

Progress in the Study of Analogs of Luteinizing Hormone-releasing Hormone. GAO Xing-Ming, TANG Yan-Chun, YE Yun-Hua (College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China).

Abstract Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) agonists as antitumor agents for hormone-dependent tumor have been on the market for about ten years, while the LHRH antagonists that have been developed furthest are still in clinical trial.

Significant progress has been made in searching for LHRH antagonists with high activity, low histamine releasing, good aqueous solubility. Smaller linear or cyclic peptides and peptidomimetics showed antagonistic activity both *in vitro* and *in vivo*. The β II-turn in the central tetrapeptide and the N-terminal tripeptide segment of decapeptide LHRH antagonists play an important role in receptor binding.

Key words LHRH analogues, agonists, antitumor drugs, antagonists

单胺氧化酶

陈剑峰 王恩多¹⁾

(中国科学院上海生物化学研究所, 分子生物学国家重点实验室, 上海 200031)

摘要 单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 是生物体内一种十分重要的酶, 它在大脑和周围神经组织中催化一些生物体产生的胺, 氧化脱氨产生过氧化氢 (H_2O_2)。单胺氧化酶 A 和 B 基因的克隆清楚地证明了这些酶是由不同的多肽组成的。单胺氧化酶 A 和 B 的基因定位于 X 染色体 (Xp11.23), 都由 15 个外显子组成, 而且它们的内含子-外显子组织是完全一致的。这些事实表明单胺氧化酶 A 和 B 的基因很可能从同一个祖先进化而来。单胺氧化酶 A 和 B 具有不同的底物和抑制剂专一性, 在生物神经递质代谢和行为方面具有不同的作用。

关键词 单胺氧化酶, 神经递质, 行为

学科分类号 Q556

单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO, EC 1.4.3.4), 全名为单胺: O_2 氧化还原酶, 它在大脑和周围神经组织中催化一些生物体产生的胺, 氧化脱氨产生过氧化氢^[1]。根据底物选择性和对抑制剂的灵敏度, 单胺氧化酶被分为 A 和 B 两种^[2]。单胺氧化酶 A 对底物血清素 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和抑制剂 clorgyline 具有高亲和性; 而单胺氧化酶 B 则对苯乙基胺 (PEA)、苯甲胺和抑制剂 deprenyl 具有高亲和性。单胺氧化酶 A 和 B 分别由不同的基因编码^[3]。有文献报道荷兰一个家庭的 8 个男子的行为表现出异常的攻击性, 原因是编码单胺氧化酶 A 基因的一个点突变导致单胺氧化酶 A 的缺陷^[4]; 单胺氧化酶 B 活力的变化则与帕金森氏综合症有关。本文主要综述单胺氧化酶 A 和 B 基因的结构和功能的研究进展, 酶与行为和疾病的关系, 以及利用基因剔除小鼠开展进一步研究的展望。

1 单胺氧化酶 A 和 B 的分类

1968 年, Johnston^[2]根据单胺氧化酶对其不可逆抑制剂 clorgyline 的敏感度将其分成 A 和 B 两个亚类, 单胺氧化酶 A 对 clorgyline 敏感, 而单胺氧化酶 B 不敏感。进一步研究表明单胺氧化酶 B 比单胺氧化酶 A 对 pargyline 和 deprenyl 更敏感。90 年代初, Fowler 等发现单胺氧化酶 A 的偏爱底物是血清素和去甲肾上腺素, 而单胺氧化酶 B 则为苯乙基胺和苯甲胺。多巴胺是单胺氧化酶的一个较特殊的底物: 在人体内被单胺氧化酶 B 催化; 而在啮齿类动物中是由单胺氧化酶 A 氧化^[2, 5]。但是对于大多数物种, 多巴胺既可被单胺氧化酶 A, 也可被单胺氧化酶 B 氧化。以上是单胺氧化酶分类的一般规则。因为单胺氧化酶的底物专一性与底

¹⁾ 通讯联系人。

Tel: (021) 64374430-241, E-mail: wed@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 1999-10-14, 修回日期: 2000-02-24

物的浓度、亲和力、转换率以及酶的浓度有关,所以在一些特殊的情况下会有特例出现.

