

到解释。

粘细菌尽管在系统分类上属于细菌, 并不更接近真核生物, 但却表现与真核生物更多的相似性。如在粘细菌中发现类似真核生物的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 暗示这类细菌可能有类似于真核生物信号传导的级联反应。由于遗传操作的优越性, 粘细菌可作为研究信号调控的理想体系。对粘细菌多细胞形态发生分子调控的研究, 不但对认识原核生物的细胞分化发育, 而且对理解生命的进化过程、真核生物的细胞行为和分化发育的分子调控等具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev*, 1996, **60** (1): 70~102
- 2 Kaiser D, Kroos L. Intercellular signaling. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 257~ 283
- 3 Plamann L, Davis J M, Cantwell B, *et al.* Evidence that asgB encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol*, 1994, **176** (7): 2013 ~ 2020
- 4 Gill R E, Karlok M, Benton D. *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling. *J Bacteriol*, 1993, **175** (14): 4538~ 4544
- 5 Lee B-U, Lee K, Robles J, *et al.* A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD (P) + -containing protein. *Genes Dev*, 1995, **9** (23): 2964~ 2973
- 6 Cheng Y, Kalman L V, Kaiser D. The dsr gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3. *J Bacteriol*, 1994, **176** (5): 1427~ 1433
- 7 Toal D R, Clifton S W, Roe B A, *et al.* The esg locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1 α and E1 β subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase. *Mol Microbiol*, 1995, **16** (2): 177~ 189
- 8 Harris B Z, Kaiser D, Singer M. The guanosine nucleotide (p) ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev*, 1998, **12** (7): 1022~ 1035
- 9 Hochman A. Programmed death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol*, 1997, **23** (3): 207~ 214
- 10 Dworkin M. Cell surfaces and appendages. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 63~ 83
- 11 Ueki T, Inouye S. A new sigma factor, SigD, essential for stationary phase is also required for multicellular differentiation in *Myxococcus xanthus*. *Genes cells*, 1998, **3** (6): 371~ 385
- 12 Inouye S, Inouye M. Development-specific gene expression: protein serine/threonine kinases and sigma factors. In: Dworkin M, Kaiser D eds. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 201~ 212
- 13 Kil K-S, Brown G L, Downard J S. A segment of the *Myxococcus xanthus* ops DNA functions as an upstream activation site for tps gene transcription. *J Bacteriol*, 1990, **172** (6): 3081~ 3088
- 14 Weinberg R A, Zusman D R. Evidence that the *Myxococcus xanthus* frz genes are developmentally regulated. *J Bacteriol*, 1989, **171** (11): 6174~ 6186
- 15 White D. Cell interactions and the control of development in *Myxobacteria* populations. *Int Rev Cytol*, 1981, **72**: 203~ 227

Multicellular Morphogenesis in Myxobacteria and Its Molecular Regulation. ZHOU Lu, LI Yue-Zhong, LI Jian (State Key Laboratory of Microbial Technology, College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China).

Abstract Multicellular morphogenesis is the main content of myxobacterial social behavior. The morphogenesis contains aggregation of cells under nutrient deprivation, autolysis, development of fruiting bodies and formation of myxospores. There is a complicated system of signals and regulation during morphogenesis, which is much more similar to eukaryotes. *Myxobacterium* is an important model for studying cellular differentiation and development in prokaryotes and biological evolution.

Key words myxobacteria, *Myxococcus xanthus*, morphogenesis, molecular regulation

阿尔茨海默氏病与氧应激

陈 瑗 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 是老年人群痴呆最普遍的原因, 也是老年人病态和死亡的主要原因。以阿尔茨海默氏病与氧应激为题, 从 AD 发生的分子基础和氧应激基础, 以及 β 淀粉样蛋白 (β amyloid, β A) 的聚合作用和毒性与自由基的关系, 对近年来在 AD 发生机制研究中引人注目的

氧应激问题, 作一简要综述.

