

肽或蛋白质、有毒性的、或细胞内不稳定的多肽和蛋白质以及具有高附加值的药用多肽等方面具有的巨大潜在价值, 将逐渐得到开发应用。此外, 在疫苗制备上, CFCF 系统将因表达产物的专一性和纯净性比体内表达系统具有更大的优越性。因为在临床上应用的疫苗必须保证纯度, 否则, 会引起过敏症。

总之, CFCF 系统为生命科学和生物技术开辟了一个新领域, 预计, 它很有可能成为遗传工程中构建工程菌的替代方法。

参 考 文 献

- 1 Spirin A S, Baranov V I, Ryabova L A *et al.* A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 1988, **242** (4882): 1162~ 1164
- 2 Zubay G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet*, 1973, **7**: 267~ 287
- 3 Baranov V I, Spirin A S. Gene expression in cell-free system in preparative scale. *Methods in Enzymology*, 1993, **217**: 123~ 142
- 4 Ryranov L A, Ortlepp S A, Baranov V I. Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17** (11): 4412~ 4418
- 5 Kolosov L A, Kolosova I M, Alakhov V Y *et al.* Preparative synthesis of bioactive human interleukin-2 in a continuous flow translation system. *Biotechnol Appl Biochem*, 1992, **6** (2): 125~ 133
- 6 Marszal E, Suchova M, Konecny P *et al.* Study of cell-free protein synthesis in aqueous two-phase systems. *J Mol Recog*, 1995, **8** (1): 151~ 156
- 7 Baranov V I, Morozov I Y, Ortlepp S A *et al.* Gene expression in cell-free system in preparative scale. *Gene*, 1989, **84** (2): 463~ 466
- 8 Tulin E E, Tsutsumi K I, Ejiri S I *et al.* Continuous coupled transcription-translation system for the production of rice cytoplasmic aldolase. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **45**

(6): 511~ 516

- 9 Kobatake E I, Kariyama Y, Aizawa M. Translation of immobilizing genetic information by yeast cell-free protein synthesizing system. *Biotechnol Bioeng*, 1991, **37** (6): 723~ 728
- 10 Resto E, Lida A, Van M D *et al.* Amplification of protein expression in a cell-free system. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (22): 5979~ 5983
- 11 Craig D, Howell M T, Gidds C L *et al.* Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a eukaryotic *in vitro* transcription-translation system. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20** (19): 4987~ 4995
- 12 Kigawa T, Yokoyama S. A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J Biochem*, 1991, **110** (2): 166~ 168

Gene Expression and Protein Synthesis in Cell-free Systems. WANG Jing-lin, GAO Pei-ji (*The State key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China*).

Abstract Cell-free translation: the *in vitro* synthesis of protein using cellular extracts has been a routine technique in molecular biology labs for twenty years. But it has seldom studied in our country. The characteristics including types, preparation, basics, functions and progress of cell-free systems are introduced. Its advantages and disadvantages are also discussed. It is beneficial for the application and understanding of the technique by our researchers in applied biochemistry and molecular biology assays.

Key words cell-free system, gene expression, protein synthesis

NHE 基因家族的研究进展

黄桂君 钱桂生

(第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

摘要 Na^+/H^+ 交换泵 (Na^+/H^+ exchanger, NHE) 是存在于所有脊椎动物细胞中的重要跨膜蛋白,

收稿日期: 1997-06-13, 修回日期: 1997-12-08

该蛋白质涉及细胞的多种功能, 包括细胞内 pH 值调节、细胞体积的控制以及离子转运等. 目前已克隆了五个亚型 NHE 的 cDNA, 它们构成了脊椎动物细胞离子转运泵的一个基因家族. 这五个亚型的表达水平及活性可受多种因素的调节. 在肿瘤、高血压及糖尿病等疾病中, 已发现 NHE-1 亚型的表达水平和活性显著增高. 因此, 研究 NHE-1 的转录及活性调节机制, 将可能为这些疾病的诊治提供新的手段.

