



王红阳主编

细胞信号转导

基础理论与实用技术

Cell Signaling

*Fundamental Theory
& Practical Techniques*



上海科技教育出版社

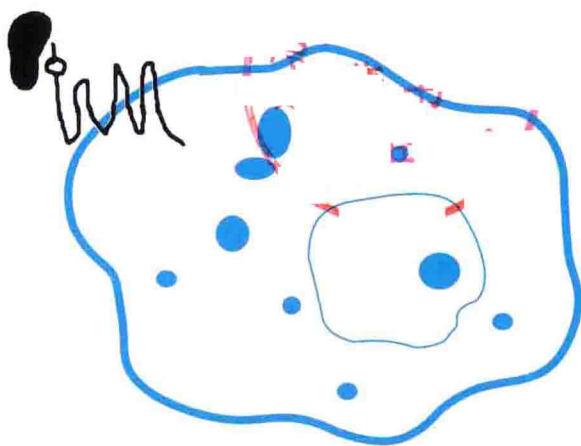
王红阳主编

细胞信号转导

基础理论与实用技术

Cell Signaling

*Fundamental Theory
& Practical Techniques*



上海科技教育出版社

图书在版编目(CIP)数据

细胞信号转导: 基础理论与实用技术/王红阳主编.
—上海: 上海科技教育出版社, 2013.12
ISBN 978-7-5428-5787-3

I. ①细… II. ①王… III. ①细胞—信号—转导—
技术 IV. ①Q735

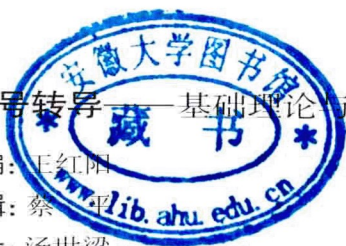
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第250657号

细胞信号转导——基础理论与实用技术

主 编: 王红阳

责任编辑: 蔡

封面设计: 汤世梁



出版发行: 上海世纪出版股份有限公司
上 海 科 技 教 育 出 版 社
(上海市柳州路 218 号 邮政编码 200235)

网 址: www.ewen.cc

www.sste.com

经 销: 各地新华书店

印 刷: 上海中华印刷有限公司

开 本: 787×1092 1/16

印 张: 15

插 页: 4

版 次: 2013 年 12 月第 1 版

印 次: 2013 年 12 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 978-7-5428-5787-3/R·429

定 价: 168.00 元



出版说明

科学技术是第一生产力。21 世纪，科学技术和生产力必将发生新的革命性突破。

为贯彻落实“科教兴国”和“科教兴市”战略，上海市科学技术委员会和上海市新闻出版局于 2000 年设立“上海科技专著出版资金”，资助优秀科技著作在上海出版。

本书出版受“上海科技专著出版资金”资助。

上海科技专著出版资金管理委员会

主 编 王红阳

副 主 编 丁 劲

编 写 者 （按汉语拼音排序）

陈 磊 陈 瑶 丁 劲 董立巍
付 静 古 瑾 李 亮 李 宁
李 梢 李 忠 谈冶雄 杨 文
于乐兴 王红阳 王 雪 文 文
张 博

参加校对者 （按汉语拼音排序）

孙 文 潘宇飞 杨 纯 余艳婷

前言

随着生命科学的快速发展，细胞信号转导研究已延伸至生物学与医学研究领域的各个层面；信号转导也已从一个新兴学科发展为多领域多学科的通用理论。细胞信号转导的实用技术不断更新、完善，在生命科学研究中发挥着至关重要的作用。

细胞将外源和内源性变化转化成特定的信号并逐级传递，最终作出相应的反应，这是一个非常复杂且极为精细的调控过程，它伴随着配体与受体结合、蛋白质的结构与活性改变以及各种基因表达的变化等。这一过程依赖的分子组成的信号转导链称为“信号转导通路”，细胞中不同的信号转导通路交互作用、互相调控形成一个动态的信号转导网络。随着生命科学的发展，新的信号调节分子和信号转导机制不断被揭示，对信号转导网络的理解和绘制也逐步清晰，日臻完善。

