

生化药理学进展



(第二辑)

中国药理学学会 生化药理专业委员会 编

R963-1
=G1
中国医药科技出版社

116735

生化药理学进展

(第二辑)

(1989)

中国药理学会 生化药理专业委员会 编

编 委

周廷冲 丛 铮

王崇铨 朱秀媛

中国医药科技出版社

生化药理学进展(第二辑)

中国药理学会 生化药理专业委员会 编

*

中国医药科技出版社 出版

(北京西外北礼士路甲 38 号)

中国医药科技出版社激光照排室 排版

河北省昌黎县印刷厂 印刷

新华书店北京发行所 发行

*

开本 $787 \times 1092 \text{ mm}^{1/32}$ 印张 $5\frac{3}{4}$

字数 126 千字 印数 1—3500

1989 年 12 月第 1 版 1989 年 12 月第 1 次印刷

ISBN 7-5067-0105-7/R · 0106

定价: 3.20 元

内 容 提 要

第二届全国生化药理学术讨论会特邀著名生化药理学专家周廷冲教授等九人作了大会报告,从不同角度介绍了生化药理学近年来的主要进展,包括新理论及新的技术方法。本书即由大会特邀报告的九篇论文汇编而成。内容包括:受体信号转导的生化机理;肌醇脂质与钙动员受体;脂氧素:一类新的具有生物活性的花生四烯酸代谢物;亲和层析及其在生化药理研究中的应用;大鼠肝细胞原代培养方法的要点及其在生化药理学研究中的应用;有机磷胆碱酯酶抑制剂的生化效应;活性氧自由基引起的疾病与用超氧化物歧化酶治疗的分子药理学;免疫调节剂与肝药物代谢酶;碳酸酐酶和骨等。本书可作为从事药理学、特别是生化药理学教学和科研工作者、研究生和高年级本科生的参考书。广大医务工作者和药学工作者阅读本书,在扩大和更新知识结构方面,会有较大帮助。

目 录

1. 受体信号转导的生化机理…… 周廷冲、薛沿宁(1)
2. 肌醇脂质与钙动员受体…… 梁念慈、陈庆辉(28)
3. 脂氧素:一类新的具有生物活性的花生四烯酸代谢物 岳天立(57)
4. 亲和层析及其在生化药理研究中的应用前景
..... 朱秀媛(72)
5. 大鼠肝细胞原代培养方法的要点及其在生化药理学研究中的应用——我们的实践和体会
..... 丛 铮(101)
6. 有机磷胆碱酯酶抑制剂的生化效应 ... 陈景芳(119)
7. 活性氧自由基引起的疾病与用超氧化物歧化酶治疗的分子药理学 李文杰(138)
8. 免疫调节剂与肝药物代谢酶 何绍雄(155)
9. 碳酸酐酶和骨:以骨为靶的碳酸酐酶抑制剂
(摘要) 丛 铮(168)
Carbonic Anhydrase and Bone; Target
Inhibitors of Carbonic Anhydrase. (英文全文)
..... L. C. Waite and W. M. Pierce, Jr. (170)

1. 受体信号转导的生化机理

周廷冲 · 薛沿宁

(军事医学科学院基础医学研究所)

生物可接受多种信号并发生特定的反应。这些信号可以是物理性的,如光、声等;也可以是化学性的,如神经递质、激素、毒物和药物、生长因子等。化学信号统称为配体,并可分为内源性的和外源性的。这些信号可作用到靶组织的专一蛋白质上,这种蛋白质称为受体。符合受体的条件是,既能识别配体,又有一定的亲和力,同时也能将信号传递给另一个转导蛋白。不符合后一个条件的专一蛋白只能称为接受体(Acceptor),而不能称为受体(Receptor)。受体被信号激活可引起短期的细胞综合反应,如血压的升降、心跳频率和强度的改变等,也能引起较长期的细胞综合反应,在肿瘤、创伤愈合、溃疡、贫血、衰老、老年痴呆以及免疫功能低下等症候中发挥作用。因此,研究受体信号转导的生化机理对疾病的防治有重要意义。

