

- 2 Richardson J H, Sodroski J G, Waldmann T A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 3137
- 3 Graus-Porta D, Beerli R R, Hynes N E. *Mol Cell Biol*, 1995; **3**: 1182
- 4 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; **2**: 422
- 5 Duan L X, Bagasra D, Laughlin M A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; **91**: 5075
- 6 Cattaneo A, Neuberger M S. *EMBO J*, 1987; **6**: 2753
- 7 Biocca S, Neuberger M S, Cattaneo A. *EMBO J*, 1990; **1**: 101
- 8 Baltimore D. *Nature*, 1988; **335**: 395
- 9 Winter G, Milstein C. *Nature*, 1991; **349**: 293
- 10 Whitlow M, Filpula D. *Methods Enzymol*, 1991; **2**: 97
- 11 Beerli R R, Wels W, Hynes N E. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; **2**: 666
- 12 Melnick J, Dul J L, Argon Y. *Nature*, 1994; **370**: 373
- 13 Schutze M P, Peterson P A, Jackson M R. *EMBO J*, 1994; **7**: 1696
- 14 Somia N V, Zoppe M, Verma I M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; **92**: 7570
- 15 Valsesia-Wittmann S, Drynda A, Deleage G *et al.* *J Virol*, 1994; **7**: 4609
- 16 Ferrari G, Salvatori G, Rossi C *et al.* *Hum gene Ther*, 1995; **6**: 733
- 17 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Campioni N *et al.* *Bio/Technology*, 1994; **12**: 396
- 18 Beerli R R, Wels W, Hynes N E. *Biol Chem J*, 1994; **39**: 23931
- 19 Deshane J, Loechel F, Conry R M. *Gene Ther*, 1994; **1**:

332

- 20 Richardson J H, Marasco W A. *Trend of Biotech*, 1995; **13**: 306

Intracellular Antibody Technique and Its Medical Application. Zhou Chunshui, Zhen Yongsu (*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*).

Abstract Intracellular antibody refers to the recombinant antibody expressed intracellularly. Single-chain Fv fragment, one common form of intracellular antibody with high affinity, can be expressed in transfected nonlymphocytes and targets to a particular cellular compartment to interfere the activity of some macromolecular substances or the process of their secretion. Intracellular antibody has been proved to be capable of inhibiting growth factor receptors, inactivating oncoproteins and inhibiting HIV-1 replication. Intracellular antibody technique is a novel gene therapy approach with potentiality in medical application.

Key words antibody engineering, intracellular targeting, single-chain Fv fragment, gene therapy

活性氧参与艾滋病发病的机理

王兰芳 郑荣梁

(兰州大学生物系, 兰州 730000)

摘要 HIV 的长期感染, 使得患者体内活性氧大量积累, 形成了氧胁迫。各种活性氧介导的氧胁迫, 能够激活转录因子 NF- κ B, 从而刺激并促进 HIV 的基因表达。同时氧胁迫还使得 HIV 感染者机体功能陷入紊乱, 表现为 DNA 严重损伤, Ca^{2+} 失去细胞内外的平衡, 酶系统遭到破坏, 能量代谢受阻等诸多方面。应用抗氧化剂治疗艾滋病仍处于探索阶段。

关键词 活性氧, 氧胁迫, 自由基, 艾滋病, 抗氧化剂

人免疫缺陷病毒 (HIV) 感染者发展到有症状的艾滋病 (AIDS) 患者, 往往经历一个可长达 8~11 年^[1], 乃至 13 年^[2] 的潜伏期, 即临床上的无症状期. 在此期间, HIV 只持续低水平的复制, 宿主 CD_4^+ 细胞感染 HIV 相对较少 (1/10 000 或 1/100 000)^[3]. 因此, 对 HIV 活化机制的探讨成为艾滋病研究的焦点之一. 近几年来, 人们发现 HIV 长期感染者体内活性氧大量积累, 这促使人们去研究活性氧在艾滋病发病机理中所起的作用.