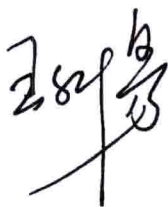
第二军医大学国际合作生物信号转导研究中心自 1997 年创建以来，开拓并深入开展了与疾病相关的信号转导研究，并取得重要进展，形成了一定特色。为将信号转导的新观点、新进展和新技术以及本中心在研究工作中的心得与广大读者分享，应上海科技教育出版社之约，我们编著了《细胞信号转导——基础理论与实用技术》一书。

本书深入浅出、图文并茂地描述了信号转

导的复杂过程，篇幅不长但不失连贯系统，从分子水平揭示了信号转导的本质，阐明了信号转导过程中的各种调控机制及其生物学意义。在概括性介绍基本理论的基础上，详述了相关实验技术的所需材料及其操作步骤，同时强调了实验操作中必须注意的事项以及可能遇到问题的解决方案，体现了有别于同类专业书籍的一大特色——操作性强，实用性佳；生动直观的插图对相关概念和实验技术加以形象描述的方式也期望能为本书增色。

本书主要适用于生命科学和医学专业的本科生和研究生，尤其有助于研究经验尚不丰富的医技人员快速提高相关研究水平。

由于信号转导是一门专业性很强的学科，内容覆盖面甚广、知识更新极快，限于篇幅可能有些许疏漏，敬请同行专家和广大读者给予指正。

A stylized handwritten signature in black ink, likely belonging to Wang Hong, the author of the preface.

中国工程院院士
国际合作生物信号转导研究中心主任
2013年1月31日

目 录

1 细胞受体与配体的作用及其相关技术	1
1.1 基本概念	2
1.1.1 细胞受体的分类与结构	2
1.1.1.1 跨膜受体	3
1.1.1.2 膜周受体	6
1.1.1.3 胞内受体	7
1.1.2 配体的来源与分类	9
1.1.3 受体与配体的作用模式	10
1.1.4 受体与配体作用的特点	10
1.1.5 配体与受体介导的信号通路	11
1.1.5.1 外源信号通路	11
1.1.5.2 胞内受体介导的信号通路	13
1.2 实用技术	14
1.2.1 细胞受体的分离	14
1.2.2 细胞受体的定量以及定位检测	19
1.2.2.1 蛋白质印迹技术检测受体含量	19
1.2.2.2 实时定量PCR技术	23
1.2.2.3 免疫组化与免疫荧光技术	24
1.2.2.4 荧光或放射免疫标记配体检测受体的 含量及其分布	27
1.2.3 受体活性及其功能的测定	27
1.2.3.1 受体磷酸化与去磷酸化的检测	27
1.2.3.2 RNA干扰技术检测受体功能	28
1.2.3.3 转基因动物在受体功能研究中的 应用	28
1.2.4 配体表达的检测	29

2	蛋白质的活性调节	35
2.1	基本理论	36
2.1.1	蛋白质的可逆磷酸化修饰	36
2.1.1.1	蛋白激酶与蛋白质的磷酸化	37
2.1.1.2	蛋白磷酸酶与蛋白质的去磷酸化	41
2.1.1.3	以蛋白激酶为靶点的靶向药物	46
2.1.2	蛋白质的泛素化与去泛素化	49
2.1.2.1	泛素化	49
2.1.2.2	去泛素化	50
2.1.2.3	泛素化在信号转导过程中的作用	51
2.1.2.4	类泛素化	53
2.1.3	蛋白质的乙酰化与去乙酰化	54
2.1.4	蛋白质的甲基化与去甲基化	57
2.2	实用技术	58
2.2.1	蛋白质可逆磷酸化的研究技术	59
2.2.1.1	蛋白质磷酸化水平的检测	59
2.2.1.2	体外激酶活性测定	59
2.2.1.3	放射性核素标记磷酸化蛋白	63
2.2.1.4	蛋白激酶与磷酸酶抑制剂的应用	68
2.2.1.5	磷酸化蛋白质组学	68
2.2.2	蛋白质泛素化的研究方法	73
2.2.2.1	免疫沉淀法测定	73
2.2.2.2	蛋白质印迹法	74
2.2.2.3	底物蛋白质泛素化位点的鉴定	75
2.2.3	蛋白质乙酰化的研究方法	75
2.2.3.1	染色质免疫沉淀技术(ChIP)鉴定乙酰化位点	76
2.2.3.2	免疫印迹法检测蛋白乙酰化	76
2.2.3.3	生物芯片确定组蛋白乙酰化表达图谱	77
2.2.4	蛋白质甲基化的研究方法	77