内源性信号分子的研究近年来发展很快,其分泌的机理可分为内分泌、旁分泌和自分泌三种形式。一般激素是由内分泌腺分泌,经血流到达靶器官或血管的受体上,称为内分泌。多数生长因子是由细胞分泌后作用在邻近细胞的受体上,所以称为旁分泌;而转化生长因子等则由细胞分泌后作用在

自身细胞的受体上，所以称为自分泌（图 1）。

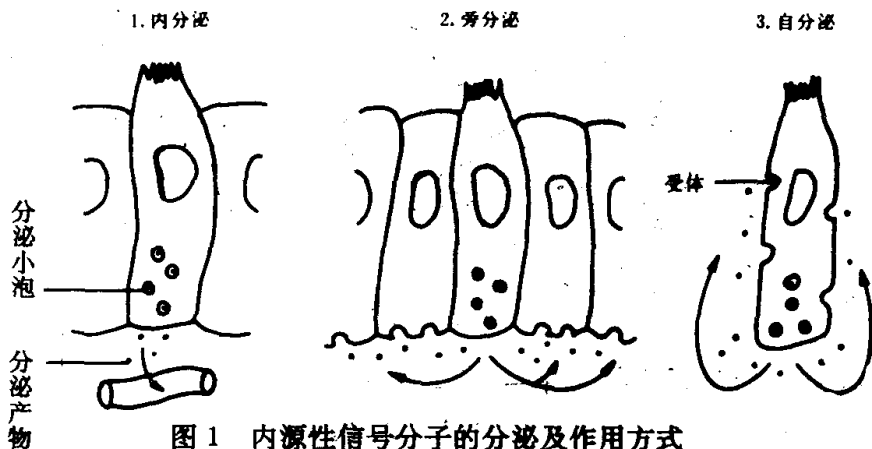


图 1 内源性信号分子的分泌及作用方式

为了便于充分讨论受体信号转导的生化机理，特别应该重视以下四类活性蛋白。第一类是受体蛋白；第二类是各种蛋白激酶，如酪氨酸蛋白激酶（TPK）、蛋白激酶 C（CPK）、cAMP 依存的蛋白激酶（APK）、cGMP 依存的蛋白激酶（GPK）、钙调素依存的蛋白激酶（Cal-PK）。各种激酶是与磷酸酶（phosphatase）紧密相关的，因为磷酸化和去磷酸化反应往往交替进行；第三类是 GTP 调节蛋白（G 蛋白）的族员；第四类是生长因子及其他肽类激素，其中生长因子是近年来特别引人瞩目的活性蛋白，它包括表皮生长因子（EGF）、血小板来源的生长因子（PDGF）、神经生长因子（NGF）等。迄今为止，可以认为膜受体信号转导涉及了一种类似接力赛的转导机理。在生物膜内，受体活化把信号传递给 G 类蛋白，G 类蛋白活化后又把信号传递给效应酶。因此，每一步的活性蛋白都是双功能的，一方面接受信号，另一方面又输出信号，使起始信号传递下去，直至发生生理反应。

一、受体在转录后的修饰和活化

受体是在粗面内质网腔内翻译而成，然后输送至高尔基氏体，最后进入细胞膜。在输送过程中，受体蛋白要经过各种修饰。在粗面内质网腔内，受体N端糖基化；至高尔基氏体，受体N端的低聚糖又经修饰加工，成为“糖帽”，有时还加些脂肪酸。另外，受体各亚基之间可以二硫键结合到一起。这些修饰的好处是受体不会过早降解，同时还可增加受体对配体的亲和力。

