

多肽激素作用原理的研究概况

张世荣

(中国科学院动物研究所内分泌室胰岛素组)

激素是由内分泌腺细胞合成的生理效应很强的有机物质,由腺体分泌进入血循环。血循环中的激素浓度通常是很低的(10^{-12} — 10^{-6} 克分子浓度),因此其作用的重要特征是对其作用对象的高度专一性和敏感性。某一激素的作用对象称为这一激素的靶。激素对其靶细胞作用的专一性和敏感性的本质,是20年来很多实验室所致力研究的重要课题。1900年J. N. Langley和P. Ehrlich提出了活细胞存在着结合化学物质部位的假说。这些年来动物学和内分泌学家对作用物和拮抗物作用的动力学研究,已确证接受激素的部位是存在的,这种接受部位称为激素受体。最著名的例子是肾上腺能系统存在 α 和 β 两种受体;胆碱能系统则含有尼克丁受体和蕈毒碱受体。它们分别对同型异功的药物有专一识别能力。自此激素受体被认为是接受激素分子的专一性的信息部位,对它的研究是研究激素作用原理的重要方面。

激素按其化学本质可分为三大类:即多肽激素、甾体激素和一些芳香族氨基酸衍生物,它们的作用方式不尽相同。甾体激素和芳香族氨基酸衍生物的作用方式是:激素可进入细胞并与溶于胞浆内的一种受体蛋白特异地结合,所形成的激素-受体复合体移至细胞核并作用于基因系统,导致特异性的蛋白质合成。

多肽激素(包括某些非多肽激素,如神经递素,乙酰胆碱和儿茶酚胺等)的作用方式与甾体激素不同,这类激素作用于靶细胞,并不进入细胞内而是与质膜表面的特异性受体相结合。通过激素信息的传递,而激发细胞产生生物效应。

这类激素作用原理的研究与以下两方面的工作密切相关;一是Sutherland(1958)对激素

作用中的cAMP和它的功能的发现。二是膜结构流动镶嵌(Fluid mosaic)模型学说的建立。本文将着重介绍多肽激素作用原理研究的最近进展。

目前研究多肽激素作用原理有两个主要方面:一是激素作用于膜的过程;二是在细胞内,包括在细胞质和细胞核的反应过程。据目前所知,这两个过程的反应链可能有三个重要的环节。第一个环节是激素与受体及腺苷酸环化酶系统的相互作用,释放cAMP等所谓第二信使。这部分是在细胞膜上进行的。第二个环节是cAMP激活蛋白激酶系统以至通过磷酸化过程引起一系列酶促反应。这是在细胞质内进行的。第三个环节是被激活的蛋白激酶接着作用于细胞核的基因系统,从而导致基因转录的控制。对于象生长激素、催乳激素和胰岛素等促进蛋白质合成的激素,可能是以这种方式达到其作用效应的。对多肽激素来说,三个环节中,激素作用于细胞膜的过程是一个首要的步骤,也是当前研究最多的。了解这个步骤,提供了人为控制激素及药物作用的可能性。下面仅就这个问题分别作一些简介。

一、膜上受体

多肽激素作用于细胞表面的概念首先是由Pastan等于1966年提出的,他们发现在保温系统中迅速加入促甲状腺素抗体时,促甲状腺素对甲状腺切片的作用立即被消除。同样抗胰岛素血清亦能废除胰岛素对膈肌的作用。由于在反应系统中加入激素抗体能废除激素的作用,因而认为激素并没有进入细胞内。1968—1973年有人将多肽激素分子通过共价键连接到一个

高分子量(100万)不溶性的纤维素或琼脂糖小球上。形成一种“固相激素”复合分子,它比其靶细胞要大得多,因此它不能进入细胞内。但是它们仍然发挥激素的作用。从而进一步提供了多肽激素不需进入细胞内而是与细胞表面相互作用产生效应的证据¹⁾。