3	信号分子间相互作用及其实用技术·····	81
3.1	基本理论·····	82
3.1.1	信号分子的分类与作用方式·····	82
3.1.1.1	分类·····	82
3.1.1.2	作用方式·····	83
3.1.2	信号通路的网络调控·····	84
3.1.2.1	信号转导网络调控的复杂多样性·····	85
3.1.2.2	信号转导网络调控的专一性·····	85
3.1.2.3	信号转导网络的自我调控·····	85
3.2	实用技术·····	86
3.2.1	蛋白质与蛋白质相互作用的研究技术·····	87
3.2.1.1	免疫沉淀法·····	87
3.2.1.2	酵母双杂交系统·····	90
3.2.1.3	噬菌体展示系统·····	92
3.2.1.4	亲和层析与质谱分析法·····	94
3.2.2	核酸与蛋白质相互作用的研究技术·····	96
3.2.2.1	DNA与蛋白质相互作用的研究 技术·····	96
3.2.2.2	RNA与蛋白质相互作用的研究 技术·····	98
3.2.3	其他新技术简介·····	100
3.2.3.1	荧光共振能量转移分析技术·····	100
3.2.3.2	双分子荧光互补技术·····	102
3.2.3.3	Biacore技术·····	103
3.2.3.4	芯片技术·····	104
4	信号转导中转录因子的调控·····	111
4.1	基本理论·····	111
4.1.1	转录因子的结构特征·····	112
4.1.1.1	DNA结合域·····	112
4.1.1.2	转录激活域·····	114
4.1.1.3	蛋白质与蛋白质相互作用的调节结	

构域·····	115
4.1.2 转录因子活性的调节·····	115
4.1.2.1 配体调节·····	116
4.1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用·····	116
4.1.2.3 化学修饰调节·····	118
4.2 实用技术·····	120
4.2.1 转录因子与DNA结合的检测·····	120
4.2.1.1 电泳迁移率改变分析·····	120
4.2.1.2 染色质免疫沉淀分析·····	127
4.2.2 转录因子的活性分析·····	133
4.2.2.1 报告基因分析·····	133
4.2.2.2 足迹法·····	136
4.2.3 表观遗传对转录的调控·····	139
5 组学技术在信号转导研究中的应用·····	145
5.1 基本理论·····	146
5.1.1 基因组学理论·····	146
5.1.1.1 真核生物染色体组成·····	146
5.1.1.2 真核生物基因组结构·····	148
5.1.1.3 基因组变异的分类·····	148
5.1.2 转录组学理论·····	149
5.1.2.1 RNA的分类·····	149
5.1.2.2 信使RNA·····	150
5.1.3 蛋白质组学理论·····	151
5.1.3.1 基本概念·····	151
5.1.3.2 蛋白质组学产生与发展的背景·····	151
5.1.3.3 蛋白质组学研究的主要内容·····	152
5.1.3.4 蛋白质组学的应用·····	153
5.1.4 代谢组学理论·····	154
5.1.4.1 基本概念·····	154
5.1.4.2 主要研究方法·····	154
5.2 实用技术·····	155
5.2.1 基因拷贝数变化分析·····	155

5.2.1.1	DNA印迹·····	156
5.2.1.2	实时荧光定量PCR·····	161
5.2.2	单核苷酸多态性分析·····	163
5.2.2.1	单核苷酸多态性 (SNP) 芯片 技术·····	163
5.2.2.2	焦磷酸测序技术·····	165
5.2.2.3	质谱分析技术·····	166
5.2.2.4	高分辨率溶解曲线 (HRM) 技术·····	167
5.2.3	采用高通量测序技术的基因组变异 分析·····	168
5.2.4	表观遗传学分析技术·····	170
5.2.4.1	DNA甲基化研究技术·····	170
5.2.4.2	组蛋白修饰研究技术·····	172
5.2.5	采用芯片的转录组分析技术·····	173
5.2.6	基因表达系列分析·····	174
5.2.7	表达序列标签·····	176
5.2.8	蛋白质组学实用技术·····	177
5.2.8.1	双向荧光差异凝胶电泳·····	178
5.2.8.2	放射性核素标记相对与绝对定量 技术·····	183
5.2.9	代谢组学技术·····	189
5.2.9.1	培养细胞的代谢物提取·····	190
5.2.9.2	大肠埃希菌的代谢物提取·····	192
6	生物信息学在信号转导研究中的应用·····	197
6.1	基本理论·····	197
6.1.1	信号转导通路·····	198
6.1.2	信号转导通路的静态网络模型·····	198
6.1.2.1	网络上的路径·····	199
6.1.2.2	网络上的距离·····	200
6.1.2.3	节点重要性·····	200
6.1.2.4	网络子结构·····	201