活性氧等自由基是人体生理生化反应的正常产物. 超氧阴离子 (O_2^-)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟自由基 ($\cdot OH$)、烷氧基 (RO)、单线态氧 (1O_2) 等氧化性物质既能协助机体抵御和杀伤细菌等侵染物, 又会促进机体衰老, 引起各种疾病, 人体内由酶系统、自由基清除剂、抗氧化剂以及修复系统构成的天然防御体系, 恰好消除了这些活性氧及其他自由基的毒害作用. 正常人体内自由基与其防御体系之间处于动态平衡之中. 由于种种原因, 机体内活性氧积累过多, 不能被防御体系消除, 或者防御体系衰落, 不足以消除相对过多的自由基时, 便形成了氧胁迫. 机体对氧胁迫的反应称为氧应激^[4].

1 氧胁迫是 HIV 长期感染的积累效应

无症状期, HIV 感染者外周血液中的单核细胞与淋巴细胞的谷胱甘肽 (GSH) 含量明显少于正常组 (Buhi 等, 1994 年). 据 Eck^[5] 报道, HIV 感染者的巯基酸 (acid-soluble thiol) 含量通常低于正常人. 半胱氨酸 (Cys) 在 HIV 阳性者体内含量为 $7.55 \mu g/L$ ($n=47$), 而在正常人体内为 $9.36 \mu g/L$ ($n=16$) (Jarstrand 和 Akerlund, 1994 年). Flores 等^[6] 报道, HIV 感染者的含锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 与过氧化氢酶 (CAT) 含量也明显下降.

GSH、acid-soluble thiol、Cys 均为人体内重要的自由基清除剂, MnSOD 与 CAT 是两种重要的防御性酶. 以上这些研究表明, HIV 感染者体内必然存在着活性氧的大量积累, 才

使得相应的防御性物质消耗加剧.

丙二醛 (MDA) 是活性氧诱发的不饱和脂肪酸过氧化作用的主要产物. 1988 年, Sonaerborg 等^[7] 指出, HIV 感染者尿中的 MDA 含量显著高于正常人的平均值. Favier 等^[8] 于 1994 年进一步提出, 无症状期的脂类过氧化水平高于 AIDS 期. 脂类过氧化水平也反应了 HIV 感染后患者体内氧胁迫状态.

巨噬细胞 ($M\Phi$) 在体外被证明为 HIV 的易感靶细胞, 受 HIV 感染的 $M\Phi$ 成为多种组织中 HIV 的贮存者和携带者. 无增殖力的成熟 $M\Phi$ 受 HIV 感染后, 可不立即死亡而使 HIV 长期在其中复制^[9]. $M\Phi$ 在行使吞噬功能时产生一定量的活性氧; 感染的 $M\Phi$ 又可分泌细胞因子, 引起一系列继发反应, 如由单核 $M\Phi$ 产生的肿瘤坏死因子 (TNF α) 可影响靶细胞的多聚不饱和脂肪酸 (PUFA) 的代谢, 从而产生大量的自由基^[10]. HIV 对 $M\Phi$ 的长期大规模的侵染与盘踞, 导致 $M\Phi$ 及其分泌的细胞因子发生一系列反应, 持续产生活性氧自由基.

除了机体免疫系统为对抗 HIV 的长期而又顽固的侵染释放了大量的活性氧, 产生了“自我毒害”效应外, HIV 本身也通过直接或间接的方式削弱宿主机体的抗氧化能力. Tat 蛋白是 HIV 基因编码的调节蛋白之一, 为 HIV 基因表达及病毒复制所必需, 并能改变宿主细胞的基因表达^[11]. Tat 蛋白通过抑制宿主细胞 MnSOD 的表达来抑制细胞的抗氧化能力. 这是 HIV 为自身的复制与增殖谋得一个合适的细胞环境而采取的措施^[12].

HIV 的感染使患者出现了厌食、吸收障碍、消化不良等症状, 从而出现了营养不良的状况, 对抗氧化剂的摄取和利用也大大下降^[12].

一方面是活性氧的大量积累, 另一方面是抗氧化能力的下降, HIV 患者机体内的氧化与抗氧化平衡丧失, 最终形成了氧胁迫状态.

2 氧胁迫在艾滋病发病机理中的作用

2.1 氧胁迫可触发 HIV 的基因表达

H_2O_2 与 1O_2 介导的细胞内氧胁迫均可触

发 HIV-1 的活化, 且活化的第一步是转录因子诱导的 HIV 基因长末端重复序列 (LTR) 的激活^[13]. H_2O_2 可以通过活化转录因子 $NF\kappa B$ 诱导人体细胞内 HIV 的表达 (Paech 等, 1991 年).