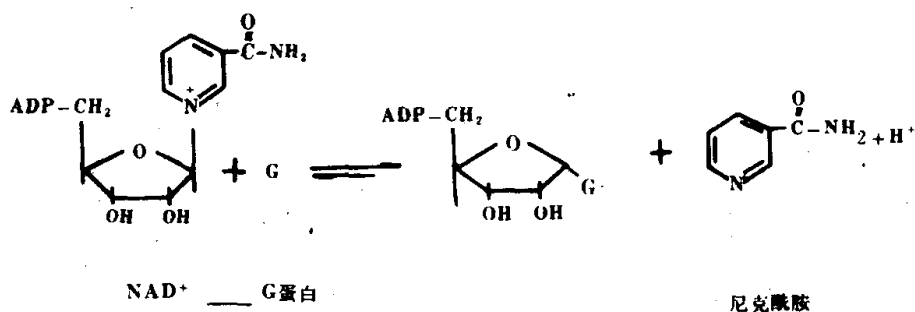
配体与膜上受体结合并使之活化，这种活化通常引起某些价键变化，包括共价键变化和非共价键变化：1. 共价键变化，如受体磷酸化、受体二硫键的变化、受体的蛋白酶水解。当配体为活性蛋白时，后两者尤为重要。2. 非共价键变化，如膜电位变化、受体在膜上分布的变化（成块或戴帽）、别构效应、膜脂环境的变化。受体活化后通常伴随着受体数目和亲和力的改变。虽然我们了解到受体活化后的一些变化，但迄今为止仍不知受体的功能区以及与配体结合后的活化机理。实验证明，受体分子内的二硫键在其结构和功能中有重要作用。 β -肾上腺能受体(β -AR)在SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳中 M_r 为54000。当将二硫键化学还原后，泳动速度降低， M_r 变为65000，同时对标记配体的亲和力减低。这说明受体分子内由于二硫键的存在，使得受体分子保持着一种致密态，还原后则分子伸展开来，使 M_r 增加。另外，分子内二硫键是受体与配体结合所必需的。最近，膜蛋白的重组实验还证实， β -AR经二硫苏糖醇处理使二硫键断裂，可像激动剂作用一样

被活化。

细胞表面受体的半胱氨酸残基参与 G 蛋白的偶联以及受体分子内二硫键的形成，在受体的结构和功能上有重要意义。在许多细胞表面的受体蛋白上，半胱氨酸残基相当丰富，如 EGF 受体 (EGF-R)、低密度脂蛋白受体 (LDL-R)、NGF 受体 (NGF-R)，它们的多数半胱氨酸残基位于细胞膜外区。

二、鸟嘌呤核苷酸调节蛋白的族员

在受体信号转导机理中，鸟嘌呤核苷酸调节蛋白 (G 蛋白) 起重要作用。G 蛋白具有 GTP 结合能力，按情况的不同，有的 G 蛋白能调节离子通道，有的能影响效应酶的活性。各种 G 蛋白的结构相似，都是由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成，GTP 与 α 亚基结合， α 亚基可与 β 、 γ 亚基解离，这一过程就是 G 蛋白活化的过程。某些细菌毒素，如百日咳毒素 (PT)、霍乱毒素 (CT) 和大肠杆菌毒素 (LT)，可以催化 G 蛋白与 NAD^+ 的反应，使 G 蛋白发生 ADP 核糖基化而失活：