关键词 阿尔茨海默氏病, 基因突变, 氧应激

学科分类号 R 741

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病, 是老年人群痴呆最普遍的原因, 也是老年人病态和死亡的主要原因. 该病的临床特征是记忆力减退, 识别能力进行性下降和精神障碍. 死后组织病理学研究表明, 在受累及的脑区, 在正在死亡和已经死亡的神经元中存在神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs), 包括缠绕的细胞骨架 Tau 蛋白, 以及老年斑 (senile plaque) 又称轴突斑 (neuritic plaque), 老年斑的周围常围绕营养障碍性轴突, 激活的小胶质细胞和活性星形细胞. 老年斑的核心部分的主要蛋白质成分是淀粉样蛋白 (β amyloid, β A) 的 40~43 个氨基酸聚合形成的淀粉样蛋白细丝 (amyloid fibrils).

1 阿尔茨海默氏病发生的分子基础

β A 在 AD 发生中的作用已被肯定. β A 的前身

是 β A 前身蛋白 (amyloid precursor protein, APP), 是普遍表达的具有单个跨膜结构域的糖蛋白, 是由染色体 21 中的一个基因编码. APP 有四个同工型: APP695、APP714、APP751 和 APP770. 是由共同的 mRNA 前身经过不同的剪接形成的 (图 1)^[1]. 细胞对 APP 代谢有二条通路: α 通路是受 α -secretase 催化在残基 687 和 688 之间断裂, 接着在 C 端由 γ -secretase 催化在 712 附近断裂, α 通路不产生 β A, 因为断裂发生在 β A 结构域内; β 通路是由 β -secretase 催化在 671~672 间断裂, 接着在 C 端由 γ -secretase 催化, 在 712 附近断裂, 这条通路产生 β A, 由于 γ -secretase 催化位置不同形成长短不同的 β A, 如断裂在 712~713 生成短的 β A 1~40, 断裂在 714 以后形成长的 β A 1~42/43.

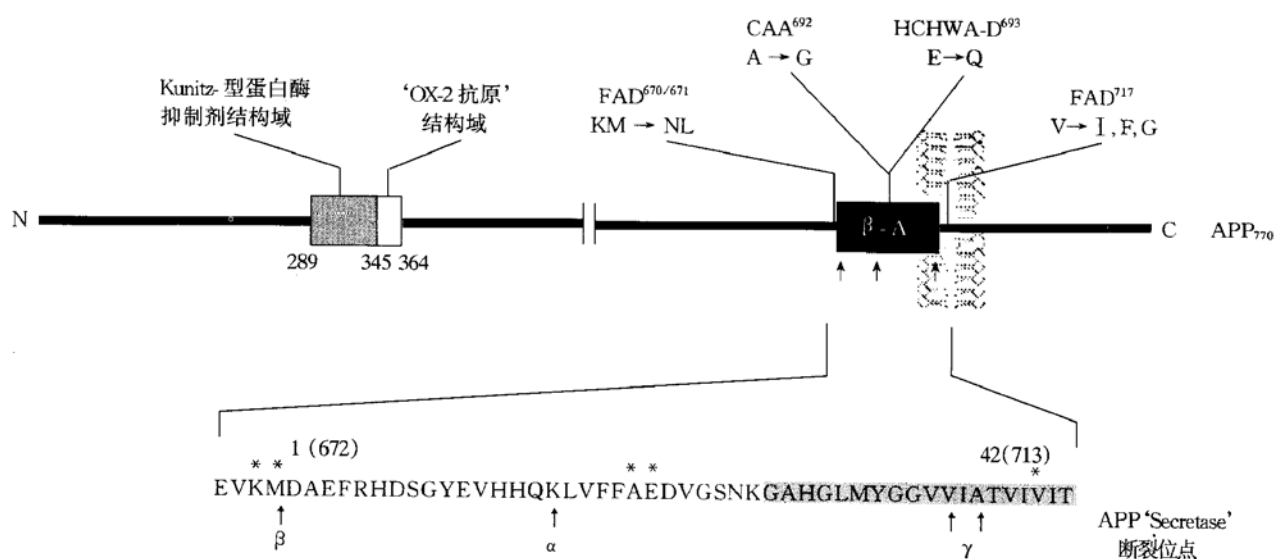


图 1 人 APP 基因及遗传性突变位点的示意图

家族性 AD (familial AD, FAD) 与 APP 基因突变有关^[1]. 主要有二种 FAD, 一种是 670/671 密码子双突变 KM $\rightarrow$ NL, 另一种是在 717 位点突变, V $\rightarrow$ I、F、G. APP 上述五种突变引起单纯型 AD. 此外, 在少数情况下点突变还可能发生在 β A 692 和 693 位点, 前者 A $\rightarrow$ G 与严重的脑淀粉样血管瘤 (cerebral amyloid angiopathy, CAA) 和早老性痴呆有关, 后者 E $\rightarrow$ Q 可导致 Dutch 型伴有淀粉样

