

二醇的加入而加剧. 此时应改变溶液条件 (如 pH, 离子强度等).

d. 设计好沉淀剂的种类及浓度范围以及选择合适的温度, 以避免去污剂的“相分离”. 寻找到合适的去污剂. 选择的标准应该是: (1) 纯. (2) 形成小的单相分散的微团. (3) 化学上稳定、惰性而且温和. (4) 对大幅度变化的 pH 与离子强度相对稳定. 许多非离子型与两性离子型去污剂能满足上述要求. 适于膜蛋白结晶的去污剂列在表 3.

表 3 用于膜蛋白结晶的去污剂

去 污 剂	分子量	CMC/ (mmol/L.)
β -辛基葡糖苷(β -OG)	292	22—23
β -壬基葡糖苷(β -NG)	306	6.5
癸基麦芽糖苷(C_{10} -M)	482	1.6
十二烷基麦芽糖苷(C_{12} -M)	510	0.16
辛基四氧乙烯(C_8E_4)	306	7.0
辛基多氧乙烯(C_8E_5)	350	4.3
十二烷基辛氧乙烯($C_{12}E_8$)	518	0.08
癸基二甲胺-N-氧化物(DDAO)	201	10.4
十二烷基二甲胺-N-氧化物 (LDAO)	229	1.1
十二烷基二甲氨基丙基亚砷	335	3.0
辛基 2-羟乙基亚砷	206	29.9
壬酰 N-甲基葡糖胺(MEGA-9)	363	23.0
癸酰基 N-甲基葡糖胺 (MEGA-10)	377	5.0

参 考 文 献

- 1 Michel H. J Mol Biol, 1982; **158**: 567
- 2 Allen J P, Feher G. Proc Natl Acad Sci USA, 1984; **81**:

- 4795
- 3 Ford R C, Picot D, Garavito R M. EMBO J, 1987; **6**: 1581
- 4 Garavito R M, Neuhans J M. J Biol Chem, 1984; **259**: 4254
- 5 Nestel U, Wacker T, Woitzik D *et al.* FEBS Lett, 1989; **242**: 405
- 6 Picot D, Garavito R M. In: Schuster I ed, Cytochrome p-450: Biochemistry and Biophysics, London: Taylor and Franeis, 1989; 29
- 7 Hawthornthwaite A M, Cogdell R J, Woolley K *et al.* J Mol Biol, 1989; **209**: 833
- 8 Yue W H, Zou Y P, Yu C A *et al.* Biochemistry, 1991; **30**: 2303
- 9 Michel H, Crystallization of Membrane Protein. USA: CRC Press, Inc. 1991; 53—208
- 10 Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A *et al.* J Mol Biol, 1990; **213**: 899
- 11 Kühlbrandt W. Quarterly Review of Biophysics, 1992; **25**: 1
- 12 Kühlbrandt W, Wang D N. Nature, 1991; **350**: 130
- 13 Stokes D L, Green N M. J Mol Biol, 1990; **213**: 529
- 14 Leonard K, Haiker H, Weiss H. J Mol Biol, 1987; **194**: 277
- 15 Valpuesta J M, Henderson R, Frey T G. J Mol Biol, 1990; **214**: 237
- 16 Stark W, Kühlbrandt W, Wildnaber I *et al.* EMBO J. 1984; **3**: 777
- 17 Unwin P N T, Zampighi G. Nature, 1980; **283**: 545
- 18 Brisson A, Unwin P N T. Nature, 1985; **315**: 474
- 19 Engel A, Massalski A, Schindler H *et al.* Nature, 1985; **317**: 643
- 20 Mohraz M, Marcva V S, Smith P R. J Cell Biol, 1987; **105**: 1

PAF 受体及其信号传导

吕小燕

(北京医科大学第一临床学院, 北京 100034)

摘要 血小板激活因子是一种强力的磷脂介质, 普遍认为它经其特异受体而起作用. 最近已克隆出 PAF 膜受体的 cDNA. 文章综述了有关 PAF 受体及其信号传导研究的新进展.

关键词 PAF 受体, 信号传导, 基因表达

血小板激活因子 (PAF) 是一种作用强大的磷脂介质. 多种细胞/组织可产生内源性 PAF, 参与调节多种生理和病理过程. 普遍认为 PAF 经其特异的膜受体起作用, 最近已克隆出了这种受体的 cDNA. 有关 PAF 受体后的信号传导也积累了大量资料.

