

环 化 腺 苷 酸

董 霖

(中国科学院上海生物化学研究所)

Sutherland 等人在研究肾上腺素及增血糖素与糖代谢的关系中,观察到肾上腺素及增血糖素能促使肝内磷酸化酶的活性增高,因而促进糖元降解为葡萄糖-1-磷酸。他们在进一步研究时发现激素对磷酸化酶的影响并非直接作用,而是要经过一个中间环节。激素的效应仅在完整细胞中表现出来,如果将细胞破碎后,离心除去残渣部分,则所剩下的上清液部分就不出现激素的效应,但是如果将残渣部分再加到匀浆的上清部分,则激素的效应又重复出现,对这一现象进一步研究发现在残渣部分的细胞膜可产生一个对热稳定的因子,它起着对激素敏感的中间作用,这就是激素效应的中间环节。经过 Sutherland 等人系统研究这一个对热稳定的因子是腺苷 3',5'-单磷酸,简称环化 AMP (cAMP),其结构见图 1。

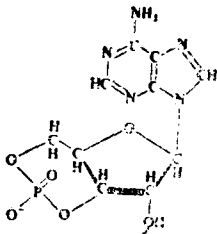


图 1 腺苷 3',5'-单磷酸结构

在体内 cAMP 的产生是由与细胞膜紧密结合的腺苷酸环化酶(简称环化酶)催化细胞内 ATP 而形成。cAMP 又很容易被磷酸二酯酶分解成 5'AMP。

自从发现 cAMP 以后,大量的工作更进一步说明除肾上腺素外,很多激素的作用都通过 cAMP。cAMP 不仅促进糖元的分解,还影响多种酶活性,并且对激素的产生、水分通透性的调节、离子的通透,甚至对神经系统都有作用。从低等微生物一直到高等哺乳动物的各种组织细胞内都含有 cAMP,作为细胞内重要的调节因素,它的生物学意义是非常广泛的。

cAMP 与激素作用的关系

现已证明很多种激素对靶细胞的作用,都是先经过一个中间过程,即首先调节细胞内 cAMP 水平的高低,使之发生相应的变化,然后再引起细胞内的各种反

应。如肾上腺素的作用,即先提高细胞内 cAMP 的水平,从而促进糖元降解。在各种激素中,除儿茶酚胺能对许多种组织的细胞内 cAMP 含量产生影响外,其它激素作用的组织特异性很强,表 1 中列举了不同激素引起细胞内 cAMP 含量改变的相应组织。

表 1 激素作用的组织特异性

激 素	相 应 的 组 织
儿茶酚胺	多种组织
增血糖素	肝、脂肪组织
ACTH	肾上腺皮质
黄体素	黄体、睾丸、脂肪组织
增血压素	肾
促甲状腺素	甲状腺
组织胺	脑
胰岛素	肝、脂肪组织
前列腺素	脂肪组织

这些激素作用于靶细胞的细胞膜,刺激或抑制环化酶活力,使细胞内 cAMP 的含量发生改变。因此 Sutherland 等人提出激素与 cAMP 的关系就象第一信使与第二信使的关系,即激素为第一信使,cAMP 为第二信使。关于第二信使的概念如图 2 所示。

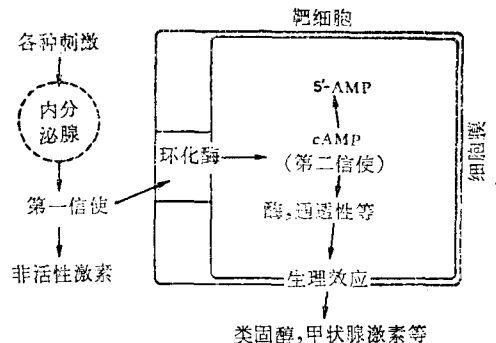


图 2 第二信使概念示意图

Sutherland 等人进一步研究了细胞膜的环化酶系统,认为环化酶为细胞膜的蛋白组成部分,其组成形式可能如模式图 3 所示。细胞膜环化酶系统由两种亚基组成,一种为调节亚基 R,另一种为催化亚基 C。激素