另一个更为重要的证据是: 根据上述实验并结合 Sutherland 以前对 3',5'-环化腺一磷(cAMP)的发现和第二信使学说的提出,认为多肽激素的作用,可能是首先与细胞膜表面专一性受体结合,进而激活腺苷酸环化酶,在此酶作用下,ATP 转化为 cAMP。作为第二信使的 cAMP 在细胞质内引起一系列的酶促反应(见图 1)。

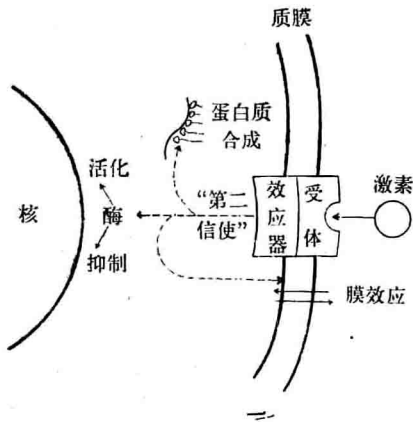
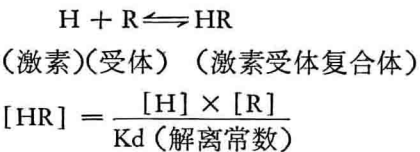


图 1 多肽蛋白质激素作用模式图

直接的证据是在 1969 年后发现的。应用新发展的放射受体测定法和放射自显影方法进行这方面的研究指出: 激素的作用,首先是专一性地与靶细胞膜上一定数量受体部位进行物理的或化学的亲和结合,这种结合反应是可逆的,是服从质量作用定律的。细胞产生的效应与结合的激素分子数呈比例关系。这种结合可用下列简单的反应式来表示:



由于这一研究的推动,目前,几乎所有的多

肽激素与其对应受体的相互关系都被研究。膜上受体的研究已成为当前内分泌学研究中最活跃的研究课题之一。

70 年代,通过大量的生物化学研究,已经确定多肽激素的膜上受体是一种糖蛋白或脂蛋白,最近联系到膜结构的流动镶嵌模型学说来分析受体部位,已取得了重要的进展。

质膜是由脂肪和蛋白质所构成的。膜脂主要由磷脂排成双层,在生理状态下至少一部分是流动相的。膜蛋白有两种,一种是与膜脂疏松联系着的,称外周蛋白,另一种是与膜脂牢固结合的,称整合蛋白(Integral protein)。受体蛋白就是一种整合蛋白。这种蛋白是兼性的,它以疏水一端埋在双层脂内,而亲水部分露于膜外。这部分含有很多共价键连接的寡糖链。这些碳水化合物可能是受体的专一性识别的重要部分(见图 2)。例如血型主要是由红血球上这类碳

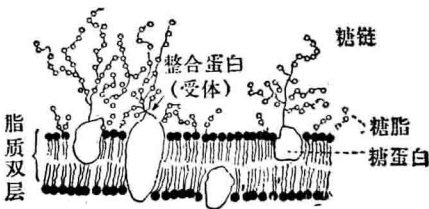
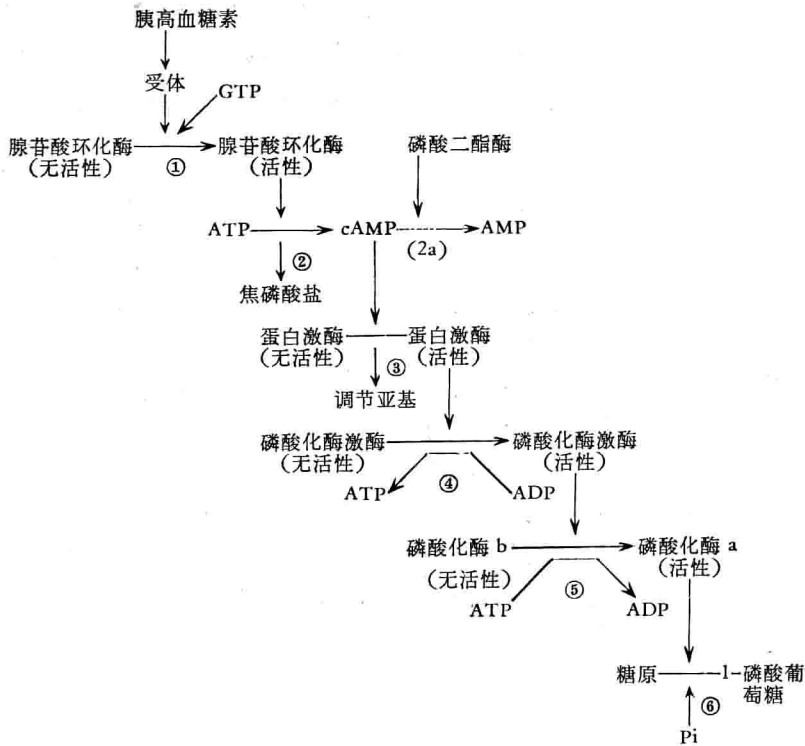


