

综述与专论

血小板生成素及其研究进展*

刘存仁 张红卫

(山东大学生物系, 济南 250100)

摘要 血小板生成素 (TPO) 是最近被描述的一种新型细胞因子, 相对分子质量在 35×10^3 以上, 是一种糖蛋白. 人和鼠 TPO 成熟蛋白分别由 332 和 335 个氨基酸残基组成. TPO 的受体与造血生长因子受体超家族成员 c-Mpl 相关. TPO 不仅对巨核系祖细胞的增殖、分化具有明显的调控作用, 而且对血小板的生成同样具有促进作用.

关键词 血小板生成素, 细胞因子, 调控

血小板是哺乳动物及人体血细胞的重要组成部分, 它具有促进止血和加速凝血的功能. 巨核细胞是生成血小板的前体细胞, 它由巨核系祖细胞增殖分化而成. 血小板生成素 (thrombopoietin, TPO) 是最近被发现和描述的一种新型细胞因子, 它不仅对巨核系祖细胞的增殖、分化具有调控作用, 而且对血小板的生成具有特异的促进作用. 因此, TPO 又被称为巨核细胞集落刺激因子或巨核细胞生长发育因子. 本文就它的分子和细胞生物学研究进展进行综述.

1 TPO cDNA 的分子克隆及其编码蛋白

Bartley 等^[1]和 de Sauvage 等^[2]于 1994 年分别报道了人 TPO cDNA 的全长序列. 鼠 TPO 的 cDNA 全长序列也于同年由 Lok 等^[3]克隆成功. 人 TPO cDNA 克隆约 1774 个碱基, 其中含有一个由 1059 个碱基组成的阅读框架, 可编码由 353 个氨基酸残基构成的前体多肽. 其 5' 和 3' 端非编码区分别由 215 和 498 个碱基组成. 编码的蛋白 N 端疏水性强, 符合分泌蛋白的特点. 经分析表明, 信号肽酶切割位点位于 TPO 前体多肽第 21 位和 22 位的两个丝氨酸残基之间. 因此, 人 TPO 成熟多

肽长度为 332 个氨基酸残基, 其 N 端为丝氨酸残基^[1,2]. 鼠 TPO cDNA 全长约 1486 个碱基, 含有一个 356 个氨基酸残基的阅读框架, 其前体多肽的 N 端具有信号肽顺序. 将鼠 TPO cDNA 转染 BHK 细胞后的表达产物或者从分泌 TPO 的突变细胞系培养上清中分离纯化的天然 TPO 经 N 端氨基酸序列分析表明, 信号肽切割位点也位于第 21 位和 22 位的两个丝氨酸残基之间, 故鼠 TPO 的成熟多肽长度为 335 个氨基酸残基, 其 N 端为丝氨酸^[3]. 将人和鼠 TPO 编码的多肽进行氨基酸序列对比, 发现两者具有大小相近、同源性较高等特点. 从分子结构上看, 两者均为双结构域分子. 人和鼠 TPO N 端结构域具有 84% 的氨基酸同源, 并且与红细胞生成素 (EPO) 氨基酸序列具有同源性. 因此, N 端结构域被称为 EPO 样结构^[4]. 另外所有 4 个半胱氨酸残基完全相同, 它们均分布在 N 端结构域中^[1]. 以往的研究表明, 在人 EPO 氨基酸序列中也存在着 4 个半胱氨酸残基, 其中 1, 4-二硫键对 EPO 的功能非常重要^[5,6]. 由此推测, TPO 中的第 1、4 半胱氨酸间可形成重要的二

* 山东大学青年自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1995-07-03, 修回日期: 1995-09-27

