

血红素加氧酶系统研究现状*

郭建增, 周岐新

(重庆医科大学 药理教研室, 中国重庆 400016)

摘要: 血红素加氧酶(HO)是降解血红素的微粒体酶系统,目前已确定的有3种同工酶,它们降解血红素生成一氧化碳(CO)和胆绿素,并释放出铁离子.这3种产物都有重要的生物学意义.为了探讨血红素加氧酶系统的调节机制,就这种机制及3种重要产物的功能作一综述.

关键词: 血红素加氧酶; 一氧化碳; 胆绿素; 铁

中图分类号: R318; R345 文献标识码: A 文章编号: 1007-7847(2001)S0-0190-08

Recent Progress of Research into Heme Oxygenase System

GUO Jian-Zeng, ZHOU Qi-Xin

(Dept of Pharmacology, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Heme oxygenase(HO) is a complex microsomal enzyme system involving three isoenzymes in the degradation of heme and resulting in the generation of biliverdin, iron, and carbon monoxide. Recently, attention has been focused on the biological effects of the products of this enzymatic reaction on the living body. Some developments about this field of research are briefly described.

Key words: heme oxygenase; carbon monoxide; biliverdin; iron

(Life Science Research, 2001, 5(Suppl): 190~197)

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是在进化上高度保守的一族微粒体酶系统,它在调节机体生理性铁稳态,抗氧化防御机制以及以气体神经递质分子一氧化碳(CO)为中介的信号传导通路中扮演重要角色.

迄今已发现3种哺乳动物源的HO:在代谢降解含血红素蛋白的器官组织中有高度集中的可诱导型HO-1;脑、睾丸表达很高的非诱导型(结构型)HO-2^[1,2];类似HO-2却只有极低催化活性的HO-3^[3].HO的3种同工酶是3种不同基因的表达产物,其中HO-1可被血红素、金属元素、氧化应激、紫外照射、化学物质、高温、某些药物、还原型谷胱甘肽(GSH)耗竭等因素诱导激活,它与热休克蛋白32是同一种物质.HO-2生化特性及

结构都与HO-1不同,几乎不被诱导,唯一已知诱导因素是糖皮质激素^[4].与HO-1、HO-2相比,HO-3生理功能尚未完全明了,其代谢血红素的能力虽然很低,但可能对血红素依赖性的反应过程有调节作用^[3].除哺乳动物之外,植物及其它多数生物如细菌也有HO同工酶表达,例如白侯棒状杆菌就存在影响该病原微生物摄取铁的HO^[5].

HO催化氧化降解血红素分子,后者既作为底物又构成该酶活性的辅基.氧化酶解的产物包括各1分子的胆绿素、CO、游离铁.该反应过程需要消耗3分子氧和7个电子^[6].在哺乳动物,电子由NADPH-细胞色素P450还原酶提供^[7].植物和细菌则由其他供电子途径提供电子.

血红素分子首先被氧化成 α -间羟血红素,后

* 收稿日期:2001-04-16; 修回日期:2001-08-18

作者简介:郭建增(1971-),男,内蒙古原县人,博士研究生,从事神经精神药理学研究;周岐新(1947-),男,四川温江县人,博士生导师,从事神经精神药理学研究, E-mail: czhouqx@yahoo.com.cn.

者是一种去质子态的中间产物,具有自由基特征,并进一步氧化反应生成胆绿血红素(verdoheme)和CO,该反应过程不需外源还原当量,随后在NADPH-细胞色素P450-还原酶提供还原当量和氧分子参与下胆绿血红素转变成胆绿素,并释放出游离铁离子^[8,9]。

血红素也是高度保守的分子,是多数生命形式存在所必不可少的,而且也是某些氧化-还原反应的关键组分。生物合成的血红素参与构成多种蛋白质的催化单位,如:呼吸链细胞色素族,合成型及降解型细胞色素P450,过氧化氢酶,过氧化物酶,一氧化氮合酶(NOS),鸟苷酸环化酶,色氨酸吡咯酶等^[4]。血红素在反复的氧化-还原反应中起关键作用。它能稳定、紧密地与其它蛋白质如谷胱甘肽S转移酶、血红蛋白或血红素结合蛋白(hemopexin)结合。血红素自身确实是一种氧化物前体,可产生有毒的小分子,但在正常情况下我们检测不到游离的血红素,说明其即使存在也仅是微乎其微,本文就血红素加氧酶参与血红素降解的生物意义作一综述。

1 历史回顾

HO催化的反应与其他化学反应有所不同,HO作用的底物和产物具有颜色,并且容易在活体观察到。例如皮下软组织创伤后,先有黑色青肿、瘀斑(血红素的颜色),然后逐渐转变成绿色(胆绿素的颜色),最后又转变成黄色(胆红素的颜色)。正因直观的原因,人们很早就观察到了HO作用的底物和产物,但对HO的来源、意义及反应过程却是近年才开始逐渐阐明的。

