

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<sup>[1]</sup>. NO 由 NOS (EC 1.14.13.39) 以 L-精氨酸、O<sub>2</sub>、NADPH 为底物, FAD、FMN、血红素、四氢叶酸 (BH<sub>4</sub>) 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<sup>[2,3]</sup>. 根据 NOS 活性基本调控条件主要分为: 组成性 NOS (cNOS) (受 Ca<sup>2+</sup>

调节, 又称原生型、组成型 NOS) 和诱导性 NOS (iNOS)<sup>[4]</sup>. 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)<sup>[5]</sup>.

### 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<sup>[6]</sup>, 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

直接参与 L-精氨酸电子氧化中 5 个电子的传递. 和脂肪酸单氧化酶 P-450<sub>BM3</sub> 一样, 在 NOS 同一条多肽链上包含了具有氧化酶和还原酶催化活性的不同结构域, NOS 很可能是真核生物系统中唯一的自给自足的 P-450 酶.

分离提纯的 NOS I、II, 大多数是胞浆型, NOS III 颗粒型 > 90%. 在 SDS-PAGE 上, 三种同工酶的分子质量分别为 150~160 ku、125~135 ku、135 ku; cDNA 克隆预测 NOS 分子质量为 NOS I (大鼠、人脑) 160 ku、161 ku, NOS II (鼠类、人巨噬细胞) 130 ku、131 ku, NOS III (牛、人内皮细胞) 131 ku<sup>[5]</sup>.

## 2.2 NOS 结构特征

### 2.2.1 一级结构: 生物化学和基因序列研究

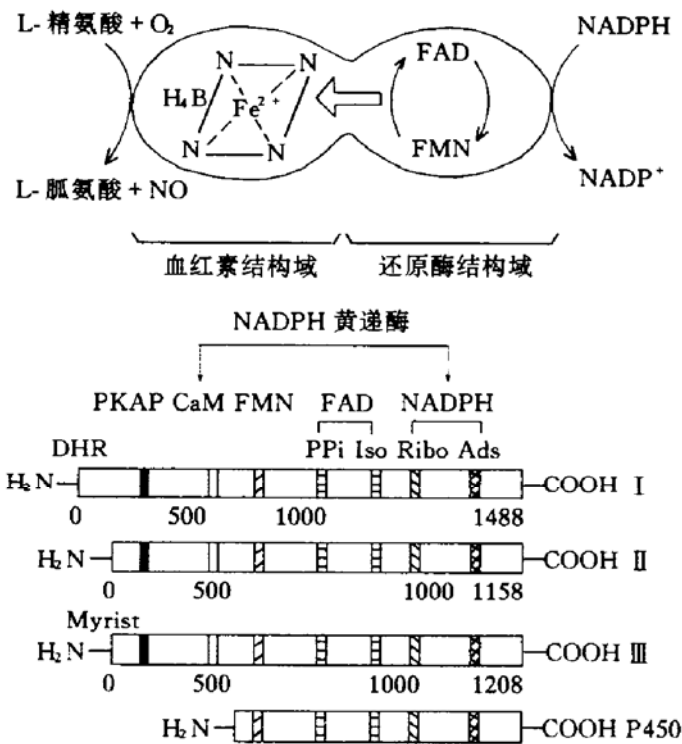


图 1 人类 NOS 同工酶一级结构

表明三种同工酶属于一个关系极为密切的蛋白质家族, 但又是不同的基因产物. 种属间 NOS 氨基酸序列具有高度保守性. 如人类各同工酶之间序列同源性为 50%~60%, 而不同种属动物间相同的同工酶序列同源性 > 90%, 与依赖 NADPH 细胞色素 P-450 还原酶比较 (图 1), NOS 的 C 端同 P-450 还原酶均含有 NADPH、FAD、FMN 以及 CaM 和磷酸化的共同序列.

三种同工酶的 N 端结构极其相似, 可能与其 L-精氨酸结合位点和催化活性有关. 不同的是, NOS I 的 N 端含有一个 DHR 结构域, DHR 与细胞内信号转导有关. 而 NOS III 的 N 端含有一个十四烷基化共同序列, 这一结构与其颗粒型酶存在方式及其在细胞膜上的锚定作用有关<sup>[5]</sup>.