$NF\kappa B$ 为哺乳动物所有, 是转录活化因子. 它存在于多种细胞和组织中, 尤其是前 B 细胞、B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、单核细胞等免疫细胞中. $NF\kappa B$ 能够快速激活感染、免疫、应激等状态下所涉及的基因的表达^[14].

$NF\kappa B$ 与 J-C- κ 基因内区的 κB 结合. J-C- κ 是编码如下蛋白的基因的上游区: a. 免疫调控细胞因子; b. 免疫调节细胞的表面受体; c. fos、HIV 基因的 LTR 等^[12].

$NF\kappa B$ 与 HIV-LTR 的结合足以引起 HIV 基因的转录, 似乎是 HIV 复制的必需条件^[15]. 在未活化细胞内, $NF\kappa B$ 与其抑制物 $I\kappa B$ 结合在一起, $I\kappa B$ 阻止了 $NF\kappa B$ 与 DNA 的结合, 也阻止了核内 $NF\kappa B$ 的摄取. 在诱导物作用下, $NF\kappa B$ 即可与 $I\kappa B$ 分开, 从细胞质转移到核内, 触发相关基因的表达^[16].

Meyer 等^[16]报道, H_2O_2 等活性氧均可活化 $NF\kappa B$. N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC) 等抗氧化剂则抑制 $NF\kappa B$ 的活性. 此外, $NF\kappa B$ 的其他活化物质 TNF、白细胞介素 1 (IL-1)、巴豆肉豆蔻乙酯 (PMA)、紫外线 (UV)、 γ 射线等都可诱导细胞内氧胁迫^[17]. 可见, $NF\kappa B$ 为活性氧敏感因子.

氧胁迫通过激活 $NF\kappa B$ 从而诱发 HIV 基因的转录与表达, 这对 AIDS 期的来临意义重大.

2.2 氧胁迫对 HIV 感染者 DNA 的损伤

活性氧使 DNA 遭到损伤, 胸腺嘧啶二醇 (TG), 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-OHdG) 和 5-羟基甲基尿嘧啶 (5-OHMU) 等一系列损伤分子的形成^[4], 导致了碱基的修饰、缺失、DNA 降解、致癌基因表达增强等^[18]. DNA 周围金属离子, 尤其是 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 的存在, 催化了 Fenton 反应, 生成大量氧化性最强的 $\cdot OH$,

$\cdot OH$ 使得 DNA 损伤更为严重^[19]. 氧胁迫对患者 DNA 的严重损伤, 使得机体抗 HIV 所必需的应激蛋白、酶及诸多免疫性物质的表达与合成受到强烈的干扰, 大大削弱了机体的免疫能力. 而致癌基因的活跃表达则进一步威胁到患者的身体状况.

有实验表明, 组蛋白为活性氧的敏感靶分子 (Dizdaroglu 等, 1991 年). 受损后的组蛋白的聚集化是细胞程序化死亡 (PCD) 的一个显著标志. 这意味着患者免疫细胞可能大量丧失.

2.3 氧胁迫诱发的 Ca^{2+} 体内平衡失调

维持 Ca^{2+} 体内平衡状态, 对细胞的存活意义重大. 25 nmol/L 的 H_2O_2 即可诱发 Ca^{2+} 从线粒体、内质网的 Ca^{2+} 池中大量释放, 致使细胞膜透性丧失, 造成 2×10^6 个淋巴细胞死亡 (Orrenius 等, 1989 年). 细胞膜 PUFA 的氧化可加剧 Ca^{2+} 内流, 而花生四烯酸的过氧化产物又可充当 Ca^{2+} 的载体, 从而使得细胞内外 Ca^{2+} 平衡状态丧失 (Braugher, 1987 年).

细胞内外 Ca^{2+} 平衡失调, 引起了诸多酶的继发性反应. 例如, 蛋白激酶 PKC 被 Ca^{2+} 激活后, 可使 $I\kappa B$ 磷酸化, 进一步增强了 HIV 基因的表达^[16]. 核酸内切酶被认为一旦由 Ca^{2+} 活化以后可诱发 DNA 的片段化, 从而导致了 PCD (Orrenius 等, 1989 年). 氧胁迫对某些酶 (如磷脂酶) 的直接损伤连同这些继发性反应意味着机体酶系统的紊乱.

