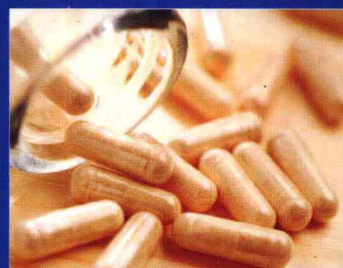
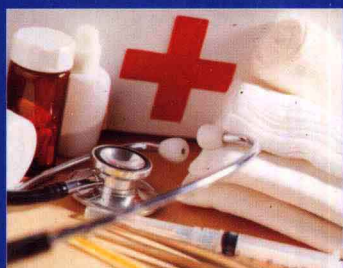


A Practical Handbook of Clinical
Research Work and Experiment

临床医师

科研与实践指导

主 编 冯 帆 高旭东 王春平



本书为指导临床医师从事医学实践

开展科研活动的实用指导书

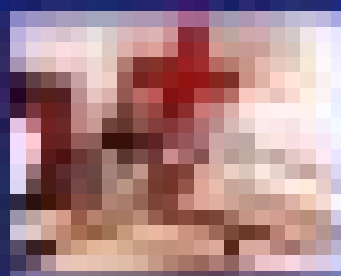
适合临床医师和医学研究生使用

陕西师范大学出版总社有限公司

本书为《住院医师规范化培训临床实践指南》的配套教材，旨在帮助住院医师在临床实践中掌握最新的诊疗规范，提高临床实践能力。

临床医师

科研与实践指导



本书为住院医师规范化培训临床实践指南的配套教材，旨在帮助住院医师在临床实践中掌握最新的诊疗规范，提高临床实践能力。

本书为住院医师规范化培训临床实践指南的配套教材，旨在帮助住院医师在临床实践中掌握最新的诊疗规范，提高临床实践能力。

本书为住院医师规范化培训临床实践指南的配套教材，旨在帮助住院医师在临床实践中掌握最新的诊疗规范，提高临床实践能力。

住院医师规范化培训临床实践指南

A Practical Handbook of Clinical
Research Work and Experiment

临床医师

科研与实践指导

主 编 冯 帆 高旭东 王春平



陕西师范大学出版总社有限公司

图书代号 JC11N0675

图书在版编目(CIP)数据

临床医师科研与实践指导 / 冯帆, 高旭东, 王春平主编. —西安: 陕西师范大学出版总社有限公司, 2011.8

ISBN978-7-5613-5676-0

I. ①临… II. ①冯… ②高… ③王… III. ①临床医学—研究
IV. ①R4

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第140850号

临床医师科研与实践指导

主 编 / 冯 帆 高旭东 王春平
责任编辑 / 晏国英
责任校对 / 晏国英
装帧设计 / 鼎新设计
出版发行 / 陕西师范大学出版总社有限公司
(西安市长安南路199号 邮编 710062)
网 址 / <http://www.snupg.com>
经 销 / 新华书店
印 刷 / 陕西迅捷印务有限责任公司
开 本 / 889mm×1194mm 1/16
印 张 / 20.5
字 数 / 520 千
版 次 / 2011年8月第1版
印 次 / 2011年9月第1次印刷
书 号 / ISBN978-7-5613-5676-0
定 价 / 78.00 元

读者购书、书店添货如发现印刷装订问题,请与本社高教出版分社联系调换。
电话:(029)85303622(兼传真), 85307826。

本书编写人员

- | | | | |
|-----|-----|---------------------------|-----|
| 主 编 | 冯 帆 | 高旭东 | 王春平 |
| 副主编 | 陆荫英 | 张 帆 | 杨平勋 |
| 审 校 | 杨永平 | | |
| 编 者 | 冯 帆 | 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所 | |
| | 高旭东 | 中国人民解放军 302 医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心 | |
| | 王春平 | 中国人民解放军 302 医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心 | |
| | 陆荫英 | 中国人民解放军 302 医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心 | |
| | 张 帆 | 中国人民解放军 301 医院肿瘤中心肿瘤内科 | |
| | 杨平勋 | 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 | |
| | 王 铤 | 中国人民解放军 302 医院肝脏肿瘤诊疗与研究中心 | |
| | 范 迪 | 北京生命科学研究所 | |
| | | 北京师范大学生命科学学院 | |
| | 郭正光 | 中国医学科学院基础医学研究所 | |
| | | 中国协和医科大学基础医学院 | |
| | 于 政 | 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所 | |
| | 王 涛 | 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所 | |
| | 张 鹏 | 中国人民解放军 301 医院泌尿外科 | |
| | | 解放军福州军区总医院 | |
| | 熊 璐 | 中国人民解放军 302 医院病理科 | |
| | 王力强 | 沈阳军区联勤部疾病预防控制中心 | |

前言

能够独立完成科研工作,一个重要的前提是对科研工作要有清醒的认识。要做到这一点,就必须了解这么几个问题:什么是科研工作?科研工作的基本规律是什么?科研工作涉及哪些基本技术?这些基本技术的原理和注意事项有哪些?它们之间内在的逻辑联系是什么?如何围绕着一个靶点或者说目的基因做完整的实验?要发表一篇科研论文需要包含哪些内容,如何组织材料?