1 PAF 受体

由于 PAF 是一种磷脂, 在通过结合分析以获得受体时, PAF 不仅与溶解了的受体结合, 同时也与去污剂胶团反应, 因而过去分离 PAF 受体的尝试始终不成功. 在研究者采用多种分离方法所得到的从 52 000—220 000 多种分子量不等的蛋白质中, 无法确认哪一种为 PAF 受体. 与此同时许多研究通过放射配基结合分析的方法, 了解到多种细胞上 PAF 特异结合位点的特性. 不同细胞上 PAF 受体的数目及其与配体的亲和力不同. 离子对 ^3H -PAF 的结合产生不同的影响: K^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 促进之, 而 Na^+ 和 Li^+ 抑制之. 使用结构迥异的拮抗剂进行结合分析发现, 从同种动物中得到的不同细胞的 K_d 值不同. 这种亲和力上的差异可能由于受体被遮蔽、内化或易位至膜内层所致, 也可能是由于 PAF 受体的异质性.

最近从豚鼠肺脏克隆了 PAF 受体 cDNA^[1], 研究者使用了在 *Xenopus laevis* 卵母细胞中基因表达的配体特异的克隆技术. Honda 等从豚鼠肺分出一多聚 (A^+) RNA, 这种 RNA 注入卵母细胞后可使之对 PAF 产生电生理反应. 使用此 RNA 建立 cDNA 文库, 构建 Zp74 质粒, 在卵母细胞或 COS-7 细胞中表达. 根据药理学反应确认 Zp74 所编码的蛋白质为 PAF 受体. PAF 受体拮抗剂 CV-6209 与 Y-24180 可抑制相应的反应, 而溶血 PAF 无效. 经质粒转染的 COS-7 细胞膜对标记 PAF 受体拮抗剂 ^3H -WEB 具有特异性结合. Honda 等同时报告包括人类在内的不同种系

中, PAF 受体的 mRNA 在白细胞中丰度甚高, 在脾胃则含量较少^[1,2]. PAF 受体的 cDNA 是 3020 的核苷酸序列, 根据由克隆 DNA 最长开放阅读框架导出的 342 个氨基酸序列计算, 其分子量为 38 982. 分析还显示 PAF 受体具有 G 蛋白偶联受体的特征: 它具有 7 个穿膜疏水片段. 与其它 G 蛋白偶联的受体相比较发现它的一些氨基酸是高度保守的.

图 1 所标数字标明由豚鼠肺克隆的 PAF 受体中氨基酸所在位置. 第二跨膜区有一天门冬氨酸, 第二第三个膜外环上各有一半胱氨酸, 第六第七跨膜区有 3 个脯氨酸. 受体的胞浆尾上有 4 个丝氨酸和 5 个苏氨酸. 整个序列中有 12 个酪氨酸, 其中两个在胞浆环上, 受体胞外部分上的天门冬酰胺残基可能是连接糖基化基团的位点.