早在20世纪初和中叶,Mann和London分别报道了胆色素在体外和在机体内的形成^[10,11]。20世纪80年代,随着NO作为一种气体神经递质分子地位的确立,与NO类似的CO也逐渐引起人们的注意。1987年Brune等首次发表了CO激活可溶性鸟苷酸环化酶的研究报道^[12],随后Furchgott报道了CO在内皮依赖性和非依赖性血管舒张中的作用^[13],1993年Verma关于CO作为神经信息分子的论著标志着HO-CO研究的新阶段^[14]。此后,关于HO-CO系统的研究持续升温,目前已逐步揭示了其更多更广泛的生物学活性。

2 HO同工酶的表达调控

3种HO同工酶都有不同的基因编码,其中

HO-1基因定位于人染色体22q12,HO-2定位于人染色体16p13^[15]。尽管HO-1和HO-2是进化高度保守蛋白,但二酶一级结构仅有40%相近,HO-3与HO-2结构很相近,但降解血红素的酶活性有很大差异。

大鼠HO-1基因包含4个内含子5个外显子^[16]。HO-2基因却有复杂得多的基因结构,其第一个外显子已发现至少有3个不同的非翻译5'端序列,3'端非翻译区有两个间隔600bp的polyA信号。这样在不同组织5'端序列与3'端polyA不同组合至少能产生5个不同大小转录产物,从1.3~2.1kb(1kb=1×10³bp)不等^[17]。这些序列的组合具有分化特异性和组织特异性,因此HO-2能在细胞组织的分化发育中发挥作用。

HO同工酶的蛋白和基因构成是高度保守的,但又明显不相似。由于HO-1可被GSH耗竭、NO、NO衍生物、金属元素、氧化应激等众多因素诱导激活,因此对其基因的表达调控机制研究较深入,HO-1启动子区发现一些增强子和调节片段,包含API(activator protein)结合位点,GCN4位点,热休克反应片段,血红素反应片段,金属依赖性转录位点,还有NF-κB结合位点^[16]。转录因子与这些特异位点结合活化HO-1基因。引起HO-1基因活化的刺激条件有一共同特点,即都引发氧化应激,破坏细胞氧化还原平衡。有研究证明HO-1对高氧刺激的反应依赖于位于HO-1启动子区STAT(signal transducer and activator of transcription)结合位点和位于远端增强子SX2的AP-1结合位点^[18]。一般认为HO-1的诱导依赖于以下因素:酪氨酸磷酸化^[19],AP-1激活调节反应元件^[20,21],G-jun氨基端激酶激活^[22],PKA活化^[23],丝裂原激活的蛋白激酶(MAP)途径中的ERE和P38途径激活^[24],以及NO产生^[25]。值得注意的是,NOS也是一种含血红素蛋白质,因此HO可以通过降解血红素而交互性抑制NO合成。新近报道HO-1基因有长度多态性,人类HO-1启动子区不同长度的GT重复序列调节其转录水平,30个以上重复GT使活性氧对HO-1表达的诱导能力下降^[26]。

3种HO共有-一个相同片段构成血红素催化单元,此片段称为“血红素加氧酶签章”(heme oxygenase signature)。该片段位于HO中段,由24个氨基酸组成,以组氨酸残基为中心(HO-1的132位组氨酸,HO-2的151位组氨酸,HO-3的128位组

氨酸) 形成一个疏水袋^[27], 已经证明该中心的组氨酸残基是 HO-2 酶活性所必需^[28], 与 HO-1 酶活性的关系尚无定论. 哺乳动物 HO 活性依赖 NADPH 细胞色素 C 还原酶提供还原当量. 结合了血红素的 HO 酶蛋白和 NADPH 细胞色素 C 还原酶组成暂时电子转运链. 有意思的是 HO 同工酶并不利用降解生物体内最广泛存在的血红素 b, 却有效催化不同来源的血红素 c 衍生物. 因为血红素 c 构成线粒体细胞色素 c 的辅基, 所以有研究者认为 HO 降解血红素 c 与细胞凋亡有关^[29].

3 HO 同工酶在脑的调控特点

一般来讲不同器官及细胞类型的 HO-1 调节因子是相同的. 因为脑存在血脑屏障这一功能结构, 使脑 HO-1 表达不受全身系统性刺激因子的影响, 但当脑内注射 LPS、IFN- γ 、海人草酸时都可诱导 HO-1 表达增强^[30,31]. 当然某些全身性刺激如低氧/高热, 脑缺血、创伤、出血等都激活 HO-1 表达^[32-35]. HO-1 的诱导激活快速而短暂, 例如, 低氧或高热 15 min 内就可测到 HO-1 mRNA 增高, 1 h 后表达达峰, 比正常增强 30~50 倍, 24 h 后又回到正常^[36].