根据 G 蛋白的功能以及细菌毒素对它的作用,可将其分为以下几类: G_s 、 G_i 和 G_t 样蛋白(见图 2)。 G_s 类蛋白主要有兴奋腺苷酸环化酶(AC)的作用,从而使 cAMP 的含量增高。 G_s 又分为激素类 G_s 和嗅觉类 G_s , 后者对 GTP 的亲合力明显高于前者。LT 和 CT 可作用在 G_s 类蛋白上使之失活。在视网膜中还有另一种 G 蛋白: G_t , 又称转导素(transducin), 它可激活 cGMP 磷酸二酯酶。 G_t 可被 PT 和 CT 作用而失活。最后一类是 G_i 样蛋白族, 此类又可分为 G_{i1} 、 G_{i2} 、 G_{i3} 、 G_{i4} 、 G_{i5} 等, 其中 G_{i1} 对 AC 是抑制性的。 G_{i1} 的 α 亚基可抑制 AC, β 、 γ 亚基则能抑制 K^+ 通道的开启, 若 β 、 γ 亚基与 α 亚基结合成一复合物, 就可取消 α 亚基对 AC 的抑制。 G_o 是从脑中分离的专一转导蛋白, 可抑制电压敏感的 Ca^{2+} 通道, 即抑制 Ca^{2+} 内流。还有可能存在调节 K^+ 通道的专一 G_k 蛋白。在钙动员受体与效应酶(磷脂酶 C, PLC) 之间存在一种兴奋性转导蛋白 G_p 。另外, 中介受体信号、兴奋磷脂酶 A_2 (PLA₂) 的也是一种 G 蛋白。另一种转导蛋白 G_h 已经分离, 但功能不明。以上 G_i 样蛋白经 PT 处理后, 都表现出其相应效应的失活。最近的实验还表明, CPK 和胰岛素受体 TPK 可以通过磷酸化来调控这些 G 蛋白的活力。

三、受体磷酸化、内吞和向下调

受体磷酸化为许多受体功能变化的关键步骤, 如光受体(视紫红蛋白, Rhodopsin, 简写 Rh)、N-胆碱能受体、EGF 受体、胰岛素受体、PDGF 受体以及 β -肾上腺能受体均可被磷酸化。受体磷酸化可能有两种机理: (1) 受体本身具有内在

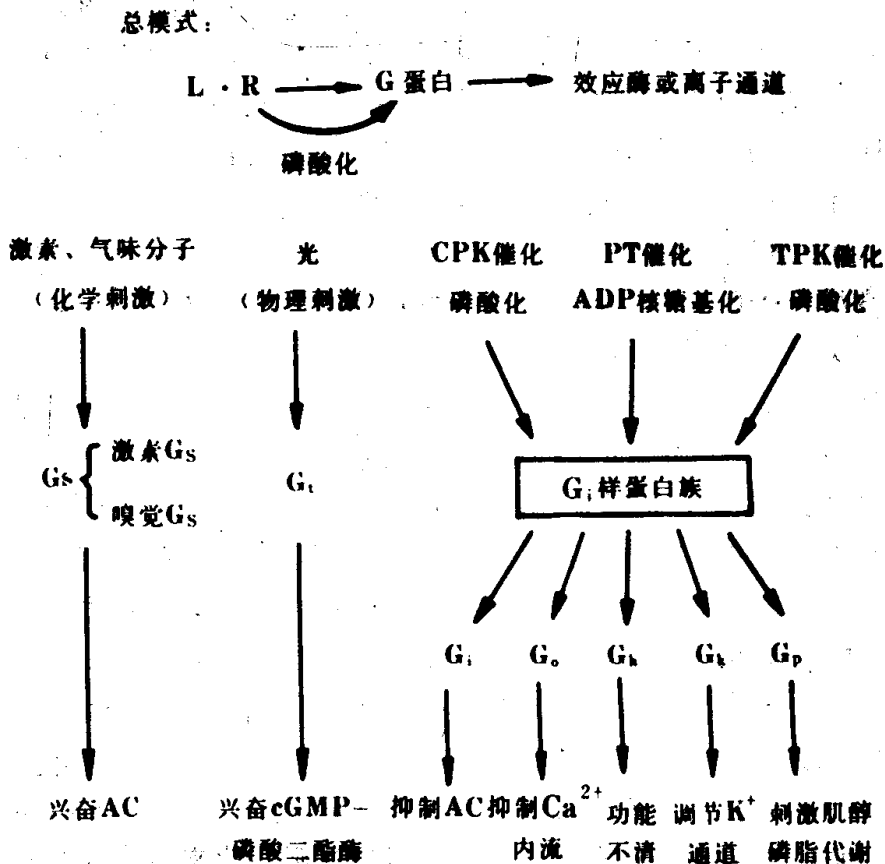


图2 GTP调节蛋白的族员

的激酶活性，当与其配体结合时，受体活化并促使其自身以及膜联系的底物的磷酸化，一般称这类反应为受体自身磷酸化，属于这一类型的例子有胰岛素、EGF、PDGF等受体。

(2) 非受体激酶活化后作用到受体上，或者是配体使受体构象改变，使得受体成为膜上蛋白激酶的底物，从而发生受体磷酸化。属于这一类型的例子有光受体、N-胆碱能受体等，一