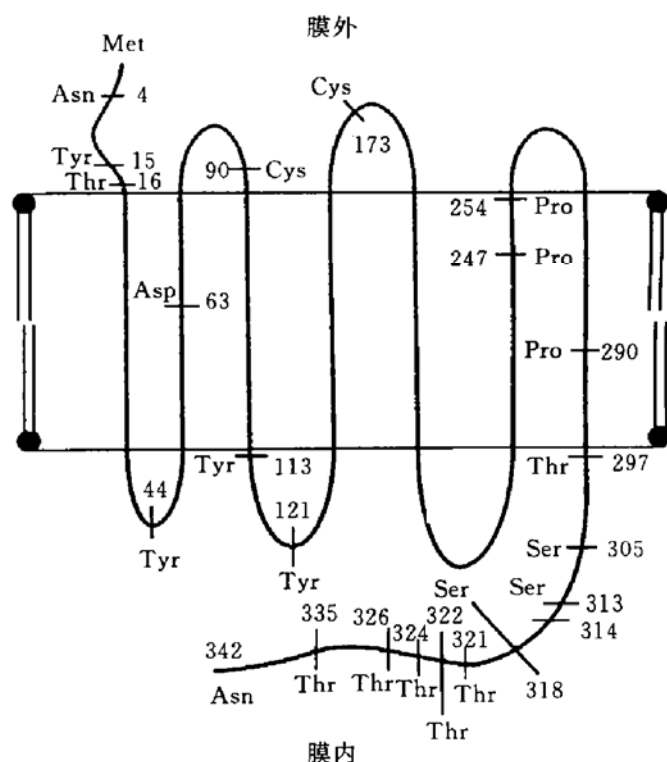


图 1 PAF 受体的 7 个跨膜区及其膜内外片段的模式图

2 PAF 的信号传导

2.1 信号传导的途径

已有的资料表明, PAF 可激活若干与 G

蛋白有关的跨膜信号传导途径,如通过 PLC, PLA_2 和 PLD 激活磷脂代谢以及刺激蛋白激酶等. PAF 对这些途径的激活均受到其特异受体拮抗剂的抑制.

PAF 可刺激多种细胞中 PLC 介导的磷酸肌醇 (PPI) 代谢^[3], 用 PAF 刺激 5—10s 即可见到与细胞外钙浓度无关的 IP_3 水平升高, 同时有二脂酰甘油 (DG), IP_4 和 IP_5 水平升高. IP_3 最重要的第二信使作用是动员细胞内钙, 但在有细胞外钙存在时, 仅约 1/4 由 PAF 所引起的钙含量增加归因于 IP_3 引起的细胞内钙动员^[4]. PAF 引起血小板钙内流可能是通过一受体门控的离子通道, 这个通道的选择性不严格, Na^+ 和 Li^+ 也可由此通过^[5]. PAF 还可能激活 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换通道.

PLA_2 使磷脂骨架第二位碳脱酰基. 在许多细胞和组织中, PAF 通过激活 PLA_2 而产生花生四烯酸及前列腺素类代谢产物. PAF 激活 P388D₁ 巨噬细胞样细胞中的 PLA_2 而引起 PGE_2 水平升高. 未经预处理的细胞中 PGE_2 升高为基础量的 2—3 倍, 在用脂多糖预激的细胞中则为 9—12 倍. PLA_2 抑制剂 manoil, 酪氨酸激酶 (TPK) 抑制剂 genistein 抑制这一反应, 而 PKC 抑制剂 H7 无效^[6]. 经脂多糖预激的 P388D₁ 细胞中的环氧化酶和 PLA_2 的酶活性没有改变. 转录抑制剂 actinomycin D, 蛋白质合成抑制剂 cycloheximide 对 PAF 刺激的 PGE_2 增加有相当程度的抑制, 提示这一过程中有某些基因的表达.

最近的研究表明, PAF 的信号传导与 PLD 也有关系^[7,8]. PLD 引起转磷脂酰基化反应, 其活性的生化标志之一是当乙醇存在时产生磷脂酰乙醇. PLD 的催化产物磷脂酸也可能在细胞中起作用, 它可能被磷酸水解酶代谢为 DG, 激活 PKC 或被代谢为脂肪酸, 如花生四烯酸. 上述研究表明在特定的细胞中 PAF 可激活一个或多个酶, 产生若干脂质介质, 这些介质参与 PAF 引起的反应.

克隆 PAF 受体的研究表明, 其与 G 蛋白偶联的受体家族具有同源性. 不少研究证据支

持这一看法. 如 PAF 刺激 GTP 酶活性、GTP 引起 PAF 结合曲线的移位^[9,10]; 百日咳毒素在许多系统中抑制 PAF 诱导的磷脂代谢等反应. 目前认为在血小板中与 PAF 受体功能相关的 G 蛋白既非 Gi 也非 Gs .

