

217

- 10 Higuchi M, Aggarwal B. FEBS Lett, 1993; **331**: 252  
 11 Roy C, Brown D L, Little J E *et al.* Exp Cell Res, 1992; **200**: 417  
 12 Ansari B, Coates P J, Greenstein B D *et al.* J Pathol, 1993; **170**: 1  
 13 Jacobson M D, Fburne J, Raff M C. EMBO J, 1994; **13**: 1899  
 14 Osmak M, Eljuga D. Res Exp Med, 1993; **193**: 389  
 15 Fesus L, Thomazy V, Falus A. FEBS Lett, 1987; **224**: 104  
 16 Fesus L, Thomazy V, Autuori F *et al.* FEBS Lett, 1989; **245**: 150

### Methods for Detecting Programmed Cell Death.

Li Deling, Wang Huixin, Zhou Tingchong

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China).

**Abstract** Programmed cell death (PCD) is different from ordinary death, necrosis. It is very important to determine which kind of death is PCD. The PCD detecting methods were reviewed in the following aspects: cell morphologic features, membrane integrity, DNA and other biochemical changes.

**Key words** programmed cell death, apoptotic body, succinate dehydrogenase, transglutaminase

# 一种新的平滑肌调控蛋白 Calponin

唐大椿 向继洲<sup>1)</sup> 鲁文彤

(同济医科大学医学分子生物学研究室, 武汉 430030)

**摘要** Calponin 为一种平滑肌特有的调控蛋白, 分子克隆的证据表明, 它具有两种亚型,  $\alpha$ 型和 $\beta$ 型分别由 292 和 252 个氨基酸组成。它能与肌动蛋白结合, 抑制肌球蛋白 ATP 酶活性和平滑肌收缩。其与肌动蛋白结合域有 38 个氨基酸残基 (第 145~182 位), 丝氨酸 175 在调宁蛋白与肌动蛋白的相互作用中起重要作用, 它还能与钙调蛋白结合, 呈钙依赖性, 其结构域在第 52~144 位残基。调宁蛋白的机能受磷酸化与脱磷酸化的调节。

**关键词** 调宁蛋白, 收缩蛋白, 平滑肌

平滑肌收缩的细胞内信号传导包括肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 和蛋白激酶 (protein kinase C, PKC) 两条途径。MLCK 使肌球蛋白轻链上丝氨酸 19 磷酸化, PKC 使调宁蛋白 (calponin) 和 caldesmon 磷酸化, 导致肌球蛋白 ATP 酶 (简称 ATP 酶) 活性增加, 平滑肌收缩, 反之, 当肌球蛋白轻链、调宁蛋白和 caldesmon 脱磷酸化, ATP 酶活性下降, 肌肉松弛<sup>[1,2]</sup>。由此可见, 调宁蛋白参与平滑肌收缩的调控, 现就调宁蛋白的生化性质、机能特性及结构与功能的关系等问题, 作一简要综述。

## 1 调宁蛋白的生化性质

### 1.1 分布

一般认为, 调宁蛋白几乎存在于所有哺乳动物和人的各种平滑肌组织内。Takahashi 等<sup>[3]</sup>首先从鸡沙囊平滑肌组织提纯调宁蛋白, 以后, 人们从血管、胃、子宫、输尿管、膀胱和输精管等平滑肌组织内纯化出调宁蛋白, 它在平滑肌组织内的含量与原肌球蛋白 tropomyosin 相似, 是肌动蛋白 actin 含量的 1/7<sup>[4-7]</sup>。

<sup>1)</sup>同济医科大学药理学教研室。

收稿日期: 1995-10-05, 修回日期: 1995-12-04

调宁蛋白具有很强的组织特异性, 为平滑肌组织所特有, 一般很难在骨骼肌、心肌和其他组织内发现. Gimona 等<sup>[8]</sup>从鸡骨骼肌、肾、肝和脾等组织提取总蛋白, 用抗调宁蛋白的抗体做蛋白质印迹 (Western blotting) 未发现调宁蛋白. 其他研究小组亦有相似结果. 此外, 已知调宁蛋白的 mRNA 为 1.3 kb, RNA 杂交法 (Northern hybridization) 证明心肌、骨骼肌和其他非肌性组织不含调宁蛋白的 mRNA<sup>[9]</sup>.