围绕上述问题,本书分三篇进行了讲解。第一篇主要是理论部分,介绍了相关的一些理论和研究思路。第二篇包括四个基础讲座、六个高级讲座。基础讲座主要针对一些实验体系,而高级讲座则更关注一些较热门的研究工作。第三篇是案例,作者精心挑选并剖析了一些研究论文。这些论文各有特点,别具匠心,有相当的示范性、逻辑性和科学性。

第一篇第一讲介绍科学的思想方法和逻辑范式。第二讲通过介绍细胞信号转导的原理、过程和方法从而给出一些细胞生物学研究中的范式及具体研究工作中的实验设计、注意事项和方法。按照目前抽象的定义,科研论文就是要发现一个实验因素的特定功能,并探讨其机理。因此在本篇中的第三讲就选取了一系列同类型的、不同影响力因子的论文进行剖析。这些论文的思路相同,研究工作相近。通过介绍和分析这些案例使读者对以下几个问题有清楚的认识:什么样的文章需要什么样的工作?不同层次的文章之间有什么差异?第四讲主要介绍模式生物的相关研究思路和研究方法。

第二篇第一至四讲,分别介绍分子、细胞、生化和病理实验的基本操作、基本原理和注意事项,通过实例来说明如何整合这些基本的操作以及技术。

第二篇第五至十讲包括:基因治疗反映了分子生物学在医学中的应用;蛋白质相互作用研究方法;图位克隆代表现代遗传学的前沿;围绕端粒研究的重要意义;分子药理学研究方法;药物开发的系统研究。这些较高层次的实验和研究内容能给读者一定的启发。

第三篇选取了5个研究案例进行分析和讲评。

与一般意义上的 protocol 不同,本书是一本中级教程,它的读者对象是具有临床经验的青年临床医师,因此并不过多地关注具体的生物医学技术操作、实验流程和实验方法。相反,本书着力点在于帮助读者使用技术,更好地设计实验乃至确定课题。

作者的初衷:

使读者通过阅读本书,去除对科研工作的畏难情绪;了解多种科学实验设计的套路;确定某种假设应该通过怎样的方法去验证;怎样解释得到的结果;如何设计实验和组织材料以及发表研究论文;直观地认识到做出什么样的实验就可以发表什么样的文章;什么样的刊物需要怎样的结果;比较不同的实验差异;把握整体研究中不同实验的原理和不同实验的内在逻辑联系。

本书是在军事医学科学院毒物药物研究所王莉莉研究员的关心和指导下完成的。王莉莉老师为本书投入了相当多的时间和精力,提出了很多宝贵的意见和建议,并且在百忙之中审阅了全部书稿。特此致谢。

编者

2010年12月11日

目 录

第一篇	(1)
第一讲 生物医学研究中科学的思想方法	(2)
第二讲 细胞信号转导的相关问题	(5)
第一节 细胞信号转导通路的组成	(5)
第二节 细胞信号转导的过程及其调控方式	(7)
第三节 一些重要的信号通路	(9)
第四节 如何研究指定基因对细胞信号通路的作用	(14)
第三讲 科研论文需要包括哪些内容	(20)
第四讲 模式生物与模式生物在研究中的应用	(45)
第一节 拟南芥和针对拟南芥的研究工作	(45)
第二节 秀丽线虫和针对秀丽线虫的研究工作	(60)
第二篇(上)	(72)
第一讲 分子生物学实验技术与设计	(73)
第一节 分子生物学的基本操作	(73)
第二节 核酸印迹实验方法	(78)
第三节 RNAi	(83)
第二讲 肿瘤细胞生物学实验方法	(93)
第一节 实验因素(如基因或药物)对肿瘤细胞的影响	(93)
第二节 细胞培养的基本技术	(105)
第三讲 生物化学实验方法	(113)
第一节 层析技术与蛋白质分离纯化	(113)
第二节 酶学实验基础	(121)
第三节 蛋白质的检测	(135)
第四讲 病理学技术	(139)
第一节 制片技术	(140)
第二节 染色技术	(145)
第二篇(下)	(153)
第五讲 基因治疗	(154)
第一节 基因治疗的基本概念	(154)
第二节 基因治疗在肿瘤治疗中的应用和展望	(157)
第三节 研究实例——如何完成肿瘤基因治疗的研究工作	(160)
第六讲 蛋白质相互作用	(168)
第一节 蛋白质相互作用的研究概况	(168)
第二节 蛋白质相互作用的方法	(168)
第三节 蛋白质相互作用的主要研究内容	(174)
第四节 蛋白质相互作用的研究案例分析	(177)
第七讲 基因的图位克隆	(186)

第八讲 端粒与端粒酶·····	(192)
第一节 端粒与端粒酶的研究概述·····	(192)
第二节 围绕 hTERT 的研究策略·····	(206)
第九讲 分子药理学研究方法·····	(217)
第十讲 药品开发技术与药剂学研究·····	(238)
第一节 药剂学研究内容概述·····	(238)
第二节 原料药药剂学性质测定方法·····	(241)
第三节 药品处方工艺实验技术·····	(243)
第四节 质量研究实验技术及应用·····	(247)
第五节 稳定性研究技术及应用·····	(255)
第六节 我国新药注册管理·····	(258)
第三篇·····	(264)
案例 1·····	(265)
案例 2·····	(276)
案例 3·····	(284)
案例 4·····	(291)
案例 5·····	(299)
附 录·····	(305)
1. 有关缓冲液和培养基·····	(305)
2. 一些常用的限定性内切酶·····	(309)
3. 研究中常用的抗生素·····	(310)
4. 实验中常用的一些工具酶·····	(311)
5. 病理学研究中常用的一些染色方法·····	(311)
6. 病理学研究中常用的一些缓冲液配方·····	(312)
7. 药学相关的检索工具和数据库·····	(316)
索 引·····	(318)