2 单胺氧化酶在生物体中的分布

用免疫组织化学、酶的放射自显影和原位杂交等技术,已得到单胺氧化酶在啮齿类动物、猫、灵长类动物和人类脑中分布的定位.结果显示单胺氧化酶 A 和 B 在不同动物脑中的分布差异很小.单胺氧化酶 A 主要分布在儿茶酚胺能神经元中;单胺氧化酶 B 主要分布在 5-羟色胺能神经元、组胺能神经元和神经胶质细胞中.在脑组织中,单胺氧化酶 A 和 B 含量最高的部位分别在蓝斑和中缝核.在同一生物体内,单胺氧化酶在外周的分布是不同的.单胺氧化酶 B 主要分布在人血小板、牛肝脏和肾脏中;单胺氧化酶 A 则主要分布在另外一些组织中,如:人胎盘、牛甲状腺.

在大多数组织中,单胺氧化酶的存在都是因为这些组织本身某一功能的需要.然而,在脑部的一些区域,单胺氧化酶与其底物并不分布在同一神经元中.例如:单胺氧化酶 A 催化 5-羟色胺,但是在 5-羟色胺神经元中并没有发现单胺氧化酶 A;单胺氧化酶 B 催化苯乙基胺,但是它却分布在 5-羟色胺能神经元和神经胶质细胞中.单胺氧化酶在这些区域中的作用,可能是防止一些神经元外部的氧化性胺作为假神经递质对神经元产生影响.

3 单胺氧化酶的基因

3.1 人肝单胺氧化酶 A 和 B 基因的克隆

1988 年,人肝单胺氧化酶 A 和 B 的全长 cDNA 被克隆.由 cDNA 推导出的氨基酸序列分析表明单胺氧化酶 A 和 B 的分子质量分别是 59.7 ku 和 58.0 ku,两者间有 70% 的同源性.用单胺氧化酶 A 和 B 的 cDNA 转染哺乳动物细胞,两种酶与内源性的单胺氧化酶 A 和 B 具有相同的底物和抑制剂专一性.这些结果证明单胺氧化酶 A 和 B 是由不同的基因编码的,并不是由同一种蛋白质加工的产物.

3.2 单胺氧化酶 A 和 B 基因的染色体定位

早期利用抗体将一些哺乳动物的单胺氧化酶基因定位于 X 染色体.1989 年,人和小鼠的单胺氧化酶 A 和 B 基因定位于 Xp11.23 上相邻的位点^[6].

3.3 单胺氧化酶 A 和 B 基因组织结构

1991 年,利用单胺氧化酶 A 和 B 的 cDNA 特

异片段,从 X-染色体基因文库中分离出长约 60 kb 的单胺氧化酶 A 和 B 的基因^[3].这两个基因都有 15 个外显子,而且它们的内含子-外显子组织也完全一致(图 1).单胺氧化酶 A 和 B 的第 11 个外显子的产物有高达 93.9% 的同源性.以上结果表明单胺氧化酶 A 和 B 的基因很可能从同一个祖先进化而来^[3].人、牛和大鼠的单胺氧化酶 A 的氨基酸序列同源性大于 87%;人和大鼠的单胺氧化酶 B 也非常保守,同源性约为 88.3%.很可能是生物为了保持单胺氧化酶的生理功能,在一定的进化压力下完成了该酶的进化,从而使得不同种类哺乳动物间的单胺氧化酶 A 和 B 具有高度的保守性.

3.4 单胺氧化酶 A 和 B 催化活力的结构基础

通过同源序列分析,发现哺乳动物与鲑鱼单胺氧化酶之间有四个高度保守的区域^[7].在单胺氧化酶 B 中,这些保守区域包括:a. ADP 结合位点(β - α - β 结构单位);b. 被推测出来的底物结合结构域;c. 黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)共价结合位点;d. C 端区域,它可能形成了一个与跨膜相关的 α 螺旋^[7].

为了阐明单胺氧化酶 A 和 B 的结构与功能,对以上保守区域作了一系列的研究.将单胺氧化酶 A 和 B 的 ADP 结合区域(β - α - β)的 N 端互换后,对酶的底物和抑制剂专一性没有任何影响^[8].人单胺氧化酶 B 第 34 位的谷氨酸残基对于 FAD 与酶最初的非共价结合以及将 FAD 运送到其共价结合位点(³⁹⁷Cys)是至关重要的^[9].FAD 结合区域的 C 端部分虽然对于单胺氧化酶 A 并不重要,但对单胺氧化酶 B 的催化活力是至关重要的.

