Trends in Cell Biol*, **8**:107-111.
- [21] Grilli M., et al., 1996, *Science*, **274**:1383-1385.

β -1,4-半乳糖基转移酶家族的研究进展*

吴文英 龚兴国

(浙江大学生物技术系 杭州 310027)

β -1,4-半乳糖基转移酶(β -1,4-GT)是近年来研究最多的糖基转移酶之一。它一般负责合成最常见的二糖单位:N-乙酰基乳糖胺[Gal(β 1,4)GlcNAc]。 β -1,4-半乳糖基转移酶不同于其他糖基转移酶的是它不仅存在高尔基体膜上而且整合于细胞质膜上,它也是目前已知的唯一在高尔基体上负责将半乳糖基团从 UDP-半乳糖苷转移到 N-多糖复合物的末端 N-乙酰基葡萄糖胺上的酶。受体糖 GlcNAc 可以是自由单糖,也可以是糖蛋白或糖脂的糖侧链的非还原性末端单糖。另外,在哺乳期的哺乳动物乳腺中,

它与 α -乳清蛋白结合变成“乳糖合成酶”,催化半乳糖基转移到 D-葡萄糖上的反应,专一的合成乳汁中富含的乳糖。

一、 β -1,4-GT 家族成员的基因结构

β -1,4-GT(I)两种不同的定位对应着两种不同类型的 β -1,4-GT,即细胞膜上的较长的 β -1,4-GT

* 浙江省自然科学基金(396077)及浙江大学曹光彪高科技基金资助(171026)。

(L β -1,4-GT)和高尔基体膜上的较短的 β -1,4-GT (S β -1,4-GT)。目前已经证明两类不同的 β -1,4-GT在体细胞中是由同一基因编码,定位于第9(人)、第4(鼠)和第18(牛)号染色体。三种不同种属来源的酶有90%以上的同源性,但和其他糖基转移酶同源性很少,其基因由6个外显子组成,总长约50kb,基因含两个启动子P1和P2,及两个ATG起始位点。L β -1,4-GT转录时利用第一个启动子P1和第一个ATG,S β -1,4-GT转录时利用P2和第二个ATG(图1)。

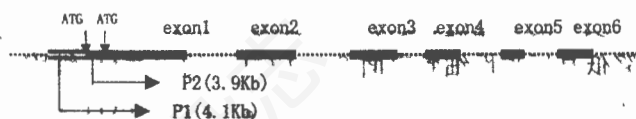


图1 β -1,4-GT的基因结构模式图

鼠的 β -1,4-GT基因在体细胞中转录两种不同的mRNA(3.9和4.1kb)。两种不同的转录起始位点被第一个外显子中约200bp隔开,即一个在阅读框内的两个ATG的前面(4.1kb),一个在两者的中间(3.9kb)。两种转录产物经剪切加工成长短不同的mRNA,再翻译出胞内氨基端相差13个氨基酸残基的L β -1,4-GT和S β -1,4-GT。牛和人^[1,2]的 β -1,4-GT基因表达产物也是这样。1997年,Shaper. N.L等在非哺乳动物鸡中克隆到非等位的 β -1,4-GT基因,两者的氨基酸的同源性为52%,两者相对

应牛的同源性分别为62%和49%。

二、 β -1,4-GT家族的蛋白分子结构

通过缺失分析和定点突变, β -1,4-GT的蛋白结构已被阐明,以牛的 β -1,4-GT氨基酸序列为例,N端区域(1-129位氨基酸)与蛋白质的膜定位有关;从130-257位的氨基酸残基包含了结合N-乙酰葡萄糖胺的结构域;C端258-402位氨基酸是结合UDP-半乳糖基的关键区域,而其中的Tyr286、Tyr311、Trp313和Trp314对于催化转移半乳糖基是必不可少的。Gastine等也已阐明了牛 β -1,4-GT催化结构域及与UDP-Gal复合物的晶体结构^[3]。

图2列出人七个同源 β -1,4-GTs的蛋白结构特征及功能。根据系统发生学分析,将其分为四个亚类; β 4Gal-T1和-T2, β 4Gal-T3和-T4, β 4Gal-T5和-T6以及 β 4Gal-T7^[4]。前六个的催化区域有四个完全保守的半胱氨酸, β 4Gal-T7则没有。 β 4Gal-T5和-T6在干区域的附近有许多公有的N糖基化位点, β 4Gal-T2至-T6的C端有一个可能的N糖基化位点。每个亚类的干区域的长度各不相同,而以 β 4Gal-T3和-T4的则最短。在保守区域(氨基酸序列WGWR REDDE) β 4Gal-T7有一个非保守置换(G/R)和一个保守置换(D/E)。主干序列内的几个残基对于 β 4Gal-T1的催化活性有非常重要的关系^[5,6],而且X光晶体衍射分析表明 β 4Gal-T1的保守基序在催化槽内,它包括供体和受体结合位点。