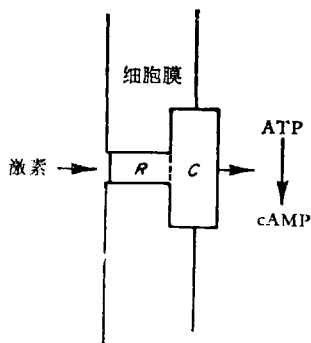


图3 细胞膜环化酶系统蛋白组成的模式图

与细胞膜相互作用导致R及C的构型改变，继而改变C的活性。激素作用的组织特异性可能与R有关，由于R对激素的反应不同，因而表现出某种激素只对某一种或几种专一的靶细胞产生影响。至今虽然对激素与靶细胞膜的关系已经有了一些了解，但是还有很多问题尚未解决。例如不同激素对细胞膜的作用是否相同，激素与细胞特异性关系在结构上的证据都有待进一步阐明。

cAMP 的某些作用

cAMP 的作用是多方面的，它能影响很多酶的活性（见表2），还能影响细胞内其他反应及代谢过程。cAMP 在细胞内的作用，大部分表现为对酶活性的影响，继而影响了很多重要的代谢过程。但是也有例外，

表2 细胞内受 cAMP 影响的反应

酶 或 相 应 的 反 应	改 变 情 况
蛋白激酶	+
磷酸化酶	+
糖元合成酶	-
磷酸果糖激酶	+
酪氨酸氨基转化酶	+
果糖-1, 6-二磷酸酯酶	-
固醇生成	+
脂肪分解	+
葡萄糖生成	+
酮体生成	+
氨基酸→肝蛋白	-
尿素产生(肝)	+
钾释放(肝)	+
渗透性	+
葡萄糖氧化	+
淀粉酶	+
胰岛素释放	+
蛋白质自多聚核蛋白体释放	+

例如：cAMP 在提高蟾蜍膀胱对水的通透性的作用中，看不出有酶的作用，而仅是一种物理状态的改变。总之，cAMP 在细胞内的作用是多方面的，本文仅从以下三个方面来说明它的作用。

(一) cAMP 对酶活力的影响

cAMP 对酶活力影响的原理有的已较清楚。现以磷酸化酶为例来说明 cAMP 与酶活性的关系。Krebs 等人详细地研究了肌肉内磷酸化酶的活化过程后证明，cAMP 所引起的酶活性的增高是经过如图4所示的一系列反应的。cAMP 首先激活磷酸化酶 b 激酶的激酶（亦称蛋白激酶），活性的蛋白激酶使无活性的磷酸化酶 b 激酶转变为活性的磷酸化酶 b 激酶，然后活性的磷酸化酶 b 激酶再催化磷酸化酶 b 转变为磷酸化酶 a，最后催化糖元转变为葡萄糖-1-磷酸。

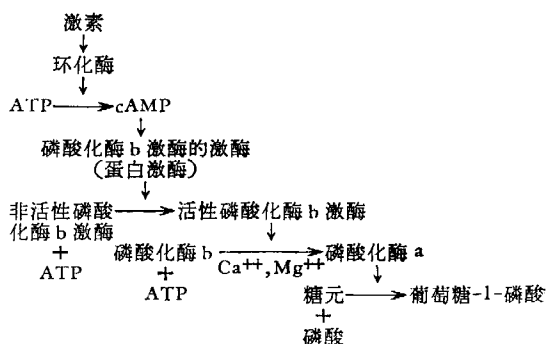


图4 磷酸化酶的活化过程

cAMP 激活的蛋白激酶能促进磷酸化酶激酶的磷酸化，使之转变为活性激酶，引起一系列反应。目前已知蛋白激酶还能催化其它很多蛋白质的磷酸化，较重要的如组蛋白、精蛋白、酪蛋白等。这些磷酸化的蛋白质可能参与细胞内一些重要的调节控制作用。

cAMP 与蛋白激酶二者之间的关系如何，是一个很有趣的问题。1970年 Gill 等人观察到 cAMP 与受体蛋白结合后同时也表现出蛋白激酶的活性。他们用 ^3H 标记的 cAMP 渗入到受体蛋白的量表示结合活力，用 ^{32}P 渗入蛋白的量表示蛋白激酶的催化活力。用肾上腺皮质抽提物为材料，经过各种提纯方法，这两种活力的变化见表3。经过 DEAE-纤维素柱分离后，可以得到三个活力峰（见图5），分别为第 I 峰（此峰较小）第 II 峰主要为 ^3H cAMP 与受体蛋白结合的活力，第 III 峰具有两种活力。超离心分析结果表明峰 II 为 4S，峰 III 为 7S。为进一步探讨 7S 部分二种活力的关系，将 4S 部分加入到 7S 部分，蛋白激酶的催化活力可被抑制 20—45%，再加入 cAMP 又可使激酶催化活力恢复。如果将 7S 部分在 pH6.0，加热到 43℃，15—30 分钟，cAMP 与受体结合活力下降 25%，同时激酶活力提高 10—25%，说明 cAMP 的受体蛋白对蛋白激