般称为非自身磷酸化。这里所举例子不是绝对的，也可能两者兼而有之。

受体和其他酶系统一样，也经历了磷酸化和去磷酸化的过程，而受体则成为磷酸化的接受体或供体。参与这两种反应的有受体蛋白激酶和蛋白磷酸酶。

受体磷酸化是促进受体内吞的关键，也是受体向下调的重要原因。向下调意指组织长期暴露在化学信号下可使其细胞表面受体脱敏，如 α -和 β -肾上腺能受体、N-胆碱能受体等，当这些受体磷酸化后就变得不敏感。但是，内吞不是向下调的唯一原因。受体向下调的机理大概有以下三种：(1)受体与其效应蛋白的解偶联；(2)由受体中介的细胞受体内吞；(3)由于蛋白构象改变，受体不再与激动剂结合而失活。由受体内吞导致的受体向下调仍然占主要地位，这种向下调又可分为：(1)同源性向下调，系指配体与其相应受体结合后发生内吞，最终至溶酶体内降解。部分内吞的受体在拣选时可再周转至细胞膜，如EGF、转铁蛋白(Transferrin, TF)、LDL对各自受体的作用。(2)异源性向下调，系指配体与其受体结合后，很快促使其它受体内吞，此现象称为受体系统间的串活或受体的转移调控，如PDGF、成纤维细胞生长因子(FGF)、大戟二萜醇酯(PMA)、血管紧张素可以作用在各自的受体上，但促使EGF受体的内吞。

最近，通过受体一级结构的测定和磷酸化反应的研究，可将内吞后的历程分解为数个步骤(图3)，即(1)反应起始(磷酸化)，(2)群集和内吞，(3)拣选，(4)输送至溶酶体。由图可见，受体磷酸化与内吞有密切的关系，当受体与配体结合并磷酸化时，才能群集在一起并处在细胞膜的凹坑中。受