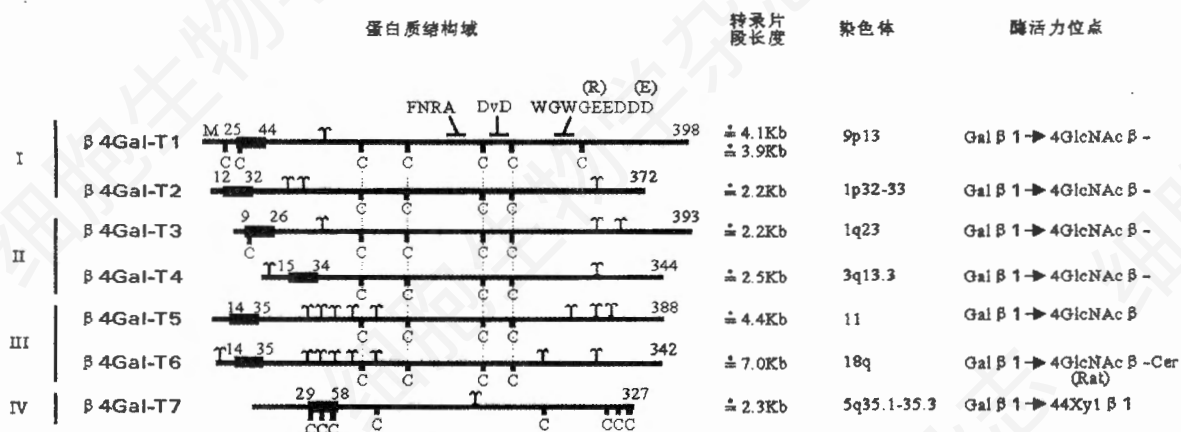


图2 人七个同源 β 1,4GTs的蛋白结构特征及功能^[7]

C:半胱氨酸;T:N-糖基化位点;—:跨膜区。

三、 β -1,4-GT的生物学功能

β -1,4-GT参与精子与卵细胞的结合是早期人

们对该酶感兴趣的重要原因。在受精时,精子首先碰到卵细胞的透明带。透明带主要由ZP1、ZP2、ZP3三种蛋白组成,其中ZP3既是精子得以黏附的

配体,又是启动顶体反应的必要因素。精子头部表面具有半乳糖基转移酶活性的膜整合蛋白即 β -1,4-GT 一直被认为是与含有大量寡糖链的 ZP3 结合,诱发顶体反应的主角。精子头部的膜整合 β -1,4-GT 专一性的结合 ZP3 上的寡糖链。美国 Texas 大学的研究人员通过实验揭示了小鼠精子中的 β -1,4-GT 是如何引发顶体反应的。与 ZP3 的结合使 β -1,4-GT 聚合,进而通过其胞质区(N端含 Arg-Phe-Arg 的 motif)将信号通过 Gi 蛋白介导的途径传入细胞,引发顶体反应。近来有人认为 β -1,4-GT 是细胞表面众多黏附分子中重要一员,参与细胞的附着与迁移;同时也可能是细胞增殖信号途径中的一个环节。

1. β -1,4-GT 参与细胞黏附和迁移

细胞表面的 β -1,4-GT 同间质中的 N-乙酰葡萄糖胺的结合是细胞与间质粘连的主要原因。Begovac 研究了间质中与 β -1,4-GT 结合的层粘连蛋白,用消化的层粘连蛋白的片段进行亲和性分析,发现了 E8 片段是最容易结合的^[8]。

而且细胞膜上的 β -1,4-GT 之胞质结构域与细胞内的骨架蛋白结合如同桥梁一般,将细胞和间质连接起来,从而影响细胞在介质上的繁殖和迁移。Evans 等把去掉催化区域的 β -1,4-GT 的 cDNA 导入 F9 胚胎瘤性细胞和 Swiss 3T3 成纤维细胞中,让它高表达。结果过量的表达产物竞争性的结合了骨架蛋白,使得细胞的黏附性大降,迁移行为也发生改变^[9]。Appeddu 在此基础上发现,细胞膜整合的 β -1,4-GT 超量时细胞的迁移率下降;过低时则使迁移率加快。因此,他认为对于正常细胞, β -1,4-GT 同骨架蛋白间的相对量有一最佳值,细胞通过调节这一相对量而改变迁移行为。

