

专论与综述

蛋白和多肽激素作用原理研究进展

——激素与受体结合的后效应

冯佑民 张友尚

(中国科学院上海生物化学研究所)

在探讨蛋白和多肽激素在分子水平上作用机制的研究中, 一个非常重要的环节是对蛋白和多肽激素受体的研究。这个领域开始于六十年代末和七十年代初, 十多年来人们在激素与受体结合的反应性、受体的本质、受体的性质、受体的结构以及受体的结构与功能的关系等方面积累了丰富的知识。也就是说对激素的靶——受体——有了深入的了解, 认识到激素发挥生理作用的第一步是与其特定的受体结合。受体具有识别、结合特定激素和进而发动生理效应的双重功能。有很多综述归纳和讨论了这方面的成就^[1-6]。那么, 激素发挥生理作用的第二步或说激素与受体结合的后效应是什么呢? 本文试图归纳和讨论近年来在这方面的进展概况。在讨论中也会涉及个别其他活性蛋白与受体结合的后效应。

一、激素敏感的腺苷酸环化酶体系

首先回顾一下 Sutherland 的第二信使学说, 这个学说认为由于环境的刺激, 使内分泌腺释放激素, 激素作为第一信使携带着信息到达其靶器官, 与细胞表面特定的受体结合, 形成激素-受体复合体, 该复合体进而导致位于细胞内表面的腺苷酸环化酶的活化, 该酶催化 ATP 变成 cAMP。cAMP 作为第二信使将信息继续传下去直至生理作用的表达。已证明很多激素和神经介质是通过第二信使 cAMP 起作用的。在这个模式中, 受体、腺苷酸环化酶和第二信使是

激素发挥作用的三个主要环节。十几年来人们对受体和受体与激素的相互作用已经有了比较清楚的了解, 对于腺苷酸环化酶的性质及 cAMP 的产生也有深入的研究, 但对激素与受体结合后如何导致腺苷酸环化酶活化的认识经过了相当长的时间, 曾提出过多种假设^[2]。

近来的研究进一步揭示了对激素敏感的腺苷酸环化酶体系, 证明在受体和腺苷酸环化酶之间存在有一类调节蛋白。因此, 这个体系至少包含有三种蛋白质, 它们是受体 (R), 位于细胞外表面, 它的功能是识别和专一结合激素; 腺苷酸环化酶 (C), 位于细胞内表面, 催化 ATP 变为 cAMP; 依赖于 GTP 的调节蛋白 (N), 位于两者之间, 负责调节激素对 C 的影响。进一步研究表明, 调节蛋白有两种, 一种能激活腺苷酸环化酶 (N_s), 另一种是抑制该酶 (N_i)^[7,8]。已经将 N_s 和 N_i 分离纯化, 它们各由三个不同的亚基组成, 亚基分子量为 42000 (α_s) 或 41000 (α_i), 35000 (β_s 或 β_i) 和约 5000 (γ_s 或 γ_i)^[9]。受体、调节蛋白及其亚基和腺苷酸环化酶之间的关系如图 1 所示。

这样我们对于对激素敏感的腺苷酸环化酶体系的调节机制的认识更清楚了, 即激素与受体的结合首先促进了受体蛋白与调节蛋白 (N_s 或 N_i) 的相互作用, 这种相互作用导致调节蛋白与 GTP 结合, 同时原来结合在调节蛋白的 GDP 从调节蛋白上解离下来, 形成调节蛋白-GTP, 后者与腺苷酸环化酶相互作用致使该酶

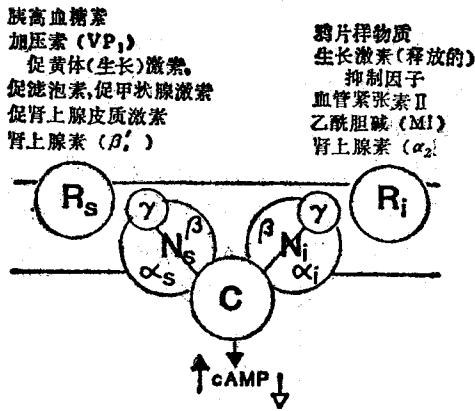


图1 激素敏感的腺苷酸环化酶体系的组成及其相互关系^[9]

