

晶体生长的连续性^[19].

参 考 文 献

- Mann S. Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry. *Nature*, 1993, **365** (6446): 499~ 505
- Stupp S I, Braun P V. Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors. *Science*, 1997, **277** (5330): 1242~ 1248
- Belcher A M, Wu X H, Christensen R J, *et al.* Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature*, 1996, **381** (6577): 56~ 58
- Mann S. Crystallochemical strategies in biomineralization. In: Mann S, Webb J, Williams R J P, eds. *Biomaterialization: Chemical and Biochemical Perspectives*. New York: VCH, 1989. 35~ 62
- Cariolou M A, Morse D E. Purification and characterization of calcium-binding conchiolin shell peptides from the mollusc, *Haliotis rufescens*, as a function of development. *J Comp Physiol*, 1988, **157B** (6): 717~ 729
- Cuif J P, Dauphin Y. Occurrence of mineralization disturbances in nacreous layers of cultivated pearls produced by *Pinctada margaritifera* var. *cumingi* from French Polynesia. Comparison with reported shell alterations. *Aquat Living Resour*, 1996, **9** (2): 187~ 193
- Dauphin Y. The organic matrix of coleoid cephalopod shells: molecular weights and isoelectric properties of the matrix in relation to biomineralization processes. *Mar Biol*, 1996, **125** (4): 525~ 529
- Borbas J E, Wheeler A P, Sikes C S. Molluscan shell matrix phosphoproteins: correlation of degree of phosphorylation to shell mineral microstructure and to *in vitro* regulation of mineralization. *J Exp Zool*, 1991, **258** (1): 1~ 12
- Halloran B A, Donachy J E. Characterization of organic matrix macromolecules from the shells of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Comp Biochem Physiol*, 1995, **111B** (2): 221~ 231
- Miyamoto H, Miyashita T, Okushima M, *et al.* A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (24): 9657~ 9660
- Keith J, Stockwell S, Ball D, *et al.* Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **105B** (3/4): 487~ 496
- Donachy J E, Drake B, Sikes C S. Sequence and atomic force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar Biol*, 1992, **114** (3): 423~ 428
- Marsh M E. Self-association of calcium and magnesium complexes of dentin phosphoryn. *Biochemistry*, 1989, **28** (2): 339~ 345
- Sudo S, Fujikawa T, Nagakura T, *et al.* Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*, 1997, **387** (6634): 563~ 564
- Mann S, Douglas D, Archibald J M, *et al.* Crystallization at inorganic-organic interfaces: biominerals and biomimetic synthesis. *Science*, 1993, **261** (5126): 1286~ 1292
- Falini G, Albeck S, Weiner S, *et al.* Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules. *Science*, 1996, **271** (5245): 67~ 69
- Weiner S, Addadi L. Acidic macromolecules of mineralized tissues: the controllers of crystal formation. *Trends Biochem Sci*, 1991, **16** (2): 252~ 256
- Bowen C E, Tang H. Conchiolin protein in aragonite shells of mollusks. *Comp Biochem Physiol*, 1996, **115A** (4): 269~ 275
- Addadi L, Weiner S. A pavement of pearl. *Nature*, 1997, **389** (6653): 912~ 915

Biological Macromolecules and Molecular Recognition in Mollusk Biomineralization.

HE Gen, MAI Kang-Sen (College of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China).

Abstract A biomimetic synthesis based on biomineralization principles leads to the development of new strategies in material science and biotectonics. Mollusk biomineralization is a process of nucleation and growth of inorganic crystals controlled by biological macromolecules, also is a process of inorganic-organic and inorganic-inorganic molecular recognition. The latest progress in studies on the characteristics of macromolecules and molecular recognition involved in mollusk biomineralization is reviewed.