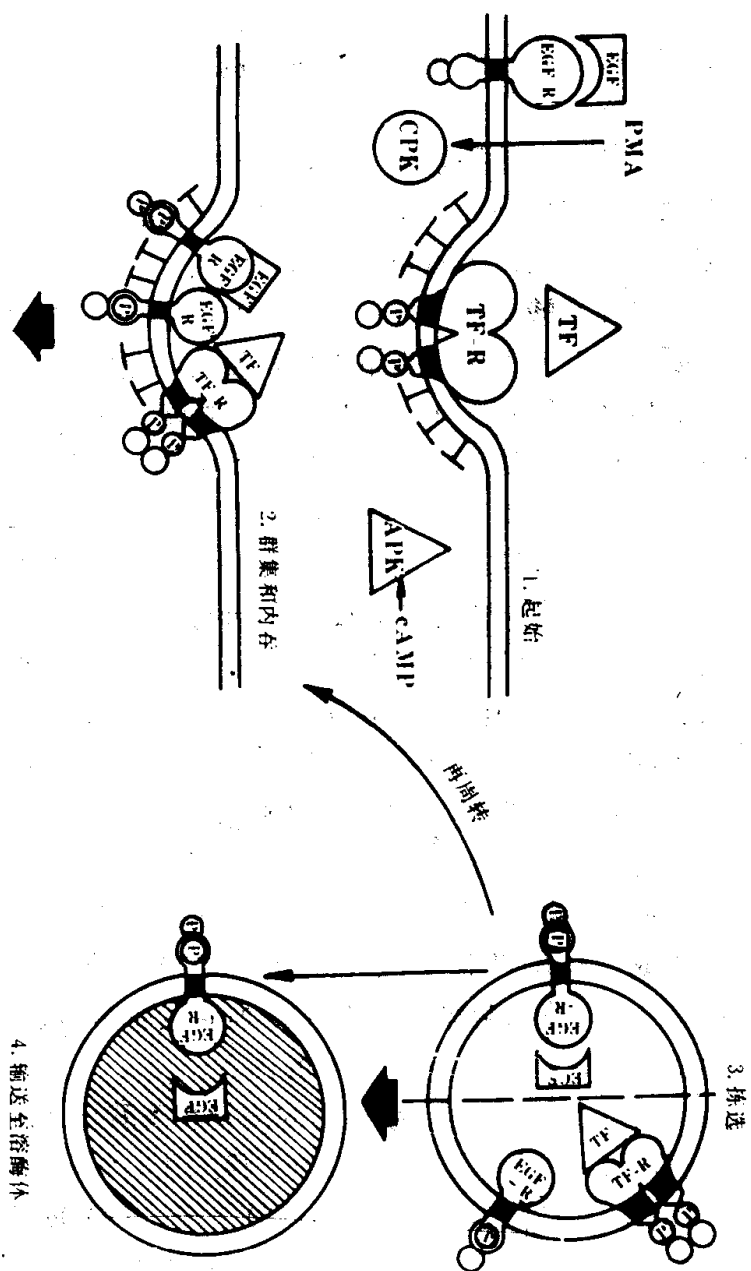


图 3 磷酸化对受体功能的调控

体与配体结合、cAMP 水平的提高 (APK 活化)、以及 Ca^{2+} 、二酰甘油 (DG) 或 PMA 对 CPK 的活化都能促使受体磷酸化。PMA 激活 CPK, 可使 EGF 受体在 654 位苏氨酸残基上磷酸化, 从而发生群集和内吞, 这是一种异源性向下调。PMA 也能触发 TF 受体内吞。在拣选时, 内吞的 EGF 受体和 TF 受体进入内吞小泡, 这里酸性 pH 可使 EGF 从其受体上解离下来, 受体又很快再周转至细胞膜。由此可见, 这种异源性向下调经历了 (1)、(2)、(3) 三个步骤。EGF 与其受体结合后发生内吞, 从内吞小泡输送至溶酶体, 在这里受体与配体解离后被降解, 这属于同源性向下调, 共经历了 (1)、(2)、(3)、(4) 四个步骤。看来, 受体酪氨酸的磷酸化是受体进入溶酶体的先决条件, 而 TF 受体不含 TPK 活性, 故不进入溶酶体。EGF 受体或胰岛素受体的丝氨酸、苏氨酸上的磷酸化可使该受体 TPK 活性降低。向下调以及 TPK 活性的降低, 共同使受体的功能减弱或丧失。

四、钙动员受体和肌醇磷脂代谢

钙动员受体是指一类重要的细胞表面受体, 刺激这类受体可活化 PLC。受体和 PLC 之间也有偶联蛋白——GTP 调节蛋白 (G_p) 存在并负责信息转导 (图 4), 这一情况与 cAMP 依存的蛋白激酶 (APK) 系统中的受体和 AC 之间的偶联蛋白 (G_s 、 G_i 等) 十分类似。当激动剂 (A) 激活受体 (R) 时, 就催化 G 蛋白的 α 亚基使结合的 GDP 转换为 GTP, α 亚基与 β 、 γ 亚基解离开来。被解离的 α 亚基可激活 PLC, 此效应酶可催化水解 PIP_2 (磷脂酰肌醇 4, 5-二磷酸), 生成 IP_3 (肌醇 1, 4,