### 1.2 分子质量

调宁蛋白的分子质量一般在 33~35 ku, 随组织和种属的不同而发生轻度变化. 目前, 大多数实验室主要从鸡沙囊纯化调宁蛋白, 其分子质量为 34 ku, 以单体形式存在, 等电点为 9.91<sup>[4,10]</sup>. 此外, 还发现调宁蛋白的一种亚型, 分子质量为 29 ku, 主要存在于人子宫

肌、输尿管、膀胱和输精管内<sup>[7]</sup>. 分子量大小的确定有利于调宁蛋白的纯化与鉴定. 有趣的是, 29 ku 调宁蛋白在平滑肌瘤组织内消失, 这可能为肿瘤的诊断提供理论与实验基础<sup>[10]</sup>.

### 1.3 表达特性

在鸡胚的第 12~19 d, 调宁蛋白的表达水平较高且稳定. 如把胚胎期鸡沙囊平滑肌细胞进行人工培养, 该细胞内调宁蛋白的含量在 48 h 内显著下降<sup>[8]</sup>. 另外, 在培养的血管平滑肌细胞内, 调宁蛋白的含量也下降到原来的 1/5~1/9, 因此有人认为, 通过测定平滑肌细胞内调宁蛋白的含量, 能判断其分化程度<sup>[11]</sup>.

### 1.4 氨基酸序列

有人已克隆出调宁蛋白的 cDNA<sup>[9]</sup>, 长 879 bp, 并根据 cDNA 推断出调宁蛋白的全部氨基酸残基序列 (图 1).

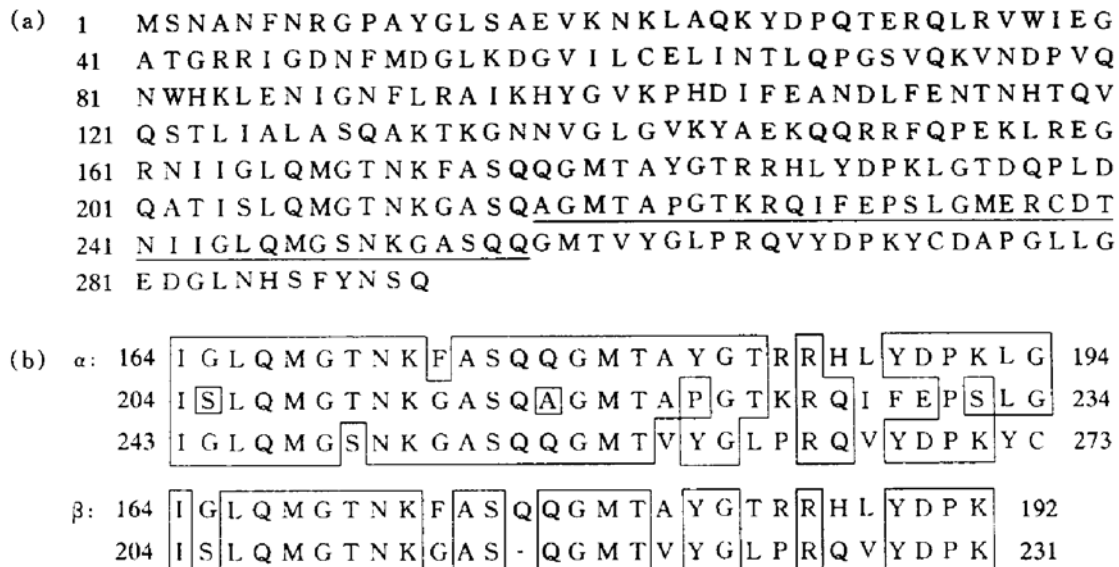


图 1 调宁蛋白的氨基酸残基序列与重复区域

(a) 调宁蛋白的全部序列, 下划线处为 β 型缺乏的残基; (b) α, β 型的重复区域.

α 型调宁蛋白具有 292 个残基, 理论分子质量为 32 333 u, 一般认为, 它与早先纯化的 34 ku 调宁蛋白基本一致. β 型调宁蛋白具有 252 个残基, 理论分子质量为 28 127 u, 与 29 ku 调宁蛋白相似, α 型和 β 型的等电点分别为 9.91 和 9.95. 有人推测, α 型和 β 型均来自同一基因, 因剪切编排不同造成两种亚

型<sup>[10]</sup>.

α 型调宁蛋白的羧基端有三个重复区域, 每区域长 29~31 个残基, β 型仅有两个重复区域. α 型二级结构包括: 13% α 螺旋, 22% β 折叠和 26% β 转角. 对其空间结构的研究, 有助于深刻阐明调宁蛋白结构与功能之间的关系<sup>[10,11]</sup>.