变性的遗传性脑出血 (hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis of Dutch-type, HCHWA-D), 涉及 β A 沉积在脑血管周围和脑出血. 有假设认为这些突变改变了 secretase 介导的 APP 分解代谢, 导致 β A 生成量增加或不溶性的 β A 1~42/43 氨基酸片段的比例增加. 已经证实长的 β A 42/43 是老年斑中最早和最多出现的 β A, 易于形成纤维.

最近的研究揭示, 染色体 14 的早老素 1

(presenilin 1) 基因 (ps1) 和染色体 1 的早老素 2 (presenilin 2) 基因 (ps2) 也参与了 AD 的发生^[2,3]. ps 的很多突变位点已经知道, ps1 基因突变能增加 Tau 蛋白磷酸化, 增加 β A 生成; ps2 基因突变能升高 FAD 患者血浆 β A 1~42/43 含量, 以及改变膜蛋白交通 (trafficking), 增加 APP 暴露于 γ -secretase, 在 42 位点催化断裂, 由此使 β A 1~42/43 生成增加. 已有报道提出 ps 突变是导致遗传性 FAD 早期发病的主要原因^[4], 而 APP 突变在遗传性 FAD 发病中只占 1%~5%^[1]. 除 APP、ps1 和 ps2 基因外, 还有染色体 19 的 apolipoprotein E (apoE) 的等位基因 apoE4 参与 AD 的发生^[2]. β A 易于与 apoE4 结合形成细丝, apoE4 与 β A 的结合活性远大于 apoE3. APP 基因突变导致 FAD 发病的年龄为 45~60 岁, apoE4 与晚期 FAD 发病密切相关.

2 AD 发生的氧应激基础

APP、ps1 和 ps2 基因突变的共同结果是改变了 APP 的加工处理和代谢, 造成更多的长 β A 1~42/43 产生. 与短 β A 1~40 相比, β A 1~42/43 易于聚合、沉积, 毒性更大. β A 与 apoE4 结合形成细丝, 增加 β A 的沉积. 所有事实说明 β A 在脑中沉积是 AD 的关键致病事件, 能导致神经退行性病变, 最终发生老年性痴呆. 问题是这些基因突变形成的 β A 1~42/43 是如何引起聚合沉积的, 它们的毒性机理如何等等尚不清楚. 最近的研究说明随龄增加的氧应激参与了 AD 的发生.

年龄是 AD 发生的主要危险因素, 即使在具有遗传倾向的个体, 这病很少发生在 55 岁以前. 与衰老的自由基理论相一致, 氧应激也被认为参与 AD 的发生. 衰老机体的氧自由基生成增多和抗氧化防御能力降低, 使机体处于持续的应激状态, 造成细胞成分损伤, 由此导致蛋白质分子键的断裂、交链、聚合和沉积. 脂质的过氧化, 其通过链式反应使脂氧基 (LO $\cdot$)、脂过氧基 (LOO $\cdot$) 和脂氢过氧化物 (LOOH) 生成增多. 这些活性氧能连续地断裂 (scission)、分裂 (fission)、重排和氧化, 生成很多双功能羰基化合物, 其与氨基反应生成希夫氏碱, 对蛋白质进行修饰; 蛋白质也是氧自由基作用的靶, 也可受到氧自由基引发, 形成蛋白质自由基 (Pr $\cdot$)、蛋白质过氧化物 (PrOOH)^[5]. PrOOH 与脂质过氧化物一样可以被过渡金属离子催化生成蛋白质氧基 (PrO $\cdot$) 和蛋白质过氧基 (PrOO $\cdot$).

PrOOH 非常稳定, 有足够长的寿命允许其在细胞内和细胞间扩散. 因此, 这些蛋白质衍生的自由基可看作是一种新型的活性氧种.