2.2.2 二聚体: NOS I、III 通常转录成无活性的单体, 在结合 BH<sub>4</sub>、血红素之后, N 端氧化酶结构域发生构型改变, 形成二聚体, 但只有在 Ca<sup>2+</sup> 水平升高激活了 CaM 并与二聚体结合以后, 才具有活性<sup>[7]</sup>. 而诱导转录的 NOS II 单体, 在静息细胞中极低的 Ca<sup>2+</sup> 水平下, 即能与 CaM 结合, 发生单体构型改变形成 CaM 结合性单体, 但这种单体仅在结合了 L-精氨酸、血红素、BH<sub>4</sub> 形成二聚体时才具有活性. 通常情况下 NOS II 单体或未结合 CaM 的二聚体很少在胞浆中积存.

### 2.3 NOS 活性

2.3.1 NOS 反应活性多样性见表 1<sup>[5]</sup>. 虽然 NOS 催化 NO 合成机制不十分清楚, 目前认为它包括两个单氧化过程. 首先, 一分子氧和

表 1 NOS 催化反应的多样性

活性	反 应
1a L-Arg N <sup>ω</sup> 羟化酶	$L-Arg + NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow NHA + NADP^+ + H_2O$
1b N <sup>ω</sup> HA 单氧化酶	$NHA + 1/2 (NADPH + H^+) + O_2 \rightarrow L-Cit + NO + H_2O$
2 NADPH 黄递酶	$NBT + NADPH + H^+ \rightarrow \text{还原性 NBT} + NADP^+$
3 细胞色素 c 还原酶	$\text{细胞色素 c} + NADPH + H^+ \rightarrow \text{还原性细胞色素 c} + NADP^+$
4 NADPH 氧化酶	$NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow H_2O_2 + NADP^+$
	$1/2 NADPH + O_2 \rightarrow O_2^- + 1/2 (NADP^+ + H^+)$
5 BH <sub>2</sub> 还原酶	$BH_2 + NADPH + H^+ \rightarrow BH_4 + NADP^+$

注: L-Arg: L-精氨酸; L-Cit: L-瓜氨酸; NHA: N<sup>ω</sup> 羟基精氨酸; NBT: 氮蓝四唑.

一分子 NADPH 和  $BH_4$  反应生成中间产物  $N^{\omega}$  羟基精氨酸 (NHA), 然后在黄素辅酶参与下 NHA 继续氧化生成 L-胍氨酸和 NO. NHA 的 3 个电子氧化通过三种途径实现 (图 2)<sup>[8]</sup>. 在许多组织中 NOS 活性有其组织特异性, 某一种组织以表达一种类型的同工酶为主, 如神经元主要表达 NOS I, 内皮细胞相对特异地表达 NOS III 等.