C, 腺苷酸环化酶催化单位; N, 调节蛋白及其亚基;
R, 激素受体; s 和 i, 分别代表激活和抑制

活化或被抑制。

最近,人们用分别纯化的受体、调节蛋白和腺苷酸环化酶成功地在脂质体中重组成对激素敏感的腺苷酸环化酶体系,进一步证明这三种蛋白是该酶体系的必需因子^[10]。

二、依赖于激素的受体自身磷酸化

近年来在受体研究中一个很重要的成就是发现某些激素和生长因子的受体也是酶,它能催化酪氨酸 (Tyr) 磷酸化。Cohen 等^[11]首先指出上皮生长因子 (EGF) 受体的酶学性质。接着 Kahn 等^[12]发现胰岛素与 EGF 类似,也能促进受体自身 Tyr 的磷酸化。之后在肌肉,脂肪和肝等胰岛素经典靶组织都观察到这一现象。胰岛素促进的磷酸化作用是与该体系结合胰岛素的能力平行的。例如,从患肥胖型胰岛素对抗症的小白鼠^[13]或严重对抗胰岛素的病人^[14]中获得的细胞结合胰岛素的能力弱,与之相应这些细胞也缺乏由胰岛素促进的磷酸化作用。这就是说胰岛素促进的磷酸化作用是和胰岛素与受体的结合直接相关的。还证明能模拟胰岛素活力的某些非胰岛素物质如胰岛素受体的抗体,某些外源凝集素甚至胰蛋白酶也能促进这种磷酸化作用,可见胰岛素促进的磷酸化作用又是与胰岛素的生理效应平行的。

胰岛素受体是由 α -和 β -两类亚基各两个

通过二硫键 (S-S) 连接而成。 α -亚基由 719 个氨基酸残基组成,亲水性强,位于细胞表面; β -亚基含 620 个氨基酸残基,可分为三个区域,由 194 个氨基酸残基组成的 N-端区域露在细胞表面,第二个区域由 23—26 个疏水性很强的氨基酸残基组成,可能是横跨细胞膜区域,第三个区域是由 403 个氨基酸组成的 C-端,插入细胞浆中(图 2)^[15,16]。

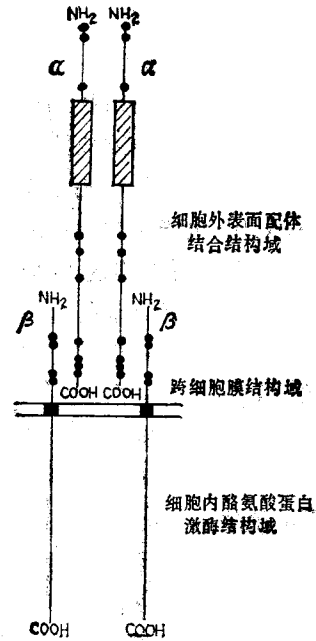


图2 胰岛素受体结构示意图^[17]

▨ 半胱氨酸含量高的区域; ■ 横跨细胞膜区域; ● 单个半胱氨酸(可能形成亚基间 S-S);
NH₂- N-末端; COOH- C-末端

近来的研究指出胰岛素受体 β -亚基 C-端含有能为胰岛素活化的 Tyr 蛋白激酶活性,在活化后 β -亚基自身被磷酸化。胰岛素受体的两类亚基可能具有不同的功能, α -亚基含有结合胰岛素的部位,而 β -亚基是对 Tyr 专一的蛋白激酶。“胰岛素-受体-蛋白激酶”复合体可能是胰岛素信息跨膜传递的体系。

根据上述,胰岛素的作用机制之一可能是胰岛素与其受体的结合刺激了胰岛素受体对 Tyr 专一的蛋白激酶的活化,该酶活化后首先使自身磷酸化,进而催化其它蛋白质(包括酶)

的磷酸化,最终表现出胰岛素的生理效应。这里存在的主要问题是鉴定胰岛素受体对 Tyr 专一的蛋白激酶的天然底物,以及进一步证明胰岛素受体磷酸化对胰岛素发挥生理效应的必要性。已有一些关于该酶除胰岛素受体以外的其他底物的报道。例如,组蛋白,血管紧张肽可作为该酶的底物被磷酸化;大鼠脂肪组织中存在一个热稳定的该酶底物。最近, Fujita-Yamaguchi 等^[17]指出细胞的微管蛋白可能是该酶作用的底物。

