

钙调素与细胞增殖的调控

徐天乐 苏慧慈

(第四军医大学组胚教研室 西安, 710032)

钙调素(calmodulin, 简称 CaM) 广泛存在于真核细胞内, 是细胞内信使 Ca^{2+} 的重要受体。作为一种多功能的酶调节物, CaM 与生物体的许多生命现象有关, 包括细胞生长和细胞增殖。CaM 还通过调节 Ca^{2+} 代谢和 cAMP 代谢等, 间接影响细胞的活动。当前颇受关注的癌基因蛋白也可能受 CaM 调节^[1]。鉴于 CaM 对细胞的普遍性和核心性调节作用, 目前已对多种 CaM 依赖性过程进行了较深入的研究。尤其是 CaM 与细胞增殖的调控的研究日益受到人们的重视。真核细胞的分裂增殖是一个复杂的过程。对于细胞增殖调控的机理现在还远没有搞清楚。因此, 了解 CaM 与细胞增殖的关系, 将有助于人们认识正常细胞生长调控中 CaM 的作用及寻找肿瘤细胞生长失调的原因, 为癌症治疗提供线索。

一、CaM 与细胞增殖

CaM 是真核生物非肌性细胞中 Ca^{2+} 依赖性信息的主要介体(mediator)^[2]。长期以来, 人们已经注意到 Ca^{2+} 是细胞生长的重要调节剂。离体实验证明, 培养基中缺乏 Ca^{2+} 时, WI-38 细胞阻断于 G_1/S 期过渡上^[3]。Poenie 等报告, 海胆胚胎细胞染色体浓缩和核膜解体同 Ca^{2+} 浓度短暂升高相关^[4]。有资料表明, Ca^{2+} 和 CaM 均集中分布在有丝分裂纺锤体的极处^[5]。免疫荧光定位研究证实, 在细胞周期的不同时期, CaM 分布不同。在分裂间期, CaM 均匀地分布于细胞浆中, 主要与含肌动蛋白的微丝束结合; 而细胞进入 M 期后, CaM 浓聚在极粒和染色体之间的半纺锤体上^[5]。有人推测 CaM 在细胞分裂过程中可能从 3 个方

面发挥作用: (1) 调节纺锤体中膜性囊泡上 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性, 从而调节纺锤体内的 Ca^{2+} 浓度; (2) 调节有丝分裂装置中肌球蛋白轻链激酶(MLCK)和肌凝蛋白磷酸化, 可能为染色体的移动提供所需的能量和收缩力量; (3) Ca^{2+} 与 CaM 结合增加微管蛋白对 Ca^{2+} 的敏感性, 促进微管的解聚和染色体的移动^[6]。

在细胞周期中, CaM 的含量不是恒定的。中国仓鼠卵细胞在早 G_1 期, CaM 浓度约 $25 \text{ mg}/10^6$ 个细胞, 在晚 G_1 期, 该值增加 1 倍, 而在 S、 G_2 和 M 各期, CaM 浓度不变^[7]。You 等对小鼠红白血病细胞的研究也证实, 细胞从 G_1 期过渡到 S 期, CaM 浓度增加 1 倍^[8]。说明 CaM 在晚 G_1 期合成。线性回归分析表明, CaM 水平与 G_1 期长短以及进入 S 期细胞的百分数有直接的相关性。因此, CaM 水平对 G_1 期转化成 S 期起关键作用。另一方面, CaM 浓度变化直接影响细胞增殖。激活多种 CaM 依赖性酶所需的 Ca^{2+} 阈浓度随 CaM 浓度变化而变化^[9]。已经发现病毒、化学致癌物或激素诱发的转化细胞中, CaM 含量都增高 2—3 倍, 且 G_1 期大大缩短^[7]。

