

第九届全国基因与基因组学术研讨会

论文摘要集

主办单位

中国生物化学和分子生物学会基因与基因组专业委员会

中国生物化学和分子生物学会医学生物化学与分子生物学分会

中科院上海生科院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室



二〇〇五年九月十二日~十五日

中国·昆明

第九届全国基因与基因组学术研讨会

学术委员会名单：

主席：李载平，强伯勤

副主席：李伯良，陈江野

委员：顾健人，赵慕钧，缪世英，龚毅，徐国良，马大龙，

沈岩，邱小波，余龙，黄薇，敖世洲，金由辛

工作组成员名单：

王同喜，王华峰，杨新颖，谢伟军，陆霞，

张爱宝，秦正崑，沈枝安等

第九届全国基因与基因组学术研讨会会议日程

日期	时间	报告内容	报告人
9月12日	全天	参会代表报到	
9月13日	7: 00—8: 00	早 餐	
	8: 00—8: 40	开 幕 式	
	8: 40—9: 20	癌症是一种以局部细胞生长异常为特征的全身性、系统性疾病	顾健人（院士，上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室）
	9: 20—10: 00	复杂性状疾病易感基因研究	沈岩（院士，中国医学科学院基础医学研究所，医学分子生物学国家重点实验室）
	10: 00—10: 40	休 息	
	10: 40—11: 20	基因功能的主要终结者：泛素-蛋白酶体通路	邱小波（教授，中国医学科学院暨协和医科大学，基础医学研究所，医学分子生物学国家重点实验室）
	11: 20—12: 00	衰老机理—掀起你的盖头来	周金秋（教授，中科院上海生命科学学院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室）
	12: 00—13: 00	午 餐	
	13: 30—17: 30	分 组 报 告	
	18: 00—19: 00	晚 餐	
	19: 00—21: 00	分 组 报 告 或 公 司 报 告	

9月14日	7: 00-8: 00	早 餐	
	8: 00-8: 40	我国人类功能基因研究进展	马大龙（教授，北京大学人类疾病基因研究中心）
	8: 40-9: 20	基因表达的表观遗传调控研究进展	李伯良（教授，中科院上海生命科学学院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室）
	9: 20-10: 00	miRNA:细胞分化、发育和肿瘤发生中的RNA 调控	屈良鹄（教授，中山大学基因工程教育部重点实验室）
	10: 00-10: 30	休 息	
	10: 30-12: 00	分 组 报 告	
	12: 00-13: 00	午 餐	
	13: 30-15: 00	分 组 报 告	
	15: 00-15: 30	休 息	
	15: 30-16: 10	生物技术药物研究的概况与进展	马清均（教授，军事医学科学院生物工程研究所）
	16: 10-16: 50	A systemic SNP survey of 123 candidate genes from important pathways for genetic susceptibility of coronary atherosclerosis in Chinese populations	黄薇（教授，中国基因组南方中心）
	16: 50-17: 30	肝癌发生与转移的分子生物学研究	余龙（教授，复旦大学遗传工程国家重点实验室）
	17: 30-18: 00	闭 幕 式	
	18: 30-19: 30	告 别 宴 会	
9月15日	全天	会议组织参观或离会	

目 录

大会报告

癌症是一种以局部细胞生长异常为特征的全身性、系统性疾病 顾健人.....	2
复杂性状疾病易感基因研究 沈岩.....	3
基因功能的主要终结者：泛素-蛋白酶体通路 邱小波.....	5
衰老机理——掀起你的盖头来 周金秋.....	6
我国人类功能基因研究进展 马大龙.....	7
基因表达的表现遗传调控研究进展 李伯良.....	10
miRNA：细胞分化、发育和肿瘤发生中的RNA调控 屈良鹄.....	11
生物技术药物研究的概况与进展 马清均.....	12
A systemic SNP survey of 123 candidate genes from important pathways for genetic susceptibility of coronary atherosclerosis in Chinese populations 黄薇.....	13
肝癌发生与转移的分子生物学研究 余龙.....	14

分组报告

水稻中小分子RNA的寻找 金由辛.....	16
siRNA对HepG2 2.2.15细胞和转基因小鼠中HBV的基因表达及复制的抑制作用研究 杨安钢.....	17
细胞凋亡诱导因子CIDE-B基因的细胞特异性表达调控研究 答亮.....	18
干扰素通过顺序激活PKC δ -JNK-STAT1调节磷脂爬行酶1的表达 赵克温.....	19
炎症反应相关基因环加氧酶-2的转录调控机制 朱应.....	20

肺癌相关新基因CT120两种转录本（A/B）的不同功能 万大方.....	21
国际人类基因组单体型图计划及其应用 曾长青.....	22
小鼠核受体mLRH-1新异构体的发现和鉴定 高大明.....	23
ISL1与BETA2在胰岛素基因转录调控中的相互作用 王卫平.....	24
重组嵌合Cbl泛素连接酶对乳腺癌细胞生长的影响 李霞.....	25
Oral Adeno-associated Virus-sTRAIL Gene Therapy Suppresses Human Hepatocellular Carcinoma Growth in Mice 郑德发.....	26
人纤溶酶原K5抑制血管增生的作用及结构基础 高国全.....	27
人白血病多药耐药细胞株K562/A02中sorcin基因表达及其意义研究 许元富.....	28
多发性骨髓瘤负性相关基因DAZAP2研究 胡维新.....	29
乙酰化对造血转录因子功能的调控作用 张庆军.....	30
血红素加氧酶-2中的碱性氨基酸对其接受CPR提供电子能力的影响 赵炜明.....	31
七氟醚抗性新基因的功能初步研究 刘红.....	32
Troglitazone对小鼠I型葡萄糖载体（mGLUT1）表达的影响 李天洙.....	33
增强C/EBP ϵ 表达对U-937细胞分化的影响 卢健.....	34
HZF1和Annexin1在红系细胞分化中的重要作用 张俊武.....	35
参与白念珠菌菌丝生长和毒性表现的转录因子的功能研究 陈江野.....	36
利用组织芯片研究卵巢癌中FRAT1基因和 β -catenin蛋白的表达情况及两者相关性 王益华.....	37
PP2C蛋白磷酸化酶调控酵母细胞线粒体F0F1 ATP合成酶的功能 蒋伶活.....	38
TGF β 结合蛋白1干扰质粒的构建及其功能研究 赵涵芳.....	39

三种不同基因表达谱芯片平台的比较张耀洲 韩峻松.....	40
淋巴细胞中hMOR基因的转录调控 李刚.....	41
人单核/巨噬细胞中ACAT基因表达与细胞膜APP加工关系 陈佳.....	42
Cdc2相关蛋白激酶PFTK1和PCTK1通过与PLZF相互作用而影响其在细胞中的功能 姜梅.....	43
De novo methylation of Oct4 promoter in neuronal induction of P19 cells - A cell culture model to study DNA methylation 李静宇.....	44
从文献量看国际与中国基因组研究的发展 高柳滨.....	45
肿瘤抗原的筛选及其抗体抑瘤作用的研究 冯静.....	46
Targeted Disruption of <i>Smad4</i> in Cardiomyocytes Results in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure 王剑.....	47
宫颈癌差异表达新基因的筛选、克隆及功能分析 左泽华.....	48
Dicer基因SNP与HBV易感性研究 阎小君.....	49
Discovery and Structure Analysis of Novel non-coding mRNA-like RNA 张耀洲.....	50

论文摘要

针对uPA的siRNA对人乳腺癌细胞侵袭的抑制作用 黄红艳,孙强,李庆霞,刘家云,王凯,鲍炜,贾林涛,王成济,杨安钢.....	53
人肝脏高凝状态相关基因的筛选、生物信息学分析和表达初步 崔晓燕,方定志,刘秉文.....	54
人端粒酶逆转录酶启动子介导的肿瘤特异性RNA干扰载体的构建及应用 黄胜林,吴怡,俞海,赵涵芳.....	55
The <i>MALE STERILE L</i> gene encodes a basic helix loop helix (bHLH) protein that controls tapetal cell development in rice (<i>Oryza sativa</i>) anther Li Na, Liu Haisheng, Li Xiaoxing, Chu Huangwei, Huang Hai, Ma Hong, Luo Da, Zhang Dabing.....	56
神经干细胞分化相关DCF1基因克隆与表达 鹿淑亚,文铁桥.....	57
分枝杆菌噬菌体裂解肽的分离和功能鉴定 苏畅,刘堰.....	58

人抗HBsAg单链抗体基因的构建、表达及其表达产物的活性鉴定 温伟红, 孟艳玲, 薛茜, 贾林涛, 赵晶, 许彦鸣, 刘家云, 王成济, 杨安钢.....	59
葡萄糖神经酰胺合酶与白血病细胞耐药的关系 谢平, 葛素梅, 谢可鸣, 顾中华, 穆会君, 王珏, 张滨.....	60
转录因子C/EBP β mRNA 3'UTR位点专一的相互作用蛋白的初步鉴定及其功能的研究 刘定千, 孙丽.....	61
海洛因对大鼠脑外组织嘌呤核苷酸分解代谢关键酶的影响 孙聪.....	62
PKC δ Protects Human Breast Tumor MCF-7 Cells against Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Apoptosis Jindan Zhang, Ning Liu, Jingchun Zhang, Shilian Liu, Yanxin Liu, and Dexian Zheng.....	63
端粒酶活性抑制蛋白LPTS的制备和纯化 陈光明, 李载平, 赵慕钧.....	64
HBX转录激活Beclin 1基因的表达 唐红, 徐振华, 毛怡, 宋海, 答亮, 王遂泉, 王翼飞, 横山一成, 李载平, 赵慕钧.....	65
与人LPTS/PinX1具有相似端粒酶调节功能的斑马鱼LPTS的克隆鉴定 孙成副, 吴芝莉, 贾方钧, 李逸平, 赵慕钧.....	66
大鼠TM4SF4基因在四氯化碳损伤模型中的功能研究 裘捷, 刘占武, 李载平, 赵慕钧.....	67
抗Pgp/抗CD3微型双功能抗体的构建和表达 高瀛岱, 熊冬生, 邵晓枫, 杨铭, 刘汉芝, 许元富, 彭晖, 杨纯正.....	68
靶向V-ATPase质子泵的siRNA对肿瘤转移的抑制作用及分子机制 覃文新, 卢小东, 李锦军, 姚明, 杨胜利, 顾健人.....	69
人鼠嵌合抗CD20 F(ab') ₂ 片段抗体突变体的研究 熊冬生, 王金宏, 范冬梅, 刘银星, 许元富, 纪庆, 王彩云, 许元生, 刘汉芝, 邵晓枫, 彭晖, 杨铭, 朱祯平, 杨纯正.....	70
利用基因芯片技术分析ES细胞向心肌细胞诱导分化中基因表达的变化 贾竹青, N.A. Affara, 周春燕.....	71
骨髓细胞移植和钙离子ATP酶2a基因治疗心肌梗塞后心力衰竭 郭豫涛, 李小鹰, 鲁小春, 吴迪, 姚克群, 陈苹, 马康涛, 周春燕.....	72
康赛宁对NOD鼠胰岛细胞瘤细胞株NIT生长影响的体外研究 王德彬, 吴仕筠, 全家妩.....	73
人 γ 珠蛋白基因-175和-173T \rightarrow C突变均在转基因鼠中确立HPFH表型——说明一个多蛋白复合体可能涉及 γ 基因在成人红细胞中沉默的机制 刘立仁, 杜占文, 赵华路, 刘晓玲, 黄小东, 沈洁, 鞠丽梅, 方福德, 张俊武.....	74
La(III)对果蝇遗传性状及其唾腺染色体的影响 吴士筠, 杨春洪.....	75
人类内源性小RNA的发现和基因表达调控网络 殷勤伟, 谭余良, 陈芳, 张勇琴, 郭维锐.....	76
Survivin基因启动子的克隆及活性的初步研究	

徐让, 卢健, 钱关祥.....	77
大鼠副睾16基因的功能初探	
史毅, 张永莲, 金由辛.....	78
草苁蓉根茎粗多糖的分离纯化及其部分性质的研究	
宋全胜, 柳明洙, 梁忠岩, 李天洙, 孙权, 张学武.....	79
大鼠骨髓间充质干细胞条件培养液促进心肌成纤维细胞分泌胶原	
韩瑜, 韩变梅, 朱伟铨, 陈静海, 胡盛寿, 柳明洙, 陈曦.....	80
水稻双功能激酶基因 (OsSTY kinase) 的克隆及其表达研究	
杜滢, 梁颖.....	81
珍珠梅水提物对S₁₈₀荷瘤小鼠血管内皮生长因子表达的影响	
陈丽艳, 柳明洙, 张璐, 张学武, 李天洙, 孙权, 崔长旭.....	82
外源质粒DNA对小鼠脾脏物质能量代谢的影响	
刘建文, 乐国伟, 施用晖.....	83
人ACAT1 mRNA反式剪接成熟的<i>in vitro</i>体系研究	
胡光晶, 陈江, 李夏璐, 马涵慧, 韩瑞军, 杨新颖, 李伯良.....	84
TNF-α通过NF-κB途径增强人ACAT1基因表达	
雷磊, 张念一, 杨金波, 杨新颖, 王怡, 李伯良.....	85
人ACAT2基因沉默或低表达的分子机制	
赵晓楠, 鲁明, 陈佳, 王灿华, 姚晓敏, 宋保亮, 李伯良.....	86
可变性剪接成熟的人ACAT2 mRNAs及其编码的异构体	
姚晓敏, 王灿华, 宋保亮, 杨新颖, Catherine CY Chang, TY Chang, 李伯良.....	87
人ACAT1 4.3-knt mRNA的核糖体内部进入起始翻译	
陈佳, 赵晓楠, 鲁明, 杨力, 李伯良.....	88
神经系统特异表达的黏附分子-NECL1的研究进展	
阴彬, 彭小忠, 强伯勤.....	89
白念珠菌CaCdc37的表达及其功能研究	
刘晓艳, 宋文纪, 倪坚, 陈江野.....	90
CTD蛋白激酶CaSrb10对白念珠菌形态发生和毒力的影响	
逯杨, 李砚东, 苏畅, 陈江野.....	91
利用双向电泳技术鉴定野生型白念珠菌和基因敲除菌株中差异表达的蛋白	
苏畅, 逯杨, 曹芳, 陈江野.....	92
CZF2基因在白念珠菌白灰形态转变中的功能研究	
黄广华, 王华峰, 周舟, 陈江野.....	93
CaTOS9基因在白念珠菌白灰形态转变和交配过程中的功能作用	
黄广华, 王华峰, 谢伟军, 陈江野.....	94
脑源Cdc2蛋白激酶PFTK1与14-3-3蛋白的相互作用及其入核机制	
高衍昆, 杨弢, 姜梅, 倪坚, 敖世洲, 陈江野.....	95
EB1影响细胞增殖及转化机制的初步探讨	
刘梅, 王益华, 周晓波, 张果, 杨尚斌, 闫霜, 白瑾峰, 徐宁志.....	96

RNAi下调c-myc表达导致人乳腺癌细胞MCF-7蛋白表达谱改变的研究 杨尚斌, 娄晓敏, 王益华, 刘斯奇, 徐宁志.....	97
人垂体瘤转化基因(hPTTG-1)与食管癌侵袭转移的相关性研究 闫霜, 周翠琦, 王益华, 全兰平, 白瑾峰, 朱红霞, 徐宁志.....	98
ICF综合症中DNMT3L对DNMT3B突变蛋白活性调控作用的研究 谢正华, 黄燕女, 徐国良.....	99
肠细胞Caco-2和肝癌组织中ACAT2基因的表达及其分子机制 宋保亮, 王灿华, 姚晓敏, 杨力, 张文静, 王甄真, 杨金波, 戚炜, 杨新颖, Kenji Inoue, 林志新, 张惠展, Tatsuhiko Kodama, Catherine C.Y. Chang, 刘银坤, Ta-Yuan Chang, 李伯良.....	100
坛紫菜(<i>Porphyra hatainensis</i>)丝状孢子体阶段表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST)大规模分析 王广策, 范晓蕾, 方永军, 胡松年.....	101
多管藻藻红蛋白的规模分离纯化 王广策, 牛建峰.....	102
一种新型树脂: 琼胶糖-壳聚糖共混交联微球的制备 薛志欣, 王广策.....	103
CPT ₂ 基因与种子特异性启动子植物表达的构建及转化大豆的研究 黄永芬, 付畅, 王豫颖, 孙丹丹, 徐庆华, 刘玉芬, 汪清胤, 齐群刚.....	104
Construction and Analysis of Silkworm Pupa (<i>Bombyx mori</i>) cDNA Library Yaoyzhou Zhang, Jian Chen, Zhengbing Lv, Zuoming Nie, Caiying Jiang, Lili Liu, Dan Wang, Yulan Lou, Fukun Zhao, Xiangfu Wu, and Genjun Xu.....	106
Expression, Purification and Characterization of human GM-CSF in Silkworm Pupae (<i>Bombyx mori</i>) Jian Chen, Yao-Zhou Zhang, Cheng-Zhi Xu, Xiang-Fu Wu.....	107
Study on the oral pharmacological action of hGM-CSF expressed in pupae Yaoyzhou Zhang, Jian Chen, Xiangfu Wu and Genjun Xun.....	108
家蚕类蜘蛛毒素基因的研究 王丹, 聂作明, 吕正兵, 蒋彩英, 刘立丽, 陈健, 张耀洲.....	109
死亡素在裂殖酵母中表达及工程菌发酵条件的探索 吕正兵, 蒋彩英, 刘立丽, 张耀洲.....	110
小麦小孢子特异性表达β-expansin基因的分离和特性研究 金勇丰, 金慧清, 边腾飞.....	111
Oxidative Stress Stimulates the Expression of Thioredoxin Reductase through the Ras/MEK Signaling Pathway Fu Qiang, Kwok-Ming Yao, Kin-Sing Lee and Nai-Sum Wong.....	112

大会报告

癌症是一种以局部细胞生长异常为特征的全身性、系统性疾病

顾健人

上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室

本实验室从基因组水平的大规模 cDNA 转染实验所得的结果表明：30,000 个 cDNA 中有 3,806 个基因的 cDNA 与细胞生长相关；其中 2,836 个为已知基因。从已知基因来看，相当一部分是与神经、激素、免疫、代谢、离子通道及小分子受体相关。这些基因中，除激素、免疫相关基因外，过去被人们所忽视，尤其是神经与离子通道。此后，我们应用肝癌、癌旁肝与正常肝组织进行了 cDNA 芯片检测，证明相当数目的神经递质合成相关基因、神经递质受体、离子通道及转运蛋白，存在于肝癌及肝组织，其中部分基因存在表达差异。

这说明上述组织包括肝脏存在神经递质的受体及离子通道传递系统。这些系统既是一种自泌/邻泌系统，也可能同时具有全身系统性调节的双重性调控系统。

以上发现提示了肿瘤的发生不仅是局部组织与细胞本身的异常，同时存在全身性系统性的调控异常。

参考文献：

1. Wan DF et al. PNAS 101:15724-15729, 2004
2. 顾健人、杨胜利：中华医学杂志 85:505-507, 2005

复杂性状疾病易感基因研究

沈岩

中国医学科学院基础医学研究所，医学分子生物学国家重点实验室，北京，100005

人类疾病是遗传（基因组信息）与环境因素相互作用形成的复杂动态系统脱离正常运行状态的结果。除获得性疾病（外伤、感染等）外，人类疾病按遗传学可分为染色体病、线粒体病、单基因病和多基因病。“人类基因组计划”就是通过全面揭示人类基因组信息来识别严重危害人类健康的肿瘤、心血管等疾病的基因，阐明疾病机理，获得有效的预防、诊断和治疗措施。生物医学和人类健康将在人类基因组计划的基础上取得革命性进步。疾病基因的识别是目前以及未来 20 年医学研究的重点和焦点之一。

我国单基因遗传病致病基因识别鉴定研究的突破以 1998 年中南大学夏家辉教授课题组克隆出神经性耳聋致病基因为标志。2001 年以来，我国研究者又先后鉴定出遗传性乳光牙本质、A-1 型短指、儿童白内障、家族性房颤、儿童失神癫痫、红斑肢痛症、单纯先天性白内障、角膜环状皮样瘤等疾病的致病基因。基于丰富的疾病资源和已经取得的成功经验，我国科学界在遗传病致病基因鉴定方面还会取得更多的成果。

多基因病是指由两个或两个以上基因与环境因素共同作用所导致的疾病。其遗传方式不遵循简单的孟德尔遗传模式。多基因病在人群中的总发病率约为 20%~25%。因此多基因病也被称为常见疾病。在人类死亡原因中排在前三位的心脏病、恶性肿瘤和脑血管疾病均为多基因病。多基因病是对人类健康威胁最大、给家庭和社会造成主要负担、需要重点防治的疾病。多基因病易感基因的识别是一个需要迫切解决的问题，也一直是国际学术界面对的难题。

多基因病易感基因研究的复杂性和难度主要表现在疾病遗传模式未知、具有遗传异质性和表型异质性、具有不完全外显或不规则外显现象、有环境因素影响等方面。多基因病易感基因识别中最常用的传统研究策略是连锁分析（包括参数分析法和非参数连锁分析）和功能基因关联研究与传递不平衡检验（包括病例/对照研究和基于家系的关联研究）。连锁分析适用于复杂疾病中罕见的单基因致病类型（如青少年型糖尿病 MODY 基因），或者具有“主效基因”的复杂疾病（如先天性巨结

肠有一个主效基因 **RET** 和几个微效基因共同作用)。功能基因关联分析需要先验知识(如与疾病假说有关的候选基因,与疾病病理、药理或病生理过程有关的基因,与疾病连锁的染色体区域内的基因或导致动物疾病模型的基因等)。功能基因关联分析的优点是所需的散发病例或核心家系比较好收集,可以采集临床表型同质性较高的大样本,关联分析的检出力高于家系连锁分析,可以检出“相对风险率”小的微效基因。关联分析最主要的问题是假阳性率高。

多基因病易感基因研究策略的一些新发展包括数量性状定位(Quantitative Trait Loci, QTL)策略和“常见疾病,常见变异”假说(通过不同人种、大规模人群遗传分析,筛选在大多数患者中存在的常见变异,或者叫通用变异)。在技术方面的发展包括结合疾病的动物模型开展基因表达芯片、蛋白质组学分析等。

多年来,尽管在多基因疾病易感基因研究方面积累了大量有价值的科研成果和数据,但有多数阳性结果在不同研究小组中很难重复,至今尚未阐明相关疾病的发病机理。究其原因,研究策略和方法学依然是制约进展的瓶颈。

当前,人类疾病基因研究正从遗传病致病基因识别向鉴定严重危害人类健康的多基因复杂性状疾病易感基因过渡,预计到2030年,绝大多数多基因病的易感基因将被识别。因此,今后5—10年将是我国人类疾病基因研究的重要战略时期。由于当前多基因病的研究策略和方法学的制约,使这一领域的研究面临很大阻力。但这也为我国科学家在多基因病易感基因识别方面赶超国际水平提供了很好的机遇。

由于多基因疾病通常是由多个微效基因的累加作用,并在特定环境因素诱发下产生的。其中多数疾病还具有高度的异质性。所以在其易感基因的研究方法和策略上,不能完全沿袭传统的以“还原论”为基础的研究方法。最近,由中国医学科学院、清华大学、北京大学、吉林大学和人类基因组北方研究中心组成的“中国精神分裂症协作组”以偏执型精神分裂症为模型提出不同于以往的新的研究策略。以疾病相关的代谢通路作为研究对象,研究通路上所涉及基因的协同作用与疾病易感性的关系,取得了有意义的结果。

多基因病易感基因的研究需要临床医学、基础医学、信息科学、统计学、数学等众多学科的紧密结合,呼唤新思维、新策略、新方法的产生,也为中国生物医学研究提供了新的机遇和挑战。

基因功能的主要终结者：泛素-蛋白酶体通路

邱小波

邱小波^{1,2}, 欧阳松应¹, 缪时英¹, 袁钧英², 王琳芳¹, Alfred L. Goldberg²

1. 中国医学科学院暨协和医科大学, 基础医学所(院), 医学分子生物学国家重点实验室; 2. Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

蛋白质的合成使基因功能得以体现, 而蛋白质的降解则使基因功能得以终结。泛素-蛋白酶体通路是细胞内蛋白质降解的主要途径。它调节着几乎所有的细胞活动, 包括细胞周期、DNA 复制和转录、蛋白质质量控制及免疫应答等。由 76 个氨基酸组成的泛素与底物蛋白质以共价键结合形成复合物, 称为泛素化。这个过程依次需要泛素激活酶 (E1)、泛素载体蛋白 (E2) 和泛素蛋白连接酶 (E3) 的作用。蛋白酶体是一个很大的由多个亚单位组成的 26S 的复合物, 可将多聚泛素化的蛋白质降解为小肽段。E3 通过决定泛素化的时间性和特异性来间接调控蛋白酶体介导的降解, 而去泛素化酶则通过对泛素化的逆转实现对这个通路的调节。

近几年来, 我们一直致力于研究泛素-蛋白酶体通路及其在细胞凋亡中的作用。我们 1) 发现了一种新的蛋白酶体亚单位 Dubal。Dubal 能通过促进蛋白酶体中去泛素化酶 UCH37 的活性来调节蛋白质降解。2) 发现了存在于睾丸的新型蛋白酶体。3) 发现了一个新的细胞凋亡通路。在这个通路中, 一个称为 Nrdp1 的新的 E3 可以通过催化泛素化和蛋白酶体降解而阻抑 ErbB3 (EGF 受体家族的一个成员), NF- κ B (可抗凋亡的转录因子) 及 BRUCE (一种具 E2 及 E3 双重活性的凋亡抑制蛋白)。4) 提出了一种新的拮抗细胞凋亡的机制。BRUCE 通过直接拮抗促凋亡因子 Smac 和 caspase-9 及其前体, 而实现对细胞凋亡的抑制。5) 揭示了 BRUCE 是第一个被发现的直接对抗促凋亡因子并为抑制凋亡所必需的哺乳动物泛素-蛋白酶体通路成员。这些发现将对研究基因功能的调节, 以及对许多疾病 (如男性不育症, 癌症、心脏病及神经退行性疾病等) 的诊断和治疗, 提供重要理论依据和线索。

衰老机理——掀起你的盖头来

周金秋

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室，上海，200031

Aging Research: Call for Mechanisms

Jin-Qiu Zhou and Fei-Long Meng

Max-Planck Junior Research Group in the State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 320 Yue-Yang Road, Shanghai 200031, P. R. China.

E-mail: jqzhou@sibs.ac.cn

Since civilization, people have been asking the question why and how we age, and numerous attempts were made to find an elixir. Nowadays, scientists start to focus on physiological mechanisms underlying the aging process. While the theorists are still debating whether the aging is genetic programmed or just the failure of living system to keep going, biologists have recently taken a big step to delve into the mechanism of aging. Long-lived mutants were isolated in several species by manipulating single gene, and several small molecules that can extend the life span were also found. In contrast to other fundamental cellular processes, aging appears to be more complicated and unlikely controlled by a simple pathway. The factors that were proved to impact aging process rang from caloric intake to stress response, from hormones to reproduction, from genome instability to oxidative damage. However, we still know little about this fundamental biological process. What are the critical modulators of life span since approximately 20% genes of genome affect life span in *C. elegans* and *S. cerevisiae*? What is the molecular mechanism of caloric restriction which can increase longevity in diversified species? How to design strategies which allow the candidate drugs suggested by laboratory studies for further evaluation? Deciphering such a fundamental biological network with widespread medical and societal effects will be a worthy challenge for genomic research.

我国人类功能基因研究进展

马大龙

北京大学人类疾病基因研究中心, 北京, 100083

Tel & Fax: 82801149; E-mail: madl@bjmu.edu.cn

Homepage: <http://gene.bjmu.edu.cn/>

举世瞩目的人类基因组计划已经基本完成测序工作, 错误率已经低于 10 万分之一。已鉴定的基因 22287, 转录本 34214, 包括 19438 已知基因, 2188 预测基因。估计编码蛋白的人类基因 20000-25000 (Nature, 2004, Oct. 21)。并且其它物种的全基因组序列分析工作在不断加速, 目前在 GenBank 的哺乳动物基因组草图就包括了小鼠、大鼠、牛、猪、狗、羊、猫、黑猩猩等 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。这些数据可以提供给全世界的科学家免费下载使用, 极大地改变了传统的研究思路。在海量基因蛋白序列资料的基础上, 生物学和医学研究的重点已经转向功能基因组学, 这一领域研究是生物技术产业和健康产业的核心, 蕴藏着巨大的产业化潜能和经济效益, 并与人类的健康息息相关。基于基因组研究成果具有极为广阔的应用前景, 将会从根本上改变疾病诊断、治疗和预防的传统健康产业模式, 带来巨大的社会 and 经济效益。

目前, 虽然人类基因组全部序列已知, 但仍对数千人类基因的功能一无所知; 对多数已知基因的功能一知半解。根据 2005 年 1 月版 RefSeq 数据库统计, 已发表功能研究论文 1 篇以下的人类基因占 58.3%, 发表 5 篇以下论文的基因占 23.2%, 6 篇以上的基因只占 18.2%。这说明我们对人类基因功能的了解尚远远不够, 仍有大量的人类新基因和蛋白有待于我们发掘。对于生物技术产业来说, 最重要的创新源泉是功能基因与蛋白质; 一个有自主知识产权的重要功能基因有可能形成系列产品, 带动生物技术产业发展。人类功能基因的主要开发价值包括: 1. 基因工程药物; 2. 药物靶标; 3. 免疫靶标; 4. 基因治疗靶基因; 5. 疾病诊断和易感分析标志; 6. 生物技术支撑产品等。特别是在药物开发领域具有重大经济效益和社会效益。

随着人类基因组计划的完成, 我国在人类功能基因研究领域已经从大规模的基因测序转向以细胞水平为主的功能研究、疾病相关性研究、相互作用蛋白的研究及蛋白质组学研究等前沿领域。自 2002 年起, 我国将人类基因组的后续研究与开发工作列入 12 个国家重大科技专项之一的“功能基因组与生物芯片”, 包括 6 个专题, 涉及人类基因组、水稻基因组、微生物基因组、蛋白质组及生物芯片等, 其中“人类重要生理活性及具有药物开发前景的功能基因的研究”课题的主要研究内容包括: 建立规模化的人类重要生理功能基因克隆化、鉴定、重组蛋白表达、细胞水平与动物整体水平的筛选、系统性的基因功能研究, 最终能够进入基因组药物和药物靶标的开发阶段。

根据 PubMed 检索, 我国实验室迄今已经有超过 230 个人类基因在国际杂志首次发表其功能研究文章, 得到国际同行的认可, 特别是近 2 年的人类功能基因论文数量明显增加, 反映我国在这一领域获得长足的进步。这些论文摘要可以在本中心主页检索 (<http://gene.bjmu.edu.cn/news/60.htm>)。我国研究的部分新功能基因已经开展了深入的工作, 获得国际同行的认同和引用。有近 10 个新功能

基因具有潜在靶标的开发价值，已经开始与新药开发的研究单位合作开展靶标验证和药物筛选的工作，有望成为我国新药开发的创新点。不过，我国多数基因功能研究尚缺乏深度。

从研究历史来看，上世纪 80 年代和 90 年代在人类功能基因研究策略的选择方面，往往采用传统生物学途径，即：发现生物活性→鉴定蛋白质→克隆基因→细胞分析→动物模型→人体内功能及与疾病关联。这一策略的特点是发现的基因往往是具有重要功能和高活性的基因及其编码蛋白，但缺点是工作量大，技术难度高、成本昂贵，并且由于高活性高表达的基因往往最先发现，因而目前已经很难再用这一技术路线发现新的重要功能基因。

进入 21 世纪在后基因组时代，功能基因研究在技术路线上已经与传统的方法有很大不同，其最主要特点是利用了反向生物学的途径，包括两种殊途同归的路线：

1. 数据库 DNA 序列→蛋白质表达→细胞筛选→动物模型→人类体内功能及疾病关联性
2. 疾病标本→DNA 标本→致病基因或易感基因分析→蛋白质分析→突变型基因的对细胞表型影响→动物模型→人类体内功能和疾病分子机理

这两种技术路线均需要整合一系列的新技术，如生物芯片，生物信息，蛋白组学，结构基因组学，酵母双杂交，基因敲除，RNAi 等，而其中一个必不可少的关键技术是细胞水平的功能筛选技术（cell-based screening technology），这一技术发挥了承上启下的作用，可以看作是功能基因研究的枢纽环节，特别是新药开发中应用的高通量（high-throughput）和高内涵（high-content）细胞筛选技术将在功能基因研究中发挥越来越重要的作用（图 1）。通过在体外培养的哺乳动物细胞中基因过表达或抑制基因表达，分析所产生信号传导通路和/或细胞表型改变，可以直接发现基因功能。近年来一些技术上的进展，使细胞筛选平台具有微量、自动、高效、高通量，以及可以系统研究的特点，已经成为功能基因组研究核心方法之一。近 2-3 年来已经有一批成功应用细胞筛选平台进行大规模功能基因组研究和发现重要功能基因的报道。