Key words mollusks, biomineralization, biological macromolecules, molecular recognition

反义技术及其在 G 蛋白研究中的应用

余方圆¹⁾ 周元国

(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042)

摘要 反义技术至少包括反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶技术。在 G 蛋白研究中, 反义技术在 G 蛋白

¹⁾ 现通讯地址: 解放军 254 医院骨科, 天津 300141。 收稿日期: 1998-04-06, 修回日期: 1998-07-27

受体及受体亚型研究、G 蛋白转导信号特异性研究方面及对 G 蛋白耦联信号传导途径与其他信号传导途径之间“cross talk”认识方面的研究中,有着广泛的应用.

关键词 反义技术,反义寡核苷酸,反义 RNA,核酶,G 蛋白

学科分类号 Q52, Q513

1 反义技术

反义技术就是根据碱基互补原理,利用人工或生物合成的特异互补的 DNA 或 RNA 片段(或其修饰产物)抑制或封闭基因表达的技术,至少应包括反义寡核苷酸技术、反义 RNA 技术和核酶(ribozyme)技术.

1.1 反义寡核苷酸技术

反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASON)技术,就是用一段人工合成的能与 RNA 或 DNA 互补结合的寡核苷酸链抑制基因的表达.前者称为反义(antisense),后者称为反基因(antigene).

ASON 可用自动 DNA/RNA 合成仪很方便地合成.一般认为其长度以 15~30 nt 较为合适.由于合成后的未修饰寡核苷酸(ON)对核酸酶的抵抗力较弱,且不易透过细胞膜,与靶序列的亲合力也较低,故经常需要修饰.常用的修饰手段有:磷酸二酯键修饰;磷酸修饰,其中目前应用最多的是硫代(S-ON)修饰,修饰后在生物体液中的半衰期至少是未修饰者的 10 倍^[1];对糖环修饰;对碱基及杂环修饰;引入亲脂性基团或改变其负电性以增加 ASON 进入靶细胞;增加靶组织导向,包括受体介导和抗体介导两种;增加作用强度,在 ASON 分子末端引入一些具有特定功能的化合物能有效增加 ASON 与靶基因的结合强度,且还可以将靶基因切断.

ASON 作用原理可以分为: a. antigene 作用机制:即以 DNA 作为 ASON 的靶点,抑制 DNA 复制和转录.包括与 DNA 双螺旋结合,形成“第三链”(triplex);与局部解链的 DNA 单链结合,形成 D-环(D-loop);双股环状 ON 特异封闭或套住特异转录因子以阻断转录过程. b. antisense 作用机理: ASON 与 mRNA 靶序列通过碱基配对结合,从而与处于不同时期的 mRNA 杂交,阻断 RNA 的加工、成熟、出核(核内机制);影响核糖体结合或沿 mRNA 的移动(胞浆机制);激活 RNase H,剪切杂交链中未配对的碱基,这在核内或胞浆均可发生.对于一种 ASON 而言,其机制可能是一种,

也可能是多种共同作用.

1.2 反义 RNA 技术

反义 RNA 是指一段核苷酸序列可与其所调控的 RNA 序列互补结合的 RNA 片段.反义 RNA 技术通常指的是利用基因重组技术,构建人工表达载体,使其离体或体内表达反义 RNA,从而抑制靶基因的表达.反义 RNA 作用原理目前尚不甚清楚,可能与几方面有关:复制水平,反义 RNA 可与引物 RNA 互补结合,抑制 DNA 复制,从而控制着 DNA 的复制效率.转录水平,与 mRNA 5' 末端互补结合,阻止帽子结构形成;作用于外显子和内含子连接区,阻止前 mRNA 的剪接;作用于 poly A 形成位点,阻止 mRNA 的成熟及其向胞浆中的转运.翻译水平:这可能是最主要的方面,其机理可能为:互补于起始密码子 AUG 的反义 RNA 能阻止核糖体结合;互补于编码区的反义 RNA 可阻止核糖体在 mRNA 上的移动;降解靶 mRNA^[2].