Czech 等^[18]指出用能增加细胞 cAMP 浓度的激素如肾上腺素,异丙基肾上腺素和胰高血糖素预处理脂肪细胞可导致被处理的脂肪细胞结合 ¹²⁵I-胰岛素的能力下降 40—50%。进一步证明 Bt₂cAMP 也能模拟上述激素的作用。用 Scatchard 作图分析表明这种结合能力降低是由于脂肪细胞胰岛素受体在处理前后亲和性降低引起的。细胞内 cAMP 浓度增加的直接结果是导致依赖于 cAMP 的蛋白激酶活性增加,该酶可使丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 磷酸化。因此提出如下假设,即胰岛素受体的一个或多个 Ser 或 Thr 磷酸化可能导致胰岛素受体对胰岛素亲和性下降。由此可见,催化 Ser 或 Thr 磷酸化的蛋白激酶(如,依赖于 cAMP 的蛋白激酶,蛋白激酶 C 等)和催化 Tyr 磷酸化的蛋白激酶(如胰岛素受体的 β -亚基)在调节胰岛素生物活性中存在着密切的关系(图 3)。而这些蛋白激酶又受不同激素或因子调节^[6],这可能是

激素之间相互调节的机制之一。

我们知道很多代谢过程如糖原生成,脂肪形成,胆甾醇的合成,蛋白质的合成和葡萄糖异生等,其关键酶的作用都是通过磷酸化而控制的。有人比喻磷酸化作用可能是激素信号控制的一种“语言”,在这种“语言”中磷酸化可以看做为“单词”如 Ser-磷酸, Thr-磷酸, Tyr-磷酸等,“句子”则是由含有单个或多个磷酸化部位的一些酶组成的^[19]。由此可见磷酸化作用在代谢过程中起着非常重要的作用。

三、激素作用的化学介体

在激素与受体结合的后效应研究中另一个新的领域是激素作用的化学介体的发现。在胰岛素作用机制的研究中人们注意到胰岛素与其受体结合后有一种能模拟胰岛素生物活力的化学因子产生^[20]。很快 Larner 等^[21]和 Jerett 等^[22,23]分离出这种化学物质称为胰岛素化学介体,并对其生物活力和物化性质进行了研究。表 7 列举了胰岛素化学介体模拟的胰岛素生物活力^[24]。最近张世荣等^[25]指出胰岛素化学介体不仅在无细胞体系中能模拟胰岛素的生物活力,在完整细胞中也能模拟(表 1)。这对进一步确定胰岛素化学介体在胰岛素作用机制中的地位是一个很重要的进展。

虽然尚未获得足够量均一的胰岛素化学介体以测定其结构,但对其物化性质已经有了比较详细的研究。胰岛素化学介体对热和酸稳定,在酸性条件下用凝胶过滤,测得其分子量为 1000—3000,但在中性 pH 时分子量约为在酸性条件下的两倍,说明这种物质在中性条件下可能聚合;蛋白水解酶和唾液酸酶能破坏其活力。这些性质说明胰岛素化学介体是分子量为 1000—3000 的糖肽。由于若干蛋白水解酶的抑制剂能抑制胰岛素化学介体的产生,说明它的产生包括蛋白质水解的过程。因此,胰岛素化学介体可能是以前体形式存在于细胞表面,当胰岛素与其受体结合后激活了细胞膜上某种蛋白酶将其水解下来,作为胰岛素化学介体发挥胰岛素的生理作用^[24]。

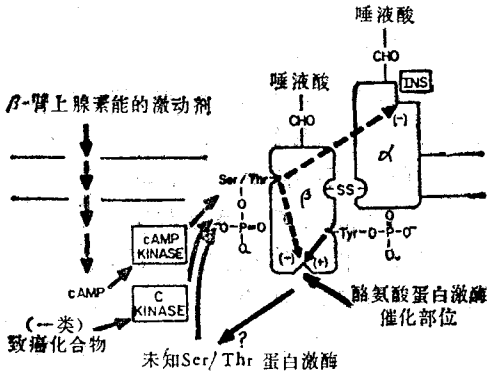


图 3 胰岛素受体蛋白激酶和其它蛋白激酶的关系^[6]
 cAMP KINASE 依赖于 cAMP 的蛋白激酶;
 C KINASE 蛋白激酶 C; INS 胰岛素