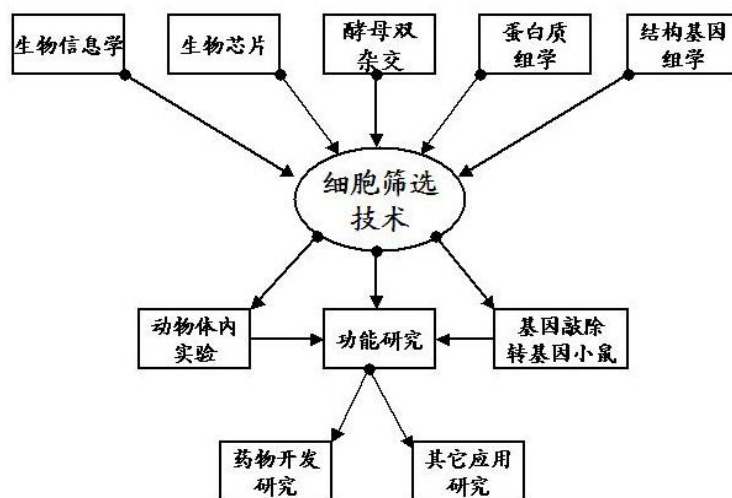


图 1. 细胞筛选技术在功能基因研究的重要位置

我国在细胞水平的研究工作具备了良好的工作基础，但存在缺乏创新的问题，往往是在国外发现新的重要功能基因后。国内实验室利用自己的细胞模型开展跟踪式的研究，最多能够发现一些已知基因的新功能，缺乏具有源头创新的成果。在后基因组时代，如果有一部分我国的细胞学实验室利用自己成熟的细胞模型，开展新的人类功能基因筛选和生物学效应研究，将能够明显增强我国在功能基因研究的整体实力，加速具有自主知识产权的人类功能基因和疾病相关基因的研究与开发，为我国的生物医药发展提供动力。因而，在人类功能基因研究中，希望特别重视细胞水平的工作，建立和完善适宜的细胞模型，开展具有创新的功能基因筛选和鉴定工作，使得更多的人类未知功能基因首次由我国科学家阐明功能。例如，近年来，国家基因组北方研究中心在高通量功能基因细胞筛选模型的建立上取得了明显的进展，已经建立了利用报告基因筛选 NF κ B、AP-1、STATs、NFAT、SRE 等近 20 个信号转导通路的模型，分别对 600 条以上的新基因进行了功能筛选，至少有 30 个基因经重复实验证明对上述通路具有调节作用，证明这一技术路线可行。目前，这些筛选模型已经对国内实验室开发，希望为国内功能基因筛选提供公用平台。当然，任何一项技术均有其不足之处，细胞水平研究不能完全反映基因的体内的真正功能，其它各项技术特别是基因敲除小鼠等动物模型建立的工作也是功能基因研究的关键环节，但由于我国在这一领域基础薄弱，技术水平较低，而且投入大，效率低，在短期很难有较大的突破进展，因而目前不宜在我国作为人类功能基因研究主要手段。只有在已经有明确细胞水平研究结果的基础上，细心遴选基因开展动物模型工作才是必要的。

此外，在人类功能基因研究策略方面，由于需要应用多种多样的新技术，很难想象单一实验室能够建立功能基因研究的全套技术，而专业技术服务体系的建立将发挥越来越重要的作用。例如，在“人类重要生理活性及具有药物开发前景的功能基因的研究”重大专项课题的实施中，初步建立起功能基因研究的协调管理机制，组织开展了流水线作业式的整合型研究模式，尽量避免小作坊的孤立式研究。目前已经建立了一系列为课题组服务的有偿专业技术平台，如酵母双杂交技术，腺病毒和腺相关病毒构建、昆虫表达系统、抗体制备、转基因小鼠、cDNA panel 表达谱分析平台、化学合成 siRNA、组织芯片等，这些技术服务平台正在发挥越来越重要的作用，并将进一步扩大新的服务平台，使得功能基因课题组能够集中精力提出科学思路，承担关键性的任务，做本专业最擅长的工作，尽快出高水平研究成果。希望国内的实验室和技术型企业关注功能基因技术平台建设的工作，一方面，尽量委托使用其它单位已建立的技术平台为自己的功能基因课题服务，另一方面，也应结合自己的技术优势，建立具有特色的技术平台为其它课题组服务，产生互动效应。

综上所述，后基因组时代为我国科学家提供了开展创新研究的新机遇，同时，我们也面临着国际竞争的严峻挑战，如果我们能够扬长避短，整合我国相关领域优势力量，开展大科学研究，建立具有我国特色的人类功能基因研究策略，将有可能在这一领域获得突破性的进展。

基因表达的表现遗传调控研究进展

李伯良

(李伯良, 谢幼华)

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

真核细胞的基因组 DNA 在细胞核里以染色质的形式存在。构成染色质的基本结构是核小体, 重复的核小体结构以及连接 DNA, 通过组蛋白和其他蛋白的进一步折叠、压缩, 形成高度有序的染色质结构。在细胞生命活动的选择性基因沉默或基因活化过程中, 包裹于染色质中的基因组 DNA 序列一般不发生改变, 但染色质结构却发生大量动态变化, 使一些特定基因组区域的转录活性呈现相应的有序变化。这种影响基因转录活性而不涉及 DNA 序列改变, 且随细胞有丝分裂能够稳定传递的基因表达调控方式称为表现遗传调控, 其分子基础主要是 DNA 甲基化、组蛋白化学修饰和染色质重塑。这些表现遗传信息决定了局部染色质的结构和基因转录的活性状态。细胞通过调控染色质水平上的各种表现遗传信息, 作为协调环境与基因组遗传信息互动的媒介, 响应细胞内外环境信号的变化。

随着人类基因组计划的完成, 生命科学研究面临的主要任务之一是阐明遗传信息如何通过基因的选择性表达, 保证生命活动的正常进行和对环境变化的有序应答, 这一调控过程的异常又如何引起各种疾病的发生、发展。探索这些问题的表现遗传调控研究, 已经成为生命科学研究热点之一。近年来, 国际上对基因表达的表现遗传调控及其在疾病发生、发展过程中的作用给予了高度的关注, 主要的 DNA 甲基化酶、大量的组蛋白修饰酶、重塑复合物成分蛋白及其基因被陆续发现, 它们在生命活动中的功能和疾病发生、发展中的作用被逐渐阐明, 在细胞内调控 DNA 甲基化和组蛋白修饰的机制方面也获得了许多重要发现。

进一步的研究将揭示调控 DNA 甲基化、组蛋白修饰以及染色质重塑的各种信号、因子如何整合各种不断变化的环境信号, 形成可被细胞内转录机器阅读的表现遗传信息, 从而指导基因的表达与否及表达水平, 使特定基因在恰当的时间和空间表达, 使细胞分化、功能特化。在表现遗传与疾病关系的研究方面, 有待阐明表现遗传信息的异常变化与细胞功能和结构的异化是否存在因果关系, 如: 与细胞恶性转化不同阶段相应的特征性异常表现遗传信息是什么? 环境因素在各种重大疾病发生、发展过程中究竟怎样起作用? 等等重要科学问题。

表现遗传研究成果, 可丰富基因表达调控的生理功能与病理变化的分子机制, 进而促进相关生命科学各领域的重大进步和揭示生命体有序的奥秘; 同时由于表现遗传信息大多是可逆的, 因此阐明细胞内表现遗传调控的内源性机制, 将帮助确立药物靶点, 研制基于表现遗传学原理的药物, 实现对许多重要疾病的临床干预, 提升人类的健康水平。

miRNA: 细胞分化、发育和肿瘤发生中的 RNA 调控

屈良鹄

中山大学基因工程教育部重点实验室, 广州, 510275

2001 年几个实验室分别在线虫、果蝇和哺乳动物中发现许多长度在 21-23 核苷酸的内源单链小分子 RNA, 被命名为微 RNA(microRNA, miRNA)。由此向前追溯, 1993 年在线虫中发现的 lin-4 是第一种 miRNA, 它参与控制线虫的发育时序。目前已发现 miRNA 是一个巨大的小分子非编码 RNA 家族, 广泛存在于各种动植物中, 参与生命过程中一系列重要进程, 包括细胞分化、细胞凋亡、胚胎发育和组织形态建成。特别是最近发现一系列与肿瘤发生相关的 miRNA 和由人类病毒编码的 miRNA, 提示 miRNA 在哺乳动物基因表达调控中具有重要的作用。

据最新报道, 人类基因组里编码蛋白基因中大约三分之一可能是由 miRNA 调控的, 进一步推测 miRNA 能通过调控蛋白质基因表达谱来决定组织和细胞的特异性基因表达。这表明 RNA 在细胞机制中所起的作用远超出先前的认识, 对该领域的研究也才刚刚开始。miRNA 主要通过对 mRNA 的专一性降解或 mRNA 翻译活性的抑制来介导转录后基因表达的调控, 代表了一种新的 RNA 调控方式。

到目前为止, 已经有两千多种 miRNA 在各种生物中被报道。以前一般估计 miRNA 基因的数量约为该种生物蛋白质基因数的百分之一, 而最新的估计已增加到蛋白质基因数的 4%。对 miRNA 的研究为人们进一步认识生命中遗传信息表达的 RNA 调控网络及其分子机制奠定基础, 并为肿瘤等重大疾病的防治提供新的思路和方法。

生物技术药物研究的概况与进展

马清均

军事医学科学院生物工程研究所，北京，100850

上世纪 70 年代出现的 DNA 重组技术和单克隆抗体技术为基础的新生物技术，成为全球发展最快的高技术之一，为生物技术医药开拓了一个新领域，产生了新型生物技术药物，从 1982 年第一个生物技术药物基因重组胰岛素出现至今，已有 100 多种生物技术药物投放市场，生物技术药物占批准创新药物的比重达 1/3，占全部临床试验药物的 27%，生物技术药物仍将保持持续发展的趋势。

随着基因重组、蛋白质组学、生物信息学的研究，将更好的阐明疾病发病机理和发现新的药物靶标，极大地促进生物技术药物的研究和发展，就研究开发新药的基因组途径、个性化治疗药物、重组多肽药物、核酸药物、治疗性抗体和疫苗研究的概况与进展作一简介。

A systemic SNP survey of 123 candidate genes from important pathways for genetic susceptibility of coronary atherosclerosis in Chinese populations

黄薇

Ying Wang¹, Yi Wang², Yungang He^{1,2}, Haifeng Wang^{1,3}, Liang Xu¹, Yangfan Liu^{1,3}, Yi Wang¹, Weiwei Sun¹, Ying Wang¹, Xiaoyan Xiong¹, Aijun Sun⁴, Junbo Ge⁴, Momiao Xiong^{1,2}, Li Jin^{1,2}, Wei Huang¹

1. Chinese National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai, China; 3. Shanghai South Gene Technology Co., Ltd., Shanghai, China; 4. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, China

It has been widely accepted by researchers that the mechanism of atherosclerosis is mainly due to “response to injury”. This complex and progressive procedure involved many biological pathways, such as oxidant-antioxidant, coagulation, inflammation, lipid metabolism *etc.* Despite lots of observations have showed their correlations with atherosclerosis in *vitro* and in *vivo*, less information of a systemic association study for coronary atherosclerosis has been provided. With the initiation of the International HapMap Project, the deposition of millions of SNPs into public database and rapid improvement in SNP genotyping technology, it may facilitate us to survey the impact of genetic polymorphism to atherosclerosis by genotyping large numbers of common SNPs in large-scale association studies. Here we offer a systemic SNP survey of 123 candidate genes involved in three pathways, which is related with the pathogenesis of coronary atherosclerosis in Chinese populations. In this study, we typed overall 1518 haplotype tagging SNPs from 123 candidate genes in 916 samples (492 atherosclerotic cases and 424 controls). The result demonstrated that totally 116 SNPs and 41 haplotypes representing 38 susceptible genes were observed to be highly associated with coronary atherosclerosis. It also showed that there existed a few significant interactions between genes within and between pathways, which implicated a stronger correlation with the pathogenesis of disease. However, it is just a first glimpse to the pathogenesis of coronary atherosclerosis through a large-scale association study in Chinese populations and the further related investigation will be continued.

肝癌发生与转移的分子生物学研究

余 龙

复旦大学遗传工程国家重点实验室，上海，200433

E-mail: longyu@fudan.edu.cn

肝癌是我国常见的恶性肿瘤，有着发病率高，预后凶险，容易转移复发等特征。在发病早期常不易发现，而在晚期又缺乏有效治疗方法，因而从基因水平探讨肝癌的发生、转移机制，寻找有效的诊断、治疗方法具有十分现实的意义。

在克隆了 515 个人体基因的基础上，通过对比 110 个基因在肝癌和癌旁组织的表达丰度，筛选出在肝癌上调表达基因 51 个，下调基因 18 个。从中鉴定出 *LY43*、*G824*、*HDGF2*、*HDGF3*、*CYPJ*、*LY14B*、*Rab24*、*Rab25*、*DNLC2A* 和 *DNLC2B* 与肿瘤发生密切相关。例如①发现 *LY43* 是 *MDM2* 互作蛋白，它对 *P53* 转录活性的增强作用大于 *P14^{ARF}*，是一个可能的抑癌基因；②*HDGF2* 和 *HDGF3* 在肝癌组织中显著上调表达，稳定过表达 *HDGF2* 或 *HDGF3* 的 *NIH3T3* 细胞增殖加快，能在裸鼠皮下成瘤，故提示为致癌基因；③*LY14B* 在正常肝细胞不表达，却高丰度表达于肝癌细胞，组化显示为膜蛋白，多分布于与包膜临近的癌组织区域。转基因实验证明它具有强烈的促肝癌血管生成作用。

完成了 202 例肝癌组织标本 *P53* 调控区和全部外显子的测序分析，发现总突变率为 40%，共计 25 种突变。并据此绘制了中国人肝癌 *P53* 基因的突变频谱图。对上述 25 种突变分别进行了功能分析，如转录因子活性（包括对 *p21*，*GADD45*，*BRCA1*，*MDM2* 等下游基因的转录激活作用），促凋亡作用，对克隆形成的负调控，对细胞周期的调节功能等。还分析了导致功能变化的分子机制。如突变后构象变化对磷酸化位点的影响，对（与 *pin-1*，*Aik1* 等）分子互作能力的影响。

分组报告

水稻中小分子 RNA 的寻找

李洋, 李伟, 赵波涛, 姚成果, 秦文明, 魏家绵¹, 金由辛²

1. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 上海, 200032;
2. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

收集不同时期水稻的不同组织, 制备了十个水稻小分子 RNA (约 20-30 核苷酸) 的 cDNA 库。具体方法为从水稻组织中抽提出总 RNA, 用 PAGE 电泳分离 20-30 核苷酸长度的小分子 RNA, 在小分子 RNA 的 5' 和 3' 端各加 20 核苷酸长度的 ODN 接头, 两个接头的序列不同但其中均有相同的限制性内切核酸酶位点, 5' 接头两端均无磷酸根, 3' 接头的 3' 末端为双脱氧修饰, 其目的均为降低加接头时辅反应的发生。经 PCR 扩增后, 用限制性内切酶处理, 用 DNA 连接酶连接成基因串 (长度在 500-1000 核苷酸之间)。克隆测序。共获得 6000 多个 20-30 长度的核苷酸序列。检索水稻基因组数据库, 排除基因组内没有的序列 (可能来自污染的细菌等)、明确被定为如 mRNA、tRNA、rRNA 等已知 RNA 内的序列 (为已知 RNA 的降解物)。对于能在基因组内定位又不是降解而产生的序列, 则提取该序列上下游各 200 核苷酸序列, 用 mfod 程序对总长度约 420-430 核苷酸的序列进行二级结构模拟, 共找到了 150 个处于发夹结构内的小分子 RNA。再通过 Northern 杂交验证、在 10 种不同植物的基因组序列或 EST 序列库中寻找同源物、排除那些临近转座元件的序列后, 基本确定了 32 种新的 miRNA 基因家族。对这些家族进行了保守性分析, 发现在一种 miRNA 的发夹结构前体上有两个 miRNA 的成熟序列, 这种现象以前未有报道。搜检已知的 miRNA 前体, 发现 miR319 的发夹茎区也有两个保守序列, 其中一个是 miRNA319。用 Northern 杂交法证明了另一个保守序列确实有成熟的转录物存在, 我们命名它为 miR319-2。对找到的 32 种 miRNA 均寻找到了它们的可能的靶基因。对这些 miRNA 的功能研究正在进行中。

siRNA 对 HepG2 2.2.15 细胞和转基因小鼠中 HBV 的基因表达及复制的抑制作用研究

杨安钢^{*}, 刘家云, 李庆霞, 黄红艳, 温伟红, 贾林涛, 王成济

第四军医大学免疫学教研室, 西安, 710032

*Tel: 029-83374528, Fax: 029-83253816; E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

HBV 的持续感染是全球关注的公共卫生问题, 在我国尤为突出。目前临床使用的抗病毒药物干扰素及核苷类似物的疗效不够满意, 使得临床抗病毒方案的实施面临极大的挑战。RNAi 能够高效、特异地关闭或降低特定基因的表达, 在抗病毒感染方面显示出广泛的应用前景。本研究成功地构建了 5 个 HBV 序列特异性 siRNA 表达载体, 酶切鉴定和 DNA 测序结果证实插入序列完全正确。重组 pSUPER 质粒与 pTK-Hyg 共转染表达 HBV 的 HepG2 2.2.15 细胞, 经潮霉素抗性筛选获得稳定的单克隆细胞株。细胞周期分析和细胞生长曲线结果显示, 导入 HBV 特异性 siRNA 表达载体对 HepG2 2.2.15 细胞的生长无明显影响。体外实验结果证实 siRNA 能高效、特异、持久地抑制 HepG2 2.2.15 细胞中 HBV 的基因表达和复制: 在 mRNA 水平上, RT-PCR 和 Northern blot 结果证实 siRNA 能显著降低 HBV mRNA 的表达; 在蛋白质水平上 siRNA 均能明显抑制相应细胞株中 HBsAg 和 HBeAg 的分泌, 免疫荧光染色和 Western blot 结果证实细胞内 HBV 抗原的合成减少; 荧光定量 PCR (FQ-PCR) 检测结果显示, siRNA 能够高效、特异地抑制 HBV DNA 的复制; 对 HBV 抗原表达的持久、动态观察发现, 载体转录的 siRNA 能够持久、高效地抑制 HBV 基因的表达。体内实验结果发现 siRNA 对转基因小鼠血清 HBsAg 的水平、肝脏组织中 HBsAg 的表达以及 HBV DNA 的复制均有明显的抑制作用, 同时 ALT 的测定结果表明注入 siRNA 表达载体对 HBV 转基因小鼠肝脏无明显损害。体内外的实验结果表明, 针对 HBV 的 siRNA 能高效地抑制体外培养的 HepG2 2.2.15 细胞和转基因小鼠体内 HBV 的基因表达和复制, 这为 HBV 感染的治疗提供了理论依据。

细胞凋亡诱导因子 CIDE-B 基因的细胞特异性表达调控研究

答亮, 李栋, 李载平, 赵慕钧

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

CIDEs (Cell death-inducing DFF45-like effectors) 是一个具有诱导细胞凋亡活性的蛋白家族。作为该家族的成员之一, 人类 CIDE-B 基因有长短两个转录本, 在肝脏和脾脏中高度表达, 在其它组织中表达量较低或者几乎检测不到。RT-PCR 检测显示, CIDE-B 基因在 BEL-7404 和 HepG2 细胞株中表达, 而在 SMMC-7721、HeLa、HEK-293T 和 Jurkat 细胞中都不表达。为研究 CIDE-B 基因的组织 and 细胞特异性表达调控模式, 我们克隆并分析了基因的启动子区域。5'和 3'缺失分析表明, 该基因具有 2 个启动子: 位于翻译起始位点上游 3628 和 3345 bp 之间的上游启动子和位于翻译起始位点上游 204 和 1 bp 之间的内部启动子, 它们分别控制 CIDE-B 基因长、短两个转录本的表达。凝胶阻滞和点突变实验显示, Sp1 和 Sp3 均能结合这两个启动子, 并调节它们的基本活性。序列分析表明, CIDE-B 上游启动子位于一个 CpG 岛内。由于 CpG 岛甲基化是基因表达调控的重要方式之一, 我们对多个细胞株进行上游启动子区 DNA 甲基化分析。结果显示, 只有在表达 CIDE-B 长转录本的 BEL-7404 细胞中, 该区域甲基化程度很低, 而在其它不表达 CIDE-B 的细胞株 (SMMC-7721、HeLa、HEK-293T 和 Jurkat) 中, 该区域都高度甲基化。HepG2 细胞只表达 CIDE-B 短转录本, 其上游启动子区域同样处于高度甲基化状态。此外, 利用 SssI 甲基转移酶将上游启动子完全甲基化, 转染细胞发现启动子的活性几乎完全丧失; 利用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5'-aza-dC 处理不表达 CIDE-B 的 SMMC-7721、HeLa 和 HEK-293T 细胞, 均能诱导 CIDE-B 基因表达。这些结果表明上游启动子区域 CpG 位点甲基化控制了 CIDE-B 基因长转录本的细胞特异性表达。另一方面, CIDE-B 内部启动子 GC 含量较低, 只有 1 个 CpG 位点, 其活性受甲基化调控的可能性不大。进一步分析发现启动子区域含有 2 个肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α , HNF4 α) 的潜在作用位点。凝胶阻滞、缺失和点突变实验显示, 其中一个位于翻译起始位点上游-142/-130 bp 的 HNF4 α 作用位点能结合 HNF4 α , 并介导 HNF4 α 对于 CIDE-B 内部启动子活性的增强作用。此外, 在不表达 CIDE-B 的 HEK-293T 细胞株中导入外源 HNF4 α 因子, 能够激活 CIDE-B 短转录本的表达, 而对长转录本不产生影响。这些结果表明 HNF4 α 因子对 CIDE-B 基因短转录本的细胞特异性表达起着重要调控作用。总之, 我们的工作较深入的阐明了人类 CIDE-B 基因细胞特异性表达调控机制, 由此发现了一个新的基因表达调控模式, 即通过表观遗传和遗传水平上的双重调控实现基因的细胞特异性表达。

干扰素通过顺序激活 PKC δ -JNK-STAT1 调节磷脂爬行酶 1 的表达

赵克温, 李栋, 赵倩, 陈国强

中国科学院上海生命科学研究院健康科学中心, 上海市重庆南路 225 号, 200025
“细胞分化与凋亡”教育部重点实验室, 上海市重庆南路 280 号, 200025

磷脂爬行酶 1 (phospholipid scramblase 1, PLSCR1) 属于钙离子结合的 II 型膜蛋白, 但非棕榈酰化 PLSCR1 也进入细胞核内并结合基因组 DNA。目前的研究表明, PLSCR1 可能在许多生长因子和细胞因子诱导的细胞增殖、分化、凋亡及干扰素 (interferon, IFN) 的抗病毒效应中发挥重要作用。已有的研究结果证实, IFN 和某些分化诱导剂 (如全反式维甲酸 *all-trans* retinoic acid, ATRA) 可以诱导 PLSCR1 蛋白表达, 但是其表达调控机制有待进一步研究。我们的研究表明, PKC δ 特异性的抑制剂 rottlerin 及 PKC δ 显性负突变的质粒可以明显拮抗 IFN 诱导的 PLSCR1 的表达。IFN 在 STAT1 缺陷的 U3A 细胞中不能改变 PLSCR1 的表达; U3A 细胞转染野生型 STAT1 的质粒可以使细胞恢复 IFN 诱导的 PLSCR1 表达上升而转染 STAT1-727 位丝氨酸突变的质粒则不能, 说明 PKC δ 对 IFN 诱导的 PLSCR1 表达的影响依赖于 STAT1-727 位丝氨酸的磷酸化。由于 JNK 特异性的抑制剂 SP600125 及 JNK 显性负突变的质粒即可以抑制 STAT1 丝氨酸的磷酸化, 又可以抑制 PLSCR1 的表达, 说明, JNK 也参与 IFN 诱导的 STAT1 的活化及 PLSCR1 的表达。进一步的实验表明, PKC δ 特异性的抑制剂 rottlerin 及其显性负突变的质粒可以抑制 IFN 诱导的 JNK 激活, 而 JNK 特异性的抑制剂 SP600125 及 JNK 显性负突变的质粒对 PKC δ 的活性无任何影响, 说明 JNK 参与 PKC δ 介导的 STAT1 的激活。总之, 我们的结果显示, IFN 诱导的 PLSCR1 的表达需要顺序激活 PKC δ -JNK-STAT1。

炎症反应相关基因环加氧酶-2 的转录调控机制

朱 应

武汉大学生命科学院, 病毒学国家重点实验室, 武汉, 430072

Cyclooxygenase (COX) is a rate-limiting enzyme in the biosynthetic pathway of prostaglandins and thromboxanes from arachidonic acid. Prostaglandins play important roles in many biological processes. Altered prostanoid production is associated with a variety of illnesses, including acute and chronic inflammation, cardiovascular disease, and colon cancer. Two isoforms of COX were described, COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in almost all tissues, while COX-2 is the inducible form of the enzyme, which is expressed in response to inflammatory and other physiological stimuli and growth factors and is involved in the production of those prostaglandins that mediate pain and support the inflammatory process. As an immediate early response gene, promoter regions of COX-2 contain a classical TATA box, an E-box, and a series of binding sites for transcription factors such as nuclear factor κ B (NF- κ B), NFAT/AP-1, nuclear factor IL-6/CCAAT-enhancer protein, and cyclic AMP-response element CRE-binding proteins (C/EBP), which regulate COX-2 gene expression in transcriptional and post-transcriptional levels. It has been shown that several kinds of viral proteins, such as LMP-1 of Epstein-Barr Virus (EBV), gp120 of Human Immunodeficiency Virus (HIV), HBx of Human Hepatitis B Virus (HBV), are capable of stimulating COX-2 through a wide range of cellular transcriptional factors. In this study, we investigated the signal transduction pathways that are involved in SARS-CoV stimulated COX-2 expression.

肺癌相关新基因 CT120 两种转录本 (A/B) 的不同功能

何祥火, 潘东宁, 万大方

上海交通大学肿瘤研究所, 癌基因及相关基因国家重点实验室
上海, 200032

通过定点克隆和 RACE 等方法从染色体 17p13.3 区域获得一个新基因 CT120。CT120 基因有两种转录本, 分别为 CT120A 和 CT120B。

CT120A: cDNA 全长 2145bp, 含 5 个外显子, 编码 257 个氨基酸, N 端含有一个信号肽序列及 7 个跨膜区, 蛋白定位于细胞质膜上, 可能是 G 蛋白偶联受体超家族的成员。CT120A 在正常肺中低表达或不表达, 在肺癌及其它肿瘤细胞株、肺癌组织中高表达, 体外可促进 NIH/3T3 细胞的克隆形成和细胞增殖, 体内促进肺癌细胞裸鼠成瘤。采用 RNA 干扰技术可特异性降低 CT120A 在肺癌细胞株中的表达。CT120A 表达下调后使细胞增殖速度减慢, 抑制软琼脂中的克隆形成和体内裸鼠肿瘤的生长。

酵母双杂交和免疫共沉淀实验证明 CT120A 可与 SLC3A2 和 GGTL3B 蛋白相互作用。促进肺癌细胞生长的作用机制探讨表明, CT120A 可上调并激活 Raf/MAPK 和 PI3K/Akt 信号转导通路的级联反应。

CT120B: 缺少 CT120A 的第四个外显子 (96 个核苷酸), 蛋白水平缺失 CT120A 蛋白的 136-167 位氨基酸 (32 个氨基酸)。即 cDNA 全长 2049bp 含 4 个外显子, 编码 225 个氨基酸, 含 6 个跨膜区。CT120B 蛋白定位于质膜和胞浆中。CT120B 在正常肺组织中的表达高于肺癌细胞株。CT120B 过表达可抑制肺腺癌细胞生长和软琼脂集落形成。裸鼠成瘤实验可抑制肿瘤生长。CT120B 抑制细胞生长的作用机制研究表明, 过表达 CT120B 可诱导细胞周期发生 G1/S 期停滞。

国际人类基因组单体型图计划及其应用

曾长青, 杨焕明等, BGI HapMap 课题组

中科院北京基因组研究所
E-mail: czeng@genomics.org.cn

历时多年的人类基因组测序计划的完成揭示了人类自身遗传编码的基本框架,其本身和由此产生的基因组学深入研究还显示出人类的个体差异的主要分子基础,即单核苷酸多态性,简称 SNP (single nucleotide polymorphism)。作为基因组中最广泛存在的遗传多态形式,人类基因组中多达千万的 SNPs 包含着包括对于复杂性疾病的易感性等绝大部分个体间遗传差异的主要答案。然而,对于涉及多个基因和多条代谢途径的复杂性疾病来说,每个相关 SNP 对于表现型的贡献是微效的,不但在研究上具有极大困难,更在经费上产生极大难度。由此,可视为测序计划续集的国际单体型图计划于 2002 年 10 月启动,并预计 3 年完成。其目标为通过对来自不同人群的 270 个全基因组的高密度 SNP 分型鉴定,确定人类基因组中 DNA 序列差异的常见分布模式和连锁不平衡性质并提供可以覆盖常见单体型的 tag SNPs,从而为确定疾病相关基因和产生易感性差异的相关 SNPs,单体型,或高度连锁不平衡单体型 blocks 提供重要的基础数据和有效工具。

这一六国合作的重大项目主要分两部分进行。Phase 1 由各个参与中心对所有样品进行 5 kb 密度的 SNP 分型,Phase 2 进一步提高分型密度。目前 Phase 1 的数据产生已经全部完成,其中中国团队承担 10%的分型任务,负责 3 号,21 号和 8 号染色体短臂的 genotyping。HapMap 及其卫星项目生成了极大量的群体基因组的宝贵数据,仅中国团队就产生超过 28,000,000 的 genotypes。同时,大量的单体型和连锁不平衡数据,tag SNPs 以及算法等都已经免费发布,是群体遗传学、疾病相关研究和进化分析等不可多得的数据资源。本报告将着重介绍 HapMap 的概况和所完成内容,主要成就和可利用资源,中国团队的进展和部分研究结果,以及对于 HapMap 的运用与范例介绍。

小鼠核受体 mLRH-1 新异构体的发现和鉴定

高大明, 王林芳, 刘晶, 孔玉英, 汪垣, 谢幼华

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

孤儿核受体 LRH-1 (Liver receptor homologue 1) 在成体的胆固醇代谢和胚胎发育过程中都有极为重要的生物学功能。*mlrh-1* 基因剔除的小鼠在胚胎发育早期 (ED. 6.5) 死亡。目前对 *mlrh-1* 基因在胚胎早期发育过程中表达的调控机制仍不清楚。我们利用小鼠胚胎干细胞 (ES 细胞) 作为模型系统研究发现, *mlrh-1* 在 ES 细胞中有较高的表达, 但已知的 *mlrh-1* 启动子 (*P1*) 在 ES 细胞中却几乎没有活性, 而且已知的转录本 (*v1*) 在 ES 细胞中也检测不到。通过 EST 比对、RT-PCR 和 Western blot 等实验, 我们在 ES 细胞中发现了一种 *mlrh-1* 的新转录本形式 (*v2*), 该形式编码一种 mLRH-1 的新异构体 (V2)。*v2* 转录本由一个在 ES 细胞中有高活力的新启动子 (*P2*) 所调控, 该启动子含有在 ES 细胞中具有高活力的转录调控元件。在小鼠胚胎发育过程中, *v2* 转录本持续表达, 而 *v1* 在胚胎发育的中后期才表达; 在成体小鼠中, *v2* 和 *v1* 的组织表达分布部分重叠, 在 LRH-1 具有重要生理功能的某些组织 (如卵巢) 中, *v2* 是主要的表达形式, 而 *v1* 的表达不能被检测到。产生类似 V2 异构体的现象在大鼠中也同样存在。这种 mLRH-1 新异构体的发现表明 *mlrh-1* 在胚胎发育和成体组织中有非常复杂的调控机制, 对于进一步深入研究 LRH-1 在胚胎发育和成体中的生物学功能有重要的意义。

ISL1 与 BETA2 在胰岛素基因转录调控中的相互作用

王卫平, 彭斯扬, 孟君, 李涛, 张晖, 李彦明, 陈苹, 马康涛, 周春燕

北京大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京, 100083

目的: 胰岛因子 1 (islet 1, ISL1) 是 LIM 同源框蛋白家族成员, 在胰岛细胞发育中具有重要作用, 但在胰岛素基因转录调控中的作用尚未阐明。本研究初步探索了 ISL1 调控胰岛素基因表达的作用途径和方式。**方法:** 构建 *isl1* 基因编码区全长序列以及同源结构域、LIM1、LIM2 结构域的原核、真核表达载体。利用荧光素酶报告体系, 对 ISL1 在胰岛素基因转录调控中的作用进行了研究; 利用免疫共沉淀、GST-pull down 实验对 ISL-1 在胰岛素基因转录调控中的作用方式进行了探索。**结果:** 首先通过荧光素酶实验, 证明了 ISL1 是胰岛素基因的激活性转录因子, 并与 BETA2 (碱性螺旋环螺旋蛋白家族成员, 参与胰岛发育调控) 具有协同激活作用; 利用免疫共沉淀实验发现 ISL1 与 BETA2 存在于同一个复合体中; GST-pull down 实验证明 ISL1 与 BETA2 存在直接的相互作用, 该相互作用是由 ISL1 的 LIM 结构域和 BETA2 的碱性螺旋环螺旋结构域来介导的。**结论:** ISL1 可与 BETA2 协同激活胰岛素基因的转录。

重组嵌合 Cbl 泛素连接酶对乳腺癌细胞生长的影响

李霞, 张璟, 刘新平, 刘云才, 药立波

第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安, 710033

E-mail: lixia7305@yahoo.com.cn

Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) 是一类泛素连接酶 E3, 由 N-端保守的 TKB 和 RING 结构域以及其它蛋白-蛋白结合模体组成。Cbl 分子中的 TKB 及其他结构域可以识别并结合靶蛋白, RING 结构域负责募集泛素结合酶 E2, 从而启动泛素化降解途径。Cbl 以这种方式参与细胞内信号转导的负向调控, 这对于维持细胞的内稳态具有重要作用。Cbl 突变后可成为癌蛋白; 许多肿瘤细胞则表现为与增殖有关的分子 (如受体型蛋白酪氨酸激酶, RTK) 因发生突变或其它遗传学改变不受 Cbl 负调控。这些现象提示, 加强或重建 Cbl 的负调控作用, 或许能够从受体活化的上游信号开始抑制肿瘤细胞增殖。

为利用 Cbl 的泛素连接酶活性特异性地泛素化癌相关蛋白 HER2 以促进其降解, 从而对 HER2 阳性的肿瘤生长进行负向调节, 我们构建了数个重组嵌合 Cbl 分子截短体。这些嵌合分子既保留了 Cbl 泛素连接酶活性所需要的 Cbl N 端 (包含 TKB 与 RING 结构域), 并且 TKB 中原有的 SH2 分别置换为可以结合 HER2 并且介导其活化信号的下游信号分子 Grb2、Grb7、p85 及 Src 的 SH2, 分别命名为 CblN/Grb2、CblN/Grb7、CblN/p85 及 CblN/Src。同时构建了 Cbl 全长 (Cbl)、N 端截短体 (CblN) 以及另外一类 U-box 泛素连接酶 CHIP (可以促使 HER2 下调) 作为对照。

将上述分子分别稳定转染 HER2 阳性的乳腺癌细胞系 SK-BR-3, 我们发现在 SK-BR-3 细胞中稳定表达的 Cbl、CblN/Grb2、CblN/Grb7、CblN/p85、CblN/Src 或 CHIP 可结合并下调 HER2 蛋白水平, 细胞的克隆形成能力降低。进一步将 Cbl/Grb7、Cbl/Src 及 CHIP 基因亚克隆至可诱导表达载体 pIND 并稳定转染 SK-BR-3 细胞株, 发现 ponA 诱导表达相应的目的蛋白后, 细胞的 HER2 表达下调, 细胞生长减慢并发生明显的 G1 期阻滞, 克隆形成能力降低。

进一步将 CblN/Grb2 和 CHIP 分别构建入原核表达载体 pGEX4T-2 中并表达和纯化 GST-CblN/Grb2 及 GST-CHIP 融合蛋白。体内外结合实验及泛素化实验均证实 CblN/Grb2 能够结合靶蛋白 HER2 且具有泛素连接酶活性。这表明重组嵌合 Cbl 泛素连接酶是通过促进底物泛素化的方式下调相应靶蛋白的表达, 从而实现了其抑制肿瘤生长的作用。

此项研究为加强或重建 Cbl 泛素连接酶对某些致癌相关蛋白的泛素化负调控作用提供了一种新的策略, 从而也为肿瘤的治疗提供了一条新的思路。

Oral Adeno-associated Virus-sTRAIL Gene Therapy Suppresses Human Hepatocellular Carcinoma Growth in Mice

Hong Ma, Yanxin Liu, Shilian Liu, Ruian XU and Dexian Zheng (郑德发)

National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Extracellular domain of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (sTRAIL) may function as soluble cytokines to kill various cancer cells selectively without toxicity to most normal cells. In the present study, we constructed a series of recombinant adeno-associated viruses vectors expressing the extracellular domain of human TRAIL fused with signal peptides of human insulin, interferon, human growth hormone, and serum albumin, respectively, and designated as ISN-T, IFN-T, HGH-T, and Alb-T. Transduction of human SMMC-7721 liver cancer cells with ISN-T led to higher levels of TRAIL₉₅₋₂₈₁ protein expression in the cell culture media and produced more apoptosis in the cells *in vitro* than those with IFN-T, HGH-T, and Alb-T. The therapeutic potential of ISN-T was then evaluated in a transplanted mouse model established by injection of human liver cancer SMMC-7721 cells subcutaneously. Subsequent oral or *i. p.* administration of ISN-T resulted in a rapid, high level and long time expression of the soluble TRAIL in sera and livers of the animals, and effective suppression of tumor growth, while without toxicity to normal hepatocytes. These data strongly suggest that it is possible to increase soluble TRAIL expression to make full use of tumoricidal activity of TRAIL as a therapeutic strategy. In conclusion, we provided evidences that oral administration of AAV-TRAIL might be a very important alternative route with practical significance for cancer gene therapy in clinical medicine.