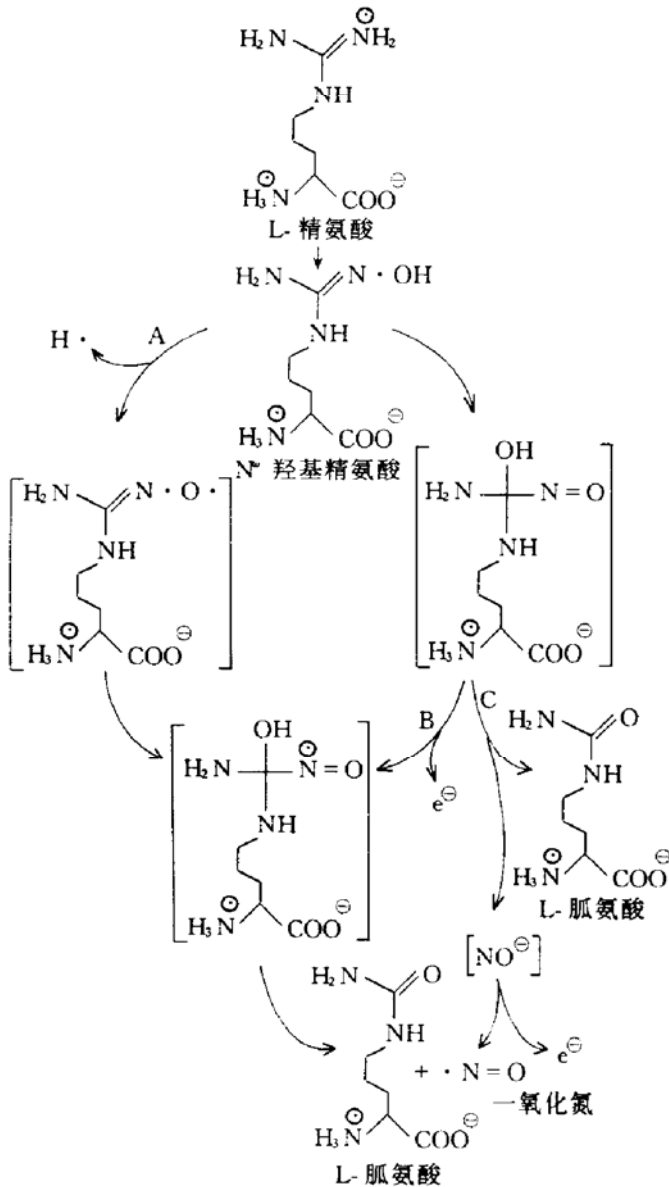


图 2 NOS 反应, 显示  $N^{\omega}$  羟基精氨酸三个电子氧化的三种途径

2.3.2 NOS 活性多层次、多位点调控:

a. 转录水平: 目前报道只有 NOS II 是通过诱导转录, 而且, 只有干扰素  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和脂多糖 (LPS) 为转录诱导物<sup>[4]</sup>. 在 NOS II

基因结构中有 LPS 调控区和 IFN- $\gamma$  介导的 LPS 诱导增强区. LPS 的诱导作用还有赖于 NF- $\kappa$ B 异源二聚体 (P50/c-rel 和 p50/RelA); IFN- $\gamma$  要在 IRF-1 辅助下发挥其诱导作用<sup>[9]</sup>. 其他许多诱导因子均为协同 IFN- $\gamma$ 、LPS 诱导功能, 在不同水平、不同细胞中诱导产生 NOS II. 有证据表明 NOS II 的表达与炎性、免疫性因素无关. 某些组织中“诱导性” NOS 可有组成性表达, 提示诱导性 NOS 参与机体自身稳定功能<sup>[10]</sup>. 组成性 NOS 也可能存在转录性调控, 如应切力、张力、低氧及细胞因子均对其活性产生影响<sup>[11]</sup>.

b. 翻译水平: mRNA 稳定性是 NOS 活性的重要调节点. IFN- $\gamma$  可以增强 NOS II 的 mRNA 稳定性, TGF- $\beta$  则降低 NOS II 的 mRNA 稳定性, 减少 mRNA 翻译. TNF- $\alpha$  能降低 NOS III 的 mRNA 稳定性. 有 5% NOS I 在剪切中因缺乏编码 CaM 结构域的外显子, 拼接后失去转化 L-精氨酸的活性, 但 NADPH 黄递酶活性保留. 其他很多调控因子都影响到 NOS 的 mRNA 水平<sup>[12]</sup>.

c. 翻译后水平: NOS 磷酸化是快速调节酶活性的一种方式. 三种同工酶均可被蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC)、 $Ca^{2+}$  / CaM 依赖性蛋白激酶 (CaMK) 磷酸化, 而磷酸化主要是在 NOS 的一个不同的色氨酸, 实验发现 PKC 磷酸化后 NOS 活性中度升高, CaMK 的磷酸化使 NOS 活性显著下降. 转染细胞经过佛波酯处理以后, 其 NOS 再磷酸化时酶活性显著下降, 因为佛波酯抑制了乙酰胆碱和内皮源性松弛因子 (EDRF) 释放. 磷酸化效应对 NOS 活性的影响可能是间接的.

NOS III 是唯一的能被十四烷基化的酶, 其 N 端甘氨酸定点突变后, 则由颗粒型转化为胞浆型, 证明 N 端十四烷基化是 NOS III 颗粒活性所必需的. 实际上十四烷基化蛋白质的膜结合性依赖于其分子上一些额外的区域, 如多碱(元)性结构域<sup>[13]</sup>.

NOS I、III 是  $Ca^{2+}$  / CaM 依赖性酶,  $Ca^{2+}$  / CaM 水平严格控制其活性. 生理条件

下, 由  $\text{Ca}^{2+}$  激动剂触发的酶活性持续时间短暂 (数秒钟). NOS II 是  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖性酶, 其活性持续时间长 (可达数天). 也有报道同工酶 II 受  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 调节, 只是, 它与 CaM 形成高亲合性复合物, 对  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性不十分明显<sup>[4]</sup>.