表 1 在无细胞和完整细胞体系中胰岛素化学介体的胰岛素功能^[24]

	胰岛素功能	
	胰岛素	胰岛素化学介体
I. 无细胞体系		
(a) 细胞质		
依赖于 cAMP 的蛋白激酶	↓	↓
糖原合成酶	↑	↑
乙酰辅酶 A 羧化酶	↑	↑
(b) 细胞膜		
激素活化的腺苷酸环化酶	↓	↓
(N^+ , K^+)-ATPase	↑	↑
(c) 内质网		
cAMP 磷酸二酯酶	↑	↑
葡萄糖-6-磷酸酶	↓	↓
(d) 线粒体		
丙酮酸脱氢酶	↑	↑
Ca^{2+} -运输	↑	↑
(e) 细胞核		
RNA 合成	↑	↑
II. 完整细胞体系		
(a) 大鼠脂肪细胞		
激素刺激的 cAMP 浓度	↓	↓
脂肪形成	↑	↑
抗脂解作用	↑	↑
(b) 人工培养的大鼠肝细胞		
脂肪形成	↑	↑
胰岛素受体的向下调节	↑	↑

注: ↑ 刺激作用, ↓ 抑制作用

四、激素-受体复合体的内部化 (internalization)

细胞至少有三种不同的使细胞表面物质内部化的机制,它们是大胞饮作用 (macropinocytosis), 小胞饮作用 (micropinocytosis) 和受体调节的内部化 (receptor-mediated endocytosis)。前两种都不浓缩被内部化的物质,它们将附在细胞表面的物质内部化进入胞饮物囊 (pinosome), 后者进而与溶酶体 (lysosome) 融合将内部化的物质转移到溶酶体并在那里将其降解。这种内部化是不专一的,是清除细胞表面异物的正常生理现象。而激素或某些配基所引起的内部化则不同于上述两种。激素与受体结合形成激素-受体复合体,这种复合体进而聚集成簇 (cluster) 形成涂层坑 (coated pit), 然后内部化转入到细胞内一个特殊的受体囊 (receptosome) 中,它和胞饮物囊类似但不同,受体囊不与溶酶体融合而是将内部化的激素-受体复合体带到高尔基体区域^[28,29]。

很多报道指出,胰岛素可促进胰岛素受体的内部化,而且内部化的受体可以再返回到细胞表面^[30]。虽然对于胰岛素受体的这种循环在胰岛素作用中的确切意义还不知道,但认为这种循环过程中某些步骤在调节胰岛素作用中可能具有重要意义^[31]。但也有人持不同的观点,他们依据无类胰岛素活力但能和胰岛素受体专一结合的胰岛素受体抗体的片段 (Fab) 也能引起胰岛素受体内部化,认为胰岛素受体的内部化和一般附在细胞表面物质的内部化一样,与胰岛素作用无关^[32]。

转铁蛋白 (transferrin, Tf) 调节的 Tf-受体复合体的内部化似乎是 Tf 传递铁 (Fe^{3+}) 的机制。体外实验证明在略碱性 pH 时, Tf 结合铁,而在略酸性 pH 的条件下 Tf 释放所结合的铁。近来报道结合铁的铁与细胞表面专一受体结合形成 Tf-受体复合体,该复合体经内部化进入细胞后转入一个特殊的囊,那里 pH 为 5 左右,于是 Tf 将结合的铁释放成为脱铁 Tf,后者在略酸性条件下与 Tf 受体的结合更紧

Cheng 等^[24]把胰岛素化学介体粗制品进一步纯化,可将激活磷酸化糖原合成酶磷酸(酯)酶与抑制该酶的胰岛素化学介体分开,在不存在 cAMP 的条件下前者抑制依赖于 cAMP 的蛋白激酶,后者激活该酶。与此类似, Saltiel 等^[26]从胰岛素化学介体粗制剂中分离了刺激和抑制丙酮酸脱氢酶磷酸(酯)酶的化学介体。这说明可能存在多种化学介体。胰岛素化学介体可模拟多种胰岛素生物功能(表 I)和多种胰岛素化学介体的存在是与胰岛素具有多种生理效应的现象相一致的。