Matsuoka 等的研究证明 HO-1 和 HO-2 是磷酸化蛋白, 而且其磷酸化过程不需 PKC 活性, 但海人草酸诱导人工培养胶质细胞 HO-1 表达的试验却证明 PKC 参与其中, 可能使 PKC 磷酸化 AP1, e-Fos, e-Jun 而增强它们诱导能力, PKC 参与 HO-1 基因调节可能反映出了 AP1 转录活化^[37].

NO 供体能轻度引发 HO-2 转录反应, 相比之下, HO-1 对 NO 供体的转录反应强烈得多. 而且后面将讲述 HO-2 可能是细胞内 NO 的终结者, 这说明 CO 产生与 NO 产生之间相互作用, NO 是 HO-1 诱导剂, HO-2 又调节 NO 去路. 如果是这样, HO 和 CO 在细胞中所起的作用都具备双面性, 这种动态的作用可能决定了细胞本身的生死存亡. 此外, NOS 是细胞色素 P450 内含血红素蛋白质, 因此, 它在细胞中的水平与 HO-1、HO-2 活性也息息相关.

HO-2 的 5' 端非翻译区有少量的调节序列, 其中最主要是 GRE(糖皮质激素反应元件)^[15], 目前已在 Hela 细胞系中建立了有 GRE 功能的表达体系, 并证明地塞米松能时间依赖性地增强 HO-2 mRNA 及蛋白的表达. 此转录增强具有长时性, 48 h 后 mRNA 仍维持在高水平^[38]. 糖皮质激素(Gcs)

已被证明使脑中 HO-2 主要调节子. 因为 Gcs 对 HO-2 蛋白的诱导反应强于 HO-2 mRNA, 所以认为 Gcs 主要作用于翻译水平或起稳定 HO-2 蛋白的作用. 脑和睾丸的 HO-2 表达受发育性调控, 而且肾上腺 Gcs 加速了 HO-2 出生后的表达. Gcs 也增加成年动物脑 HO-2 水平, 此外, 新生大鼠脑发育调控型 HO-2 表达增强正好与血液循环中肾上腺甾体激素高峰同时出现^[39]. 总之, 这些都说明肾上腺甾体激素是 HO-2 生理调节剂. 脑、睾丸 HO-1 并未见明显的发育相关性表达增强或为 Gcs 所诱导. 然而有意思的是尽管单纯肾上腺 Gcs 并不能上调神经元 HO-1 表达, 但对 HO-1 蛋白表达有“允许”作用.

4 HO 活性产物的功能

Ohta K 等^[40]报告 HO 缺陷患者血管内皮系统受损、血管内溶血、血红素及触珠蛋白浓度增高、肾小球血管系膜增生、毛细血管增厚、内皮脱落、内皮下不明物质沉积、小管间质性损伤严重、肾小管扩张或萎缩、间质纤维化、炎性细胞浸润、铁和触珠蛋白大量异常沉积, 患者发育迟缓而且智力低下. 这说明 HO 系统确实具有重要生理功能. 其功能的实现与其活性产物 CO、胆绿素和/或胆红素, 以及铁离子密不可分.

4.1 CO

20 世纪 80 年代 NO 研究的热潮引起人们对 CO 的关注, 因二者有很多相似之处, Marks 等在 1991 年提出“一氧化碳有生理功能吗?”的问题^[41], 1993 年 Verma, Maines 等提出 CO 像 NO 一样通过激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC) 发挥其生理功能^[14], 直到现在仍不断有研究者证明 CO 作为一种生理调节因子的功能所在^[42,43].

4.1.1 CO 与学习记忆

长时程增强(long term potentiation, LTP) 是神经突触可塑性的一种模式, 被认为是学习记忆的电生理基础. LTP 通过激活突触后膜的 NMDA 受体通道, 并维持突触前膜递质量子式释放而发挥效应. CO 可能作为一种逆行性神经递质分子在这里起到联系突触前后膜之间信息传递作用. Stevens 和 Zhou 等人首先发现内源性 CO 的产生与 LTP 形成和维持的关系^[44,45]. Marks、Ikesaya 等人也相继证明 CO 在 LTP 产生中起重要作用. 当然也有学者对他们实验中所应用的工具药 ZnPP-IX 作用的选择性提出质疑. 但过表达 HO-1 和过

表达 HO-2 转基因小鼠空间定向学习能力受损提供了有力证据^[46]。有研究者依据其试验结果提出, CO 在 LTP 的产生中起到一种基础刺激作用, 而 NO 则起到一种时相性刺激作用。值得注意的是关于阻断内源性 CO 产生对整体动物认知功能的研究报告很少, 而且相互矛盾。我们的实验证实侧脑室给予 HO 选择性抑制剂对小鼠被动回避反应无明显影响, 但能降低 moris 水迷宫中的空间定向学习成绩。从断乳之日起单独黑饲小鼠 HO-1 表达减少; 学习训练后小鼠海马 HO-1 mRNA 表达增强^[47]。