特别值得提出的是, 蛋白质的糖化作用 (glycation) 在非糖尿病的衰老个体内也发生^[6]. 还原糖和蛋白质氨基反应生成分子能互变的希夫氏碱和 Amadori 产物, 后者能进一步降解生成各种不同的含有羰基的醛酮化合物, 这些活性化合物通过分子断裂和交链形成大分子复合物等不同的终产物称之为进展性糖化终产物 (advanced glycation end products, AGEs). 这一系列过程称 Maillard 反应, 它可受到活性氧和过渡金属的促进生成活性氧. 因此糖化作用本身就是对蛋白质的修饰, 同时能生成活性氧和羰基化合物, 引起其他蛋白质的修饰和损伤.

脑特别易于受到氧应激和活性氧损伤^[1,6], 因为神经元葡萄糖代谢率高, 与其他细胞相比, 神经元由线粒体生成 O $_2$ $\cdot^-$ 量增多. 神经元的谷胱甘肽含量较低, 以及只含有中等含量的抗氧化酶; 神经元富含对自由基敏感的多不饱和脂肪酸; 脑某些区域过渡金属含量较高.

与其他细胞蛋白质相比, 神经单纤维 (neurofilament) 和骨架蛋白如 Tau 蛋白相对半寿期较长和含有高比例的赖氨酸. 由于富含赖氨酸使它们对氧化损伤特别敏感, 易于受到脂质过氧化作用、蛋白质过氧化作用以及糖化作用生成的羰基化合物的修饰, 破坏神经元纤维的运输.

3 β A 的聚合作用与自由基

在 AD 患者脑的弥散性斑块中 β A 1~42/43 的沉积先于 β A 1~40. 在体外 β A 1~42/43 形成不溶性的聚合物快于 β A 1~40. 这是 β A 1~42/43 比 β A 1~40 具有更大毒性和致病性的原因. 合成的含有疏水区的 β A 29~39 的 β A 能缓慢地形成稳定的聚合物和伴有衰老 (放置时间的延长) 对神经元显示毒性. 但有例外, β A 25~35 的片段, 其一旦溶解立即聚合和显示最大毒性^[1,7].

蛋白质不溶性是蛋白质共价交联的结果. 体内外实验研究说明蛋白质不溶性与自由基有关^[6], 如由 NFTs 和老年斑分离的蛋白质多为多聚体; NFTs 中的 Tau 蛋白含有 AGE 修饰物; 在体外 AGE 修饰能诱导 β A 聚合, 聚合的 β A 作为种子能进一步沉积可溶性 β A; 自由基氧化 β A 能生成不溶性蛋白质聚合物. 羰基生成是蛋白质氧化的标志.

蛋白质的聚合主要是由于侧链羰基形成, 这些羰基来自精氨酸和脯氨酸的 δ 羟化和赖氨酸的 ϵ 羟化. 在形成的醛基间醛醇缩合, 或与其他赖氨酸希夫氏碱缩合, 或以上两种缩合导致分子内和分子间共价交链. 总之蛋白质聚合是由于蛋白质的氧化、AGEs 修饰和脂质过氧化生成的羰基化合物的联合作用, 协同地引起交联, 由此改变蛋白质的生物化学和物理性质.

自由基参与 β A 的聚合作用还表现在金属离子的诱导作用^[7]. 浓度大于 300 nmol/L 的 Zn (II) 能诱导 β A 聚合. 大鼠/小鼠的 β A 基因序列 (5, 10 和 13 位点) 与人不同, 大鼠 β A 1~40 即使 Zn (II) 大于 10 μ mol/L 时仍然是稳定的和可溶的. 人 β A 1~40 含有两个对 Zn (II) 亲和力不同的特异性结合位点. 而在大鼠相应的基因序列仅有一个这样的结合位点, 在体外 Fe (III) 和 Al (III) 能明显地加速 β A 聚合, Cu (II) 还能稳定 β A 二聚体. 结果显示 β A 有结合金属离子的倾向. β A 能在 H_2O_2 金属离子催化系统 (如血红蛋白和血红素) 作用下, 由可溶性分子转变为不溶性的聚合分子, 而且这种聚合作用可被自由基清除剂和游离氨基酸防止. 说明氨基酸氧化和蛋白质交链导致聚合, 因此金属催化氧化系统参与 AD 病理学改变.