硫键. Bartley 等^[1]和 de Sauvage 等^[2]分别将全长人 TPO 蛋白与仅由 N 端 174 和 153 个氨基酸残基组成的多肽进行了生物活性对比, 发现两者具有相似的生物活性, 表明 TPO 蛋白的生物活性主要由其 N 端结构域决定. 然而人和鼠 TPO C 端结构域仅有 60% 的同源性, 并且富含丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸残基, 与其他已知蛋白序列无同源性^[4]. 在 C 端结构域中, 还分别有 6 个 (人 TPO) 和 7 个 (鼠 TPO) 可能的 N-糖基化位点 (Asn-X-Ser/Thr), 其中的 5 个在人和鼠 TPO 多肽序列中有保守性^[2-4]. 表明 C 端结构域的糖基化有相似性. 此外在人和鼠 TPO 双结构域之间的连接处各具有一个双碱性的精氨酸-精氨酸 (Arg-Arg) 对^[2,3], 它可能是蛋白质分子被切割加工的位点. 推测人或者鼠 TPO 成熟多肽相对分子质量约 35×10^3 , 但重组人或者鼠 TPO 蛋白均含有高达 50% 的糖. 因此, 成熟蛋白是一种糖蛋白, 应有更高的相对分子质量^[4]. 由上述分析可知, TPO 的生物活性主要由其 N 端结构域决定, 它的糖基化位点则位于 C 端结构域中. 有关 C 端结构域的功能及其糖基化对 TPO 生物活性的影响还需进一步探讨.

2 TPO 的基因结构和染色体定位

采用人 TPO cDNA 作为探针进行 DNA 杂交分析表明, 人 TPO 基因在基因组中为单拷贝基因. 利用原位杂交与 G 带分析技术最终将人 TPO 基因定位于 $3q^{26-27}$ 位点^[4], 它与人 EPO 基因处在不同的染色体上^[7].

Foster 等^[4]利用鼠 TPO cDNA 作为探针, 成功地分离到人 TPO 基因. 该基因约 6 kb 以上, 其编码区段由 5 个外显子和 4 个内含子组成. 内含子和外显子分布与人 EPO 基因^[8,9]相似. 将人 TPO cDNA 5' 端非编码区与基因序列对比发现, 除上述 4 个内含子外, 在基因上游 159~1826 区还具有一个内含子序列, 为便于比较, 将它称为“内含子 0”. 那么位于它上游的非编码外显子则称为“外显子 0”.

因此, 人 TPO 基因实际上由“5+0”个外显子和“4+0”个内含子组成. 另外鼠 TPO cDNA 5' 端非编码区与人 TPO 基因序列在 135~158 和 1827~1922 区具有很高的同源性^[4]. 然而鼠 TPO 基因是否具有相似的结构还有待于实验证实. 将人 TPO 基因与人 EPO 基因对比, 两者对应的所有内含子的分布完全相同. 表明两者可能具有相同的起源. 然而 EPO 是一个由 166 个氨基酸构成的单一结构域的蛋白, 而 TPO 为双结构域蛋白, 而且两者处在不同的染色体上. 因此, TPO 与 EPO 基因的起源关系仍需进一步探讨.

3 TPO mRNA 表达的组织分布

以 TPO cDNA 为探针进行 RNA 印迹分析显示, 人 TPO mRNA 仅在胎肝、成体肝和肾组织中表达, 而在胎儿或成体心脏、脑、肺、胎盘和骨骼肌来源的组织中未见表达^[2]. 鼠 TPO mRNA 在肝和肾组织中有表达, 而在心脏、脑、肺、脾脏、骨骼肌和睾丸来源的组织中无表达^[3]. 由此可见, 人或鼠 TPO mRNA 表达的组织分布具有相似性.

4 TPO 的生物学特性

巨核系祖细胞是生成巨核细胞及其血小板的前体细胞, 它们的增殖、分化及成熟是在细胞因子的调控下进行的. 最近的研究表明, TPO 就是其中一个特异的调控因子. Kaushansky 等^[10]的体外实验表明, 重组鼠 TPO 具有刺激巨核细胞集落生成的功能, 并且在集落数目和集落大小方面与作用早期分化阶段的白细胞介素 3 (IL-3) 或干细胞因子 (SCF) 具有协同作用. 然而对红系和粒-单系细胞集落的形成影响甚小. 不仅如此, 鼠 TPO 还能够刺激人 MO7e 和 KU812 巨核细胞系的细胞增殖以及 CMK 细胞系的 GPIb (一种血小板膜分化抗原) 表达. 显示鼠 TPO 对巨核细胞的增殖及分化具有调控作用. 为了进一步探讨 TPO 对巨核细胞发育的影响, 将不含成熟巨核细胞的骨髓细胞接种在无血清的含