人纤溶酶原 K5 抑制血管增生的作用及结构基础

高国全, 蔡卫斌, 杨霞, 李朝阳, 陈静, 杨中汉, 葛啸虎, 罗超权

中山大学基础医学院生化教研室, 广州, 510089

目的: 探讨人纤溶酶原 K5 (plasminogen kringle 5, K5) 抑制血管增生活性与其 Kringle 结构的关系, 并获得具有生物活性的重组 K5 突变体蛋白。**方法:** 根据 K5 蛋白 (Pro⁴⁵²-Ala⁵⁴²) 的结构特征和二硫键分布特点, 设计 K5 的 4 个缺失突变体: K5 mut1 (Cys⁴⁶²-Cys⁵⁴¹, 保留 K5 kringle 环 3 个完整二硫键但除去 N 端和 C 端氨基酸臂), K5 mut2 (Cys⁴⁸³-Cys⁵³⁶, 打开 kringle 环, 只保留二个二硫键), K5 mut3 (Met⁴⁶³-Cys⁵⁴¹, 在 K5 mut1 的结构基础上, 删除氨基酸 Cys⁴⁶², 打开第一个二硫键), K5 mut4 (Gln⁴⁸⁴-Cys⁵³⁶, 在 K5 mut2 的结构基础上, 删除氨基酸 Cys⁴⁸³, 打开第二个二硫键); 以野生型人纤溶酶原 K5 cDNA 为模板, 用 PCR 方法得到编码缺失突变体的 DNA 片段, 定向克隆入 pET22b (+) 表达载体, 通过 DNA 序列分析鉴定重组体定向连接和阅读框架正确并没有突变后将其转化进 *E.coli* BL21 (DE3), IPTG 低温诱导蛋白表达, 产物用固化 Ni²⁺-His Bind Resin 亲和层析和高浓度甘油透析方法纯化, SDS-PAGE 和 Western-blot 分析鉴定; MTT 法分析重组蛋白对人视网膜血管内皮细胞 (HRCEC)、周皮细胞、正常肝细胞、Bel7402 肝癌细胞和 Hepa 肝癌细胞的影响; 在种植性肝癌鼠模型和氧诱导鼠视网膜血管增生模型上观察并比较 K5 及其突变体蛋白的抗血管增生活性。**结果:** 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 株中高效表达了 K5 及其突变体蛋白, MALDI-TOF-MS 测定 5 种重组蛋白的相对分子量, 并用 Western-blot 方法 (I 抗为抗 His-tag 抗体) 进一步定性鉴定; MTT 法分析三种重组蛋白对 HRCEC 增殖影响显示: K5 和 K5 mut1 能浓度依赖性抑制 HRCEC 的增殖, EC₅₀ 分别约为 70nmol/L 和 30nmol/L; K5 mut2、K5 mut3 和 K5 mut4 对 HRCEC 增殖影响不明显; K5 及其突变体蛋白对周皮细胞、正常肝细胞、Bel7402 细胞和 Hepa 细胞的增殖均无抑制作用; 体内实验显示: K5 和 K5 mut1 均具有明显的抑制小鼠肿瘤生长的作用, 抑瘤率分别为 62.1%和 75.3%, 而 K5 mut2、K5 mut3 和 K5 mut4 对小鼠肿瘤生长无明显抑制作用。在氧诱导鼠视网膜血管增生模型观察到 K5 及 K5 mut1 均可抑制氧诱导的视网膜血管增生, 且后者强于前者, 其它突变体对新生血管无明显影响。**结论:** 完整的 Kringle 结构 (包含三个二硫键) 是维持人纤溶酶原 K5 抗血管增生活性所必需; K5 mut1 是比 K5 分子量更小、活性更强的新型血管增生抑制因子。

人白血病多药耐药细胞株 K562/A02 中 sorcin 基因表达及其意义研究

许元富, 周圆, 范冬梅, 谭耀红, 齐静, 邵晓风, 熊冬生, 杨纯正

中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所, 实验血液学国家重点实验室, 天津, 300020

肿瘤多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是肿瘤耐药的主要形式, 也是造成肿瘤化疗失败的主要原因之一。MDR 的产生是多因素的, 可能有许多机制在不同水平以不同的方式共同参与了肿瘤细胞对化疗药物的耐受。为了了解多药耐药可能的新的分子机制, 发现参与白血病耐药机制的相关基因, 寻找诊断和治疗肿瘤耐药的新靶点和信策略, 我们选用 AtlasTM Human cDNA Expression Microarray 对 K562 与其耐药细胞系 K562/A02 mRNA 的表达进行了差示分析, 结果发现 5 个基因在 K562/A02 细胞中的表达水平明显高于 K562 细胞, 其中一个就是可溶性耐药相关钙结合蛋白基因 (soluble resistance-related calcium-binding protein, sorcin), 本研究在以上工作基础上, 对 sorcin 基因与白血病细胞多药耐药之间的相关性进行进一步的实验研究。

目的: 研究 sorcin 基因与白血病多药耐药细胞株 K562/A02 耐药表型的相关性。**方法:** 用 Northern Blot 和 Western Blot 方法, 检测 K562 和 K562/A02 细胞 sorcin 基因和蛋白表达水平的差异。设计针对 sorcin 基因的反义寡核苷酸, 通过脂质体将其导入 K562/A02 细胞, 通过 Western Blot 方法检测转染前后细胞内 sorcin 蛋白表达的变化, MTT 方法检测转染后细胞对阿霉素敏感性的变化。**结果:** Northern Blot 和 Western Blot 结果表明, K562/A02 细胞中 sorcin 表达水平明显高于 K562 敏感细胞。将 sorcin 基因反义寡核苷酸转入 K562/A02 细胞后, 细胞内 sorcin 蛋白表达明显下降, 对阿霉素的敏感性提高了 2.7 倍。**结论:** sorcin 参与了白血病多药耐药细胞株 K562/A02 耐药表型的形成, 有望成为今后白血病多药耐药治疗的新靶点。

多发性骨髓瘤负性相关基因 DAZAP2 研究

胡维新, 石奕武, 沈熔, 任维, 汤立军, 谭达人

中南大学生物科学院技术学院分子生物学研究中心, 长沙, 410078

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞异常增生的血液系统恶性肿瘤, 发病机制复杂。染色体畸变导致癌基因与抑癌基因的表达失调、骨髓微环境中细胞因子的相互作用、凋亡相关基因的改变、甚至病毒编码的生长因子参与等多因素协同作用, 使其呈现出多阶段的恶性转化过程。为了寻找 MM 新的相关基因, 应用 cDNA 芯片对初诊 MM 患者和正常对照人的骨髓单个核细胞的 mRNA 进行检测。结果显示, DAZAP2 (deleted in azoospermia associated protein 2) 在患者骨髓单个核细胞中表达下调最为明显。根据 cDNA 芯片的结果, 采用半定量 RT-PCR 检测了 MM 样品中 DAZAP2 的表达。在 30 例正常人骨髓中 DAZAP2 均表达 (100%, 30/30); 36 例初诊患者中仅 12 例表达 (33.3%, 12/36), 其余 24 例均不表达 (66.7%, 24/36), DAZAP2 在 MM 中表达明显下调 ($p < 0.001$)。用抗 DAZAP2 多克隆抗体对 MM 样品进行 Western blot 检测, 得出与半定量 RT-PCR 一致的结果。

Northern blot 分析 DAZAP2 基因在多种人正常组织中均有表达, 其转录本大小为 1.9 kb 左右。使用 5'-和 3'-RACE 技术, 从正常人骨髓单个核细胞中克隆到一 1913 bp 的 cDNA 全长序列 (Genbank 号为 AY430097), 与来源于人睾丸的 DAZAP2 高度同源。该序列有短的 5'非翻译区与较长的带有 polyA 尾的 3'非翻译区, 开放阅读框从 84 位碱基至 590 位碱基, 长度为 507 个碱基, 编码 168 个氨基酸、分子量为 17 kD 的蛋白。利用生物信息学分析发现, 人 DAZAP2 基因为单拷贝基因, 含有 4 个外显子, 位于 12 号染色体上; DAZAP2 蛋白具有 1 个蛋白激酶 C 磷酸化位点, 1 个富含脯氨酸区和多个 SH2 和 SH3 结合位点。人 DAZAP2 蛋白与鼠 prtb (proline codon-rich transcript, brain expressed) 蛋白高度同源。Prtb 通过黏附介导的机制参与细胞生长与分化的调节。比较分析不同脊椎动物的 DAZAP2, 发现脊椎动物 DAZAP2 在进化过程中高度保守, C 端部分比 N 端更保守。通过构建重组真核表达质粒 pEGFP-N2-DAZAP2, 采用脂质体介导的基因转移技术, 转染 COS7 细胞, 瞬时表达后, 用激光共聚焦显微镜观察, 可见 DAZAP2 蛋白主要定位于细胞质中不连续的泡状结构上。以上这些结果提示, DAZAP2 是 MM 的负相关基因, 其表达缺失可能与 MM 的发病有关, 临床上可作为 MM 诊断的分子标志。

乙酰化对造血转录因子功能的调控作用

张庆军, 刘德培, 梁植权
协和医科大学基础所, 北京, 100005

造血发生是有多种转录因子参与的复杂过程。组蛋白乙酰化酶和去乙酰化酶对造血相关转录因子的功能调节起了重要作用。转录因子 GATA-1, NF-E2, EKLF, PU.1 等募集组蛋白乙酰化和去乙酰化酶到染色质对组蛋白进行修饰, 改变染色质结构, 最终使靶基因的表达发生改变。另一方面, 转录因子本身也可以被乙酰化和去乙酰化, 在这一过程中, 转录因子的活性发生改变, 包括 DNA 结合活性, 转录激活和抑制活性, 以及与其他蛋白质相互作用的活性。造血转录因子和组蛋白乙酰化酶、去乙酰化酶的相互作用对研究组织特异和链系特异的转录因子的基因表达调控提供了良好的模型。重要的组蛋白乙酰化酶 (HAT) 包括 CBP/P300、PCAF 等, 往往是转录共激活因子 (coactivator)。它们不但可以被特异的转录因子募集到特定的染色质部位将组蛋白乙酰化, 而且可以将众多的转录因子乙酰化, 调节这些转录因子的功能。造血相关的转录因子 GATA-1 是一个典型的例子。

GATA-1 是第一个被发现的造血转录因子。CBP/P300 可以乙酰化它的 C 端亮氨酸丰富区。这一乙酰化作用并不改变其 DNA 结合活性, 而可能是增加了转录调节蛋白接触染色质的能力, 从而促进基因转录。GATA-1 的乙酰化也会增加组织特异的组蛋白乙酰化, 主要发生在珠蛋白基因簇的 LCR 和 β -珠蛋白基因启动子, 从而增加转录。GATA-1 还可以与组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) -1、3、4、5 相互作用。HDAC-5 可通过与 GATA-1 作用抑制转录激活, 调控红系发生过程。

其他的造血相关转录因子与组蛋白乙酰化酶的作用及其效应总结于下表。

Table. Regulation of hematopoietic transcription factors by HAT.

HAT	effects of acetylating transcription factor itself	DNA binding activity	effects of acetylating histone
GATA-1 CBP/P300	β -globin gene expression \uparrow Erythroid differentiation \uparrow	not change	H3, H4 at β -globin LCR β -globin gene expression \uparrow
NF-E2 CBP/P300	β -globin gene expression	increase	—
EKLF CBP/P300, PCAF	transcriptional activation	not change	—
GATA-2 CBP/P300	Erythroid differentiation \downarrow	—	—
TAL-1 P300, PCAF	Erythroid differentiation \uparrow	increase	—
PU.1 CBP	—	—	β -globin LCR erythroid differentiation \downarrow

血红素加氧酶-2 中的碱性氨基酸对其接受 CPR 提供电子能力的影响

王秀宏¹, 赵炜明¹, 周虹²

1. 哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室, 哈尔滨, 150086;

2. 军事医学科学院野战输血研究所, 北京, 100850

微粒体中的血红素加氧酶可以利用分子氧和 NADPH-细胞色素 P-450 还原酶 (NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR) 提供的电子, 区域特异性地催化血红素转变为 α -胆绿素、CO 和铁离子。为鉴定人血红素加氧酶-2 (HHO-2) 中的碱性氨基酸残基对接受 CPR 提供电子的能力的影响, 我们制备了 4 种血红素加氧酶-2 的突变型, 其中精氨酸 (R)、赖氨酸 (K) 被置换成丙氨酸 (A) 或甘氨酸 (G)。方法: 应用 PCR 构建 4 种 HO-2 突变型酶的表达质粒。为研究血红素-血红素加氧酶复合物对接受 CPR 提供的电子的接受能力, 我们测定了血红素的降解速度。结果: 当用 CPR 作为供电子体时, 血红素加氧酶-2 的突变型 K55A、K59A、K169A 和 R205G, 对血红素的降解速率低于野生型。然而, 当用抗坏血酸作为供电子体时, 血红素的降解速率与野生型相当。结论: 由于用 CPR 和抗坏血酸做供电子体时, 血红素的降解水平存在差异, 推测这 4 个被置换的碱性氨基酸参与了 CPR 和血红素加氧酶-2 之间的电子传递过程。

七氟醚抗性新基因的功能初步研究

刘红¹, 刘玉清¹, 李君¹, 李一石¹, 陈兰英¹, 刘进²

1. 中国医学科学院, 中国协和医科大学, 心血管病研究所, 阜外心血管病医院, 北京, 100037; 2. 四川大学华西医院, 成都, 610041

目标: 吸入麻醉药自临床应用以来, 已有一百五十多年的历史, 但其作用机制至今不完全清楚, 本研究克隆了对吸入麻醉药七氟醚耐药的相关基因, 并对其基因功能进行了初步的探索, 以期从另一角度研究吸入麻醉药作用机制。

方法: 本研究采用对七氟醚敏感和耐药的果蝇品系为实验组, 以野生型黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 为对照组。应用荧光标记反转录差异显示 PCR (fluoroDDRT-PCR) 技术分离差异表达的基因片段; 从测序凝胶中分离出表达差异的片段后, 以 PCR 反应扩增这些差异片段并回收; 用 Northern 印迹杂交确证阳性差异片段; 通过 cDNA 末端快速扩增技术 (RACE) 扩增其全长 cDNA, 通过生物信息学对基因进行分析, 推测基因可能的功能。用 RT-PCR 方法分析基因在果蝇脑、胸部神经节和身体的表达水平; 在 COS-7 细胞系中进行缺氧实验以初步分析基因的功能。

结果: 和野生型黑腹果蝇比较, 从对七氟醚敏感和耐药品系中回收了 32 条差异片段, Northern 印迹杂交确证 1 条阳性片段: No.8 基因片段, 其在耐药品系中高表达; RACE 法扩增该片段获得了 2.0kb 的全长 cDNA, 位于果蝇 Chr.2R 44D1 区域内, 与果蝇 CG11669 基因高度同源, 为一功能未知基因, 通过对该基因的序列分析, 发现其含有 α -淀粉酶的结构域, 推测有可能具有 α -葡萄糖苷酶分子的功能。应用 RT-PCR 方法分析, 发现该基因在果蝇的身体中的表达水平较高, 在胸部神经节中的表达水平很低, 在头部未检测到该基因的表达。基因在 cos-7 细胞系中过表达后, 给予 cos-7 细胞缺氧和复氧, 和对照组细胞比较, 表达有该基因的细胞的细胞凋亡百分比升高, 蛋白 Akt 水平升高, 且 iNOS 蛋白的水平升高, 而 eNOS 水平不升高。

结论: 本研究结果进一步证实了前期工作用经典遗传学方法确定果蝇对吸入麻醉药七氟醚耐药基因位于第 2 号染色体上的初步结论。该基因有可能参与细胞的缺氧保护作用, 是通过 AKt 和 NO 信号通路的。

Troglitazone 对小鼠I型葡萄糖载体 (mGLUT1) 表达的影响

李天洙, 柳明洙

延边大学医学部, 延吉, 133000
E-mail: litianzhu@yahoo.com.cn

小鼠 I 型葡萄糖载体 (mGLUT1) 在脂肪、肌肉等多种组织中表达, 参与葡萄糖的代谢过程。据报道, GLUT1 在多种病理状态下有较高水平的表达, 但机理不清楚。Troglitazone 作用靶点是一种核转录因子, 即过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) γ , PPAR γ 和配体结合而激活后, 与维甲酸类受体 X (RXR α) 形成二聚体, 再结合于 PPARs 反应元件 (PPRE) 上而发挥转录调控作用。PPRE 存在于许多与糖代谢与脂类代谢相关的蛋白质中。为了探讨 Troglitazone 对小鼠 I 型葡萄糖载体 (mGLUT1) 表达的影响。本实验采用分子克隆技术, 将过氧化物酶体增殖物受体 γ (PPAR γ) 和维甲酸类受体 X (RXR α) 及 mGLUT1 cDNA 分别克隆到表达载体 pCMX 和 pGL3b 上。PPAR γ 与 RXR α 及 mGLUT1 克隆载体转染 NIH 3T3 细胞, 处理或不处理 Troglitazone, 应用荧光素酶活性测定法及 RNA 印迹等方法测定 Troglitazone 对 mGLUT1 重组体荧光素酶活性调节及对 mRNA 表达的影响。

结果表明 Troglitazone 可激活 mGLUT1 重组体荧光素酶的活性, 并且可增加 mGLUT1 的 mRNA 表达水平, 可能参与 PPAR γ 对 mGLUT1 的调节过程。

增强 C/EBP ϵ 表达对 U-937 细胞分化的影响

蔡蓉, 戴冰冰, 李珂, 钱关祥, 卢健

上海第二医科大学生物化学与分子生物学教研室, 人类基因治疗中心,
上海第二医科大学, 上海, 200025

背景与目的: C/EBP ϵ 是一种在髓系造血细胞中特异性表达的核内转录因子, 可能是髓系细胞分化过程中发挥重要作用的调控蛋白, 并且参与了一系列髓系细胞特异性基因的转录激活。C/EBP ϵ 基因缺失的小鼠中性粒细胞形态异常, 并伴随功能缺陷, 丢失了参与呼吸爆发 (oxidative burst) 与炎症反应的能力, 提示 C/EBP ϵ 对于粒系定向祖细胞的终末分化及效应细胞正常功能的发挥, 起着非常关键性的作用。在本研究中, 我们拟对 C/EBP ϵ 的细胞类型特异性表达进行探讨; 同时, 研究过量表达 C/EBP ϵ 对人粒-单核性白血病细胞 U-937 分化的影响。**方法:** 应用 RT-PCR 检测了五种不同类型的人造血系细胞 NB4、HL-60、U-937、Jurkat T 及 K-562 细胞中 C/EBP ϵ 的表达水平。应用 PCR 的方法克隆了 C/EBP ϵ 的全长编码序列, 并构建了 C/EBP ϵ 的表达质粒 pcDNA3.1-C/EBP ϵ 。电穿孔转染表达载体于 U-937 细胞, G418 筛选稳定表达的混合细胞克隆, 并应用 PCR 方法证实载体在转染细胞基因组中的整合情况。RT-PCR 与 Western blot 检测转染细胞内 C/EBP ϵ 的表达水平, 流式细胞仪检测过量表达 C/EBP ϵ 对 U-937 细胞分化的影响。**结果:** C/EBP ϵ 在急性早幼粒性白血病细胞 NB4 中表达水平最高, 在急性髓系白血病细胞 HL-60 中的表达水平次之, 在人粒-单核性白血病细胞 U-937 中表达水平较低, 而在 T 淋巴细胞白血病 Jurkat T、人红白血病细胞 K-562 中未检测到此基因的表达。据此结果, 选择 C/EBP ϵ 表达水平较低的人粒-单核性白血病细胞 U-937 作为过量表达的对象。PCR 实验证实 pcDNA3.1-C/EBP ϵ 表达质粒已整合入转染细胞基因组内; RT-PCR 与 Western blot 实验证实稳定转染 U-937 细胞内 C/EBP ϵ 的表达水平明显提高。与未转染 U-937 细胞以及稳定转染阴性对照质粒的 U-937 细胞相比, 过量表达转录因子 C/EBP ϵ 的 U-937 细胞表面粒细胞特异性抗原-CD11b 的表达得以显著增强。**结论:** C/EBP ϵ 的表达具有显著的细胞类型特异性; C/EBP ϵ 可能是髓系造血细胞向粒细胞分化过程中非常重要的转录调控因子。

HZF1 和 Annexin1 在红系细胞分化中的重要作用

张俊武, 彭瀚, 霍晓芳, 杜占文

中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京, 100005

K562 是人红白血病细胞系, 它处于干细胞分化的红系和巨核系共同祖细胞阶段而停止分化, 但血红素 (hemin) 可诱导其继续向红系分化, 因此它一直被用作研究红系分化的模型。我们利用 DD-RTPCR 方法分析 K562 细胞 Hemin 诱导前后的基因表达变化, 鉴别到 200 多个差异表达 EST。对其中两个 EST 所代表的基因在红系分化中的功能作用进行了研究。一个为我们先前从人骨髓 cDNA 文库中克隆的新的锌指蛋白基因 HZF1 (GenBank 注册号: AF244088)。另一个为已知基因—钙依赖磷脂酶结合蛋白 Annexin1 基因, 已知它参与调节细胞生长分化、凋亡等过程, 但不知其在红系分化中的作用。

Northern blot 分析验证了 HZF1 mRNA 表达随着 K562 细胞的 Hemin 诱导表达上调。构建了表达 HZF1 反义 RNA 的表达质粒 (pcDNA3.1-antiHZF1) 以及表达产生其特异干扰 RNA 的表达质粒 (pAVU6+27-HZF1RNAi), 分别转染 K562 细胞, 得到稳定转化子。通过用联苯胺染色以及红系分化标志基因表达的检测, 说明反义 RNA 和 RNA 干扰导致的 HZF1 内源表达抑制严重阻碍了 K562 细胞 hemin 诱导的红系分化, 确定了 HZF1 在红系分化中的重要作用。

利用抗 Annexin1 抗体和 Western blot 分析验证了 Annexin1 随着 K562 细胞的 Hemin 诱导表达上调。构建了表达 Annexin1 的表达质粒 (pcDNA3.1-Annexin1) 以及表达产生其干扰 RNA 的表达质粒 (pAVU6+27-Annexin1RNAi), 分别转染 K562 细胞得到稳定转化子。通过用联苯胺染色、血红蛋白含量测定以及红系分化标志表达的检测, 发现 Annexin 1 在 K562 细胞的过表达部分促进了红系分化, 而其表达抑制则几乎完全阻断了红系分化。进一步分析 Annexin1 影响红系分化的作用机制, 发现它通过增加 ERK 的磷酸化水平来实现促进红系分化的作用。在 MEK 的特异抑制剂 U0126 的作用下, 过表达 Annexin1 的稳定转化子在 Hemin 诱导后的红系分化潜能明显降低。并通过用 Ras (野生型) 和 RasN17 (负显性突变) 转染不同转化子, 发现 Annexin1 激活 ERK 是通过 Ras 依赖的途径完成的。检测了在分化过程中的细胞周期变化及周期调节蛋白的变化, 发现过表达 Annexin1 的稳定转化子在 Hemin 诱导后 p21 蛋白表达增加。这些结果提示 Annexin1 可能通过激活 Ras 依赖的 ERK 通路和增加 p21 的表达来实现其促进红系分化的作用。

参与白念珠菌菌丝生长和毒性表现的转录因子的功能研究

曹芳, 逯杨, 毛旭明, 谢伟军, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

The transcription factor Efg1, a basic helix-loop-helix protein similar to StuA of *Aspergillus nidulans* and Phd1 of *Saccharomyces cerevisiae*, is a potential target of the cAMP/PKA pathway. Efg1 mutants do not form hyphae in all liquid inducing media and show a reduced virulence in a mouse model. The Efg1 and cAMP/PKA pathway are essential for the expression of genes induced during the yeast to hyphae transition. The transcription factor Flo8 is essential for filamentous growth and biofilm formation in *S. cerevisiae*. Its function is regulated by the cAMP/PKA pathway. Blast analysis of the *S. cerevisiae* Flo8 protein sequence against the *Candida albicans* genome sequence failed to identify a Flo8 ortholog. To determine whether a similar pathway/regulation exists in *C. albicans*, we have cloned a homologue of *FLO8* from *C. albicans* by its ability to complement *flo8* in *S. cerevisiae*. A *C. albicans* genomic library was transformed into the *S. cerevisiae* *flo8* mutant and genes that complemented the *flo8* defect in invasive growth were isolated. The isolated clones were further tested for their ability to suppress the invasive growth in a *flo11* mutant. Two of the clones could suppress the invasive growth defect in *flo8* mutants, but not in *flo11* mutants. They could also suppress the filamentous growth defect of a diploid *flo8* mutant. The two clones contain a common gene that encodes a putative protein of 817 aa, with a small region highly similar to ScFlo8. We designated this gene *CaFLO8*. The conserved region in the CaFlo8 protein is also highly similar to a region in Lug, a regulator of flower-specific gene expression during flower development in *Arabidopsis*. Deletion of the *CaFLO8* in *C. albicans* completely blocked hyphal development and induction of hyphal genes in liquid media, but show enhanced filamentation under embedded conditions. In addition, *caflo8* mutant is avirulence in systemic infections in mice. These phenotypes are similar to mutants of the cAMP/PKA pathway. Comparison of transcription profiles between *caflo8* and *efg1* mutants suggest that CaFlo8 regulates a subset of Efg1 regulated genes. The protein profiles of whole extracts from wild type strain, *efg1* and *caflo8* mutants were examined using two-dimensional electrophoresis to identify the proteins related to morphological transition. Furthermore, Flo8 interacts with Efg1 *in vivo*. We suggest that the CaFlo8 and the Efg1 function together to activate the expression of hyphal specific genes and other genes in *C. albicans*.

利用组织芯片研究卵巢癌中 *FRAT1* 基因和 β -catenin 蛋白的表达情况及两者相关性

王益华¹, 刘爽¹, 周晓波¹, 朱红霞¹, 周翠琦¹, 张果¹, 全兰平¹, 白瑾峰¹, Stephen M. Hewitt², 徐宁志^{1*}

1. 中国医学科学院中国协和医科大学, 肿瘤医院肿瘤研究所, 细胞生物及分子生物学实验室, 北京, 100021; 2. Tissue Array Research Program, Laboratory of Pathology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 20892-4605, USA.

