

■ 生物医学研究技术丛书

细胞信号转导 研究技术

◇
主编 李俊发 贺俊崎



中国协和医科大学出版社

生物医学研究技术丛书

细胞信号转导研究技术 (C115)

细胞信号转导研究技术 / 李俊发、贺俊崎主编. — 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008.6

ISBN 978-7-81136-037-0

I. ①细… II. 李… III. 细胞—信号—转导 IV. Q732

细胞信号转导研究技术

李俊发 贺俊崎 主 编

主 编	李俊发
责任编辑	贺俊崎
出 版 社	中国协和医科大学出版社
网 址	http://www.cup.com.cn
经 销	新华书店
印 刷	北京
开 本	787mm×1092mm 1/16
印 张	24
字 数	378千字
版 次	2008年6月第1版
印 数	1—3000
定 价	62.00元

ISBN 978-7-81136-037-0

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞信号转导研究技术 / 李俊发, 贺俊崎主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2008.6

ISBN 978-7-81136-037-0

I. 细… II. 李… III. 细胞-信号-转导 IV. Q735

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 059763 号

细胞信号转导研究技术

主 编: 李俊发 贺俊崎

责任编辑: 谢 阳

出版发行: 中国协和医科大学出版社

(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com

经 销: 新华书店总店北京发行所

印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 700×1000 毫米 1/16 开

印 张: 24.25

彩 图: 1

字 数: 378 千字

版 次: 2008 年 8 月第一版 2008 年 8 月第一次印刷

印 数: 1 — 3000

定 价: 62.00 元

ISBN 978-7-81136-037-0/R·037

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

细胞信号转导研究技术

李俊发 贺俊崎 主 编
李慎涛 张 红 邵 国 副主编

参编人员 (以姓氏拼音为序)

卜祥宁	首都医科大学神经生物学系
陈 鹏	首都医科大学生物化学与分子生物学系
程 杉	首都医科大学生物化学与分子生物学系
迟锦玉	首都医科大学生物化学与分子生物学系
贺俊崎	首都医科大学生物化学与分子生物学系
韩 松	首都医科大学神经生物学系
黄 娉	首都医科大学神经生物学系
江 君	首都医科大学神经生物学系
孔 璐	首都医科大学生物化学与分子生物学系
李积凤	首都医科大学生物化学与分子生物学系
李俊发	首都医科大学神经生物学系
李慎涛	首都医科大学免疫学系
李延华	首都医科大学生物化学与分子生物学系
马艳梅	首都医科大学生物化学与分子生物学系
戚智锋	首都医科大学神经生物学系
邵 国	内蒙古科技大学包头医学院生物医学研究中心
沈 慧	首都医科大学生物化学与分子生物学系
孙丽翠	首都医科大学生物化学与分子生物学系
唐佐青	首都医科大学细胞生物学系
余和芬	首都医科大学生物化学与分子生物学系
杨巍巍	首都医科大学神经生物学系
张 红	首都医科大学细胞生物学系
张 楠	首都医科大学神经生物学系
张静宜	首都医科大学神经生物学系
张九芹	首都医科大学生物化学与分子生物学系
赵焕英	首都医科大学神经生物学系
郑君芳	首都医科大学生物化学与分子生物学系
江 君	首都医科大学神经生物学系

绘 图

前 言

信号转导原本为物理学专用名词,1977年 Hildebrand 第一次使用该术语,用于描述生物体细胞外信号通过与细胞表面的受体相互作用,转变为胞内信号并在细胞内传递的过程。随后“信号转导”被 Springer、Koman 和 Kenny 等人相继使用。然而,直到1980年, Martin Rodbell 在《Nature》杂志上发表一篇有关“信号转导”的综述后,该术语才被广泛地应用于生物学研究领域。同时, Martin Rodbell 本人也由于开创了细胞信号转导这一崭新的研究领域,于1994年和 Alfred G Gilman 共同获得了诺贝尔医学或生理学奖。