6.1.3 信号转导通路的动态网络模型·····	201
6.1.3.1 布尔网络模型·····	202
6.1.3.2 动力学网络模型·····	202
6.1.3.3 动态特性·····	204
6.1.4 信号转导通路的差异变化·····	205
6.1.4.1 基于显著差异表达基因富集度分析 的方法·····	205
6.1.4.2 基于所有基因整体差异表达程度的 分析方法·····	206
6.1.4.3 基于部分基因差异表达程度的分析 方法·····	206
6.1.4.4 拓扑结构信息·····	207
6.1.4.5 信号转导通路间信号耦合的差异 变化·····	207
6.2 实用技术·····	208
6.2.1 信号转导通路相关数据库·····	208
6.2.2 信号转导通路的网络统计分析·····	210
6.2.2.1 信号转导通路的网络表示·····	210
6.2.2.2 基本统计分析·····	210
6.2.3 信号转导通路的动态特性分析·····	211
6.2.3.1 布尔网络模型分析·····	211
6.2.3.2 动力学网络模型分析·····	212
6.2.3.3 常用分析工具·····	214
6.2.4 显著差异变化信号转导通路的计算识别 技术·····	215
6.2.4.1 针对已知信号转导通路的计算识别 技术·····	215
6.2.4.2 显著差异网络模块的计算识别 技术·····	216
6.2.4.3 常用分析工具·····	217
附录·····	222
缩略语·····	222

1 细胞受体与配体的作用 及其相关技术

- ★ 受体是一类存在于细胞膜上或细胞内的特殊蛋白，能特异性地被信号分子识别并与其结合，进而激活细胞内一系列生物化学反应，使细胞对外界刺激作出应答
- ★ 受体可分为细胞膜受体和胞内受体两大类：细胞膜受体包括跨膜受体和膜周受体，跨膜受体能介导跨膜信号转导；胞内受体包括细胞质与细胞核受体
- ★ 受体存在于机体的不同组织和细胞中，可与配体相互作用，参与调控细胞的生长、分化、衰老以及死亡等生命程序
- ★ 能与受体作用或结合的生物活性物质广义上统称为配体，通常指能与受体形成复合物而引起生物调节作用的一类小分子
- ★ 细胞受体与配体的表达水平或结构发生改变是细胞功能变化的重要标志
- ★ 检测受体与配体含量及其功能的常用技术包括聚合酶链式反应、免疫印迹、免疫组织化学、免疫荧光法以及酶联免疫吸附测定法等

1.1 基本概念

从生物学上讲，受体（receptor）是一类存在于细胞膜上或细胞内的特殊蛋白，它们能被信号分子特异性识别并与其结合，进而被激活，引起细胞内的一系列生物化学效应及其功能变化。

配体（ligand）是指能与生物分子（受体）形成复合物并引起生物调节作用的一类小分子。与受体结合的生物活性物质广义上统称为配体。

从生物化学和药理学的角度，受体可分为细胞表面受体、细胞质受体、细胞核受体以及免疫受体。配体存在于血液或细胞间液，由实质细胞或间质细胞分泌产生，包括激素、神经递质、细胞因子、细胞黏附分子、小分子多糖、脂类或多肽等；此外，单克隆抗体也是一种重要的配体；配体也可根据需要人工合成，用于研究特定受体的功能或发挥治疗作用。

受体的生物学意义，简单地说是接受并传递信号。受体能识别配体信号，与配体特异性结合或介导配体与细胞组分的特异性作用，将配体的化学或物理信号转变成细胞的生理性或病理性反应。配体在细胞或组织之间承担着通信和协调作用。细胞或组织发生功能变化时，可分泌不同的生长因子、细胞因子、多肽或脂类分子，这些物质通过作用于相邻细胞或远端组织，传递功能信号；同时，其他细胞或组织也会将反应结果通过配体反馈，使机体功能保持协调与稳定。