生理学和药理学研究为探讨 CaM 与细胞增殖的关系提供了许多线索。细胞内微注射 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 时, 细胞分裂中断; 但当注射 Ca^{2+} 或注射三磷酸肌醇(IP_3)引起 Ca^{2+} 从内质网释放后, 细胞分裂加快^[10,11]。在早 G_1 期加入亚致死剂量的 CaM 拮抗剂 W 13, 导致中国仓鼠卵细胞可逆地阻断于 G_1 期; 而同样剂量的 W 13 对晚 G_1 期细胞无影响^[12]。CaM 抑制剂——三氟拉嗪(TFP)对肿瘤细胞增殖有

明显的抑制作用^[13,14]。有资料表明, CaM拮抗剂和抑制剂阻断G₁/S期过渡, 以及使细胞周期中断于G₂期或M期^[12,15]。

二、CaM 基因的表达对细胞增殖的影响

CaM拮抗剂不仅结合细胞CaM, 而且能与细胞膜、细胞表面受体及蛋白激酶C结合^[2]。因此, 药理学方法研究CaM与细胞增殖的关系存在明显的局限性。近几年来, 应用分子生物学和基因分析技术研究了CaM基因的表达对细胞增殖的影响。在牛乳头状瘤病毒(BPV)转化的小鼠C127细胞中, 当鸡CaM启动子诱发小鼠CaM基因表达, 使细胞内CaM浓度升高时, 最显著的表型为细胞周期因G₁期变短而缩短。然而, BPV-C127细胞中另一种钙结合蛋白——小清蛋白(parvalbumin)的表达, 不影响同CaM升高相关的细胞增殖^[16]。提示CaM对细胞增殖的影响具有特异性。Rasmussen等用人金属硫蛋白-IIa(hMT-IIa)启动子和小鼠MT-I启动子分别诱发BPV-C127细胞CaM mRNAs和CaM反义RNA的表达。前者在使细胞中CaM增多的同时, 细胞周期缩短而增殖速度加快。后者因CaM反义RNA与CaM mRNA形成双螺旋, 使CaM mRNA翻译受阻, 细胞内CaM合成减少, 导致细胞周期阻断于G₁期、G₂期或/和有丝分裂中期^[17]。此结果提示, CaM对细胞增殖的影响并非细胞生长速度改变所致, 因为表达反义RNA的细胞合成蛋白质的速度是正常的。目前认为, CaM基因的表达是通过以下三个环节调控真核细胞增殖的: 1. 促进G₁/S期过渡; 2. 促进G₂/M期过渡; 3. 促进细胞进入有丝分裂后期(见图)^[11]。

从低等真核生物酵母菌*S. cerevisiae*和*S. pombe*及真菌*A. nidulans*中已分离出单个CaM基因。基因损坏实验证明, 健全的CaM基因是细胞存活所必需的^[1]。在*A. nidulans*中, 携CaM损坏基因的芽胞第一次细胞分裂G₂期和第二次细胞分裂早G₁期均被阻断。在

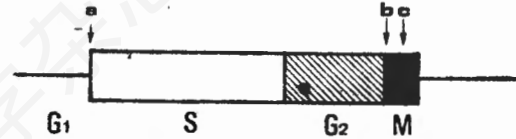


图 CaM 依赖性细胞增殖调控示意图

M: 有丝分裂期 S: DNA合成期
G₁: DNA合成前期 G₂: DNA合成后期
a: G₁/S期过渡 b: G₂/M期过渡
c: 有丝分裂中/后期过渡

*S. pombe*中也观察到, 缺乏完整的CaM基因, 细胞增殖无法实现。CaM基因缺陷还造成细胞核移位受阻。由于在某些细胞中, CaM与纺锤体的形成有关^[5]。因此, 纺锤体形成障碍或许与上述细胞核移位受阻有关。有人在*S. cerevisiae*中运用CaM基因突变模型证明, CaM对维持有丝分裂的进行至关重要; 然而, CaM不影响*S. cerevisiae*细胞从G₁期进入S期。这同在哺乳类细胞中观察到的结果不一致。由于*S. cerevisiae*细胞和哺乳类细胞周期调控存在差异, 故推测CaM对低等真核细胞和高等真核细胞周期调控的部位不同^[1]。