目前,生物医学研究的发展突飞猛进,继20世纪遗传密码、基因转录、翻译和蛋白质修饰等基本规律的研究获得突破之后,如何控制细胞的基因表达、增殖、分化和发育等细胞信号转导过程将成为本世纪生物学研究领域的最大挑战。细胞信号转导主要以细胞感受、转导机体内外环境信息的分子通路、生物个体发育过程中调节基因表达和代谢生理反应等为其主要的研究内容。它不仅涉及细胞生物学、分子生物学、生物化学、生理学和免疫学等基础学科的研究领域,而且与临床医学中的一些重大疾病的发病和治疗密不可分。因此,近年来细胞信号转导的研究引起了国内外生命科学界的广泛关注,有关细胞信号转导方面的研究论文大量地出现在与生命科学有关的期刊中。

细胞信号转导几乎涉及细胞内所有的生理活动。独立的生物体,如酵母和细菌,在温度、渗透压和营养成分发生变化时,通过合成所需蛋白质,来提高自身在一定条件下的生存能力;有活动能力的细胞在遇到趋化因子时,向源头移动;对于动物,肾上腺素加强细胞的新陈代谢,生长素促进细胞进行基因复制与分裂;生物在多变,甚至于恶劣的环境条件下,对外界刺激的反应具有惊人的适应能力。对于这些生命现象内在的分子机制,即细胞识别刺激并把这种识别转变为反应的过程的了解,都依赖于我们对细胞信号转导知识的积累。

细胞信号转导一般经过以下几个典型的步骤:第一,外界刺激激活受体,这种刺激一般是一个能与受体结合的配体;第二,被激活的受体在细胞内将该刺激转导为一个化学信号,通常体现为一种信号分子的浓度(如 cAMP 和 Ca^{2+}) 或者一种信

号蛋白(如钙调蛋白)的活性变化。生物体通过将一种信号(刺激)转变为另一种信号可以将刺激信号不断放大;第三,细胞内化学信使对效应器系统起作用,导致细胞的行为发生改变。整合的输入信号,通常经过平行的信号传导、反馈或二者共同作用,来影响转导的过程和最终的效应阶段。效应器系统包括控制基因表达的转录因子、分泌调节物、代谢酶、细胞骨架的传感器、细胞周期的调节蛋白、细胞表面受体和细胞膜上的离子通道等。多条信号转导通路都可在这些效应器系统中得到必要的整合,而不同的刺激信号又能决定细胞特定的生理反应。

研究细胞信号转导通路,是一项十分具有挑战性的工作。首先,细胞拥有上百条不同的信号转导通路,包含成千种不同的蛋白质作为各种细胞信号转导的工作元件。熟悉和掌握这些细胞信号转导通路十分琐碎,困难。其次,这一领域内的研究进展虽然迅猛、惊人,但人类对于细胞信号转导机制的认识仍然很不完整,一些重要的调控机制依然不为人所知,因此每年都有着新的转导机制被发现。第三,信号转导机制很少是简单线性的通路,即简单地从一个刺激到一种行为变化,而多是通过多条信号转导的分支与汇聚来实现的,即一种输入信息可同时影响多个效应器系统,同时多种输入信息也可同时影响同一个效应器系统。这就使得细胞信号转导通路形成了一个复杂的网络结构。第四,信号转导通路存在具有促进作用的正反馈环和抑制作用的负反馈环,这些反馈环可将信号转变为短暂的生理反应。