1.1.1 细胞受体的分类与结构

根据受体在细胞内所处的部位，可将受体大致分为两大类：（1）细胞膜受体；（2）胞内受体。细胞膜受体又包括跨膜受体（transmembrane receptor）和膜周受体（peripheral membrane receptor），此类受体为镶嵌或附着于细胞膜脂质双层结构的蛋白分子，接受不能进入细胞的配体信号并通过其细胞质部分将信号传递入细胞。这一过程又称为跨膜信号转导（transmembrane signal transduction）^[1]。

胞内受体 (intracellular receptor) 包括细胞质与细胞核受体。核受体指位于细胞核内感受甾醇类和甲状腺素类激素的受体, 可以在细胞质与配体作用后, 再进入细胞核, 或直接在细胞核内与配体相互作用, 调控基因的转录。

1.1.1.1 跨膜受体

跨膜受体又分为 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR), 离子通道型受体 (ion channel-linked receptor) 和酶联受体 (enzyme-linked receptor)。跨膜受体由三部分组成, 即细胞外结构域、穿膜结构域与细胞内结构域。

细胞外结构域 通常含有配体结合位点和糖基化位点。

穿膜结构域 通常由 20~30 个疏水氨基酸残基组成, 其主要功能是将受体锚定在膜上, 通过其构象的改变, 将细胞外结构域的信号传至细胞内结构域; 另外还可形成离子通道孔。

细胞内结构域 受体的细胞质部分, 通常含有与细胞内分子相互作用位点或酶活性结构域。酶活性结构域主要可分为六种^[2]: (1) 酪氨酸激酶型; (2) 丝氨酸、苏氨酸激酶型; (3) 酪氨酸激酶相关型; (4) 类酪氨酸磷酸酶型; (5) 鸟苷酸环化酶型; (6) 组氨酸激酶相关型。

G 蛋白偶联受体

研究人员已发现约 800 种不同的基因表达产物均属于 GPCR 超家族。这类分子的氨基末端位于细胞外表面, 羧基末端在细胞膜内侧, 完整的肽链反复跨膜 7 次。由于肽链反复跨膜, 在膜的内、外侧形成几个环状结构, 分别负责与配体 (化学、物理信号) 的结合及细胞内的信号传递。细胞质部分可与一种 GTP 结合蛋白 (G protein) 相互作用, 所以这类受体被称为 G 蛋白偶联受体 (图 1-1), 如细胞因子受体 (cytokine receptor) 和趋化因子受体 (chemokine receptor)。

离子通道型受体

是一类自身为离子通道的受体。这种离子通道与受电位控制或受化学修饰调控的离子通道不同, 它们的开放或关闭直接受配体的调节, 其配体主要为神经递质。

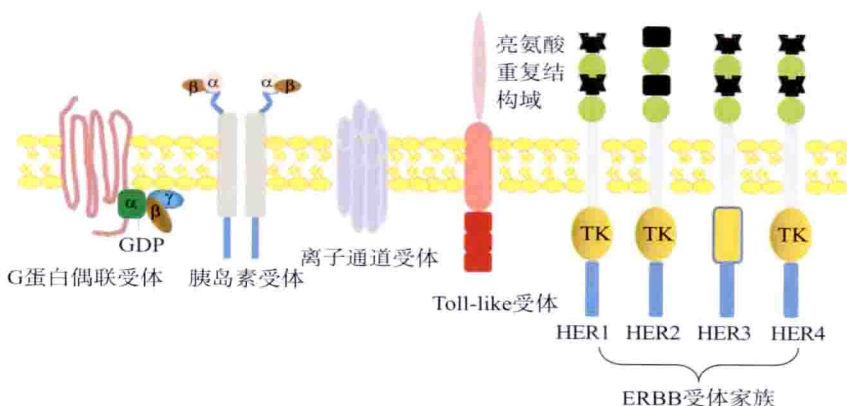


图 1-1 细胞膜蛋白受体示意图

跨膜结构；配体结合部；配体未知；G 蛋白；酪氨酸激酶；无酪氨酸激酶活性；TLR 结构域；N-末端亚基；亮氨酸重复区；膜脂质双层结构；C-末端；半胱氨酸丰富区

酶联受体

又称为催化受体，含有细胞外配体结合结构域，跨膜螺旋结构域和细胞内结构域，后者本身具有酶活性，或是能够与细胞质中的酶结合。^[3]