4.1.2 CO 与平滑肌张力调节

Furchgott 等报道了外源 CO 引起血管舒张^[13], Grundemar 等证明啮齿类及人的小动脉存在 HO 并产生 CO^[48], 内源性 CO 参与维持中小动脉及主动脉血管张力和血压调节。同样外源性 CO 中毒也改变血管张力, 这种作用可能与激活 NO 依赖性过程有关^[49]。有报道 CO 通过改变孤束核谷氨酸能神经传递而在心血管调节中起关键作用^[50]。抑制孤束核 HO 活性将减弱压力反射^[51]。CO 对肝血管张力也有影响, 在低血压休克时, 其调节作用甚至强于 NO。而且证实肝实质细胞, HO-2 活性产生的 CO 是调节血管张力的生理因素^[52]。

在大鼠的胃, 小鼠的小肠, 犬空肠都发现有 HO-2 存在, 提示在这些部位 CO 可能有调节胃肠道平滑肌张力的作用^[53]。Rattan 证明^[54], HO 系统广泛分布于胃肠道, 选择性抑制其活性将抑制胃肠道非肾上腺素能非胆碱能(NANC)神经介导的平滑肌舒张, 提示内源性 CO 参与消化系统神经传导。HO、NOS 基因敲除小鼠肠平滑肌舒张和抑制性神经传导都减弱, 而且 HO 敲除使肠平滑肌完全丧失对电场刺激的反应; 加外源 CO 使之恢复反应^[55]。豚鼠胎盘 HO-1、HO-2 都有表达, 可能也是调节血管张力^[56]; 人类受孕子宫肌层 HO-1、HO-2 的表达比未孕子宫增强 15 倍, CO 似乎起抑制子宫肌的收缩作用^[57]。

4.1.3 CO 与炎症细胞因子和神经元退行性变

Otterbein 等人的研究证实, CO 通过激活 MAPK 途径的(MKK)3/p38 通路, 选择性抑制致炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 MIP-1 β , 诱导抗炎细胞因子 IL-10, 使 CO 最终抑制炎症反应^[58,59]。有研究表明 HO-2 来源的 CO 参与了脊神经退行性变的发生和发展, 发生明显神经退行性变的病灶 HO-2

表达增强, 并证明神经营养因子 BDNF (Brain derived neurotrophic factor) 和 IGF-1 (insulin like growth factor-1) 诱导受创脊髓 HO-2 表达增强^[60]。大鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎, 其炎性病灶内渗出性单核细胞而非少突胶质细胞和星形胶质细胞 HO-1 表达增强, 因 CO 是 cGMP、NOS、环氧化酶调节因子, 所以 CO 可能参与了自身免疫性脑脊髓炎、神经炎病的炎症过程^[61,62]。还有研究证明 HO-1 催化产生的 CO 抑制 TNF- α 诱导的细胞凋亡^[63]。

关于 CO 作为中枢神经递质分子刺激 HPA 轴促进 CRH 释放的研究也见于报道。甚至有学者证实低浓度 CO 有助于细胞抵抗氧化应激^[64]。

4.2 胆红素

Stocker 等报道胆红素是一种具有重要生理功能的抗氧化剂^[65]。因 HO-1 就是热休克蛋白 32, 因此研究者的目光都投向 HO 来源的胆红素的抗氧化作用。如紫外照射对皮肤的氧化应激、肝缺血、内毒素中毒、肾毒性肾炎、高氧刺激的纤母细胞、低氧、动脉粥样硬化、心血管系统的细胞因子及缺血再灌等引起的氧化应激。血红素诱导 HO-1 使胆红素浓度增加并缩小离体缺血再灌大鼠心脏的梗死面积, HO 抑制剂锡原卟啉则加重缺血再灌损伤, 加入外源性胆红素起到与诱导 HO-1 同样的作用^[66]。Clark 等的研究作为 HO-胆红素系统抗氧化应激作用提供了直接证据^[67]。Kimpara 使用两种不同的抗胆红素单抗酶联免疫吸附试验证明, AD 病人脑脊液中胆红素及其衍生物水平升高。此升高与血脑屏障通透性增加关系。提示 HO 催化产生的胆红素能对抗氧化应激, 后者可能是引起 AD 病变的重要原因^[68]。

采用 HO 基因敲除和 HO 基因过表达的转基因动物, 发现肺 HO-1 过表达的大鼠能更好地耐受低氧条件^[69]; 过表达 HO-1 小鼠大脑中动脉闭塞引起的损伤明显减轻^[70]; 野生型动物的心脏移植比 HO 弱表达的心脏移植存活时间更长^[71]。低氧环境下 HO-1 基因敲除小鼠右室扩张、梗死, 而野生型无此反应^[72]。前述一先天性 HO 完全缺陷病例所出现的全身病理性改变也提示 HO 具有极重要的抗氧化应激作用^[73]。

4.3 铁离子

如前所述, HO 降解血红素时释放出与 CO 和胆绿素相同分子个数的游离铁。生物体内游离铁可通过 Fenton Haber-Weiss 反应, 参与催化生成有害的活性氧代谢物, 如羟自由基, 超氧阴离子等。