(1) 神经元细胞的迁移 根据层粘连蛋白能引导神经元细胞的生长和轴突的伸长,Begovac 考察了神经元细胞表面的 β -1,4-GT 的分布,发现它们集中在生长锥和伪足上,显然它们对于神经元的分布和形态形成起重要作用。

Hathaway 将 β -1,4-GT 的抗体显微注射进鸡胚胎的神经管部位,结果导致神经系统的胚胎发育完全受损。其机理是细胞膜上的 β -1,4-GT 通过与间质中的层粘连蛋白之 E8 区上的寡聚糖侧链结合,调节神经上皮细胞与间质的黏附能力,从而引导神经系统的形成。Huang 等也通过在 PC12 细胞中过量表达膜整合的 β -1,4-GT 加速了神经元的迁移和轴突伸长这一实验^[10],证明了 β -1,4-GT 的胞内部分有与细胞骨架结合的位点受胞外结构与配体作用

的影响,调节同骨架蛋白结合的极性,因此细胞表面 β -1,4-GT 的空间分布和神经板基部层粘连蛋白的分布影响神经元轴突的形态发生。

(2) 癌细胞的迁移 Passaniti 检测了小鼠的黑色素瘤迁移性细胞株 B16 表面的各种糖基转移酶活性,发现的活力比非迁移性细胞株提高了整整 5 倍^[11],同时 Penno 也发现肾上腺瘤细胞表面的 β -1,4-GT 活力很高,这可能是细胞迁移行为失常的原因之一。

Johnson 增加低迁移性小鼠黑色素瘤细胞表面 β -1,4-GT 的表达量, β -1,4-GT 强烈地结合细胞外基质中的寡糖链,使得细胞表现出高迁移性;相反,降低高迁移性细胞表面 β -1,4-GT 的表达量,细胞的迁移性降低,侵染能力也降低。在 β -1,4-GT 的表达量合理的生理范围内,细胞株的侵染能力与 β -1,4-GT 的表达量紧密相关。用两种干扰剂:竞争性寡糖底物和底物调节蛋白预处理过的细胞,其迁移性和侵染性都受到抑制^[12]。

由此可见, β -1,4-GT 作为细胞表面的黏附分子之一,不仅对于正常细胞的形态建成和生理行为有重要作用;对于可转移的癌变细胞而言,更有着特征性的异常现象。这样通过竞争性抑制剂抑制 β -1,4-GT 的功能或通过基因寻靶降低它在细胞表面的表达量提供抑制癌细胞迁移的一种可能的方法。研究膜整合的 β -1,4-GT 及其家族成员在正常和非正常细胞表面的结构和功能是很有意义的。

2. β -1,4-GT 与上皮细胞增殖的关系

Maillet 用干扰 β -1,4-GT 活力的 UDP-半乳糖基, α -乳清蛋白或 β -1,4GT 抗体处理 3T3 成纤维细胞和 F9 癌细胞,发现其生长受抑制,出现不正常分化,大量合成层粘连蛋白^[13];而用其他细胞表面黏附分子的抑制剂却没有这样的结果。他推断在表面黏附分子中 β -1,4-GT 对增殖信号的介导作用占据着最主要的地位。

Hinton 发现 β -1,4-GT 蛋白表达具有细胞周期特异性,而且在胞内的与细胞膜上的数量也是不同的。减少细胞膜上与骨架蛋白偶联的 β -1,4-GT 的细胞比对照组生长速度更快,而增加之则生长缓慢,可见这类 β -1,4-GT 是传递细胞增殖的负信号的。他亦发现 EGF 受体的活性同 β -1,4-GT 的数量成正比关系^[14]。

Akimotoy 用抗人 β -1,4-GT 的单克隆抗体对鸡胚中处于分化阶段的皮肤组织进行离体和活体的免疫染色,发现在角质化表皮和间质层间富含 N-乙酰

葡萄糖胺的区域里染色信号很强,其他部位相对较弱,而作为参照的高尔基体上的信号则大致相同。Asano 通过基因剔除使老鼠 β -1,4-GT 缺陷,发现虽然老鼠能正常出生,有生育能力,但都显示出生长延迟以及半致死性,上皮细胞繁殖和小肠发育显著加快,小肠绒毛分化不正常,这些说明虽然 β -1,4-GT 胚胎发育中不是必须的,同时对于出生后老鼠上皮细胞的繁殖和分化具有极其重要的作用^[15]。由此可知 β -1,4-GT 与表皮的生长分化关系密切。