1.3 核酶(ribozyme)技术

Ribozyme 又称基因剪刀,是一类具有催化活性的特殊的反义 RNA,可与靶序列杂交并加以剪切,从而对基因表达进行调控.常见的 ribozyme 有锤头状、发夹状和斧头状三种,应用最多的是锤头状 ribozyme. Ribozyme 的基本组成应有中间极为保守的核苷酸序列(活性中心)和两端的引导序列,当两端引导序列与靶 RNA 互补结合时,中间极端保守序列即在该位点切断;但也有人认为 ribozyme 的作用原理是反义抑制和切割活性的综合结果.

2 反义技术在 G 蛋白研究中的应用

2.1 在受体及靶酶研究中的应用

在信号传导系统中,不同的信号物质可通过不同的受体起作用,同一信号物质的不同亚类可通过不同的受体亚型,甚至同一种物质在不同的情况下也可通过不同的受体亚型起作用.反义技术为受体及其亚型的研究提供了更高的特异性,尤其在特异性受体(或其亚型)阻断剂尚未发现时更是唯一的手段. Rossi 等^[3]用针对 MOR-1 的 5'-非翻译区的

ASON 微注射入脑血管,发现能阻断 MU-1 止痛吗啡和脑啡肽(DADL)的镇痛作用,而对吗啡-6 β -葡萄糖苷酸(M6G)的镇痛作用无影响,提示 M6G 通过与前二者不同的阿片受体起作用。另外,反义技术在受体定位、受体调节的研究中也有应用。针对编码胰岛素样生长因子 I 受体(IGF1R)的 ASON 可使 IGF1R 下调,并进而发现这种下调明显抑制了凝血酶诱导的 DNA 合成^[4]。

G 蛋白耦联途径有不同的蛋白激酶(PK)参与,用反义技术可以了解不同 PK 在信号传导中的不同作用。Shih 等^[5]用针对编码 PKA、PKC、 β -ARK 的 mRNA 的 ASON 分别与不同的细胞系共孵以及在体研究均证实,在激动剂介导的脱敏作用中,这几种 PK 具有细胞特异性。

2.2 在研究 G 蛋白转导信号特异性方面的应用

不同的受体多耦联于不同的 G 蛋白亚型。近年来,尤其是 G 蛋白亚基亚型在信号传导中的特异性得到了广泛的研究。药理工具如 PTX (百日咳毒素)、CTX (霍乱毒素)等只能对 G 蛋白家族(Gi、Gs、Gq、Go 等)进行大致的分类,而不能区别各类的亚型;G 蛋白亚型抗体(如针对 G 蛋白 C 区的抗体)其特异性有时也受到限制,利用反义技术则能通过特异地抑制某种亚型 G 蛋白的表达来了解这种亚型在一定信号传导中的特异性。Kaneko 等^[6]分别用互补于大鼠 G 蛋白不同 α 亚基 mRNA 的 ASON 和鼠脑 poly(A⁺) RNA 一同注入爪蟾卵母细胞,发现 Gi₁-ASON 抑制了乙酰胆碱(Ach)的钙通道抑制效应,而对 5-HT 的作用无影响;Go α 则对 5-HT 的钙通道抑制效应的抑制较之对 Ach 为著,提示 Gi₁ 介导了胆碱类受体的钙通道抑制效应,而 Go 则介导了 5-HT 受体的机能;Raff 等(1994, 1996 年)用含 33 个碱基的 S-ON 注入小鼠大脑室,发现只有针对 Gi₂ 的 ASON 能明显减弱吗啡介导的镇痛作用;Watkins 等^[7]用反义 RNA 转基因小鼠(用反义 RNA 抑制了 Gi₂ 表达的 Gi₂ 缺陷小鼠)证实了 Gi₂ 可调节两种不同的信号途径——AC 途径和 PLC 途径。利用反义技术发现,除 α 亚基外, $\beta\gamma$ 二聚体在 G 蛋白特异介导信号传导中也有着重要的作用。Kleuss 等分别用 4 种 β 亚基的特异 ASON 微注射入 GH3 细胞核内,发现在 β_1 、 β_3 表达受抑的同时,M-胆碱类和生长抑素受体抑制电压依赖性钙通道的作用也分别减弱了,从而证明介导这两种受体的 G 蛋白的特异性除 α 亚基外,也包括 β 亚基的不同,并利用针对不

