

白血病抑制因子

孙红 施渭康

(中国科学院上海细胞生物学研究所 200031)

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是一类具有广泛生物学功能的细胞因子。60年代末,人们发现一种能诱导M1白血病细胞系分化为正常细胞的分化诱导因子,被称为D-因子^[1]。但由于当时研究条件限制,未能对这种因子的生理和生化特性有更多的了解。1984年, Tomida等人从小鼠成纤维细胞株L929细胞^[2]和小鼠Ehrlich腹水瘤细胞^[3]条件培养液中分别提取出能诱导M1细胞分化的D-因子。1988年, Hilton等人从小鼠Krebs II腹水瘤细胞的条件培养液中分离到白血病抑制因子(LIF)^[4,5],证明就是D-因子。在同一时期,测定了LIF的氨基酸顺序^[6],获得了小鼠^[7]和人^[8]的LIF cDNA。另外,一些早已发现的因子诸如胆碱能神经元分化因子(CDNF)、肝细胞刺激因子(HSF)、人白介素分化因子(HILDA)和黑素细胞脂蛋白脂酶抑制因子(MLPL1)等,尽管它们的分子量和生物学功能各不相同,但通过氨基酸或核酸序列分析也被证明为LIF。近年来,对LIF在体内外的生理功能、基因表达调控、受体结合等生物学活性都有了更深的了解。本文仅就LIF的基因和蛋白结构、体内外生理功能、受体结合等几个方面回顾近年来这一领域中的进展。

一、基因和蛋白^[9]

LIF基因是单拷贝基因,在人和小鼠中分别位于第22条和第11条染色体上,也有报道位于小鼠第13条染色体上。完整的LIF基因由3个外显子和2个内含子组成。其中,外显子I编码5'端非翻译区及疏水信号肽的前6个氨基酸残基;外显子II编码余下的信号肽残基和成熟LIF蛋白的前44个氨基酸残基;其

他136个残基和3'端非翻译区则由外显子III编码。比较人、小鼠、羊和猪等四种不同哺乳动物的LIF基因,可以发现外显子的顺序高度保守,而内含子和两端侧翼顺序的保守性则较弱。

LIF基因5'端大约300bp的区域对LIF基因表达调控非常重要。在这段区域里有四个高度保守的TATA样片段。利用S1核酸酶保护法,发现LIF基因有两个转录起始位点:一个位于翻译起始位点上游-60--64bp处,前方紧接TATA box(TATATAAT);另外一个则位于翻译起始位点上游-160bp处,前方也同样有一个TATA样片段(GATAATTT)。在翻译起始位点上游的-249--360bp处有一段潜在的负调节子;而在上游-600--860bp处则有一个LIF基因的增强子。

由于LIF基因的转录起始位点不同,经过不同的剪接过程,在小鼠体内存在着两种不同的LIF mRNA分子。主要区别在外显子I上,形成两个带有不同信号肽的LIF蛋白。这种信号肽氨基酸残基的差异,决定了两种分子分泌到细胞外的不同命运。其一以可溶的形式存在于细胞间液中,随体液循环而扩散(D型);另一个形式则附着在细胞外基质上,成为外基质的组成部分(M型)(见图)。

成熟的LIF蛋白是一种高度糖基化的分泌型蛋白。由于糖基化程度不同,分子量也从38kD到67kD不等。去糖基化的LIF核心蛋白分子量约20kD(~180个氨基酸),这同从cDNA推导出的核心肽的分子量相符。比较人、大鼠、小鼠,羊和猪等五种不同哺乳动物的LIF蛋白,其氨基酸组成是高度保守的。在小鼠LIF中发现的6个半胱氨酸残基在其他

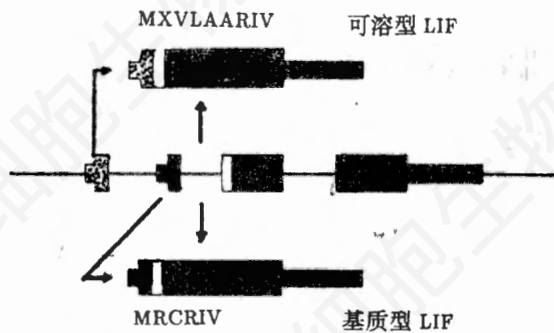


图 小鼠 LIF 基因两种转录本(引自 Polyfunctional cytokines IL-6 and LIF P₂₆)