因脑组织富含多聚不饱和脂肪酸, 所以更易受活性氧、自由基攻击形成脂质过氧化物^[74]。一般认为, 铁离子过高与机体氧化应激反应增强有关。但有报道, 铁离子能被机体生成的细胞内储铁蛋白—铁蛋白迅速结合而失去催化生成自由基的作用。铁蛋白本身是一种应激反应蛋白, 经氯化正铁血红素预处理可诱导其生成增加, 但此效应要在氯化正铁血红素处理 16~ 20 h 后才能看到^[75]。同样, 紫外光照射 24 h 后铁蛋白才被高度诱导^[76]。猴蛛网膜下腔出血诱导同侧脑动脉共同表达 HO-1 和铁蛋白, HO-1 蛋白在出血后 3 d 达峰并持续 14 d 以上, 铁蛋白在 7 d 才达峰^[77]。在铁蛋白 mRNA 中, 铁调节蛋白(iron regulatory protein, IRP)与铁反应元件(iron responsive element, IRE)结合而抑制其转录, 这种结合受铁、NO、氧化应激、低氧/复氧等因素影响。发现铁蛋白重链基因有电子反应元件(electrophilic response element, EpRE), 它与铁调节蛋白结合位点共同构成铁蛋白抗氧化反应体系, 对机体氧化应激产生应答^[78]。然而在肺组织, 高氧诱导 HO-1, 游离铁生成增加更强地诱导 HO-1, 最终产生更多的铁沉积^[79]。Baranano 等发现微粒体膜上存在一种需铁转运体的 ATP 酶, 该酶与 HO-1 共同定位于微粒体膜上, 将细胞内的亚铁离子转运入微粒体囊泡。HO-1 缺陷导致的铁异常沉积与该酶活性增高有关^[80]。Lamb N J 等证明 HO-1 催化产生的亚铁离子能促进微粒体脂质过氧化反应, 而同时催化产生的胆红素并不足以对抗铁离子所造成的氧化应激损伤^[81]。Schipper 报告半胱胺、多巴胺、 β -淀粉样蛋白、IL-1 β 和 TNF- α 诱导培养的大鼠星形胶质细胞 HO-1 表达增高, 伴随着线粒体非转铁蛋白来源的铁离子沉积增加。用地塞米松或锌间卟啉 IX 抑制 HO-1 表达或降低其活性可中止此反应。AD 病患者老年斑及神经纤维缠结病灶周围表达增高的 HO-1 可能与该病病理性铁沉积有关^[82]。Denery 认为 HO-1 在体外能对抗一定程度的氧化应激, 但其能力有限, 因为 HO-1 自身活性产生的铁离子将引发进一步的氧化应激^[83]。HO-2 可能对在体状态氧化应激有保护作用, 但其过表达的后果有待尚未阐明^[84]。也有研究证明 HO-1 调节铁离子外流, HO-1 缺乏导致细胞内铁沉积死亡^[85]。在 HO-2 基因敲除动物, 尽管 HO-1 表达增强, 但动物对高氧损伤的敏感性依旧增加, 并伴随铁沉积增加, 而铁蛋白表达却未见增加^[83]。还有证据表明减少铁摄取可预防氧化应激

或减轻氧化失衡细胞的氧化应激^[86]。这里有一问题值得我们考虑, 既然游离铁是诱导铁蛋白的因素, 那么铁蛋白又怎么能够迅速地被诱导表达去结合游离铁, 使其失去诱导铁蛋白表达的能力。或许这里存在一个有相互制约机制的反应平衡, 构成一个超短反馈回路。

5 总结

如上所述, HO 活性的 3 种产物(胆红素、CO 和铁离子) 都具生物活性, 在不同情形下既可能发挥有利作用也可能造成损害作用。目前不清楚的是 HO 活性调节的空间性和时间性, 以及是否能特异性促进某一种血红素代谢产物作用增强。如正常衰老红细胞降解产生的血红素或组织内出血产生的血红素可能作为一种前氧化剂有潜在危险性, HO 被诱导表达增强可迅速降解血红素而解除此危。但与此同时产生的胆绿素和/或胆红素、CO、铁离子对机体又会产生什么影响呢? 或者, 在利用血红素降解产生的 CO 作神经递质分子时, 如何避免铁负荷增加带来的危害呢? 或者在利用血红素降解产生的抗氧化物胆绿素时, 如何将不需要的铁负荷及 CO 依赖性 cGMP 变化、血管张力变化等因素分离开呢? HO-1 和 HO-2 在这些过程中又各自扮演什么角色? HO-3 呢? 这些问题都有待进一步探讨。

参考文献 (References):