此外,用类似的途径 Teyssot 等^[27]分离得到催乳素 (PRL) 的化学介体,证明也是一个热稳定分子量约 1000 的多肽。

密。因此,脱铁 Tf 与 Tf 受体仍结合为复合体,之后这个复合体又被放出至细胞表面,由于在生理 pH 脱铁 Tf 与 Tf 受体结合能力弱,所以脱铁 Tf 从受体上解离下来又到血液中重新结合铁。如此, Tf 通过 Tf-受体复合体内部化完成了传递铁的生理功能(图 4)^[33]。

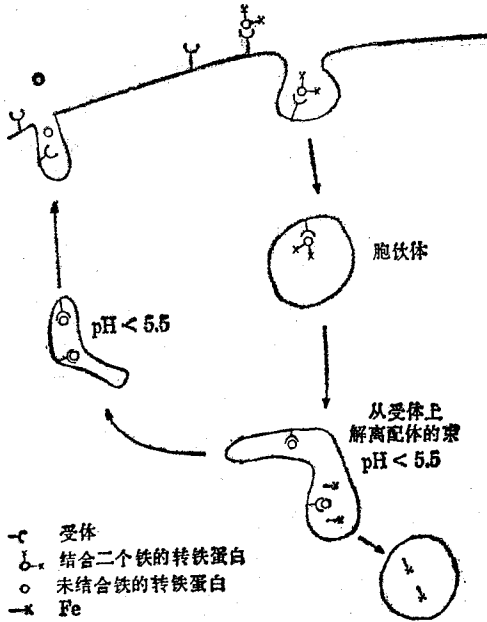


图 4 转铁蛋白-受体复合体的内部化与转铁的关系^[33]

五、胰岛素与受体通过二硫键(S-S)结合成共价键复合体

胰岛素与受体结合的后效应的另一种形式是胰岛素与受体结合后进一步通过 S-S 键交换形成共价键的复合体。这本来是最初关于胰岛素作用机制的假设之一,后来几乎被人们忘记。最近又有新的证据指出 ¹²⁵I-胰岛素与受体结合后洗去游离和可解离的 ¹²⁵I-胰岛素,然后将细胞或细胞膜增溶,分离得到一种胰岛素-受体复合体,它们以 S-S 键相连接。¹²⁵I-胰岛素与受体结合后的这种 S-S 键交换可被加入天然胰岛素抑制而不为其它物质影响。有人认为胰岛素受体的这种氧化还原状态的变化可能在胰岛素作用中起着重要的作用^[34-36]。

六、激素对基因表达的调节作用

一般认为甾体激素与受体结合后进入细胞

核与染色体结合,通过影响基因转录而实现其生理效应。近来 Murdoch 等^[37]报道促甲状腺激素释放激素(TRH)在数分钟内可增加 PRL 基因转录的 7—12 倍。这说明 TRH 与其细胞表面受体结合后产生的信号能很快达到细胞核。这给人们以启示:可能有的蛋白和多肽激素特别是具有促生长效应的激素如胰岛素,生长激素(GH)等也可能通过对基因的调节完成其某些生理效应。有人指出胰岛素-受体复合体内部化进入细胞后有 80% 的胰岛素是完整的^[38]。联系到有不少报道证明在细胞器尤其是核膜上有胰岛素受体存在^[39],因此,通过调节基因也可能是胰岛素发挥生理作用的方式之一。Sibrowski 等^[40]指出胰岛素在体内调节葡萄糖酶的合成是通过增加葡萄糖激酶 mRNA 实现的。这进一步说明通过影响基因转录可能是胰岛素的作用途径之一。

七、不同配基受体之间的通讯

前面曾提到用肾上腺素等能提高细胞内 cAMP 浓度的激素预先处理脂肪细胞可抑制被处理脂肪细胞与胰岛素的结合能力。这是激素之间相互影响的例子之一,而且认为可能是通过磷酸化作用肾上腺素影响胰岛素受体使其与胰岛素的亲和性降低所致。最近 Wright 等^[41]指出 fibronectin (FN) 和 phorbol esters 与其受体的结合可以在无补体 3(C₃) 存在下活化同一细胞上的 C₃ 受体而并不改变这种受体的数目和分布。他们称这种现象为不同配基受体之间的通讯。虽然这样的报道还很少,但可能具有重要的生物学意义。