第一篇

导读

本篇偏重理论，包括总论、细胞信号转导、科研论文的主要内容、模式生物的研究与应用等内容，主要希望能够帮助读者了解一些基本理论，同时也希望在大的科研脉络上为读者提供一些帮助。

内容概要

科学的思想方法：本书的总论。

细胞信号转导：细胞信号转导的内容、组成以及思路。

科研论文的主要内容：不同论文内容工作上的同与异，希望读者能够从中了解，什么样的文章要求做哪些工作，自己的工作能够发表什么文章。

模式生物：以拟南芥和线虫为例介绍有关模式生物的研究。

第一讲 生物医学研究中科学的思想方法

我们做任何研究,都必须有相应的思想方法为指导。符合科学的思想方法,就是科学的思想方法。对科学的界定是相对困难的,但通过对伪科学和非科学的界定可以近似地反映出科学的内涵。随着科学与技术的发展,研究的技术和手段在不断进步。但科学研究中所包含的逻辑和思路以及指导的思想是不变的。

经过数百年发展,生物医学研究已经历了形态、结构、功能和调控等几个阶段。在这几百年中,人类对生物体的研究不断深入,看待事物的角度和视野也在不断变化。在这知识爆炸的时代,新技术和新发现层出不穷,研究成果未见诸纸面就已过时并非全然夸张。虽然科学研究不断取得各种进展,但万变不离其宗,生物医学研究的基本思路和研究范式是不变的,很多重大发现,在其研究过程中所孕育的思想方法,体现出的巧妙构思,虽时隔数年、数十年,仍能够给人们以震撼与启迪。

生物医学研究者在日常工作中通过各种尝试,试图在体内和体外模拟生理或者病理的变化过程。在这一过程中,研究者通过不断积累和总结,在数百年中形成了生物医学研究的构架。对于任何研究者而言,对科学的思想方法的任何论述都是困难的。不管是初学者还是大师都会有自己的真知灼见,但同时也在不断体会和摸索中。生物医学研究是如此博大精深,这使得任何研究者都不能够自信窥得全貌,学得真知。

本书第一讲的主要目的在于开篇介绍初衷,同时对本书的内容提出一个总论。但正如前文所述,全面论述生物医学研究中的科学的思想方法对任何研究者而言无疑都是十分困难的任务。

笔者希望通过讲解和大量的实例帮助读者去除科研的困惑感,能够在独立的研究过程 and 工作中更好地驾驭实验工作,认真观察、从容分析。

1. 排除干扰会为研究工作提供相当的便利

Gregor Johann Mendel^[1]注意到豌豆具有一些稳定的、容易区分的成对性状,这些成对性状在形态、结构和生理等方面差别非常明显。在他的杂交实验中,Mendel 关注了 7 对相对性状的遗传规律。Mendel 只针对一对相对性状的传递情况进行研究,然后再观察两对相对性状的分配原理。

Mendel 时代对于遗传和变异已有一些了解,但对遗传和变异的实质和内在规律几乎没有任何了解。但 Mendel 选择以豌豆为材料,这使得他的研究成为可能。豌豆严格的自花授粉保证了性状纯合和遗传机制的稳定。同时,和现代以突变体为基础的遗传学不同,Mendel 选定的性状都是稳定遗传的,同时也不是数量性状,加上 Mendel 设计了精巧的实验,遗传学第一和第二规律就诞生了^[2]。

Mendel 的幸运在于选取了合适的材料,遇到了有完美表型的纯合的性状。这些都保证了 Mendel 能够排除在当时的环境下无法研究的杂合、不稳定遗传的性状和数量遗传以及其他很多问题的干扰。使得在现代遗传学、现代发育生物学都还处在萌芽阶段时就揭示出了有性生殖的遗传基础^[3]。

此外,在本书第三篇案例 1 中,作者也设计了精巧的实验,一一排除了多种生物大分子的干扰,最终确定了酯类在细胞凋亡过程起到的重要作用^[4]。

2. 选取合适的模式生物

可以说豌豆成就了 Gregor Johann Mendel,果蝇成就了 Thoman Hunt Morgan。果蝇只有四对染色体,基因组结构简单,有很多具有显著表型的性状(灰身和残翅等),这使得使用果蝇进行杂交分析性状的连锁性十分便利^[2]。同时,果蝇具有性染色体,而且性别决定机制远比高等生物简单。在研究中,Morgan 结合各种突变体设计出了精巧的实验,最终发现了伴性遗传。此外,果蝇唾腺染色体是肉眼可见的染色体,对果蝇唾腺染色体的研究也使人们初步了解了染色体的化学本质。最重要的是结合杂交、连锁和细胞遗传学的实验结果和科学分析,研究者最终将遗传因子和染色体耦联起来,发展

出了图距等思想和概念,开启了现代遗传学和分子遗传学的大门^[5]。

选取合适的模式生物是成功完成科研工作的重要保障。本书有模式生物一讲,以拟南芥和线虫为例,介绍了模式生物的一些研究工作。

目前常用的模式生物有^[6]:

噬菌体(bacteriophage, phage),主要用于病毒学研究,同时也是 10 ~ 50KB 范围的分子克隆的常用载体。噬菌体展示是相当常用的技术。

大肠杆菌(*Escherichia coli*),主要用于原核生物的研究。DH5 α 等菌株是分子克隆和基因操作的基础。

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),作为最简单的真核生物,连同各种裂殖、芽殖酵母共同成为研究 DNA 复制和有丝分裂的材料。酵母双杂交技术也是蛋白质相互作用研究的基础。