3. β -1,4-GT 与细胞信号传导

Hathaway 用过量表达 L β -1,4-GT 的转基因动物来研究 β -1,4-GT 在乳腺形成过程中的作用。正如所预料的,转基因动物乳腺上皮细胞的 β -1,4-GT 活力是野生型的 2.3 倍。实验表明细胞表面的 β -1,4-GT 是乳腺细胞与细胞间质(ECM)相互作用的重要媒介。而且,干扰细胞表面的 β -1,4-GT 表达水平可抑制乳腺特异性组织基因的表达,说明 β -1,4-GT 是介导正常乳腺组织分化信号途径中的重要成分^[16]。

用 β -1,4-GT 抗体或多价 N-乙酰葡萄糖胺处理 3T3 成纤维细胞,测试酪氨酸磷酸化情况。发现两者都能引起 Paxillin 和 FAK 的 Tyr 磷酸化(1-2 秒)和去磷酸化(5-10 秒),从而导致肌动蛋白应力纤维重组。而用 β -1,4-GT 抗体 Fab 片段或单价 N-乙酰葡萄糖胺处理则无此作用。磷酸化抑制剂过钒酸钠可抑制 FAK 的磷酸化,因此过钒酸钠可抑制依赖 β -1,4-GT 的肌动蛋白应力纤维的重组。而只有细胞膜上的且与骨架蛋白偶联的 β -1,4-GT 才能引起 Tyr 磷酸化。多价 N-乙酰葡萄糖胺聚集的 β -1,4-GT 越多,则 FAK 的 Tyr 的磷酸化程度越高,去磷酸化时间延长。由此可知: β -1,4-GT 可诱使配体聚集激活的胞内信号传导,特别是 FAK 的激活所引起的应力纤维的重组^[17]。

综上所述,细胞膜上的 β -1,4-GT 能与相邻细胞表面或 ECM 上的糖苷底物的结合介导细胞-细胞和细胞-基质间的相互作用,作为胞外寡糖链配基的信号传递受体影响 FAK 途径或通过调节表皮生长因

子受体信号传导能力向胞内传递生长抑制信号。

摘 要

β -1,4-半乳糖基转移酶是近年来糖基转移酶中研究得最多的一种。随着新成员的不断发现和克隆,进一步探求其重要生物学功能已成为研究热点。目前研究结果表明该酶与受精过程,细胞黏附和转移,癌细胞转移,表皮细胞增殖及细胞信号传导等重要生物学功能密切相关。

参 考 文 献

- [1] Masri K. A., et al., 1988, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**:657-663.
- [2] Mengle G. L., et al., 1991, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**:1269-1276.
- [3] Gastine L. N., et al., 1999, *EMBO J.*, **18**:3546-3557.
- [4] Lo N. W., et al., 1998, *Glycobiology*, **8**:517-526.
- [5] Wang Y., et al., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**:701-709.
- [6] ZU H., et al., 1995, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**:362-369.
- [7] Amado D., et al., 1999, *Biochimica. Biophysica. Acta*, **1473**:35-53.
- [8] Begovac P. C., et al., 1991, *J. Cell. Biol.*, **113**:637.
- [9] Evans S. C., et al., 1993, *J. Cell. Biology*, **120**:1045-1057.
- [10] Huang Q., et al., 1995, *J. Cell. Sci.*, **108**:839-847.
- [11] Passaniti, A. and Hart, G. W., 1990, *Cancer Res*, **50**:7261-7271.
- [12] Johnson F. M. and Shur B. D., 1999, *J. Cell. Sci.*, **112**:2785-2795.
- [13] Maillet, C. D. and Shur, B. D., 1994, *J. Cell. Sci.*, **107**:1713-1724.
- [14] Hinton D. A., et al., 1995, *Experi. Cell. Res*, **219**:640-649.
- [15] Asano M., et al., 1997, *EMBO J.*, **16**:1850-1857.
- [16] Hathaway H. J. and Shur B. D., 1996, *Development* **122**:2859-2872.
- [17] Wassler M. J. and Shur B. D., 2000, *J. Cell. Sci.*, **113**:237-245.

《细胞生物学杂志》

转帐请至:

户名:中国科学院上海生命科学研究院细胞杂志

帐号:033924-00801052783

银行:农行徐汇支行枫林所

《实验生物学报》

转帐请至:

户名:中国科学院上海生命科学研究院实生学报

帐号:033924-00801052307

银行:农行徐汇支行枫林所