四种动物中也都存在, 这表明分子内部二硫键对维持 LIF 分子结构和活性的重要性。同时, 分子中七个糖基化位点有六个也是高度保守的。

二、体外生理功能

1. LIF 和造血系统^[10-12]

LIF 在造血系统中的生理功能非常复杂。对于造血系统中的一些肿瘤细胞, LIF 通常显示出生长抑制效应, 同时诱导或协同诱导肿瘤细胞分化。已发现 LIF 能单独抑制小鼠白血病 M1 细胞的增殖, 并诱导出巨噬细胞表型, 如表达 Fc 受体, 具有吞噬能力或产生溶菌酶。在与粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、白细胞介素-6(IL-6)等细胞因子的协同作用下, LIF 能够抑制人白血病细胞株 HL-60 和 U937 细胞的生长, 并诱导这些细胞分化。但是, LIF 也能协同 IL-3 促进小鼠白血病细胞株 DA-1 细胞的增殖。单独 LIF 作用不能促使任何正常造血细胞的集落形成。但与 IL-3 协同作用时, 能刺激巨核细胞的集落形成, 同时促进造血干细胞进入细胞周期。最近发现, LIF 能够促进逆转录病毒对造血干细胞的感染作用。由于逆转录病毒感染需要依靠细胞分裂, 很可能 LIF 通过促进造血干细胞进入细胞周期的途径从而增强了逆转录病毒对造血干细胞的感染能力。

2. LIF 和小鼠胚胎发育^[13]

LIF 另一个重要功能是抑制小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, 简称 ES 细胞)的分化。将小鼠胚泡内细胞团细胞进行培养, 可以获得具有正常核型的 ES 细胞系。这种细胞具有完全的发育潜能, 在一定的化学物质诱导下能分化形成三种胚层的多种类型细胞; 在注入囊胚后可以参与胚胎各种器官, 包括生殖腺的发育, 形成嵌合体小鼠。但是, ES 细胞在体外培养极易分化。早期工作曾将 ES 细胞与饲养层细胞共培养, 以维持其发育多能性。1987 年, 在大鼠肝(BRL)细胞条件培养液中发现一种可溶性分化抑制因子(DIA), 几乎能完全抑制 ES 细胞的分化, 随后证明这种因子就是 LIF。最近已有人用重组 LIF 完全代替饲养层或 BRL 条件培养液, 成功地分离并建立了 ES 细胞系, 直接证明了 LIF 抑制 ES 细胞分化的作用。

1992 年, 有研究报告指出在胚胎着床前后的小鼠子宫内膜腺细胞大量表达 LIF 基因, 同时用 PCR 方法检测到着床前囊胚中也有 LIF 基因表达。最近, 我们实验室用整体杂交法也已发现, 从受精卵到囊胚的各期胚胎中都有 LIF 基因表达, 但囊胚期胚胎的表达水平最高(待发表)。这提示 LIF 很可能与小鼠胚胎早期发育和着床有着密切关系。通过转基因小鼠的研究, 发现胚胎不能在不表达 LIF 基因的小鼠子宫内着床(详见下文体内功能)^[21], 进一步表明 LIF 在着床过程中有着重要作用。

3. LIF 和骨的重吸收^[14]

1986 年, Abe 等人发现在用有丝分裂原处理的脾脏细胞条件培养液中含有一种既能诱导 M1 细胞分化, 又能刺激骨的重吸收的因子(67 kD), 经纯化后证明就是 LIF。重组 LIF 也能促进骨的重吸收。进一步研究发现, 在破骨细胞表面不表达 LIF 的高亲和力受体, 而在成骨细胞的细胞膜上有 LIF 的高亲和力受体。LIF 促进骨的重吸收作用的同时, 对前列腺素生物合成酶的抑制剂消炎痛(indomethacin)也很敏感,

