



# G 蛋白在心血管功能调节 及急性肺损伤中的作用研究

A Study of the Role of G Protein on the Regulation of  
Cardiovascular System Functions and Acute Lung Injury

周元国 著



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



# G 蛋白在心血管功能调节 及急性肺损伤中的作用研究

A Study of the Role of G Protein on the Regulation of  
Cardiovascular System Functions and Acute Lung Injury

周元国 著



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

## 图书在版编目(CIP)数据

G 蛋白在心血管功能调节及急性肺损伤中的作用研究 / 周元国著. —北京:高等教育出版社,2003.7

ISBN 7-04-011533-6

I. G... II. 周... III. ①鸟苷酸结合蛋白-调节(生理)-心血管系统-研究②鸟苷酸结合蛋白-治疗-急性病:肺疾病-损伤-研究 IV. R54

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 008365 号

---

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-64054588
社 址	北京市西城区德外大街 4 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100011	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
总 机	010-82028899		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>
经 销	新华书店北京发行所		
排 版	高等教育出版社照排中心		
印 刷	高等教育出版社印刷厂		
开 本	850×1168 1/32	版 次	2003 年 7 月第 1 版
印 张	7.25	印 次	2003 年 7 月第 1 次印刷
字 数	170 000	定 价	12.40 元
插 页	3		

---

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

**版权所有 侵权必究**

## 作者简介



周元国,男,湖北黄陂人,1961年10月生。医学博士,研究员,博士研究生导师。1983年6月毕业于第三军医大学,1992年获美国宾夕法尼亚医学院博士后证书。现任第三军医大学野战外科研究所分子生物学中心主任,《创伤外科杂志》副主编。

自1984年起从事创伤及创伤后并发症的发病机制和治疗研究;先后承担了国家“九七三”课题,国家自然科学基金重点课题、面上项目和军队“八五”“九五”“十五”攻关项目、指令课题和重点课题的研究工作。1990年起在国内率先开展了创伤分子生物学研究,组建了国内第一个分子创伤学实验室,以G蛋白在创伤中的作用和创伤应激、创伤耐受分子基础等为主要内容的系列研究,为分子创伤学学科的建设做出了贡献。近20年来在FASEBJ等国内外杂志上共发表论文61篇。博士论文获得2001年全国百篇优秀博士论文奖。以主要参与者获全国科技进步二等奖一项;全军科技进步二等奖3项和三等奖一项。参加《创伤外科学》等三部专著的编写,合作主编《分子创伤学》即将出版。1998年被解放军总后勤部评为“科技新星”。

## 导师简介



王正国，男，汉族，1935年12月生，于1956年毕业于中国医科大学，现任中国工程院院士，医药卫生工程学部主任，第三军医大学野战外科研究所一级教授，中华医学会创伤学分会主任委员，《中华创伤杂志》（中、英文版）总编辑。王正国院士致力于战创伤基础理论和应用基础研究40多年，是我国冲击伤、创伤弹道学、交通医学研究的主要创始人之一，国家重点学科——野战外科学学术带头人，已培养博士后7名、博士研究生40名、硕士研究生7名，还为部队师以上医院培训了500余名战创伤医务人员。以第一作者发表论文200余篇（英文发表的论文27篇），先后编著、主编专著20余部，参编10余部，获含国家科技进步一等奖在内的国家级科技奖7项及其他军队、省部级科技奖数10项。并先后获国际军事医学最高奖—Michael DeBakey国际军医奖，陈嘉庚医学科学奖，国际交通医学重大贡献奖。2002年获第四届中国工程科技光华奖。1998年获总后勤部“科学技术一代名师”称号，1999年江泽民主席亲自签发通令为他记一等功，以表彰其为战创伤医学研究做出的杰出贡献。

## 内 容 提 要

G 蛋白作为耦联于细胞表面受体和细胞内效应器的桥梁,是细胞外信息进入细胞的主要门户之一,不论是在生理状态,还是病理状态下,它的水平和活性对维持和控制细胞正常状态均是十分重要的。本书作为一个学术研究报告,通过对生理过程的老化模型和药物脱敏、高血压及急性肺损伤等模型 G 蛋白几种主要亚型及其基因表达水平变化的定量观察,并结合施以受体激动剂和药物地塞米松,研究 G 蛋白的作用和变化的机制。书中还对 G 蛋白的结构、分类、发挥生物学功能和作用的机制以及 G 蛋白调节的方式进行了系统介绍。本书适用于从事与细胞信号传导相关的生理、药理、病理等领域研究的学生、研究生、科研人员和临床工作者参考。