关键词 Na^+/H^+ 离子交换泵, 基因表达调控, 细胞内 pH 值, 肿瘤, 高血压

学科分类号 Q78

Na^+/H^+ 交换泵 (Na^+/H^+ exchanger, NHE) 存在于所有真核细胞中, 是调节细胞内 pH (pH_i) 的重要跨膜蛋白. NHE 以胞内一个 H^+ , 胞外一个 Na^+ 进行等分子比例的跨膜交换, 从而排出胞内 H^+ , 并导致胞内 Na^+ 升高, 而由 Na^+ , K^+ -ATP 酶维持正常钠梯度, 因此 NHE 需要 Na^+ , K^+ -ATP 酶提供能量维持 Na^+/H^+ 交换. 在人类及脊椎动物细胞中已克隆出五个亚型 NHE 的 cDNA^[1], 分别命名为 NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4 及 β -NHE, 它们构成了一个基因家族. 这五个亚型在基因结构及氨基酸序列上具有较高的同源性. 但在组织细胞分布、功能作用及活性调节等方面存在以下差异: a. NHE-1 几乎在所有组织细胞中均有一定水平的表达, 而其他亚型一般在胃肠道、肾脏及膀胱等上皮细胞中表达. 在极性上皮细胞中, NHE-1 定位在基侧质膜, 其他亚型则定位在顶质膜. NHE-1 所起到的作用不同于其他亚型, 即 NHE-1 属于管家基因, 主要参与细胞 pH_i 的调节和控制胞内的渗透压及细胞体积, 并影响着细胞的增殖、分化和死亡. 胃肠道的 NHE 亚型 (非 NHE-1) 则与水钠吸收有关, 而肾脏的 NHE 亚型因“泌 H^+ 吸 Na^+ ”作用而参与细胞外液 pH 调节. b. NHE-1 的 Na^+/H^+ 交换活性对氨氯吡咪及其同系物的抑制作用敏感, 而其他亚型的敏感性很低或抵抗. c. 各亚型的功能活性或表达水平, 可分别受生长因子等多种因素调节. 在肿瘤、高血压病、心肌缺血再灌注损伤及糖尿病等疾病中, 已初步发现 NHE-1 的表达水平及功能活性有明显的改变. 因此通过分子生物学手段研究 NHE-1 在不同病理情况

下的表达调控与活性调节, 将可能为这些疾病的诊治提供新的理论依据和手段. 本文将以 NHE-1 为代表综述 NHE 基因家族的分子结构、转录机制、功能活性调节及与某些疾病关系的研究进展.

1 NHE-1 基因结构及转录调节

1989 年 Sardet 等^[2]首次克隆出人类的 NHE-1 cDNA, 1990 年确定其全长为 5 kb, 开放阅读框长为 2 445 bp. 在人基因组中, NHE-1 基因全长跨越 70 kb^[3], 定位在染色体的 1p35~36. NHE-1 基因由 12 个外显子及 11 个内含子组成, 其中的一个内含子长达 41.5 kb. 该基因 5' 侧翼区的转录调控序列长为 1 377 bp, 包含多个复杂的顺式调控元件. 初步研究表明, 在不同的组织细胞或在不同的病理生理条件下, NHE-1 基因可能采用不同的转录调控方式. Horie 等^[4]的研究发现, 酸负荷引起的 NHE-1 mRNA 及蛋白质表达增加, 与蛋白激酶 C 增强反式作用因子 AP-1 的活性有关. 当细胞受酸刺激时, 首先激活蛋白激酶 C, 从而诱导早期反应基因 *c-fos* 和 *c-Jun* 的表达上调, *c-fos*、*c-Jun* 产物形成异源二聚体 AP-1, AP-1 与 NHE-1 基因 5' 调控区的特异位点结合, 从而增强 NHE-1 的转录表达. Kolyada 等^[5]则发现, 在人肝癌细胞株 HepG2 及平滑肌细胞株 Vsm ATr5 中, NHE-1 mRNA 的转录受反式作用因子 C/EBP 的诱导. 在这两株细胞中, NHE-1 基因的 5' 侧翼调控区 -239~-215 位点序列对其转录表达是关键的, 而该序列上的 -230~-220 位点为 C/EBP 特异结合共有序列 (consensus sequence

for the C/EBP), 当该位点发生点突变即可中止与 C/EBP 的结合, 并显著降低 NHE-1 基因的转录. NHE-1 基因转录调控的不同方式和机制显示了细胞对外界环境的适应性, 也可能在病理情况下, 参与了某些疾病的代偿性调节.

其他亚型的基因结构, 包括 5' 侧翼调控元件与 NHE-1 基因极为相似^[6,7], 在进化上它们可能起源于同一祖先基因.

