

• 文献综述 •

诱导型一氧化氮合酶基因的表达与调控

韩 梅 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

摘要 哺乳动物体内存在组成型与诱导型两种类型的一氧化氮合酶,前者在生理状态下恒定表达,由其催化产生的一氧化氮作为信使分子,在免疫、神经和心血管系统中发挥多种生理作用;后者只有在致炎细胞因子或脂多糖作用下才表达,其催化合成的一氧化氮参与脓毒性休克、高血压和动脉粥样硬化等多种疾病的病理生理过程。因此,揭示诱导型一氧化氮合酶基因的表达调控机制,具有重要的理论意义和潜在的临床应用价值。

关键词 一氧化氮合酶,诱导型; 表达调节; 调控元件; 转录因子

一氧化氮(nitric oxide, NO)是体内最小的生物活性物质之一,可由存在于多种细胞内的一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成。NO作为一种生物信息分子,其生物学作用主要体现在免疫应答、血管张力调节和神经信息传递等方面。NO不但对这些系统的正常功能具有重要的调节作用,而且参与脓毒性休克、高血压和动脉粥样硬化等多种疾病的病理生理过程。已经证明,哺乳动物血管内存在两种类型的NOS,一种是由血管内皮细胞(endothelial cell, EC)和神经细胞持续合成的NOS,称为组成型NOS(cNOS),cNOS的活力依赖于 Ca^{2+} /钙调蛋白(CaM)复合物,可被快速激活,但其活性维持时间较短;在生理状态下血管系统内的NO主要由cNOS催化合成。另一种是诱导型NOS(iNOS),主要分布于血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)、巨噬细胞和中性粒细胞,在生理状态下iNOS不表达,其表达需要某些细胞因子如白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)和脂多糖的诱导。iNOS的活性不依赖于 Ca^{2+} /CaM复合物,因为iNOS的诱导表达涉及基因转录、蛋白质合成等过程,故机体受到刺激后数小时才能显示该酶的活性。iNOS一经诱导生成,其活性持续时间较长,因此,该酶催化NO生成的能力比cNOS强得多。虽然cNOS和iNOS都属于血红素类蛋白质,

均以同源二聚体发挥作用,且其活性均依赖于NADPH,但是两者的一级结构、组织分布以及表达调控具有明显的差异。本文仅对iNOS基因的表达调控及分子机制作一综述。

1 诱导型一氧化氮合酶的特征

小鼠巨噬细胞iNOS为一同源二聚体,解离后形成的无活性单体的分子量为130 kDa^[1]。从人的软骨细胞克隆的iNOS cDNA推测其编码的多肽链是由1 153个氨基酸残基组成,分子量约131 kDa,与小鼠iNOS约有81%的同源性,而与cNOS的同源性仅为51%。人iNOS基因定位于17号染色体^[2],大鼠iNOS单体的分子量为131 kDa,与cNOS相同的是,iNOS分子内也含有FMN、FAD、NADP、血红素和四氢生物喋呤,这些辅助因子的确切功能还不十分清楚。业已证实血红素、四氢生物喋呤和L-精氨酸对于iNOS二聚体的形成以及酶的活化具有重要作用^[3]。iNOS与cNOS的主要区别之一是iNOS与CaM的结合不依赖于 Ca^{2+} ,可能是iNOS活性持续时间较长的主要原因。

来自同一种属动物不同细胞的iNOS cDNA序列基本一致。例如大鼠VSMC和肝细胞的iNOS cDNA的同源性为98.8%,人软骨细胞、肝细胞和直肠癌细胞株(DLD-1)等细胞的iNOS cDNA的同源性在99%以上。可见同一种属动物的不同细胞表达的iNOS是单一基因的产物。有学者提出,在不同动物之间可能只存在一种iNOS基因的观点,然而同一基因并不意味着不同动物和不同细胞的iNOS的产物完全一样,因为还可能存在mRNA剪接和蛋白质修饰方式的差异等情况。

2 诱导型一氧化氮合酶的表达调控

用球囊导管剥脱在体血管内皮或用致炎细胞因子(如IL- 1β 、TFN- α 、IFN- γ 等)及脂多糖处理离体血管,均可刺激血管壁细胞表达iNOS,并伴随出现NO释放和血管张力降低,这些现象不依赖于血管内皮的存在,可被iNOS抑制剂所消除。近年证实,体外培养的EC