细胞信号传导是当前生命科学研究中发展极为迅速的前沿领域之一。经过多年研究,人们发现细胞内多种信号通路之间存在着极为复杂的相互作用,形成了一个细胞信号传导的网络系统,在这个复杂网络系统中跨膜和跨核膜是信号传导的两个关键环节,其中又以受体和与受体耦联的分子的特性、激活和传导信号的方式更引人注意。G 蛋白作为最重要的一类受体耦联分子在跨膜信号传导中的作用在过去的 20 年中得到了长足的进步,是继环腺苷酸等多个项目之后的又一个获得诺贝尔生理或医学奖的信号传导领域。然而国内外研究更多的是注重于基础理论的研究,与临床疾病有关的 G 蛋白的变化及作用的研究尚有许多待开发的领域。

本书作为一本研究专著,在研究了衰老、受体脱敏感和自发性高血压与 G 蛋白及其亚型的关系的基础之上,重点研究了临床最为常见的严重并发症之一——急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中 G 蛋白耦联信号传导在其发病机制和治疗中的作用和意义。作为一个创伤学工作者,我认为该项工作也是从分子创伤学角度研究创伤后并发症的一个有益尝试,该研究有可能为创伤基础研究开拓一个新领域。同时也可揭示人体生理和病理过程的分子基础,甚至为研究疾病的诊断、治疗提供很好的启示。

出版学位论文的单行本,在国外特别是北欧国家已有很长的

历史,对学位教育的广泛开展和水平的提高起到了很好的推动作用。国务院学位委员会和教育部学位办公室决定在我国也开展这项工作,确实是一件值得赞颂的工作。学位教育在我国高层次人才培养中占有重要地位,也取得了优异的成绩,然而学位论文的内容和水平存在较大的差异也是不容忽视的问题。我相信随着更多的优秀学位论文的公开出版,不仅对广大的研究生学习如何写作学位论文、提高水平是一个引导和鞭策,同时对研究生导师们如何指导研究生修改论文也是大有裨益的。

中国工程院院士

中华医学会创伤学分会主任委员 王正国

2003年4月24日于重庆第三军医大学



# 前 言

当前,生命科学研究领域中调节细胞生长、增殖、分化和凋亡等一系列基本生命活动的细胞信号传导是最为热门的研究方向之一。G 蛋白,又称鸟苷酸调节蛋白(guanine nucleotide regulatory protein),是位于受体与效应底物分子之间的耦联蛋白。它存在于各个组织和细胞中,是联系外部信息(如神经递质、细胞因子、激素、活性多肽等)和胞内第二信使的桥梁,其在高等动物、简单真核生物、昆虫及植物中普遍存在,是参与细胞内外信息传导的最重要途径之一。20 世纪 80 年代,Rodbell 等发现跨膜信号传导需要 GTP 的存在;后来,Gilman 等人发现 G<sub>s</sub>(刺激型 G 蛋白)在细胞信号传导途径中的作用及其功能,两人并由此于 1994 年获得了诺贝尔生理或医学奖。

国内外对 G 蛋白介导的信号途径中各组分的研究已进行了十多年,许多问题已逐渐明确,特别是其在疾病发生发展中的作用研究,使人们对很多疾病有了更深一层次的理解。例如生理学家们发现 G 蛋白的结构和功能改变与心血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤等很多重大疾病都密切相关。另外,G 蛋白耦联受体(GPCRs)还是一类非常重要的药物靶标,在当今前 50 种最畅销的上市药物中,20%属于 G 蛋白受体相关药物。随着 G 蛋白耦联信号组分的结构与功能的关系以及结合区和功能的不断明确,将为医学上新

药剂的合成及研制提供更多的线索。

然而,近年来 G 蛋白的研究更多的已转向 Ras 等小分子 GTP 结合蛋白, G 蛋白耦联受体、G 蛋白信号调节因子(RGS)以及 G 蛋白介导的信号途径与其他信号途径的交叉调节(cross talk)方式和机制。本书作为一本学位论文,完成于 1996 年,总结的是 1992 年至 1995 年期间的研究工作,其中有些内容现在看来是不全面甚至是不准确的,但为了保持论文的原样,我仅对个别排版和印刷错误作了修改,所有图片也按原样制版,我希望这样能更准确地反映实际情况,为后来者提供一些有用的参考。但在书后附上了一篇近期完成的关于 G 蛋白介导的信号通路及其调节的综述,以供读者参考。