- [1] MAINES M D, TRAKSHEL G M, KUTTY R K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase—only one molecular species of the enzyme is inducible [J]. *J Bio Chem*, 1986, 261: 411–419.
- [2] TRAKSHEL G M, MAINES M D. Multiplicity of heme oxygenase isozymes HO1 and HO2 are different molecular species in rat and rabbit [J]. *J Bio Chem*, 1989, 264: 1323–1328.
- [3] McCOUBREY W K, HUANG T J, MAINES M D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase—3 [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 247: 725–732.
- [4] MAINES M D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 517–554.
- [5] WILKS A, SCHMITT M P. Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmo O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(2): 837–841.
- [6] LIU Y, ORTIZ de Montellano P R. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme

- oxygenase-1 [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6909-6917.
- [7] SCHACTER B A, NELSON E B, MARVER H S, *et al.* Immunohistochemical evidence for an association of heme oxygenase with the microsomal electron transport system [J]. *J Biol Chem*, 1972, 247: 3601-3607.
- [8] LIU Y, MOENNE-LOCCOZ P, LOEHR T M, *et al.* Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 6909-6917.
- [9] MATERA K M, TAKAHASHI S, FUJII H, *et al.* Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of α -hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271: 6618-6624.
- [10] MANN F C, SHEARD C, BOLLMAN J L, *et al.* The formation of bile pigment from hemoglobin [J]. *Am J Physiol*, 1926, 76: 306-315.
- [11] LONDON I M, WEST K, SHEMIN D, *et al.* On the origin of bile pigment in normal man [J]. *J Biol Chem*, 1950, 184: 351-358.
- [12] BRUNE B, ULLRIVH V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase [J]. *Mol Pharmacol*, 1987, 32(4): 497-504.
- [13] FURCHGOTT R F, JOTHIANANDIN S. Endothelium-dependent and independent vasodilation involving cGMP: Relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide, and light [J]. *Blood Vessels*, 1991, 28: 52-61.
- [14] VERMA A, HIRSCH D J, GLATT C E, *et al.* Carbon monoxide: A putative neural messenger [J]. *Science*, 1993, 259: 381-384.
- [15] KUTTY R K, KUTTY G, RODRIQUEZ I R, *et al.* Chromosomal localization of human heme oxygenase genes: heme oxygenase-1 maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 maps to chromosome 16p13.3 [J]. *Genomics*, 1994, 20: 513-516.
- [16] MULLER R M, TAGUCHI H, SHIBAHARA S. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 6795-6802.
- [17] LIU N, WANG X, McCOUBREY W K, *et al.* Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon specific to rat testis; control by corticosterone of the oxygenase protein expression [J]. *Gene*, 2000, 241: 175-183.
- [18] LEE P J, CAMHI S L, CHIN B Y, *et al.* AP-1 and SP1 mediate hyperoxia-induced gene transcription of heme oxygenase-1 [J]. *Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(1): L175-182.
- [19] MASUYA Y, HIOKI K, TOKUNAGA R, *et al.* Involvement of the tyrosine phosphorylation pathway in induction of human heme oxygenase-1 by hemin, sodium arsenite, and cadmium chloride [J]. *J Biochem*, 1998, 124: 628-633.
- [20] HARTSFIELD C L, ALAM J, CHOI A M. Transcriptional regulation of the heme oxygenase 1 gene by pyrrolidine dithiocarbamate [J]. *FASEB J*, 1998, 12: 1675-1682.
- [21] CAMHI S L, ALAM J, CHOI A M, *et al.* Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by δ distal enhancers: Role of reactive oxygen intermediates and AP-1 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18: 226-234.
- [22] OGURO T, HAYASHI M, NAKAJO S, *et al.* The expression of heme oxygenase-1 gene responded to oxidative stress produced by phorone, a glutathione depletor, in the rat liver, the relevance to activation of c-jun N-terminal kinase [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 287: 773-778.
- [23] IMMENSCHUH S, KIEZTMANN T, HINKE V, *et al.* The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase a signaling pathway in rat hepatocyte cultures [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 53: 483-491.
- [24] ELBIRD K K, WHITMARSH A J, DAVIS R J, *et al.* Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 [J]. *Hepatoma Cells*, 1998, 273: 8922-8931.
- [25] IMMENSCHUH S, TAN M, RAMADORI G, *et al.* Nitric oxide mediates the lipopolysaccharide-dependent upregulation of the heme oxygenase-1 gene expression in cultured rat Kupffer cells [J]. *J Hepatol*, 1999, 30: 61-69.
- [26] YAMADA N, YAMAYA M., OKINAGA S, *et al.* Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema [J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66: 187-195.
- [27] ROTENBERG M O, MAINES M D. Characterization of a cDNA encoding rabbit brain heme oxygenase-2 and identification of a conserved domain among mammalian heme oxygenase isozymes: possible heme-binding site? [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 290: 336-344.
- [28] McCOUBREY W K Jr, MAINES M D. Domains of rat heme oxygenase-2 the amino terminus and histidine 151 are required for catalytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993, 302: 402-408.
- [29] KUTTY R K, MAINES M D. Oxidation of heme c derivatives by purified heme oxygenase: evidence for the presence of one molecular species of heme oxygenase in rat liver [J]. *J Biol Chem*, 1982, 257: 9944-9952.
- [30] KITAMURA Y, FURUKA M, MATSUOKA Y, *et al.* *In vivo* induction of inducible nitric oxide synthase by microinjection with interferon γ and lipopolysaccharide in rat hippocampus [J]. *Glia*, 1996, 18: 233-243.
- [31] MATSUOKA Y, OKAZAKI M, KAKIMURA J, *et al.* Kainic acid induction of heme oxygenase *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neuroscience*, 1998, 85: 1223-1233.
- [32] EWING J F, MAINES M D. *In situ* hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: differential distribution of isozyme 1 and 2 [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1992, 3: 559-570.
- [33] MATZ P G, WENSTEIN P R, SHARP F R. Heme oxygenase-1 and heat shock protein 70 induction in glia and neurons throughout rat brain after experimental intracerebral hemorrhage [J]. *Neurosurgery*, 1997, 40: 152-160.
- [34] TURNER C P, BERGEON M, MATZ P, *et al.* Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin

- [J]. *J Cereb Blood Flow Metabol*, 1998, 18: 257–273.
- [35] PANAHIAN N, YOSHIURA M. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice [J]. *J Neurochem*, 1999, 72: 1187–1203.
- [36] EWING J F, MAINES M D. Rapid induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase-2 is not a heat shock protein [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 5364–5368.
- [37] MATSUOKA Y, KITAMURA Y, KAKIMURA J, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 mediated by non-NMDA and metabotropic receptors in glial cells: possible involvement of reactive oxygen species production and protein kinase C activation [J]. *Neuropharmacology*, 1999, 38: 825–834.
- [38] RAJU V S, McCOUBREY W K Jr. Regulation of heme oxygenase-2 mRNA and protein by glucocorticoids: characterization of a functional GRE [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1997, 1351: 89–104.
- [39] MUNCK A, GUYRE P, HOLBOOK N. Physiological functions of glucocorticoids during stress and their relation to pharmacological actions [J]. *Endocrinol Rev*, 1984, 5: 1–25.
- [40] OHTA K, YACHIE A, FUJIMOTO K, *et al.* Tubular injury as a cardinal pathologic feature in human heme oxygenase-1 deficiency [J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 35(5): 863–870.
- [41] MARKS G S, BRAIN J F, NAKATSU K, *et al.* Does carbon monoxide have a physiological function [J]? *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12: 185–188.
- [42] HO K M, NY L, McMURRAY G, *et al.* Co-localization of carbon monoxide and nitric oxide synthesizing enzymes in the human urethral sphincter [J]. *J Urol*, 1999, 161: 1968–1972.
- [43] STEINER A A, BRANCO L G. Carbon monoxide is the heme oxygenase product with a pyretic action: evidence for a cGMP signaling pathway [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280(2): 448–457.
- [44] STEVENS C F, WANG Y. Reversal of long-term potentiation by inhibitors at heme oxygenase [J]. *Nature*, 1992, 357: 240–244.
- [45] ZHOU M, SMALL S A, KANDEL E R, *et al.* Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus [J]. *Science*, 1993, 260: 1946–1950.
- [46] MORGAN D, HOLCOMB L, SAAD I, *et al.* Impaired spatial navigation learning in transgenic mice over-expressing heme oxygenase-1 [J]. *Brain Res*, 1998, 808: 110–112.
- [47] 郭建增, 周岐新. 血红素加氧酶1涉及小鼠被动和空间学习记忆[D]. 重庆医科大学博士学位论文, 2001. 31–46.
- [48] GRUNDEMAR I, JOHANSSON M B, EKELUND M, *et al.* Haem oxygenase activity in blood vessel homogenates as measured by carbon monoxide production [J]. *Acta Physiol Scand*, 1995, 153: 203–204.
- [49] THOM S R, FISHER D, XU Y A, *et al.* Role of nitric oxide derived oxidants in vascular injury from carbon monoxide in the rat [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: 984–992.
- [50] SILVA C C S, ALMEIDA V A, HAIBARI A S, *et al.* Role of carbon monoxide in L-glutamate-induced cardiovascular responses in nucleus tractus solitarius of conscious rats [J]. *Brain Res*, 1999, 824: 147–152.
- [51] LO W C, JAN C R, CHIANG H T, *et al.* Modulatory effects of carbon monoxide on baroreflex activation in nucleus tractus solitarius of rats [J]. *Hypertension*, 2000, 35(6): 1253–1257.
- [52] PANNEN B H, BAUER M. Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats [J]. *Life Sci*, 1998, 62: 2025–2033.
- [53] MILLER S M, FARRUGIA G, SCHMALZ P F, *et al.* Heme oxygenase-2 is present in interstitial cell networks of the mouse small intestine [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114: 239–244.
- [54] RATTAN S, CHAKDER S. Influence of heme oxygenase inhibitors on the basal tissue enzymatic activity and smooth muscle relaxation of internal anal sphincter [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294(3): 1009–1016.
- [55] XUE L, FARRUGIA G, MILLER S M, *et al.* Carbon monoxide and nitric oxide as neurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1851–1855.
- [56] ODRICICH M J, GRAHAM C H, KIMURA K A, *et al.* Heme oxygenase and nitric oxide synthase in the placenta of the guinea pig during gestation [J]. *Placenta*, 1998, 19: 509–516.
- [57] ACEVEDO C H, AHMED A. Hemeoxygenase-1 inhibits human myometrial contractility via carbon monoxide and is upregulated by progesterone during pregnancy [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 949–955.
- [58] OTTERBEIN L E, BACH F H, ALAM J, *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(4): 422–428.
- [59] BROUARD S, OTTERBEIN L E, ANRATHER J, *et al.* Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1015–1026.
- [60] GORDH T, SHARMA H S, AZIZI M, *et al.* Spinal nerve lesion induces upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase in the spinal cord. An immunohistochemical investigation in the rat [J]. *Amino Acids*, 2000, 19(1): 373–381.
- [61] SCHLUESENER H J, SEID K. Heme oxygenase-1 in lesions of rat experimental autoimmune encephalomyelitis and neuritis [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 110(1–2): 114–120.
- [62] SPEIF G, DENNOG C, EICHHOM U. Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(10): 1795–1799.
- [63] IRINA P, OTTERBEIN L E, ALAM J, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278: L312–319.
- [64] KWON K C, RIVIER C L. Nitric oxide and carbon monoxide have a stimulatory role in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to physico-emotional stressors in rats [J]. *Endocrinology*,