* Tel: 010-87788487, Fax: 010-67738220; E-mail: xningzhi@public.bta.net.cn

背景与目的: 卵巢癌是严重威胁女性健康的恶性肿瘤之一, 其死亡率高居妇科肿瘤之首。虽然目前卵巢癌相关研究进展迅速, 但与之相关的分子事件仍不十分清楚。许多研究已经证实 β -catenin 在卵巢癌中有异常表达, 主要表现为胞浆和/或胞核累积, 但造成 β -catenin 异常表达的原因尚需进一步研究。*FRAT1* (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas-1) 基因在一些肿瘤细胞中高表达, 而且 *FRAT1* 可以促使 β -catenin 浆核累积。为确定 *FRAT1* 在卵巢癌中的表达情况及与 β -catenin 异常表达的相关性, 本实验检测了 *FRAT1* 和 β -catenin 在卵巢癌中的表达状态, 并研究两者之间的关系。

方法: 卵巢癌组织芯片 (TARP5-T-BO-1) 上有 60 例卵巢上皮肿瘤样本, 包括 41 例浆液性腺癌、11 例透明细胞癌、5 例子官内膜样腺癌和 3 例粘液性腺癌。分别采用原位杂交和免疫组化 SP 法, 检测卵巢癌组织芯片上 *FRAT1* 和 β -catenin 的表达。

结果: 46% 的卵巢癌组织中存在 *FRAT1* 高表达, 其中 19/41 例浆液性腺癌, 4/11 例透明细胞癌, 4/5 例子官内膜样腺癌和 1/3 例粘液性腺癌高表达 *FRAT1*; 55% 的卵巢癌组织中出现 β -catenin 异常表达, 主要表现为胞浆和/或胞核累积, 其中约 59% (24/41) 的浆液性腺癌, 4/11 例透明细胞癌, 5/5 例子官内膜样腺癌和 0/3 例粘液性腺癌的 β -catenin 出现浆核累积。而且, 在卵巢浆液性腺癌中, *FRAT1* 高表达和 β -catenin 出现浆核累积的异常表达显著相关 ($P < 0.01$)。

结论: 在一些卵巢癌中, 存在 *FRAT1* 基因高表达和 β -catenin 异常表达的情况, 而且 *FRAT1* 基因高表达很可能是造成卵巢浆液性腺癌中 β -catenin 异常表达的原因之一。

PP2C 蛋白磷酸化酶调控酵母细胞线粒体 F0F1ATP 合成酶的功能

蒋伶活

天津大学药物科学与生物技术学院分子和细胞药理学系, 天津, 300072
E-mail: linghuojiang@yahoo.com.cn

细胞中许多重要过程是由蛋白质的磷酸化和去磷酸化来调节控制。蛋白质的去磷酸化是由蛋白磷酸化酶来执行。根据蛋白磷酸化酶底物的特异性, 真核细胞蛋白磷酸化酶主要有三类: 酪氨酸蛋白磷酸化酶, 丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶和双重特异性蛋白磷酸化酶。丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶又分为四个不同的亚组: PP1, PP2A, PP2B 和 PP2C。PP2C 是一类由单一组份构成的蛋白磷酸化酶, 它们的酶活性依赖于金属锰或镁离子的存在。白念珠菌是目前引起艾滋病人和化疗后癌症病人死亡的最主要的病原真菌。最近我们从白念珠菌中首次发现和鉴定了一种新的 PP2C 蛋白磷酸化酶, 我们命名它为 PTC7。它的同源基因在真核生物中普遍存在, 但 PTC7 的细胞和生物学功能还不清楚。因此, 我们首先对 PTC7 蛋白进行了细胞学定位研究, 发现在 *PTC7* 基因启动子带动下的 PTC7GFP 融合蛋白存在于白念珠菌细胞的线粒体中。然而, 我们没有观察到敲除了 *ptc7* 基因的啤酒酵母菌和白念珠菌细胞表现出任何生长和发育缺陷。以前有结果表明酵母菌 PP2C 基因在功能上存在重叠, 为了进一步认识 PTC7 的细胞和生物学功能, 我们通过酵母有性接合方法分别构建了 *PTC7* 基因和其它六个 PP2C 基因之一的双基因缺失突变体菌株 (*ptc1/ptc7*; *ptc2/ptc7*; *ptc3/ptc7*; *ptc4/ptc7*; *ptc5/ptc7* 和 *ycr079w/ptc7*)。对这六个双基因缺失突变体的表征研究发现, 在乙醇或甘油作为唯一碳源的 YP 培养基上, *ptc1* 单基因缺失菌株和以前报道的研究结果一样表现生长的缓慢, 而 *ptc1/ptc7* 双基因缺失菌株根本不能生长。这些结果表示 *ptc1/ptc7* 双基因缺失导致酵母细胞线粒体 F0F1ATP 合成酶的功能丧失, 因为酵母细胞对非发酵性碳源乙醇和甘油的利用绝对依赖于 F0F1ATP 合成酶正常功能的存在。将建于酵母多拷贝质粒 YEp24 上的啤酒酵母基因组文库转化入 *ptc1/ptc7* 双缺失株里, 我们发现 *ATP16* 基因 (编码线粒体 F0F1ATP 合成酶可溶性部分 F1 的 Delta 亚基) 是 *ptc1/ptc7* 双缺失株利用酒精缺陷的多拷贝抑止基因, 这进一步显示 PTC7 基因能与 PTC1 基因一起调控酵母细胞线粒体 F0F1ATP 合成酶的功能。

TGF β 结合蛋白 1 干扰质粒的构建及其功能研究

赵涵芳*, 吴怡, 黄胜林, 杨蓉, 应磊, 倪兆慧

上海第二医科大学生化与分子生物学教研室, 上海, 200025

*E-mail: zhaohf@shsmu.edu.cn

近年来, 糖尿病肾病 (DN) 已为终末期肾功能衰竭的主要病因之一。研究发现, DN 引发终末期肾功能衰竭的主要原因就是肾脏纤维化, 且肾小管间质病变比肾小球病变更易引发纤维化。如何阻止肾脏纤维化进程成了现今治疗糖尿病肾病的主要目的。

通过基因芯片检测黄芪诱导前后糖尿病大鼠肾脏组织差异表达, 结果表明黄芪诱导后糖尿病大鼠肾脏组织 TGF β 1 结合蛋白 1 (Latent transforming growth factor binding protein1, LTBP1) 表达明显降低。有研究表明转化生长因子 TGF β 是一种具有多重生物学效应的细胞因子, 它可以使细胞增值和细胞外基质聚集, 参与了多种组织器官纤维化的形成。TGF β 1 隶属一个超基因家族, 最初从细胞中分泌出来的时候是以一个大分子蛋白复合体的形式出现。这个大分子复合体包括三部分: 成熟的 TGF β 前体, 潜在结合肽 (latency-associated peptide, LAP), 还有 LTBP1。LTBP1 属于 LTBP 家族, 目前已经发现的成员有 LTBP1、LTBP2、LTBP3、LTBP4。LTBP1 涉及 TGF β 的合成、分泌、甚至靶向运输, 所以它有可能在控制和调节 TGF β 活性中发挥重要作用。RNA 干扰技术是近年来发展起来的一项研究基因功能的新技术。其基本原理是利用小 RNA 与目的基因 mRNA 互补, 从而启动 Dicer 酶使得目的基因 mRNA 降解。本实验以 TGF β 1 和 LTBP1 的关系为入手点, 以干扰质粒骨架 psilencer-CMV-4.1 连接四对人工设计的小 RNA, 构建干扰质粒 psilencer-CMV-shLTBP1。测序正确后, 干扰质粒转染人近端肾小管上皮细胞, 观察 LTBP1, TGF β 1 和胶原的表达改变。结果显示小 RNA 正确连接入质粒。干扰质粒 psilencer-CMV-shLTBP1 对 LTBP1 有明显的沉默作用, 同时发现 LTBP1 下游基因 TGF β 1 和胶原 I 及 III 的表达都有不同程度的下调, 说明 LTBP1 本身就是一个纤维化相关基因。

三种不同基因表达谱芯片平台的比较

韩峻松, 胡远皆, 张晓娜, 史耀舟, 杨宏钧, 赵国屏, 张庆华, 肖华胜

上海生物芯片有限公司, 生物芯片上海国家工程中心,

上海浦东张江高科技园区李冰路 151 号, 上海, 201203

基因表达谱芯片是一种高通量的研究 mRNA 表达水平的工具。目前, 表达谱芯片已经应用到多个领域, 如功能基因组学, 毒理学等。基因表达谱芯片主要可以分为寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片两大类。原位合成的寡核苷酸芯片便于商品化生产, 但技术要求很高; 而 cDNA 芯片相对比较容易制备。在本研究中我们比较了三种表达谱芯片, Affymetrix 芯片和 Agilent 芯片, 以及我们实验室自己制备的一种 cDNA 芯片。Affymetrix 芯片是通过光蚀刻原位合成的 25mer 寡核苷酸芯片, Agilent 是使用 Ink-jet 技术原位合成的 60mer 的寡核苷酸芯片, cDNA 芯片是把 500-1kb 长的 PCR 产物片段直接点到玻璃片上制成的。

实验中使用了两对手术切除的肿瘤标本以及相应的癌旁组织, 芯片分别为 Affymetrix HG-U133A 芯片, Agilent Human 1A Microarray (V2) 和我们自制的人 14K 芯片。首先通过生物信息学分析, 找出了 5934 个在三个平台都有的基因。杂交 Affymetrix 芯片和 Agilent 芯片需要对 RNA 样品用体外转录进行线性放大, Affymetrix 需要 12.5 μ g 的 cRNA, Agilent 芯片需要约 4 μ g 的 cRNA, 而 cDNA 芯片只需要约 30 μ g 的总 RNA。芯片杂交后, 就灵敏度来看, Affymetrix 芯片的信号相对较弱, 在 5934 个共同基因中, 有表达的基因约为 50-60%, 而 Agilent 和 cDNA 芯片都在 80% 以上。通过 RT-qPCR 的验证, 有不少 Affymetrix 芯片没有检测到的基因实际是有一定量的表达的。而计算不同平台产生的信号值的 Pearson 相关系数和 Spearman 相关系数, 结果为 0.5-0.7, 如果去除各个平台中一些不可靠的数据, 可以使相关系数提高约 0.1。取 Cut-off 值为 2, 三个平台总共挑选出 273 个上、下调基因, 其中约 20% 的基因可以从所有三个平台中挑选出来, 40%-70% 的基因可以从两个平台中选出。使用 RT-qPCR 验证挑选出的上下调基因, 两对标本各选了 40 个基因, 结果表明, 所有结果的趋势基本一致 (即从一个平台选出的上调基因, 在另一个平台不会下调, 但可能会是没有改变, 反之亦然), Affymetrix 芯片的假阴性率相对较高, 而 cDNA 芯片的假阳性率相对较高, 但同时从该种芯片中挑选出了一些不能从其它平台发现的上下调基因。

以上结果表明, 各平台相互之间的结果有一定的差异, 但仍具有一定的可比性。原位合成的寡核苷酸芯片的重复性和特异性相对较好, 而 cDNA 芯片的灵敏度相对较高。

淋巴细胞中 hMOR 基因的转录调控

李慧, 李平风, 刘新华, 李刚

北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京, 100083

阿片 μ 受体 (hMOR) 在许多组织中介导吗啡的一系列生理、药理效应。近来又发现, 外源性阿片物质吗啡可促进人免疫缺陷病毒 (HIV) 的复制并加速细胞死亡。这一研究结果提示, 吸毒成瘾不仅可增加 HIV 感染的机率, 并且可加速 AIDS 的病程。因吗啡显著的镇痛和成瘾效应, 对吗啡生物效应的研究多针对神经系统进行, 而对免疫系统的相关研究较少。本实验室已对免疫细胞中 hMOR 基因转录调控的分子机制进行了初步试验, 本课题将做进一步探讨。

方法: 以 T/B 淋巴细胞杂交株——CEM x174 细胞为研究对象, 用 5' 基因缺失的方法构建一系列荧光素酶报道基因重组载体, 其中插入不同长度的 hMOR 基因启动子片段, 其 3' 端均位于 -2 位置, 5' 端分别定位于 -2279, -1371, -984, -652, -372 及 -253 (pLUC1~6)。将这些重组载体分别瞬时转染导入 CEM x174 细胞, 分析不同片段的启动活性。用 EMSA 的方法来寻求 5' 调控区的顺式作用元件与反式作用因子, 同时做定点突变, 进一步验证顺式作用元件。

结果: (1) RT-PCR 的结果显示吗啡可以上调 CEM x174 细胞内 hMOR 的 mRNA 表达水平, 效应与吗啡剂量及作用时间有关, 且可被 hMOR 选择性拮抗剂纳洛酮阻断。(2) 克隆了 hMOR 基因 5' 旁侧调控区域的一段 2278 bp 的序列, 并分析了其中潜在的调控元件。(3) 用引物延伸的方法确定了该序列中的一个转录起始位点 (TIS), 位于翻译起始位点 ATG 上游约 110 bp 处。此结果与以往在鼠或人神经细胞中相关研究报道有较大差别。(4) 对不同萤火虫荧光素酶报道基因重组子的启动活性分析显示, 我们依次所构建的 6 个包含不同长度启动子序列的重组载体中, pLUC1~6 的表达活性分别是对照的 4.5、2.9、6.9、7.3、10.2、1.2 倍, pLUC1 与 pLUC2、pLUC2 与 pLUC3、pLUC4 与 pLUC5、pLUC5 与 pLUC6 间表达活性存在显著性差异 ($P < 0.01$)。 (5) 用 EMSA 的方法确定了在 5' 端的 -372 与 -253 之间确实存在转录因子。(6) supershift 验证了 5' 端的 -372 与 -253 之间存在 sp1 结合位点。(7) 定点突变验证了 303~-303 处 3 个碱基对 sp1 的结合有一定影响。

结论: 吗啡对 CEM x174 细胞的作用由 hMOR 介导。hMOR 5' 旁侧调控区包含重要的调控元件, 克隆的序列中 -372~-253 及 -2279~-1371 区包含 hMOR 基因转录的增强元件, 而在 -1371~-968 及 -650~-370 区包含抑制元件。这些转录调控元件可能参与了吗啡上调 CEM x174 细胞内 hMOR 表达的作用。5' 旁侧调控区 -311~-282 之间有 sp1 的结合位点, 且 -303~-301 处 3 个碱基对 sp1 的结合有一定影响。

人单核/巨噬细胞中 ACAT 基因表达与细胞膜 APP 加工关系

陈佳, 王甄真, 陈跃磊, 雷磊, 杨新颖, 李伯良

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是细胞内唯一催化游离胆固醇与长链脂肪酸合成胆固醇酯的酶, 生理上它是参与生命体吸收、转运或储存胆固醇而维持体内胆固醇代谢平衡的关键酶之一, 病理上其与胆固醇代谢平衡异常引起的动脉粥样硬化 (AS)、老年性痴呆症 (AD)、高胆固醇血症 (HC) 等病变直接相关。已有文献报道神经细胞中 ACAT 活性过高可导致膜上淀粉样前体蛋白 (APP) 大量加工成淀粉样蛋白 ($A\beta$), 从而提高 AD 的发病率, 利用 ACAT 抑制剂可有效地减轻 AD 的病理症状。也有研究表明, 膜蛋白 APP 加工产生的 $A\beta$, 不但可导致 AD, 在 AS 斑点内也存在。

本工作在利用人单核/巨噬细胞体系研究 ACAT 基因表达的一系列进展基础上, 探索人单核/巨噬细胞产生膜蛋白 APP 及其加工与 ACAT 基因表达的关系。首先, Western Blot 分析表明, 人血来源的单核/巨噬细胞和细胞株型的单核/巨噬细胞均产生膜蛋白 APP, 其中分化成熟的巨噬细胞产生 APP 量远高于单核细胞; 免疫荧光结果显示, 在单核细胞和巨噬细胞中 APP 的分布形式存在明显的差异, 提示由于这两种细胞膜游离胆固醇区域化程度不同可能引起 APP 的分布变化。进而, 利用 ACAT 的特异性抑制剂 (CI-976 和 CP-113,818) 对人单核细胞株 THP-1 和 THP-1 来源的巨噬细胞进行处理, 然后检测细胞中 APP 的 mRNA 和蛋白量的实验结果显示, APP mRNA 量在加入 ACAT 抑制剂处理后无明显变化, 但 APP 蛋白量在加入 ACAT 抑制剂作用后有显著升高, 而且随着 ACAT 抑制剂用量或处理时间的增加 APP 在细胞中的累积也逐渐提高, 同时加工产生的胞外分泌型 APP (sAPP) 显著降低, 这说明人单核/巨噬细胞中的 ACAT 活性与膜蛋白 APP 的加工密切相关。进一步分别构建 ACAT1 和 ACAT2 RNAi 质粒, 并转染筛选具有相应 RNAi 作用的稳定表达 siRNAs 的 THP-1 细胞株, 利用这些 ACAT 基因表达不同的细胞株深入探索研究结果显示, 当 ACAT2 基因表达被抑制时, 膜蛋白 APP 显著累积, 且加工产生的胞外 sAPP 减少; 而当 ACAT1 基因表达被抑制时, APP 和 sAPP 的量均无明显变化; 这些实验结果证实人单核/巨噬细胞中 ACAT 基因表达与膜蛋白 APP 的加工密切相关, 且可能是 ACAT2 基因表达发挥更重要作用。有关抑制 ACAT 基因表达而降低酶活性后, 可能引起人单核/巨噬细胞膜上游离胆固醇动态变化, 从而影响膜蛋白 APP 加工产生 sAPP 及 $A\beta$ 等方面工作, 均在深入探索中。

ACAT 在体内可发挥分子、细胞、整体水平的多层面功能作用, 至今已有以 ACAT 的产物胆固醇酯的病理作用功能体系研究, 而对应于酶底物游离胆固醇的 ACAT 功能研究体系尚未见有报道。综合以上获得的结果, 深入探索研究人单核/巨噬细胞中 ACAT 基因表达、细胞膜游离胆固醇、膜蛋白 APP 加工的三者之间关系及其分子机制, 在揭示 ACAT 基因表达调控对细胞膜 APP 加工的效应机制的同时, 可建立 ACAT 基因表达调控的细胞水平功能研究新体系, 为拓展探索 ACAT 基因表达调控对细胞膜游离胆固醇生理功能与病理变化作用、为相关疾病的临床与药物研究提供理论依据。

Cdc2 相关蛋白激酶 PFTK1 和 PCTK1 通过与 PLZF 相互作用而影响其在细胞中的功能

姜梅, 高衍昆, 杨弢, 倪坚, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

Promyelocytic Leukemia Zinc Finger protein (PLZF) is one of the Kruppel-like zinc finger proteins previously identified in a unique case of acute promyelocytic leukemia (APL) as its counterpart of a reciprocal chromosomal translocation involving the retinoic acid receptor alpha gene (RAR alpha). PLZF has a pox virus and zinc finger (POZ) domain in its N-terminal and 9 homologous C2H4 zinc fingers in its C-terminal. There is a region rich in prolines, which located between the BTB/POZ domain and the zinc fingers. We have cloned a human *PFTAIRE1* (*hPFTAIRE1*) gene which encode for a Cdc2-related kinase. Although N-terminal of the hPFTAIRE1(PFTK1) contains two nuclear localization signals (NLS), GFP-hPFTAIRE1 fusion protein expressed in Hela cell distributes in cytoplasm. To search for the possible regulators, substrates and the cytoplasmic distribution mechanism of the hPFTAIRE1, we screened two-hybrid library by using the hPFTAIRE1 as a bait, and obtained several hPFTAIRE1 interacting proteins, including the PLZF. The interaction between the hPFTAIRE1 and the PLZF was confirmed by co-immunoprecipitation analysis. hPCTAIRE1(PCTK1), another member of the Cdc2-related kinases was also identified to bind with the PLZF. The interaction of hPFTAIRE1 and hPCTAIRE1 with the PLZF has been confirmed by in vitro and in vivo experiments. Using different fragments of the PLZF as a bait, we found that the pro- rich region of the PLZF is required for its binding to hPFTAIRE1 and hPCTAIRE1 in both the yeast two-hybrid system and the co-immunoprecipitation analysis. Our results suggested that the two Cdk-like protein kinases hPFTAIRE1 and hPCTAIRE1 may play an important role in functional regulation of the PLZF.

De novo methylation of Oct4 promoter in neuronal induction of P19 cells - A cell culture model to study DNA methylation

Jingyu Li (李静宇), Mintie Pu and Guoliang Xu

Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS. Room 306, Cell Building, Yueyang Road 320,
Shanghai 200031. E-mail: jyli@sibs.ac.cn

DNA methylation is intricately involved in a variety of cellular processes, such as differentiation, X-chromosome inactivation and genomic imprinting. DNA methylation controls these processes principally by its ability to modulate gene expression. The correlation between DNA methylation and transcriptional inhibition has long been known, but little is known about the molecular details involved in this repression mechanism, especially the detailed function of the maintenance methyltransferase (Dnmt1) and de novo methyltransferases (Dnmt3a and Dnmt3b). The regulation of Oct4 expression plays a crucial role in mammalian embryogenesis and cell differentiation. The gene is expressed in the earliest stages of embryogenesis and repressed later on. Oct4 expression also occurs in embryonal carcinoma (EC) cells and is repressed in retinoic acid (RA)-induced EC cells undergoing differentiation. Several studies have shown that the promoter of Oct4 becomes methylated during differentiation. Our study revealed that the Oct4 promoter but not distal enhancer is gradually methylated when P19 EC cells undergo differentiation upon RA treatment. Other epigenetic changes concern histone H3 deacetylation and de-methylation at lysine 4. Depletion of Dnmt3a or Dnmt3b in P19 cells disturbed the establishment of the methylation pattern of Oct4 promoter, but had no effect on the embryonic body formation and neuronal differentiation. While in Dnmt3a and Dnmt3b double depleted P19 cells, almost no methylation of Oct4 promoter could be detected, and the expression of Oct4 was reactivated during differentiation. Taken together, both Dnmt3a and Dnmt3b contribute to the de novo methylation of Oct4, and the Oct4 promoter methylation of P19 cells is an excellent paradigm for the study of the role and mechanism of DNA methylation in development.

从文献量看国际与中国基因组研究的发展

高柳滨，陈桦

中国科学院上海生命科学信息中心，上海市岳阳路 319 号 31 号 A 座 207 室，200031
E-mail: gaolb@sibs.ac.cn

基因组学是一门系统地研究物种全部基因及其生物学意义和运动规律的学问，试图系统地揭示生命过程的全景。在完成一系列基因测序工作后，基因组的研究正在跨入后基因组时代，通过对基因功能、结构的进一步深入了解造福人类。本篇报告试图应用情报分析方法中的文献计量分析法，应用美国 ISI 的 SCI 数据库，对 1999-2004 年 5 年间全球涉及基因组序列、结构、功能和病原微生物四个方面研究的基因组研究发表的论文进行检索并对所得检索结果进行数据合并、去重处理后共获得文献 10549 篇。在所获得基因组序列、结构、功能和病原微生物等各自的论文发表总量及其论文总被引频次和基因组研究论文发表总量及其论文总被引频次的基础上，我们从论文发表量、被引用频次和篇均被引用论文的情况进行揭示，从基因组研究领域的文献的国家分布、机构分布、时间分布等方面来分析全球基因组研究的发展情况，并对中国和中国科学研究所的论文情况进行了详细分析。以便从文献计量角度了解全球、中国及中国科学院基因组研究的发展情况。

（注：全球的论文总量是在对基因组主要研究领域功能、结构、序列和病原微生物论文检索结果基础上进行数据合并和去重处理后所得数据，所以不是简单的四大研究领域研究论文量简单的总和。另，本报告中所说论文指 SCI 中的 article 类文献。由于此类文献在科技文献类型中一般所占比例最高，对其的分析基本能代表该学科领域的发展情况。故本报告选取此类文献进行了系统分析。）

肿瘤抗原的筛选及其抗体抑瘤作用的研究

冯静, 阎锡蕴

中国科学院生物物理研究所, 北京, 100101

在以结直肠癌细胞系 LS 174T 的活细胞为抗原免疫小鼠得到的单克隆抗体中, 通过 ELISA 及免疫组化等方法筛选出一株肿瘤相关的单克隆抗体 CC4; 免疫组化实验表明, 该单克隆抗体可特异性识别多种人肿瘤组织, 包括结肠癌, 胃癌, 肝癌, 卵巢癌, 乳腺癌及子宫内膜癌等, 而与人正常组织不结合或只有轻微结合; 用生化及细胞免疫荧光等方法对其抗原的鉴定结果表明, CC4 抗原是一个 130 kDa 的 CEA 相关蛋白。体外实验表明, 抗体 CC4 可以抑制肿瘤细胞的增殖、黏附和迁移。荷人瘤小鼠动物实验表明抗体 CC4 对 LS 174T 结直肠癌肿瘤生长具有明显的抑制作用, 抑制率为 57.26%, 显示了 CC4 具有成为肿瘤治疗性抗体的潜在应用价值。通过 RT-PCR 的方法克隆了 CC4 抗体可变区的编码基因, 并构建了其 scFv, 为抗体 CC4 的应用奠定了基础。

Targeted Disruption of *Smad4* in Cardiomyocytes Results in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

Jian Wang¹ (王剑), Ning Xu², Xinheng Feng², Ning Hou¹, JiShuai Zhang¹, Xuan Cheng¹, Youyi Zhang², Xiao Yang¹

1. Genetic Laboratory of Development and Diseases, Institute of Biotechnology, Beijing 100071; 2. Institute of Vascular Medicine, Peking University Third Hospital and Key Laboratory of Molecular Cardiovascular Science, Ministry of Education, Beijing 100083, P.R. China

Transforming growth factor- β s (TGF- β s) are pleiotropic cytokines involved in many physiological and pathological processes, including heart development and heart disease. *Smad4* is the central intracellular mediator of TGF- β signaling. To investigate the function of *Smad4* in heart development further, we generated a strain of cardiomyocyte-specific *Smad4* knock-out mice employing the Cre-loxP system. Unexpectedly, the deletion of *Smad4* in cardiomyocytes resulted in cardiac hypertrophy characterized by an increase in the size of cardiac myocytes, age-associated fibrosis, and re-expression of certain fetal genes. Approximately 70% of the *Smad4* mutant mice died spontaneously between 5 and 12 months of age. Echocardiography and an invasive hemodynamic study of the left ventricle (LV) revealed markedly decreased cardiac contractility in *Smad4* mutant mice compared with littermate controls. Moreover, phosphorylated extracellular-signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and MAP-ERK kinase (MEK) 1 were increased in the *Smad4* mutants, suggesting that an up-regulation of MEK1-ERK1/2 signaling as a consequence of deletion of *Smad4* underlies the impaired cardiac function. These results reveal an important function of *Smad4* in cardiac remodeling, and suggest that an altered cellular response to TGF- β could be a mechanism by which cardiac myocytes undergo hypertrophy.

宫颈癌差异表达新基因的筛选、克隆及功能分析

左泽华, 赵旻, 刘娟, 张力, 伍欣星

武汉大学医学院病毒学研究所分子病毒室, 武汉, 430071

采用细胞原癌基因、抑癌基因分类表达谱芯片, 分析了原发性宫颈癌的基因组差异表达情况, 对目前已知的 300 多条细胞原癌、抑癌基因进行分析, 筛选出存在差异表达的原癌或抑癌基因共 11 条, 占候选基因的 3.4%, 其中表达明显下调的基因 7 条, 上调基因 4 条。对其中表达下调最明显的基因——人膀胱癌相关蛋白基因 (Homo sapiens bladder cancer associated protein, BLCAP) 进行了深入研究: 制备其全长 cDNA 并克隆到真核表达载体 pLXSN 上, 转染至宫颈癌细胞系 *HeLa* 中, 运用 G418 筛选获得稳定转染的 BLCAP 阳性克隆; 分析了稳定转染 BLCAP 基因的 *HeLa* 细胞的细胞形态、细胞生长及增殖和集落生成能力; BLCAP 基因裸鼠体内抑瘤实验; 检测了 BLCAP 基因在人正常细胞和不同肿瘤细胞株中表达水平的差异以及 DNA 凋亡情况等。结果显示, BLCAP 基因在人不同肿瘤细胞中表达水平较之在人正常细胞中的表达水平降低; BLCAP 导入 *HeLa* 细胞后, 细胞的体积变大, 细胞生长减慢, 培养至第六天时, 细胞数量约为对照细胞的 20%, 细胞形成集落能力——克隆形成率下降 59.3%。同等量 *HeLa* 细胞注射裸鼠皮下后, 稳定转染了 BLCAP 基因的 *HeLa* 细胞较之未转染 BLCAP 基因的 *HeLa* 细胞及转染了空载体的 *HeLa* 细胞出瘤时间晚, 最终成瘤体积小, 且肿瘤病理切片结果显示, 稳定转染了 BLCAP 基因的 *HeLa* 细胞所成肿瘤组织, 癌组织被纤维组织包裹, 边缘整齐, 肌层和脂肪组织未侵犯, 部分癌巢边缘癌细胞可见散在类似凋亡细胞的细胞群。而未转染质粒组及转染空载体 pLXSN 质粒组所成肿瘤组织癌组织突破肌层呈浸润性生长, 癌巢边缘癌细胞病理性核分裂像多见。在 DNA 凋亡实验中, 稳定转染 BLCAP 基因的 *HeLa* 细胞 DNA 中出现大小约 200bp 及其倍体的 DNA 梯带, 而转染空载体 pLXSN 的 *HeLa* 细胞及正常培养的 *HeLa* 细胞中则未出现, 说明 *HeLa* 细胞在转染 BLCAP 基因后出现了凋亡。

综上所述, BLCAP 基因与宫颈癌的发生、发展存在密切关系。可能是一条潜在的宫颈癌抑癌基因。

Dicer 基因 SNP 与 HBV 易感性研究

郭晏海, 阎小君

第四军医大学药理学系基因诊断研究所, 西安, 710033

在自然状态下, 人体细胞内存在 RNA 干预系统, 它在抵御病毒感染的过程中可能发挥着一定或是重要的作用。而在这一过程中核糖核酸酶 III 家族成员 RNase III 蛋白——Dicer 是启动 RNA 干预的关键蛋白分子, 因此 Dicer 与 HBV 的易感性可能存在一定的关系,

这方面的研究目前还是空白, 为此, 我们对 60 例 HBV 感染者的 chromosome: 14; Maps: 14q32.13, 既 Dicer 基因所在的基因组区域 (94622319..94693512, 中长度为 71194 bp) 进行 SNP 的筛查, 并分析 SNP 与 HBV 易感性的关系, 目前已进行总长 8908bp 区域 (94622319..94631227) 的基因序列扫描, 共发现 16 个 SNP 位点, 其中有 1 个 SNP 位点和 HBV 的易感性有关联。随着扫描区域的扩展, 样本量的扩大, 可能会发现更多与 HBV 易感性相关联的 SNP, 甚至有可能发现抗 HBV 感染的 SNP。

Discovery and Structure Analysis of Novel non-coding mRNA-like RNA

Yaozhou Zhang* (张耀洲), Zuoming Nie, Jian Chen, Zhengbing Lv, Zhaochu Qin, Caiying Jiang, Dan Wang, Lili Liu, Yulan Lou, Fukun Zhao, Xiangfu Wu, and, Genjun Xu

Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

*Corresponding author: Tel: +86-571-86843198, Fax: +86-571-86843198; E-mail: yaozhou@chinagene.com

During the analysis of one thousand cDNA sequences from silkworm pupae, it has been found that about 3% mRNA sequence is non-coding mRNA with a polyU sequence at 5' terminal which is complementary to the polyA sequence at 3' terminal, forming a particular cucurbit-shaped secondary structure which still has a 2-80nt polyA terminal. This class of non-coding mRNA with a polyU sequence at 5' terminal and a polyA sequence at 3' terminal is found for the first time, and has the characteristic of small nucleolar RNA (snoRNA). It belongs to a novel class of mRNA-like snoRNA, having similar C box and D box as those in archaebacteria, with complementary sequence to rRNA at the upstream and downstream of D box. It reveals that AUG box is present at the loop-stem binding site of the secondary structure of this class of snoRNA and CAT box is present at both ends of transcriptional region of snoRNA. About 74% of this class of snoRNA is transcribed from genome in a translation-like mode in that it begins from ATG and end at TAA. The existence of this novel family of non-coding mRNA was verified by RT-PCR and Southern blotting.

论文摘要

针对 uPA 的 siRNA 对人乳腺癌细胞侵袭的抑制作用

黄红艳¹, 孙强², 李庆霞¹, 刘家云¹, 王凯¹, 鲍炜¹, 贾林涛¹, 王成济¹, 杨安钢^{1*}

1. 第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 西安, 710032; 2. 军事医学科学院生物技术研究所发育与疾病遗传学研究室, 北京, 100071

*E-mail: agyang@fmmu.edu.cn

目的: 通过 RNA 干涉的方法抑制乳腺癌细胞中 uPA 的表达, 观察 uPA 的表达抑制后对肿瘤细胞的体外侵袭能力的影响。**方法:** 1. 构建可以表达针对 uPA 的 siRNA 的干涉载体, 转染高侵袭性人乳腺癌细胞系 MDA-MB 231, G418 抗性筛选, 挑选单克隆株。2. 分别通过 RT-PCR 和 Western Blot 的方法检测 uPA 的表达; 3. 平板克隆形成试验检测转染前后肿瘤细胞的克隆形成能力; 4. Boyden Chamber Assay 检测肿瘤细胞体外侵袭能力。**结果:** 1. 可以稳定表达针对 uPA 的 siRNA 的单克隆株, uPA 的表达水平显著下降; 2. 转染了针对 uPA 的 siRNA 的单克隆株的克隆形成能力降低; 3. 转染了针对 uPA 的 siRNA 的单克隆株体外侵袭能力与原代细胞 MDA-MB 231 相比明显受到抑制。**结论:** uPA 在人乳腺癌侵袭行为中发挥重要的作用, 针对 uPA 的 siRNA 可以显著降低 uPA 的表达, 从而抑制肿瘤细胞的侵袭, 可望成为抗肿瘤侵袭治疗的一种有效手段。

人肝脏高凝状态相关基因的筛选、生物信息学分析和表达初步

崔晓燕, 方定志, 刘秉文

四川大学, 华西基础医学与法医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 成都, 610041
E-mail: dzfang@mail.sc.cninfo.net

目的: 筛选人肝脏高凝状态 (prothrombotic states, PTS) 相关基因的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析和人肝脏高凝状态相关基因表达的初步研究。**方法:** 以本室建立的 PTS 大鼠肝脏差异表达基因消减 cDNA 文库中带有目的 cDNA 的质粒为模板, 采用 PCR 方法扩增目的片段; 以 PCR 产物作混合探针, 用噬菌斑原位杂交法筛选人肝脏 cDNA 文库, 经初筛、二筛和三筛后, 将获得的阳性克隆转入 *E.coli* BM 25.8, 使 λ TripIEx 环化成质粒 pTripIEx, 经双酶切鉴定后进行 DNA 测序。然后进行生物信息学分析和基因表达的初步研究。分别用 11mmol/L 葡萄糖, 33 mmol/L 葡萄糖, 11 mmol/L 葡萄糖和 22 mmol/L 甘露醇培养人肝癌细胞株 HepG2 细胞 48h。实验分为四组: 未添加葡萄糖组 (Normal 组), 添加 11mmol/L 葡萄糖组 (G11 组), 添加 33mmol/L 葡萄糖组 (G33 组), 添加 11mmol/L 葡萄糖和 22 mmol/L 甘露醇组 (G11+M22 组)。抽提细胞总 RNA, 鉴定其纯度和完整性, 采用 RT-PCR 方法分析 LFIRE1 基因、10 号染色体开放阅读框架 104 基因的转录水平。**结果:** 从人肝脏 cDNA 文库中筛选获得 4 条全长 cDNA 序列, 经序列测定及生物信息学分析发现, 其中 3 条的表达产物分别为纤维蛋白原 γ 、纤维蛋白原类似物 1、10 号染色体开放阅读框架 104; 另 1 条与氨基甲酰磷酸合成酶 1 同源。G11 组, G33 组, G11+M22 组的 LFIRE1 基因表达量均比未添加葡萄糖组增加, 但无显著性差异。10 号染色体开放阅读框架 104 基因在 G11+M22 组中比在其他组中表达量显著增加, 而 G11 组和 G33 组与未添加葡萄糖组相比 10 号染色体开放阅读框架 104 基因的表达量却没有显著性增加。**结论:** 纤维蛋白原 γ 、肝脏纤维蛋白原相关基因 1、10 号染色体开放阅读框架 104 和氨基甲酰磷酸合成酶 1 的同源基因的表达改变可能与 PTS 相关; 血浆葡萄糖升高是否使 LFIRE1、10 号染色体开放阅读框架 104 基因的转录水平增加尚有待进一步证实。

人端粒酶逆转录酶启动子介导的肿瘤特异性 RNA 干扰载体的构建及应用

黄胜林, 吴怡, 俞海, 赵涵芳

上海第二医科大学生物化学与分子生物学教研室, 人类基因治疗中心, 上海, 200025

目的: RNA 干扰在肿瘤基因治疗中的应用正得到广泛地重视, 然而由于靶向性问题限制了其进一步应用。本研究旨在构建一个具有肿瘤特异性的 RNA 干扰载体, 并探讨其对抗凋亡基因 Bcl-2 的干扰作用及影响。

方法: 通过对人端粒酶逆转录酶启动子 (hTRTP) 一定的改造, 以及采用一个约 100bp 的 polyA 尾 (mpA), 构建一个人端粒酶逆转录酶启动子介导的 RNA 干扰载体 pBlock-hTRTP-shRNA-mpA。为验证其具有 RNA 干扰作用以及肿瘤特异性, 我们又构建特异针对外源报告基因 luciferase 和 EGFP 的干扰载体 pBlock-hTRTP-shLUC-mpA 和 pBlock-hTRTP-shEGFP-mpA, 观察在肿瘤细胞 HeLa、HepG2 和 A549 以及正常细胞 WI-38 中的作用。双荧光素酶检测 luciferase 的表达; RT-PCR、荧光显微镜和流式细胞仪检测 EGFP 的表达。进一步我们构建针对内源性基因 Bcl-2 的干扰载体 pBlock-hTRTP-shBcl2-mpA, 稳定转染 heLa 细胞, 用 RT-PCR 和 western blot 检测干扰效率。MTT 法观察稳定干扰 Bcl-2 的 heLa 细胞和对照细胞的增殖情况以及细胞对不同浓度 5-FU 的存活率; 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况。

结果: 成功构建了 hTRTP 介导的特异针对 luciferase、EGFP 和 Bcl-2 的 RNA 干扰载体, 经测序鉴定正确。双荧光素酶测定发现 pBlock-hTRTP-shLUC-mpA 在肿瘤细胞 HeLa、HepG2 和 A549 中可显著抑制 luciferase 的表达, 表达量分别为 0.33 ± 0.070 , 0.31 ± 0.063 , 0.43 ± 0.034 (对照为 1, $p < 0.01$), 而正常细胞 WI-38 中无明显作用 (0.88 ± 0.172)。RT-PCR、荧光显微镜和流式细胞仪检测 pBlock-hTRTP-shEGFP-mpA 在上述细胞中干扰 EGFP 的表达情况, 结果与 luciferase 基本一致。稳定转染 pBlock-hTRTP-shBcl2-mpA 的 heLa 细胞, RT-PCR 和 western blot 均检测到 Bcl-2 被显著抑制, 与对照细胞相比, 细胞的增殖和周期无显著差别, 但对 5-FU 的敏感性却显著增强。

结论: 我们首次报道了一个人端粒酶逆转录酶启动子介导的肿瘤特异性 RNA 干扰载体, 该载体可特异高效地干扰内源性和外源性基因在肿瘤细胞中的表达, 而在正常细胞中无明显作用。利用该系统可特异地干扰 Bcl-2 的表达并增强肿瘤细胞对 5-FU 的敏感性。这使得 RNA 干扰在体内肿瘤基因治疗中的靶向性和安全性得到一定的加强, 将进一步促进 RNA 干扰在肿瘤基因治疗中的应用。

The *MALE STERILE L* gene encodes a basic helix loop helix (bHLH) protein that controls tapetal cell development in rice (*Oryza sativa*) anther

Li Na¹, Liu Haisheng¹, Li Xiaoxing¹, Chu Huangwei¹, Huang Hai², Ma Hong³, Luo Da², Zhang Dabing^{1*} (张 大 兵)

1. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Dongchuan Road 800, Shanghai 200240, P. R. China; 2. Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes of Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Fenglin Road 300, Shanghai 200030, P. R. China; 3. Department of Biology, Pennsylvania State University, University Park, PA, 16802, USA.