通过对单胺氧化酶 A 和 B 的一系列杂合酶的研究,Gottowik 等^[8]于 1995 年成功地将单胺氧化酶 B 的底物结合位点定位于两段序列:62~103 和 146~200 位残基.将人单胺氧化酶 A 中 161~375 位残基间的片段替换为单胺氧化酶 B 中相应的片段,可将单胺氧化酶 B 的底物和抑制剂专一性赋予单胺氧化酶 A.相应的平行实验证明大鼠单胺氧化酶 110~220 位残基间的区域与单胺氧化酶 A 和 B 的底物专一性密切相关.进一步的突变研究证明,大鼠 MAO A 的 208 位残基和 MAO B 的相应位点是芳香族还是脂肪族氨基酸将决定单胺氧化酶 A 和 B 的底物专一性^[10].

在人肝单胺氧化酶 A 和 B 中,都含有 9 个半胱氨酸残基.单胺氧化酶 A 中的³⁷⁴Cys 和⁴⁰⁶Cys 以及单胺氧化酶 B 中的¹⁵⁶Cys、³⁶⁵Cys 和³⁹⁷Cys 对于

单胺氧化酶的催化活力至关重要^[9].

借助于亲和标记和定点突变的方法, 人们对人单胺氧化酶 B 活性位点的结构特征有了一定的了解. 被 FAD 修饰的³⁹⁷Cys 位于单胺氧化酶 B 的活性位点; ³⁸²His 可能为单胺氧化酶 B 的活性中心提

供了一个亲核基团^[11]. 用 N-环丙基-甲苄胺将牛肝单胺氧化酶 B 修饰灭活, 部分水解后经 HPLC 分离得到一个八肽, 其中一个残基是被修饰的³⁶⁵Cys, 证明³⁶⁵Cys 是底物结合位点.

MAO A

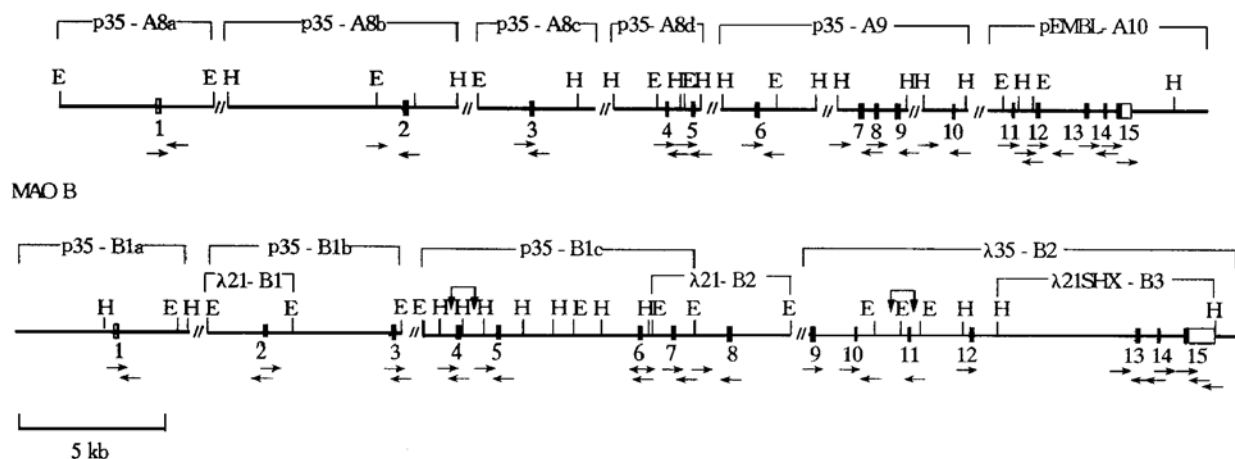


图 1 单胺氧化酶 A 和 B 基因的部分结构图^[3]

标出了外显子的位置。■:编码区; □:外显子的非翻译区。下方相应的数字表示外显子的编号, ⇄:测序的区域; ▮:无法准确确定外显子在哪个酶解片段上。λ:噬菌体克隆; p: λ噬菌体 DNA 的 pUC19 亚克隆。E: *Eco* R I 限制性内切酶切点; H: *Hind* III 限制性内切酶切点; //: 内含子间隔。

3.5 单胺氧化酶的体内功能

随着基因剔除技术的发展与成熟,人们可以利用该技术方便地研究酶在体内的功能^[12, 13].