NO 能反馈抑制 NOS 的活性<sup>[14,15]</sup>, 但不十分清楚有关的 NO 反应点, 如 NOS 的血红素辅基、巯基 (-SH)、或 NOS 侧链中的某个氨基酸.

有人认为  $\text{BH}_4$  与 NOS 稳定性有关<sup>[16]</sup>, TGF- $\beta$  能加速小鼠巨噬细胞 NOS II 的降解. 在 L-精氨酸缺乏、NADPH 充足情况下, NOS 催化合成过氧化物, 而不产生 NO. 人的血浆、尿中存在 L-精氨酸类似物, 能抑制 NOS 的合成<sup>[17]</sup>.

### 3 NOS 分子生物学

#### 3.1 NOS 基因的染色体定位

利用特异性 DNA 探针已经证明 NOS I、II、III 基因分别位于 12 号 (12q24.2 ~ 24.3)<sup>[14,15]</sup>、17 号 (17p11 ~ 17q11)<sup>[13]</sup>、7 号 (7q35 ~ 36)<sup>[15]</sup> 染色体.

#### 3.2 NOS 的基因结构

根据克隆及 cDNA 结果推测, NOS I 的 mRNA 长度 > 10 kb, 而其编码基因 > 100 kb, 但其基因的详细结构尚不清楚.

人的 NOS III 基因全长 21 kb, 由 26 个外显子组成, 在 5' 端上游的启动子不含 TATA 盒, 但在转录起始点上游 100 bp 处, G + C 含量丰富, 占 70%, 其中有 2 个 SP1 结合序列. 紧邻 SP1 上游还发现启动子区有 GATA 结合序列, GATA 结合蛋白与细胞特异性转录因子有关. 此外, 5' 端上游调节区还有 AP1、AP2、NF-1 等与细胞因子诱导有关的许多 *cis*-调节序列, 尤其是应切力反应元件 (SSRE) 和雌激素反应元件 (ERE) 重复序列与血流的应切力上调血管内皮细胞表达 NOS 基因和增加血流有关, 但是 NOS III 的 5' 端上游调节区功能尚不十分清楚.

人的 NOS II 基因全长 37 kb, 也是由 26 个外显子组成. 人和鼠的 NOS II 在 5' 端非常相似, 在转录起始点上游的启动子均含有 TATA 盒, 在 5' 端上游还存在有 NF- $\kappa$ B 位点、干扰素  $\gamma$  反应元件 ( $\gamma$ -IRE)、TNF 反应元件 (TNF-RE)、NF-IL6 等与细胞因子/LPS 诱导表达有关的 *cis*-调节序列, 但它们在基因上的位置有所不同. 对巨噬细胞基因启动子调节区功能分析表明, 在转录起始点上游 -85 ~ -76 区的 NF- $\kappa$ B 结合序列与 LPS 诱导有关, 而且 IFN- $\gamma$  能促进 LPS 的诱导作用. 在 -913 ~ -923 区结合了 IRF-1, 敲除小鼠在体试验<sup>[8]</sup>也证明 IRF-1 与 NOS II 表达有关. 人类 NOS II 基因的功能仍然是值得研究的重要课题.

#### 3.3 NOS 分子遗传学

有人正在研究一种毁坏 NOS 基因小鼠——敲除鼠 (knock-out), 但只在 NOS I 方面取得一些进展<sup>[18]</sup>, 如这种小鼠发生肥大性幽门狭窄, 一种人类肠道 NOS I 缺陷的类似症状. 仅毁坏 NOS I “外显子 1”, 酶的转录即模糊不清. 另外观察到人类胎儿发育期 NOS I 是由外显子 1、2 选择性转录的, 认为敲除鼠 NOS I 在胎鼠可能已经表达. 但胎儿期 NOS I 表达的功能还不清楚.

## 4 展 望

NO 的生物学效应已经日益引起人们的关注<sup>[19,20]</sup>. 大量研究表明, NO 参与了血管张力维持、血细胞活性和神经传递的调节, 内源性 NO 机能障碍将直接导致某些病理过程的发生. 虽然对 NO 研究已取得突破性进展, 但尚有许多未知领域值得研究. 相信对 NO/NOS 研究的深入, 必将加深人们对 NO/NOS 作用机理的认识, 从而阐明 NO 与许多生理、病理的关系, 为许多临床重危和疑难病症的治疗提供某些新的思路.