表3 提纯过程中二种活力的表现

提 纯 步 骤	毫微克分子 ³ HcAMP 结合/毫克 蛋白	毫微克分子 ³² P 渗入/毫克 蛋白/10 分钟
全部匀浆	1.69	1.19
100,000g 上清	3.17	2.10
硫酸铵沉淀	8.31	3.60
磷酸钙凝胶吸附	15.99	8.09
DEAE-纤维素柱峰 II	90.0	9.2
峰 III	51	25
超离心 II 4S	326.6	4.4
III 7S	49.8	56

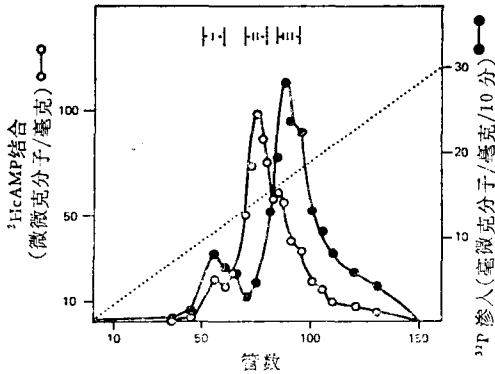


图5 DEAE-纤维素柱分离受体蛋白及蛋白激酶

酶的催化活力有抑制作用。同时还观察到,若将 7S 部分与 ³HcAMP 一起保温后再用超离心分析,就可出现二个峰,原来 7S 中具有与 cAMP 结合活力的部分自 7S 转移至 4S 处,而具有催化活力的激酶部分仍留在 7S 处不变(见图 6)。从以上几个实验可以说明以下两个问题:(1)在一般情况下受体蛋白与蛋白激酶结合在一起,前者抑制后者。(2)当 cAMP 与受体蛋白结合,使受体蛋白与蛋白激酶解离,释放出蛋白激酶的活力。

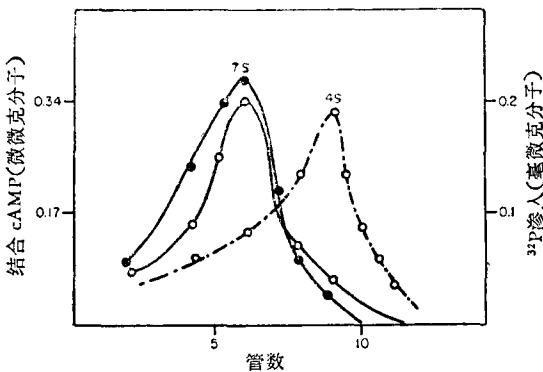


图6 cAMP 对超离心沉降的受体蛋白及蛋白激酶活力的影响

DEAE-纤维素柱分离的第一个峰与 cAMP 一起保温,再经过超离心分离可以得到两个活力部分,一为

4S,主要为受体蛋白的活力,另一为 3.8S,主要为激酶活力。可能在一定的条件下蛋白激酶的亚基为 3.8S,它与受体蛋白分离后很快又组成 7S 的二聚体。根据以上实验推测蛋白激酶活化的模式图如图 7,cAMP 在蛋白激酶的活化过程中起着去抑制的作用。