三、CaM 调控细胞增殖的机理

1. CaM 影响核酸代谢

细胞进入S期后, CaM水平升高; CaM拮抗剂则使细胞阻断在G₁/S期过渡上, 表明CaM可能影响DNA的合成。有作者报告, CaM与G₁/S期过渡时DNA修复有关^[18]。Roberts等认为, CaM可能参与DNA合成中复制子的失活和再激活的调节^[19]。CaM还刺激某些细胞RNA合成, 可能是Ca²⁺-CaM复合物活化核内依赖Ca²⁺的蛋白激酶, 磷酸化核内特异性非组蛋白, 导致基因组的解抑, 实现基因的选择性表达^[7]。此外, 植物细胞染色体上的NTP酶受CaM调控^[20], NTP酶活性的改变可导致核苷水平的变化, 进而影响到细胞有丝分裂能力或RNA合成过程。

2. CaM 调节Ca²⁺代谢

众所周知, Ca²⁺是细胞生长重要的调节

剂。CaM 不仅作为 Ca^{2+} 受体将 Ca^{2+} 信息传递给不同的酶, 同时也通过活化膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶来调节胞内 Ca^{2+} 浓度, 从而有效地维持胞内钙稳态^[7]。

最近, Epstein 等用转基因小鼠方法, 使 CaM 基因在小鼠胰岛 β 细胞中过度表达, 从而使细胞内 CaM 浓度升高 5 倍。有趣的是, 小鼠出生后几小时或 1—3 天内发生糖尿病。免疫组织化学显示, 转基因小鼠胰岛 β 细胞数目减少, 胰岛素分泌减少, 但 CaM 染色密度升高。他们认为, CaM 过度表达, 导致胞内游离 Ca^{2+} 水平下降, 进而抑制了 β 细胞生长发育, 是致病的主要原因^[21]。

3. CaM 调节 cAMP 代谢

许多研究证明, cAMP 生成增多和减少均影响细胞增殖^[22]。cAMP 的合成受腺苷酸环化酶(ACase)的催化, 而分解则受磷酸二酯酶(PDE)的催化。CaM 能分别激活 ACase 和 PDE 从而影响 cAMP 代谢, 使 cAMP 生成增多或减少^[7]。此外, 许多被 cAMP 依赖性蛋白激酶磷酸化的蛋白质, 包括 CaM-PDE, 其脱磷酸化受 CaM 依赖性磷酸酶——钙调神经磷酸酶(calcineurin)的催化^[23]。

4. CaM 影响细胞生长调节基因的表达

CaM 调控细胞增殖的途径之一可能是影响某些细胞生长调节基因的表达。Rasmussen 等观察了 CaM 升高对 BPV-C127 细胞周期中几种细胞周期依赖性蛋白质 mRNA 水平的影响。结果表明, 组蛋白 H₄ 和磷酸甘油醛脱氢酶 mRNA 不受 CaM 升高的影响; 而表达中间波形纤维蛋白(Vimentin)和微丝肌动蛋白(β -Actin)的两种细胞生长调节基因的 mRNA 水平, 因 CaM 升高而增加 2—3 倍; 癌基因 c-myc 的 mRNA 水平也增加^[1]。据认为, c-myc 与控制细胞生长及启动 DNA 合成有关^[24]。有资料表明, c-myc 的表达有赖于另一种癌基因 c-fos 基因的表达^[25]。c-fos 和 c-myc 的表达均受胞内 Ca^{2+} 水平的影响, 并且 CaM 拮抗剂可以抑制 c-fos 基因表达^[26]。CaM 可能在