面对这些挑战,以及便于广大读者阅读和理解,在《细胞信号转导研究技术》书中,我们共收编了28章内容,其中前10章概要地介绍了有关细胞信号转导的基本理论,后18章较为详细地介绍了细胞信号转导研究中的常见技术和方法。我们期望本书能够成为适合我国综合性大学和医学院校相关专业研究生的教科书,成为我国从事生命科学、基础或临床医学研究的科学工作者的参考书。另外,值得一提的是参加本书编写的主要人员为工作在第一线的硕士或博士毕业生,书中收录的很多技术方法都是他们多年实验工作经验的总结和描述。我们期望通过本书对于细胞信号转导有关内容的基本概念和目前国际上常见研究技术的介绍,不仅能进一步丰富研究生和有关研究人员对细胞信号转导的了解,掌握目前国际的研究现状,同时有助于开拓从事生命科学、基础或临床医学研究的同学们的思路,为今后的科研课程设计打下良好的理论基础。

李俊发 贺俊崎

2008年3月12日于首都医科大学



李俊发，男，博士，教授、博士生导师。现任首都医科大学神经生物系副主任、分子生物学实验测试室主任，兼中国生理学会理事、北京生理学会秘书长、《生理通讯》主编、《基础医学与临床》常务编委和《中华眼底病杂志》编委等学术职务。2006年6月在首都医科大学神经生物学专业获理学博士学位；1996~2001年，美国国立卫生研究院（NIH）做访问学者；2005年在美国德州大学医学部（UTMB）做访问研究员。从事细胞信号转导、蛋白质化学修饰，以及脑缺血/低氧性损伤和适应形成的细胞分子机制等领域的研究工作。近5年获得国家、部和市级科研和人才基金等14项课题资助，其中3项国家自然科学基金。目前已在国内外发表论文80余篇，其中在J Biol Chem 和 Proc Natl Acad Sci USA 等SCI杂志上发表论文29篇。



贺俊崎，男，博士，北京市特聘教授、教育部新世纪优秀人才、博士生导师。1998 年在中国协和医科大学获博士学位；1998 ~ 2003 年在美国 Emory University 学习；2003 ~ 2004 年在 Emory University 任职。贺俊崎教授所从事的研究方向为细胞信号转导与蛋白质组学，目前着重研究 PDZ 蛋白细胞信号转导通路及 PDZ 蛋白的生物学功能。研究工作获国家自然科学基金、教育部博士点基金、北京市自然科学基金、北京市教委重点课题、教育部新世纪优秀人才奖励计划以及北京市优秀人才奖励计划等多种基金资助。多项研究成果发表于 J Biol Chem、Oncogene 等多种国际著名期刊上。

目 录

第一部分 细胞信号转导基本理论	(1)
第 1 章 配体与受体简述	(3)
第 2 章 G 蛋白及其偶联的效应酶	(17)
第 3 章 蛋白激酶与蛋白磷酸酶	(31)
第 4 章 蛋白激酶 C 与细胞信号转导	(51)
第 5 章 蛋白结构域与细胞信号转导	(78)
第 6 章 钙离子与细胞信号转导	(89)
第 7 章 受体酪氨酸激酶与细胞信号转导	(104)
第 8 章 非受体蛋白酪氨酸激酶与细胞信号转导	(122)
第 9 章 受体丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶与细胞信号 转导	(137)
第 10 章 磷脂酰肌醇 3 - 激酶、蛋白激酶 B 与细 胞信号转导	(156)
第二部分 细胞信号转导研究技术	(175)
第 11 章 生物样品采集、贮存及预处理技术	(177)
第 12 章 蛋白质分离纯化技术	(194)
第 13 章 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	(206)
第 14 章 蛋白质染色技术	(215)
第 15 章 蛋白质印迹技术	(230)
第 16 章 双向电泳技术	(238)
第 17 章 蛋白质免疫沉淀技术	(267)
第 18 章 染色体免疫共沉淀技术	(278)
第 19 章 凝胶电泳迁移率变动分析技术	(285)