在单胺氧化酶 A 基因剔除幼鼠的脑中, 血清素的浓度是野生型幼鼠的 9 倍。在成年小鼠脑中, 基因剔除小鼠血清素的浓度仅仅是野生型小鼠的 2 倍, 原因是单胺氧化酶 B 随着小鼠的成长而逐渐增多^[12]。在单胺氧化酶 A 基因剔除幼鼠和成年小鼠的脑中, 去甲肾上腺素的浓度为野生型小鼠的两倍, 多巴胺的浓度只在单胺氧化酶 A 基因剔除幼鼠的脑中稍有上升^[12]。对于单胺氧化酶 B 的基因剔除小鼠, 只有苯乙基胺的浓度升高为野生型小鼠的 8 倍左右^[13]。

4 单胺氧化酶与疾病的关系

4.1 单胺氧化酶与压力相关的精神失常

在临床上,单胺氧化酶的抑制剂可以缓解创伤后精神压力综合症以及受到痛苦刺激的病人的症状.这说明单胺氧化酶的抑制剂对压力与恐惧有直接的作用.1996年,Doyle等发现唾液中单胺氧化酶A和B的活力与精神压力有关.又有实验表明单胺氧化酶A和B基因剔除的小鼠在强制游泳实

验中对压力的反应性有所增强^[12, 13], 因为单胺氧化酶 A 基因剔除小鼠脑中去甲肾上腺素和多巴胺的水平以及单胺氧化酶 B 基因剔除的小鼠脑中苯乙胺水平的上升, 增强了小鼠对精神压力的反应。

4.2 单胺氧化酶 A 缺陷与攻击性行为

血清素作为单胺氧化酶 A 的一种底物, 与攻击性行为密切相关。在单胺氧化酶 A 基因剔除幼鼠脑中, 血清素的水平比正常幼鼠高得多。当基因剔除幼鼠成年后, 便表现出行为上具有攻击性^[12]。这说明单胺氧化酶 A 的基因剔除幼鼠中血清素水平的上升, 可能是造成成年单胺氧化酶 A 的基因剔除小鼠成年后攻击性行为的基础。单胺氧化酶 A 缺陷的小鼠脑皮层血清素水平的升高会导致体感脑皮层结构的变化, 这可能也是造成单胺氧化酶 A 缺陷的小鼠攻击性行为的原因。此外, 血清素水平的升高还可能是造成成年单胺氧化酶 A 的基因剔除小鼠感情学习增强的原因^[14]。与单胺氧化酶 A 基因剔除小鼠类似, 人类中也有相似的病例。如: 荷兰一家庭中男性成员的行为具有异常的攻击性, 其原因是编码单胺氧化酶 A 的基因单点碱基缺失而导致单胺氧化酶 A 的缺陷。

4.3 单胺氧化酶与帕金森氏综合症

在帕金森氏综合症患者的脑中, 黑质中多巴胺能神经元的减少导致单胺氧化酶 B 水平的上升, 单胺氧化酶 B 氧化过量的 DA 而产生过量的氧基团 (如 H_2O_2), 这些氧基团会氧化破坏黑纹神经元. 单胺氧化酶 B 的抑制剂 (deprenyl) 则可以延缓病情的发展.

单胺氧化酶 B 还可以将 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四羟基吡啶 (MPTP) 转换为有毒的代谢产物 1-甲基-4-苯吡啶 (MPP^+), 后者可以选择性地破坏黑纹神经元^[15]. 这种由 MPTP 引起的神经元的破坏与帕金森氏综合症中神经元的破坏很相似, 也可以被 deprenyl 所缓解. 因此, 单胺氧化酶 B 与由 MPTP 引起的帕金森氏综合症密切相关. 以下实验证明了该结论 (图 2): 剔除单胺氧化酶基因的小鼠在注射了 MPTP 后, 因为无单胺氧化酶 B 将 MPTP 转换为有毒的 MPP^+ , 所以并未引起黑纹神经元的破坏^[13].