近来,有人从大鼠主动脉血管平滑肌克隆出酸性调宁蛋白的 cDNA,长 993 bp, 编码 330 个残基,其中,前 273 个残基与普通调宁蛋白相似,后 57 个残基多为酸性,等电点为 5.2,理论分子质量为 36 377 u<sup>[12]</sup>. 目前,对酸性调宁蛋白的研究尚处于起步阶段.

### 1.5 蛋白结合特性

调宁蛋白具有与其他肌肉相关蛋白质相结合的特性,如能与肌动蛋白、原肌球蛋白和钙调蛋白(calmodulin)等结合.与肌动蛋白的结合,直接影响调宁蛋白的机能.

调宁蛋白能与 F 肌动蛋白纤维结合.有人用沉淀法证明两者结合在一起,解离常数  $K_d$  为  $4.6 \times 10^{-8}$  mol,亲和力较高,且不受原肌球蛋白的影响,调宁蛋白与肌动蛋白比值为 1:3<sup>[13]</sup>,还有人用免疫细胞化学法和免疫荧光法证明调宁蛋白与肌动蛋白在细胞内的定位相同<sup>[11]</sup>.肌动蛋白的羧基端为两者结合的重要结构域<sup>[14]</sup>.

调宁蛋白还能与原肌球蛋白结合,电镜研究结果提示,调宁蛋白有规律地与原肌球蛋白结合,原肌球蛋白羧基端约 17 nm 处为调宁蛋白结合位点.调宁蛋白与钙调蛋白的结合呈钙依赖性, $K_d$  值为  $10^{-7}$  mol,利用这一特性,可用钙调蛋白亲和层析柱来纯化调宁蛋白.目前,调宁蛋白与上述两种蛋白相结合的生理意义还不完全清楚,有资料表明,钙调蛋白与调宁蛋白结合后,可恢复后者对 ATP 酶的抑制<sup>[14]</sup>.

近年来,有人发现 S100(一种钙结合蛋白)也能够与调宁蛋白结合,呈钙依赖性, $K_d$  值为  $7 \times 10^{-7}$  mol,结合比值为 1:1,这种结合可能参与 ATP 酶活性的调节<sup>[15]</sup>

## 2 调宁蛋白的作用及其分子机理

### 2.1 抑制平滑肌机能

ATP 酶活性是平滑肌收缩的生化指标,它由 3 个步骤构成: a. 肌球蛋白轻链磷酸化, b. 肌动蛋白与肌球蛋白结合, c. ATP 酶活性增加,该酶活性的增加启动肌丝滑行,平滑肌

收缩,调宁蛋白则能抑制 ATP 酶活性.

Winder 等<sup>[16]</sup>首先在离体收缩系统内发现调宁蛋白能抑制 ATP 酶,他们用 MLCK 使肌球蛋白磷酸化,然后再加入肌动蛋白,ATP 酶活性明显上升,如在反应系统内事先加入调宁蛋白,则该酶活性明显受到抑制,呈剂量依赖性,如用免疫沉淀法去掉调宁蛋白,则 ATP 酶活性恢复至原状,若增加肌动蛋白的含量,ATP 酶活性也能部分恢复.这些结果提示,调宁蛋白与肌动蛋白结合后,阻碍肌动蛋白与肌球蛋白的相互作用,从而抑制 ATP 酶活性<sup>[10,16]</sup>.以后的研究表明,调宁蛋白不仅能抑制 ATP 酶活性,而且能抑制肌丝滑行,影响平滑肌的机能,已有人在肌丝滑行实验模型内观察到,调宁蛋白减少 F 肌动蛋白的运动速率,他们将肌球蛋白固定在一种稳定膜上,然后加入荧光标记的 F 肌动蛋白和 ATP,可见 F 肌动蛋白纤维在肌球蛋白上滑行,如加入调宁蛋白后, F 肌动蛋白纤维运动速率从  $2.0 \mu\text{m/s}$  减少至  $0.7 \mu\text{m/s}$ <sup>[17,18]</sup>.