*E-mail: zhangdb@sjtu.edu.cn

Tapetum is the innermost cell layer that lines anther locules and indirectly contacts with pollen mother cells (PMCs). This secretory tissue produces essential nutrients necessary for pollen maturation, and is completely diminished by the time the pollen is fully mature. To better understand the critical roles played by the tapetum in pollen development, we have characterized a rice (*Oryza sativa*) recessive male sterile mutant, *osms-l*, with smaller white anther without mature pollens, while the tapetum didn't undergo cellular degradation soon after microspores formation, resulting in pollen collapse. Subsequent map-based cloning and DNA sequencing of the mutant gene revealed one base pair deletion in the seventh exon of a *bHLH* gene located on chromosome 2, which encodes a 58.3 kD bHLH protein that contains a basic helix-loop-helix (bHLH) domain, falling into the MYC subgroup of bHLH genes. A OsMS-L-GFP fusion protein was localized in the nucleus, and the formation of homodimeric complexes of OsMS-L was proved by a yeast two-hybrid system. These results suggest that the OsMS-L plays a crucial role in tapetal cell development and the post-meiotic transcriptional regulation of microspore development.

神经干细胞分化相关 DCF1 基因克隆与表达

庞淑亚, 文铁桥*

上海大学生命科学学院, 上海, 200444

*E-mail: tqwen02@yahoo.com.cn

神经干细胞的发现并分离, 使得对神经系统疾病的治疗发生了观念的转变, 重视药物治疗对神经干细胞分化和神经元再生的促进作用以及外源神经干细胞移植的治疗作用。神经干细胞的研究在短短几年间已经显示了其在神经损伤修复、神经退行性疾病、神经性遗传病等方面的极其广泛而又极具潜力的应用价值。

采用基因表达谱分析观察到树突细胞因子 (DCF1) 的表达与神经干细胞分化密切相关。通过构建神经干细胞分化 cDNA 文库, 克隆到全长 DCF1 序列 972bp, 将其亚克隆到哺乳动物细胞表达载体, 以 GFP 为报告基因, 转化神经干细胞 (C17.2), 证实 DCF1 的表达显著促进细胞分化; 将 DCF1 亚克隆到 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZ α A 进行了编码蛋白的表达, PAGE 电泳、Western Blot 证实该序列编码 35 KD 蛋白。观察了 DCF1 基因在 SD 大鼠的组织表达差异, 结果表明在肝、肾、脑均有表达。

分枝杆菌噬菌体裂解肽的分离和功能鉴定

苏畅, 刘堰*

重庆西南大学生命科学学院, 重庆, 400715

*南京大学生物医药国家重点实验室, 南京, 210093

结核病是严重危害人类健康的传染病, 是我国重点控制的重大疾病之一, 也是全球关注的公共卫生问题和社会问题。近年来全球结核病疫情的回升引起了国际社会的高度重视。当前我国的结核病防治工作还面临严峻的挑战。我国仍然是全球结核病严重流行的国家, 现有结核病人占全球的 1/4, 死亡人数多, 疫情下降缓慢, 危害严重。在结核病人中, 有 3/4 是最具有生产能力的青壮年。重庆市为中国结核病的第二高发区。如果我们不及时采取有效措施, 结核病蔓延将进一步加剧, 结核病防治的难点表现为耐药性强, 解决结核病问题的迅速有效措施是开发特异性的新药。

本课题通过对分枝杆菌噬菌体的研究, 找寻某种针对性裂解分枝杆菌, 尤其是结核分枝杆菌活性物质 (裂解肽), 噬菌体的裂解肽迅速破坏宿主细菌的细胞壁, 从而释放出扩增的噬菌体。这些肽往往特异性杀死其宿主菌, 因此可能是特异性控制致病细菌的有效途径。并希望开发用于结核病治疗。目前实验以快生型分枝杆菌为宿主菌, 通过平板筛选, 纯化、富集等一系列方法获得了两个有目的活性的噬菌体原种, 并通过对噬菌体 DNA 进行电泳, 初步证实了预期的结果。实验还将对该噬菌体进行大规模富集, 提高其滴度, 并通过电镜实验进一步验证噬菌体的存在和纯度。并预计通过进行蛋白质双向电泳的方法获取其蛋白组数据, 通过在蛋白和基因水平的数据比较获得有功能活性的裂解肽。

人抗 HBsAg 单链抗体基因的构建、表达及其表达产物的活性鉴定

温伟红¹, 孟艳玲¹, 薛茜¹, 贾林涛², 赵晶², 许彦鸣², 刘家云¹, 王成济², 杨安钢¹

第四军医大学, 1. 免疫学教研室, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 西安, 710033

目的: 构建人抗 HBsAg 单链抗体基因, 在真核细胞中进行表达, 并分析表达产物的生物学活性。

方法: 以从噬菌体抗体库中筛选获得的抗 HBsAg 的 Fab 抗体基因为模板, 分别扩增出其轻、重链可变区 (V_L、V_H) 基因, 通过重组 PCR 方法将轻、重链可变区基因用连接肽 (Gly₄Ser)₃ 的编码序列连接, 并引入前导肽的编码序列, 构建具有 L-V_H-Linker-V_L 结构的单链抗体基因。将所构建的单链抗体基因克隆入绿色荧光蛋白融合表达载体 pEGFP-N3, 瞬时转染 COS-7 细胞, 荧光显微镜观察 ScFv-EGFP 融合蛋白的表达情况。稳定转染 Jurkat 细胞, G418 筛选, 建立稳定表达 ScFv-EGFP 融合蛋白的细胞系, 收集建系细胞的裂解产物和浓缩的培养上清, SDS-PAGE 及 Western Blot 检测证实 ScFv-EGFP 融合蛋白的分泌性表达。培养上清的间接 ELISA 及其与 HBsAg 阳性或阴性肝癌细胞共孵育后, 荧光显微镜观察及流式细胞仪检测分析表达产物的生物学活性。

结果: 经测序表明, 前导肽、连接肽、V_L 及 V_H 的序列完全正确, 经酶切证实成功构建了 ScFv-EGFP 融合表达载体。瞬时转染 COS-7 细胞后, 荧光显微镜可直接观察到 ScFv-EGFP 融合蛋白的表达。建立了稳定表达 ScFv 融合蛋白的 Jurkat 细胞系。SDS-PAGE 及 Western Blot 检测证实了建系细胞分泌表达 ScFv-EGFP 融合蛋白。间接 ELISA 检测证实所表达的单链抗体能够与 HBsAg 特异性结合。建系细胞的培养上清与 HBsAg 阳性或阴性肝癌细胞共孵育后, 荧光显微镜观察及流式细胞仪检测明确了 ScFv-EGFP 融合蛋白具有与 HBsAg 阳性肝癌细胞特异性结合的活性。

结论: 成功构建了带有前导肽的人抗 HBsAg 单链抗体基因, 在真核细胞中实现了 ScFv-EGFP 融合蛋白的分泌表达, 并证实表达产物具有与 HBsAg 特异性结合的活性。

葡萄糖神经酰胺合酶与白血病细胞耐药的关系

谢平¹, 葛素梅², 谢可鸣², 顾中华¹, 穆会君¹, 王珏¹, 张滨¹

1. 无锡市第一人民医院中心实验室, 无锡, 214002; 2. 苏州大学病理生理学教研室

目的: 观察葡萄糖神经酰胺合酶 (glucosylceramide synthase, GCS) 基因及其蛋白在人白血病细胞的表达及其与肿瘤多药耐药的关系。**方法:** (1) 以 β -actin 基因为内参照物, 采用 RT-PCR 方法分析耐药/非耐药白血病患者外周血标本、对药物敏感的 HL-60 细胞株/对阿霉素耐药的 HL-60/ADR 细胞株中 GCS 基因的表达水平, 并同时与多药耐药基因 (mdr1) 的表达进行比较。(2) 采用 Western Blot 印迹方法分析 HL-60 细胞株/HL-60/ADR 细胞株中 GCS 蛋白及 P-gp 蛋白的表达情况。**结果:** (1) 白血病患者耐药组临床标本中的 GCS 基因扩增条带光密度相对比值 (GCS 基因/ β -actin 基因) 明显高于非耐药组 ($P < 0.05$); 且 GCS 基因扩增条带显著增强时往往伴有 mdr1 基因的表达, 两者呈正相关 ($P < 0.01$ 、 $\gamma = 0.6$)。(2) HL-60/ADR 细胞株 GCS 的 mRNA 及蛋白均过度表达, 且明显高于 HL-60 细胞株; 此外, HL-60/ADR 细胞株的 mdr1 mRNA 和 P-gp 蛋白的表达亦显著增高。**结论:** (1) GCS 可能在白血病多药耐药中起着重要作用; (2) 在白血病耐药的产生过程中确实存在着几种机制的共同作用及相互影响。

转录因子 C/EBP β mRNA 3'UTR 位点专一的相互作用蛋白的初步鉴定及其功能的研究

刘定干, 孙丽

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海, 200031

C/EBP β , 或称 NF-IL6 (nuclear factor for interleukin-6), 是一个与细胞的正常增殖及多种基因表达密切相关的转录因子。我们早已发现, 该因子 mRNA 的 3'非翻译区 (3'UTR) 对恶变细胞具有抗癌基因功能。但是, 这种功能的分子基础迄今尚未被阐明。我们推测, 由于 3'UTR 并不编码蛋白质产物, 却是真核 mRNA 与细胞内 RNA 结合蛋白的重要的相互作用元件, 所以, 其功能应当和这种相互作用有关。

几年来, 我们曾经试用过几种分离 RNA 结合蛋白的方法, 象噬菌体展示法、酵母三元杂交法等, 都没能取得成功 (前者是由于方法不成熟, 后者是由于假阳性太多)。

我们已经发现, 在受 C/EBP β 3'UTR 的 cDNA 转染而回复的恶性肝癌细胞系中, 有一个与该 3'UTR 专一相互作用的蛋白表现出与原恶性细胞系不同的细胞内分布。这一事实说明, 分离与 C/EBP β 3'UTR 相互作用的蛋白, 可能是解开它的抗癌基因活性的分子基础的突破口。

近来, 我们尝试了用亲和层析的原理并结合蛋白质谱分析 (MALDI-TOF-MS), 直接分离与 C/EBP β 有相互作用的蛋白。我们利用 pSP64 和 pSP65 两个质粒的特点, 将体外转录的 C/EBP β 3'UTR RNA 的 3'端添上了一段“尾巴”, 通过这段“尾巴”把 C/EBP β 3'UTR RNA 固定在质粒 DNA 所构成的“臂”上, 而这只“臂”则共价固定在玻璃粉表面上, 制成了一种新的亲和介质。利用这种方法, 我们分离了 3 种只与“臂”上带 RNA 的亲和介质相互作用而不和不带 RNA 的介质相互作用的细胞内可溶性蛋白。MALDI-TOF-MS 分析指出这 3 种蛋白分别是波形蛋白 (vimentin)、细胞角蛋白 8 (cytokeratin8) 和细胞角蛋白 18 (cytokeratin18)。根据文献, 这些蛋白一般是与 mRNA 在细胞内的定位有关; 同时也和细胞的正常表型和恶变有密切关系。目前, 我们正在继续对 C/EBP β 3'UTR RNA 上的与这些蛋白作用的位点进行研究, 并试图揭示 C/EBP β 3'UTR RNA 和这些蛋白的相互作用对其在细胞内的定位的影响。在本次会议上, 我们将报告我们的工作的详情和最新进展。

海洛因对大鼠脑外组织嘌呤核苷酸分解代谢关键酶的影响

孙 聪

长春中医学院生物化学与分子生物学教研室, 长春, 130117

阿片是历史悠久的镇痛药,但由于其成瘾性使阿片类生物碱中海洛因和海洛因的滥用成为全球性的医学和社会问题。其中海洛因比吗啡有更强的成瘾性。目前对阿片类生物碱成瘾、耐受及戒断机制方面的研究较为深入,而阿片对外周组织的作用研究甚少。本研究的目的是通过研究海洛因对大鼠嘌呤核苷酸分解代谢关键酶黄嘌呤氧化酶(XO)基因表达的调控作用来认识海洛因对大鼠核苷酸分解代谢的影响,以期阿片类药物的研究增添新的内容。

在研究中我们选用成年雄性 Wistar 大鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,分别作为生理盐水对照组、3 天海洛因依赖组、9 天海洛因依赖组、3 天自然戒断组和 8 天自然戒断组。按照剂量逐日递增的原则,生理盐水对照组腹腔注射生理盐水 9 天后处死,3 天海洛因依赖组和 9 天海洛因依赖组分别腹腔注射海洛因 3 天和 9 天后处死,3 天自然戒断组和 8 天自然戒断组均腹腔注射海洛因 9 天后再分别自然戒断 3 天和 8 天后处死。处死大鼠立即采集血浆及组织分别于-70°C 冰箱和液氮中冻存。血浆用于测定 XO 酶活性,肌肉、小肠组织除测定 XO 酶活性之外还提取其中的总 RNA 作 RT-PCR 来检测该组织中 mRNA 的含量。

XO 作为一种嘌呤核苷酸分解代谢的关键酶,在嘌呤核苷酸的分解代谢过程中起到非常重要的作用。海洛因依赖时大鼠血浆中的 XO 活性较对照组升高。可能是导致嘌呤核苷酸分解代谢增强的原因。同时 XO 是一种细胞内酶,血浆中的 XO 活性的增高必定也是某种或某几种器官 XO 的增高释放入血的结果。我们测定肌肉和小肠中 XO 的活性,发现海洛因依赖时,肌肉及小肠中 XO 活性较对照组增高。说明海洛因依赖时,海洛因可作用于组织细胞内导致 XO 活性的升高,从而加速了嘌呤核苷酸的分解代谢,使尿酸的生成增加。但血浆中,戒断组 XO 有逐渐下降趋势,最后降至对照组水平。在肌肉中,戒断组 XO 有逐渐下降趋势,最后降至对照组水平;在小肠中,戒断组没有下降趋势,反而有上升趋势。从自然戒断组的结果我们可以得出,海洛因对组织细胞的作用在短时间戒断后并不能完全消失,尤其是小肠组织。

肌肉和小肠 XO 的 PCR 结果表明 9 天海洛因依赖组 XO 明显高于对照组,3 天海洛因组与对照组无明显差异,自然戒断组 XO-mRNA 水平也高于对照组,可见海洛因在转录水平增强了 XO mRNA 的转录。此结果与 XO 酶学基本相符。在自然戒断后肌肉中 XO 下降至对照组水平而小肠却持续升高,这说明小肠组织对 XO 的调整在一段时间内可能没有恢复正常,所以戒断后小肠 XO 的 mRNA 含量高于正常,而肌肉则对 XO 的反应比较灵敏,很快就降至正常水平。

从酶学和基因表达两者的高度一致性可以初步推断海洛因对 XO 酶的调节是发生在转录水平。但并不排除可能存在翻译水平上的影响。海洛因通过诱导外周组织 XO 的基因表达,进而加强嘌呤核苷酸的分解代谢,消耗体内的核苷酸。我们可以推断出海洛因引起核苷酸自身消耗,该发现为戒毒的治疗提出新的内容和方向。

PKC δ Protects Human Breast Tumor MCF-7 Cells against Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Mediated Apoptosis

Jindan Zhang, Ning Liu, Jingchun Zhang, Shilian Liu, Yanxin Liu, and Dexian Zheng

National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, 5 Dong Dan San Tiao, Beijing 100005, China

Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in a number of tumorigenic or transformed cells, yet is relatively non-toxic to most normal cells, therefore, it is a promising agent for cancer therapy. However, some cancer cell lines were resistant to TRAIL cytotoxicity, including MCF-7 breast cancer cells. The mechanism is not clear. Here we report that protein kinase C delta (PKC δ) protects MCF-7 cells from the recombinant soluble TRAIL (rsTRAIL)- mediated apoptosis. It was demonstrated that rottlerin, a PKC δ inhibitor, sensitized MCF-7 cells to rsTRAIL cytotoxicity. Combination of rottlerin and rsTRAIL inhibited PKC δ translocation from the cytosol to membrane, and PKC δ kinase activity on the cell membrane was kept pace with the change of PKC δ expression. Moreover, inhibition of PKC δ by interference RNA could facilitate apoptosis of MCF-7 cells induced by rsTRAIL. Further experiments on the signal machinery showed that rottlerin increased the sensitivity of MCF-7 cells to rsTRAIL by suppressing the transcription activity of NF- κ B, and enhancing the caspase-processing to generate executive apoptotic signals. These findings indicate that PKC δ functions as a survival factor protecting MCF-7 cells from the apoptosis induced by rsTRAIL.

端粒酶活性抑制蛋白 LPTS 的制备和纯化

陈光明, 李载平, 赵慕钧

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

端粒酶 (Telomerase) 是一种合成和延伸细胞染色体端粒的核糖核蛋白, 在正常人体细胞内端粒酶活性几乎检测不到, 然而, 在绝大多数恶性肿瘤细胞 (85%) 中普遍可以检测到端粒酶活性且活性较强。端粒酶被激活是发生恶性肿瘤的重要特征之一, 其激活及表达程度与肿瘤的发生和转移密切相关。抑制端粒酶并使端粒缩短被认为是抑制癌细胞的一种机制, 因此端粒酶成为肿瘤靶向治疗的靶点之一。

目前, 以端粒酶为靶点的肿瘤治疗研究, 主要采用了针对端粒酶 RNA 组分的反义核酸技术、基因治疗技术、切割端粒酶 mRNA 的核酶技术和抑制端粒酶基因转录的技术等。这些技术可以使肿瘤细胞的端粒缩短, 进而使细胞进入危机期或者死亡, 或者使肿瘤细胞的致瘤性显著下降。但是, 在蛋白质水平的治疗研究, 针对端粒酶活性的蛋白抑制剂, 目前还未见报道。

LPTS 基因是我们实验室克隆到的一个肝相关的候选抑癌基因, 具有调控细胞生长、抑制端粒酶活性的功能。LPTS 在肝癌组织及肝癌细胞系中表达量极低或检测不到, 在 SMMC-7721 肝癌细胞中导入 LPTS 基因后, 染色体端粒变短, 明显抑制了细胞克隆的形成能力和恶性增殖能力, 并最终诱发细胞进入危机期或者死亡。因此, LPTS 具有抑制肿瘤细胞生长的能力。

在以往的研究中, 在 LPTS 蛋白是通过在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达制备, 然后经 Gst-或 Hi 柱亲和层析法纯化。但此纯化方法生产成本高, 不适于大量制备。为此, 我们研制了一个高效制备 LPTS 蛋白的纯化方法, 为开展 LPTS 蛋白在肿瘤治疗中的应用性研究打下基础。具体的制备工艺如下:

将 LPTS 基因插入 pET24a+质粒, 将重组质粒转化进宿主菌 *E. coli* BL-21, 然后进行诱导表达。将发酵液离心获得菌体, 然后超声波破碎细胞, 低温离心后收集上清液。采用阳离子交换介质, SP-Sepharose 柱层析, 分离纯化目的蛋白。然后再将含目的蛋白的分离液经超滤浓缩后, 经 Sephadex G100 柱层析进一步纯化, 获得全长蛋白的纯度达 80%以上。经体外活性检测, 我们制备的 LPTS 蛋白具有抑制端粒酶的活性。

HBX 转录激活 Beclin 1 基因的表达

唐红¹, 徐振华¹, 毛怡¹, 宋海¹, 答亮¹, 王遂泉¹, 王翼飞², 横山一成³, 李载平¹,
赵慕钧¹

1. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031; 2. 上海大学数学系; 3. 日本理化学研究所筑波研究所

Beclin 1 最早是作为 Bcl-2 的结合蛋白被发现的。后来的研究表明 Beclin 1 基因可抑制 Sindbis 病毒的复制, 降低病毒引起的中枢神经系统的损伤, 从而对 Sindbis 病毒感染的小鼠大脑保护有作用。我们的研究表明 Beclin 1 蛋白在 HBX 基因呈阳性的肝组织中表达量升高。为研究这一现象的机制, 我们克隆并鉴定了 Beclin 1 基因的启动子。序列研究发现 Beclin 1 基因的启动子没有常规的 TATA 盒, 但包含 HBx 蛋白相关的转录因子的结合位点。荧光素酶实验表明: Beclin 1 基因的-277 / +197 区域具有最大启动子活性; 在肝细胞中 Beclin 1 基因的启动子活性可因外源转入 HBX 基因而被激活。这有可能就是 Beclin 1 蛋白在 HBX 基因呈阳性的肝组织中表达量升高的原因。我们还研究了 Beclin 1 基因对 HBV 病毒复制的影响。酶联免疫实验表明, 在 HBV 病毒感染的肝细胞中, Beclin 1 基因可降低作为 HBV 病毒复制指标的 HBV 表面抗原和 E 抗原的分泌量。进一步研究发现, Beclin 1 基因对增强子 I/X 启动子和增强子 II/核心启动子均有抑制作用。而增强子 I/X 启动子和增强子 II/核心启动子对 HBV 病毒复制起重要作用。综上所述, HBX 基因可能通过上调 Beclin 1 基因的启动子活性而增加 Beclin 1 蛋白在肝中的表达; Beclin 1 基因反过来又可以通过抑制 HBV 的调控元件抑制病毒的复制。我们的研究结果提示了一种新的宿主抵抗 HBV 病毒感染的机制。

与人 LPTS/PinX1 具有相似端粒酶调节功能的斑马鱼 LPTS 的克隆鉴定

孙成副, 吴芝莉, 贾方钧, 李逸平, 赵慕钧

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海, 200031

人 *LPTS/PinX1* 基因是通过定位候选克隆和酵母双杂交方法鉴定得到的一个端粒酶抑制蛋白基因。细胞内过表达 *LPTS/PinX1* 能够抑制端粒酶活性, 导致端粒的缩短和细胞危机期的产生; 而 *LPTS/PinX1* 的缺失导致端粒酶活性和肿瘤发生频率的提高。为了进一步研究 *LPTS* 在端粒长度调控和发育中的作用, 我们在斑马鱼中克隆了人 *LPTS/PinX1* 的同源基因。序列分析表明, 斑马鱼 *LPTS* 具有和人 *LPTS/PinX1* 相似的结构: N 端保守的 G-patch 结构域和 C 端赖氨酸丰富的结构域。生物信息学的分析表明了斑马鱼 *LPTS* 在进化过程中的保守性。我们在斑马鱼不同组织 (比如心、脑和肝) 和胚胎发育时期 (比如 64 细胞期、5 体节期和 *prim-5*) 中检测了 *LPTS* 的表达, 结果发现斑马鱼 *LPTS* 在所有检测的组织 and 胚胎发育时期都有表达。与人 *LPTS/PinX1* 相似, 斑马鱼 *LPTS* 在细胞内同样定位于核仁和端粒上。整体原位杂交的结果表明斑马鱼 *LPTS* 在早期胚胎的所有区域都有表达。体外 TRAP 实验结果显示斑马鱼 *LPTS* 蛋白能够抑制斑马鱼和人的端粒酶活性。我们的结果清楚的表明斑马鱼 *LPTS* 是一个保守的端粒酶抑制蛋白, 因此为下一步研究利用斑马鱼模型研究 *LPTS* 在端粒调控途径和发育中的作用打下了基础。

大鼠 TM4SF4 基因在四氯化碳损伤模型中的功能研究

袁捷, 刘占武, 李载平, 赵慕钧

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

大鼠 TM4SF4 基因,最初是作为一个在肝部分切除后的再生肝中高表达的增殖相关因子被发现的。但是它在肝损伤和肝再生中具体功能和作用机理还不不清楚。本文中,我们主要研究 TM4SF4 基因在四氯化碳急性肝损伤中的作用和功能。我们建立了大鼠四氯化碳肝损伤模型,发现 TM4SF4 基因在四氯化碳处理后表达上调。将大鼠 TM4SF4 基因的编码区以正向或者反向插入 pcDNA3 载体,将质粒用脂质体包埋后通过尾静脉注射的方法导入大鼠体内,以血清中谷丙转氨酶活力的升高和组织坏死程度作为指标来检测 TM4SF4 基因对于四氯化碳肝损伤的影响。我们发现,大鼠 TM4SF4 基因的过量表达会使肝脏的损伤加重,同时血清中的谷丙转氨酶活力升高,而注入反向克隆的大鼠 TM4SF4 基因阻断了 TM4SF4 表达,使得肝组织受到的损伤大大减轻。这些表明大鼠 TM4SF4 的上调表达是肝脏受到损伤后的一种反应, TM4SF4 的高表达与肝脏的再生相关,但是在四氯化碳肝损伤的大鼠中,使 TM4SF4 过量表达会加剧肝细胞的坏死。因此 TM4SF4 在肝脏再生与肝细胞坏死过程中起到了重要的作用。为了进一步研究 TM4SF4 在四氯化碳肝损伤中的作用机制,我们检测了 TM4SF4 基因导入对于一系列肝再生相关基因表达的影响,发现 TM4SF4 基因导入可以影响 TNF- α , TNF RI, c-met 和 Stat3 的表达,提示 TM4SF4 基因可能通过 TNF- α 通路和 HGF/c-met 通路发挥作用。目前对于 TM4SF4 基因的作用机理正在进行深入研究。

抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体的构建和表达

高瀛岱, 熊冬生, 邵晓枫, 杨铭, 刘汉芝, 许元富, 彭晖, 杨纯正

中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室, 天津, 300020

目的: 肿瘤细胞对多种化疗药物产生交叉耐药性 (Multidrug resistance, MDR) 是造成肿瘤化疗失败的主要原因, MDR 的形成机制很多, 但能在临床得到验证的耐药机制很少, 其中对由 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, Pgp) 介导的耐药机制的研究最为广泛和深入, 并在临床得到了证实。Pgp 是药物杀伤耐药肿瘤细胞的理想靶点。

HIT3a 是我所研制的鼠源性抗 CD3 的单克隆抗体, 并已经过国际人类白细胞分化抗原协作组会议正式命名。PHMA02 为本实验室自行研制的具有自主知识产权的抗 Pgp 的鼠源性单克隆抗体。我们克隆单克隆抗体 HIT3a 和 PHMA02 轻、重链可变区基因, 构建表达了抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体, 并探讨抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体介导激活的 T 淋巴细胞杀伤 Pgp⁺耐药肿瘤细胞的作用。

方法: 采用 PCR 和 overlap PCR 方法构建抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体, 并用双脱氧终止法测定 DNA 序列; 采用亲和层析法纯化该产物, 并用 Western blot 和分子排阻层析鉴定纯化产物; 采用免疫荧光法、放射免疫分析法和玫瑰花环试验鉴定纯化产物与靶细胞的结合活性; 采用 ⁵¹Cr 释放试验测定其介导的体外靶向杀伤活性; 采用人白血病及表皮癌耐药及敏感裸鼠移植瘤模型测定该微型双功能抗体在裸鼠体内的分布情况及介导的体内靶向杀伤活性。

结果: DNA 序列测定结果表明: 抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体已构建成功, 表达可溶性产物的产量达 4mg/l 以上, 纯化产物中二聚体的比例达 90%, 具有与 Jurkat (CD3⁺) 和人白血病耐药细胞 K562/A02 (Pgp⁺) 及人表皮癌细胞 KBv200 (Pgp⁺) 结合的活性, 与抗 CD3scFv 及抗 PgpscFv 的亲合常数相当且能同时与 Jurkat 和 K562/A02 细胞结合形成玫瑰花环。抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体在体外具有介导激活的 T 淋巴细胞杀伤 Pgp 表达阳性的耐药肿瘤细胞的作用, 杀伤作用的强弱显示出效靶比和剂量依赖关系, 且可被 CD3scFv 或 PgpscFv 特异性的阻断。具有在耐药肿瘤部位富集的能力, 抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体在体内均具有明显的靶向激活的细胞毒性 T 细胞杀伤耐药肿瘤细胞的作用, 并能有效抑制耐药肿瘤的生长, 延长裸鼠的生存时间。

结论: 首次成功构建表达的抗 Pgp/抗 CD3 微型双功能抗体在体外和体内均具有明显的靶向细胞毒性 T 细胞杀伤耐药肿瘤细胞的作用, 且能在大肠杆菌中高效表达, 是一个有望用于耐药肿瘤治疗的双特异性抗体, 为耐药肿瘤, 特别是肿瘤残留灶和微小转移灶的治疗提供了一种安全、有效的新途径。

靶向 V-ATPase 质子泵的 siRNA 对肿瘤转移的抑制作用及分子机制

章文新¹, 卢小东², 李锦军¹, 姚明¹, 杨胜利¹, 顾健人¹

1. 上海交通大学医学院上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海, 200032; 2. 江苏大学生命科学研究所, 镇江, 212013

恶性肿瘤的侵袭和转移是造成肿瘤病人治疗失败的主要原因, 肿瘤发生的病因、进程和转移全过程, 机体局部的微环境起着非常重要的作用。肿瘤侵袭和转移过程中, 肿瘤和机体相互作用的微环境内的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)、基质细胞 (fibroblasts、epithelial 和 endothelial 细胞等) 和肿瘤细胞之间发生着各种酶和细胞因子等的相互交换和作用; 其中, 蛋白水解酶对 ECM 的降解、使肿瘤细胞从原发部位脱离并进入脉管和/或淋巴管系统、在转移靶器官的毛细血管壁着床和穿过转移靶器官的血管壁或淋巴管壁进入转移靶器官组织的过程中起着非常重要的作用, 参与上述过程的每一类蛋白水解酶几乎都是 pH 敏感的, 需要在细胞外的酸性微环境中激活。因此, 上述过程中的每一步都是酸度敏感的。

V-ATPase (vacuolar H⁺-ATPase) 是近年来在细胞中发现的一种 ATP 依赖的专一性质子泵, 不仅在细胞内的细胞器酸化过程中起作用, 而且可以跨质膜 (plasma membranes) 将 H⁺ 泵出细胞, 在细胞外的微环境酸化过程中起重要作用。位于肿瘤细胞质膜上的 V-ATPase 将 H⁺ 泵到细胞外, 可造成肿瘤细胞外的酸性微环境。因为恶性肿瘤的侵袭和转移过程中需要蛋白水解酶参与细胞外 ECM 的降解, 而这些蛋白水解酶发挥作用需要一个合适的低 pH 环境。我们推测: V-ATPase 质子泵的这种功能可使肿瘤细胞外酸性微环境中的蛋白水解酶活性被大大增强, 因此 V-ATPase 可能会成为肿瘤治疗较为理想的候选靶点。因为参与降解肿瘤细胞外基质的蛋白水解酶种类较多、机制复杂, 所以现有的抑制和干扰某一种或某几种蛋白水解酶的方案, 并不能完全阻止蛋白水解酶对肿瘤细胞周围基质的降解, 从而达到有效的抑制恶性肿瘤侵袭和转移的目的。