这提示 LIF 促进破骨细胞对骨的重吸收作用很可能是通过成骨细胞合成前列腺素介导的。

4. LIF 与急性期 (Acute Phase) 反应^[15]

急性期反应是机体一些组织针对诸如外来感染、损伤等不利影响下形成,在进化上属高度保守的一种防卫性反应。它包括在肝脏产生一系列急性期蛋白,如 α -抗胰蛋白酶、纤维蛋白元等等。这个过程受到许多激素和细胞因子的调控。研究培养在人结肠癌细胞 COLO-16 条件培养液中的人肝脏细胞株 Hep-G 2 细胞急性期蛋白的合成,发现有三种不同的糖蛋白参与反应,分别称为肝细胞刺激因子 (HSF) I、II 和 III。研究表明,HSF-III 蛋白在功能、生化特性、抗原性和受体结合等方面都和 LIF 没有明显差别。在大鼠体内注入内毒素时,血清中 LIF 浓度明显升高,肝细胞膜表面存在着高亲和力 LIF 受体,这些发现都表明 LIF 在肝脏的急性期反应中起着重要作用。

5. LIF 和神经递质表型^[16]

70 年代末,发现从新生大鼠背根神经节分离出来的神经元培养在心肌细胞条件培养液中,神经递质的表型会由肾上腺素能型转变为胆碱能型。最近,从新生大鼠心肌细胞的条件培养液中分离出一种蛋白质因子,称为胆碱能神经元分化因子。经蛋白测序后证实这种因子为 LIF。表明 LIF 与神经递质表型的转变也有密切的关系。

6. LIF 和成肌细胞生长^[17]

体外的成肌细胞生长很缓慢,且容易分化。原代培养人和小鼠的肌细胞时,加入低浓度 LIF,却能明显地刺激成肌细胞的生长。同时也发现,这些细胞的细胞膜上都存在着 LIF 受体。

7. LIF 和脂肪代谢^[18]

从恶性黑色素瘤患者分离得到的 SEK I 细胞,种入裸鼠中会引起相应的恶性疾病,导致小鼠体重急剧下降。Mori 等人发现 SEK I 细胞分泌一种能抑制脂蛋白脂酶活性的蛋白质,阻碍 3T3-L1 脂肪细胞对游离脂肪酸的

摄取。氨基酸测序后证明这种蛋白质与 LIF 有很大同源性。在黑色素瘤患病小鼠的血清中也可检测到 LIF。认为 LIF 通过抑制脂蛋白脂酶活性,参与脂肪代谢,阻碍脂肪合成。患病小鼠脂肪不断被消耗,因而体重下降。

三、体内生理功能

目前研究 LIF 在体内生理功能的主要途径是提高或降低体内 LIF 蛋白的水平,然后观察小鼠的各种生理状态。

提高体内 LIF 水平有两种方法:一个是利用逆转录病毒构建 LIF 的高表达载体,然后将这种载体导入一株非白血病造血细胞株 FDC-PI 细胞,并将这种细胞植入小鼠体内^[19]。这种细胞在体内不断繁殖,结果在骨髓、脾脏、胸腺、肠系膜淋巴结等处,观察到持续并大量地表达和分泌 LIF,每只小鼠含量达到 0.1—1.0 毫克/天。几天后小鼠产生反应,由于皮下和腹部的脂肪被消耗,而使体重急剧下降。同时小鼠也表现出一些急性期反应的典型症状:毛发耸立,性情暴躁,体内红白血球沉降速度增加,白蛋白水平下降,巨核母细胞、巨核细胞和血小板等数量均有升高;代谢调节障碍;新骨沉积;骨髓造血能力下降;胸腺萎缩;精子发生和黄体形成调节障碍等等。另外一种提高体内 LIF 水平的方法是将 LIF 蛋白直接注射入小鼠腹腔内^[20],得到的结果与前一种方法的基本相似:如体重下降,呈现急性期反应等等。但与前一方法不同的是高剂量 LIF 蛋白可以促使胸腺萎缩,而低剂量却没有明显的胸腺萎缩现象。