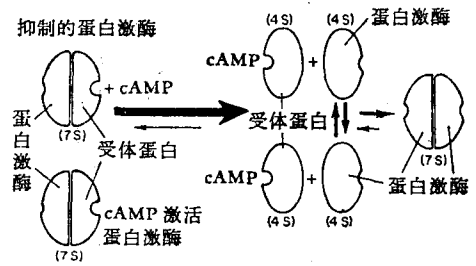


图7 cAMP 对蛋白激酶的活化作用

(二) cAMP 与蛋白合成的关系

cAMP 对蛋白合成的影响是多方面的,近年来的资料说明基因的转录和翻译都受 cAMP 的影响。

Pastan 等人观察到 cAMP 能控制大肠杆菌产生诱导酶的速度。在大肠杆菌的培养液中加入 IPTG (异丙基-硫代-β-D 半乳糖苷) 能诱导合成 β-半乳糖苷酶,葡萄糖抑制此作用,但 cAMP 可以恢复大肠杆菌诱导合成该酶的能力。同时 lacmRNA (注) 与酶合成的变化有平行的关系。用氯霉素处理的大肠杆菌无细胞系统,虽然 β-半乳糖苷酶的合成受抑制,但是 cAMP 仍能促进 lacmRNA 的合成,说明 cAMP 可能作用于 lac

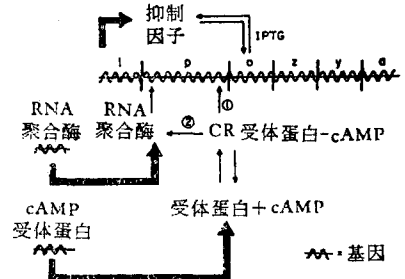
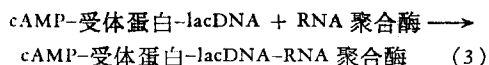
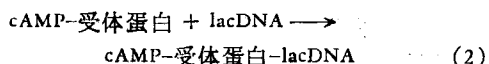
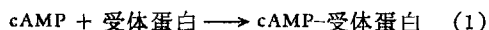


图8 lac 操纵子示意图

(表示乳糖)操纵子,影响转录 mRNA 的水平。现已知 lac 操纵子有三个起调节作用的基因 (i, p, o) 及三个结构基因 (z, y, a) (见图 8)。其中 p 基因为促进基因, RNA 聚合酶在 p 基因处与 lac 操纵子相结合起始转录, cAMP 的作用与 p 基因密切相关,能控制 lac 操纵子的反应速度。Monod 等人发现大肠杆菌有一种变种在 p 基因处起变化后, cAMP 的作用也就变小。1971 年 Pastan 等人用大肠杆菌的变种进行实验,进一步认为 cAMP 可能先与一个受体蛋白结合,然后与 p 基因形成一复合物, RNA 聚合酶便可与复合物结合,并开始合成 lacmRNARNA。这个过程可以用简单的方程式表示如下:



目前对以上四者结合的顺序意见还不完全一致。

有人认为 cAMP 与受体蛋白的关系恰似 cAMP 与蛋白激酶的关系。那么受体蛋白是否具有蛋白激酶的作用,对这个问题还有争论。有的实验支持受体蛋白即蛋白激酶。例如用大肠杆菌中抽提的 RNA 聚合酶以噬菌体 T₂ DNA 为样板,加入从哺乳动物中抽提的蛋白激酶,就可以合成 RNA,如果在反应系统中加 cAMP 可以加强蛋白激酶的作用。但是如果反应系统中无蛋白激酶则 cAMP 亦无效。

Pastan 等人的工作指出有一种大肠杆菌变种不能合成 β -半乳糖苷酶。但是加入从能合成此酶的菌种中抽提的受体蛋白和加入 cAMP,经过培养后能使前者产生半乳糖苷酶,也进一步说明 cAMP 及受体蛋白对合成诱导产生的 β -半乳糖苷酶的重要性。

cAMP 在遗传信息传递的各个水平上都起一定的作用。如通过对组蛋白磷酸化的作用而影响 DNA 的复制,对核糖核蛋白体的作用影响蛋白合成的翻译。但在这方面仍有争论,还有待于进一步研究。

(三) cAMP 与肿瘤的关系

由于 cAMP 对细胞内很多反应过程起着调节控制的作用,因此很自然地想到,对肿瘤这一特殊生长的情况,是否也有某些控制作用。近来有一些实验说明 cAMP 对肿瘤细胞的生长有抑制作用。

1970 年 Heidrick 等人观察到 cAMP 对四株组织培养的肿瘤细胞的生长分别抑制 70—89%,而对一株非恶变的细胞则影响仅为 13%。1971 年 yang 等人在实验中观察到双丁酰 cAMP 能抑制培养的白血病细胞的生长。同时用同位素渗入方法测定蛋白质及核酸的合成,看到当培养基内加双丁酰 cAMP 4—6 小时后, RNA 的合成显著下降,8 小时后蛋白质合成下降,在 8