线虫(*C. elegans*),作为重要的研究生物,已经在细胞凋亡和发育生物学中发挥了重要作用。

果蝇(*Drosophila melanogaster*),广泛用作遗传和演化的室内外研究材料,果蝇成就了 Thoman Hunt Morgan。

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),一个世代仅有两个月,在植物学研究中最为常用。

斑马鱼(*Danio rerio*)和非洲爪蟾(*Xenopus laevis*),都是发育生物学中最为重要的材料。当斑马鱼和非洲爪蟾代替了美洲豹蛙,发育生物学研究就进入了大发现时代。

小鼠(*Mus musculus*),现已成为使用量最大、研究最详尽的哺乳类实验动物。

3. 技术在进步,一些概念和思想也在变化^[2]

技术的进步使得很多概念的含义发生了变化。在 Mendel 时代,形状被遗传因子所控制。在当时的技术条件下,虽然确定了遗传因子的作用和传递规律,但对于遗传因子的本质限于技术条件,没有清晰认识的可能。

Morgan 划时代地确定遗传因子就是染色体的一段。遗传因子能够随染色体移动、传递和发生变化。根据连锁和互换的原理进行的杂交作图将遗传因子在染色体上的相对位置确定出来,并且引入了图距,绘制出了最初的遗传图谱。Morgan 利用各种突变体,将遗传因子对性状的控制机制研究进一步深入。

随着 DNA 的结构解析和基因操作技术体系的不断完善,基因在染色体上的具体位置和基因的大小,目前可以被精确地确定,基因序列测定也变得很容易。

基因具有精细的结构和复杂的调控机制。Morgan 时代利用杂交技术确定了基因在染色体上的遗传位置,绘制的是遗传图谱。人类基因组时代和后基因组时代能够精确地确定基因的位置和起止,确定了基因在染色体上的物理位置,绘制的是物理图谱。基因图位克隆技术也自然是 Morgan 遗传学的最新进展。新的技术使得研究者对基因的功能研究越来越容易,同时也使得 Mendel - Morgan 遗传学理论在当代焕发出了耀眼的光芒和勃勃生机。

数十年来,新技术使得人们的认识越来越进步,主要表现在以下几个方面。

(1)对遗传粒子的认识越来越具体。从符合一系列规律的因子到具有精细结构的一段 DNA 序列,人们的认识更加具体深入。

(2)对遗传规律的认识越来越清晰。现代分子细胞学技术的进步使得观察细胞和染色体的互动变得很容易,对性生殖机制的研究也越发深入。

(3)对基因和性状的关系的认识越来越清晰。在 Mendel - Morgan 时代,基因都控制相应的性状,但对具体机制几乎一无所知。早期的分子生物学和生物化学的回答是一个基因对应一个蛋白质,一个蛋白质对应一个性状。这当然十分粗浅。现代分子生物学和发育生物学将这一过程的细节基本揭示出来,以往以突变体命名的,认识还比较抽象的大量基因(如 *Dorsal*)的细节都被揭示,Hox - box 基因盒的功能和规律便是这类研究的杰出代表。此外,基因的上位效应、连锁互换机制和显隐性机制等

遗传规律的具体和精细的分子机制也被逐一阐述,这些激动人心的进展都是遗传学基本规律在新技术的帮助下取得的。

可见,随着技术的进步,大量的认识被认为是有时代的局限性的。但也有一些思想,经过千锤百炼,在新技术的帮助下,重新发出耀眼的光芒。

4. 现代实验科学的基本思想是获得与失去 (Gain or Loss)

突变体 (Mutant) 的研究和使用贯穿了生物医学研究的始终。某个基因功能的改变或者缺失,在表型上往往有所反映。这些表型上的异常就是形形色色的突变体。我们知道,自然界中任何物种都存在相当稳定的突变率。这些突变在数十亿年中被积累,成为进化的最基本的动力。早期,研究人员不得不通过扩大实验动物种群数量的方法找寻突变体。将突变体纯合化后,再进行杂交研究,将突变性状与染色体特定遗传位置上的特定遗传因子联系在一起。

这一阶段的研究范式是:某性状的缺损可能是由某基因的改变导致,进而推断该基因在正常情况下会控制正常的性状表型,该基因就发挥了相应作用。Miller 使用 X-Ray 照射果蝇,人工诱变。虽然这种诱变具有一定的盲目性和无序性,但这使得遗传学研究的进程大大加快。

随着时间的推移,人们渐渐发现,突变体和基因缺失并不是完全等同的。同时,突变体的性状改变也并不一定能够完全反映出某基因缺失导致功能的障碍。因此 RNAi 和基因打靶技术便应运而生。这样的技术可以降低或完全去除某基因的表达,那么相应的,该基因可能会发挥相反的某种功能。转染或导入某基因后,会有某些性状和表型发生改变。这一变化会和降低该基因表达后表现出的表型相反。由此“正做”和“反做”共同确定基因的功能。这种思路也是突变体理论的延伸,但更为科学与严谨。本书列举的大量案例都是按照这种思路进行的。

此外,技术的积累和进步使得我们对表型改变的研究更加深入。我们能够分析的表型早已经从最初的形态学性状(灰身、长翅)过渡到显微水平上(镰刀状红细胞贫血),最终,蛋白质组学和芯片技术体系可以使我们能够在形态、结构、病理、分子和细胞等各个水平上找到非常细微的各种表型的变化。这些表型可以是 Bio-Marker 表达量产生变化,也可以是核固缩或者是细胞癌变。