同的 β 和 γ 亚基的 ASON 进一步发现 M-胆碱类受体耦联 G 蛋白亚型是 G_{o1 β 3 γ 4}, 生长抑素受体耦联 G 蛋白是 G_{o2 β 1 γ 3}。反义技术极大地扩展了人们对受体-G 蛋白耦联途径的认识。

2.3 在对信号系统间“cross talk”认识中的应用

各个信号传系统之间从受体到效应器及发挥的细胞效应之间都有着广泛的联系,称为“cross talk”。反义技术在认识 G 蛋白耦联途径之间的“cross regulation”研究中有广泛地应用。Gi 蛋白亚型一般认为是 AC 和 GC 耦联的,但 Watkins 等^[7]发现用反义 RNA 抑制了 Gi₂ 表达的脂肪细胞能明显增强凝血酶刺激的 PLC 的活性;Gs 通常认为是 AC 耦联的,但 de la Pena 等^[8]用在爪蟾卵母细胞中同时注入受体 cRNA 和针对编码不同 G α 、G β mRNA 的特异 ASON 的方法,发现 Gs 耦联卵母细胞中表达的促甲状腺素释放激素(TRH)受体激活 PLC 并继而引起 IP₃ 的释放。反义技术在认识 G 蛋白耦联途径与其他信号传导系统间的“cross talk”研究中有更进一步的应用。用诱导反义 RNA 表达致 Gi₂ 缺陷的转基因小鼠证实 Gi₂ 缺陷能增加蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)的活性并减少胰岛素受体(属受体酪氨酸蛋白激酶(R-TK)系统)激活的胰岛素底物-1 酪氨酸残基磷酸化^[2];Delafontaine 等^[4]发现用 S-ON 抑制 IGF1 (R-TK 系统)的表达明显抑制了凝血酶(G 蛋白耦联受体)介导的 DNA 合成,这些均说明 G 蛋白耦联途径与 R-TK 耦联途径之间有着广泛的“cross talk”。

参 考 文 献

- 1 Ho P T C, Bacon T A, Wickstrom E, *et al.* Efficacy of antisense phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides to the transferrin receptor correlates with serum stability and cellular uptake. *J Cell Biol*, 1989, **109** (4): 329a
- 2 Moxham C M, Malbon C C. Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit Gi₂. *Nature*, 1996, **379** (6548): 840 ~ 844
- 3 Rossi G C, Standifer K M, Pasernak G W. Differential blockade of morphine-6 β -glucuronide analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against MOR-1 and G-protein α subunits in rats. *Neurosci Lett*, 1995, **198** (2): 99~ 102
- 4 Delafontaine P, Anwar A, Lou H, *et al.* G-protein coupled and tyrosine kinase receptors: evidence that activation of the insulin-like growth factor I is required for thrombin-induced mitogenesis of rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1996, **97** (1): 139~ 145
- 5 Shih M, Malbon C C. Oligodeoxynucleotides antisense to mRNA encoding protein kinase A, protein kinase C and β -adrenergic