- 2000, 141: 2244–2253.
- [65] STOCKER R, YAMAMOTO Y, McDONAGH A F, *et al.* Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance [J]. *Science*, 1987, 235: 1043–1046.
- [66] CLARK J E, FORESTI R, SARATHCHANDRA P, *et al.* Heme oxygenase-1 derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(2): H643–51.
- [67] CLARK J E, FORESTI R, GREEN C J, *et al.* Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress [J]. *Biochem J*, 2000, 348 Pt 3: 615–619.
- [68] KIMPARA T, TAKEDA A, YAMAGUCHI T, *et al.* Increased bilirubins and their derivatives in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2000, 21(4): 551–554.
- [69] OTTERBEIN L E, KOLLS J K, NANTEL L L, *et al.* Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 1047–1054.
- [70] PANAHIAN N, OSHIURA M. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice [J]. *J Neurochem*, 1999, 72: 1187–1203.
- [71] SOARES M P, LIN Y, ANRATHER J, *et al.* Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1073–1077.
- [72] YET S F, PERRELLA M A, LAYNE M D, *et al.* Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: R23–R29.
- [73] YACHIE A, NIIDA Y, WADA T, *et al.* Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 129–135.
- [74] FREVA Q S, STEVEN Y Q, GARRY R B. Iron and free radical oxidations in cell membranes [J]. *Cellular and Molecular Biology*, 2000, 46(3): 657–662.
- [75] LIN F, FIROTTI A. Hemin-enhanced resistance of human leukemia cells to oxidative killing: Antisense determination of ferritin involvement [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 352: 51–58.
- [76] APPELEGATE L A, SCALETTA C, PANIZZON R, *et al.* Evidence that ferritin is UV inducible in human skin: Part of a putative defense mechanism [J]. *J Invest Dermatol*, 1999, 111: 159–163.
- [77] ONO S, ZHANG Z D, MARTON L S, *et al.* Heme oxygenase-1 and ferritin are increased in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage in monkeys [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(7): 1066–1076.
- [78] TSUJI Y, AYAKI H, WHITMAN SP, *et al.* Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress [J]. *Mol Cell Biol*, 2000 20(16): 5818–5827.
- [79] FOGG S, AGARWAL A, NICK H S, *et al.* Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase-1 gene expression in pulmonary endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20: 797–804.
- [80] BARANANO D E, WOLOSKER H, BAE B I, *et al.* A mammalian iron ATPase induced by iron [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(20): 15166–15173.
- [81] LAMB N J, QUINLAN G J, MUMBY S, *et al.* Haem oxygenase shows pro-oxidant activity in microsomal and cellular systems: implications for the release of low-molecular-mass iron [J]. *Biochem J*, 1999, 344(Pt 1): 153–158.
- [82] SCHIPPER H M, CHERTKOW H, MEHINDATE K, *et al.* Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration [J]. *Exp Gerontol*, 2000, 35(6–7): 821–830.
- [83] DENNERY P A, SPITZ D R, YANG Y, *et al.* Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2 [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1001–1011.
- [84] DENNERY P A. Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury [J]. *Curr Top Cell Regul*, 2000, 36: 181–199.
- [85] FERRIS C D, JAFFREY S R, SAWA A, *et al.* Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(3): 152–157.
- [86] BRAUN V. Regulation of iron uptake minimizes iron-mediated oxidative stress [J]. *J Biosci*, 1998, 23: 483–489.