PAF 引起的反应与 TPK 和 PKC 也有关系. 在 PPI 代谢增加的 PAF 反应细胞中可见 PG 激活 PKC. 最近有报导指出 PAF 也刺激 TPK 而产生蛋白质的酪氨酸磷酸化. PAF 在血小板中迅速引起分子量为 50000, 60000, 71000, 82000 和 300000 蛋白的酪氨酸磷酸化, 这一反应可为 PAF 受体拮抗剂所阻断^[11]. 使用磷酸酪氨酸蛋白单克隆抗体琼脂糖柱分离对照及经 PAF 处理的兔血小板溶片时发现, PAF 引起分子量为 50000 和 60000 蛋白对 pp60^{c-src} 抗体的免疫反应性增加. 用 pp60^{c-src} 进行免疫沉淀确证分子量为 50000 和 60000 蛋白的磷酸化增加. PAF 还引起 pp60^{c-src} 自胞浆向细胞膜易位. 在人中性粒细胞中 PAF 刺激分子量是 41000, 54000, 66000, 104000 和 106000 的蛋白上的酪氨酸磷酸化. 百日咳毒素处理可抑制分子量是 66000, 104000 和 106000 蛋白质的磷酸化, 而对分子量为 41000 的蛋白质没有影响^[12]. 上述研究表明 PAF 直接或间接影响 TPK 和/或磷酸基酪氨酸磷酸酶 (phosphoryl tyrosine phosphatase) 且可能与两套激酶和/或磷酸酶都有关系.

2.2 PAF 信号传导的调节与基因表达

对 PAF 反应产生脱敏并伴随 PAF 受体下调, 是普遍的现象^[3]. 血小板聚集、PPI 代谢增强、蛋白磷酸化及 Ca^{2+} 动员、中性粒细胞分泌颗粒及肝中糖原分解等反应均可用 PAF 处理而脱敏, 同时 ^3H -PAF 的结合也发生变化. 脱敏现象可能与受体的磷酸化、cAMP, G 蛋白、PKC 和 TPK 等的调节作用, 以及 PAF 受体的内化有关.

最近发现, PAF 在人单核细胞^[13]、成神经细胞瘤细胞^[14]、A-431 细胞^[15] 及淋巴母细胞样细胞^[16] 中引起早期反应基因如 c-fos 的表达, PAF 受体拮抗剂可阻断这一反应. PKC 激活

剂 PMA 在成神经细胞瘤细胞中对 PAF 引起的 c-fos 表达呈协同作用. PKC 抑制剂 Straurosporine 和 TPK 抑制剂 Genistein 在 A-431 细胞中均抑制 PAF 刺激的 c-fos 基因表达. 可见 PKC 和 TPK 在 PAF 刺激的 c-fos 基因表达中均有作用, 因此 PAF 受体偶联的信号传导途径可能为基因表达提供信号.

拿到了 PAF 受体的 cDNA, 有关 PAF 受体信号传导途径的研究也已积累了大量资料, 为在分子水平上准确回答上述问题奠定了基础.

致谢 承蒙北京医科大学生物化学教研室周爱儒教授审阅, 谨致谢意.

参 考 文 献

- 1 Honda Z, Nakamura M, Miki I *et al.* Nature, 1991; **349**: 342
- 2 Nakamura M, Honda Z, Izumi T *et al.* J Biol Chem, 1991; **266**: 20400
- 3 Shukla S D. Lipids, 1991; **26**: 1028
- 4 Yue T L, Gleason M M, Hallenbeck J *et al.* Neuroscience, 1991; **41**: 177
- 5 Avdonin P V, Cheglakov I B, Tkachuk V A. Eur J Biochem, 1991; **198**: 267
- 6 Glaser K B, Asmis R, Dennis E A. J Biol Chem, 1990; **265**: 8658
- 7 Shukla S D, Halendam S P. Life Sci, 1991; **48**: 851
- 8 Kanaho Y, Kanoh H, Saitoh K *et al.* J Immunol, 1991; **146**: 3536
- 9 Hwang S. J Lipid Media, 1990; **2**: 123
- 10 Hwang S, Lam M H, Pong S S. J Biol Chem, 1986; **261**: 532
- 11 Dhar A, Shukla S D. J Biol Chem, 1991; **266**: 18797
- 12 Gomez-Cambronero J, Wang E, Johnson G *et al.* J Biol Chem, 1990; **266**: 6240
- 13 Ho Y, Lee W M F, Snyderman R. J Exp Med, 1987; **165**: 1524
- 14 Squinto S P, Block A L, Braquet P *et al.* J Neurosci Res, 1989; **24**: 558
- 15 Tripathi Y B, Kandala J, Guntaka R V *et al.* Life Sci, 1991; **49**: 1761
- 16 Mazer B, Domenico J, Sawami H *et al.* Immunol, 1991; **146**: 1914