2.4 氧胁迫改变了 ATP 的水平 and 代谢途径

在核苷酸的氧损伤产物与 Ca^{2+} 作用下, 多聚 ADP-核糖合成酶大量激活, 作为该酶底物的 NAD 大量消耗; NADPH 活性降低, 不仅给电子传递链造成损失, 还原态 GSH 的转化也因此受阻. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶的第 149 号 Cys 的巯基氧化, 糖酵解途径因此被抑制, ATP 水平显著下降^[20]. 用 H_2O_2 处理几分钟后的细胞, 其 ATP 含量只有对照组的 20% (Spragg 等, 1985 年). 而 ATP 水平的下降是细胞由正常走向死亡的一个“分水岭”. 同时,

也在很大程度上影响了患者对 HIV 的抵抗力。

综上所述, HIV 长期感染在宿主体内导致的氧胁迫, 一方面通过激活 NF κ B 诱发了 HIV 的高水平表达; 另一方面也给患者机体带来了多方面多层次的损伤, 最终削弱了机体的防御力, 从而为 HIV 的侵染创造了良好的环境。可见, 氧胁迫在艾滋病发病机理中起着非常重要的作用。

3 抗氧化剂对艾滋病的治疗意义

自从人们逐渐发现了氧胁迫与艾滋病的密切关系, 就开始探讨抗氧化剂的治疗效果。在自由基医学角度上, 抗氧化剂与自由基清除剂是同义词。

典型的抗氧化剂 GSH、NAC、Cys、Vit E 等, 在临床上给无症状期患者使用后, 均能改善患者血液的抗氧化剂水平^[21], 但尚未观察到进一步的效果。最近发现具有抗氧化作用的硫辛酸 (α -lipoic acid), 能够抑制人工培养细胞中 HIV-1 的复制 (Baur 等, 1991 年)。硫辛酸对 HIV 的抑制效果远远大于 NAC (Suzuki 等, 1992 年)。

抗氧化剂虽然在理论上具有一定的治疗作用, 但人体环境较体外试验环境要复杂得多。AIDS 期病人存在严重的营养流失问题, 从药物或食物中摄入的抗氧化剂无法被机体充分利用, 这对抗氧化剂的使用方式提出了挑战。如何最有效地达到治疗效果, 有待于对众多抗氧化剂生理、生化和药理等性质进行深入综合的研究, 及对更有效的抗氧化剂的发掘。

参 考 文 献

- Downs A M, Ancelle-Park R A, Costagliola D *et al.* J Aids, 1991; 4: 805
- Lifson A R, Butchbinder S P, Sheppard H W *et al.* J Infect Dis, 1991; 163: 959
- Simmonds P, Balfe P, Peuthere J F *et al.* J Virol, 1990; 64: 864
- 郑荣梁主编. 自由基生物学. 北京: 高等教育出版社, 1992; 107: 42
- Eck H P. Biol Chem Hoppe Seyler, 1989; 370: 101
- Flores S C, Marecki J C, Harper K F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 763
- Sonnerborg A C, Carlin G, Akerlund B *et al.* Scand J Infect Dis, 1988; 20: 287
- Favier A, Sappey C, Leclerc P *et al.* Chemico-Biological Interactions, 1994; 91: 165
- Meltzer M S, Harvey D C, Lanie J M *et al.* Immunology Today, 1990; 11: 217
- 童善庆, 杜德源. 上海免疫学杂志, 1989; 9: 236
- Buchschacher G L. Jr. J Am Med Ass, 1993; 269: 2880
- Denis J M M. In: Favier A E eds. Trace elements and free radical in oxidative diseases, Paris: AOCS Press, 1994: 113
- Piette J, Legrand-Poels S. Chemico-Biological Interactions, 1994; 91: 79
- Bauerle P A, Baltimore D. In: Cohen P eds. Molecular aspects of cellular regulation, hormone control regulation of gene transcription, Amsterdam: North Holland biomedical Press, 1991: 409
- Yoshie O, Majima T, Saito H. J Leukoc Biol, 1989; 45: 10
- Meyer M, Path H L, Bauerle P A. Chemico-Biological Interactions, 1994; 91: 91
- Halliwell B, Aruma D I. FEBS Lett, 1991; 281: 9
- 郑荣梁, Lesko S A, Ts'o P O P. 中国科学 (B), 1988; (4): 378
- Schraufstatter I U, Hyslop P A, Hinsaw D B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 4908
- Hinsaw D B, Hyslop P A, Halsey W A *et al.* J Clin Invest, 1987; 263: 1665
- Baruchel S, Bouniu G, Gold P. In: Pasquier C eds. Oxidative stress, cell action and viral infection, Switer: Birkhauser Verlag Basel, 1994: 311