### 参 考 文 献

- 1 孙长凯, 黄远桂, 李广德等. 解放军医学杂志, 1995; 20: 390
- 2 Dinerman J L, Dawson T M, Schell M J *et al.* Proc Natl

- Acad Sci USA, 1994; **91**: 4214
- 3 Oswald I P, Eltoun I, Wynn T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 999
  - 4 Nathan C, Xie Q W. J Biol Chem, 1994; **269**: 13725
  - 5 Knowles R G, Moncada S. Biochemistry, 1994; **298**: 249
  - 6 Marletta M A. Cell, 1994; **78**: 927
  - 7 Abu-Soud H M, Stuehr D J. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 10769
  - 8 Stuehr D J, Griffith O W. In: Meister A ed. Advances in enzymology. New York: Wiley Press, 1992: 287
  - 9 Kamijo R, Harada H, Matsuyama T *et al.* J Exp Med, 1994; **180**: 977
  - 10 Lowenstein C J, Alley E W, Raval P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90**: 9730
  - 11 Youichi N, Nobuhiro I, Shoji T. Biochem Biophys Res Commun, 1994; **200**: 802
  - 12 Weiner C P, Lizasoain I, Baglis S A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **97**: 5212
  - 13 Chartrair N A, Geller D A, Koty P P *et al.* J Biol Chem, 1994; **269**: 6765
  - 14 Marsden P A, Heng H H Q, Scherer S W *et al.* J Biol Chem, 1993; **268**: 17478
  - 15 Miyahara K, Kawamoto T, Sase K *et al.* Eur J Biochem, 1994; **223**: 719
  - 16 Marletta M A. J Biol Chem, 1993; **268**: 12231
  - 17 Rush M D. Cell, 1994; **76**: 411
  - 18 Huang P L, Dawson T M, Bredt D S *et al.* Cell, 1993; **75**: 1273
  - 19 Bredt D S, Snyder S H. Annu Rev Biochem, 1994; **63**: 175
  - 20 Anggard E. The Lancet, 1994; **343**: 1199

**Nitric Oxide Synthase: Biochemistry and Molecular Biology.** Chen Jinwen, Sun Changkai, Huang Yuanguai (*Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xian 710032, China*).

**Abstract** Nitric oxide synthase (NOS) is an important part of nitric oxide (NO) research in the fields of biology and medicine. In recent years, there is a rapid development in the researches of the nature and molecular characteristics of NOS, ever in some aspects of molecular genetics of NOS. Researches showed that to intervene in some processes of NOS-NO pathway, such as activation of the enzyme, synthesis, release and transportation of NO, and even genes related to encoding and expressing enzyme will provide new clues and methods for managing some clinic problems.

**Key words** nitric oxide synthase (NOS), nitric oxide (NO), biochemistry, molecular biology

## 反义 RNA 技术在植物基因工程领域中的应用

周跃钢

(西南农业大学生物化学教研组, 重庆 630716)

**摘要** 反义 RNA 技术在植物基因工程领域中的应用包括: a. 番茄和其他水果的成熟控制; b. 植物的抗病性; c. 改变花卉的颜色; d. 植物淀粉合成的控制; e. 油料植物种子中脂肪酸合成的控制; f. 杂交种子生产中雄性不育性的控制; g. 其他.

**关键词** 反义 RNA, 反义基因, 成熟, 植物病毒, 花色, 淀粉合成, 脂肪酸合成, 不育性

反义 RNA 是指与靶 RNA (多为 mRNA) 具有互补序列的 RNA 分子, 它通过与靶 RNA 进行碱基配对结合的方式参与基因表达的调控. 通常把转录产生反义 RNA 的基因称为反义基因或反义 DNA, 因其与转录产生靶 RNA 的目的基因是反义的<sup>[1]</sup>.

参与基因表达调控的反义 RNA 最初是在

原核生物中发现的, 随后又陆续在原核生物中发现了许多种不同的天然存在的反义 RNA, 如在质粒的复制, Tn10 的转座, 噬菌体的繁殖等许多过程中都发现了反义 RNA 调控系统的存在. 显然, 在原核生物中存在有反义

收稿日期: 1995-07-21, 修回日期: 1996-01-10