

·学科进展·

5-脂氧合酶基因打靶小鼠及细胞核定位研究

陈新生* 王寅 殷明

(第二军医大学药学院,上海 200433)

[摘要] 简要介绍了5-脂氧合酶基因打靶小鼠模型的性质,在各种疾病模型中的表型,以及5-脂氧合酶细胞核定位研究的新进展。

[关键词] 5-脂氧合酶,基因打靶,细胞核定位

花生四烯酸在体内主要通过环氧合酶和脂氧合酶途径代谢。脂氧合酶存在于白细胞、巨噬细胞和肥大细胞内,依据其对花生四烯酸氧化位置的不同分为5-、12-和15-脂氧合酶。花生四烯酸与位于细胞核膜的5-脂氧合酶激动蛋白结合后,被递呈给5-脂氧合酶,经氧化代谢产生羟基二十碳五烯酸和白三烯类物质。白三烯是强有力的炎症介质,对哮喘、类风湿性关节炎、过敏性鼻炎、银屑病及癌症等常见多发病的发生发展起很大作用。

基于基因同源重组原理产生5-脂氧合酶基因打靶小鼠模型,对阐明5-脂氧合酶在细胞内的功能、定位、基因调控,酶对白三烯类生物合成调控的机制,新型治疗药物研制具有重要意义。本文就有关5-脂氧合酶基因打靶小鼠及酶细胞核定位的研究新进展作一介绍。

1 5-脂氧合酶基因打靶小鼠研究

人的5-脂氧合酶基因位于10号染色体富含CpG的片段,长约80 kb,有14个外显子。其启动子区域有CCGCC的串联重复序列^[1-3]。迄今,对5-脂氧合酶基因调控机制了解甚少。从小鼠克隆到与人5-脂氧合酶基因的3个外显子具同源性的片段^[4]。其外显子/内含子接头的位置与人基因相似,但内含子的尺寸明显不同^[4,5]。

以小鼠5-脂氧合酶基因含外显子4—6的片段构建目标载体,在外显子6处插入新霉素抗性盒。这部分基因编码含673个氨基酸的5-脂氧合酶蛋白

中的220—277个,位于蛋白组氨酸铁离子配体编码区域的上游^[4,5]。

以胚胎干细胞打靶技术产生5-脂氧合酶基因缺失小鼠(5-LO^{-/-}),建立了129Sv系、C57BL/6 × 129Sv系。以Southern Blot确证子代的5-脂氧合酶基因被破坏,以Western Blot及酶活性评价方法表明骨髓衍生肥大细胞、腹腔及肺泡巨噬细胞中5-脂氧合酶蛋白和酶功能丧失^[5]。从而首次得到无白三烯合成功能的哺乳动物。

5-LO^{-/-}小鼠在子宫内生长发育正常,外表无明显异常,能正常繁殖^[5]。从正常及5-LO^{-/-}小鼠分离到的巨噬细胞、骨髓肥大细胞激活后均能表达5-脂氧合酶、分泌白三烯。5-LO^{-/-}细胞绝大多数方面表现正常,经钙离子载体A23187作用后,骨髓衍生肥大细胞释放的颗粒成分,前列腺素合成水平与野生型小鼠细胞基本相同。经酵母多糖刺激,5-LO^{-/-}腹腔巨噬细胞合成与野生型细胞相等数量的前列腺素,但吞噬功能部分丧失。肥大细胞及巨噬细胞的细胞特异性功能还有待进一步研究,以阐明5-脂氧合酶通路的更多功能。

对5-LO^{-/-}小鼠在各种实验模型的表型已进行详尽研究。如卵清蛋白诱导5-LO^{-/-}小鼠产生哮喘模型,其支气管肺泡灌流液嗜酸细胞的积累减少,卡巴胆碱激发的气道阻力减轻,总IgE及卵清蛋白特异性IgG量降低,免疫反应性降低^[6]。