细胞周期 G₀—G₁—S 期各环节调节 c-fos 和 c-myc 的基因表达与功能^[1]。

5. CaM 影响微管的稳定性

Crossin 等观察到微管解聚药物促进培养细胞的 DNA 合成, 而微管稳定剂 Taxol 则抑制上述药物的效应^[27]。已知 CaM 可通过翻转机制(flip-flop)调节微管解聚, 即在 Ca^{2+} 存在下, CaM 与微管 Tau 因子竞争结合, 抑制微管聚合^[18]。因此, CaM 对细胞骨架的动态调节可能与细胞进入 S 期有重要关系。

众所周知, 有丝分裂纺锤体微管的装配/去装配过程决定染色体向两极移动。实验证明, Ca^{2+} -CaM 对微管装配/去装配均有影响^[1]。因此, 在细胞 M 期 CaM 可能影响微管的稳定性。一方面, CaM 减少微管解聚所需的 Ca^{2+} 浓度^[28]; 另一方面, CaM 参与某些有丝分裂相关蛋白的磷酸化作用。已经证明, 微管蛋白、微管伴随蛋白以及新近阐明的 62 kD 蛋白质, 分别是 CaM 依赖性蛋白激酶的底物^[29]。在体研究揭示, 62 kD 蛋白质的磷酸化仅发生在 M 期, 似乎与纺锤体微管解聚有关^[29]。可以相信, CaM 能通过磷酸化某些关键性蛋白质, 影响微管的稳定性, 从而实现细胞有丝分裂的调控。

6. CaM 影响促有丝分裂因子的活性

近年来研究细胞周期时发现了多种与细胞周期调控有关的因子。如细胞周期调节蛋白(cyclin)、促有丝分裂因子(mitosis promoting factor, MPF)等。MPF 能诱导细胞染色体浓缩和核膜解体, 促进细胞分裂。在胚胎时期, 它受抑制细胞因子(cytostatic factor, CSF)抑制。CSF 可能是一种细胞周期调节蛋白, 在间期合成, 而于有丝分裂后期迅速通过磷酸化降解^[30]。目前还不清楚 CSF 是不是 CaM 依赖性蛋白激酶的底物。但是向受精卵内注射 CSF, 细胞分裂即停滞在分裂中期, 此过程需要 Ca^{2+} -CaM 参与^[31]。

越来越多的证据表明, 蛋白质磷酸化是细胞增殖调控的中心环节^[1]。已经证明, 酵母中

两种细胞周期调节因子 cdc 28 和 cdc 2 是蛋白激酶^[82,83]。cdc 2/cdc 28 存在于从酵母到人各类真核细胞中。近来发现, cdc 2/cdc 28 是 MPF 的主要亚基^[34]。Mendenhall 等报告, ACase 间接调节 cdc 28 的活性, cdc 28/cdc 2/MPF 可能是 cAMP 信号通路的“下游”(downstream)成分^[36]。鉴于 CaM 能分别增加或减少细胞 cAMP 水平, 因此通过 cAMP 途径可能是 CaM 调节 MPF 活性的另一种方式。

四、结 束 语

细胞增殖是多因子参加的, 由多步调控的复杂的生命过程。大量事实表明, Ca^{2+} -CaM 参与了细胞增殖的部分调控, 包括 ① 启动 DNA 合成, 促进 G_1/S 期过渡; ② 诱导核膜解体, 促进 G_2/M 期过渡; ③ 参与染色体移动, 促进细胞进入有丝分裂后期。 Ca^{2+} -CaM 调控细胞增殖的详细机理仍有待探索。

由于 CaM 本身不具酶活性, 其发挥生物学效应的关键在于它能够和 CaM 结合蛋白 (CaMBP) 结合, 从而引起 CaMBP 生物学活性的改变。因此研究 CaMBP, 尤其是研究与细胞周期中蛋白质的磷酸化和去磷酸化有重要关系的 CaM-蛋白激酶 II 和钙调神经磷酸酶, 也有助于揭示 CaM 与细胞增殖调控的关系。