4 β A 的毒性与自由基

β A 的神经毒性涉及自由基. β A_{25~35} 和 β A_{1~40} 溶液, 用 ESR 能检测到自由基的信号. 37 $^{\circ}$ C β A_{1~40} 温育 135 h 能完全降解成一系列较小的碎片, 为原来大小的 1/3^[1]. 这些自由基肽能使培养的神经元和突触活性氧含量增加^[6]. β A 能诱导 PC12 细胞或大鼠皮层神经元细胞膜分解和膜结构破坏, 抗氧化酶 CAT 有保护作用, 细胞内 H_2O_2 含量升高与 β A 神经毒性呈正相关. 结果说明 H_2O_2 是 β A 毒性的介导体, β A 能诱导转录因子 NF- κ B 活性也支持这一点^[8].

值得提出的是^[9] β A 诱导细胞氧应激涉及其与细胞表面多肽的相互作用. 内皮细胞或皮层神经元细胞经胰蛋白酶处理后, β A 的毒性效应即被抑制. 已证实 β A 致的细胞氧应激是由 AGE 受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 介导的. 用抗 RAGE IgG 或过量的可溶性 RAGE 阻止 β A 与 RAGE 结合, 能防止细胞 TBARS 生成和 NF- κ B 激活, 无关 IgG 则无抑制作用. 结果说明, β A 如同 AGEs 一样, 本身是氧化剂能生成活性氧,

同时也能通过 RAGE 触发内皮细胞或神经元细胞生成活性氧如 H_2O_2 .

β A 毒性与自由基的关系还表现在 β A 对小胶质细胞的激活^[9]. 与内皮细胞和神经原细胞一样, RAGE 也是小胶质细胞表面 β A 的重要受体. β A 触发小胶质细胞呼吸爆发, 产生活性氧和毒性细胞因子 TNF α 等, 由此加重 β A 沉积和对细胞损伤. 持久的激活成为 AD 慢性炎症的基础. β A-RAGE 相互作用, 诱导小胶质细胞沿着 β A 浓度梯度迁移, 成为老年斑周围小胶质细胞聚集的原因.

5 结 语

以上的资料说明 FAD 的发生除与 APP、ps1 和 ps2 的基因突变和 apoE 等位基因 apoE4 的参与外, 随龄的氧应激是 AD 发生发展的主要诱因. 脂质过氧化、蛋白质过氧化以及糖化作用所致的羰基化成为 β A 降解、交链和聚合沉积的原因. 蛋白质特异性结合过渡金属是引起蛋白质羰基化的又一原因. 在前面的讨论中已提及 β A 能结合 Zn (II) 和引起 β A 聚合. 更为详细的分子机制还是对 APP 蛋白的研究^[6,10]. APP 能结合 Cu (II), 并能将结合 Cu (II) 还原成 Cu (I). APP_{135~153} 为特异性结合 Cu (II) 区, APP 通过 144 和 158 位点的半胱氨酸氧化成双硫键, 提供电子使 Cu (II) 还原成 Cu (I), 显示 APP 有将电子传递给 Cu (II) 的功能. 一旦 Cu (I) 形成, 在有过氧化物存在下通过 Fenton 反应生成 $\cdot$ OH 导致蛋白质断裂. Cu (I) 的捕捉剂 Bathocuproine 和 Cu (II) 的螯合剂 DTPA 都能阻断 APP 断裂. 在分子水平上所有的氨基酸都易于受到 $\cdot$ OH 的攻击, 但精氨酸、脯氨酸和赖氨酸是优先的靶分子, 使其转变成羰基化合物. 由于修饰蛋白质易于被蛋白酶降解, 因此羰基化 APP 在发生交联和聚合前更易于被 secretase 降解加速 β A 的生成. 进一步说明氧应激能促使 AD 的发展, 并参与发病的各个阶段.