小时后细胞进入 S 期, DNA 的合成也显著下降。Johnson 等报道小白鼠胚胎纤维细胞以甲基胆蒎诱发及 Rsv (Rous 肉瘤病毒) 诱发的肉瘤细胞给予 10^{-4} — 10^{-3} M 双丁酰 cAMP 培养 3—5 小时后,可使已转化成肉瘤的细胞重新变化成在形态及生长特性方面与正常相同的纤维细胞。当培养基内除去双丁酰 cAMP 后,又恢复肉瘤细胞的状态,用 cAMP 加茶碱可以得到与双丁酰 cAMP 同样的效果。此外,Prasad 看到在神经母细胞瘤培养液中加入双丁酰 cAMP 3—5 天后,瘤细胞大多数都长出了轴突,同时还抑制瘤细胞的生长,说明双丁酰 cAMP 不仅抑制瘤细胞生长,同时具有促进分化的作用。

Gericke 观察到 cAMP 对整体动物肿瘤生长有抑制作用。将 cAMP 注射到小白鼠移植的 NKL-淋巴肉瘤的瘤体,可以清楚地看到对肿瘤生长的抑制作用,注射 10 天后,瘤体生长抑制 50% (图 9),注射 cAMP 的剂量增加,效果也更显著 (图 10),但是当停止给药后,瘤体又迅速长大。图中 P 相当于直径 4 毫米。

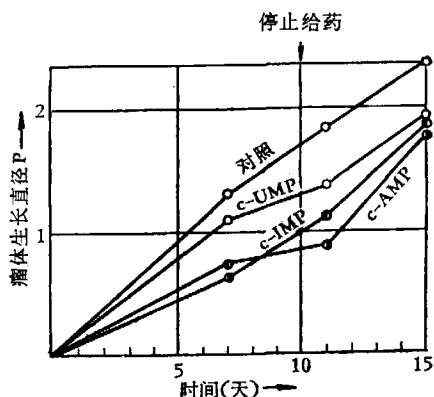


图 9 cAMP 对肿瘤生长的抑制作用

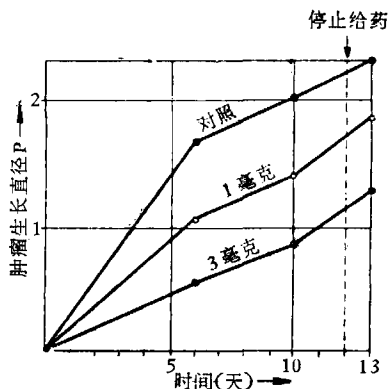


图 10 不同剂量 cAMP 对肿瘤生长的抑制作用

由于观察到 cAMP 对整体动物的肿瘤及肿瘤细胞生长的抑制作用,一些工作者进一步深入探讨了正常细胞与肿瘤细胞内 cAMP 的变化情况。Shappard 等人

(下接 64 页)

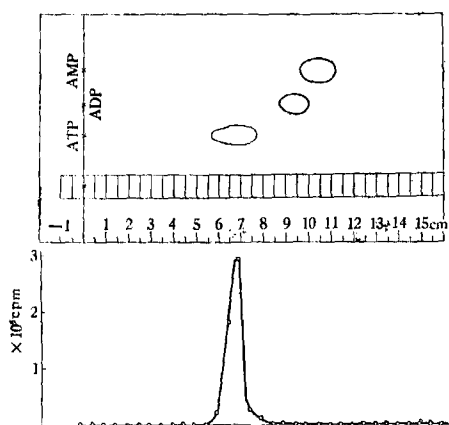


图2 γ - ^{32}P -ATP 的层析图谱和放射性测量
 Whatman No. 1 层析纸 10×18 厘米
 展层溶剂 异丁酸: 1NNH₄OH: 0.1M EDTA =
 100:60:1.6(V/V)
 放射性用 NE-8301 型液体闪烁计测定。