摘 要

CaM 是 Ca^{2+} 的重要受体。大量事实表明, Ca^{2+} -CaM 参与了细胞增殖的部分调控。其调控机理较复杂, 主要通过以下 3 个环节实现: 即促进 G_1/S 期过渡、 G_2/M 期过渡和促进细胞进入有丝分裂后期。研究 CaM 对细胞增殖的调控具有重要的理论和实际意义。

参 考 文 献

- [1] Rasmussen, C. D. and A. R. Means, 1989, Trends Neurosci., 12: 433—438.
 [2] Means, A. R., 1988, Prog. Horm. Res., 44: 223—262.
 [3] Tupper, J. T., et al., 1980, J. Cell Physiol., 104: 97—103.

- [4] Poenie, M., et al., 1985, Nature, 315: 147—149.
 [5] Welsh, M. J., et al., 1978, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75: 1867—1871.
 [6] 李俊成, 1984, 国外医学生理、病理学分册, 4(2): 79—81.
 [7] 徐友涵, 1985, 生物化学与生物物理进展, 1: 22—27.
 [8] You Jinsong, et al., 1990, Cell Res., 1: 89—94.
 [9] Olwin, B. B. and D. R. Storm, 1985, Biochemistry, 24: 8081—8086.
 [10] Steinhardt, R. A. and J. Alderton, 1988, Nature, 332: 364—366.
 [11] Twigg, J., et al., 1988, Nature, 332: 366—369.
 [12] Chafouleas, J. G. et al., 1982, Cell, 28: 41—50.
 [13] 赵雅丽等, 1988, 实验生物学报, 21(4): 481—487.
 [14] 赵雅丽等, 1991, 生物化学与生物物理进展, 18(2): 118—122.
 [15] Eilam Y. and D. Chernichovsky, 1988, J. Gen. Microbiol., 134: 1063—1069.
 [16] Rasmussen, C. D. and A. R. Means, 1989, Mol. Endocrinol., 3: 588—596.
 [17] Rasmussen, C. D. and A. R. Means, 1989, EMBO J., 8: 73—82.
 [18] Rosenthal, S. A. and W. N. Hait, 1988, Yale J. Biol. Med., 61: 39—49.
 [19] Roberts, J. M. and H. Weintraub, 1986, Cell, 46: 741—752.
 [20] Chen Y. R. et al. 1987, J. Biol Chem. 262: 10689—10694.
 [21] Epstein, P. N., et al., 1989, Cell, 58: 1067—1073.
 [22] Dumout, J. E., et al., 1989, TIBS, 14: 67—71.
 [23] Klee, C. B., et al., 1988, in Calcium Signal and Cell Response ed. by Yagi K. and T. Miyazaki, pp 75—84, Japan Scientific Society Press and Springer-Verlag
 [24] Iguchi-Ariga, S. M. M., et al., 1987, EMBO J. 6: 2365—2371.
 [25] Muller, R., et al. 1984, Nature, 312: 716—720.
 [26] Morgan, J. I. and T. Curran, 1986, Nature, 322: 552—555.
 [27] Crossin, K. L. and D. H. Carney, 1981, Cell, 23: 61—71.
 [28] Marcum, J. M., et al., 1978, Proc. Natl

- Acad. Sci. USA, 75: 3771—3775.
- [29] Dinsmore, J. H. and R. D. Sloboda, 1988, *Cell*, 53: 769—780.
- [30] Pines, J. and T. Hunt, 1987, *EMBO J.* 6: 2987—2995.
- [31] Newport, J. W. and M. W. Kirschner, 1984, *Cell*, 37: 731—742.
- [32] Reed, S. I. et al., 1985, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 82: 4055—4059.
- [33] Simanis, V. and P. Nurse, 1986, *Cell*, 45: 261—268.
- [34] Draetta, G., et al. 1989, *Cell*, 56: 829—838.
- [35] Mendenhall, M. D. et al., 1987, *Cell*, 50: 929—935.