第 20 章	免疫组织化学技术	(291)
第 21 章	哺乳动物细胞中基因瞬时表达技术	(301)
第 22 章	RT-PCR 技术	(309)
第 23 章	RNA 干扰技术	(322)
第 24 章	DNA 点突变及报告基因荧光素酶技术	(333)
第 25 章	蛋白质半衰期检测技术	(340)
第 26 章	β -O 连接 N-乙酰葡萄糖胺糖基化位点检测技术	(349)
第 27 章	蛋白质甲基化研究技术	(360)
第 28 章	生物质谱技术	(371)
(85)		章 2 第
(88)		章 3 第
(104)		章 4 第
(122)		章 5 第
(131)		章 6 第
(137)		章 7 第
(150)		章 8 第
(172)		章 9 第
(177)		章 10 第
(194)		章 11 第
(206)		章 12 第
(212)		章 13 第
(230)		章 14 第
(238)		章 15 第
(267)		章 16 第
(278)		章 17 第
(282)		章 18 第
(282)		章 19 第

第一部分

细胞信号转导基本理论

第1章 配体与受体简述

生物体由多种具有特殊结构和功能的细胞组成，是一个复杂的有机整体。生物体对外界刺激的反应，需要通过信号转导系统来传递，从而调控机体内的特定功能，以保证机体生命活动的正常进行。细胞信号转导 (signal transduction) 是指细胞外信号通过与细胞表面或细胞内受体的结合，引发胞内级联反应，进而调节胞内特定蛋白酶的活性或诱导特定基因的表达，使细胞发生应答反应的过程。生物体细胞之间信息的传递，除了可依靠直接接触或缝隙连接外，更主要是通过配体与受体结合所介导的细胞信号转导反应来实现的。作为细胞信号转导过程中的重要组成成分，本章主要从概念、分类及功能等方面，对配体与受体作一简要介绍。

1 配体

配体 (ligand) 是生物体内能特异结合并激活受体的小分子化合物或多肽，也称为第一信使，包括激素、神经递质、细胞因子、淋巴因子、生长因子和化学诱导剂等物质。按其来源和化学性质不同可分为胺类信使、肽类激素、生长因子和脂肪酸衍生物等 (表 1.1)。按其特点和作用机制，第一信使主要包括以下几类：

1.1 激素

激素通常由远离靶器官的内分泌细胞分泌，随血液循环运输到生物体各部位而发挥作用。一旦进入血液循环，它们被大量稀释或被相应的酶降解。在循环中，它们大多与特异的结合蛋白形成复合物。靶细胞周围的激素浓度十分低，所以细胞的受体必须对激素有很高的亲和力。尽管一个靶细胞可以在几毫秒之内与激素相结合，但总的反应时间跨度在几秒到几小时不等。按激素的化学组成可分为含氮激素、类固醇激素和脂肪酸衍生物等。其中含氮激素包括胺类激素 (如肾上腺素、甲状腺素)、肽类激素 (几种促激素的释放因子，即调节肽) 和蛋白质激素 (如

胰岛素)等;类固醇激素包括性激素(如雌二醇、睾酮)、糖皮质激素(皮质醇)和盐皮质激素(醛固酮)。大多数含氮激素是水溶性的,它们不能穿过靶细胞的脂质双分子层,只能通过与靶细胞表面相应的受体结合,经过信号转导,在细胞内产生第二信使或直接激活蛋白激酶和蛋白磷酸酶等酶的活性,引起细胞的应答反应。而类固醇激素和甲状腺素是脂溶性激素,可以穿过细胞膜与细胞内受体形成复合物,进入细胞核启动 mRNA 的转录,发挥其生理功能。不同的含氮激素在分子量上差异很大,从几个氨基酸到完整的蛋白质不等。例如,促甲状腺激素释放激素(TRH)只由三个氨基酸残基组成,而卵泡刺激素(FSH)和促甲状腺激素(TSH)都是异二聚体蛋白,含有大约 200 个氨基酸残基。