2 NHE-1 蛋白质分子结构及功能活性调节

根据 NHE-1 cDNA 序列演绎的氨基酸序列及疏水性分析 (hydropathy profile), NHE-1 具有 815 个氨基酸, 分子质量为 100 ku^[3], 其在胞膜上具有拓扑学结构分布^[1]. 即该蛋白质在分子结构上具有二个功能域: 约 500 个氨基酸组成的 N 端疏水区域和 300 个氨基酸组成的 C 端亲水区域. N 端约十余个氨基酸向胞外延伸, 其余氨基酸嵌合于胞膜上形成 10 ~ 12 个分布节段. N 端功能域是 NHE-1 介导细胞 Na^+/H^+ 交换的必要条件, 即当 NHE-1 的胞内区域缺失突变, 仅存在 N 端功能域时仍可进行 Na^+/H^+ 交换, 该 N 端功能域缺失则丧失交换活性. C 端功能域位于细胞浆内, 该功能域决定 NHE-1 进行 Na^+/H^+ 交换的 pH_i 调定点, 其调定点在 $\text{pH}_i \approx 7.1 \sim 7.2$. C 端功能域的另一作用是介导生长因子、有丝分裂原、肿瘤促发因子 (如佛波酯) 及激素等信号刺激对 NHE-1 的激活调节, 其结果是增加 C 端对 H^+ 的亲合性或感受性, 从而提高 pH_i 调定点^[8]. NHE-1 的磷酸化反应则是其激活调节的重要方式之一^[2,8]. 另一个激活调节方式则与 Ca^{2+} / 钙调蛋白有关^[1]. 在 NHE-1 C 端功能域中间 (636 ~ 656 位点) 存在着与钙调蛋白高亲和力结合的位点. 当 635 ~ 656 位点序列缺失或点突变时, 即丧失与钙调蛋白结合的能力, 并减弱由生长因子等信号刺激引起的胞内碱化效应 (pH_i 调定点上移效应). 颇为有趣的是, 以 NHE-1 C 端加 NHE-3 N 端构成的嵌合体蛋白 (chimeric protein), 可使

NHE-3 N 端的交换活性受钙离子和钙调蛋白的调节^[9]. 据此, Pouyssegur 等提出了 NHE-1 的自我抑制调控模式, 其基本思想是: NHE-1 的 635 ~ 656 位点作为自我抑制功能区, 当钙离子升高激活钙调蛋白后, 钙调蛋白与 635 ~ 656 位点结合从而消除其自我抑制, NHE-1 的活性功能释放.

其他亚型的活性调节方式主要以磷酸化反应进行, 但所涉及到信号传导途径和蛋白激酶不同^[1]. 研究 NHE 的活性调节机制将有助于阐明某些疾病的病理生理过程.

3 NHE-1 在某些疾病中的作用

NHE-1 与人类疾病的关系是近年才刚刚开始研究的领域. 到目前为止, 初步发现 NHE-1 在以下几种疾病中, 其活性功能或表达水平明显增强.

a. 心血管系统疾病. 原发性高血压病患者和遗传性高血压动物的血细胞及/或组织细胞的 Na^+/H^+ 交换活性和 pH_i 异常增高, 这些异常可能是高血压病因之一^[10,11]. 而心肌肥厚及血管平滑肌增殖则与 NHE-1 mRNA 表达上调相关联, 使用 Na^+/H^+ 交换拮抗剂 (Hoe 694) 可抑制其增殖生长^[12]. 心肌缺血和酸中毒时, NHE-1 mRNA 表达上调, 伴有 Na^+/H^+ 交换活性加强^[13], 使用氨氯吡咪可保护心肌缺血再灌注损伤.

b. 已发现在胰岛素依赖型 (I 型) 糖尿病中, 组织细胞的 Na^+/H^+ 交换活性增强^[10]. Morahan 等^[14] 按孟德尔遗传方式研究, 发现 I 型糖尿病动物与正常动物杂交后, NHE-1 基因纯合子后代全部患病. 提示 NHE-1 基因是 I 型糖尿病的易感基因. 不过尚不清楚该型糖尿病是否与 NHE-1 基因的超表达有关.

c. NHE-1 在肿瘤细胞 pH_i 调节中的作用: 由于癌细胞的无氧糖酵解优势 (反巴士德效应), 导致癌细胞产生大量的乳酸和 H^+ . 80 年代中后期, 采用 ^{31}P 核磁共振波谱技术检测, 证实了在体癌组织间液的 pH_e (为 6.5 ~ 7.0) 比正常组织的 pH_e 平均低 0.5 单位, 而