图 2 细胞质膜结构模式图(流动镶嵌模型)

水化合物所决定的。

目前膜上的激素受体蛋白已可以利用一些非离子的去垢剂(如 Triton X-100 和 Lubrol PX 等)以及一些含离子的乳化剂如脱氧胆酸盐等进行增溶,从而把受体蛋白从膜上溶解下来,以进行分离和纯化,并进一步对受体蛋白分子进行物理和化学特性分析,在分子水平上研究激素与受体相互作用。最近我们实验室采用 EDTA 和正丁醇结合的提取方法,达到不用去垢剂分离出真正的水溶性胰岛素受体,为从膜上分离出不受去垢剂干扰的激素受体蛋白打下了基础。然而由于膜上这种激素受体蛋白含量

1) 最近有人评论,认为这种“固相激素”在实验系统中,激素可从其连接物中掉下来,这些掉下来的激素足以行使它的效应。以致给这种实验的可靠性带来了疑问。



① 激素与膜受体互相作用，从而激活腺苷酸环化酶；② 从 ATP 形成 cAMP ③ cAMP 与蛋白激酶调节亚基结合，使催化亚基游离而活化；④ 活性的蛋白激酶催化 ATP 放出 ~Pi，使磷酸化酶激酶磷酸化而活化；⑤ 磷酸化酶激酶磷酸化从而使之活化；⑥ 糖原分解为 1-磷酸葡萄糖

极微，至今国内外还未能得到一种真正纯的激素受体蛋白。

最近的另一个重要发现是受体蛋白能滑动通过脂双层膜并排列在一起，形成寡聚组或簇。这种寡聚组可能会产生某些新的性质，如肌红蛋白与由四个亚基聚集所形成的血红蛋白相比，在它与 O_2 结合时有特殊的动力学性质和变构调节的优越性。膜受体的这种丛集可能有利于其与激素结合和信息传递反应。我们实验室利用盐酸胍非共价键解离方法处理胰岛素受体蛋白，分离得到一个 5 万分子量的（是目前最小的）胰岛素受体活性单位。如果按 P. Cuatrecasas 1972 年报道提纯的胰岛素受体蛋白分子量为 30 万道尔顿的话，则可能是由 6 个亚单位聚合而成。

最近通过化学修饰的胰高血糖素和胰岛素的类似物与受体相互作用的研究，证明激素系以其疏水面与受体结合的。例如胰岛素二体的

疏水结合面，可能就是胰岛素与其受体结合区的一部分。除此之外静电相互作用也可能是激素与受体结合的重要方式。

应用合成或化学修饰的多肽激素类似物或拮抗物(或称抗激素)，研究激素的作用方式，发现激素分子可分为与受体“结合区”和激发生物活性的“活性区”。例如去除胰高血糖素或肠促胰液肽的 N-末端组氨酸残基，它们与受体结合仅下降一半，而生物活性则只剩下 1/16。目前已确定 ACTH 和胰高血糖素的多肽链上可分为与“受体结合区”和“激活环化酶区”。这种发现，不仅推动了多肽激素分子的结构与功能研究，而且对小分子多肽激素如促黄体素释放激素，血管紧张肽和催产素等，利用合成和化学修饰已成功地制成很多类型具有不同结合活力和生物活力的类似物，在生产实践和医学临床上应用。但是对于有较复杂三维结构的多肽激素，由于其结合区(或信息区)不是简单的由一级结