5-三磷酸) 和 DG, IP_3 扩散至细胞浆, 作用在内质网上受体并释放 Ca^{2+} (称为钙动员)。DG 仍短暂地留在细胞膜并激活

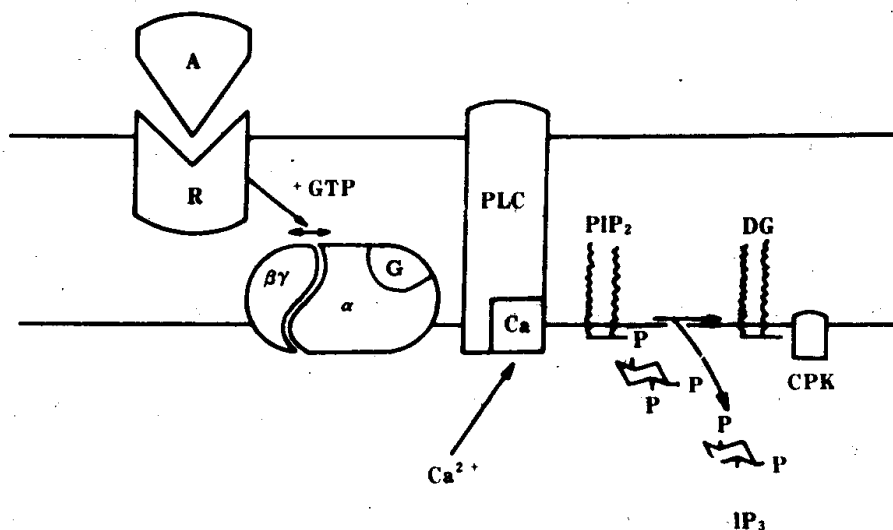


图 4 钙动员受体和磷脂酶 C 间的偶联

CPK。G 蛋白的 α 亚基具有 GTPase 的作用, 可水解结合的 GTP 从而终止 PLC 的活化。PLC 对 Ca^{2+} 有一高亲和部位, 为了 α 亚基的活化, 此部位须被 Ca^{2+} 占据, 最低 Ca^{2+} 浓度为 100nM, 此系未兴奋细胞之浓度。然而 Ca^{2+} 在 1~500 μ M (取决于细胞类别及检测条件) 时, 即便不涉及 G 蛋白, 也能直接刺激 PLC。

PIP_2 水解得到的 IP_3 可再进一步代谢, 一方面再周转回到 PIP_2 (图 5), 另一方面可生成其它肌醇多磷酸类分子 (图 6), 如肌醇-1, 2-环-4, 5-三磷酸 (cIP_3), 肌醇-1, 3, 4, 5-四磷酸 (IP_4) 等, 这些肌醇多磷酸也可能是新的信使。实验证明, IP_3 经 IP_3 激酶催化生成 IP_4 , IP_4 则能打开细胞膜上的