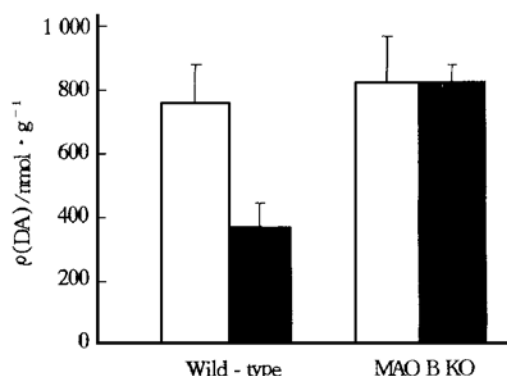


图 2 野生型 (Wild-type) 和单胺氧化酶 B 基因剔除小鼠 (MAO B KO) 纹状体中多巴胺 (DA) 水平^[13]

■: 皮下给药 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四羟基吡啶 (MPTP) 60 mg/kg; □: 注射生理盐水的对照.

总之, 单胺氧化酶 B 可以通过生物激活内源或外源的神经毒或是升高有害的 H_2O_2 的水平来加速大脑的老化.

1997 年, Polymeropoulos^[16] 从四个不同家族的帕金森氏综合症患者中发现了同一个与该病有关的基因, 这表明家族的帕金森氏综合症可能是遗传的. 因为单胺氧化酶活力的改变会对神经递质和神经化学产生影响, 所以与单胺氧化酶活力水平相关基因的遗传性变化会影响到人对帕金森氏综合症的易感性. 帕金森氏综合症患者与正常人单胺氧化酶 B 等位基因的分布完全不同. 有实验表明, 单胺氧化酶 B 等位基因 B4 和等位基因 1 的存在会影响

帕金森氏综合症发病的可能性.

另外, 单胺氧化酶 B 基因的多型性与帕金森氏综合症也有一定的关系. 至今, 未发现单胺氧化酶 A 基因的多型性与帕金森氏综合症有关. 单胺氧化酶 B 基因第 2 内含子中 GT 重复的等位基因数目与帕金森氏综合症密切相关, 在病人的基因中等位基因数目较多^[17].

目前, 单胺氧化酶 B 的专一性可逆抑制剂 deprenyl (selegiline) 已被广泛地用于帕金森氏综合症的治疗中^[18]. 已有实验证明 selegiline 的神经保护作用可能并非因为抑制了单胺氧化酶 B, 而是因为引起脑组织和血管中一氧化氮水平的升高, 从而可以保护缺血和氧化对脑部神经元的破坏^[19].

4.4 单胺氧化酶抑制剂与戒毒治疗

最近, 单胺氧化酶 B 的专一性可逆抑制剂 deprenyl 已被用于可卡因成瘾者戒毒的辅助治疗中. 实验证明口服 selegiline 后, 可将可卡因引起的欣快感降低 40%, 同时可以改变边缘区域的糖代谢 (边缘区域指脑部可能与可卡因成瘾有关的海马和扁桃体结构). 这些结果暗示单胺氧化酶 B 可能与可卡因引起的欣快感以及边缘代谢有关^[20]. 此外, selegiline 还被用于治疗鸦片成瘾者停用鸦片后所引起的突触前多巴胺产生减少.

5 展 望

从单胺氧化酶的发现至今, 人们对该酶已经有了很深刻的了解. 目前, 已经发现单胺氧化酶与许多疾病有关. 而且, 单胺氧化酶的专一性抑制剂已被广泛地用于疾病的治疗中^[18, 19].

在单胺氧化酶基因的表达调控方面, 有多个基因参与了单胺氧化酶体内活力的调控. 这些基因包括单胺氧化酶的结构基因、负责单胺氧化酶转录后修饰的基因、控制单胺氧化酶微环境的基因以及编码单胺氧化酶转录水平调控因子的基因. 目前, 我们对单胺氧化酶的调控还知之甚少. 所以, 单胺氧化酶基因在转录水平上调控因子的基因克隆以及对其机制的研究将是一个重要的方向.

为了更深入地了解单胺氧化酶的活性中心以及底物结合位点, 对单胺氧化酶晶体结构的研究必不可少. 一旦对单胺氧化酶的底物结合位点有了较深入的了解, 便可以设计更多专一、高效的抑制剂, 从而为相关疾病的治疗提供了更加有效的途径.

参 考 文 献

- Shih J C. Molecular basis of human MAO A and B.