作为一篇学位论文能由高等教育出版社公开出版,是让人值得高兴的事,我的导师王正国院士和朱佩芳教授不仅在攻读学位期间给予了我精心的指导,在本书的写作和修改中也提出了大量的宝贵意见,同时本书的出版也得到了他们的鼓励与支持,在此我要向他们表示崇高的敬意和衷心的感谢。本书虽然是一本个人专著,但却凝结着众多给予我帮助的老师、同事、同学和朋友的辛勤劳动,说声谢谢远远不能表达我由衷的感激之情。书中综述部分的示意图多取自有关文献,未能一一列明,在此向读者及作者表示歉意。

由于本书完稿较早,加之细胞信号传导的研究发展非常快,书中的内容可能会有不正确和遗漏之处,希望读者能以吸其精华弃之糟粕的态度予以对待,如能蒙读者不吝指教,作者将不胜感激,我的 EMAIL 地址是 [ygzhou@online.cta.cq.cn](mailto:ygzhou@online.cta.cq.cn)。

作者 周元国

2003 年元月于重庆第三军医大学

## 摘 要

G 蛋白作为耦联于细胞表面受体和细胞内效应器的桥梁,是细胞外信息进入细胞的门户,不论是在生理状态,还是病理状态下,它的水平和活性对维持和控制细胞正常状态均是十分重要的。本研究通过对生理过程的老化模型和药物脱敏、高血压及急性肺损伤等病理模型 G 蛋白几种主要亚型  $\alpha$  亚基及其基因表达水平变化的定量观察,并结合施以受体激动剂(去甲肾上腺素)、拮抗剂(TXA<sub>2</sub>R 拮抗剂酚红和 GR<sub>32191</sub>)和具有多种作用的药物地塞米松对它们的影响,研究 G 蛋白在这些模型中的作用和变化的机制。

实验发现,衰老动物主动脉 Go $\alpha$  和 Gi $\alpha$  显著下降, Gs $\alpha$  4.2 $\times$ 10<sup>4</sup>带显著下降,心脏则变化不显著,提示老化所致的心血管功能变化可能与 G 蛋白有关,但心脏和主动脉是不同的。相应 G 蛋白 mRNA 的定量分析未能证明主动脉中 G 蛋白的下降是基因表达水平下降引起,从而提示这种减少可能是翻译减慢或/和降解加快所致。对衰老大鼠培养平滑肌细胞 G 蛋白的进一步观察证明,主动脉中 G 蛋白基因表达的变化主要是来自平滑肌细胞。

慢性输注 NE 使主动脉 Gs、Gi 水平下降,心室、心房 Gi $\alpha$  升高, Gs $\alpha$  先降低后回升至基础水平。提示 Gs $\alpha$  下降、Gi $\alpha$  升高分别是主动脉、心脏 NE 脱敏的分子基础。自发性高血压 G 蛋白的改变与输入 NE 相似,提示高血压的这种改变不是原发而可能是代

偿性的。对平滑肌激动剂脱敏的观察证明不仅  $G_s$  的下调参与了脱敏作用,  $G_o$  显著升高也是脱敏机制之一。

急性肺损伤后肺中 G 蛋白 6 h 以  $G_{i\alpha}$  升高,  $G_{s\alpha}$   $4.5 \times 10^4$  带下降为特点, 24 h 则  $G_{i\alpha}$ 、 $G_{s\alpha}$  和  $G_{q\alpha}$  均显著下降; 72 h 仍维持较低水平, 说明肺损伤时确有 G 蛋白的参与。而早期  $G_s$  下降,  $G_i$  升高与脱敏相似, 会降低机体的反应能力并使有害信号增强造成组织损伤。后期 G 蛋白均下降, 特别是  $G_q$ ,  $G_i$  下降可能是一种自适应性保护反应。对相应 G 蛋白 mRNA 和胞浆及胞膜 G 蛋白水平的观察证明, 多数情况下 G 蛋白未由细胞膜转位至细胞浆, 细胞膜 G 蛋白的变化主要是基因表达水平改变所致。急性肺损伤脑组织中 G 蛋白也有改变, 提示不仅肺是主要受累器官, 脑组织也可能受损或参与了肺损伤的发生, 这为肺源性脑水肿发病机制提供了新的解释。