有 TPO 的培养液中培养 6 d, 可见鼠 TPO 可诱导巨核细胞生长、增殖和生成血小板. 结果表明, TPO 能够调控巨核细胞的增殖、分化及成熟. 为了证实 TPO 的体内生物学活性, 将纯化的重组鼠 TPO 蛋白注射给小鼠, 可见外周血血小板计数较对照动物增加 4 倍以上^[3]. 组织学检查显示骨髓和脾脏中的体积较大的巨核细胞数量有明显增加. 进一步的工作证实, 体内注射 TPO 可使骨髓和脾脏中的巨核系祖细胞 (CFU-Meg) 数增加 20 倍, 而对红系祖细胞 (BFU-E 和 CFU-E) 和粒-单系祖细胞 (CFU-GM) 数无明显影响^[10]. 上述结果表明 TPO 在体内仍具有调控巨核系祖细胞增殖、分化和生成血小板的性能. Bartley 等^[1]和 de Sauvage 等^[2]的体内外实验显示, 人 TPO 具有与鼠 TPO 相似的生物学活性, 而且无种间特异性. 综上所述, TPO 是一个调控巨核系祖细胞增殖、分化及其成熟的细胞因子, 它是否具有其他的生物学活性仍需进一步研究.

5 TPO 的受体

从 TPO 的生物学活性可以看出, 它是一个特异地调控巨核系祖细胞增殖、分化及其成熟的细胞因子. 因此, 它的特异调控作用是通过靶细胞上的细胞因子受体介导的. 以往的研究表明, 原癌基因 *c-mpl* 是造血生长因子受体超家族的一个成员, 它编码的蛋白 (*c-Mpl*) 在造血中具有重要的功能^[11~14]. Methia 等^[15]将 *c-mpl* mRNA 的反义核酸导入 CD34⁺ 细胞后, 可显著抑制巨核细胞集落的形成, 而红系或髓系细胞集落的形成不受任何影响. 表明 *c-Mpl* 是一个调控巨核细胞发生的细胞因子的受体. 进一步的实验证实, 重组人或者鼠 TPO 能够特异地刺激表达人 *c-Mpl* 的 BaF3HMPLR 细胞系和表达鼠 *c-Mpl* 且 IL-3 依赖的 BaF3MPLR1.1 细胞系的增殖^[3,4]. 可见 TPO 的刺激活性与 *c-Mpl* 介导有关. 另外 *c-Mpl* 的胞外区 (*Mpl-X*) 或可溶性的 *Mpl* 不仅具有抑制重组 TPO 调控巨核细胞发生的功

能, 而且可抑制 TPO 刺激表达 *Mpl* 的细胞系增殖的活性^[1~3]. 这与 *mu-Mpl/Fc* 融合蛋白通过吸附血清中天然的 TPO 从而抑制 TPO 的调控作用完全一致^[16]. 由此可见, TPO 的受体与 *c-Mpl* 相关. 关于 TPO 刺激信号的转导机制以及调控的机理仍是今后研究的焦点.

综上所述, TPO 是由肝和肾组织中的细胞分泌的一种新型细胞因子, 分子质量在 35 ku 以上, 是一种糖蛋白. 其 N 端结构域与 EPO 具有同源性. 人 TPO 基因在基因组中为单拷贝基因, 位于 3q²⁶⁻²⁷ 位点. TPO 的受体与造血生长因子受体超家族成员 *c-Mpl* 相关. 生物活性检测表明, TPO 不仅对巨核系祖细胞的增殖、分化具有明显的调控作用, 而且对血小板的生成同样具有促进作用. 由此可见, TPO 是一种功能特异的细胞因子, 相信它在临床上会有广阔的应用前景.