胸腺 B 细胞的研究

于士广 丛英姿

(山东大学生物学系 济南, 250100)

鸟类法氏囊, 哺乳动物的胚肝、骨髓是人们公认的 B 淋巴细胞中央淋巴器官。而胸腺是 T 淋巴细胞分化的中央淋巴器官, 由胚肝、骨髓来源的前体 T 细胞在此分化成熟为 T 细胞。近年来发现在胸腺内也存在少量 Ig^+B 细胞^[1], 特别是患有自身免疫疾病如重症肌无力(MG)、系统红斑狼疮(SLE)病人的胸腺内存在 B 淋巴滤泡和大量的浆细胞^[2,3]。在一系列自身免疫小鼠如(NZB×NZH) F_1 、MRL/Mp-lpr(MRL/lpr)和 BXSB 等也观察到类似现象。因此, 学术界对胸腺 B 细胞的表型、发生、功能等产生了极大的兴趣, 结合现代细胞分离技术和免疫酶标检测手段, 对胸腺 B 细胞进行了深入研究。本文报道了近几年来对胸腺 B 细胞的研究。

胸腺 B 细胞的表型

Miyama-Inaba 等采用 65% Percoll 密度梯度离心, 收集介质与 Percoll 溶液界面之间低浮力密度胸腺细胞, 再经抗-Thy-1.2, CD 4, CD 8 加补体杀死 T 细胞, 即可获得富含胸腺 B 细胞的类群(也叫低浮力密度胸腺细胞), 约占全部胸腺细胞总数的 1% 左右。

从正常小鼠胸腺分离纯化的 B 细胞, 其中膜表面 Ig 阳性(sJ^+g)细胞占低浮力密度胸腺细

胞总数的 3—90%。免疫酶标检测表明, 大多数胸腺 B 细胞表达 $CD5^+$ 表面抗原, 而脾脏 B 细胞为 $CD5^-$ 用抗-CD 5 单抗加补体能够杀死胸腺 B 细胞, 抗-Thy-1.2, CD 4, CD 8 等抗 T 细胞抗体加补体则对胸腺 B 细胞不产生毒害作用。尽管胸腺 B 细胞和脾脏 B 细胞都有 sIg, 但多数胸腺 B 细胞较弱地表达 B 220、Ia 表面抗原, 相对较多表达 Mac-1 (CD 11 b) 和 $CD5^{[4]}$, 与腹腔 $CD 5^+$ B 细胞特性相似^[5], 而脾脏 B 细胞的表型为 $CD5^-$ 、 $CD 11 b^-$, 对 C 57 BL/6 小鼠、年幼的 NZB 小鼠胸腺 B 细胞的研究也得到相似的实验结果。

近年来对人类 MG 患者胸腺 B 细胞的研究报道较多。MG 患者低浮力密度胸腺 B 细胞占全部胸腺细胞总数的 $0.83 \pm 0.15\%$ ^[6]。Lepri-ncce 等对 MG 患者胸腺进行免疫荧光分析, 发现胸腺内具有生发中心, $IgM^+ IgD^+$ 双阳性细胞位于生发中心边缘, 处于分化过程中的 $IgM^+ IgD^-$ 细胞则位于生发中心中央。CD 21 单抗(抗 CR 2)能使大多数生发中心着色, 中央部位染色最深。这表明 B 细胞活化过程, 促进了 CD 21 的表达。进一步分析低浮力密度胸腺 B 细胞的表型, 结果有 $63 \pm 4\%$ $CD 19^+$ 细胞, $8 \pm 2\%$ $CD 35^+$ 细胞, 并有一部分胸腺 B 细胞表达 CD 71 和 4F 2 表面抗原。用 B 8.7,