地塞米松使正常大鼠肺  $G_{i\alpha}$ ,  $G_{o\alpha}$  升高,  $G_{s\alpha}$   $5.2 \times 10^4$  带升高,  $4.5 \times 10^4$  带降低, 脑  $G_{s\alpha}$  降低, 也抑制急性肺损伤时 G 蛋白变化, 使 6 h  $G_i$  不升高, 而  $G_s$  升高、24 h 胞浆中  $G_q$  升高, 说明地塞米松对 G 蛋白有调节作用, 有促进  $G_q$  从膜向浆转位的作用, 这可能是地塞米松治疗作用的重要机制之一。

$TXA_2$  受体拮抗剂虽对急性肺损伤有一定保护作用, 但不能改善急性肺损伤时 G 蛋白下调, 其原因不是  $TXA_2$  的作用未被阻断, 而可能是其他与  $G_q$  耦联的激动剂仍然存在的缘故。

因此本研究结果提示, 早期抑制或降低以传递有害信号为主的 G 蛋白如  $G_i$ ,  $G_q$  或防止  $G_s$  的下降将可能减轻有害信号对机体造成的损伤, 后期则可阻止进一步恶化, 促进机体的迅速恢复。

关键词: G 蛋白, 信息传导, 地塞米松, 去甲肾上腺素, 血栓素, 酚红, 血栓素受体, 急性肺损伤, 脱敏感,  $GR_{32191}$ , 衰老, 大鼠

## Abstract

G proteins that link receptor to effector are the bridges of signal transduction from cell-surface receptor to membrane-bound effector molecules. Their level and activity are very important to control and maintain homeostasis. The level of several main types of G protein  $\alpha$  subunits and their mRNA were quantitatively examined in the aorta, heart, lung and brain of aging rats, norepinephrine (NE) infusion rats and WKY/SHR. The alterations of G proteins in the rats with acute lung injury that were treated with dexamethasone, thromboxane antagonists (phenol red, GR<sub>32191</sub>) were also measured.

Western blot analysis revealed that the Go $\alpha$ , Gi $\alpha$  and the band of  $4.5 \times 10^4$  of Gs $\alpha$  in the aorta decreased significantly in 24 month old rats while the level of the heart did not change. These results indicate Gi $\alpha$  and Go $\alpha$  may be the molecular basis for the changes of receptor responsiveness in the aging vasculature. The mechanism of age related alterations in cardiac function is not the same as the aorta. The decrease of G protein in the aorta may be the result of increase of degradation or/and decrease of translation of mRNA other than gene expression. The observation on G protein mRNA in culture aorta smooth muscle cells (SMC) from 24 month old rats dem-

onstrated that the changes of G proteins expression are mainly from SMC.

Chronic infusions of norepinephrine significantly decreased the level of  $G_{\alpha}$ ,  $G_{i\alpha}$  and  $G_{o\alpha}$  in the aorta, and increased the level of  $G_{i\alpha}$  in the atria and ventricles. The  $G_{\alpha}$  in the heart decreased after NE infusion for 3 days but then returned to control levels by day 6. The level of  $G_{i2\alpha}$  mRNA increased after NE infusion for 6 days and might account for the increase of  $G_{i\alpha}$  protein. These results suggest the increase of  $G_{i\alpha}$  and decrease of  $G_{\alpha}$  contributes to desensitization of adrenergic response in the heart and aorta separately. The alterations of G proteins in spontaneously hypertensive rats (SHR.) are similar to the changes after NE infusion for 6 days; it is suggested that the changes are a compensatory response other than primary cause. The increase of  $G_{o\alpha}$  in the culture cells treated with NE indicated that  $G_{o\alpha}$  might a reason of cardiovascular desensitization too.