总之,笔者编写本书的目的就是想通过理论和大量实际的研究案例总结出科研实验中的逻辑与思想方法,希望读者能够把握笔者的思路 and 想法,更好地从本书中提取有用的信息。

(冯帆 高旭东 王春平 王鉉)

参考文献

- [1] 吴相钰主编. 陈阅增普通生物学. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [2] 徐晋麟, 徐沁, 陈淳编著. 现代遗传学原理. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 刘祖洞. 遗传学. 北京: 高等教育出版社, 1982.
- [4] Kristen Lauber, Erwin Bohn, Stefan Martin Krober, Yijin Xiao, Sibylle G. Blumenthal, Ralph K. Lindenmann, Patrizia Marini, Carolin Wiedig, Anke Zobywalski, Shairaz Baksh, Yan Xu, Ingo B. Autenrieth, Klaus Schulze-Osthoff, Claus Belka, Gernot Stuhler, Sebastian Wesselborg, "Apoptotic Cells Induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal," *Cell*. 2003, 113:717 - 730.
- [5] Lois N. Magner. *A History of the Life Science*. 李难, 崔极谦, 王水平译. 董纪龙校. 生命科学史. 天津: 百花文艺出版社, 2002.
- [6] 吴庆余. 基础生命科学. 北京: 高等教育出版社, 2010.

第二讲 细胞信号转导的相关问题

细胞信号转导是指细胞通过一系列机制,将细胞外因子的信号,通过与受体结合引发细胞内的一系列生物化学反应,最终产生细胞生理反应等效应的全过程。在这一过程中,细胞内多种蛋白质相互作用,最终引起很多基因表达发生变化,导致细胞很多生理状态的改变。

细胞内存在着多种信号转导通路,这些通路之间在多个层次上存在交叉调控,是一个十分复杂的信号网络。

细胞信号转导是细胞应激和维持稳态的重要保证,同时也是细胞凋亡、细胞分化和发育调控的基础。作为重要的研究模型,在细胞水平上大多数的研究内容最终都会涉及实验因素(如指定基因或者是药物)对细胞信号转导的影响。

在本讲中,首先将介绍细胞信号转导通路的基本组成,其后通过举例描述信号通路作用的基本范式,最后通过研究实例介绍如何围绕信号转导设计实验和做一篇文章,研究实验因素(如指定基因或者是药物)对细胞信号通路的作用。

第一节 细胞信号转导通路的组成

细胞信号转导系统极其复杂,信号通路成员也很多。不同信号通路具有不同的特点,但它们的组成是有规律的,都包含细胞外配体、生长因子、蛋白激酶、蛋白磷酸酶和转录因子等几部分。

1. 配体^[1]

一般情况下,能够与受体结合的任何分子都是配体。由于最初发现的受体大多数是锚定蛋白,因而同锚定蛋白结合的任何分子都被称为配体。但后来的研究发现有大量类固醇激素(如雌激素 Estrogen)等的受体不都是锚定蛋白,或者分布在细胞膜上。但配体的概念仍沿用了下来。

同时,在受体介导的内吞过程中,配体与细胞质膜受体蛋白结合,最后被吞入细胞。在这种情况下,根据配体的性质以及被细胞内吞后的作用,可以将配体分为五大类:(1)一些营养物质的载体,如转铁蛋白和低密度脂蛋白(LDL)等;(2)有害物质或者能够与某些有害物质相互作用的组分,如某些细菌、抗体和补体等;(3)一些参与免疫反应的组分,如一些抗原等;(4)信号物质,如胰岛素等多种肽类激素等;(5)一些生长因子。

2. 生长因子^[2]

生长因子(Growth Factor, GF)是一大类种类繁多,能够促进细胞生长的多肽或者小蛋白质,也可称为细胞有丝分裂原(Mitogen-Activated Protein, MAP),主要通过旁分泌、内分泌方式起作用。目前已发现有数十种,还在不断发现新的生长因子,如上皮生长因子、血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子等。

生长因子具有刺激细胞生长活性的作用,通过与特异的、高亲和的细胞膜受体结合,参与调节细胞生长与其他细胞功能。

生长因子能够存在于血小板和各种成体与胚胎组织及大多数体外培养的细胞中,对于调节不同种类细胞的不同生长过程具有一定的特异性。通常,体外培养的正常细胞和大多数生化细胞的生长需要多种生长因子的刺激,而肿瘤细胞具有一定的不依赖生长因子的自主性生长的特点。

生长因子具有重要的作用,能够促进生成大量的成骨细胞、抑制破骨细胞;治疗骨质疏松、股骨头坏死、关节炎、风湿病和因钙缺乏导致的疾病;加强胃肠功能,促进消化酶的分解,能增进食欲,参与治疗慢性胃炎;加强骨髓造血功能,促进干细胞生成,进而促进红细胞和白细胞的成熟过程;增加左心室厚度,增强心肌弹性力,参与治疗心脏病;能部分清除血液中的低密度蛋白,防止在血管壁沉积,治疗

血栓;加强肺部细胞功能,修复气血屏障,消除肺部毒素,参与治疗肺气肿、肺供氧不足和一些呼吸系统疾病;能促进人体分泌激素,增强肾功能,加强水盐代谢;刺激胸腺功能,加快淋巴T细胞、B细胞、吞噬细胞的成熟过程,提高机体免疫力,促进免疫细胞吞噬病毒病菌和一些癌细胞。

3. 蛋白激酶^[3]

蛋白激酶(Protein Kinase, PK)是指能将ATP的 γ 磷酸基转移到底物特定的氨基酸残基上,能够催化蛋白质磷酸化的一类磷酸转移酶。蛋白激酶反应中需有高能化合物(如ATP和GTP等)参加。