参 考 文 献

- 1 Bartley T D, Bogenberger J, Hunt P *et al.* Cell, 1994; 77: 1117
- 2 de Sauvage F J, Hass P E, Spencer S D *et al.* Nature, 1994; 369: 533
- 3 Lok S, Kaushansky K, Holly R D *et al.* Nature, 1994; 369: 565
- 4 Foster D C, Sprecher C A, Grant F J *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 13023
- 5 Wang F F, Kung C K-H, Goldwasser E. Endocrinology, 1985; 116: 2286
- 6 Lai P-H, Everett R, Wang F-F *et al.* J Biol Chem, 1986; 261: 3116
- 7 Law M L, Cai G-Y, Lin F-K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986; 83: 6920
- 8 Lin F K, Suggs S, Lin C-H *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985; 82: 7580
- 9 Jacobs K, Shoemaker C B, Rudersdorf R *et al.* Nature, 1985; 313: 806
- 10 Kaushansky K, Lok S, Holly R D *et al.* Nature, 1994; 369: 568
- 11 Souyri M, Vigon I, Penciocelli J-F *et al.* Cell, 1990; 63: 1137
- 12 Skoda R C, Seldin D C, Chiang M-K *et al.* EMBO J, 1993; 12: 2645
- 13 Vigon I, Mornon J-P, Cocault L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 5640
- 14 Vigon I, Florindo C, Fichelson S *et al.* Oncogene, 1993; 8: 2607
- 15 Methia N, Louache F, Vainchenker W *et al.* Blood, 1993; 82: 1395
- 16 Wendling F, Maraskovsky E, Deblis N *et al.* Nature, 1994;

369: 571

Progress on the Study of Thrombopoietin. Liu Cunren, Zhang Hongwei (*Department of Biology, Shandong University, Jinan 250100, China*).

Abstract Thrombopoietin (TPO) is a recently described novel cytokine produced in both liver and kidney. TPO protein secreted is glycoprotein with relative molecular mass of over 35 ku.

Human and mouse mature TPO consist of 332 and 335 amino acid residues respectively. TPO receptor is related to c-Mpl which is a member of the hematopoietin receptor superfamily. TPO not only regulates the proliferation and differentiation of megakaryocyte progenitor cells, but also regulates the production of platelets.

Key words thrombopoietin, cytokine, regulation

一氧化氮合酶的若干研究进展

陈晋文 孙长凯 黄远桂

(第四军医大学西京医院, 西安 710032)

摘要 一氧化氮合酶 (NOS) 是一氧化氮 (NO) 生物学与医学研究的重要内容. 近年来, 对 NOS 酶本质及其生化与分子生物学特性甚至某些分子遗传学方面的认识都在迅速发展和深化. 研究表明, 干预 NOS-NO 途径的某些环节, 如酶激活、NO 合成、释放与转运甚至有关酶的编码基因及其表达, 将为某些临床问题的解决提供新的思路 and 手段.

关键词 一氧化氮合酶 (NOS), 一氧化氮 (NO), 生物化学, 分子生物学

一氧化氮 (NO) 是真核生物细胞中新近发现的一种重要活性介质, 几乎参与各种疾病过程^[1]. NO 由 NOS (EC 1.14.13.39) 以 L-精氨酸、O₂、NADPH 为底物, FAD、FMN、血红素、四氢叶酸 (BH₄) 以及钙调蛋白 (CaM) 为辅基催化合成. 90 年代以来, 随着 NOS 的纯化、克隆, 对 NOS 的研究已取得很大成就. 本文主要介绍 NOS 酶学特性和分子生物学方面的若干研究成果.

1 NOS 超家族及其分类

根据 NOS 存在的细胞类型有不同描述, nNOS (神经元性 NOS), bNOS (脑性 NOS), cNOS (组成性或钙调节性 NOS); ecNOS (内皮细胞性 NOS); iNOS 或 macNOS (细胞因子诱导性 NOS). 但某种 NOS 的表达并不局限于一种细胞^[2,3]. 根据 NOS 活性基本调控条件主要分为: 组成性 NOS (cNOS) (受 Ca²⁺

调节, 又称原生型、组成型 NOS) 和诱导性 NOS (iNOS)^[4]. 根据 NOS 存在方式有胞浆型 (可溶性) 和颗粒型 NOS. 90 年代以来, 根据首次被提纯顺序以及克隆结果将 NOS 同工酶分为三种: 同工酶 I (NOS I, 在神经元和上皮细胞中), 同工酶 II (NOS II, 在细胞因子诱导的巨噬细胞中), 同工酶 III (NOS III, 在内皮细胞中)^[5].

2 NOS 酶学特征

2.1 酶本质

NOS 是一类复杂的酶系, 一些氧化还原辅基与 NOS 紧密结合, 形成各自独立的具有特殊酶活性的结构域. NOS 的 C 端与细胞色素 P-450 还原酶具有显著同源性^[6], 含有类似的还原酶的血红素辅基-铁原卟啉 IX (FePP-IX). 据此推测 NOS 的黄素酶、血红素辅基