降低体内 LIF 水平,目前主要采用同源重组技术将失活的 LIF 基因与 ES 细胞染色体上内源 LIF 基因的位点进行重组和交换,然后用这种不表达 LIF 基因的 ES 细胞去产生嵌合体小鼠,进而得到含有失活 LIF 基因的纯合子型转基因小鼠。这种缺乏 LIF 基因活性的小鼠可以存活并发育至成体,但不能生育,因为胚胎在缺乏 LIF 基因活性的小鼠的子宫内不能着床。

如果将这些胚胎移植入野生型假孕鼠的子宫内,则胚胎能够着床并发育至成体。令人感兴趣的是野生型小鼠胚胎在缺乏LIF基因活性的小鼠子宫内也不能着床。但如果在子宫内注入外源LIF蛋白,则有部分胚胎能够着床。这些结果表明,母体子宫内膜是否表达LIF基因对胚胎着床起着至关重要的作用^[21]。

四、LIF受体

LIF受体广泛地存在于所有效应细胞的细胞膜上^[22]。脂肪细胞、肝细胞、成骨细胞、神经细胞、胚胎癌(EC)细胞及ES细胞、M1细胞等都表达高亲和力的LIF受体($K_D = 20-100 \text{ pM}$),而有些细胞如激活的巨噬细胞膜上则同时表达高亲和力和低亲和力受体($K_D = 1-2 \text{ nM}$)。有实验表明,从仅有高亲和力受体的细胞膜上分离受体时,有40—60%的高亲和力受体会转变为低亲和力受体,从而可以得到高、低亲和力两种受体。但若受体分离时用去污剂处理膜,则只能得到低亲和力受体。这些现象提示高亲和力受体很可能是由低亲和力受体至少结合1个以上的亚基组成。这种现象在其他许多细胞因子,如GM-CSF、IL-6、IL-3等受体中也存在^[23]。

1991年底,克隆了LIF受体的主要亚基并证实是LIF的低亲和力受体(LIF-R α 链)^[24]。这条受体链的细胞膜外部分含有2个促红细胞生成素受体结构域和一个层粘蛋白结构域,这与IL-6受体的信号传递亚基gp130非常相似。LIF-R α 亚基结合gp130,就会由低亲和力受体转变为高亲和力受体。gp130虽具有改变LIF-R α 亲和力的能力,但并不是唯一的LIF-R α 亚基^[9]。第一:在COS细胞中,LIF-R α 与gp130的复合物对LIF的亲合力不如内源性受体的高;第二:在LIF-R α /gp130共转染细胞中,虽然IL-6能竞争抑制LIF的高亲和力受体,但LIF低亲和力受体的数目并没有相应提高;第三:在M1细胞中,IL-6对LIF和受体的亲和力没有竞争抑制作用。

近年来发现一种新的细胞因子, Oncosta-

tin M。这种因子在基因和蛋白结构上与LIF很接近。受体研究表明,这种因子能与LIF的高亲和力受体结合,但不能结合LIF的低亲和力受体。同时, Oncostatin M也有自己的高亲和力和低亲和力受体,但LIF不能结合这些受体^[25]。

关于LIF及其他一些细胞因子受体的研究是当前研究的一个热点。有人认为存在着一个细胞因子受体超家族,包括LIF、IL-2、3、4、5、6、7、G-CSF、GM-CSF、生长激素、催乳激素、红细胞生成素等的受体。这些受体的亚基之间有一定联系,反映出受体超家族的存在与细胞因子的功能重叠性有很大关系。

六、结束语

LIF是一类在体内、外具有广泛生物学功能的细胞因子。它在体外具有诱导M1细胞向正常细胞分化、抑制ES细胞分化、促进骨的重吸收、参与急性期反应、改变神经递质类型、调节脂肪代谢等多种重要功能。在体内LIF能参与机体应激反应和代谢调节,并影响胚胎着床。目前关于LIF的研究报道层出不穷,虽然对于LIF分子结构和生理功能有了一些认识,但其在体内、外行使各种生物学功能的机理及其调控则知之甚少。由于LIF注入体内能刺激血小板水平升高,注入子宫能增加胚胎着床的机会,因而在生物医学的基础研究及临床治疗和应用都有令人乐观的前景。