根据蛋白激酶底物的不同,可将蛋白激酶分为5类:(1)蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶;(2)蛋白酪氨酸激酶;(3)蛋白组氨酸激酶;(4)蛋白色氨酸激酶;(5)蛋白天冬氨酰基/谷氨酰基激酶。

同时,蛋白激酶也可分为以下几大类:(1)底物专一的蛋白激酶,如磷酸化酶激酶,丙酮酸脱氢酶激酶等;(2)依赖于环核苷酸的蛋白激酶,如环腺苷酸(cAMP)蛋白激酶;(3)依赖于钙离子的蛋白激酶,如环鸟苷酸(cGMP)蛋白激酶;(4)其他蛋白激酶,如组蛋白激酶等;(5)受体蛋白激酶,如GPRCK(G Protein Receptor Coupled Protein Kinase),以及RTK(Receptor Tyrosine Kinase)等。

蛋白激酶有各自的结构和作用方式,如cAMP蛋白激酶以活化型和非活化型两种形式存在于生物体中,它们之间的比例受到多种激素的控制。cAMP蛋白激酶由4个亚基组成,两个能与cAMP结合的调节亚基(R)和两个非活化的能催化磷酸基团转移的催化亚基(C)。如果细胞内cAMP浓度升高,则cAMP蛋白激酶解离成调节双亚基和两个活化的催化亚基。

4. 蛋白磷酸酶^[3]

蛋白磷酸酶(Protein Phosphatase),编号:EC 3.1.3.16,是一种催化蛋白质正磷酸酯水解的酶。生物体中往往通过这种去磷酸化调节该蛋白质的功能。蛋白磷酸酶能够与蛋白激酶一起配合调节底物蛋白质的磷酸化作用,进而参与调控多种细胞生物学过程。根据底物蛋白质分子上磷酸化的氨基酸残基的种类,蛋白磷酸酶主要分为蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶、蛋白质酪氨酸磷酸酶和双特异性磷酸酶。

5. 转录因子^[4]

转录因子(Transcription Factor, TF)能够结合在某基因上游特异核苷酸序列上的蛋白质,活化后从胞质转位至胞核,通过识别和结合基因启动子区的各类序列特异顺式作用元件,启动和调控部分基因表达。

转录因子有通用转录因子、序列特异性转录因子、辅助转录因子等。与RNA聚合酶I、II、III相对应的有三类转录因子:TF I、TF II、TF III。

特异的转录因子能识别增强子或特定序列而调控基因表达的蛋白质。Smad4和ER(Estrogen Receptor)也可属于特异的转录因子。

基因转录有正调控和负调控之分。在细菌基因组中,当一种阻遏蛋白(Repressor Protein)结合在受调控的基因上时,基因不表达,这便是负调控机制;环境因素诱导后,靶基因上去除阻遏蛋白后,RNA聚合酶识别该调控基因的启动子,使基因得以表达,这便是正调控机制。

这种以阻遏蛋白为代表的蛋白因子是反式作用因子。基因组上与反式作用因子结合的,对基因表达起调控作用的基因序列是顺式作用元件。

转录因子(Transcription Factor)能与基因5'端上有特定序列专一性结合,从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达。

转录因子的结合位点(Transcription Factor Binding Site, TFBS)是转录因子调节基因表达时,与mRNA结合的区域。

真核生物在转录时往往需要多种蛋白质因子的协助。一种蛋白质是不是转录机构的一部分往往是通过体外系统看它是否是转录起始所必需的。一般可将这些转录所需的蛋白质分为三大类:(1)RNA聚合酶的亚基。RNA聚合酶的亚基是转录必需的,但并不对某一启动子有特异性,RNA聚合

酶的各个亚基与 DNA 结合需要转录因子的参与。(2)与 RNA 聚合酶结合形成起始复合物的其他蛋白因子。某些转录因子能与 RNA 聚合酶结合形成起始复合物,但不是游离聚合酶的成分。这些因子可能是所有启动子起始转录所必需的。(3)仅与其靶启动子中的特异序列结合的蛋白因子。某些转录因子仅与其靶启动子中的特异序列结合。如果这些序列存在于启动子中,则这些序列因子是一般转录机构的一部分。如果这些序列仅存在于某些种类的启动子中,则识别这些序列的因子也只是在这些特异启动子上起始转录必需的。

转录因子具有特殊的结构,一般由 DNA 结合结构域与转录调控结构域组成。

DNA 结合结构域的结构基序主要有三种:(1)HTH (Helix Trans-Helix)和 HLH(Helix Loop Helix)结构:由两段 α -螺旋夹一段 β -折叠构成, α -螺旋与 β -折叠之间通过 β -转角或成环连接,即螺旋—转角—螺旋结构和螺旋—环—螺旋结构。(2)锌指结构(Zinc Finger):多见于 TFIIIA 和类固醇激素受体中,由一段富含半胱氨酸的多肽链构成。每四个半胱氨酸残基或组氨酸残基螯合一分子的 Zn 离子,其余的12~13个残基则呈周期性的指样突出结构,这种结构刚好能够通过嵌入 DNA 双螺旋的大沟中与 DNA 相结合。(3)亮氨酸拉链结构:多见于真核生物转录因子 DNA 结合结构域的 C 末端,这些转录因子往往与癌基因表达调控有关。由两段 α -螺旋平行排列构成,其 α -螺旋中存在每隔 7 个残基规律性排列的亮氨酸残基,亮氨酸侧链交替排列而呈拉链状,两条肽链呈钳状与 DNA 相结合。