- Neuropsychopharmacology, 1991, **4** (1): 1~ 7
- 2 Johnston J P. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol*, 1968, **17** (7): 1185~ 1197
 - 3 Grimsby J, Chen K, Wang L J, *et al.* Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (9): 3637~ 3641
 - 4 Brunner H G, Nelen M, Breakefield X O, *et al.* Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, 1993, **262** (5133): 578~ 580
 - 5 Kaseda S, Nomoto M, Iwata S. Effect of selegiline on dopamine concentration in the striatum of a primate. *Brain Res*, 1999, **815** (1): 44~ 50
 - 6 Lan N C, Heinzmann C, Gal A, *et al.* Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease. *Genomics*, 1989, **4** (4): 552~ 559
 - 7 Chen K, Wu H F, Grimsby J, *et al.* Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol*, 1994, **46** (6): 1126~ 1133
 - 8 Gottowik J, Malherbe P, Jang G, *et al.* Structure/function relationships of mitochondrial monoamine oxidase A and B chimeric forms. *Eur J Biochem*, 1995, **230** (3): 934~ 942
 - 9 Wu H F, Chen K, Shih J C. Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase A and B: role of cysteines. *Mol Pharmacol*, 1993, **43** (6): 888~ 893
 - 10 Tsugeno Y, Ito A. A key amino acid responsible for substrate selectivity of monoamine oxidase A and B. *J Biol Chem*, 1997, **272** (22): 14033~ 14036
 - 11 Hiro I, Tsugeno Y, Hirashiki I, *et al.* Characterization of wild-type and mutant forms of human monoamine oxidase A and B expressed in a mammalian cell line. *J Biochem*, 1996, **114** (4): 759~ 765
 - 12 Cases O, Serif I, Grimsby J, *et al.* Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO A. *Science*, 1995, **268** (5218): 1763~ 1766
 - 13 Grimsby J, Toth M, Chen K, *et al.* Increased stress response and β -phenylethylamine in MAO B-deficient mice. *Nature Genet*, 1997, **17** (2): 1~ 5
 - 14 Kim J J, Shih J C, Chen K, *et al.* Selective enhancement of emotional, but not motor, learning in monoamine oxidase A-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (11): 5929~ 5933
 - 15 Gerlach M, Youdim M B H, Riederer P. Pharmacology of selegiline. *Neurology*, 1996, **47** (3): S137~ 145
 - 16 Polymeropoulos M H, Lavendan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 1997, **276** (5321): 2045~ 2047
 - 17 Buchanan D D, McCann S J, James K M, *et al.* Variations in the monoamine oxidase B (MAOB) gene are associated with Parkinson's disease. *Mellick-GD. Mov-Disord*, 1999, **14** (2): 219~ 224
 - 18 Volz H P, Gleiter C H. Monoamine oxidase inhibitors. A perspective on their use in the elderly. *Drugs Aging*, 1998, **13** (5): 341~ 355
 - 19 Homas T, McLendon C, Thomas G. L-deprenyl: nitric oxide production and dilation of cerebral blood vessels. *Neuroreport*, 1998, **9** (11): 2595~ 2600
 - 20 Bartzokis G, Beckson M, Newton T, *et al.* Selegiline effects on cocaine-induced changes in medial temporal lobe metabolism and subjective ratings of euphoria. *Neuropsychopharmacology*, 1999, **20** (6): 582~ 590

Monoamine Oxidase. CHEN Jiar-Feng, WANG Err-Duo (*State Key Laboratory of Molecular Biology, Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Monoamine oxidase (MAO) catalyzes the oxidative deamination of a number of biogenic amines in the brain and peripheral tissues by the production of hydrogen peroxide (H_2O_2). The cloning of MAO A and B genes has demonstrated that the enzymes are made of different polypeptides. MAO A and B genes are located on the X-chromosome (Xp11.23) and consist of 15 exons with identical intron-exon organization, which suggests that they are derived from the same ancestral gene. MAO A and B exhibit distinct differences in the substrate selectivity and inhibitor sensitivity and play different role in the neurotransmitter metabolism and behavior.

Key words monoamine oxidase, neurotransmitter, behavior

动物线粒体基因组研究进展

廖顺尧 鲁成

(西南农业大学蚕桑学农业部重点开放实验室, 重庆 400716)

摘要 对动物线粒体分子生物学的最新研究进展进行了较详细的阐述。从线粒体基因组 (mtDNA) 的研究背景出发, 重点介绍了动物线粒体基因组的组成和结构特点, 以及目前动物 mtDNA 与核基因组的关系、线粒体基因的遗传、起源和进化研究中的热点问题。

关键词 线粒体基因组 (mtDNA), 复制, 母性遗传, 群体遗传学, 系统发生学, 异质性, 中性进化

学科分类号 Q343.3⁺5