PAF诱导5-LO^{-/-}小鼠产生休克模型,其死亡率降低,初始血压下降,2—3小时恢复,同野生型一

* 1999年国家杰出青年科学基金获得者。

本文于2000年9月27日收到。

样加剧血浓缩,使血浆外溢增加。但以 LPS 诱导产生休克,其死亡率与野生型无明显差别^[5]。

5-LO^{-/-}小鼠被曼氏血吸虫感染后,肝肉芽瘤尺寸减小但细胞组成不变,血吸虫卵抗原所致高敏感性降低,嗜酸细胞反应及数量正常^[7];被肺炎克雷伯杆菌感染后,死亡率增加,肺中多型核白细胞聚集正常,肺小泡巨噬细胞的细菌吞噬、杀细胞作用减弱^[8];被巴西日园线虫感染后,对寄生虫基本无排除作用;被产单核细胞李斯特菌感染后,抗感染能力轻微降低^[9]。

在 5-LO^{-/-}小鼠腹膜炎模型中,糖原诱导的多型核白细胞浸润正常,酵母多糖诱发的炎症反应减轻(蛋白外溢减少),免疫复合物诱发多型核白细胞聚集减少^[5,10]。

5-LO^{-/-}小鼠耳肿胀炎症模型与野生型比较,以十四烷酰佛波醇乙酸酯诱发的反应正常,花生四烯酸诱发反应程度降低(水肿减轻、多型核白细胞减少)^[5]。

对大多数模型而言,5-LO^{-/-}小鼠境况要好于其野生型同伴。仅在肺炎克雷伯杆菌感染时,5-LO^{-/-}小鼠存活率较低,这表明白三烯在此气道感染模型中对宿主的保护作用,也提示白三烯在人肺炎感染时对宿主防御系统的重要性^[8]。

因为 5-脂氧合酶/白三烯通路主要在激活的炎症细胞中表达,可以假定其对宿主无损害。白三烯合成可能是宿主对性质不明确的病原体感染、入侵的一种保护性机制。5-脂氧合酶/白三烯系统可能代表了炎症反应机制网络中冗余的一种通路。在低等生物中无 5-脂氧合酶通路,而在一些植物如马铃薯结节中存在,大多数植物的脂氧合酶通路表现为产生特殊信号分子或对损伤的保护性反应^[11]。在高等动物中白三烯发挥类似的作用。通过对 5-LO^{-/-}小鼠的深入研究有助于理解白三烯的“有益”的功效。

2 5-脂氧合酶细胞核定位研究

长期以来 5-脂氧合酶从人或猪白细胞分离得到,被认为是存在于胞质的可溶性蛋白^[12,13]。近年研究发现,在肺泡巨噬细胞和大鼠嗜碱白血病细胞(RBL-1)的核膜及胞核也有 5-脂氧合酶存在^[14]。RBL-1 与肥大细胞的表型有相关性,同时基于对 5-LO^{-/-}小鼠骨髓衍生肥大细胞的深入研究,对骨髓衍生肥大细胞中的 5-脂氧合酶定位特性进行了研究。出乎意料地发现在原始肥大细胞群中,5-脂氧

合酶只定位于胞核中,以钙离子载体或 IgE/抗原激活细胞,导致细胞内表达模式改变,包括核内、核膜的点状分布,或者是以核外周/核膜方式分布^[15]。

5-脂氧合酶在细胞核内,可能以依赖或不依赖白三烯的方式发挥功效^[16]。此外,发现 LTB₄ 能通过细胞核受体 PPAR- α 发挥作用^[17],也引起了对此一领域研究的兴趣。