- receptor kinase reveal distinctive cell-type-specific roles in agonist-induced desensitization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (25): 12193~12197
- 6 Kaneko S, Takahashi H, Satoh M. Metabotropic responses to acetylcholine and serotonin of xenopus oocytes injected with rat brain mRNA are transduced by different G-protein subtypes. *FEBS-Lett*, 1992, **299** (2): 179~182
- 7 Watkins D C, Moxham C M, Morris A J, *et al.* Research communication suppression of G_{i2} enhances phospholipase C signalling. *Biochem J*, 1994, **299** (Pt 3): 593~596
- 8 de la Pena P, del Camino D, Pardo L A, *et al.* Gs couples thyrotropin-releasing hormone receptors expressed in xenopus oocytes to phospholipase C. *J Biochem*, 1995, **270** (8): 3554~3559

Antisense Technology and the Application in G-Protein Studies. YU Fang-Yuan, ZHOU Yuan-Guo

(*Research Institute of Surgery and Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China*).

Abstract Antisense technology at least include antisense oligonucleotides technology, antisense RNA technology and ribozyme technology. Antisense technology has been widely used in the studies of G-proteins, G-protein coupled receptors and their subtypes, the specific property of G-protein in signal transduction and the "cross talk" of G-proteins involved signal transduction system with other signal transduction systems.

Key words antisense technology, antisense oligonucleotides, antisense RNA, ribozyme, G-protein

谷氨酸受体可逆磷酸化及其功能*

高 灿 张光毅

(徐州医学院生物化学与分子生物学研究中心, 徐州 221002)

摘要 谷氨酸受体 (GluRs) C 端区存在被多种蛋白激酶磷酸化的位点, 同时又能被多种蛋白磷酸酶去磷酸化, 磷酸化的结果可使 Ca^{2+} 内流增加, 增强 GluRs 功能; 去磷酸化作用则相反. 正常情况下 GluRs 可逆磷酸化处于一种动态平衡状态, 在突触可塑性机制如长时程增强 (LTP) 中起重要作用, 而在病理状态如缺血性脑损伤中, 这种平衡失衡加重兴奋性神经元损伤.

关键词 谷氨酸受体, 蛋白激酶, 蛋白磷酸酶, 磷酸化, 长时程增强, 兴奋毒

学科分类号 Q517

蛋白质磷酸化在中枢神经系统 (CNS) 信号转导和调控中具有重要意义, 几乎所有受体活性调控的共同方式亦是最重要的方式就是磷酸化. 神经组织是许多蛋白激酶和蛋白磷酸酶含量最丰富的组织, 多功能的蛋白激酶主要是 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA), Ca^{2+} 、磷脂依赖性蛋白激酶 (PKC), Ca^{2+} 、钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II) 及蛋白酪氨酸激酶 (PTK). GluRs 是 CNS 主要的兴奋性神经递质受体, 其可逆磷酸化在 CNS 信号转导中具有重要作用.

1 GluRs 的分子结构

根据药理学和电生理学研究, 将 GluRs 分成三种亚型: NMDA 受体、非 NMDA (AMPA 和 KA) 受体和代谢型受体 (mGluRs). 其中 NMDA 受体

(NRs) 是受配基调节的离子通道, 与 Ca^{2+} 通道相耦联; AMPA/KA 受体也是受配基调控的离子通道, 对 Na^{+} 、 K^{+} 有通透性, 现在证明一些受体亚型对 Ca^{2+} 也有通透性; mGluRs 则与 G 蛋白耦联. 近来对 GluRs 的分子克隆研究鉴定了一些同源亚基^[1]: AMPA 受体为 GluR1-GluR4; KA 受体为 GluR5-GluR7、KA1 和 KA2; NRs 为 NR1、NR2A-NR2D; mGluRs 有 mGluR1-mGluR8.

对于离子型 GluRs 跨膜拓扑结构, 以前曾普遍认为同其他神经递质受体一样, 具有四个跨膜区, 近年许多研究表明这一模型是不正确的^[2]. 现在认为离子型 GluRs 有三个或五个跨膜区, 而不是四

* 国家自然科学基金资助项目 (39770177).

收稿日期: 1998-05-14, 修回日期: 1998-08-03