1.2 生长因子

尽管一百多年前就有关于生物组织可以在体外存活报道,但直到 20 世纪 50 年代分离细胞的常规培养技术才开始建立。哺乳动物分离细胞的存活与否取决于培养基的成分。传统的培养基是含有营养成分和维生素的盐溶液。其中一个重要的成分是动物血清,比如胎牛血清。没有血清,多数培养细胞的 DNA 将无法复制,从而不能增殖。自然界中最好的诱导细胞分裂的刺激物存在于自然凝血的动物血清中。后来,人们分离出了一个具有促进有丝分裂特性的多肽,分子量约为 30kD,由血小板释放,被称为血小板源性生长因子(PDGF)。PDGF 是生长因子信使的一种,生长因子家族由 40 多个成员组成,分子量从 5.7kD(胰岛素)、6kD(表皮生长因子)到 78kD(转铁蛋白)不等。细胞通过其表面的受体与生长因子结合,诱发多种生物学效应。除了促进或抑制生长,生长因子也能启动细胞凋亡、分化和基因表达。与激素不同,生长因子的作用可持续数天,但其作用范围较小,仅影响邻近细胞的生长与功能。

1.3 细胞因子

人们在发现生长因子的同时,还发现了几种与免疫细胞相互作用的细胞外信号蛋白。由于它们可激活或调节免疫细胞的增殖,所以起初被称为“免疫细胞因子”。后来,人们发现它们也可作用于免疫或炎症系统的其他细胞,又被简化称为“细胞因子”。由于生长因子和细胞因子功能多样,所以很难明确界定二者的区别。细胞因子包括上面提到的生长因子,还有干扰素(IFN)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素(IL)

和粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等。化学趋化因子也属于细胞因子,通过趋化炎症细胞引起局部炎症反应。

1.4 血管活性物质

组织的生理损伤或由炎症反应引起的损伤可进一步产生炎症反应。这是机体的一种防御机制,特异细胞(多为白细胞)聚集在炎症部位,以相同的方式移动,隔离或减轻损伤。这一过程相当复杂,包括细胞和众多细胞外信使的相互作用。这些细胞外信使中有诱发炎症反应的前炎症介质和减轻炎症的抗炎介质。为使白细胞在局部的聚集达到一定的浓度,局部区域血管扩张使其通透性增加。使血管扩张的物质包括组胺(由肥大细胞和嗜碱粒细胞释放)、5-羟色胺(5-HT,血小板释放)和前炎症介质(如缓激肽)。

二十碳物质是另一类血管活性物质,多由不饱和脂肪酸——花生四烯酸衍生而成。由于花生四烯酸和它的衍生物含有二十个碳原子,所以称为二十碳物质。二十碳物质包括前列腺素、血栓素和白三烯等。它们作为有力的旁分泌或自分泌物质,在短距离发挥作用,调控细胞的许多病理生理功能。在炎症反应中,二十碳物质可引起血浆渗出、皮肤发红或疼痛。阿司匹林由于能抑制此通路中前列腺素的生成而具有抗炎和减轻疼痛的作用。

1.5 神经递质和神经肽

神经递质也是一种第一信使,但其在化学突触处的释放与结合,迥然不同于内分泌信号。神经递质包括胆碱类的乙酰胆碱、氨基酸类的 γ -氨基丁酸和 γ -甘氨酸等,以及单胺类的去甲肾上腺素、多巴胺和5-羟色胺等。在突触前细胞,含有神经递质的囊泡在局部释放少量神经递质。单个神经元只容纳很少量的神经递质,这种构成保证了相对少的囊泡通过胞外分泌释放,在突触间隙的递质可以快速有效的聚集,经突触间隙扩散并和突触后细胞上的受体结合。从宏观上讲,递质的扩散是相当慢的,但是由于突触前后细胞的距离很短(小于 $0.1\mu\text{m}$),保证了递质在神经细胞之间,以及神经肌肉接头处的快速聚集。在中枢神经系统中,谷氨酸是主要的兴奋性神经递质, γ -氨基丁酸和 γ -甘氨酸是主要的抑制性神经递质。乙酰胆碱(ACh)是一种在神经肌肉接头处起重要作用的兴奋性神经递质。递质起兴奋性还是抑制性作用,取决于神经递质受体所调节的离子通道的性质。