During acute lung injury (ALI),  $G_{i\alpha}$  increased,  $4.5 \times 10^4$  band of  $G_{\alpha}$  decreased after oleic acid injection for 6 hours. By 24 hour after injury,  $G_{i\alpha}$ ,  $G_{\alpha}$  and  $G_{q\alpha}$  all decreased significantly and maintained the low level until 72 hour after injury. The increase of  $G_{i\alpha}$  may aggravate the damage of tissue caused by Gi coupling receptor's antagonists, such as 5-HT, bradykinin and opioid, the decrease of Gs may attenuate the effects of  $PGI_2$ ,  $PGE_2$  et al. At the late stage of ALI, the decrease of G proteins, especially  $G_q$ , can resist the increase of cytokines such as PAF,  $TXA_2$  and endothelin, therefore, it is an important compensation response. The comparison of G protein level in the cytosol and membrane showed the translocation from membrane to cytosol did not take place, and there was probably reverse translocation from cytosol to membrane, because the ratio of G protein in membrane to cytosol increased significantly after oleic acid

injection. The fact that the trends of G protein mRNA are the same with G protein suggest the changes of G protein are due to increase of expression of gene. The changes of G protein in the brain of rats with ALI suggest the brain also involves in the development of lung injury. It also may be the pathophysilogic basis of the brain edema caused by lung.

$G_{i\alpha}$ ,  $G_{o\alpha}$  increased in the lung and  $G_{s\alpha}$  decreased in the brain in the normal rat after treatment with dexamethasone. It indicates that dexamethasone can modulate G protein in normal rats. The therapeutic effects to ALI may be also due to its modulation to G protein such as inhibiting the increase of  $G_i$ , preventing decrease of  $G_s$  by 6 hour after injury, and promoting the translocation of  $G_q$  from membrane to cytosol by 24 hour after injury and then.

Although the antagonists to thromboxane  $A_2$  receptor could reduce the damage of lung injury induced by oleic acid, but it did not attenuate the downregulation of thromboxane receptor and decrease of  $G_q$  protein. These data indicate that the decrease of  $G_q$  is not only caused by increase of thromboxane, but also due to the increase of other cytokine coupling to  $G_q$ .

These results suggest that inhibiting or attenuating the increase of  $G_i$ ,  $G_q$  or preventing the decrease of  $G_s$  in the early stage may prevent or reduce the damage. In the late stage, it could prevent deterioration and promote to recovery. This could be a therapeutic strategy for treatment in such ALI condition.

**Key Words:** G protein, Signal Transduction, Dexamethasone, Norepinephrine, Thromboxane, Thromboxane Receptor Phenol red,  $GR_{32191}$ , Acute lung injury,  $GR_{32191}$ , Aging, Rats

## 英文缩略语词表

缩写	英文全称	中文译名
AC	adenylate cyclase	腺苷酸环化酶
AA	arachidonic acid	花生四烯酸
ALI	acute lung injury	急性肺损伤
ARDS	Acute respiratory distress syndrome	急性呼吸窘迫综合征
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CTx	cholera toxin	霍乱毒素
DAG	diacylglycerol	二酰基甘油
DEX	dexamethasone	地塞米松
ET	Endothelin	内皮素
GAP	gTPase-activating proteins	GTP 酶激活蛋白
IP3	inositol 1,4,5 - trisphosphate	三磷酸肌醇
LBI	lung/body weight index	肺体指数
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
NcM	nitrocellulose membrane	硝酸纤维素膜
NE	Norepinephrine	去甲肾上腺素
NF1	neurofibromatosis type - 1	一型神经纤维瘤病
OA	oleic acid	油酸



OD	optical density	光密度
PAF	platelet-activating factor	血小板激活因子
PI	phosphatidylinositol	磷酸肌醇
PIP <sub>2</sub>	phosphatidyl-inositol 4,5 - bisphosphate	磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>	磷脂酶 A <sub>2</sub>
PLC	phospholipase C	磷脂酶 C
PMA	phorbol 12 - myristate 13 - acetate	大戟二萜醇 - 12 肉豆 蔻酸酯 - 13 醋酸盐
PMNs	polymorphonuclear granulocytes	多形核白细胞
PR	phenol red	酚红
PTx	Pertussis Toxin	百日咳毒素
RLW	rate of lung water	肺含水率
SHR	spontaneously hypertensive rats	自发性高血压大鼠
SMC	smooth muscle cell	平滑肌细胞
TNF	tumor necrosis factors	肿瘤坏死因子
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>	血栓素 A <sub>2</sub>
TXA <sub>2</sub> R	thromboxane A <sub>2</sub> receptor	血栓素 A <sub>2</sub> 受体
TXB <sub>2</sub>	thromboxane B <sub>2</sub>	血栓素 B <sub>2</sub>
WKY	Wistar-Kyoto	京都威斯塔大鼠