### 2.2 调控机理

由上述可知,调宁蛋白抑制 ATP 酶活性,可能是使平滑肌处于舒张状态的一种机制,很显然,当平滑肌接受外界刺激而收缩时,必然存在着解除这种抑制的机制.人们经过一系列实验证明<sup>[10,11]</sup>: a. PKC 和钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (Ca/camodulin-dependent protein kinase II, CamK II) 能使调宁蛋白磷酸化,主要磷酸化位点为丝氨酸 175 和苏氨酸 184; b. 磷酸化调宁蛋白失去抑制 ATP 酶活性的能力; c. 2A 型平滑肌磷酸酶和 1 型平滑肌肌球蛋白磷酸酶等能引致调宁蛋白的脱磷酸化; d. 脱磷酸化调宁蛋白能恢复抑制 ATP 酶活性的能力.这些结果提示,当平滑肌接受外界刺激,可通过  $\text{Ca}^{2+}$  和磷脂激活 CamK II 和 PKC,导致调宁蛋白的磷酸化,不再抑制 ATP 酶活性,有利于肌肉收缩,随后,当  $\text{Ca}^{2+}$  和磷脂等浓度下降至正常时,上述磷酸酶活性增加,调宁蛋白脱磷酸化,恢复抑制 ATP 酶,平滑肌舒张.

### 3 调宁蛋白结构与功能的关系

#### 3.1 肌动蛋白结合域

调宁蛋白与肌动蛋白的结合, 是调宁蛋白抑制 ATP 酶活性的重要前提, 阐明其肌动蛋白结合域 (actin-binding domain), 有助于深入了解调宁蛋白的分子调节机制. 有人报道, 该结合域位于调宁蛋白的第 145~182 位氨基酸残基, 共有 38 个残基. 用  $\alpha$  糜蛋白酶处理从鸡沙囊提纯的调宁蛋白, 然后分析各产物的氨基酸序列, 可获得三个多肽: a. N 端 13 ku 多肽, 包含第 7~144 位残基, b. N 端 22 ku 多肽, 包括第 7~182 位残基, c. C 端 13 ku 多肽, 带有 183~292 位残基. N 端 22 ku 多肽能与 F 肌动蛋白纤维结合, 且抑制 ATP 酶活性, 而其他两种多肽均不能够与肌动蛋白结合, 这说明, 调宁蛋白的肌动蛋白结合域在第 145~182 位. 此外, 也有证据表明, 肌动蛋白的羧基端 (第 326~355 位) 是与调宁蛋白的结合部位<sup>[10, 11, 19]</sup>.

#### 3.2 钙调蛋白结合域

用部分蛋白酶解法处理调宁蛋白, 然后进行分析得知, 调宁蛋白的钙调蛋白结合域在第 52~144 位, 钙调素与调宁蛋白结合后, 可能会翻转调宁蛋白对 ATP 酶的抑制. 另外, 原肌球蛋白结合域也能与钙调蛋白结合域相似<sup>[10, 19]</sup>.

#### 3.3 丝氨酸 175 的作用

调宁蛋白的第 175 位丝氨酸, 其主要作用归纳如下: a. 丝氨酸 175 为调宁蛋白的主要磷酸化位点, 其磷酸化状态直接影响调宁蛋白的机能. 用磷酸化多肽二维酶谱和 Edmon 法等证明, 它是 PKC 和 CamK II 的主要磷酸化位点, 我们用基因定点诱变法<sup>[20]</sup>, 也证实这一结论, 丙氨酸不能够接受磷酸化反应中的磷酸基团, 如用丙氨酸代替第 175 位上的丝氨酸, 即获诱变物 S175A, 其磷酸化程度明显减少. b. 丝氨酸 175 上的羟基直接影响调宁蛋白与肌动蛋白的结合以及对 ATP 酶活性的抑制. 我们主要用基因定点诱变法发现这一现

象<sup>[20]</sup>, 丙氨酸和天门冬氨酸上没有羟基, 而丝氨酸和苏氨酸上有羟基, 如在第 175 位上以丙氨酸和天门冬氨酸代替丝氨酸, 则调宁蛋白与肌动蛋白的结合能力显著下降, 也失去抑制 ATP 酶活性的能力, 如果用苏氨酸代替第 175 位上的丝氨酸, 调宁蛋白仍然能够与肌动蛋白结合, 保留抑制 ATP 酶活性的能力. 这种蛋白质分子上的一个羟基能影响蛋白质分子间的结合, 并影响蛋白质的功能, 已引起不少学者的兴趣, 其分子机理正在研究之中.

由此可见, 调宁蛋白是一种新的平滑肌调控蛋白, 研究其生化特征及生化分子机理, 能为防止平滑肌相关疾病如高血压、气道高反应性及痛经等, 提供理论与实验基础.