Reactive Oxygen Species Participate the Pathogenesis of AIDS. Wang Lanfang, Zheng Rongliang (Biology Department of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China).

Abstract During long period infection of HIV, plenty of reactive oxygen species are accumulated in patients, and then oxidative stress forms. Oxidative stress mediated by reactive oxygen species can activate a transcription factor, NF κ B which in turn stimulates HIV gene expression. Besides, oxidative stress causes the disturbance of biological functions of infected patients' bodies, such as DNA damage, loss of Ca²⁺

homostasis, incurable destruction of enzyme system, block of energy production and so on. It is still at experimental stage to use antioxidants in AIDS therapy.

Key words reactive oxygen species, oxidative stress, free radical, acquired immunodeficiency syndrome, antioxidant

蛋白质电导率的跃迁机理及其应用*

叶元杰

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 总结了近年来关于蛋白质电导率的理论研究工作, 简要介绍和评述了过去已有的对蛋白质电导率的研究工作, 讨论了对蛋白质分子作完整分子的电子结构和理论电导率计算的近似方案和计算方法, 由计算结果总结出蛋白质的电子结构和理论电导率的基本特性. 最后, 根据对胰岛素的计算结果提出了胰岛素及其受体在跨膜信号传递中的电子通道模型.

关键词 蛋白质, 电导率, 跃迁机理, 跨膜信号传递

1 概述

蛋白质的电导率研究对理解生命过程具有重要意义. 许多生命过程都与电子传递有关, 如光合作用、呼吸链、生物体内的通讯等等. 在这些过程中有各种各样的蛋白质参与传递和调控. 对蛋白质的电导性质的研究始于 1941 年, 由 Szent-Györgyi^[1,2] 首先提出蛋白质具有半导体性质, 随后人们即在实验和理论两方面进行研究. 对蛋白质的电导率的测量说明蛋白质在黑暗条件下有微弱的电导^[3], 在能量高于 320 nm 的光照条件下电导率可以提高数百倍^[4]. 这说明蛋白质确有半导体性质. 然而由于实验中难以得到足够纯的样品, 少量杂质的干扰使得结论带有较大的不确定性. 例如, 对溶菌酶的单晶体的最大测量误差大约为三个数量级^[4]. 在理论方面, 早期的研究工作大多采用周期性边界条件对由单一氨基酸残基构成的多肽链做能带结构计算^[5~9]. 根据这种计算人们认为蛋白质的导电机理是由于离域电子的迁移所致. 到 80 年代, Ladik 等采用非周期边界条件对由数种氨基酸残基组成的无序

多肽链做能带结构计算^[10~12], 得到的计算结果说明蛋白质内的电子主要是局域状态而不是离域状态. 根据这些计算结果, 他们提出了蛋白质电导的跃迁机理. 作者近年来所做的对真实存在的天然蛋白质的量子力学计算^[13~17] 结果支持了蛋白质电导的跃迁机理. 以跃迁机理为基础, 应用 Odagaki 和 Lax 提出的非晶态物质电导率的无规走步理论^[18], 作者和 Ladik 建立了用于计算蛋白质的理论电导率的公式^[16,17], 对猪胰岛素的理论电导率的计算结果说明天然蛋白质在受激时有较高的交流电导. 根据计算结果, 作者和 Ladik 提出了蛋白质在信号传递中的作用的电子机理^[19]. 最近, 姜燕等^[20] 应用以上方法计算了粘盲鳗胰岛素的理论电导率, 提出了胰岛素受体在跨膜信号传递中的电子通道模型.

本文主要介绍作者近年来的研究结果. 文中主要讨论物理模型和近似方案. 读者可以在相应的参考文献中了解有关计算方法的细节.

*国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1995-10-05, 修回日期: 1996-01-16