表 1.1 循环中常见的第一信使

分类	配体	来源	作用靶点	主要功能
胺类信使	肾上腺素	肾上腺髓质	心脏	心率加快, 血压增加
			平滑肌	收缩或舒张
			肝脏和肌肉	糖原分解
			脂肪组织	脂质分解
			小动脉平滑肌	血管收缩
			广泛	调节代谢
	去甲肾上腺素	肾上腺髓质	广泛	调节代谢
甲状腺素	甲状腺	广泛	调节代谢	
肽类激素	5-羟色胺	血小板	小动脉, 小静脉	血管扩张, 血管通透性增加
	组胺	肥大细胞, 嗜碱性粒细胞	小动脉, 小静脉	血管扩张, 血管通透性增加
			很多组织	细胞对葡萄糖的摄取
	胰岛素	胰腺 β 细胞	很多组织	糖原合成
	胰高血糖素	胰腺 β 细胞	很多组织	蛋白质合成
			肝脏	糖原分解
	促胃液素	肠	胃	分泌盐酸和胃蛋白酶
促胰液素	小肠	胰腺	分泌消化酶	
缩胆囊素	小肠	胰腺	分泌消化酶	
心房钠尿肽	心脏	肾脏	水钠利尿	
促肾上腺皮质激素	腺垂体	脂肪组织	脂质分解	
	卵泡刺激素	腺垂体	肾上腺皮质	分泌皮质醇等
			卵母细胞	生长
	黄体生成素	腺垂体	卵泡	合成雌激素
			卵母细胞	成熟
	促甲状腺激素	腺垂体	卵母细胞	合成雌激素、黄体激素
			甲状腺	甲状腺激素生成与释放
	甲状旁腺激素	甲状旁腺	骨骼	释放钙及磷酸盐
	血管加压素 (抗利尿激素)	下丘脑合成、神经垂体分泌	肾脏	钙重吸收
			小动脉平滑肌	尿中水重吸收
	催产素	下丘脑合成、神经垂体分泌	子宫平滑肌	血管收缩时血压升高
			输乳管	子宫颈膨胀
				泌乳

续 表

分类	配体	来源	作用靶点	主要功能
生长因子	表皮生长因子	很多细胞类型	上皮和其他细胞	生长
	生长激素	腺垂体	肝脏	生成生长激素介质
	胰岛素样生长因子 1/2	肝脏	骨骼、肌肉和其他细胞	生长
	转化生长因子	很多位置	广泛	控制生长
脂肪酸衍生物	前列腺素	大部分体细胞	广泛	炎症反应, 血管舒张

2 受体

受体是分布在细胞膜上或细胞内, 可与配体特异结合的蛋白质分子, 与配体 (激素、神经递质和细胞因子等) 结合后, 通过信号转导与放大系统引发细胞内一系列的化学反应, 产生多种生理效应。常见的神经递质及其受体系统如下 (表 1.2):

表 1.2 常见神经递质及其受体

受体	亚型	类型	分布和功能
乙酰胆碱受体	N1 ~ 2	离子通道	N2 分布于神经肌肉接头 (骨骼肌细胞膜), N1 分布于神经节。M 受体分布于胆碱能神经节后纤维所支配的效应器, 如心脏、胃肠平滑肌、膀胱逼尿肌、瞳孔括约肌和各种腺体; 参与学习和记忆、觉醒与睡眠、感觉与运动、内脏活动以及情绪等多方面的调节活动
	M1 ~ 5	G 蛋白偶联受体	
谷氨酸受体	NMDA, AMPA, KA	离子通道	广泛分布于中枢神经系统, 参与神经元的兴奋产生、传导以及学习、记忆等高级神经活动的形成
	mGluR1 ~ 8	G 蛋白偶联受体	