转录调控结构域包括转录激活结构域(Transcription Activation Domain)和转录抑制结构域(Transcription Repression Domain)两种。它们一般包含 DNA 结合区之外的 30~100 个氨基酸残基,有时一个转录因子包含不止一个转录激活区,如 ER(Estrogen Receptor)含有两个转录激活结构域 AF1 和 AF2。

转录抑制结构域也是转录因子调控表达的重要位点,但是对其作用机理研究尚不深入。可能的作用方式有三种:(1)与启动子的调控位点结合,阻止启动子与其他转录因子的结合;(2)作用于其他转录因子,抑制其他因子的作用;(3)通过改变 DNA 的高级结构阻止转录的发生。

总之,细胞信号转导途径包括配体、受体、转导分子和效应分子。配体主要包括多肽类激素、细胞因子和生长因子等。受体包括膜受体和细胞胞内受体(或者是核受体)。转导分子包括第二信使和各类蛋白激酶。最终,细胞通过各种机制应答信号,调节转录因子的种类和数量,改变基因表达情况。

(冯帆 高旭东 王鉉)

第二节 细胞信号转导的过程及其调控方式

本节首先介绍细胞信号转导的几个主要途径,然后总结出细胞信号转导过程及其调控方式的一般规律。

1. 细胞信号转导的主要途径^[1-2]

受体酪氨酸蛋白激酶(RTPK)信号转导途径:受体酪氨酸蛋白激酶超家族的共同特征是受体本身具有酪氨酸蛋白激酶(TPK)的活性,配体主要为各种生长因子。RTPK 途径与细胞增殖、肥大和肿瘤的发生关系密切。配体与受体细胞外区结合后,受体发生二聚化,自身具备酪氨酸蛋白激酶(TPK)活性并催化胞内区酪氨酸残基自身磷酸化。RTPK 的下游信号转导通过多种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的级联激活(激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、激活蛋白激酶 C(PKC)、激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)),从而引发相应的生物学效应。

非受体酪氨酸蛋白激酶途径:此途径的共同特征是受体本身不具有 TPK 活性,配体主要是一些激素和细胞因子。其调节机制差别很大。如配体与受体结合使受体二聚化后,可通过 G 蛋白介导激活 PLC- β 或与胞浆内磷酸化的 TPK 结合激活 PLC- γ ,进而引发细胞信号转导级联反应。

受体鸟苷酸环化酶信号转导途径:一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)可激活鸟苷酸环化酶(GC),升高 cGMP 的水平,cGMP 激活蛋白激酶 G(PKG),进而通过磷酸化靶蛋白发挥生物学作用。

核受体信号转导途径:细胞内受体分布于胞浆或核内,本质上都是配体调控的转录因子,均在核内启动信号转导并影响基因转录,统称为核受体。核受体按其结构和功能分为类固醇激素受体家族和甲状腺素受体家族。类固醇激素受体(雌激素受体除外)位于胞浆,与热休克蛋白(HSP)结合存在,处于非活化状态。配体与受体的结合使HSP与受体解离,暴露出DNA结合区。激活的受体二聚化并移入核内,与DNA上的激素反应/应答元件(HRE)相结合或与其他转录因子相互作用,增强或抑制基因的转录。甲状腺素类受体位于核内,不与HSP结合,配体与受体结合后,激活受体并以HRE方式调节基因转录。

G蛋白介导的信号转导途径参见本讲第三节。

2. 细胞对信号的感受^[1]

细胞表面以及细胞内都有各种受体,这些受体感受各种激素、生长因子甚至细胞外基质的变化。各种激素和生长因子浓度的变化、细胞与细胞外基质结合强弱变化等都能够引起受体的变化。当受体开启细胞内的一系列变化时,细胞对信号的感受就完成了。

3. 信号在细胞内的转导^[2]

信号在细胞内的转导主要有两个意义或者说是特点:(1)单向性。细胞中,通过上下游蛋白激酶的磷酸化过程中的化学反应动力学等特性保证了信号在细胞内转导的单向性。(2)信号的放大。

细胞中有两种机制保证了细胞外信号的放大。(1)细胞中通过形成大量第二信使(如cAMP、cGMP和DAG等)放大细胞外信号。(2)细胞中通过多级的蛋白激酶磷酸化对信号进行放大。最终,细胞外信号被快速地传递、加工和放大。

4. 细胞中信号通路之间存在交叉^[5-6]

信号通路之间的交叉反应使得细胞对信号的识别和反应更加多样。有时,一条细胞信号通路活化能够影响多条通路。同时,几条通路传递的信号也能够汇聚,产生某几类效应。例如,IGF(Insulin like Growth Factor)通路能够活化PI3K-AKT-P70S6K等一系列激酶。在这一过程中,AKT能够直接将ER磷酸化,同时P70S6K又能够参与调控NF- κ B等的功能。在此,IGF(Insulin like Growth Factor)通路能够与ER信号通路和NF- κ B信号通路发生交叉反应。值得一提的是,军事医学科学院叶棋浓课题组在世界上首次报道了FHL(Four and Half LIM)是TGF- β /Smads信号通路与ER信号通路的交叉点,FHL-2能够通过介导Smad4与ER的相互作用调节两条通路的交叉反应。

5. 最终的效应^[4]