在各种类型细胞中进行了 5-脂氧合酶核定位研究。制备能产生绿色荧光蛋白(GFP)标记的融合蛋白的载体,以详细分析细胞核内 5-脂氧合酶定位现象,并籍此追踪酶在活细胞中的运动。有趣的是,以产生此融合蛋白的质粒转染各种类型细胞,如 HEK293, COS-1, CHO, NIH 3T3 等,酶恒定在核中表达。且发现此融合蛋白与核内 DNA 染色剂 Hoechst 33258 共存于所研究的各种类型细胞中。5-LO^{-/-}小鼠骨髓衍生肥大细胞转染 5-脂氧合酶质粒后,酶定位与其初始状态一样(即在核中表达)^[18]。

许多蛋白含有核定位信号序列,由一系列碱性氨基酸(主要为精氨酸和赖氨酸)组成,呈单簇状或被分隔成两部分^[19]。5-脂氧合酶 cDNA 克隆序列中包含了几簇碱性氨基酸残基^[2]。尽管没有一个与典型核定位信号完全匹配,但可能有部分潜在的核定位信号功能。通过体外突变和转染技术,利用绿色荧光蛋白/5-脂氧合酶融合蛋白研究分析 5-脂氧合酶 3 个主要碱性部位与核定位的关系。

碱性部位 1 由 5-脂氧合酶蛋白序号为 71 - 73 的氨基酸(赖氨酸-精氨酸-赖氨酸)和 83 的氨基酸(赖氨酸)组成;碱性部位 2 由序号 128 - 133 的氨基酸(赖氨酸-谷氨酰胺-组氨酸-精氨酸-精氨酸-赖氨酸)组成;碱性部位 3 由序号 651 - 655 的氨基酸(精氨酸-天冬酰胺-赖氨酸 = 赖氨酸-赖氨酸)和 666 的氨基酸(精氨酸)组成。

碱性部位 1 和碱性部位 3 突变(以谷氨酰胺替代精氨酸及赖氨酸)不影响酶活性及酶进核的能力。而碱性部位 2 的突变则使酶活性丧失,且酶不能进核。酶细胞定位改变可能由于蛋白折叠结构改变导致。因此,通过对编码铁离子结合氨基酸的部位突变,制备了丧失脂氧合酶活性的绿色荧光蛋白/5-脂氧合酶融合蛋白^[20,21]。5-脂氧合酶包含有非血红素结合铁离子,为催化作用所必需。基于对大豆和兔网织红细胞脂氧合酶晶体结构研究以及对人 5-脂氧合酶突变分析^[20-23],表明有 3 个组氨酸残基和 C-端异亮氨酸参与结合铁离子,并推测这种结合对保持酶正确结构从而维持酶活性必不可少。在转染细

胞中,突变完全去除5-脂氧合酶结合铁离子,使大多数酶的核定位受到阻滞,只定位于细胞质中。如果突变导致酶活性丧失但有部分铁离子结合于酶蛋白,则5-脂氧合酶依赖铁离子浓度在细胞核及细胞质中梯度性分布^[18]。表明5-脂氧合酶蛋白正确的折叠为核定位所必需。

此外,制备5-脂氧合酶不同片段与绿色荧光蛋白的融合蛋白,以确证是否存在酶蛋白的一个特异性区域,能引导酶核定位。发现5-脂氧合酶N-端含127或80氨基酸片段可导致核定位,在肺泡巨噬细胞核呈现为杂色斑点状^[24]。作为对照,12-脂氧合酶N端及5-脂氧合酶C端90个氨基酸残基均不能导致核定位。

与GFP相反,细胞质蛋白丙酮酸激酶与5-脂氧合酶融合不能导致后者核定位^[18]。从25个不同的融合蛋白数据可以发现,5-脂氧合酶核定位依赖于套参数,以经典的核定位实验不能轻易识别。也就是说,5-脂氧合酶没有典型的碱性氨基酸组成的核定位信号区域,其正确的酶蛋白折叠为核定位所必需。5-脂氧合酶N端的80个氨基酸残基中似乎有序列不明确且相对弱的核定位信号序列,分子模型研究显示此片段存在于N端 β 折叠域内,其功能未知。Gillmor等人推测5-脂氧合酶N端 β 折叠域与脂蛋白脂肪酶具同源性,同5-脂氧合酶激活蛋白相互作用,参于膜的结合^[23]。研究证实5-脂氧合酶N端域对酶核定位有潜在作用,其 β 折叠域的正确结构对核定位十分重要^[18]。