癌细胞 pH_i 却能维持在生理范围之内 ($\text{pH}_i = 7.1 \sim 7.2$)^[15]. Tannock 等^[16, 17] 对同时表达有 Na^+/H^+ 泵、 Na^+ 依赖性 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 泵的癌细胞株 MHG-U1 及 EPT-1 的 pH_i 调节机制进行了研究. 发现在培养基 $\text{pH}_e < 7.0$ 时, Na^+ 依赖性的 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换泵的活性受抑制, 而 Na^+/H^+ 泵仍保持较高的交换活性, 并排出了胞内的大部分 H^+ , 从而阻止了 pH_i 下降. 由于在体癌组织间液的 $6.5 < \text{pH}_e < 7.0$, 因此这一实验结果提示, 在体条件下癌细胞可能以加强 Na^+/H^+ 交换为主要的排 H^+ 机制. 另一个证据是缺乏 Na^+/H^+ 泵的 MHG-U1 变异株癌细胞不能在裸鼠体内成瘤^[17], 尽管该变异株仍保留了 Na^+ 依赖性 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 泵, 这进一步表明了 Na^+/H^+ 泵在整体水平上对癌细胞 pH_i 调节的关键作用.

最近, Strazzabosco 等^[19] 在研究人肝癌细胞株 Hep G₂ 的 Na^+/H^+ 交换、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ 同向转运及 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换对其 pH_i 的调节作用时, 亦证明了 Na^+/H^+ 交换泵在 Hep G₂ 细胞的排酸机制中发挥了主导作用. 并发现 Hep G₂ 细胞中 Na^+/H^+ 交换活性比正常肝细胞增高 2~3 倍, 而 Hep G₂ 细胞中 NHE-1 mRNA 转录拷贝数比正常肝细胞增高 10 倍则可能是其交换活性得以增强的前提. 因此阐明癌细胞 NHE-1 基因转录上调的机制和特点, 以特异地阻抑其 NHE-1 mRNA 表达, 从而干扰和抑制癌细胞 pH_i 调节, 达到酸化癌细胞和诱导癌细胞凋亡的目的^[20], 将可能为肿瘤治疗学提供新的策略.

参 考 文 献

- 1 Bianchini L, Pouyssegur J. Molecular structure and regulation of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *J Exp Biol*, 1994, **196** (11): 337~345
- 2 Sardet C, Counillon L, Franchi A *et al.* Growth factors induce the phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter, a glycoprotein LLD kDa. *Science*, 1990, **247** (4943): 723~726
- 3 Miller R T, Counillon L, Pages G *et al.* Structure of the 5'-flanking regulatory region and gene for the human growth factor-activatable Na^+/H^+ Exchanger NHE-1. *J Biol*

- Chem, 1991, **266** (17): 10813~10819
- 4 Horie S, Moe O, Yamaji Y *et al.* Role of protein kinase C and transcription factor AP-1 in the acid-induced increase in Na^+/H^+ antiporter activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (12): 5236~5240
- 5 Kolyada A Y, Johns C A, Madias N E. Role of C/EBP proteins in hepatic and vascular smooth muscle transcription of human NHE-1 gene. *Am J Physiol*, 1995, **269** (6pt1): 1408~1416
- 6 Kandasamy R A, Orlowski J. Genomic organization and glucocorticoid transcriptional activation of the Na^+/H^+ exchanger NHE-3 gene. *J Biol Chem*, 1996, **271** (18): 10551~10559
- 7 Blaurock M C, Reboucas N A, Kusnezov J L *et al.* Phylogenetically conserved sequences in the promoter of the rabbit sodium-hydrogen exchanger isoform-1 gene (NHE1/SLC9A1). *Biochem Biophys Acta*, 1995, **1262** (2~3): 159~163
- 8 Bianchini L, Woodside M, Sardet C *et al.* Okadic acid, a phosphatase inhibitor induces activation and phosphorylation of the Na^+/H^+ antiport. *J Biol Chem*, 1991, **266** (23): 15406~15413
- 9 Wakabayashi S, Ikeda T, Noel J *et al.* cytoplasmic domain of the ubiquitous Na^+/H^+ exchanger NHE-1 can confer Ca^{2+} responsiveness to the apical isoform NHE-3. *J Biol Chem*, 1995, **270** (44): 26460~26465
- 10 Siczowski M, Ng L L. Glucose induced changes in activity and phosphorylation of the Na^+/H^+ exchanger, NHE-1, in vascular myocytes from wistar kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Metabolism*, 1996, **45** (1): 114~119
- 11 Goldsmith D J A. Leucocyte intracellular pH and Na^+/H^+ exchange activity in essential hypertension: an *in vitro* study under physiological. *J Hypertens*, 1991, **9** (7): 645
- 12 Takewaki S, Kuro O M, Hiroi Y *et al.* Activation of Na^+/H^+ antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, **27** (1): 729~742
- 13 Dyck J R, Madaford T G, Pierce G N *et al.* Induction of expression of the sodium-hydrogen exchanger in rat myocardium. *Cardiovasc Res*, 1995, **29** (2): 203~208
- 14 Morahan G, McClive P, Huang D *et al.* Genetic and Physiological association of diabetes susceptibility with raised Na^+/H^+ exchange activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (13): 5898~5902
- 15 Griffiths J R. Are cancer cells acidic? *Br J Cancer*, 1991, **64** (3): 425~427
- 16 Boyer M J, Tannock I F. Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: Influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res*, 1992, **52** (16): 4441~4447
- 17 Boyer M J, Barnard D W, Tannock I F *et al.* Regulation of intracellular pH in subpopulation of cells derived from spheroids and solid tumours. *Br J Cancer*, 1993, **68** (5): 890~897
- 18 Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S *et al.* Requirement of the Na^+/H^+ exchanger for tumor growth. *Cancer Res*, 1989, **49** (1): 205~211
- 19 Strazzabosco M, Poci C, Smirli C *et al.* Intracellular pH regulation in Hep G₂ cells: effects of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and insulinlike growth fac-