八、结 束 语

在蛋白和多肽激素中,虽然有很多激素是以 cAMP 做为第二信使,如降钙素,绒毛膜促性腺激素(CG),促肾上腺皮质激素(ACTH),胰高血糖素,促滤泡素(FSH),促黄体(生成)激素(LH),促黑(素细胞)激素(MSH),促甲状腺激素(TSH)等等。但也有些激素如胰岛素等被证明不是以 cAMP 作为第二信使。前一类激

素的生理效应似乎比较单一, 后一类生理效应比较多样性, 往往还具有促进生长的效应。例如, 胰岛素是一个多生理功能激素, 以发挥生理效应所需时间长短看, 从几秒钟(如促进葡萄糖的运输)到若干小时(如促进蛋白质的合成), 即所谓胰岛素的短效应和长效效应。这类激素往往对靶的专一性不强, 例如几乎人体所有细胞都证明含有胰岛素受体。

总之, 不同类的激素有不同的激素与受体结合的后效应; 同一种激素如胰岛素具有多种与受体结合的后效应, 这可能是胰岛素表达不同生理效应的基础。对激素与受体结合的后效应的研究将是激素作用原理研究中继受体之后又一新的焦点。预计不久对于激素与受体结合的后效应的研究会更深入, 并将会有更多的后效应被发现。

参 考 文 献

- [1] Kahn, C. R.: *J. Cell. Biol.*, **70**, 261, 1976.
- [2] 冯佑民等: 《生物化学与生物物理进展》, **5**, 1, 1979.
- [3] Kahn, C. R. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.*, **37**, 474, 1981.
- [4] Gammeltofte, S.: *Physiological Review*, **64**, 1321, 1984.
- [5] Obberghen, E. V.: *Biochem. Pharmacology*, **33**, 889, 1984.
- [6] Czech, M. P.: *Ann. Rev. Physiol.*, **47**, 357, 1985.
- [7] Stemweis, P. C.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 11517, 1981.
- [8] Codina, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 4276, 1983.
- [9] Hildebrandt, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 2039, 1984.
- [10] Cerione, R. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 9979, 1984.
- [11] Cohen, S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 4834, 1980.
- [12] Kasuga, M. et al.: *Science*, **215**, 185, 1982.
- [13] Marchand-Brustel, Y. L. et al.: *Nature*, **315**, 676, 1985.
- [14] Grigorescu, F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 15003, 1984.
- [15] Ullrich, A. et al.: *Nature*, **313**, 756, 1985.
- [16] Ebina, Y. et al.: *Cell*, **40**, 747, 1985.
- [17] Kadowaki, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 4016, 1985.
- [18] Pessin, J. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 7386, 1983.
- [19] Larner, J. et al.: *Recent Prog. Horm. Res.*, **38**, 511, 1982.
- [20] Larner, J.: *Diabetes*, **21**, 428, 1972.
- [21] Larner, J. et al.: *Science*, **206**, 1408, 1979.
- [22] Jarett, L. et al.: *Science*, **206**, 1407, 1979.
- [23] Parker, J. C. et al.: *Arch Biochem. Biophys.*, **215**, 339, 1982.
- [24] Cheng, K. et al.: *Ann. Rev. Physiol.*, **47**, 405, 1985.
- [25] Zhang, S. -R. (张世荣) et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 6471, 1983.
- [26] Saltiel, A. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 3513, 1982.
- [27] Teyssot, B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**, 6729, 1981.
- [28] Pastan, I. H. et al.: *Ann. Rev. Physiol.*, **34**, 239, 1981.
- [29] Pastan, I. et al.: *TIBS* **8**, 250, 1983.
- [30] Max Fehlmann, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**, 5921, 1982.
- [31] Arsenis, G. et al.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 2202, 1985.
- [32] Kasuga, M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **114**, 230, 1983.
- [33] Pautry-varsat, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 2258, 1983.
- [34] Saviolakis, G. A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 4924, 1981.
- [35] 张新堂等: 《生物化学与生物物理学报》, **17**, 221, 1985.
- [36] Clark, S. et al.: *Biochem. J.*, **229**, 513, 1985.
- [37] Murdoch, G. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 15329, 1983.
- [38] King, G. L. et al.: *Science*, **227**, 1583, 1984.
- [39] 王育西等: 《中华核医学杂志》, **3**, 5, 1983.
- [40] Sibrowski, W. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 343, 1984.
- [41] Wright, S. D. et al.: *J. Cell. Biol.*, **99**, 336, 1984.

[本文于 1986 年 5 月 8 日收到]