### 参 考 文 献

- 1 Stull J T, Herring B P, Gallagher P J *et al.* Hypertention, 1991; 17: 723
- 2 Tang D C, Stull J T, Kubota Y *et al.* J Biol Chem, 1992; 267: 11839
- 3 Takahashi K, Hiwada K, Kokubu T. Biochem Biophys Res Common, 1986; 141: 20
- 4 Abe M, Takahashi K, Hiwada K. J Biochem (Tokyo), 1990; 107: 507
- 5 Marston S B. FEBS Lett, 1991; 292: 179
- 6 Vancompernelle K, Gimona M, Herzog M *et al.* FEBS Lett, 1990; 274: 146
- 7 Draeger A, Ginoma M, Stuckert A *et al.* FEBS Lett, 1991; 291: 24
- 8 Gimona M, Herzog M, Vandkerchove J *et al.* FEBS Lett, 1990; 274: 159
- 9 Takahashi K, Nadal-Ginard B. J Biol Chem, 1991; 266: 13284
- 10 Winder S J, Walsh M P. Curr Topics Cell Reg, 1993; 34: 155
- 11 Winder S J, Walsh M P. Cell Signal, 1993; 5: 677
- 12 Applegate E, Feng W, Green R S *et al.* J Biol Chem, 1994; 269: 10683
- 13 Winder S J, Sutherland C, Walsh M P. Regulation of smooth muscle contraction. New York: Plenum Press, 1991; 37~51
- 14 Kolakowski J, Makuch R, Stepkowshi D *et al.* Biochem J, 1995; 306: 199
- 15 Fuji T, Oomatsuzawa A, Kuzumaki N *et al.* J Biochem

- (Tokyo), 1994; **116**: 121
- 16 Winder S J, Walsh M P. *J Biol Chem*, 1990; **265**: 10148
- 17 Abe M, Takahashi K, Hiwada K. *J Biochem (Tokyo)*, 1990; **108**: 835
- 18 Winder S J, Allen B G, Fraser E D *et al.* *Biochem J*, 1993; **296**: 827
- 19 Mezgueldi M, Fattoumt A, Derancourt J *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 15943
- 20 Tang D T, Kang H M, Jin J P *et al.* *Biophys J*, 1995; **68**: A163

**Calponin: A New Regulatory Protein for Smooth Muscle Contraction.** Tang Dachun, Xiang Jizhou<sup>1)</sup>, Lu Wentong (*Department of Medical Molecular Biology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China; <sup>1)</sup>Department of Pharmacology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*).

**Abstract** Calponin is a smooth muscle-specific

regulatory protein. The evidences of molecular cloning revealed the existence of 2 isoforms:  $\alpha$  and  $\beta$ , composed of 292 and 252 residues respectively. Calponin binds to actin and inhibits actomyosin  $Mg^{2+}$ -ATPase activity, thereby smooth muscle contraction. The actin-binding domain of calponin lies in 38 residues (145~182). Ser175 plays a critical role in the interaction of calponin with actin and the inhibition of the ATPase. It also binds to calmodulin in a  $Ca^{2+}$ -dependent manner. The calmodulin-binding domain is between residue 52 and 144. Both binding and inhibition of the ATPase can be regulated by phosphorylation and dephosphorylation of calponin.

**Key words** calponin, contractile protein, smooth muscle

## 胆碱酯酶结构与功能及磷酰化酶重活化机理

罗春元

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要** 对近几年来应用计算机模拟和分子生物学定点突变技术研究乙酰胆碱酯酶的结构与功能关系的进展进行了综述, 对不同抑制剂的抑制作用机理及重活化药物对不可逆抑制剂有机磷酸酯磷酰化酶的重活化作用机理研究进展也进行了综述。

**关键词** 乙酰胆碱酯酶, 有机磷, 磷酰化酶, 重活化机理

胆碱酯酶依其底物特异性分为乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和丁酰胆碱酯酶 (BChE) 两种, 前者是维持体内胆碱能神经冲动中非常重要的递质水解酶, 能高效地水解神经递质乙酰胆碱 (ACh) 从而维持神经冲动的正常进行; 后者的功能则至今仍不十分清楚。多种来源的 AChE 的一级结构均已由其 cDNA 序列推导出来, 电鳐 AChE (TcAChE) 的晶体 X 射线衍射已经完成, 因此, 近几年来利用计算机模拟与基因工程定点突变技术相结合对酶的结构与

功能的研究有了长足的进展。在此基础上, 对其不可逆抑制剂有机磷酸酯类的抑制作用机理和重活化剂对磷酰化酶的重活化作用机理等方面的研究均得以深化。本文对此作一综述。

### 1 酶的结构与功能的关系研究进展

过去蛋白质化学、酶催化反应动力学及抑制动力学的研究表明, AChE 的催化活力中心