V-ATPase 质子泵在高转移性肿瘤细胞中过度表达, V-ATPase 质子泵复合体的 16 KD 亚基 ATP6L 起着跨膜质子通道的作用。为了阐明 V-ATPase 质子泵在肿瘤转移中的作用及分子机制, 我们采用特异靶向 V-ATPase 质子泵复合体亚基 ATP6L 的 siRNA, 使高转移性人肝癌细胞 HCCLM3 的 ATP6L 表达下降了 60%, 体外研究显示 siRNA 处理的 HCCLM3 细胞, 其细胞侵袭力、外排 H⁺ 和从 NH₄Cl 酸过载 (NH₄Cl-prepulsed acidification) 中恢复的能力、蛋白酶 MMP-2 及明胶酶的表达和活力等均明显下降。体内实验还表明 siRNA 处理的 HCCLM3 细胞在裸鼠肝内的生长明显受到抑制, 且原位酶活力成像技术 (*in situ* gelatinase zymography) 显示明胶酶的表达和活力也明显下降, 其肺转移能力也显著减弱。以上结果提示: V-ATPase 质子泵可作为抗肿瘤转移的候选靶标。

人鼠嵌合抗 CD20 F(ab')₂ 片段抗体突变体的研究

熊冬生, 王金宏, 范冬梅, 刘银星, 许元富, 纪庆, 王彩云, 许元生, 刘汉芝, 邵晓枫, 彭晖, 杨铭, 朱祯平, 杨纯正

中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室

目的: 非何杰金氏淋巴瘤 (NHL) 可以分为两类: 慢性 (低度 low-grade) 淋巴瘤和恶性 (中、高度) 淋巴瘤。CLL 属于慢性非何杰金氏淋巴瘤。目前, 治疗 CLL 的主要手段为化疗, 但是治愈率较低, 患者通常对初次化疗反应良好, 可大部分患者产生耐药, 复发的患者也比较多。单克隆抗体因其特异性高, 本身具有细胞毒作用, 可携带药物, 毒物和放射性同位元素而成为治疗 NHL 的新策略。CD20 是非糖基化的四重跨膜磷蛋白, 95% 以上的 B 细胞淋巴瘤都有 CD20 的表达, 更重要的是 CD20 只在前-B 淋巴细胞, 未成熟 B 淋巴细胞, 成熟 B 淋巴细胞, 激活 B 淋巴细胞表达, 而在其他组织以及多能 B 淋巴干细胞、浆细胞不表达; CD20 比较暴露, 不为其它表面分子所掩盖, 因而容易被接近; 在人体血清中几乎无游离的 CD20 存在。CD20 已成为治疗 B 细胞淋巴瘤的理想靶点。HI47 是我所于 1990 研制成功的抗 CD20 鼠源性单克隆抗体, 第四届国际人类白细胞分化抗原会议将 HI47 命名为 CD20+X, 我们从 HI47 克隆了抗 CD20 单抗轻、重链可变区基因, 构建表达了抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂, 并研究了其生物学功能。

方法: 采用错配 PCR 和基因重组技术构建抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂ 突变体, 并用双脱氧终止法测定 DNA 序列; 采用 19L 生物反应器进行高密度发酵, 采用 Protein G 亲和色谱和 S100 凝胶排阻色谱分离纯化表达产物, 并用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定纯化产物; 采用 FACS 和放射免疫分析法测定纯化产物与靶细胞的结合活性; 采用 MTT 和裸鼠 *Raji* 移植瘤动物实验模型测定纯化产物对肿瘤细胞生长的抑制作用; 采用 FACS、DNA Ladder、电镜观察和 RT-PCR 研究纯化产物对肿瘤细胞生长抑制的作用机理。

结果: 成功构建了抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂ 突变体, 其突变位点在轻链可变区的 S26N, 可溶性表达产物的产量达 360mg/L, 其中 F(ab')₂ 的含量达 45%, 纯化产物中 F(ab')₂ 的含量达 90% 以上, 并保留了与 B 淋巴细胞结合活性, 其亲合力 K_a 从 $1 \times 10^9 M^{-1}$ 提高到 $2.2 \times 10^9 M^{-1}$ 。抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂ 突变体在体外对 *Daudi* 细胞和 *Raji* 细胞的生长都具有剂量依赖性的生长抑制作用, 其 IC₅₀ 值分别 14.6 $\mu g/ml$ 和 22.8 $\mu g/ml$, 且对裸鼠皮下 *Raji* 细胞移植瘤的生长具有明显的抑制作用, 抑制率可达 64%; 抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂ 突变体抑制 B 淋巴细胞生长的作用机理为诱导细胞凋亡, 其凋亡过程有 ROS 爆发, bcl-2/bax 改变和细胞色素 c 的释放。

结论: 成功构建表达的抗 CD20 嵌合抗体片段 F(ab')₂ 突变体在体内外具有抑制 B 淋巴细胞生长的作用, 且能在大肠杆菌中高效表达, 其产量、纯度和安全性符合临床需求, 有望成为治疗 B 淋巴瘤的药物。

利用基因芯片技术分析 ES 细胞向心肌细胞诱导分化中 基因表达的变化

贾竹青¹, N.A. Affara², 周春燕¹

1. 北京大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京, 100083; 2. Department of Pathology,
University of Cambridge, UK

目的: 小鼠的胚胎干细胞 (ES) 在二甲基亚砷的诱导下, 可以有效的分化为心肌细胞。利用基因芯片技术高通量检测 ES 细胞向心肌细胞诱导分化过程中基因表达的变化。
方法: 用 0.8%DMSO 诱导培养小鼠的 ES 细胞。诱导后第一天、第五天、第六天、第七天、第八天、第九天分别取样, 做小鼠全基因的 cDNA 文库的基因芯片杂交。
结果: 随着诱导时间的延长, 逐渐出现心肌特异的转录因子 Nkx2.5 的表达, 以及 Mesp1、Numb、Snail、Casq2、Sppl3、Angiopoietin1、Vdr、S100a6、Plk3 等和心肌发育相关的基因都按照细胞分化的程序开放或者关闭表达, 与此同时多个信号通路参与其中, 包括 BMP 信号的同步开放并且维持表达, 以及 PDGF 和 FGF10 的表达。在诱导的早期, PKC 通路相关基因开放表达, 但是 6 天后 PKC 和 JNK 通路的分子表达处于抑制状态; 而 Ca²⁺-Camodilin 通路分子表达升高, 同时 Wnt 经典通路分子在诱导早期没有表达或者表达量很低, 但是在诱导后第 6 天出现短暂的升高。
结论: 提示在心肌细胞的发生过程中, 有多种信号分子参与, 构成心肌发育的复杂网络系统。

骨髓细胞移植和钙离子 ATP 酶 2a 基因治疗心肌梗塞后心力衰竭

郭豫涛¹, 李小鹰¹, 鲁小春¹, 吴迪¹, 姚克群¹, 陈苹², 马康涛², 周春燕²

1. 解放军总医院老年心血管病科(南六科), 北京市复兴路 28 号, 100853; 2. 北京大学医学部基础医学院生物化学与分子生物学系, 北京市海淀区学院路 38 号, 100083

目的: 探讨骨髓基质细胞 (MSC) 作为治疗基因的靶基因转移载体的可行性, 比较 MSC 移植, 钙离子 ATP 酶 2a (SERCA2a) 基因治疗以及以 MSC 为载体的基因治疗在慢性充血性心力衰竭治疗中作用。**方法:** 按常规方法利用 SERCA2a 重组病毒或空病毒载体转染 MSC。按常规方法制作心力衰竭大鼠模型, 并随机分为 4 组: SERCA2a 基因治疗组(组 I, n=7), MSC 细胞移植组 (组 II, n=8), MSC 为载体的基因治疗组 (组 III, n=7) 和腺病毒空载体组 (组 IV, n=7)。术后不同时间点检测各组动物心肌组织中 SERCA2a mRNA 表达水平, 蛋白表达水平及酶活性; 利用免疫组化检测 VIII 表达; 利用超声心动图及有创血流动力学方法评价心脏功能。**结果:** 与组 IV 相比, 组 I (Ad-SERCa2a), 组 II (MSCs), 组 III (MSCs.Ad/SERCa2a) 大鼠的左室射血分数 (EF) 和左室短轴缩短速率 (FS) 增加, 心功能都较移植前有明显改善 ($p < 0.012$)。组 I, 组 II 和组 III 大鼠心肌梗死区面积缩小, 室壁厚度增加, 心室腔减小。治疗后 14D, 组 I 与组 III 心功能改善较组 II 明显, 组 I 与组 III 心功能改善无显著差异。但移植 21D 后, 组 I 大鼠心功能改善程度较移植后 14D 降低, 组 II 和组 III 大鼠则维持心功能改善状态并随时间延长呈上升趋势。组 I 和组 III SERCA2a mRNA 和蛋白的表达水平以及 SERCA2a 酶活性均高于组 II 和组 IV ($p < 0.01$)。细胞移植组梗死区的血管密度明显高于非细胞移植组, 在部分 Hochest3334 标记的阳性细胞中可以检测到 VIII 阳性表达。**结论:** 单纯 SERCA2a 基因治疗, MSCs 移植和以 MSC 为载体的基因治疗均能显著改善缺血性慢性心力衰竭大鼠心功能和血流动力学指标、增强室壁厚度和改善室壁形态。MSCs 移植和以 MSC 为载体的基因治疗组的大鼠心脏呈现稳定持续的心功能改善作用, 以 MSC 为载体的基因治疗组比单纯 MSCs 移植组治疗效应呈现出随时间延长而增强的趋势。MSC 可以作为治疗基因的有效转移载体。

康赛宁对 NOD 鼠胰岛细胞瘤细胞株 NIT 生长影响的体外研究

王德彬, 吴仕筠, 全家妩

中南民族大学生命科学学院, 武汉, 430074

糖尿病作为威胁人类健康的主要慢性疾病而受到世人关注, 虽然其治疗方法有所提高, 但患者生存期及生活质量难以改善。目前依靠胰岛素治疗糖尿病, 仍然不能恢复患者自身胰岛分泌功能, 无法治愈糖尿病。A 群溶血性链球菌制剂康赛宁 (Kanserin, KSR) 多年来广泛用于抗肿瘤治疗, 它可增强巨噬细胞和自然杀伤细胞的活性。康赛宁及其同类制剂对一些感染性疾病和自身免疫病也有预防和治疗效果。

为了研究康赛宁对 NOD 鼠胰岛细胞瘤细胞株 NIT 体外生长的影响, 利用不同浓度的康赛宁处理体外培养的 NOD 鼠胰岛细胞瘤细胞株 NIT 和正常小鼠胰岛 β 细胞时发现, 当培养孔中的康赛宁浓度大于 16 微克/毫升时, NIT 细胞孔在 72 小时形状发生变异, 胞浆亦浓缩, 与保护剂对照孔明显不同; 而加入 KSR 及保护剂的小鼠胰岛 β 细胞孔形态与正常胰岛 β 细胞无差别。其杀伤机制可能是: 受损严重或恶变的胰岛 β 细胞表达 Toll-Like 受体, 正常胰岛细胞不表达, 康赛宁与 Toll-Like 受体结合, 从而诱导表达该受体的细胞发生凋亡。目前, 康赛宁同类制剂 OK-432 与 Toll-Like 受体相互作用对糖尿病的影响, 国内外尚无文献报道。

用康赛宁处理 NIT 及小鼠胰岛 β 细胞 5 天后, 以 MTT 法检测细胞活性, 前者随康赛宁作用浓度的升高而降低, 而后者的活性并未降低。分别提取生理盐水处理组、康赛宁保护剂组、康赛宁处理组的 NIT 及胰岛 β 细胞 DNA, 经 Agarose gel 电泳, 表明康赛宁可使 NIT 细胞 DNA 发生规律性断裂, 但对正常胰岛 β 细胞没有影响, 进一步提示康赛宁有促 NIT 细胞凋亡的作用。康赛宁体外试验, 为研究其在体内预防性治疗糖尿病提供了一定的实验依据。

人 γ 珠蛋白基因-175 和-173T→C 突变均在转基因鼠中确立 HPFH 表型 —说明一个多蛋白复合体可能涉及 γ 基因在成人红细胞中沉默的机制

刘立仁, 杜占文, 赵华路, 刘晓玲, 黄小东, 沈洁*, 鞠丽梅*, 方福德, 张俊武
中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所医学分子生物学国家重点实验室, 北京, 100005;
*医学实验动物研究所

正常人 $A\gamma$ 珠蛋白基因主要在胎肝红细胞中表达, 出生后关闭, 但发现 $A\gamma$ 基因启动子-175 或 -173T→C 突变遗传性胎儿血红蛋白持续存在综合症 (HPFH) 个体, $A\gamma$ 基因在成人骨髓红细胞中仍然活跃表达。我们以这些天然突变体为模型研究了 γ 珠蛋白基因发育开关机制。1) 用电泳迁移率改变 (EMSA) 实验研究野生型、-175T→C 及 -173T→C γ 基因启动子与转录因子的结合, 证明在体外 -175T→C 突变导致 Oct-1 结合显著减少, 但不影响 GATA-1 结合; -173T→C 突变导致 GATA-1 结合显著减少, 但仅轻微减少 Oct-1 结合。2). 构建了三个重组粘粒, $\mu\text{LCRA}\gamma\psi\beta\delta\beta$ (包含由基因座控制区 (LCR) 中 HS1~4 核心顺序组成的 3.1kb μLCR 以及具有天然染色体排列的从 $A\gamma$ 到 β 珠蛋白基因 29kb 顺序), $\mu\text{LCRA}\gamma^{-175}\psi\beta\delta\beta$ 和 $\mu\text{LCRA}\gamma^{-173}\psi\beta\delta\beta$ (分别用 -175T→C 和 -173T→C $A\gamma$ 基因替换野生型基因), 分别注射小鼠受精卵。获得两个 $\mu\text{LCRA}\gamma\psi\beta\delta\beta$ 转基因鼠系, RNase 保护法分析确定人 $A\gamma$ 基因在小鼠胚胎期活跃表达, 而出生后显著下降到胎鼠中表达量的 1/50。人 β 珠蛋白基因在小鼠胚胎期沉默, 在胎儿早期开始表达并很快达到最高水平, 且一直保持到成年期。这些说明人 $A\gamma$ 及 β 珠蛋白基因在转基因小鼠中均呈现正确的 γ → β 发育表达开关; 获得四个 $\mu\text{LCRA}\gamma^{-175}\psi\beta\delta\beta$ 转基因鼠系。成年转基因鼠中人 $A\gamma$ 基因的表达量与胎鼠中人 $A\gamma$ 基因的表达量相比, 虽然有一定程度的下降, 但仍然维持在较高水平; 获得三个 $\mu\text{LCRA}\gamma^{-173}\psi\beta\delta\beta$ 转基因鼠系。成年转基因小鼠中人 $A\gamma$ 基因的表达量与胎鼠中人 $A\gamma$ 基因的表达量相比, 虽然有一定程度的下降, 但仍然维持在较高水平。这些结果说明, 虽然 -175 和 -173T→C 突变在体外影响启动子与 GATA-1 和 Oct-1 的结合改变不同, 但两种突变均能确立人 $A\gamma$ 基因在转基因鼠中的 HPFH 表型。这些结果使我们假设, 正常人 γ 珠蛋白基因在成人红细胞中的沉默可能涉及一个由转录因子 GATA-1、Oct-1 和其它蛋白组成的抑制性多蛋白复合体, 降低了 Oct-1 亲和力的 -175 突变和降低了 GATA-1 亲和力的 -173 突变在体内均能阻断这个多蛋白复合体的形成, 因而导致 γ 珠蛋白基因在成人红细胞中的活化。3). 利用抗 GATA-1 抗体和抗 Oct-1 抗体进行染色质免疫沉淀 (ChIP) 并结合体内足迹 (*in vivo footprint*) 实验, 证明在转基因鼠中 -175 和 -173T→C 突变均同样地阻断 -175 区 GATA-1 和 Oct-1 结合位点上的蛋白结合。这一结果与我们提出的抑制性多蛋白复合物的假设是一致的。

La(III)对果蝇遗传性状及其唾腺染色体的影响

吴士筠, 杨春洪

中南民族大学生命科学院, 生物技术国家民委重点实验室, 武汉, 430074

我国拥有十分丰富的稀土矿藏, 占世界储量的 80%左右, 是稀土生产与应用大国。近年来, 在化工、农业、医药、食品等方面得到广泛的研究与应用。随着稀土生物学效应的不断深透, 稀土元素将不可避免地通过各种途径进入生物圈, 进入人体, 但其对于人体是否有害? 成为一个迫切需要解决的问题。因此深入探讨稀土元素对生物体遗传物质的影响, 对科学指导稀土的应用, 对环境保护、人体健康显得尤为重要。

利用稀土对生物体遗传特性的研究已广为开展, 关于稀土元素与生物大分子的作用与研究已有不少报导, Sarkander 等的研究表明稀土离子可与 DNA 分子形成水溶性的配合物, 并且已知稀土离子对核酸有抑制作用。在植物方面, 人们研究了稀土对植物生长发育及植物体内许多酶的影响, 不仅提高了农作物的产量, 而且改善了作物的品质, 也分析了稀土对光合细菌和纯培养细菌生长的影响, 有效解决了许多重要经济作物的病虫害问题。但是在染色体水平上探讨稀土离子对生物体影响的研究甚少。

众所周知, 包括果蝇在内的双翅目幼虫唾腺细胞中, 含有极为特异的巨型多线染色体, 其大小为普通染色体的 100-150 倍, 唾腺染色体经过多次复制而并不分开, 大约有 1000-4000 根染色体丝的拷贝。染色体经染色后出现深浅不同、密疏各异的横纹, 这些横纹的数目和位置是恒定的, 代表着果蝇等昆虫的特征, 如果染色体有缺失、倒位、重复等, 则很容易在唾腺染色体上识别出来。本实验探讨了稀土离子 La(III)对果蝇遗传性状及其唾腺染色体的影响。研究表明: 培养基中加入不同浓度硝酸镧溶液饲养的果蝇其子一代生长期比对照延长, 且幼虫个体较对照小; 当 La 离子浓度大于 10^{-2} mol/L 时则使果蝇不繁殖, 甚至死亡; 培养基中加入不同浓度硝酸镧溶液饲养的果蝇三龄幼虫, 其唾腺染色体随着 La 离子浓度的增加, 产生缺失环的频率升高, 且有较严重的断裂损伤现象, La 离子浓度较低的培养基中培养的果蝇三龄幼虫, 其唾腺染色体的带状结构较对照疏松膨大, 形成较明显的一节“粗”一节“细”的现象。这些现象可以由亲代遗传给子一代、子二代; 同时又表现出自身的修复能力。

尽管稀土引起的果蝇染色体某些部位产生缺失环等现象对果蝇的生长、发育产生影响将如何? 是利还是弊? 还需通过基因定位等进一步研究确定。

人类内源性小 RNA 的发现和基因表达调控网络

殷勤伟, 谭余良, 陈芳, 张勇琴, 郭维锐

中国科学院生物物理研究所, 北京朝阳区大屯路 15 号, 100101

近年来,从植物到人类的细胞中发现了一类内源性的、长度约 22 个核苷酸的非编码 RNA,称为小 RNA。小 RNA 可由内源性基因编码,位于编码基因间区或编码基因的内含子或外显子区,通过 RNA 聚合酶 II 而被转录,其前体含有帽状结构和多聚腺苷酸。它们在指导 mRNA 分子的转译抑制、降解断裂或其它形式的调节通路中发挥重要作用。目前已经知道小 RNA 可以发挥多种功能,如组织器官的定向发育、细胞生长分化的时空调节、信号通路的开启和关闭、细胞周期的监测与调控、学习与记忆、肿瘤的发生与凋亡、肥胖和衰老等。我研究组采用生物信息学技术在人类基因的内含子中发现了 200 多个具有调节功能的小 RNA 分子,经 Northern Blot, RT-PCR 和 Western Blot 等生物学方法研究证明这些小 RNA 分子前体能够产生成熟的 siRNA 并以序列特异的方式沉默相应的靶基因。尽管寻找小 RNA (miRNA) 的靶基因是件非常困难的任务,但幸运的是人类内含子的小 RNA 却有许多靶基因。来源于人类基因内含子的小 RNA 能够通过不同的作用方式作用于靶基因从而调节那些基因的表达。某个小 RNA 分子亦能引起肿瘤细胞的行为和形态学的变化,进一步的深入而系统的研究在进行中。总之,根据其它实验室的研究结果和我们的发现,可以建议单一的小 RNA 基因可有一个到多个,它们能有多个不同的靶基因。同样,多个不同的小 RNA 亦可与同一个 mRNA 分子相结合并调控其生物活性。随着编码基因的表达,从内含子和外显子剪切出的小 RNA 可以与其上下游的靶 mRNA 的不同结构区域结合,从而指导转译抑制、切割降解或甲基化。小 RNA 的发现丰富了人们对蛋白质合成控制的认识,补充了在 RNA 水平对靶 mRNA 分子进行更迅速和有效的调节,展现了细胞内基因表达调控全方位多层次的网络系统。

Survivin 基因启动子的克隆及活性的初步研究

徐让, 卢健, 钱关祥

上海第二医科大学生化教研室, 上海, 200025

目的: 克隆 survivin 基因的启动子, 构建不同长度 survivin 基因启动子调控的报告基因载体, 研究该启动子在多种肿瘤细胞株中的活性, 为该启动子在肿瘤靶向性基因治疗的应用提供依据。**方法:** ①用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 survivin 基因在多种肿瘤细胞株 A549、HepG2、Hela、MB231 中的表达; ②以正常人基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 方法克隆不同长度 987bp、596bp、269bp、158bp 的 survivin 基因启动子, 并插入 pGL3-basic 载体, 构建荧光素酶报告载体; ③利用脂质体将不同长度的 survivin 基因启动子调控荧光素酶的报告基因载体瞬时转染多种肿瘤细胞株 A549、HepG2、Hela、MB231, 经荧光素酶检测, 比较不同长度 survivin 基因启动子的活性。**结果:** survivin 在所检测的多种肿瘤细胞株中都表达; 各个片段的 survivin 基因启动子在各种细胞株中均显示较高的活性, 其中翻译起始位点上游 269bp 的启动子活性最高, 是 survivin 启动子的核心序列。**结论:** survivin 启动子在多种肿瘤细胞中表达, 是一个在肿瘤基因治疗中有潜力的启动子。

大鼠副睾 16 基因的功能初探

史毅, 张永莲, 金由辛

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

大鼠副睾 16 基因是中国科学院生物化学与细胞生物学研究所张永莲院士课题组发现的新基因, 该基因的基本数据尚未发表。金由辛实验室对其功能进行了初步研究。

构建了该基因的工程菌 (大肠杆菌), 并纯化了此蛋白。用此 16 基因蛋白制备了抗体。

将 16 基因转入大鼠 DC1 细胞株, 获得了稳定转染株细胞。

设计、合成并构建了三个含抗 16 基因 siRNA 的由 U6 snRNA 启动子启动的载体。用脂质体包裹的 siRNA 载体导入表达 16 基因的 DC1 细胞, 用 RT-PCR 和 western blot 技术检查 siRNA 对 16 基因的下调活性。以空载体和含错误 siRNA 的载体为对照, 结果表明 siRNA 下调基因表达可达 70% 以上。

用 RT-PCR 方法和 Western blot 实验证明 16 基因主要在大鼠副睾头部的前半部分表达, 副睾的其他部分和大鼠其他器官中无 16 基因的表达。

用脂质体包裹的载体直接注射到大鼠副睾的头部, 同样用 RT-PCR 和 western blot 技术检测 16 基因表达被下调的情况。用生理盐水注射的大鼠为对照, 结果显示, 16 基因可以被下调 50% 左右。一次注射后, 下调作用可维持 14 天, 在 7 天时蛋白下调最低。

免疫荧光结合实验结果显示只有副睾头部前端的精子可以与融合蛋白结合。表明 16 基因蛋白分泌进入管腔后, 立即与精子结合, 但很快就离开精子或被降解。16 基因蛋白结合在精子尾部的前半段。

以注射生理盐水的大鼠为对照, 注射抗 16 基因 siRNA 载体的大鼠, 其精子的活动性有明显的下降。结果表明 16 基因蛋白与精子的结合对于精子的成熟及精子功能的完善是必要的。

通过生物信息学分析, 推测 16 基因属 lipocalin 家属。它可以象该家属的其他成员一样, 形成由 β -折叠组成的笼状结构。该结构被用于离子或疏水小分子的携带和运送。

检测野生型 DC1 细胞和 16 基因稳定转染的 DC1 细胞中, lipocalin 家属相关的两个蛋白的表达情况。结果显示, 与 lipocalin 家属相关的两个蛋白只在 16 基因稳定转染的 DC1 细胞株中表达, 而在野生型 DC1 细胞株中无表达。

综上所述, 我们初步证明 16 基因蛋白是 lipocalin 家属的成员, 它特异在副睾头部前端表达。它被分泌进入副睾管腔后, 结合在精子尾部的前半部分。其功能可能是为精子, 特别是精子尾部的前半段运送离子或疏水小分子。这种离子或疏水小分子的输送与精子的最终成熟有关。

草苻蓉根茎粗多糖的分离纯化及其部分性质的研究

宋全胜, 柳明珠, 梁忠岩*, 李天洙, 孙权, 张学武

延边大学医学部, 基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 延吉, 133000

*东北师范大学生命科学院生物化学教研室, 长春, 130000

目的: 探讨草苻蓉多糖 (*Boschniakia rossica* Fledtsch.et Flerov polysaccharide, BRPS) 抗肿瘤、抗衰老的分子机制进。

方法: 本实验以草苻蓉根茎为原料, 水提后的残渣用稀碱溶液 (0.1 mol/L NaOH) 提取, 所得粗多糖用纸层析 (paper chromatography, P.C) 和气相色谱层析 (gas chromatography, G.C), 测得其单糖组成及摩尔比。粗多糖经乙醇分级、Sevage 法脱蛋白、H₂O₂ 脱色、高速离心等方法分离纯化得到 BRPS-III A。经 DEAE-Sephadex A-25 柱层析、Sephacrose CL-4B 柱层析纯化, BRPS-III A 为均一组分, 它的结构分析有待进一步研究。

结果: G.C 分析表明, 粗多糖的单糖组成为 Ara, Xyl, Gal, Man, 和 Glc, 摩尔比依次为 0.98: 1.00: 2.38: 1.28: 10.00。BRPS-III A 的单糖组成为 Xyl, Gal, Man, 和 Glc, 摩尔比依次为 0.60: 3.11: 1.00: 3.96。

结论: BRPS 是以葡萄糖、半乳糖为主, 也含有木糖和甘露糖的中性杂多糖。

大鼠骨髓间充质干细胞条件培养液促进心肌成纤维细胞分泌胶原

韩瑜^{1,2}, 韩变梅¹, 朱伟铨¹, 陈静海¹, 胡盛寿¹, 柳明珠², 陈曦¹

1. 中国医学科学院 中国协和医科大学, 阜外心血管病医院, 心血管病研究所, 北京, 100037; 2. 延边大学医学部, 基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 延吉, 133000

目的: 缺血性心血管疾病已成为威胁人类健康的重大疾病之一。骨髓间充质干细胞 (MSCs) 移植因其可以有效地改善心脏功能, 干预心室重构病理过程而成为治疗心肌缺血的新的希望。但目前, MSCs 移植改善心功能的确切机制尚不清晰, 移植细胞的旁分泌作用是细胞心肌成型术 (Cellular Cardiomyoplasty, CCM) 可能的作用方式之一。氧、营养因子和生长因子的缺乏是缺血心肌组织微环境的组成因素, 本研究旨在探讨 MSCs 经缺氧和无血清刺激后所分泌的物质对心肌成纤维细胞 (FBCs) 胶原合成的影响, 以此为 MSCs 移植和治疗提供一定的理论依据。

方法: MSCs 分离自 80 克重的 SD 大鼠的股骨骨髓, 并用含 10%胎牛血清的 IMDM 培养液在 37°C 培养细胞。通过撤去培养液中的胎牛血清, 以及缺氧处理模拟体内的缺血环境。分别于缺氧和无血清培养处理 3 小时, 6 小时, 9 小时, 24 小时后收集 MSCs 条件培养液。FBCs 与 MSCs 条件培养液孵育 40 小时后, 用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT 法), 检测 FBCs 细胞的增殖; 通过 ³H-脯氨酸掺入试验 (³H-proline incorporation) 检测 FBCs 细胞胶原蛋白的合成; 以半定量 RT-PCR 方法分析 I、III 型胶原 mRNA 水平的表达。实验以无血清培养液培养的 FBCs 作为对照组。

结果: MTT: 与对照组比较加入缺氧和无血清处理 3 小时、6 小时、9 小时、24 小时的 MSCs 条件培养液培养的 FBCs, 各组间 OD570 的值无显著差别, 提示 MSCs 条件培养液没有影响 FBCs 的增殖。

³H-proline 实验: 加入无血清缺氧和无血清处理 6 小时的 MSCs 条件培养液培养的 FBCs CPM 值明显高于对照组, 提示 MSCs 条件培养液刺激 FBCs 胶原蛋白合成增加。

RT-PCR: 与对照组比较加入缺氧和无血清处理 6 小时的 MSCs 条件培养液培养的 FBCs 中, I 型胶原 mRNA 表达水平显著升高, 而 III 型胶原 mRNA 表达水平却有所下降, 提示 MSCs 条件培养液刺激 FBCs I 型胶原表达合成增加。

结论: 大鼠骨髓间充质干细胞在缺氧和无血清刺激后所分泌的物质能够促进心肌成纤维细胞 I 型胶原合成增加, 提示移植到缺血心肌中的骨髓间充质干细胞可能通过旁分泌作用改变心肌成纤维细胞胶原的合成, 从而进一步影响心室重构的过程。

水稻双功能激酶基因 (OsSTY kinase) 的克隆及其表达研究

杜淦, 梁颖*

西南农业大学农学与生命科学学院, 重庆, 北碚, 400716

*E-mail: liangyingjq@yahoo.com

促分裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 三酶级联途径是生物体中的一种重要信号通路, 在生物的生理、病理过程中发挥重要的作用。丝/苏及酪氨酸双功能激酶是该途径中的重要组分。现已在许多物种中分离到双功能激酶, 如人的 Erk1 和 Erk2, 拟南芥的 ATN1 和 ADK1, 大豆的 GmpK6, 裂殖酵母的 Wee1 和 Spk1 及花生的 AhSTY kinase 等。我们从水稻 (*O. Sativa indica* Guangluai 4) 中克隆了一个双功能激酶 (OsSTY) 基因, 它编码一个含 417 个氨基酸的蛋白, 其分子量为 45926 Da, 等电点为 7.689。OsSTY C-端包括一个含 11 个激酶结构模体 (motifs) 的保守结构域。OsSTY 与拟南芥 AtSTY 氨基酸序列同源性的 71%, 与花生 AhSTY 同源性的 69%。在 OsSTY 的活性中心有许多非常保守的基序, 如: 亚功能域 V (TEY)、VIB (IHRDLK) and VII (DFGV) 等。这些特征表明, OsSTY 是一个典型的双功能激酶。Southern 杂交结果和水稻基因组数据库的分析表明, OsSTY 是一个单拷贝基因。我们将秧苗进行高温和低温处理, 用 Northern 的方法检测 OsSTY 表达水平的变化。结果显示, 当高温 (37°C) 和低温 (4°C) 处理水稻秧苗后, OsSTY 在 mRNA 表达水平显著提高。为了研究信号分子和激素对 OsSTY 基因表达的影响, 我们选择用 ET、放线菌酮 CHX、SA、SA 加 CHX、ET 加 SA 等分别对水稻秧苗的叶片进行处理。用对这些处理之后 OsSTY 表达水平进行检测分析。随着 ET 处理时间的延长, OsSTY 在 mRNA 水平上稳步增加。而对于 SA 的处理, 在最初 60 分钟内, OsSTY 的表达水平没有显著的变化, 但当时间延长到 120 分钟时, OsSTY 的 mRNA 水平得到非常显著的升高。这表明 OsSTY 对 SA 的应答有一个时间滞后过程, 具体机制有待进一步研究。与 ET 和 SA 分别单独处理相比, ET 和 SA 共同处理水稻秧苗叶片后, OsSTY 的 mRNA 水平得到更加显著的提高。但是, 放线菌酮素 CHX 的处理对 OsSTY 的影响与对照 (剪切, 水处理) 没有明显的差别。

Abbreviations: ET, Etephon; CHX, Cycloheximide; SA, Salicylic acid; ABA, Abscisic acid.