对诸如酶的弱核定位信号或者酶本身的催化是否被其他蛋白屏蔽,5-脂氧合酶与其他蛋白结合协同进核的能力及酶翻译后磷酸化修饰等可能机制,需进行更多研究。在HL-60细胞核中已检测到磷酸化的5-脂氧合酶片段,但未确定磷酸化位点^[25]。

3 小结

5-LO^{-/-}小鼠有待于进行更多的研究,确定其在疾病及炎症模型中的功能。在神经性炎症、再灌注损伤、炎症性肠道疾病及对各种免疫功能作用等领域尤引起兴趣。

对5-脂氧合酶或白三烯在核内的功能有必要深入研究。目前,关于5-脂氧合酶核定位机制的研究刚开始,以后研究则需着重于阐述5-脂氧合酶核定位的调控机制及其他未知的细胞功能。

参 考 文 献

[1] Funk C D, Matsumoto T, Hoshiko S et al. Characterization of the hu-

man 5-lipoxygenase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1989, **86**: 2 587—2 591.

- [2] Matsumoto T, Funk C D, Rüdmark O et al. Molecular cloning and amino acids sequence of human 5-lipoxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988, **85**:26—30.
- [3] Hoshiko S, Rüdmark O, Samuelsson B et al. Characterization of the human gene promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1990, **87**: 9 073—9 077.
- [4] Funk C D, Kurre U, Griffis G. Targeted gene disruption by homologous recombination: toward an understanding of specific blood cell functions. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1994, **714**:253—258.
- [5] Chen X S, Sheller J R, Johnson E N et al. Role of leukotriene revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. Nature (London), 1994, **379**:179—182.
- [6] Irvin C G, Tu Y P, Sheller J R et al. 5-lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. Am. J. Physiol., 1997, **272**:1 053—1 058.
- [7] Secor W E, Powell M R, Morgan J et al. Mice deficient for 5-lipoxygenase, but not 12-lipoxygenase, display altered immune responses during infection with *Schistosoma mansoni*. Prostaglandins Other Lipid Mediators, 1998, **56**:291—304.
- [8] Bailie M B, Standiford T J, Laichalk L L et al. Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from *Klebsiella pneumoniae* in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities. J. Immunol., 1996, **157**:5 221—5 224.
- [9] Funk C D. The molecular biology of mammalian lipoxygenase and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. Biochim. Biophys. Acta., 1996, **1** 304:65—84.
- [10] Johnson E N, Sun D, Chen X S et al. Lipoxygenase gene disruption studies: status and application. Adv. Exp. Med. Biol., 1999, **447**: 63—73.
- [11] Bell E, Creelman R A, Mullet J E. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1995, **92**:8 675—8 679.
- [12] Rouzer C A, Samuelsson B. On the nature of the 5-lipoxygenase reaction in human leukocytes: enzymes purification and requirement for multiple stimulatory factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1985, **82**:6 040—6 044.
- [13] Ueda N, Kaneko S, Yoshimoto T et al. Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. J. Biol. Chem., 1986, **261**:7 982—7 988.
- [14] Peters-Golden M, McNish R W. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. Biochim. Biophys. Res. Commun., 1993, **196**:147—153.
- [15] Brock T G, Paine R, Peters-Golden M. Localization of 5-lipoxygenase to the nuclear of unstimulated rat basophilic leukemia cells. J. Biol. Chem., 1994, **269**:22 059—22 066.
- [16] Chen X S, Naumann T A, Kurre U et al. cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase. J. Biol. Chem., 1995, **270**:17 993—17 999.
- [17] Devchand P R, Keller H, Peters J M et al. The PPA Ralphi-

- leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature*, 1996, **384**: 39—43.
- [18] Chen X S, Zhang Y Y, Funk C D. Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion protein. *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**:31 237—31 244.
- [19] Corbett A H, Silver P A. Nucleocytoplasmic transport of macromolecules. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997, **61**:193—211.
- [20] Zhang Y Y, Lind B, Rådmark O et al. Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**:2 535—2 541.
- [21] Hammarberg T, Zhang Y Y, Lind B et al. Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, 1995, **230**:401—407.
- [22] Boyington J C, Gaffney B J, Amzel L M. The three-dimensional structure of an arachidonate acid 15-lipoxygenase. *Science*, 1993, **260**: 1 482—1 486.
- [23] Gillmor S A, Villasenor A, Fletterick R et al. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipase and the determinants of substrate specificity. *Nature Struct. Biol.*, 1997, **4**:1 003—1 009.
- [24] Woods J W, Coffey M J, Brock T G et al. 5-lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J. Clin. Invest.*, 1995, **95**:2 035—2 046.
- [25] Lepley R A, Muskardin D T, Fitzpatrick F A. Tyrosine kinase activity modulates catalysis and translocation of cellular 5-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**:6 179—6 184.

5-LIPOXYGENASE-DEFICIENT MICE AND NUCLEAR TARGETING STUDIES

Chen Xinsheng Wang Yin Yin Ming

(College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract A brief introduction of the characteristics of 5-lipoxygenase-deficient mice and the major phenotypic findings of it from numerous experimental models are presented. Some new progress about the research on nuclear targeting of 5-lipoxygenase are also included.

Key words 5-lipoxygenase, gene knockout, nuclear targeting

·资料·信息·

“中国城市地球物理研究战略研讨会”在抚顺召开

由国家自然科学基金委员会地球科学部和中国科学院地学部联合主办的中国城市地球物理研究战略研讨会于11月14—16日在抚顺召开。中国科学院地学部副主任陈颙院士、中国科学院地质与地球物理研究所姚振兴院士、滕吉文院士、中南工业大学何继善院士、香港地质学会会长香港大学陈龙生教授、英国莱斯特(Leicester)大学 Max Meju 博士以及有关部委、研究机构 and 高等院校等方面的专家学者共60余人参加了会议。

本次会议的主要议题是面对世纪之交,研讨城市地球物理学的发展方向。与会专家在会上展示了世界各地城市地球物理研究的进展、目前采用的主要研究方法以及成功的实例,讨论了城市地球物理学研究的科学意义、亟待解决的工业和社会问题以及目前研究工作的局限性,明确了城市地球物理学这一新生学科今后研究发展的方向。

专家们在大会充分讨论的基础上取得了共识,初步提出未来5—10年的主要研究方向和内容:(1)

城市地球物理学的研究必须面对高分辨、高信噪比、高准确度、高效实用性的挑战,因此传统的勘探地球物理学方法亟待创新。(2)要充分认识传统物探方法在解决浅层或超浅层问题上的缺陷和不足,要用有实际意义的数值模拟方法对物探方法的能力做出客观的分析。(3)开展数据采集技术方面的研究,为城市地球物理学研究积累高质量观测数据。(4)进行高精度数字处理方法、高精度近地表精细结构成像的研究。(5)开展地球物理在城市问题上综合解释方法的研究,提倡综合研究以提高认识问题的可信度。(6)挑选典型地区的典型问题作为研究工作的重点,例如以抚顺市的城市灾害问题为突破点,开展各类研究工作。

会议期间,专家们还参观了抚顺市内由于地面塌陷引起的城市灾害发生现场,并在灾害现场进行了专业性的讨论。

(地球科学部 于晟 供稿)