构中相邻的氨基酸残基所构成,而是与分子的三维结构有关,因此较难确定。

二、膜上激素受体与腺苷酸环化酶的关系

上面提到受体是位于质膜的外表面,而腺苷酸环化酶则是在质膜的内表面。膜上激素受体与膜内腺苷酸环化酶的关系怎样?胰高血糖素所提供的资料最为丰富。当胰高血糖素与受体相互作用时,腺苷酸环化酶活性增高。但是对于酶活性增高的机制目前还知道得很少,同时对于受体与腺苷酸环化酶是一个分子?还是不同的分子?尚未定论。然而已有实验证据提出它们是多亚基的结构。目前关于激素作用和受体与腺苷酸环化酶之间的关系大致有四种假说。

1. 磷酸化假说

当胰高血糖素与其受体相互作用后激活腺苷酸环化酶产生磷酸化或去磷酸化过程,而引起一系列酶促反应,最后导致糖原分解。其反应链可用上页图解说明。

Najjar 和 Constantopoulos 等对此假说提出较多的支持证据,这是目前比较吸引人的假说,但是对反应链中很多步骤仍需进一步研究。

2. 构象改变假说

认为受体是一个调节亚基,腺苷酸环化酶是一个催化亚基。两者组成一个信息单位。受体起稳定结构作用。当胰高血糖素与受体结合后,催化亚基游离,因而腺苷酸环化酶呈高活性状态。这个学说主要依据于下面一些实验。用牛乳过氧化物酶将 ^{125}I 标记在脂肪细胞膜上。在 S. D. S. 电泳中,膜产生四条带,两条是糖蛋白,一条是其它蛋白,而第四条是小分子(可能是脂)。前三条蛋白带标记量比例分别为 56:24:20。但是当与胰高血糖素反应后的膜,此三种成分比例为 59:30:11。从而认为胰高血糖素作用后引起质膜蛋白构象的变化。

第二个实验是用碘乙酰胺灭活腺苷酸环化酶,其活力消失的动力学速度常数为 $8.4 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$ 但有胰高血糖素存在的情况下,其速

度常数为 $8.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 灭活速度增加 10 倍,认为这是在胰高血糖素作用下,腺苷酸环化酶的构象产生变化,更易与碘乙酰胺反应所致。还有一些实验说明在激素作用下引起膜的成分,特别是腺苷酸环化酶的构象变化,这里不再赘述。

3. 受体和腺苷酸环化酶之间膜脂偶联假说

在纯化腺苷酸环化酶和胰高血糖素的受体研究中发现,受体与酶之间可能由一膜脂把两者偶联在一起(有人把膜脂与腺苷酸环化酶系统一起称之为效应器)下列实验为此假说提供了某些证据。

当用适量的高纯磷脂酶 A 处理肝细胞膜,去脂后,可以增强氟离子刺激腺苷酸环化酶的活性。但是其对胰高血糖素的作用则完全丧失,这就说明去膜脂后,激素的信息传递中断,而对氟离子刺激腺苷酸环化酶的活性则不受影响。证明激素激活腺苷酸环化酶需要有膜脂作为激素受体信息的传导中介物。第二个实验是用去垢剂从猫心制备的腺苷酸环化酶,这种溶解的环化酶不再被胰高血糖素所激活,随后用 DEAE 离子层析把去垢剂分离掉,并将膜磷脂回加到反应体系中,则此酶重新可被胰高血糖素激活。而且证明所加回的磷脂对激活该酶是特异的。加回丝氨酸磷脂(Phosphatidylserine)仅可恢复胰高血糖素激活酶的作用,而对肾上腺素无作用。只有加肌醇磷脂(Phosphatidyl-inositol)才能回复肾上腺素激活腺苷酸环化酶的作用。