珍珠梅水提物对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠血管内皮生长因子表达的影响

陈丽艳¹, 柳明洙¹, 张璐², 张学武¹, 李天洙¹, 孙权¹, 崔长旭¹

1. 延边大学医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 延吉, 133000; 2. 南开大学医学分子生物学研究所, 天津, 300073

目的: 研究珍珠梅水提物对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠体内血管内皮生长因子表达的影响。**方法:** 取 60 只小鼠复制 S₁₈₀ 荷瘤模型, 随机分成 5 组: 珍珠梅水提取物大、中、小剂量组, 对照组, 环磷酰胺组。观察珍珠梅水提取物对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的抑制率、脾指数及胸腺指数; 应用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法检测肿瘤组织和瘤旁组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 基因的表达。**结果:** 珍珠梅水提取物对 S₁₈₀ 荷瘤小鼠有明显的抑制作用 ($P<0.05$), 并能显著提高 S₁₈₀ 荷瘤小鼠脾指数及胸腺指数; RT-PCR 结果显示, 与对照组比较, VEGF mRNA 在珍珠梅提取物大、中剂量组, 环磷酰胺组的肿瘤组织的表达均有显著性差异 ($P<0.05$)。**结论:** 珍珠梅可以改善 S₁₈₀ 荷瘤小鼠的免疫功能, 下调 VEGF 在肿瘤组织中的表达, 抑制肿瘤血管生成, 可能是珍珠梅抑制肿瘤作用的分子机制之一。

外源质粒 DNA 对小鼠脾脏物质能量代谢的影响

刘建文, 乐国伟, 施用晖

江南大学食品学院, 无锡, 214036

目的: 研究外源质粒 DNA 经胃肠道途径对免疫激活状态下小鼠脾脏代谢的影响。**方法:** 给 Balb/c 小鼠灌胃质粒 pcDNA3 200 μ g, 分别在灌胃后 4h 和 18h 分离脾脏, 提取脾脏总 RNA。利用 Affymetrix 基因表达谱芯片对灌胃质粒 pcDNA3 后的 Balb/c 小鼠脾脏进行基因表达谱研究。采用 Genmapp 和 MAPPFinder 软件进行功能聚类分析。**结果:** 灌胃质粒 pcDNA3 后, Genmapp 软件分析结果发现外源质粒刺激小鼠脾脏产生免疫应答的同时, 脾脏中大量代谢过程受到诱导, 其中包括嘧啶代谢、嘌呤代谢及蛋白质合成, 胆固醇合成、脂肪酸合成、糖酵解、三羧酸循环及线粒体氧化磷酸化途径等。**结论:** 外源质粒 DNA 通过胃肠道途径吸收能够影响小鼠脾脏的代谢过程, 对相关基因及过程的研究有助于在分子水平上深入了解外源质粒 DNA 经胃肠道吸收后的作用机制。

人 ACAT1 mRNA 反式剪接成熟的 *in vitro* 体系研究

胡光晶, 陈江, 李夏璐, 马涵慧, 韩瑞军, 杨新颖, 李伯良

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (acyl-coA:cholesterol acyltransferase, ACAT) 催化细胞内游离胆固醇与长链脂肪酸连接形成胆固醇酯, 是调控胆固醇代谢平衡的关键酶之一。前期工作发现人 ACAT1 cDNA K1 对应的 mRNA 来自两条不同的染色体 (1 号染色体和 7 号染色体)。进而, 利用含有来源于 1 号或 7 号染色体的人 ACAT1 基因组 DNA 序列的表达质粒、转染人胎肾细胞 HEK293 探索 *in vivo* 剪接反应, 也利用抽提细胞总 RNA 作为人 ACAT1 pre-mRNA 的来源、通过加入 HeLa 细胞核抽提物探索 *in vitro* 剪接反应, 结果表明均发生反式剪接而产生人 ACAT1 cDNA K1 对应的成熟 mRNA 序列。

在上述探索基础上, 本工作深入进行反式剪接成熟人 ACAT1 mRNA 的 *in vitro* 体系研究。首先, 设计、构建体外转录人 ACAT1 pre-mRNAs 的一系列 T7 启动子控制质粒, 获得了体外合成人 7 号和 1 号染色体来源的多种不同大小的 ACAT1 pre-mRNAs, 分别作为 5'剪接供体和 3'剪接受体。其中, 5'剪接供体 pre-mRNA 全长近 2000-nt, 比文献报道应用的 5'剪接供体要大 10 倍左右, 而 3'剪接受体 pre-mRNA 则根据近年文献报道的剪接体复合物对受体序列的 5'-most YAG 识别机制、结合人 *Acat1* P1 的转录多起始位点而优化设计。然后, 利用 HeLa 细胞核抽提物, 进行 *in vitro* 反式剪接成熟 mRNA 产物的实验研究, 通过应用特异性引物进行 RT-PCR 及其产物的限制性内切酶分析、直接测序等技术方法, 鉴定反式剪接成熟的人 ACAT1 mRNA 产物。重复实验结果显示, 含有外显子 Xa 及其下游 190-nt 序列 (约 1300-nt) 与全长序列 (约 2000-nt) 的 2 种人 ACAT1 pre-mRNAs 作为 5'剪接供体, 都具有反式剪接底物活性, 并提示与 U1 snRNA 的 Sm 位点序列极其相似的外显子 Xa 下游序列 (nt +116 ~ +124) 可能发挥重要的功能作用; 含有外显子 1 与外显子 1-2 及其上游 25-nt 序列的 2 种人 ACAT1 pre-mRNAs 作为 3'剪接受体, 均具有良好的反式剪接底物活性, 而且比相应带有上游 45-nt 序列的 3'剪接受体活性要高得多, 说明外显子 1 上游序列 (nt +45 ~ +25) 中 3 个假性 YAG 对正确识别下游 3'剪接位点具有非常显著的影响。这些结果亦表明, T7 polymerase 体外转录合成的人 ACAT1 pre-mRNAs 作为 5'剪接供体和 3'剪接受体, 在 HeLa 细胞核抽提物反应体系中反式剪接成熟了人 ACAT1 mRNA 产物, 提示在 *in vitro* 条件下组装的反式剪接体带有相应于尚未染色体定位的外显子 Xb 序列 (约 10-nt) 的 pre-mRNA 或小分子 RNA。这将促进利用 *in vitro* 反式剪接体系进行外显子 Xb 序列的染色体定位、外显子 Xb 序列的上下游剪接位点分析等工作。

基因表达的反式剪接成熟 mRNA, 在低等真核生物中研究较多, 有关哺乳细胞基因表达的类似研究不多, 而深入的跨染色体反式剪接成熟 mRNA 研究还尚未见有文献报道。综合上述结果, 人 ACAT1 mRNA 由两条染色体来源的 pre-mRNAs 通过一种特殊的反式剪接新途径而加工成熟, 并且本实验室已发表于 JBC 的工作从蛋白质水平证实了这种反式剪接 mRNA 翻译的蛋白是一种新的异构体。进而, 深入研究这种特殊的反式剪接加工成熟 mRNA 的机制, 可建立 ACAT 基因表达调控研究的新体系, 为拓展探索 ACAT 基因表达调控的生理功能与病理变化作用、为相关疾病的临床与药物研究提供理论依据。

TNF- α 通过 NF- κ B 途径增强人 ACAT1 基因表达

雷磊, 张念一, 杨金波, 杨新颖, 王怡, 李伯良

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是胆固醇及其酯类代谢平衡的关键酶之一。至今, 已报道编码 ACAT1、ACAT2 的两类基因。ACAT1 基因 (*Acat1*) 在人体组织细胞广泛表达, 而 ACAT2 基因 (*Acat2*) 主要在肝肠组织细胞特异表达, 它们在动脉粥样硬化 (AS)、老年性痴呆症 (AD)、高胆固醇血症 (HC) 等病变中起重要作用。已有研究表明, AS 病变斑中含有的大量干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是促 AS 病变的重要细胞因子。

本工作在 *Acat1* P1 启动子结构元件分析和 IFN- γ 调控启动子活性作用等研究基础上, 深入探索 TNF- α 对人单核细胞 *Acat1* 的表达调控作用与分子机制。首先, TNF- α 处理体外培养单核细胞并通过 RT-PCR、Western blot 分析表明, TNF- α 可增强人血来源单核细胞中的 *Acat1* 表达, 并且这种增强表达作用具有 TNF- α 浓度依赖效应; 在人白血病来源的 THP-1、U937、HL60 三种单核细胞株中都检测到了这种 TNF- α 增强表达的效应作用; 荧光素酶报告基因实验结果显示, TNF- α 效应作用主要是提高 *Acat1* P1 启动子活性, 并且 TNF- α 的这种效应作用具有细胞特异性。进而, 利用单核细胞株 THP-1 进行深入的探索研究结果显示, TNF- α 对 P1 启动子活性的增强效应作用具有时间依赖性, 并呈现与 TNF- α 浓度相关的典型受体结合饱和曲线; 转染表达突变型 I κ B α , 降低了 TNF- α 对细胞内源性人 *Acat1* 和荧光素酶报告基因表达的效应作用, 表明 TNF- α 效应是通过 NF- κ B 信号转导途径而发挥作用; 用 NF- κ B 信号转导途径的多种抑制剂处理, 均能抑制 TNF- α 对细胞内源性人 *Acat1* 和荧光素酶报告基因表达的效应作用, 这进一步肯定了 TNF- α 是通过 NF- κ B 信号转导途径对人 *Acat1* P1 启动子活性起增强效应作用; 深入启动子序列缺失分析揭示人 *Acat1* P1 启动子存在 21-bp(-100 ~ -79) 的 TNF- α 效应区, 其中包含有一个潜在的 NF- κ B 结合部位 (-89GGGGACCACC-79); 凝胶阻滞实验 (EMSA) 表明该效应区能结合被 TNF- α 所激活的转录因子 NF- κ B (包括亚基 p65 和 p50); 然后进行 TNF- α 效应区的详细突变并通过荧光素酶报告基因表达分析和 EMSA 的结果表明, 人 *Acat1* P1 启动子上 TNF- α 效应区内存在 NF- κ B 的顺式作用元件。有关在感染条件下表达分泌的 TNF- α 通过增强人单核细胞 *Acat1* 表达而发挥作用等工作正在进行中。

感染而发高烧是冠心病、中风等 AS 病人的致命危险因子。其中, 感染条件下 TNF- α 可由多种细胞合成并分泌至细胞外, 它既可作为体内应急作用的抗感染因子, 也会作用于某些细胞而产生严重的病理性效应。综上所述, TNF- α 对人单核细胞 *Acat1* 的表达调控效应, 是通过 NF- κ B 信号转导途径而发挥作用, 即通过活化的转录因子 NF- κ B 结合于人 *Acat1* P1 启动子上的 NF- κ B 顺式元件而增强人 *Acat1* 表达, 使提高细胞内胆固醇酯的合成和促进细胞膜游离胆固醇的功能作用。这些研究为深入 ACAT 基因表达调控的生理功能与病理变化作用等探索提供重要的分子基础、为 AS 等重要疾病的临床与药物研究提供相关理论依据。

人 ACAT2 基因沉默或低表达的分子机制

赵晓楠¹, 鲁明¹, 陈佳¹, 王灿华^{1,2}, 姚晓敏^{1,2}, 宋保亮¹, 李伯良¹

1. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031; 2. 上海交通大学生命科学与技术学院, 上海, 200032

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是细胞内唯一合成胆固醇酯的酶, 在生命细胞胆固醇代谢平衡中发挥重要作用, 并与动脉粥样硬化 (AS)、老年性痴呆症 (AD)、高胆固醇血症 (HC) 等人类重要疾病直接相关。到目前为止, 已报道编码 ACAT1、ACAT2 的两类基因。ACAT1 基因 (*Acat1*) 在人体组织细胞广泛表达。ACAT2 基因 (*Acat2*) 表达则具有肝肠组织细胞和胚胎发育特异性, 在大部分成人组织细胞转变为沉默或低表达。

本工作在揭示人 *Acat2* 启动子活性具有组织特异性、肠细胞分化依赖性和转录因子 *Cdx2*、*HNF1 α* 的协同调控等的工作基础上, 探索研究成人组织细胞中有关 *Acat2* 沉默或低表达的分子机制。首先, RT-PCR、Western Blot 分析人细胞内源 *Cdx2*、*Hnf1 α* 和 *Acat2* 表达的结果显示, 在 Caco-2, HepG2 细胞中内源 *Cdx2*、*Hnf1 α* 同时表达, *Acat2* 亦高表达; 在 Hep3B、LO2、HeLa、THP-1、HEK293 细胞中内源 *Cdx2*、*Hnf1 α* 两基因的表达出现多种形式, 但 *Acat2* 均沉默或低表达。然后, RNAi 实验研究结果显示, 降低 Caco-2、HepG2 细胞内源 *Cdx2* 和/或 *Hnf1 α* 表达, *Acat2* 则也出现沉默或低表达; 外源基因转染细胞表达实验结果显示, 在 LO2、HeLa 和 THP-1 细胞中过表达外源 *Cdx2*、*Hnf1 α* 时, 出现 *Acat2* 高表达; 综合上述结果表明, 这些细胞中 *Acat2* 表达完全依赖于转录因子基因 *Cdx2*、*Hnf1 α* 的表达。但 Hep3B、HEK293 细胞高表达 *Cdx2*、*Hnf1 α* 时并不显著提高 *Acat2* 表达, 提示在肝细胞 Hep3B 和肾细胞 HEK293 中 *Acat2* 的沉默或低表达可能存在特殊的分子机制。进而, 利用克隆人 *Acat2* 启动子, 深入探索 *Acat2* 沉默或低表达过程中可能存在的这种特殊分子机制。荧光素酶报告基因表达实验结果表明, 全长或不同缺失的人 *Acat2* 启动子在 Caco-2, HepG2 细胞中呈现高活性而在 HEK293 细胞几乎无活性, 在过表达 *Cdx2*、*Hnf1 α* 的 HEK293 细胞中人 *Acat2* 启动子活性似有提高, 但没有出现明显的激活作用。同时, 对 HEK293 细胞来源的基因组 DNA 甲基化测定表明, 人 *Acat2* 启动子 DNA 的 CpG 几乎都处于甲基化状态。这些结果提示 HEK293 细胞中可能存在致使 *Acat2* 沉默或低表达的特异因素, 而有关 *Acat2* 启动子高甲基化与该基因沉默或低表达的关系、以及可能的特异反式因子作用等研究均在进行中。

肝肠组织细胞和胚胎发育特异性的 *Acat2* 表达, 既对外源饮食型胆固醇的吸收、转运等具有重要的生理功能作用, 也对需要限制吸收外源饮食型胆固醇的 AS、AD、HC 等病理变化产生影响, 所以深入探索人 *Acat2* 沉默或低表达的特殊分子机制, 可为胆固醇代谢平衡的生理功能和病理变化研究提供重要基础和相关线索, 也为上述重要疾病的临床与药物研究提供理论依据和新的靶点。

可变性剪接成熟的人 ACAT2 mRNAs 及其编码的异构体

姚晓敏^{1,2}, 王灿华^{1,2}, 宋保亮¹, 杨新颖¹, Catherine CY Chang³, TY Chang³, 李伯良¹

1. 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031; 2. 上海交通大学生命科学与技术学院, 上海, 200032; 3. Department of Biochemistry, Dartmouth Medical School, Hanover, NH 03755, USA

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 催化游离胆固醇和脂肪酸合成胆固醇酯, 其在动脉粥样硬化和 Alzheimer 病变过程中都起着十分重要的作用。已发现哺乳动物中存在两种形式的 ACAT, 其中广泛分布于各种组织细胞的 ACAT1 主要参与胆固醇代谢平衡, 而在肝肠细胞中特异表达的 ACAT2 则与外源胆固醇的吸收和脂蛋白装配密切相关。本工作在揭示人 ACAT2 基因组织结构、其启动子活性具有细胞特异性和肠细胞分化依赖性基础上, 深入研究 ACAT2 基因表达的可变性剪接。

人 ACAT2 基因长约 18 kb, 包含 15 个外显子, 所有的外显子/内含子连接区序列均为经典的 GT/AG 序列。本研究工作中, 首先通过 RT-PCR 实验结果显示, 从各种人细胞株和组织来源的 mRNAs, 用不同引物扩增人 ACAT2 cDNA 片段, 均存在多种大小不同的产物, 也同样具有肝肠细胞和组织特异性。进一步用 RT-PCR 扩增编码全长人 ACAT2 的 ORF cDNA 并进行克隆和 DNA 序列测定, 结果获得了三种大小不同的人 ACAT2 ORF cDNA 产物, 分别命名它们对应的 mRNA 为 ACAT2a, ACAT2b 和 ACAT2c mRNAs, 其中 ACAT2b 与 ACAT2c mRNAs 为缺失不同外显子的产物, 且均未导致 ORF 的改变。ACAT2a mRNA 序列与已报道的完全一致, 所有 15 个外显子组成的 ORF 编码 522 个氨基酸; ACAT2b mRNA 缺失外显子 4, 由相应的 14 个外显子组成的 in-frame ORF 编码 502 个氨基酸; ACAT2c mRNA 缺失外显子 4-5 和 8-9-10, 由相应的 10 个外显子组成的 in-frame ORF 编码 379 个氨基酸。显然, 这三种成熟的人 ACAT2 mRNAs 是从同一 pre-mRNA 通过可变性剪接产生。进而, 利用上述克隆鉴定的三种大小不同的人 ACAT2 ORF cDNAs 构建相应的表达质粒, 并分别转染 ACAT 缺陷的 CHO 细胞株 AC29 进行表达研究, Western-blot 分析结果显示表达出不同大小的人 ACAT2 产物; 同时在人肝肠细胞株中也检测到了同样不同大小的内源表达 ACAT2 产物。这些提示可表达的内源性 ACAT2b 和 ACAT2c 蛋白可能是两种 ACAT2 异构体 (isoforms), 而且它们的氨基酸序列特征性变化还包括缺失一个潜在的 CK2 (casein kinase II) 磷酸化位点 SLLD, 其位于外显子 4 编码的 20 个氨基酸区域内。深入进行体外磷酸化和酶活性测定结果表明, ACAT2a 可被磷酸化, 其异构体不被磷酸化; 而且异构体的酶活性为 ACAT2a 的 25%~35%。这表明异构体 ACAT2b 和 ACAT2c 在细胞内可通过非磷酸化形式调节这一多聚变构酶的活性。

综上所述, 我们发现人 ACAT2 基因表达存在可变性剪接, 其中两种大小不同的成熟 ACAT2 mRNAs 可产生异构体 ACAT2b 和 ACAT2c, 深入探索它们的细胞水平功能作用, 可为 ACAT 精细调节人细胞胆固醇代谢平衡研究提供重要的分子基础。

人 ACAT1 4.3-knt mRNA 的核糖体内部进入起始翻译

陈佳, 赵晓楠, 鲁明, 杨力, 李伯良

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶 (ACAT) 是生命体内胆固醇代谢平衡的关键酶之一。我们实验室与美国 Chang TY 教授实验室合作, 在国际上报道了人 ACAT1 的基因组织结构及其启动子序列; 同时深入研究发现, 人 ACAT1 cDNA K1 对应的 4.3-knt mRNA 序列分别来源于 7 号、1 号两条染色体, 可通过上游 GGC₁₂₇₄₋₁₂₇₆ 和下游 AUG₁₃₉₇₋₁₃₉₉ 翻译产生 56 和 50 kDa 的 ACAT1 异构体。

本工作在前期研究进展基础上, 深入探索人 ACAT1 cDNA K1 对应的 4.3-knt mRNA 的核糖体内部进入起始翻译。人 ACAT1 4.3-knt mRNA 含有很长的 5'-与 3'-UTR, 对 56 kDa 蛋白翻译的非 AUG 起始密码子 GGC₁₂₇₄₋₁₂₇₆ 上游 mRNA 序列分析表明, 紧邻 GGC 上游存在三个连续的、不同阅读框的终止密码子序列, 再上游则含有 30 个 AUG 起始密码子, 5'-端为 Cap 结构。由于这 30 个 AUG 起始密码子有的还与其下游 In-frame 终止密码子形成很短的 ORF, 显然核糖体通过 Cap 依赖型的 5'-端进入 mRNA、按照核糖体滑动学说对下游远端的 ACAT1 ORF 起始翻译较弱, 而且由于其上游翻译起始密码子 GGC₁₂₇₄₋₁₂₇₆ 并非利用 Met-tRNA^{Met} 起始翻译, 因而推测人 ACAT1 4.3-knt mRNA 可能存在核糖体内部进入位点 (IRES), 以确保核糖体内部进入 mRNA 起始翻译具有重要功能的 ACAT1 异构体。为了验证这一假设, 我们设计构建了能够鉴定 IRES 存在的 ACAT1 cDNA 基因单顺反子和 F-luc 报告基因-ACAT1 cDNA 基因双顺反子表达质粒, 主要是利用文献报道具有完全阻断核糖体滑动的高稳定性茎环结构, 通过人工合成、插入在单顺反子或双顺反子基因的 5'-端。这些构建的真核表达质粒转染 AC29 (Acat 缺失型 CHO 细胞株), 通过 Western blot 分析结果显示, ACAT1 cDNA 基因在单顺反子与双顺反子质粒中的表达均不受插入的高稳定性茎环结构的影响, 可表达出 ACAT1 蛋白; 并且 Luc 活性测定结果显示, 双顺反子质粒的第一顺反子 F-luc 报告基因表达完全受插入的高稳定茎环结构的影响, Luc 活性仅为未插入茎环结构对照的 1%, 这表明第二顺反子人 ACAT1 mRNA 是通过 IRES 引入核糖体起始翻译蛋白产物。有关人 ACAT1 mRNA IRES 的结构、功能与作用的分子机制等正在研究中。

核糖体通过 IRES 介导的起始翻译首先在病毒 RNA 中发现, 而有关人细胞基因 mRNA IRES 也有不少报道。已有的研究表明, 大部分 IRES 介导起始翻译表达的基因是保证病毒或细胞生命活动的关键基因, 其显著特点是在 Stress 条件下通过核糖体直接进入关键基因 mRNA 的 IRES 而起始翻译, 以确保最基础的生命活动。胆固醇是真核细胞生命活动的最基础要素之一, 人 ACAT1 mRNA IRES 及其结构功能研究, 可为 ACAT 精细调节人细胞胆固醇代谢平衡研究提供重要的分子基础。

神经系统特异表达的黏附分子-NECL1 的研究进展

阴彬, 彭小忠, 强伯勤

中国医学科学院, 中国协和医科大学基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室
北京, 100005

Nectin 家族是参与上皮及内皮细胞间连接的黏附分子, 属于免疫球蛋白超家族成员, 与脊髓灰质炎病毒受体 (PVR/CD155) 具有很高的同源性, 因此又称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白。本实验室从人胎脑文库中分离克隆了一个新基因, 由于该基因与 Nectin 家族成员具有较高的同源性, 因此将其命名为 NECL1 (Nectin-like 1)。到目前为止, 已经明确了四种 Nectin 分子和五种 Nectin-like 分子。NECL1 的 cDNA 长为 2540bp, 含一个 1197bp 的完整开放阅读框, 编码一个具有 398 个氨基酸的蛋白。人的 NECL1 与鼠的 *necl1* 在核苷酸水平与氨基酸水平都有很高的同源性, 核苷酸水平一致性为 89%, 氨基酸水平一致性为 87.3%。生物信息学分析表明, NECL1 的胞外区有三个免疫球蛋白样结构域, 一个单次跨膜区和一个短的胞内区, 因此也属于免疫球蛋白家族成员。多组织 RNA 斑点杂交和原位杂交分析表明, NECL1 在中枢神经系统中特异表达, 主要在小脑、大脑皮层和海马的神经元中表达。体外结合实验证明 NECL1 与 4.1N 蛋白有相互作用。亚细胞定位显示, NECL1 定位在细胞膜上, 在细胞-细胞间的连接处尤为明显。NECL1 可以通过其 C 末端将 4.1N 蛋白由胞浆中募集到细胞膜上, NECL1 与 4.1N 蛋白的这种相互作用可能与调节细胞间黏附作用相关。NECL1 与 4.1N 所形成的复合体在神经系统形态的维持及其动态变化中的作用还需进一步的研究。

白念珠菌 CaCdc37 的表达及其功能研究

刘晓艳, 宋文纪, 倪坚, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

CDC37 was initially identified from *Saccharomyces cerevisiae* as an essential gene involved in cell cycle progression through G1. Later, the Cdc37 was indicated to work as a molecular chaperone required for stability and activity of protein kinases in *S. cerevisiae*. We identified a Cdc37 orthologue in *Candida albicans*, CaCdc37, from a two-hybrid screening to identify Crk1-interacting proteins. The Crk1 plays an important role in hyphal development and virulence. Although genetic evidences suggested that Crk1 may act downstream of Ras1 in a pathway independent of Efg1 and the Cph1-mediated MAP Kinase pathway, the endogenous regulatory substrates of the Crk1 are not known yet. The CaCdc37 interacts preferentially with kinase domain of Crk1 (Crk1N) as shown in two hybrid and immunoprecipitation experiments. The *CaCDC37* can complement a *cdc37* thermosensitive mutant (*cdc37-34*) of *S. cerevisiae*. Crk1 protein is hardly detectable in the *cdc37-34* mutant at restrictive temperature. However upon expression of CaCdc37 in the *cdc37* mutant, Crk1 protein is detected even at restrictive temperature. Our data suggested that the CaCdc37 was required for translation or stability of the Crk1, like its *S. cerevisiae* and higher eukaryotic homologs, the CaCdc37, may functions as a molecular chaperon that stabilizes protein kinases in *C. albicans*. To further investigate the function of the CaCdc37 and subsequently identify antifungals that target kinase maturation, we intend to analyse the CaCdc37 structure. We constructed an inducible expression plasmid carrying the CaCdc37 in *E.coli*. The expressed protein was purified by metal affinity chromatography, ion-exchange chromatography and size-exclusion chromatography. The purity is higher than 95%. After getting the crystalized CaCdc37 protein we can study it's structure with X-ray technology.

CTD 蛋白激酶 CaSrb10 对白念珠菌形态发生和毒力的影响

逯杨, 李砚东, 苏畅, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所
分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

Candida albicans, the major fungal pathogen in humans, undergoes morphological conversion from yeast to filamentous growth depending upon various environmental conditions. Cdc2-related protein kinases, cyclin-dependent kinases and G1 cyclins have been shown to play an important role in hyphal development and virulence of *C. albicans*. We have identified a gene from *C. albicans*, designated *CaSRB10*, encoding a putative cyclin-dependent kinase that is highly homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Srb10 which is involved in phosphorylation of RNA polymerase II 's C terminal domain (CTD) and mediated the degradation of transcription factors. The mutant strain lacking CaSrb10 displayed a elongated pseudohyphal growth form and derepressed the expression of hyphae-specific genes in YPD media at 30°C in which condition the wild type strain grows in yeast form. The CaSrb10 was observed to interact with Cph1 in yeast two-hybrid system. The Cph1 is a transcription factor regulating filamentous growth of *C. albicans*. Overexpression of the Cph1 in *casrb10* mutant developed more elongated filaments even at 22°C. In contrast, the elongated cells were not observed in wild type strain at same growth condition. These results indicated that the CaSrb10 was contributed to control the stability and activity of the transcription factor Cph1 which is required for filamentous growth in *C. albicans*.

利用双向电泳技术鉴定野生型白念珠菌和基因敲除菌株中 差异表达的蛋白

苏畅, 逯杨, 曹芳, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

Candida albicans is responsible for most fungal infections in immunosuppressed patients. One factor required for *C. albicans* pathogenicity is the morphological transition from yeast to hyphae. The transcription factor Efg1 and CaFlo8 are essential for filamentous growth. Deletion of the *CaFLO8* or *EFG1* in *C. albicans* completely block hyphal development and induction of hyphal genes in liquid medium. *Caflo8* and *efg1* deletion mutants are avirulent in systemic infections in mice. The protein profiles of whole extracts from wild type strain SC5314, *efg1* and *Caflo8* mutant strains were examined by using two-dimensional electrophoresis to identify the proteins regulated by the Efg1 and CaFlo8. Over 1000 protein spots were visualized by silver staining. Protein identification was carried out by sequence tagging with a matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) or a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer. Under yeast growth condition, 16 spots were changed dramatically in the *Caflo8* mutant. Eight of them were identified as *FUM12.5F*, *MDH1*, *ACS2*, *ATP7*, *URA3*, *YRB1*, *PST2*, *IPF13552*. Three oxidative enzymes (*FUM12.5F*, *MDH1*, *ACS2*) of the Citric acid cycle were increased more than five-fold in the *Caflo8* mutant strain. 8 spots were changed dramatically in the *efg1* mutant. Five of them were identified as *FBAI*, *FUM12.5F*, *URA3*, *YRB1*, *SSB1*. An enzyme (*FBAI*) involved in glycolysis was decreased and an oxidative enzyme (*FUM12.5F*) of the Citric acid cycle was increased more than five-fold in the *efg1* mutant. Comparative proteome analysis between the wild-type strain (SC5314) and the knock out mutants (*Caflo8* and *efg1* mutant) illuminate the regulatory mechanism of the transcription factor Efg1 and CaFlo8.

CZF2 基因在白念珠菌白灰形态转变中的功能研究

黄广华, 王华峰, 周舟, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

Candida albicans is the most frequently isolated fungal pathogen in human. Its pathogenicity is largely dependent on its ability of morphologic transition from yeast to hyphae or switch between white and opaque phase (W/O switch). Signaling pathways controlling the yeast-hyphae transition have been well studied, while molecular mechanism of the W/O switch is still unclear and only a few factors including Efg1 are proved to be involved in this process. We have cloned a gene from *C. albicans* genomic DNA library, designated *CZF2* which encodes a fungal transcription regulator of GAL4 family containing a characteristic Zn₂Cys₆ zinc finger domain in its N-terminal. To study the function of Czf2, we knocked out *CZF2* gene in *C. albicans* and examined the phenotype of *czf2* mutant cells. We found that deletion of *CZF2* increases the W/O switch efficiency obviously, though not significantly as *EFG1*, and correspondingly, in *czf2* mutant cells, expression of white phase specific genes are up-regulated while expression of opaque phase specific genes are down-regulated. Importantly, expression of *CZF2* can be regulated by Efg1, coinciding with analysis of *CZF2* promoter which revealed three consensus Efg1 binding sites in 1kb region upstream of translation start site. Furthermore, *EFG1* transcription level is not affected by *CZF2* deletion and yeast two-hybrid assay indicated that there is no interaction between Czf2 and Efg1. Taken together, our results demonstrate that Czf2 is an inhibitor of the W/O switch process and functions as one of the protein factors downstream of Efg1.

CaTOS9 基因在白念珠菌白灰形态转变和交配过程中的功能作用

黄广华, 王华峰, 谢伟军, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

Candida albicans is an opportunistic pathogen, often causing both mucosal and systemic infections in immunocompromised people. A frequent switching in *C. albicans* is white-opaque transition. White cells are more virulent than opaque cells in system infection model, while opaque cells are more invasive in a cutaneous model of infection. The sexual cycle is an important part of the life cycle for most eukaryotes. Sexual development is often linked with pathogenetic ability for many fungi, such as *Cryptococcus neoformans* and the plant pathogen *Ustilago maydis*. *C. albicans* was thought to be asexual and lack a mating process until the recent discoveries of a mating type-like locus (*MTL*) and mating between strains carrying different types of the *MTL*. To elucidate the molecular mechanisms that regulate mating in *C. albicans*, we examined the function of Cph1 and its upstream Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathway in mating, our result showed that Cst20, Hst7, Cek1, Cek2 (a homologue of Fus3) and Cph1 play a role in the mating of *C. albicans* similar to that of their homologues in the pheromone-responsive MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. We also observed that *C. albicans* mating efficiency was greatly affected by medium composition, indicating the potential involvement of nutrient-sensing pathways in mating in addition to the MAP kinase pathway. Opaque cells are thought as mating-competent form of *C. albicans*, which mate approximately 10^6 times more efficiently than do white cells. We isolated a *C. albicans* gene, designated *CaTOS9*, encoding a nuclear protein of about 83 kDa. The *CaTOS9* is exclusively expressed in opaque-phase cells of WO-1 and regulated by a certain of transcription factors, such as Nrg1p and Tup1p. Disruption of *CaTOS9* in homozygous *MTLa* cells blocks white-to-opaque switching and deduced its mating efficiency. Our data showed that the CaTos9 is required for white/opaque switch and mating in *C. albicans*.

脑源 Cdc2 蛋白激酶 PFTK1 与 14-3-3 蛋白的相互作用及其入核机制

高衍昆, 杨弢, 姜梅, 倪坚, 敖世洲, 陈江野

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所

分子生物学国家重点实验室, 上海, 200031

The Cdk2s (Cyclin-dependent kinases) are serine/threonine kinases that had been shown to be key players in the control of cell cycle progression. hPFTAIRE1 (PFTK1), a member of Cdc2-related protein kinase, is highly expressed in human brain and exhibits cytoplasmic distribution in HeLa cells, although contains two nuclear localization signals (NLSs) in its N-terminus. To search for its substrates and regulatory components, we screened an adult human brain LexA two-hybrid library by using the full-length hPFTAIRE1 as a bait. Four 14-3-3 isoforms (β , ϵ , η , τ) were identified interacting with the hPFTAIRE1 in yeast two hybrid system. The interactions were confirmed by co-immunoprecipitation and Western blot analysis in HeLa cells. 14-3-3 proteins are adaptors implicated in binding and regulating the function and subcellular location of numerous signaling molecules. It is known that there are mainly two 14-3-3 binding consensus motifs: RSxpSxP and Rx1-2Sx2-3S. Based on this clue, we found a putative 14-3-3 binding consensus motif (RHSSPSS) in the hPFTAIRE1, which overlapped with its second NLS. Deletion of the binding motif abolished the interaction between the hPFTAIRE1 and the 14-3-3 proteins. A hPFTAIRE1 mutant (hPFTAIRE1 Δ) lacking 14-3-3 binding consensus motif still distributed in cytoplasm when fused to the C-terminus of a green fluorescent protein (GFP) and ectopically expressed in HeLa cells. These results suggested that binding with the 14-3-3 proteins is not contributed to regulate subcellular localization of the hPFTAIRE1. The interaction with four 14-3-3 proteins may be involved in its signaling regulation.