VSMC、成纤维细胞和粘附于血管壁上的巨噬细胞都可被致炎因子诱导表达 iNOS, 血管壁细胞对该类细胞因子的反应, 对于调节损伤局部血管功能具有重要作用^[4]。大鼠 VSMC 的 iNOS 基因对单一致炎细胞因子刺激所产生的应答反应强度依次为 IL-1 β >IFN- γ >TNF- α 。在一定范围内, iNOS 基因对细胞因子应答反应的强度与细胞因子的浓度和(或)作用时间呈正比。两种或两种以上细胞因子的协同作用大于各种细胞因子单独作用之和^[5]。

诱导型一氧化氮合酶基因表达调节主要在转录水平上进行^[6]。在未经诱导的细胞内, iNOS 表达水平很低, 甚至不表达。在脂多糖和细胞因子刺激下, 不同种属或同一种属不同类型细胞表达 iNOS 的活性不尽相同。例如, IL-1 β 可刺激大鼠 VSMC 高效表达 iNOS mRNA, 而经同样处理的大鼠血管 EC 的 iNOS 表达活性很低, 表明 SMC 明显高于 EC 的 iNOS 基因的诱导应答活性。但 IL-1 β 不能诱导牛和兔的血管细胞表达 iNOS, 脂多糖对这两种动物血管细胞的诱导活性都很弱。人类细胞需要在两种或三种细胞因子联合作用下, 才能使 iNOS 激活, 提示 iNOS 表达调节具有种属特异性和细胞特异性^[7]。此外, 蛋白激酶 C 激活剂和生长因子(如 PDGF、FGF 等)也可诱导某些细胞表达 iNOS。

致炎细胞因子和脂多糖对 iNOS 基因的诱导激活作用可被某些细胞因子(如 IL-4、IL-8、IL-10 等)或生长因子(如 TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3 、PDGF、FGF 等)所抑制。酪氨酸激酶抑制剂和 NF- κ B 抑制剂可阻断巨噬细胞 iNOS 的诱导表达, 说明酪氨酸激酶和 NF- κ B 参与 iNOS 基因的诱导活化过程。同一种细胞因子对不同细胞 iNOS 表达的影响, 可表现出诱导和抑制两种相反的效应, 如 PDGF 和 TGF- β , 一方面可抑制 iNOS 在小鼠巨噬细胞和大鼠 SMC 中进行表达; 另一方面又可诱导 3T3 成纤维细胞生成 iNOS。iNOS 诱导表达的复杂性及细胞特异性可能与刺激信号在细胞内的转导途径不同有关^[6]。

3 诱导型一氧化氮合酶基因转录调控的分子机制

序列分析证实, 小鼠 iNOS 基因 5'-侧翼转录调控区域中, 含有一个 TATA 盒以及 IFN- γ 应答元件(IFN- γ -RE)、NF- κ B 结合位点等与 iNOS 诱导表达有关的保守序列。将 iNOS 基因 5'-侧翼区不同部位进行缺失或定位突变后插入报告基因上游, 对片段中调控元件进行研究, 结果显示, 报告基因的表达活性取决于 TATA 盒上游的两个调控区域^[8]。一个是 -48~-209

bp 区, 该序列内含有脂多糖相关应答元件、NF- κ B 和 NF-IL-6 位点, 具有介导对脂多糖刺激产生应答的功能, 提示这些元件参与脂多糖对 iNOS 诱导表达的调节作用。NF- κ B 位点位于 TATA 盒上游 55 bp 处, 用含有 NF- κ B 位点的寡核苷酸探针可检测到被脂多糖处理的巨噬细胞内存在与探针特异结合的转录因子, NF- κ B 抑制剂 PDTC 可抑制转录因子的活化及 NO 的合成, 显然, NF- κ B 的活化是诱导 iNOS 基因表达的关键环节。另一调控区位于 -913~-1 029 bp, 该序列主要与 IFN- γ 诱导 iNOS 表达调节有关。已知该序列中含有四个 IFN- γ 应答元件, 其中包括位于 -913~-923 的 IFN 调节因子结合位点(IRF-E)。将 IRF-E 序列中的两个核苷酸定向诱变后, IFN- γ 介导的 iNOS 基因转录激活作用消失。凝胶阻滞分析表明, 被 IFN- γ 处理的巨噬细胞中存在与 IRF-E 位点特异结合的蛋白因子。人 iNOS 基因 5'-侧翼 1 090 bp 中具有与小鼠 iNOS 转录调控区相似的结构, 如转录起始点上游 -30 bp 的 TATA 盒和多种与 iNOS 诱导活化有关的保守序列。不同的是, 在人的 iNOS 基因中含有剪切张力应答元件(SSRE)^[9]。因此, 当人的血管壁剪切张力发生改变时, 可诱导 VSMC 的 iNOS 基因表达和 NO 生成。虽然人与小鼠 iNOS 基因转录调控区的结构相似, 但二者对细胞因子刺激所产生的应答反应具有明显的差异。