细胞内结构域常见的酶活性类型有酪氨酸激酶（多数酶联受体属于此类型）、丝氨酸、苏氨酸激酶和鸟苷酸环化酶等。

酶联受体主要分五种类型：（1）ERBB 家族；（2）胶质细胞源性神经营养因子（glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF）受体家族；（3）利钠肽受体（natriuretic peptide receptor, NPR）家族；（4）原肌球蛋白受体激酶神经营养因子受体（Trk neurotrophin receptor）家族；（5）Toll 样受体（Toll-like receptor, TLR）家族^[4~8]。

ERBB 家族 属于受体酪氨酸激酶，该家族在人类细胞中有四个成员：ERBB1、ERBB2、ERBB3 和 ERBB4。ERBB 受体（图 1-1）也称为 HER1、HER2（Neu）、HER3 和 HER4，其中 ERBB1 即表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）。上述受体在结构上均具有细胞外配体结合区域，单一跨膜区和细胞质酪氨酸激酶区。已知 11 种生长因子配体可激活 ERBB 受体，但至今尚未发现 ERBB2 对应的配体。ERBB 受体的细胞外结构与激酶结构域有很高的同源性，但 ERBB3 的激酶无活性。二聚体是受体激活的形式，它可以是同源二聚体也可以是异

源二聚体(ERBB1、ERBB3或ERBB4可分别与ERBB2形成异源二聚体)。

GDNF 受体家族 GDNF是一种小分子蛋白,由胶质细胞源性神经营养因子基因编码,促进各种类型神经元的生存与分化。其受体有四种类型:GFR α 1、GFR α 2、GFR α 3和GFR α 4,其相应的配体(GDNF family of ligand, GFL)分别是GDNF、NRTN、ARTN和PSPN。GFL形成同源二聚体,与糖基磷脂酰肌醇(glycosyl-phosphatidyl-inositol, GPI)锚定的GFR α 结合,该复合物能引起原癌基因RET(rearranged in transfection)编码的受体酪氨酸激酶二聚化,使RET发生分子间自身磷酸化,启动下游信号途径。

NPR 家族 此类受体的配体分为三种类型:心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP),脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)和C型利钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)。目前已从血管系统、肾、肾上腺和脑组织分离获得利钠肽受体。利钠肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)包括NPRA、NPRB和NPRC三种类型。该受体参与调节细胞内第二信使活性,如NPRA和NPRB属于鸟苷酸环化酶受体,激活后升高cGMP(环磷酸鸟苷)水平;而NPRC则抑制腺苷酸环化酶的活性。NPRA的结构由可结合心房利钠肽和脑利钠肽的膜外结合区,一个短跨膜区和细胞内结构域(包括激酶调节同源结构域和末端催化区)组成。NPRB与NPRA具有类似的结构,主要结合C型利钠肽。NPRC是一个截短受体,细胞内部分很短,缺乏酶活性,研究表明该分子参与清除配体作用,并可抑制腺苷酸环化酶及激活磷脂酶C。

Trk neurotrophin 受体家族 神经营养因子酪氨酸激酶受体参与调节哺乳动物神经系统突触的强度和韧性,影响神经元的生存与分化。常见Trk受体的配体是神经营养因子。原肌球蛋白受体激酶(Tropomyosin-receptor-kinase, Trk)的命名源自癌基因 trk (人类),第一个被发现的成员是TrkA。最初在结肠癌中发现Trk,之后发现Trk在胸腺瘤中呈激活状态(25%)。该癌基因的产生是由于1号染色体突变,导致原肌球蛋白前7个外显子与TrkA受体的跨膜及其细胞质结构域融合。正常Trk不含有与原肌球蛋白相关的氨基酸或DNA序列。Trk分三种:TrkA、TrkB和TrkC,它们与不同的神经营养因子具有不同的亲中性。神经营养因子合成后呈未成熟型,经蛋白酶切后才能成为可与Trk结合的配体。