参 考 文 献

- 1 Iversen L L, Morlishire-Smith R J, Pollack S J, *et al.* The toxicity *in vitro* of β amyloid protein. *Biochem J*, 1995, **311** (Pt1): 1~6
- 2 Fai T, Hui L, Subodh N, *et al.* Transgenic mouse and chemical lesion approaches to study of Alzheimer's disease. *Chin Med J*, 1997, **110** (8): 642~647
- 3 Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Transl Neurosci*, 1997, **20** (4): 154~159
- 4 Guo Q, Sopher B L, Funckawa K, *et al.* Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cell to apoptosis induced by trophic factor

- withdrawal and amyloid β peptide: Involvement of calcium and oxyradicals. *J Neurosci*, 1997, **17** (11): 4212~4222
- 5 Gebicki J M. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox Report*, 1997, **3** (2): 99~110
- 6 Smith M A, Sayre L M, Monnier V M, *et al.* Radical aging in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 1995, **18** (4): 172~176
- 7 Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, *et al.* Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol*, 1997, **54** (5): 533~539
- 8 Behl C. Amyloid β protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res*, 1997, **290** (3): 471~480
- 9 Yan S D, Chen X, Fu J, *et al.* RAGE and amyloid β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1996, **382** (6593): 685~691
- 10 Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, *et al.* Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a site specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry*, 1998, **37** (20): 7224~7230

Alzheimer's Disease and Oxidative Stress. CHEN Yuan, ZHOU Mei (*The First Military Medical University, Research Laboratory of Free Radical Medicine, Guangzhou 510515, China*).

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder. It is the most common cause of dementia in aged population and also a main cause of death in aged people. The oxidative stress hypothesis of AD has focused on and described from four aspects: Molecular basis and oxidative stress basis of AD pathogenesis, and β amyloid aggregation and cytotoxicity related to reactive oxygen species.

Key words Alzheimer's disease, gene mutation, oxidative stress

酵母三杂交系统的应用研究进展

张浩 王全立 毛秉智¹⁾

(军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850)

摘要 介绍了酵母三杂交系统的原理、应用、前景和存在的不足。在酵母双杂交基础上发展起来的酵母三杂交系统, 将应用范围扩大到研究蛋白质-蛋白质、蛋白质-RNA、蛋白质-小分子药物间的相互作用。

关键词 酵母三杂交系统, 酵母双杂交系统, 蛋白质间相互作用

学科分类号 Q81

1 酵母三杂交系统的原理

酵母双杂交系统作为研究两种蛋白质间相互作用的技术得到了广泛的应用。SenGupta^[1]在酵母双杂交思想上提出的酵母三杂交系统, 不仅可以用来研究更为复杂的三个蛋白质间相互作用, 而且成为体内研究 RNA-蛋白质间相互作用, 小分子药物与蛋白质间相互作用的新途径。酵母三杂交系统具有比酵母双杂交系统更广泛的应用范围, 但两者在基本原理和实验操作中非常相似。酵母双杂交和酵母三杂交系统都是利用了酿酒酵母细胞的 GAL4 蛋白调节半乳糖苷酶基因转录的特点。GAL4 蛋白有两个可分离的功能区, N 端是 DNA 结合区, C 端为转录激活区。中间的一段序列的替换不影响其功能, 这为研究蛋白质间相互作用提供了可能。当 GAL4 的 DNA 结合区与 DNA 上游的激活序列 (UAS) 结合, 其转录激活区则能有效地激活 UAS 下游报告基因的转录; 当两者不能通过中间序列结

合, 任一区域都不会激活下游报告基因的转录。酵母双杂交系统将待研究的两个蛋白质, 其中之一与 DNA 结合区蛋白质构建成第一个融合蛋白, 另外一个与转录激活区的蛋白质构建成第二个融合蛋白。酵母三杂交系统是研究两个蛋白质与第三个成分间的相互作用, 按第三个成分的不同, 可以是蛋白质、RNA 或小分子药物。如果是蛋白质, 可以用 cDNA 文库或表达质粒或细胞内天然存在的蛋白质; 如果是 RNA, 要构建成可以转录成待研究 RNA 的质粒; 如果是小分子药物, 可以用化学方法进行修饰。然后使这三种成分相互作用, 通过观察下游报告基因的转录情况, 判断这三者间是否存在相互作用。三杂交系统需要满足以下条件: a. 第 1、2 个融合蛋白必须通过与成分 3 的结合, 间接起到激活报道基因转录的作用, 两者间没有直接作用, 不能直接激活报告基因的转录; b. 成分 3

¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850.

收稿日期: 1998-10-23, 修回日期: 1999-02-15