

上皮细胞生长因子受体的性质

上皮细胞生长因子(EGF)刺激细胞增殖的能力是由高亲和力的配体结合至细胞表面特异的受体所介导的。有关这种生长因子和受体相互作用的生物化学和细胞学方面的知识业已取得相当的进展,而且EGF系统为研究其它促有丝分裂剂充当了很好的模型。对生长因子的机制和转化基因产物特性的综合研究,已使生长调节的生物学研究成为一个共同关心的课题。

一、EGF受体的结构

经SDS凝胶电泳测定,EGF受体是分子量为170,000道尔登的膜蛋白。这是一种糖蛋白,由分子量130,000道尔登的蛋白质和相当数量的以N连接的糖链组成。除了糖基化作用外,在体内EGF受体属翻译后再修饰的,即在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上进行磷酸化。酪氨酸的磷酸化看来是受体在内在蛋白激酶的作用下自身磷酸化的结果,而丝氨酸和苏氨酸的磷酸化可能由其它蛋白介导,诸如蛋白激酶C和依赖cAMP的蛋白激酶的催化亚单位。激酶C系统可能与生理功能有关,如强烈致癌的大戟二萜醇酯(TPA)能激活这种蛋白激酶,TPA加到完整的细胞中能增加EGF受体的磷酸化,有时还降低受体对¹²⁵I-EGF的亲中性。

最近从EGF受体分离的几个多肽的部分序列分析显示出它们与鸟成红细胞增多病病毒的V-erbB转化蛋白的序列有高度同源性。根据EGF受体结构与V-erbB结构的同源性和相互关系,似乎受体有60,000道尔登的胞质区段,一小段跨膜区段以及一大段V-erbB蛋白所没有的约100,000道尔登的外在区段。将与胞质相连的酪氨酸激酶,即与V-erbB相关的区段加热,使其失活,并不影响细胞外区段结合配体的能力。因此,这两个区段可能在蛋白质高级结构方面是独立折叠而成的。

二、EGF受体基因定位

人的EGF受体基因在染色体图谱上位于染色体7的P13-q22区。A-431上皮样癌细胞因能产生数目极多的EGF受体,成为生化研究极为有用的材料。染色体分析表明这些细胞含有两条染色体7的拷贝,并至

少含有两个重排基因,即染色体7的p22-qter区与其他尚未确定的基因。所以从EGF受体基因角度看A-431细胞是四倍体。令人感兴趣的是染色体7的M4易位似乎肩负着这些细胞产生大量受体的责任。

三、受体的功能

1. 配体结合

受体与EGF结合是高亲和性的(表观常数 $K_D \approx 10^{-9}$ 至 10^{-10})和专一性的。至今所知道它的配体只有完整的EGF以及竞争这一位点的某些EGF衍生物。然而,似乎 α -转化生长因子(TGF)能占有高亲和性的EGF结合位点。在体外,各种转化生长因子制剂能诱导非转化细胞非贴壁生长。这种因子有两条肽链,即 α TGF(或TGF-I)和 β TGF。 α TGF和 β TGF对这种因子的生物活性都是必需的。虽然,在放射免疫检测中 α 肽链并不与¹²⁵I-EGF竞争,但是在放射受体检测中却与¹²⁵I-EGF竞争。序列分析表明它与EGF有相当的同源性。显然,对TGF活性来说,当EGF受体为 α TGF或EGF所占据并在 β TGF存在时(推测结合到不同的受体),TGF才有活性,当阻断抗体结合到EGF受体时,就抑制了依赖TGF的非贴壁生长。 α TGF肽链有50个氨基酸残基(EGF有53个残基),在19个部位与鼠和人的EGF同源,接近总数的40%。在两条肽链结构中形成二硫键的6个半胱氨酸残基的部位上,其同源性是保守的,在鼠EGF结构的第一个二硫键环,即6—20残基中其同源接近60%。在EGF基因中, α TGF与EGF的同源性要比任何其它几个类似于EGF多肽的多得多。

2. 蛋白磷酸化

在ATP存在时,将EGF加到纯化的膜中能促使蛋白磷酸化。包括亲和标记和免疫学实验所得到的好几方面的证据表明:对EGF敏感的激酶活性是受体分子固有的。EGF活化的激酶能使受体本身的和外源底物上的酪氨酸残基磷酸化。EGF受体的激酶区段与上述的erbB的癌基因蛋白关系密切。癌基因蛋白类似酪氨酸激酶,是src激酶族中的一员,但癌基因蛋白的酪氨酸激酶活性尚未被证实。早先的材料曾提示EGF受体激酶和src激酶之间在生化方面的相互关系,例如,