参 考 文 献

- [1] Ichikawa, Y. et al., 1969, *J. Cell. Physiol.*, 74: 223—234.
- [2] Tomida, M. et al., 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 10978—10982.
- [3] Tomida, M. et al., 1984, *FEBS Lett.*, 178: 291—296.
- [4] Hilton, D. J. et al., 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 9238—9243.
- [5] Hilton, D. J. et al., 1988, *Leukemia*, 2: 216—221.
- [6] Simpson, R. J. et al., 1988, *Eur. J. Bio-*

- chem.*, 175: 541—547.
- [7] Gearing, D. P. et al., 1987, *EMBO, J.*, 6: 3995—4002.
- [8] Gough, N. M. et al., 1988, *PNAS*, 85: 2623—2627.
- [9] Gough, N. M., 1992, *Growth Factor*, 7: 175—179.
- [10] Hilton, D. J. and Gough, N. M., 1991, *J. Cell. Biochem.*, 46: 21—26.
- [11] Gearing, D. P., 1991, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 628: 9—18.
- [12] Metcalf, D., 1992, *Growth Factor*, 7: 169—173.
- [13] Smith, A. G. et al., 1992, *Dev. Biol.*, 151: 339—351.
- [14] Abe, E. et al., 1986, *PNAS*, 83: 5958—5962.
- [15] Baumann, H. and G. G. Wong, 1989, *J. Immunol.*, 143: 1163—1167.
- [16] Yamamori, T. et al., 1989, *Science*, 246: 1412—1416.
- [17] Austin, L. et al., 1991, *J. Neurol. Sci.*, 101: 193—197.
- [18] Mori, M. et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160: 1085—1092.
- [19] Metcalf, D. et al., 1989, *PNAS*, 86: 5948—5952.
- [20] Metcalf, D. et al., 1990, *Blood*, 76: 50—56.
- [21] Stewart, C. L. et al., 1992, *Nature*, 359: 76—79.
- [22] Hilton, D. J. et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 10238—10247.
- [23] Nicola, N. A., 1991, *Cell*, 67: 1—4.
- [24] Gearing, D. P., 1991, *EMBO, J.*, 10: 2839—2848.
- [25] Gearing, D. P., 1992, *New Biologist*, 4: 61—65.

p 53 与 细胞 周期 调 控

方 敏 薛绍白

(北京师范大学生物系 100875)

p 53 蛋白首先在 SV-40 转染的小鼠细胞中发现, 继之在不同类型的转化细胞系中也被检测到^[1]。进一步研究证明它还存在于正常细胞和组织中, 但与转化细胞相比其含量要低得多^[2]。

1988 年 Levine 和 Oren 等报道了第一个被鉴定的 p 53 突变型 p 53 Vall 35^[3]。以后, 人们在转化细胞中检测到各种类型的 p 53 突变型。为了有效地研究 p 53 蛋白, 已发展了很多识别 p 53 蛋白的单克隆抗体, 其中有的具有种属特异性, 有的则识别某一类突变型 p 53 蛋白。图 1 显示了小鼠 p 53 蛋白抗原决定簇的分布。目前已对 p 53 的失活机理提出了相对完善的模型(图 2), 对 p 53 的生物学功能虽还存在很多疑问, 但 p 53 对细胞周期的调控则已成为 p 53 生物学功能中的一个核心问题。

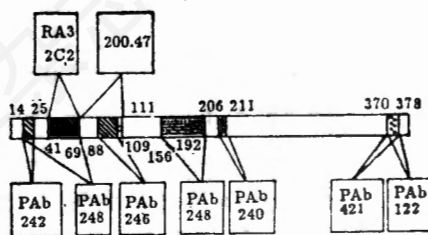


图 1 小鼠 p 53 的抗原决定簇图谱 (引自 Montenarh, M., 1992, *Critical Reviews in Oncogenesis*, 3:237)

一、p 53 蛋白——细胞周期的监控因子

1. p 53 参与细胞周期调控

1980 年 Milner 等首先报道伴刀豆球蛋白 A (Con A) 刺激胸腺淋巴细胞增殖后, p 53 基