4. 激素受体移动假说

上面谈到激素受体和腺苷酸环化酶(催化成分)一个是在膜双层脂的外侧,一个是在膜的内侧。这个学说认为在非偶联状态时两者各自独立存在,在这种情况下腺苷酸环化酶是无活性的。当激素结合到受体上时,激素-受体复合体移动与催化亚基-腺苷酸环化酶结合,因而激活了腺苷酸环化酶,随后激素通过稀释或降解,受体和腺苷酸环化酶又各自游离。Bennett 等用霍乱毒素处理各种细胞,证实了膜上结合毒素的受体数目远远多于腺苷酸环化酶的分子数目,而且当用霍乱毒素处理细胞后,其质膜的腺苷酸环化酶活性显著增高,但这种活性的出

现,既然需要在霍乱毒素与受体结合后30分钟,说明激素与受体结合后,复合体需要一段移动时间,才能与腺苷酸环化酶结合,最近剑桥大学 Metcalfe 等用电子束照射膜以测定膜上受体与腺苷酸环化酶解偶联状态(即没有激素刺激状态)和偶联状态(即加入激素刺激)时它们的分子量变动。发现肝细胞膜当加入胰高血糖素时所测得分子量恰好为没有加激素时分别测得的膜受体分子量与腺苷酸环化酶分子量之和。认为这是在激素作用下受体与腺苷酸环化酶结合在一起。此实验结果支持受体移动假说。受体移动理论对于解释受体与腺苷酸环化酶的偶联所提出的多种问题是十分有利的,但是到目前为止,实验证据还不多,还需要更多的工作加以证实(见图3)。

上面概要地介绍了多肽激素作用原理,特别着重在激素信息的接受和传递方面(即膜上受体与腺苷酸环化酶系统)的研究进展情况。通过 cAMP 传递信息的系统是很广泛的,除胰高血糖素以外,还有促肾上腺皮质激素,促甲状腺

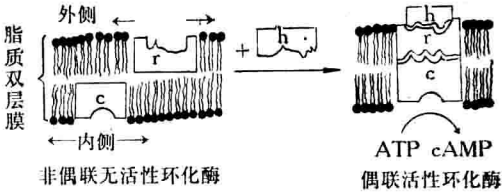


图3 激素受体与环化酶流动结合假说模式图
h: 多肽激素; r: 受体; c: 环化酶

激素,促黄体生成激素,促滤泡成熟激素,甲状旁腺激素,后叶加压素等。除此之外,我们应注意到胰岛素、促乳素和生长激素以及神经递素乙酰胆碱等,它们的作用似乎并不通过 cAMP 传递信息,有人认为它们的第二信使可能与 cGMP 或 Ca^{++} 有关,同时最近也有工作证明胰岛素作用于靶细胞时,它可能进入细胞内。除质膜外,细胞核也存在与胰岛素结合的部位。但是这方面的实验证据相对来说更少,特别是这种作用的功能和性质等很多问题还不清楚,需要将来更多的工作加以阐明。

[本文于 1978 年 5 月 13 日收到]



动物实验用简易方波刺激器

半导体方波刺激器是医学动物实验中常用的一种仪器。往往要求刺激脉冲的幅度、宽度和重复频率均为可调。在满足这些基本要求下,线路应尽量简单,易于调整,为此,单结管振荡电路是很可取的(见图)。图中,管 UJT_1 是频率可调的脉冲源,管 UJT_2 是脉冲宽度

可调的单稳电路。为获得数十伏的脉冲,管 BG_1 和 BG_2 采用高压平面三极管。平时 BG_1 处于饱和状态,其 V_{ces} 约 0.5 伏。由 UJT_2 来的 2 伏负脉冲足以使它截止。为减小波形畸变, BG_1 和 BG_2 之间采用直接耦合。这两管是交替地导通的。实验表明,以人体作负载时,输出脉冲约 90 伏,上升时间约 0.1 毫秒,最大宽度约 7 毫秒,脉冲平顶下斜率约 2 伏/毫秒。这时两个单结管和 triode 耗电约 5 和 4 毫安。经过三年多的使用,本仪器稳定可靠,满足了一般医学动物实验的要求。

(唐山煤矿医学院冷增荣、杨定泽供稿)