EGF 受体激酶能使 src 多肽和 src 激酶的抗体磷酸化。在生长因子受体中或转化基因蛋白中出现的酪氨酸激酶活性与调节生长的机制的关系还不清楚。目前各种系统的许多方法,在确定那些直接成为 EGF 受体激酶或其它酪氨酸激酶底物的有生理意义的蛋白质还有困难。

3. 直接对 DNA 的活性

最近, Mroczkowski 等证明高度纯化的 EGF 受体在 ATP 存在时,能使超螺旋的 DNA 产生缺口而成为松弛的形式。虽然在受体制备物中总有核酸酶污染的可能,但是 src 激酶制剂(来自两个实验室)和 A-431 细胞及一般小鼠肝纯化的 EGF 受体制备物都能催化同样的反应。

这种对 DNA 构象上的活性可用一些环状的,双链 DNA 分子(pBR 322, ϕ x 174, SV 40, PM2)来证明,其产物是有缺口的环状 DNA。这种松弛反应需要 ATP,不能被水解的 ATP 类似物不起作用。使 DNA 缺口的活性不受 EGF 的影响,而是保持在经加热而使酪氨酸激酶失活的受体制剂中,这提示在体外 DNA 松弛活性既不需要生长因子的结合也不需要酪氨酸激酶活性。有趣的是有时在这些反应中产生高分子量的 DNA。如果这代表已连环的 DNA 的话,那么,观察到的活性应该与 DNA 拓扑异构酶的打开缺口和连接的活性有关。

四、受体的生理学

重要的问题是受体的结构和功能如何提供介导 EGF 生物活性的机制。当 EGF 加到细胞上时,生长因子-受体复合物形成并被吞入。复合物的吞入最终导致 EGF 和受体降解。人的成纤维细胞在没有 EGF 存在时,其 EGF 受体的生理半衰期接近 10 小时。当加入 EGF 时,半衰期则很快降至 1 小时左右。那些营养性的或不是促分裂的大分子(如低密度脂蛋白,铁传递蛋白和无唾液酸糖蛋白)的受体具有高水平的再循环,与此相反,吞入了的 EGF 受体看来只有极少数进

入再循环。已有报道说配体加速吞入了的胰岛素受体降解。然而,认为受体降解与激素的吞入,特别与促分裂剂的吞入系统有联系还为时尚早。不过,在受体分子内部和激素引起的受体迅速降解中或许存在着两个效应系统,这造成了一种可能性,即受体在细胞内加工后,触发了一个或两个效应系统,并被它们转移到细胞的其他部分,例如细胞核。如果证实受体具有使 DNA 产生缺口的活性,就能预言有这样的途径存在。至今,在检测受体中间体的加工方面还没有什么进展。在前面提到的 EGF 受体转化研究中,从代谢途径标记细胞,并在有 EGF 和没有 EGF 情况下进行追踪,免疫分离和定量测定残留的标记受体。然而,未检测到可能的降解产物,只测得标记的成熟受体(170,000 道尔登)的水平下降。以前有关 ^{125}I -标记的配体(EGF 或胰岛素)交联到受体的研究提示有中间降解产物的存在。由于深入地了其性质面临着极大的技术困难,这些初步研究没有进一步做下去。

五、结 论

促细胞分裂剂激活了一个涉及许多不同生化过程的多效应反应。这些反应能被粗略地分成“早期”和“晚期”两个过程。前者一般涉及膜性质的变化,如营养物质的运输。后者包括需要核活动参加的大分子合成。在这两过程中如果受体都参加的话,则有理由认为由 EGF 激活的质膜上的酪氨酸激酶过程是致细胞分裂作用的“早期”反应。而 EGF 结合后受体吞入到内部所产生的与 DNA 相互作用是致细胞分裂作用的“晚期”反应。调节“早期”和“晚期”反应的不同机制在近十年前就有人提出过,并与一些报道相一致。这些报道指出,除了 EGF 结合外,其它因素(如抗体结合到受体上)引起受体成簇也足以诱导出细胞分裂的部分反应。

中国科学院上海细胞生物学研究所

蒋 倬译自 Cell, Vol.37,357-358,

June 1984

顾国彦 校审

(上接第 74 页)

[6] Nelson, D. S., 1976, *Immunobiology of the macrophage*, pp. 259-272, San Francisco London, New York.