信号转导的最终效应有不少,但主要有二:(1)基因表达的改变;(2)细胞生理状态的改变。细胞外信号应答的长期效应都是开启或者关闭一些基因的表达,这些需要各种转录因子来完成。但在细胞应激的状态下,细胞的生理学改变更倾向于通过其他一些机制:细胞骨架的组装与去组装;一些代谢类的酶原被迅速活化;目的蛋白或者目的蛋白的阻遏蛋白发生或者去除泛素化等;一些在细胞内贮存的RNP(RNA-protein Particle)降解或者活化等。

6. 信号的衰减机制^[7]

细胞信号不能无限传递或者应答,这有多方面的意义。首先,细胞不能无限制地应答某一信号;其次,细胞必须对信号进行衰减和钝化以免细胞内对某一信号的本底应答水平过高,影响下次应答的时间和强度;再次,某些信号应答过于强烈在生理上可能是有害的;最后,某些信号往往是周期性出现的,细胞必须对信号周期性地应答。

信号的衰减机制多种多样,有水解第二信使、钝化代谢的酶类、阻遏物与其他蛋白结合以及蛋白磷酸酶对蛋白激酶的拮抗作用等。这些方法都非常巧妙,对其研究也非常深入,在此不必赘言。近年来对类固醇激素研究中发现了很多有趣的新现象,给了人们新的启示。

雌激素(Estrogen)是女性第二性征和性别生理周期的基础与总枢纽。近年的研究发现雌激素应答过程有着非常精巧的调控机制。雌激素受体ER(Estrogen Receptor)是雌激素应答的基础,是细胞

中一类重要的基因。机体雌激素水平周期性地升高时,雌激素进入细胞与 ER 结合,使 ER 的构象发生一定的变化,这种变化使得雌激素和 ER 的复合物被泛素化。泛素化的 ER 才能与下游基因启动子上的 ERE(Estrogen Response Element)结合。下游基因启动子结合 ER 后,并不能立即开始转录,此时,在泛素的介导下,26S 蛋白酶体与 ER 相结合,被募集到 ER 下游基因启动子上。只有这样,RNA pol II 才能开启下游基因的转录。下游基因一旦开始转录,26S 蛋白酶体与 ER 的复合物就从 DNA 上脱落下来,进而 ER 被降解。ER 被大量降解,细胞对雌激素的本轮应答就告结束,信号就此衰减。ER 缓慢表达,细胞内的 ER 数量缓慢增加,此时,雌激素水平较低,ER 不能够对雌激素进行应答。

ER 在细胞中积累,等待下一轮雌激素水平周期性地升高。雌激素水平再次周期性升高时,细胞中有足够的 ER 应答雌激素的信号,应答完毕后,这些 ER 被大量降解,雌激素信号被完全衰减,细胞回到静息状态,等待再下一轮雌激素水平周期性地升高。

ER 是雌激素依赖的乳腺癌的主控基因。在这类肿瘤中,ER 起到了关键性的作用。目前有很多药物都是针对 ER 的,如 tamoxifen 和 MG132 等药物都能够针对 ER 起作用。tamoxifen 是雌激素的类似物,能够与雌激素竞争 ER,阻断 ER 的作用。而 MG132 则是泛素化的抑制剂,能够抑制 ER 被泛素化,阻断 ER 信号通路。这也是针对一条信号通路不同环节设计药物的典范。ER 应答雌激素的模式如图 1-2-1 所示。

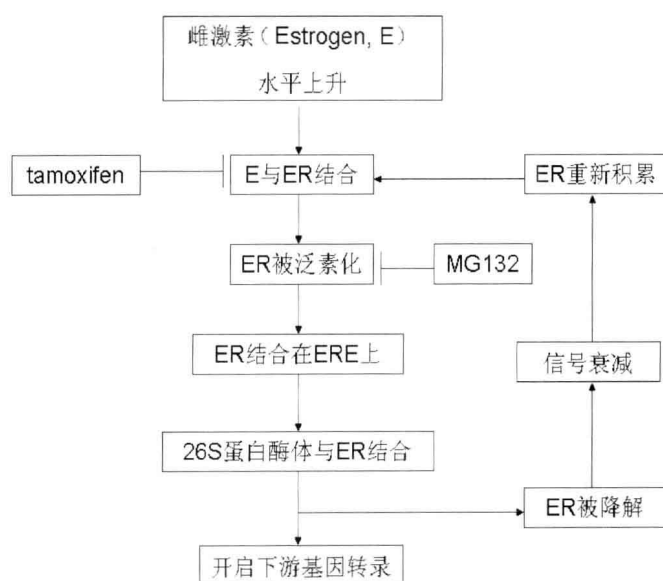


图 1-2-1

信号通路种类繁多,功能多样,但唯一不变的就是它们的基本规律:信号的感受、传导、放大、效应与衰减。本节希望通过总结和举例帮助读者在浩如烟海的文献资料中提炼出信号转导的一般规律和共同特点,为更好地设计细胞实验,完成相关研究课题提供一点帮助。

(高旭东 冯帆 范迪)

第三节 一些重要的信号通路

1. G 蛋白介导的信号通路^[8]

G 蛋白介导的信号通路有以下几种:(1)腺苷酸环化酶途径。 α 和 γ 亚基组成的异三聚体在膜受体与效应器之间起中介作用。通过激活 G 蛋白不同亚型,增加或抑制腺苷酸环化酶(AC)活性,调节细胞内 cAMP 浓度。cAMP 可激活蛋白激酶 A(PKA),引起多种靶蛋白磷酸化,调节细胞功能。(2)磷脂酶途径。激活细胞膜上磷脂酶 C(PLC),催化质膜磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)水解,生成三磷酸肌醇