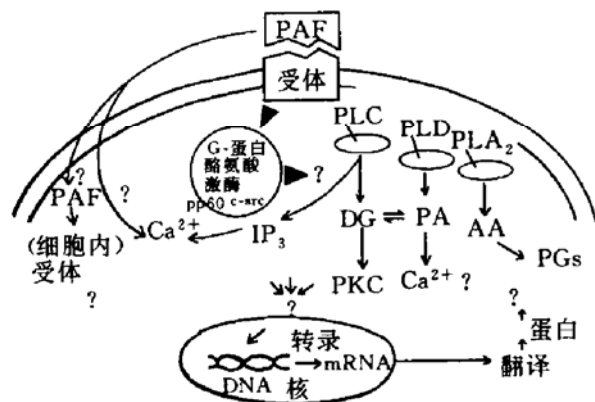


图 2 与 PAF 受体偶联的信号传导途径概图

AA: 花生四烯酸. PGs: 前列腺素类. PLA₂: 磷脂酶 A₂. PLC: 磷脂酶 C. PLD: 磷脂酶 D.

3 展 望

有关 PAF 受体及其信号传导途径尚有许多问题有待回答, 概括起来如下: a. PAF 仅是均一的细胞膜上受体吗? b. 在 PAF 信号传导途径中起关键作用的是哪一类 G 蛋白, 它与 TPK 的关系如何? c. 蛋白磷酸化与 PAF 受体活性调节的关系如何? d. 体内是否存在调控体内 PAF 水平及反应的天然拮抗剂. 可喜的是作为第一个被克隆出的磷脂激动剂受体, 已

Yuping. (*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100093*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21**(3): 207

The proteins which bound with lipid layers were named membrane proteins in biomembrane. Because of the large hydrophobic surface in membrane proteins, and the amphiphilic (hydrophobic and hydrophilic) character, their purification and crystallization are very difficult. Introducing small molecular detergent and small amphiphil into crystallization system of membrane protein, a great progress have been made. So far, a few membrane proteins have been crystallized, among them only the reaction center of *Rhodospseudomonas viridis* and *Rhodospseudomonas sphaeroides* have produced crystals and been analysed with 3 Å resolution. Two-dimensional crystal can be formed in a series of membrane proteins and the information of three-dimensional structure may be obtained by electronmicroscopy and image reconstruction.

Key words membrane proteins, detergent and amphiphil, three-dimensional crystal, image reconstruction

Platelet Activating Factor Receptor and Its Signal Transduction. Lu Xiaoyan. (*The First Teaching Hospital of Beijing Medical University, Beijing 100034*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21**(3): 211

Platelet-activating factor (PAF) is a potent phospholipid mediator. It is widely accepted that PAF effects through the reaction with its specific membrane receptors. PAF membrane receptor cDNA was cloned recently. The present paper reviewed developments on research concerning PAF receptor and its signal transduction.

Key words PAF receptor, signal transduc-

tion, gene expression

Recent Advances on the Functions of the 3'-Untranslated Regions of Eukaryotic mRNA's.

Liu Dinggan. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21**(3): 215

Eukaryotic mRNA 3'-untranslated regions' function are much complicated than it is thought. Recent studies showed that the 3'-untranslated regions determine not only the stability of mRNA, but also time, location and products of translation of the mRNA. It is noteworthy that mutations within 3'-untranslated regions can lead to tumorigenesis.

Key words mRNA, 3'-untranslated region, function

DNA Damage Induced by Lipid Peroxidation.

Liu Xiaoqi, Cao Enhua. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21**(3): 218

Lipid peroxidation may lead to base modification, DNA strand breaks and formation of various fluorescent products in model systems, bacteria and eucaryotic cells, and the selective destruction of the base guanine in DNA. The transient metal ions can intensify the DNA damage obviously. Antioxidants and free radical scavengers have the protective effect of varying degrees for DNA damage induced by lipid peroxidation. 8-Hydroxyguanine, which is strongly implicated in mutagenesis and carcinogenesis, has been observed. The molecular mechanism of mutagenesis and carcinogenesis induced by lipid peroxidation aroused great concerns in the field of free radical biology.

Key words lipid peroxidation, DNA damage,