EB1 影响细胞增殖及转化机制的初步探讨

刘梅, 王益华, 周晓波, 张果, 杨尚斌, 闫霜, 白瑾峰, 徐宁志
中国医学科学院肿瘤研究所, 细胞生物与分子生物学实验室, 北京, 100021

背景与目的: 食管癌的病因涉及到环境和遗传等多个因素.有研究表明,影响细胞有丝分裂的 EB1 蛋白在食管癌中有异常高表达,但 EB1 影响细胞生长的机制尚未阐明。另外,抑癌蛋白 APC 的羧基端有 EB1 的结合位点,所以,EB1 还是一个和 APC 相互作用的分子。该项目旨在研究 EB1 和 APC 羧基端 170 个氨基酸间的相互作用,以进一步探讨 EB1 蛋白在细胞生长增殖以及细胞转化中的作用机制。

方法: 通过分子克隆,构建 EB1 和 APC 羧基端 170 个氨基酸(APC-C170, 包含 EB1 结合位点)真核表达载体; 转染细胞并筛选获得稳定表达 EB1、稳定表达 APC-C170 的 HEK293 细胞; 生长曲线观察对细胞增殖的影响, 利用流式细胞仪分析其对细胞周期的影响; Western Blot 检测相关蛋白分子的变化。

结果: 转染后筛选得到稳定表达 EB1 的 HEK293 细胞;细胞流式分析显示, 293-EB1 细胞中有更多比例的 G2/M 期细胞; 生长曲线表明, 转染 EB1 的 293 细胞的增殖速度略快于对照细胞,尤其在细胞生长至高密度时; EB1 可以激活 beta-catenin/TCF-4 信号传导通路, 进而诱导癌基因 c-myc 和 cyclin D1 的蛋白表达水平增高。APC-C170 转染稳定表达 EB1 的 HEK293 细胞正在筛选中。

结论: 过表达 EB1 可以加速细胞的生长; 激活 beta-catenin/TCF-4 通路, 上调 c-myc 和 cyclin D1 表达与此密切相关。

RNAi 下调 *c-myc* 表达导致人乳腺癌细胞 MCF-7 蛋白表达谱改变的研究

杨尚斌¹, 娄晓敏², 王益华¹, 刘斯奇², 徐宁志^{1,2}

1. 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所, 100021; 2. 中国科学院北京基因组研究所, 101318

c-myc 基因在多种人类肿瘤中高表达, 其中包括人乳腺癌。众所周知, *c-Myc* 蛋白参与多种细胞功能, 包括细胞的复制、细胞生长、细胞的代谢活动、细胞分化以及细胞凋亡。本实验室前期研究结果表明, 利用 RNA 干扰技术特异性的下调人乳腺癌细胞 MCF-7 中 *c-Myc* 蛋白的表达, 可以在体内和体外非常显著的抑制肿瘤细胞的生长。为了进一步筛选和鉴定与 *c-Myc* 蛋白相互作用, 并参与调节细胞生长和凋亡的相关蛋白质, 在本研究中, 选用分别转染 *c-myc* 基因 RNAi 72 h 和转染空载体 72 h 的 MCF-7 细胞作为研究材料。采用双相凝胶电泳 (18 cm pH 3-10 NL 的 IPG 胶条和 13% 聚丙烯酰胺凝胶) 分离两种细胞表达的蛋白质, 辅以银染法显色。通过对两种细胞表达蛋白质的双向凝胶电泳图谱的细致分析, 得到如下结果: 1) 从这两种细胞中均可分离得到约 1600 个蛋白质斑点; 2) 两种细胞的蛋白质斑点分布相似, 在较宽的 pH 范围 (3-10) 和分子量范围 (100kDa-10kDa) 均匀分布; 3) 有 60 个蛋白质斑点在 *c-myc* 基因 RNAi 的 MCF-7 细胞中表达量升高 (大于 3 倍), 并均由 LC-MS/MS 质谱鉴定为蛋白质。通过文献检索, 我们发现, 其中 5 种蛋白质与细胞凋亡相关: BAG2、CSNK2A1、DIABLO、M6PRBP1 和 STAT3。随后, 应用 RT-PCR 方法, 分别检测这 5 种蛋白分子在两种转染细胞中 mRNA 的表达水平, 其结果与蛋白质组学的结果基本一致。该 5 种蛋白质经 RNAi 下调 *c-myc* 基因后表达上升的机制, 以及与细胞凋亡的关系正在进一步的研究中。

人垂体瘤转化基因(hPTTG-1)与食管癌侵袭转移的相关性研究

闫霜, 周翠琦, 王益华, 全兰平, 白瑾峰, 朱红霞, 徐宁志

中国医学科学院中国协和医科大学, 肿瘤医院肿瘤研究所, 细胞生物及分子生物学实验室
北京, 100021

目的: 观察并比较人垂体瘤转化基因 (hPTTG-1) 在食管鳞癌组织、癌旁组织以及多种食管鳞癌细胞系的表达状况, 分析其与食管鳞癌侵袭转移的相关性和探讨可能机制。

方法: (1)用 RT-PCR 方法检测 hPTTG-1 在多种食管鳞癌细胞系及 27 例新鲜食管癌组织中 mRNA 水平的表达情况。(2)用原位杂交法检测不同 pTNM 分期的 71 例食管鳞癌组织及配对癌旁组织石蜡切片中 hPTTG-1 的 mRNA 水平的表达差异, 统计学分析该基因的表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移及组织分化程度的关系。(3)用划痕实验和细胞侵袭小室实验检测 hPTTG-1 在促进食管鳞癌细胞侵袭和转移中的作用。

结果: (1) 在 ESCC109、KYSE180、KYSE410 和 KYSE510 食管癌细胞系中, hPTTG-1mRNA 高水平表达; 而在食管癌细胞系 ESCC9706 和 KYSE150 中, hPTTG-1 的表达相对较弱。在 27 例新鲜食管癌组织中, 67%病例 hPTTG-1 呈现高表达。(2) 在 71 例配对石蜡切片中, hPTTG-1 高表达近 60%, 统计学分析显示, hPTTG-1 高表达不仅和肿瘤分化程度, 同时也和淋巴结转移正相关。(3) 划痕实验和细胞侵袭小室实验表明, hPTTG-1 蛋白的高表达可以同时提高食管癌细胞 ESCC9706 的迁徙和侵袭能力。

结论: (1) 人垂体瘤转化基因 (hPTTG-1) 在大多食管鳞癌细胞系以及食管癌组织中高表达。(2) hPTTG-1 的高表达可以促进肿瘤的侵袭转移能力。从而为食管癌转移瘤的基因治疗提供了潜在的新靶点, 对于食管癌预后判断的临床应用值得进一步研究和验证。

ICF 综合症中 DNMT3L 对 DNMT3B 突变蛋白活性调控作用的研究

谢正华, 黄燕女, 徐国良

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所分子生物学国家重点实验室
上海, 200031

ICF (Immunodeficiency, Centromeric instability, and Facial anomalies) 综合症是一种罕见的常染色体隐性遗传病, 病人细胞中的基因组 DNA 中某些序列的甲基化水平发生了缺失。大部分 ICF 病人在 DNMT3B 的酶催化结构域发生了错义突变, 因此这些突变的发生将直接削弱 DNMT3B 的甲基化酶活性。在发育过程中基因组甲基化模式的建立是受到精细的调控的, 在这一过程中两个相关的起始性甲基化酶 DNMT3A 和 DNMT3B 的甲基化酶活性被一系列的调控因子调控, 其中 DNMT3L 就是具有刺激作用的正调控因子。我们的研究发现 ICF 病人中 DNMT3B 的突变影响了其与 DNMT3L 的相互作用, 并因此使基因组甲基化模式的正确建立发生了故障。令人感兴趣的是我们还进一步发现有两个错义突变并没有使突变蛋白丧失酶活性, 而仅仅影响了突变蛋白甲基化酶活性被 Dnmt3L 刺激的能力。我们的研究结果表明 ICF 病人基因组的甲基化缺陷很可能是由于 DNMT3B 突变使其酶活性丧失了被 DNMT3L 刺激的能力而引起的, 而不仅仅是因为 DNMT3B 突变使得其本身酶活性的丧失。

肠细胞 Caco-2 和肝癌组织中人 ACAT2 基因的表达及其分子机制

宋保亮^{1#}, 王灿华^{1,3#}, 姚晓敏^{1,3#}, 杨力¹, 张文静^{1,4}, 王甄真¹, 杨金波¹, 戚炜^{1,2},
杨新颖¹, Kenji Inoue⁵, 林志新³, 张惠展⁴, Tatsuhiko Kodama⁵, Catherine C.Y. Chang²,
刘银坤⁶, Ta-Yuan Chang^{2*}, 李伯良^{1*}

1. State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; 2. Department of Biochemistry, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire 03755, USA; 3. Department of Biochemistry and Technology, Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; 4. Department of Biochemistry and Technology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 5. Laboratory for Systems Biology and Medicine, Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; 6. Liver Cancer Institute of Zhong San Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China; #: These people made equal contributions to this manuscript

*Corresponding authors

Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase (ACAT) is a membrane bound enzyme that catalyzes the biosynthesis of cholesteryl esters, using long-chain fatty acyl-coenzyme A and cholesterol as its substrates. ACAT plays important roles in cellular cholesterol homeostasis, and also is involved in the pathophysiological processes that lead to various diseases, such as atherosclerosis, and Alzheimer's disease. For these reasons, ACAT has been a pharmaceutical target for developing drugs to treat major diseases.

Human tissue cells express two ACAT genes, *Acat1* and *Acat2*. *Acat1* is ubiquitously expressed, while *Acat2* is primarily expressed in intestinal mucosa, and plays important role in intestinal cholesterol absorption. To investigate the molecular mechanism(s) responsible for the tissue-specific expression of *Acat2*, we identified five *cis*-elements within the human *Acat2* (*hAcat2*) promoter, four for the intestinal-specific transcription factor Cdx2 and one for the transcription factor HNF1 α . Results of luciferase reporter and electrophoretic mobility shift assays show that Cdx2 and HNF1 α exert a synergistic effect on enhancing the *hAcat2* promoter activity through binding to these *cis*-elements. In the undifferentiated Caco-2 cells, the *hAcat2* expression is increased when the exogenous Cdx2 and/or HNF1 α are expressed by co-transfection. In the differentiated Caco-2 cells, the *hAcat2* expression significantly decreases when the endogenous Cdx2 or HNF1 α expression is suppressed by using RNAi technology. The expression levels of Cdx2, HNF1 α , and ACAT2 are all dramatically increased when the Caco-2 cells differentiate to become intestinal-like cells. These data provide a molecular mechanism for the tissue-specific expression of *hAcat2* in intestines. In normal adult human liver, the *Cdx2* expression is not detectable, and the *Acat2* expression is very low. In the hepatoma cell line HepG2, the *Cdx2* expression is elevated, accounting for its elevated *Acat2* expression. A high percentage (seven of fourteen) of liver samples from patients affected with hepatocellular carcinoma (HCC) exhibit the elevated *Acat2* expression. Thus, the elevated *Acat2* expression may serve as a new biomarker for certain form(s) of HCC.

In the current work, we first identify five functional *cis*-acting elements within the *hAcat2* promoter including four binding sites for Cdx2, an intestine-specific transcription factor, and one binding site for HNF1 α , a transcription factor expressed in multiple tissues. Using Caco-2 cells, several other cell lines, normal adult human liver and HCC tissues, we are able to demonstrate that Cdx-2 and HNF1 α synergistically govern the *hAcat2* expression in a tissue-specific manner.

坛紫菜 (*Porphyra hatainensis*) 丝状孢子体阶段表达序列标签 (Expressed Sequence Tag, EST) 大规模分析

王广策, 范晓蕾, 方永军, 胡松年

中国科学院海洋研究所, 青岛, 266071; 中国科学院研究生院, 北京, 100039; 浙江大学沃森研究院, 杭州, 310027; 中国科学院北京基因组研究所, 北京, 101300

坛紫菜属红藻门红毛菜科紫菜属, 是我国南方特有的品种。尽管其种植面积和产量均高于条斑紫菜, 但从分子水平对坛紫菜的研究却很少。本研究以坛紫菜丝状孢子体为研究对象, 从构建的 cDNA 文库中随机挑选了 11000 个克隆进行了测序, 得到了 5318 条高质量的 EST 序列; 其中, 1590 条为单拷贝序列, 其余 3728 条聚类拼接得到 945 个叠连群; 985 条 (38.9%) 与 NCBI 数据库中注册的序列具有明显同源性, 而其余 1550 条 (61.1%) 则为坛紫菜种所特有。利用 KEGG 的数据资源进行代谢途径分析, 结果表明最丰富的 EST 序列集中在蛋白的合成加工及降解 (108 种)、碳代谢 (30 种)、能量代谢 (44 种) 以及氨基酸合成分解代谢 (32 种) 等生理过程中, 并且首次揭示了坛紫菜中极有可能存在抗氰呼吸与 C4 固碳途径。与条斑紫菜孢子体 cDNA 文库 EST 数据进行比较, 结果表明二者只有 707 种基因具有明显同源性, 其余基因 (坛紫菜孢子体 1828, 条斑紫菜孢子体 2049) 则相似性很低, 结果表明二者虽然形态极为相似, 但是在分子水平上的种间差异仍然比较大; 同时发现了 4 种坛紫菜特有的热激蛋白基因, 并且坛紫菜中总热激蛋白基因表达丰度 (7.5%) 明显高于条斑紫菜 (5.6%), 这极有可能与坛紫菜生长发育必须较高的温度有关。目前我们已经向 Genbank 递交了 3680 条 EST 序列 (AC 号从 DN604790 到 DN608469)。

多管藻藻红蛋白的规模分离纯化

王广策, 牛建峰

中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室, 青岛, 266071

藻红蛋白是一种主要存在于红藻中用作捕光天线色素的荧光蛋白, 被广泛应用于医药, 食品工业和基础研究领域。通过膨化柱和离子交换柱或羟基磷灰石吸附层析结合的方法, 从多管藻中大规模分离纯化了 R-藻红蛋白。用 0.2mol/L, 0.1mol/L 和 0.05mol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液以及蒸馏水洗脱 Streamline 柱子得到的藻红蛋白纯度 ($\text{OD}_{565}/\text{OD}_{280}$) 已经达到了 2。上述各洗脱部分透析除盐, 然后平均分成两份。一份用羟基磷灰石吸附层析纯化, 另一份用 Q-sepharose 阴离子交换柱层析纯化。经过羟基磷灰石纯化, R-藻红蛋白的纯度均达到了 3.5。而经过 Q-sepharose 离子交换柱后, 0.2mol/L, 0.1mol/L 和 0.05mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 洗脱的部分, 藻红蛋白洗脱液的纯度超过了 3.8。纯化得到的藻红蛋白吸收光谱在 498, 535 和 565nm 处有吸收峰, 荧光发射峰位于 580nm 处。

Q-sepharose 具有很大的吸附容量, 因而大大缩短了纯化时间。缺点是价格昂贵, 再生困难。羟基磷灰石可以自制, 但其分离效果和其粒径有关, 纯化时间一般较长。通过以上两种纯化方法得到的藻红蛋白产率相当, 分别为每克冷冻多管藻可得到高纯度藻红蛋白 0.3501mg 和 0.33912mg。纯化得到的藻红蛋白用非变性凝胶电泳只能观察到一条粉红色略带荧光的条带。银染呈现一条蛋白条带。SDS-PAGE 呈现两条主要条带, 分子量为 20,000Da 和 30,000Da。

一种新型树脂：琼胶糖-壳聚糖共混交联微球的制备

薛志欣, 王广策

中国科学院海洋研究所

琼胶糖是由海藻中提取的多糖, 是一种重要的生化试剂。由其制备的琼胶糖凝胶微球广泛地应用在生化分离与提纯上, 比较出名的产品有: Sepharose CL-4, Sepharose CL-6 等。但这些产品都需保存在溶液中, 得不到干态微球, 为其储存、运输与应用带来麻烦。

壳聚糖是从海洋甲壳类动物的外壳中提取的一种氨基多糖, 它的年产量仅次于纤维素, 是近年来研究比较多的一种生物多糖。由于其活性氨基的存在, 为壳聚糖的改性带来了很大的方便。

本文采用这两种海洋生物多糖为原料, 经过对壳聚糖活性氨基的交联, 制得一种共混微球。由于二者都是天然大分子多糖, 且都可以降解, 可以预见琼胶糖-壳聚糖共混交联微球在生化分离、吸附与药物缓释等领域都将有很好的性能。

藻红蛋白是一类从海洋红藻提取的寡聚蛋白。它对癌细胞有光动力杀伤作用, 可检测病理抗原, 并具类胰岛素活性。对 S₁₈₀ 小鼠腹水瘤细胞的实验结果表明: 藻红蛋白的激光光敏反应对 S₁₈₀ 瘤细胞有很强的杀伤、破坏作用, 这种效应在一定的激光能量范围内, 与藻红蛋白本身的浓度相关。

初步实验表明, 随琼胶糖用量的增加, 壳聚糖-琼胶糖微球对藻胆蛋白的吸附率增大。

表 1 微球对藻红蛋白的吸附

微球种类	1	2	3	4
吸附量 (mg/g)	0.28	0.85	1.27	1.35

注: 1-壳聚糖微球 2-壳聚糖:琼胶糖=2:1 3-壳聚糖:琼胶糖=1:1 4-壳聚糖:琼胶糖=1:2

CPT₂ 基因与种子特异性启动子植物表达的构建及转化大豆的研究

黄永芬, 付畅, 王豫颖, 孙丹丹, 徐庆华, 刘玉芬, 汪清胤, 齐群刚
哈尔滨师范大学, 生命与环境科学学院, 生化与分子生物学实验室, 哈尔滨, 150080

胆碱磷酸转移酶基因 (*CPT*) 和乙醇胺磷酸转移酶基因 (*EPT*) 编码的酶类在生物体中对合成卵磷脂 (PC) 和脑磷脂 (PE) 具有重要作用。在动物、酵母、人等生物中, *CPT*、*EPT* 分别行使各自功能, 已有一些基因被分离和克隆; 而在植物体中, *CPT*、*EPT* 是同一种酶的两个功能, 又称为氨基乙醇磷酸转移酶 (Aminoalcoholphosphotransferase, *AAPT*)。1990 年至今, 该基因已陆续从酵母、拟南芥、大豆、白菜等植物中分离与克隆。1998 年 Q.Qi 和黄永芬教授从欧洲油菜 cDNA 文库克隆得到的 *CPT₂* 基因 (GeneBank—BnAAPT₁, E.C.4.7.8.1, EC 4.7.8.2)。并将 *CPT₂* 基因克隆到 Ti 质粒 pRD400 上, 获得了含 p35S-AMP-35S::*CPT₂* 融合基因的植物表达载体 pRDH401。用真空透析法转化拟南芥, 转基因植株后代显示: *CPT₂* 基因的超量表达使拟南芥获得抗寒性; 叶片脂膜和叶绿体总脂、总磷脂增加显著; 脂膜和叶绿体膜的 PL 中明显地增加了不饱和脂肪酸 (18:2、18:3) 的比率; 种子含油量增加。*CPT₂* 基因大小 1100bp; 不含内含子; 编码 387 个氨基酸; 含有多个疏水结构域的跨膜结合蛋白。定位于内质网及线粒体内、外膜。在植物体, 受低温及脱落酸 (ABA) 诱导, 该酶的产品 PC、PE 是主要的膜脂与膜的流动性及植物的抗寒性密切相关, 同时对机体代谢有重要调节作用, 对人体可延缓衰老, 降低血清胆固醇, 预防心血管疾病, 促进脂代谢, 治疗脂肪肝, 促进神经传导, 治疗癫痫和痴呆症。最近研究还证明 *CPT* 基因在人体的超量表达可以治疗癌症。如果能通过植物转 *CPT₂* 基因操作, 使植物获得抗寒性, 转化油料作物有可能大幅度增加磷脂的含量生产药用磷脂, 不仅给农业种植业也将给药用磷脂的生产带来革命性进步。为此我们又分别构建了两个种子特异性启动子与 *CPT₂* 融合基因的植物表达载体和并进行了转化大豆的研究。结果如下:

1. *CPT₂* 与种子特异性植物表达载体的构建

选用的两个种子特异性启动子是 pNapin 和 pKti3。pNapin 是甘蓝型油菜 1.7S 种子贮藏蛋白基因的启动子, 为萌发及幼苗的生长提供营养来源, 它的表达是种子特异性的, 并且受 ABA 的影响; pKti3 是从大豆胰蛋白酶抑制剂 KTi3 (Kunitz trypsin inhibitor) 基因中分离出来的, 在胚胎发生过程有较高的表达水平, 其 mRNA 在叶片中也存在。

1.1 pNapin::*CPT₂* 融合基因表达载体的构建

Napin 启动子存在于 pDH 质粒中, *CPT₂* 基因存在于 p525 质粒上。BamHI 和 XbaI 双酶切 p525 质粒回收 1.1Kb *CPT₂* 基因片段插入经同样双酶切回收的 pDH 中。然后对重组的 pDH 双酶切再插入到表达载体 pRDH400 上。经 PCR、凝胶电泳检测及测序均证实得到阳性重组子。

1.2 pKti3::*CPT₂* 融合基因表达载体的构建

CPT₂ 基因存在于 pRDH401 质粒中, 用含有酶切位点 (XbaI, XbaI) 的特异性引物进行 PCR 反应, 扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳得到 1.1Kb 大小的特异性片段, 与 pGEM-T 载体连接, Kti3 启动子存在于 pML70 质粒中, 然后将回收后的条带插入 pML70 质粒的 XbaI 位点, 经 PCR、酶切筛选出含正向克隆的 pKti3-*CPT₂* 重组载体, 并经酶切、连接插入植物表达载体 pRD400 获得植物表达载体 pRDHpKti3-*CPT₂*。经 PCR、凝胶电泳检测及测序均证实得到阳性重组子。

2. pNapim-*CPT₂* 融合基因的植物表达载体转化大豆的研究

用花粉管通道法转化四个大豆品种, 结实率平均为 47%, 不同品种略有差异, 对 D2、D3 植物经两次 Kan^r、PCR、Southern、杂交检测, 获得三个转化株系总计 40 棵幼苗, 阳性率为 14.4%。用 RT-PCR 检测三个株系 40 株幼苗、幼胚 RNA 获得三个株系 4 棵阳性植株, 随后又对这四个植株的根、茎、叶等组织做 RT-PCR 检测, 没有得到条带, 说明 Napin 启动子的驱动下外源基因仅在胚组织中表达。

对 D2、D3 代植株进行抗寒性实验说明转化株能耐 -2-6℃ 低温 4-8 小时。经国家授权单位黑龙江省谷物分析中心对 D3 代进行脂类水平检测, 转化大豆比对照总脂增加 2.8%, PE、PC 含量均增加, 不饱和脂肪酸中亚油酸 (18:2) 和亚麻油酸 (18:3) 比对照增加了 1.6% 和 0.6%。

以上实验说明 pNapin 驱动的 *CPT₂* 在大豆种子中表达获得了抗寒性; 磷脂、不饱和脂肪酸均增加, pKti3-*CPT₂* 融合基因转化大豆的研究正在进行。

Construction and Analysis of Silkworm Pupa (*Bombyx mori*) cDNA Library

Yaozhou Zhang*, Jian Chen, Zhengbing Lv, Zuoming Nie, Caiying Jiang, Lili Liu, Dan Wang,
Yulan Lou, Fukun Zhao, Xiangfu Wu and Genjun Xu

Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

*Corresponding author: Tel: +86-571-86843198, Fax: +86-571-86843198; E-mail:
yaozhou@chinagene.com

A cDNA library was constructed from whole silkworm pupae (*Bombyx mori*) and 1500 clones were randomly selected for sequencing to reveal the gene expression profile of the pupae phase. The general cDNA length is around 100-4000bp, most abundant in 400-1500bp. We have successfully generated high-quality sequence for 1121 clones, which contained 1003 unigenes after being assembled. We compared cDNA sequences to the silkworm (*Bombyx mori*) genome in GenBank database and the silkworm cDNA database including silkbase and KAIKOcDNA database, and found out 352 novel ESTs and 57 unknown ESTs. After being compared with all available ORF-complete mRNA sequences from the same organism (fruitfly or mosquito) in the RefSeq collection, 385 full-length cDNA were identified. In addition, we analyzed the structure of silkworm mRNA and characterized that 86.2% of silkworm mRNA tailed with poly(A) contained the highly conserved AAUAAA signal and the signal located 10-17 nt upstream of the putative poly(A). We deduce that AAUAAA box is not only the signal for polyadenylation, but maybe also for transcription stop of pre-mRNA.

Expression, Purification and Characterization of human GM-CSF in Silkworm Pupae (*Bombyx mori*)

Jian Chen^{a, b}, Yao-Zhou Zhang^b, Cheng-Zhi Xu^b, Xiang-Fu Wu^c

a. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; b. Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; c. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

A recombinant baculovirus containing human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) gene was constructed on the basis of *Bombyx mori* (Silkworm) nucleopolyhedrovirus (BmNPV), which expressed the protein of interest by infecting silkworm pupae. The expressed protein was purified and characterized with respect to its physico-chemical properties. The purification of recombinant protein was performed by a procedure consisting of three chromatographic steps with a recovery of 10.3%. The biological activity of the protein was 1.3×10^5 conoly-formation units ml^{-1} in the crude extract of silkworm pupae. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the protein presented an apparent molecular mass of 29 kDa. In addition, its isoelectric point was 5.1. The biological activity of the purified protein is up to 8.4×10^6 conoly-formation units mg^{-1} . Our results suggest that the silkworm pupae would be a low-cost and convenient bioreactor to express heterologous proteins.

Study on the oral pharmacological action of hGM-CSF expressed in pupae

Yaozhou Zhang¹, Jian Chen¹, Xiangfu Wu² and Genjun Xun²

1. Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-tech University, Hangzhou, China 310018; 2. Shanghai Institute of Biochemistry and Cell, the Chinese Academy of China, Shanghai 200031, China

To evaluate the oral pharmacological action of hGM-CSF expressed in pupae, mice, Sprague-Dawley rats, Beagle dogs and Macaque monkeys were administrated orally. The results showed that BmrhGM-CSF could increase the level of blood leukocytes, stimulate CFU-GM colony formation in human bone marrow cells, the pharmacological action was similar to injection of Leucomax, known leukocytosis-promoting drug. The activity of GM-CSF in blood was measured by ELISA after oral administration. SDS-PAGE autoradiography indicated that a segment of BmrhGM-CSF about 20kD was detected in mice blood in 30 min after oral administration with BmrhGM-CSF labeled with ¹²⁵I. Its bioavailability in the blood was approximately 18%. In-situ hybridization in mice small intestine showed that the BmrhGM-CSF had been absorbed into intestine cell and celom via intestinal micro villus. The same leukocytosis-promoting function of BmrhGM-CSF by oral administration had been observed in Macaque monkey receiving chemotherapy and Beagle dog receiving actinotherapy. These data demonstrated that the BmrhGM-CSF expressed in silkworm system still had biological function by oral administration. It hinted *Bombyx mori* bioreactor might afford a new tool for oral administration of polypeptide or protein drugs

家蚕类蜘蛛毒素基因的研究

王丹, 聂作明, 吕正兵, 蒋彩英, 刘立丽, 陈健, 张耀洲*

浙江理工大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州, 310018

*通讯作者: Tel:+86-571-86843194; Fax: +86-571-86843198; E-mail: yaozhou@chinagene.com

我们从家蚕蛹 cDNA 文库中获得了一长度为 1332bp 的 cDNA, 序列分析发现其中存在一个 324bp 的开放阅读框 (ORF), 其对应的氨基酸序列和蜘蛛毒素蛋白具有较高的同源性, 尤其和蜘蛛毒素蛋白 ω -Aga-IVB 的同源性达到 40%, 利用 rasmol 软件对其高级结构进行了预测, 结果表明: 家蚕类蜘蛛毒素的二级结构以 α -螺旋和无规线团为主, 其三级结构为一个由四个结构域组成的马鞍形结构, 均与蜘蛛毒素蛋白 ω -Aga-IVB 相似, 推测其可能与蛛毒素蛋白 ω -Aga-IVB 具有相似的生物学功能。我国蚕桑资源丰富, 深入研究该基因功能, 对新型心血管物药的开发研究可能具有重要的意义。

死亡素在裂殖酵母中表达及工程菌发酵条件的探索

吕正兵, 蒋彩英, 刘立丽, 张耀洲
浙江理工大学生物化学研究所, 杭州, 310018

钱坤, 吕正兵, 文良柱, 周玉燕, 顾林, 沈子龙
中国药科大学生物技术中心, 南京, 210009

在斑腹刺益蝽 (*Podisus maculiventris*) 中发现的死亡素由 21 个氨基酸残基组成 (thanatin), 根据其一级结构及密码子偏爱性, 通过 PCR 方法人工合成死亡素基因, 将所合成的死亡素基因克隆于 pMD18T simple vector, 筛选重组 T 载体并测序鉴定。将测序正确的重组 T 载体和穿梭质粒 pRHZ-41 分别用 XhoI I 和 BamH I 双酶切后, 回收相应片段, 构建重组表达载体 pRHZ-41-Tha, pRHZ-41-Tha 转化裂殖酵母后, 用 PCR 和测序方法筛选阳性克隆, 共鉴定出 33 个阳性克隆, 并分别在 EMM 培养基中培养至对数中后期, 收集菌体, 蜗牛酶和超声波联合使用破碎细胞, 离心收集上清, 用杯碟法检测重组表达产物的生物活性, 结果表明只筛选到一个正常表达死亡素的克隆, 其表达产物对大肠杆菌具有明显的抑菌活性。

以有表达活性的重组子为研究对象, 选取邻苯二甲酸氢钾, 磷酸氢二钠, 氯化铵, 葡萄糖, 亮氨酸, 尿嘧啶 6 个因素, 每个因素选 3 个水平, 采用 $L_{18}(3^7)$ 正交设计表设计试验, 优化后的培养基, 摇瓶发酵, 目的蛋白产量在 26-51mg/L 之间, 发酵罐的批次发酵产量在 51-102mg/L 之间。本研究为以后继续研究工程菌的连续发酵和高密度发酵提供了理论依据。

小麦小孢子特异性表达 β -expansin 基因的分离和特性研究

金勇丰, 金慧清, 边腾飞

浙江大学华家池校区生物化学研究所, 杭州, 310029

植物花粉发育的研究一直是国际生殖生物学热衷研究的领域, 而花粉发育过程中的小孢子, 具有单细胞和单倍体的独特的优点, 被认为是现代植物科学和育种的一系列题目的研究中心。本文在建立小麦小孢子和花粉离体培养和胚胎发生诱导体系的基础上, 分别提取小麦单核小孢子, 营养胁迫诱导 2-4 天的的小孢子和成熟花粉 mRNA 合成 cDNA 库, 通过抑制差示杂交筛选获得差示 cDNA, 并将其克隆到 T/A 载体中获得 850 个克隆, Reverse Northern Hybridization (RNH) 鉴定获得 7 个克隆, 在小孢子特异表达, 而在成熟花粉, 叶片, 根, 小孢子离体培养获得的胚中不表达。经 BLAST 同源性分析表明, 359 则与玉米的 β -expansin 基因有 72% 的同源性, 应用 5'/3'RACE 技术分离出全长基因, 该基因全长 1118bp, 编码 265 个氨基酸。分别以该基因 5'编码区和 3'非编码区为探针进行 Northern 杂交进一步表明该基因只在小孢子阶段高表达, 而在叶片、幼茎、子房、成熟花粉、根等组织中几乎检测不到。Southern 杂交表明该基因是一个多拷贝基因。基因结构分析表明有 2 或 3 个内含子, 启动子序列分析表明含有其它植物花粉或小孢子特异性表达的共有序列。将 β -expansin 编码区基因克隆到大肠杆菌表达载体 pGEM-4T-1, 经 SDS-PAGE 电泳鉴定获得高效表达, 用 GST 蛋白纯化试剂盒纯化蛋白免疫兔子获得多克隆抗体。通过 RT-PCR 分析也已从拟南芥菜在分离小孢子特异性表达 β -expansin 基因, 在成熟花粉、绿荚、叶片、根等中并不表达。将 β -expansin 基因克隆进入家蚕杆状病毒表达载体系统中进行大量表达, PCR 和杂交鉴定表明 β -expansin 基因已经整合进入载体系统并获得重组病毒 BacPAK-359, 用 6XHis 亲和柱纯化获得 β -expansin 蛋白进一步研究其生物学功能研究。目前正通过转基因技术, 阐明小孢子特异表达的基因在植物小孢子发育和胚胎诱导形成过程中的功能, 为通过小孢子特异表达的基因表达的调控花粉发育 (如雄性不育) 和胚胎发生 (如双单倍体育种) 打下基础。

Oxidative Stress Stimulates the Expression of Thioredoxin Reductase through the Ras/MEK Signaling Pathway

Fu Qiang¹, Kwok-Ming Yao², Kin-Sing Lee², and Nai-Sum Wong²

1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, West China Pre-clinical & Forensic Medicine School, Sichuan University, 610041; 2. Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Hong Kong.
E-mail: fucarl@126.com

The thioredoxin reductase/thioredoxin system plays an important role in the intracellular metabolism of reactive oxygen species (ROS) and protein thiols. Several previous studies suggested that the expression of thioredoxin reductase (TR) could be stimulated by oxidative stress but the underlying signaling mechanism is uncertain. In the present study, we have investigated the effect of changes in intracellular redox potential on the expression of TR in several human cancer cell lines. The treatment of HT-29 cells with N-ethylene maleimide (NEM) resulted in a marked increase in the promoter activity of TR. Progressive 5'-deletion of the TR-promoter produces a minimal promoter fragment that contains only the putative Sp1/Sp3 sites and is responsive to NEM. NEM stimulated a gradual increase in the phosphorylation of ERK1/2 in HT-29 cells, as well as in HeLa and Cos-7 cells. Transfection of HT-29 cells with a constitutively active MEK resulted in a marked increase in the promoter activity of the minimal TR-promoter fragment. Similar stimulation of the TR-promoter activity by the active MEK-mutant was also seen in HeLa and the Cos-7 cells. The transfection of a constitutively active Ras mutant into HT-29 cells resulted in marked stimulation of the activity of the TR-promoter that could be abolished by co-transfection with a dominant negative mutant of MEK. Together the data suggest that a Ras/MEK pathway may operate to regulate the expression of TR in response to oxidative stress.