Ca^{2+} 通道而不是作用在胞浆内质网上的受体上。

肌醇磷脂代谢途径中有两个重要的酶：PLC 和 PLA_2 。PLC

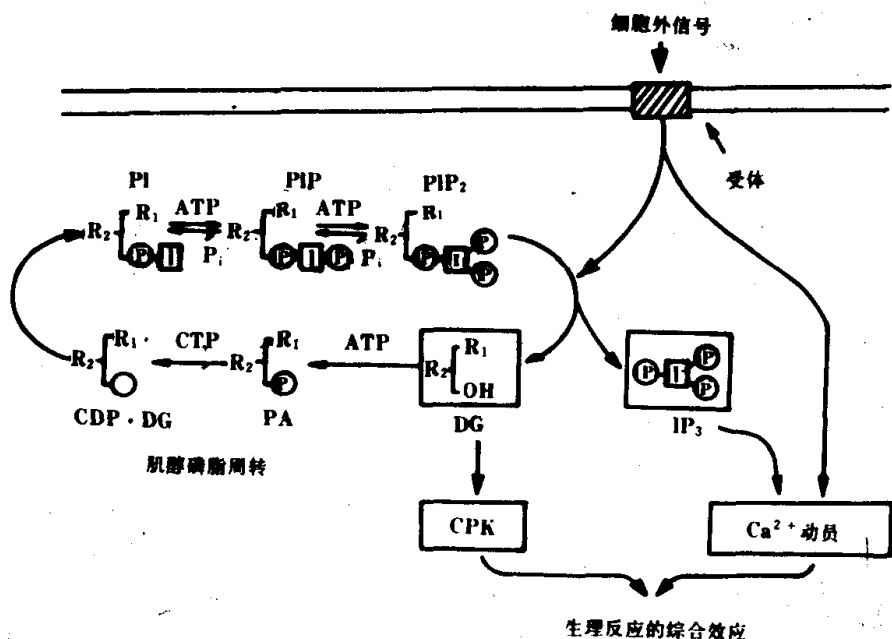
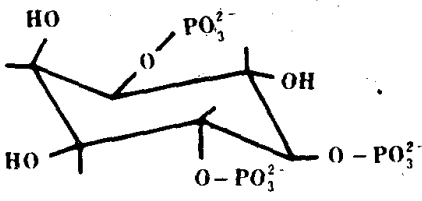


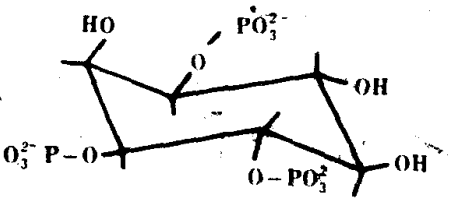
图 5 肌醇磷脂周转和信号转导

亦称多磷酸肌醇磷酸二酯酶 (PPI-PDE)，可催化 PIP_2 的水解。 PLA_2 为钙依存的脂酶，其 N 端结构和 CPK 相同，这两个酶均富含半胱氨酸，使得酶的结构在与膜磷脂表面相互作用时更加稳定。从磷酸肌醇产生花生四烯酸 (AA) 有两条途径：PLC 作用于肌醇磷脂产生 DG 和 IP_3 ，DG 经脂肪酶催化生成 AA、脂肪酸及甘油； PLA_2 作用于肌醇磷脂释放出 AA 及溶血磷酸甘油酯。AA 是产生前列腺素、白三烯等的前驱物。 PLA_2 对钙的亲和力远低于 PLC。它的另一作用为防止磷脂过氧化物的毒性，可催化水解膜上脂肪酸过氧化物。

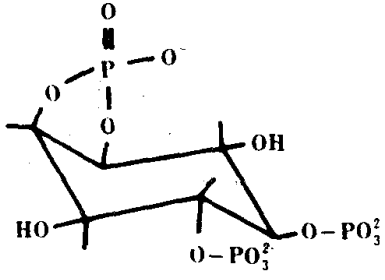
与肌醇磷脂代谢及钙动员有关的靶组织可分为：(1) 兴奋性组织：平滑肌、脑、交感神经节等；(2) 非兴奋性组织：肝、血小板、中性白血球；(3) 腺体：内分泌腺如肾上腺髓质层、松果腺，外分泌腺如胰腺、腮腺、绿头蝇唾液腺。有



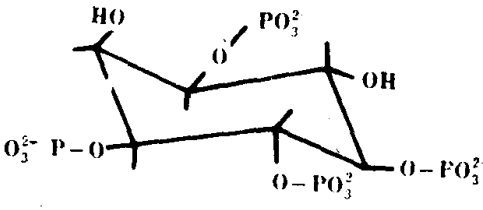
肌醇-1, 4, 5-三磷酸 (IP₃)



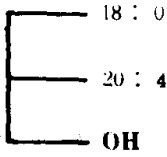
肌醇-1, 3, 4-三磷酸



肌醇-1:2-环-4, 5-三磷酸 (cIP₃)



肌醇-1, 3, 4, 5-四磷酸 (IP₄)



二酰基甘油 (DG)

图 6 磷脂肌醇代谢中的信号分子和未定分子