[7] Allison, A. C., 1978, *Recent Advances in Histopathology* No. 10, (Anthony, P. P. &

Woolf, N., ed.), pp. 70-89, Churchill Livingstone, Edinburgh London & New York.

[8] Jean-Francois BACH, 1976, *Immunologie*, pp. 92-108,

培养半小时的玻片上,鸡红细胞胞浆及核已被消化成几种不同状态(分四级):原形核(3—4微米)、核固缩(2—3微米)、胞浆或核形隐约不清或呈墨绿色大小不一点状色素残余体(0.3—1.5微米,其中1微米较多)(图版图4,5)。

3. 透射电镜

观察超薄切片,可见巨噬细胞表面不规则,有伪足样结构和微绒毛。胞浆内见到较多的线粒体和粗面内质网,丰富的游离和多聚核糖体及明显的高尔基复合体。且可见大小不一、形态和密度不等的各级溶酶体,包括初、次级溶酶体和残余体(图版图8,9)。其中有的鸡红细胞核、浆依然完整,形成较大的异噬性溶酶体;有的鸡红细胞核已消化为固缩或碎裂的形态(与光镜所见的未消化形态,核固缩和点状色素残余体颗粒的大小,经测量相当)(图版图6,7);有的鸡红细胞核全被消化,留有胞浆密度稍低(与光镜见到鸡红细胞痕迹空泡同);有的胞浆消化多,形成多泡体样结构,其中有消化不全的核(图版图9)。有时可见空泡和脂肪滴(图版图8,9)。巨噬细胞核呈卵圆形、肾形、不规则形,有时有凹陷,见到核仁,在核膜及核仁上有稀疏分布的异染色质(图版图7)。

讨 论

巨噬细胞吞噬和消化鸡红细胞可分为四个阶段:

1. 趋化移动

在相差镜下能见到巨噬细胞向异物(鸡红细胞)移动。这是由于具有阳性趋化性物质作用引起的。这些趋化物质可能是鸡红细胞膜表面的脂多糖激活补体系统及致敏的淋巴细胞与鸡红细胞抗原接触而产生的趋化性淋巴因子等^[5,6]。

2. 识别粘附

辨认异己是巨噬细胞本能,在本实验鸡红细胞为巨噬细胞应清除的对象。在光镜、相差镜、电镜下都明显见到鸡红细胞紧紧粘附在巨噬细胞膜上。

3. 摄入

巨噬细胞与鸡红细胞相接触后,伸出伪足将它们包围并卷入胞浆内,形成由浆、膜包绕的异噬泡。随后巨噬细胞表面膜面积愈来愈少,直到变为球形,吞噬作用停止。这些在相差镜下最明显,电镜及光镜下也能见到摄入的固定形态。

4. 消化

指初级溶酶体进入异噬泡后将异物进行降解和消化、清除的过程。溶酶体含水解酶60多种^[7],当鸡红细胞作为异物吞入胞内形成异噬泡后,激活初级溶酶体,聚集在鸡红细胞周围并与其融合为较大的次级溶酶体。在相差镜下见线粒体的活动加强,电镜观察线粒体、核糖体、粗面内质网增多,高尔基复合体明显,均说明巨噬细胞内能量和物质代谢增强。然后溶酶体按消化需要,顺序地活化,释放不同成分的酶,将鸡红细胞核或浆分别消化,形成不同消化程度的各种次级溶酶体,包括多泡体及大小不一的残余体。我们在光镜下见到的消化状态与电镜对照完全一致,特别是光镜下易混淆的点状色素残余体(0.3—1.5微米),在电镜下得到了证实。

总之,由于巨噬细胞吞噬和消化异物(包括微生物)的能力并不一致,所以在检测巨噬细胞吞噬力时,必须更注意消化力的观察,这就是我们研究巨噬细胞溶酶体消化力形态的目的。

本工作承中国科学院上海生理研究所电镜室同志协助,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 许长照, 1984, 解剖学通报, 7(1):32—34.
- [2] Jakab, G. J. et al., 1980. In *Macrophages and lymphocytes: Nature, Function and Interaction* (Escobar, M. R. & Friedman, H., ed.) pp 81—90, Plenum, New York.
- [3] Bornstein, M. B., 1958, *Lab. Invest.* 7: 134—137.
- [4] 鲍璋等, 1983. 实验生物学报, 16(1):81—91.
- [5] 上海第二医学院等, 1980. 免疫学讲义, 148—149.

(下转第63页)