毫居/毫克分子 ATP。欲得到更高比放射性强度的 ATP, 可再相应地增加 $^{32}\text{P}_i$ 的剂量。

γ - ^{32}P -ATP 的化学纯度和放射纯度鉴定, 采用上行纸层析法。标准 AMP、ADP、ATP 的位置用紫外灯检出。放射样品区内的纸剪成宽 1.0 厘米, 长 0.5 厘米的小纸条, 浸入 6 毫升甲苯闪烁液中计数。纸层析和放射测定结果如图 2 所示, 除相应于 ATP 位置上有放射性外, 没有能察觉出其他的放射点 (图 2)。

Glynn 和 Chappell^[3] 在保温结束后加 5 倍体积乙醇停止酶反应, 还要用旋转蒸发浓缩等步骤, 操作比较繁琐。我们将反应液直接上柱分离, 效果也很好, 这样简化了若干步骤, 为管道化操作创造了条件。

Walsk 工作中^[6], 不采用阴离子树脂分离, 而只用活性炭柱, 这样的产品纯度较差, 含有少量 AMP、ADP 等杂质。我们在活性炭柱前增加了阴离子树脂分离, 提高了产品纯度。阴柱和活性炭柱联合使用比单用阴柱有二个优点, 第一, 活性炭柱用乙醇氨水洗脱, 洗脱液容易浓缩

至干; 第二, 这样获得的 ATP 为无盐制剂, 产品能适应各种不同的需要。而阴离子柱洗脱下来的为酸性溶液, 需加 Tris 中和后再进行浓缩, 既难浓缩又含有不少盐在内。

上述方法制备的 γ - ^{32}P -ATP, 现已应用于数项科研工作中, 效果良好。

参 考 资 料

- [1] Moffatt, J. G.: *Methods Enzymol.*, **12**, 182, 1967.
- [2] Littauer, U. Z., Kimhi, Y. and Avron, M.: *Anal Biochem.*, **9**, 85, 1964.
- [3] Glynn, I. M. and Chappell, J. B.: *Biochem. J.*, **90**, 147, 1964.
- [4] Scopes, R. K.: *Biochem. J.*, **113**, 551, 1969.
- [5] Cori, G. T., Slein, W. W. and Cori, C. F.: *J. Biol. Chem.*, **173**, 605, 1948.
- [6] Walsh, D. A.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1971.

(上接 26 页)

(1972 年) 报告正常细胞及恶变细胞 cAMP 的水平不同, 正常细胞 3T3、3T3/Bolb 内 cAMP 水平较高, 而转变成肿瘤细胞 3T6、3T12 及病毒感染的肿瘤细胞 Py3T3、SV3T3 内 cAMP 的水平较正常为低。细胞恶变后再恢复为正常细胞时, 细胞内 cAMP 的水平也随即恢复到正常。这三类细胞对激素的反应略有不同。前列腺素能使 3T3 正常细胞内 cAMP 含量提高 6 倍, 恶变细胞只增高二倍。胰岛素对两种细胞的作用无区别。根据某些激素有抑制肿瘤细胞生长的作用, 也间接支持 cAMP 能控制细胞生长的观点, 高度恶变的细胞可能缺少 cAMP。某些物质能提高细胞内 cAMP 水平, 可能抑制细胞的生长; 另一些物质能降低 cAMP 的水平, 可能刺激细胞的生长。为了进一步了解细胞内 cAMP 的含量为何发生变化, 一些学者还比较了正常和肿瘤细胞内合成和分解 cAMP 的酶活性, 目前尚未得到系统的看法。

从大量的工作中已看到肿瘤细胞分裂速度快以及分化是不完全的, 恶变程度愈高, 分化愈低、分裂愈快; 高度分化的细胞, 则往往分裂很慢, 甚至不分裂。细胞的分裂与分化似乎是一对矛盾的事物, 从以上所举的 cAMP 对组织培养细胞的影响实验中, 可以看到 cAMP 似乎在调节这对矛盾中起着一定的作用。

电 泳

在外加电场的作用下, 混悬于液体中的电荷颗粒 (离子或分子) 向一极迁移的现象叫做电泳。由于电荷颗粒的净电荷和大小的不同就以不同的速度向一极迁移, 因而可将混合物中性质极为相似的不同颗粒进行有效的分离。此外, 电泳法还应用于测定颗粒的迁移速度, 从而算出其分子量。因此电泳法是目前普遍使用的生物学实验技术之一。