我们克隆了大鼠 iNOS 基因转录调控区序列, 与小鼠的同一区域进行比较后, 发现两种基因在 TATA 盒上游 10 bp 的区域内, 碱基顺序具有 74% 的同源性。其中远端 1/3 和近端 1/3 区域内, 二者的同源性更高, 分别为 85% 和 88%。大鼠 iNOS 基因 5'-侧翼区同样含有多种顺式作用元件, 其中包括两个 NF- κ B 作用位点和八个 IFN- γ 应答元件^[10]。以大鼠 iNOS 基因上游调控区不同区段为探针, 从被 IL-1 β 和脂多糖诱导的大鼠 VSMC 和 EC 内可检测到与探针特异结合的转录因子, 并且证实, 与不同区段 DNA 探针结合的转录因子种类、数目以及与探针相互作用的方式具有差异。同时发现, 来自不同细胞的核蛋白与同一调控区探针结合的方式和活性也不相同, 这就意味着刺激信号在不同细胞内的转导途径并非一致, 因而造成 iNOS 诱导表达的细胞特异性^[11]。

除转录水平调控外, 转录后事件也影响 iNOS 表达, 脂多糖一方面可激活 iNOS 基因转录; 另一方面又可延长 iNOS mRNA 半衰期, 促进 iNOS 的翻译。TGF- β 通过降低 mRNA 的稳定性、减慢翻译速率和加快酶蛋白降解而抑制 iNOS 表达及活性。

4 结束语

致炎细胞因子和脂多糖可诱导多种细胞产生 iNOS, 引发一种延迟的、持久的 NO 释放, 这对于介导机体产生免疫应答反应、调节生理和病理状态下的血管功能具有重要作用。在血管内皮局部受到损伤时, iNOS 在严格调控下的诱导表达对于补偿内源性 NO 不足、恢复正常血管功能具有重要意义。然而, 一旦这种控制失效, NO 的过量产生会给机体带来不利影响。不同种属动物 iNOS 基因转录调控元件的非同源性以及不同细胞内刺激信号转导途径的差异造成 iNOS 诱导表达的种属和细胞特异性。因此, 阐明 iNOS 的表达调控机制, 有其重要的理论意义和潜在的临床应用价值。

参考文献

- 1 Hevel JM, White KA, Marletta MA, et al. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 22 789~791.
- 2 Charles IG, Palmer RMJ, Hickery MS, et al. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 11 419~423.
- 3 Beak KJ, Thiel BA, Lucas S, et al. Macrophage nitric oxide synthase subunits purification, characterization and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 21 120~129.
- 4 Schini Rerth VB, Venhoutte PM. Nitric oxide synthases in vascular cells. *Exp Physiol*, 1995, **80**: 885~905.
- 5 乔亚明, 温进坤, 魏素珍. TNF- α , IL-1 β 及 LPS 对血管平滑肌细胞一氧化氮合酶基因表达的影响及作用机制研究. *生物化学杂志*, 1997, **13**: 406~411.
- 6 Forstermann U, Gath I, Schwarz P. Isoforms of nitric oxide synthase properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol*, 1995, **50**: 1 321~332.
- 7 Laubach VE, Zhang CX, Russell SW, et al. Analysis of expression and promoter function of the human inducible nitric oxide synthase gene in DLD-1 cell and monkey hepatocytes. *Biochem Biophys Acta*, 1997, **1351**: 287~295.
- 8 Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, et al. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 9 730~734.
- 9 Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **200**: 802~807.
- 10 韩梅, 温进坤. 大鼠诱导型一氧化氮合酶基因转录调控区的克隆与鉴定. *生物化学杂志*, 1997, **13**: 525~530.
- 11 韩梅, 温进坤. 不同种属血管细胞 iNOS 诱导表达的差异性研究. *生物化学杂志*, 待发表.

(1997-12-12 收到)