tor II on Na^+/H^+ exchange activity. Hepatology, 1995, 22 (2): 588~597

- 20 黄桂君, 钱桂生 (Huang G J, Qian G S). pH 对细胞凋亡的调控及 pH 调节的肿瘤治疗研究. 科学 (Science), 1997, 228 (8): 51~52

Advances in the Study of the NHE Gene Family. HUANG Guirjun, QIAN Guirsheng (*Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China*).

Abstract Na^+/H^+ exchangers (NHE) are vital transmembrane transporters involved in multiple cellular functions including the regulation of intracellular pH, the control of cell volume and ion transport. Five isoforms of Na^+/H^+ exchangers have been cloned and characterized to

date; they constitute a new gene family of vertebrate transporters. And these isoforms are highly regulated by a remarkably wide variety of stimuli which can modulate their expression level and activity. Among the isoforms, the increased expression level and activity of human NHE-1 have been found to play a role in some critical diseases, such as tumor, hypertension and diabetes. Thus it may provide a new way of diagnosing and treating for these diseases by investigating on the transcription modulation of NHE-1 gene and the activity regulation of the exchanger.

Key words Na^+/H^+ exchanger, intracellular pH, gene expression regulation, neoplasm, hypertension

导向性纤溶酶原激活剂的研究*

杨嘉树 茹炳根

(北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 溶栓疗法是血栓治疗中的一种重要措施. 研制具有高选择性的导向性纤溶酶原激活剂有着重大的理论意义和实用价值. 采用血栓特异的单克隆抗体及其片段来介导溶栓剂已展示出较好的应用前景. 双功能抗体以及同时具有抗栓, 抗凝活性的小肽正逐渐拓宽人们有关导向分子研制的视野. 所有这一切都将随着分子生物学技术的不断完善而付诸实现.

关键词 导向性纤溶酶原激活剂, 血栓, 血小板, 纤维蛋白, 单克隆抗体, 双功能抗体, 单链抗体, 活性小肽

学科分类号 Q51

由血凝块导致的脑血栓和冠状动脉血栓形成严重危害人类的健康. 对这类由于血液凝固阻塞血管而引起的疾病, 可以通过使用溶栓剂, 将纤溶系统中的纤维蛋白溶酶原 (plasminogen, 简称纤溶酶原) 活化成纤溶酶 (plasmin), 进而催化血凝块中的纤维蛋白降解成小分子的可溶物质而使循环畅通.

1 临床上使用的溶栓剂

目前, 在溶栓疗法中最常使用的溶栓剂有

三类, 即链激酶 (streptokinase, SK), 尿激酶 (urokinase, UK 或 urokinase-type plasminogen activator, u-PA) 和组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA). SK 和 UK 缺乏纤维蛋白专一性, 除了能激活纤维蛋白表面的纤溶酶原外, 也同时激活循环中游离的纤溶酶原而导致 $\alpha_2\text{AP}$ (α_2 -antiplasmin, 体内存在的纤溶酶的拮抗剂) 的消耗, 进而使

* 国家“863”计划资助项目 (863-102-09).

收稿日期: 1997-07-17, 修回日期: 1997-11-16