

structure, with a region homologous to a tRNA, a middle tRNA-unrelated region, and a terminal AT-rich region. Each SINE contains an internal promoter for RNA polymerase III and lacks open reading frames. "Master source gene model", "multiple source gene model", "transposon model (parasitism model)", and "horizontal transfer model" have been postulated to explain the origin and evolution of

SINEs. The observation of their molecular phylogeny was made with examples of salmon, whales and artiodactyls, hominoid primates, and western Palearctic water frogs. Their application to genetic profiles and antitumor technique was also introduced.

Key words Short Interspersed Elements (SINE), tRNA, retroposon, retroposition, evolution, phylogeny

G 蛋白在细胞机械感受机制中的作用*

冯 兵 王德文 何作云¹⁾

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 机械刺激对生物器官、细胞的生理活动具有重要的影响。虽然生物细胞对各种机械作用具有各自不同的反应形式, 但大多具有类似的机械感受机制, 即首先由细胞膜、整合素-细胞骨架感受, 在激活 G 蛋白等信号分子后, 进一步引起生理、病理反应。因此, G 蛋白可能是完成机械能向化学能转化的关键环节。

关键词 机械受体, 信号传导, 心肌细胞, 血管内皮细胞

学科分类号 R339.17, Q689

大量研究发现包括器官运动 (如肢体运动、心搏、血液循环)、细胞间粘附以及细胞内的应力等不同性质、不同程度、不同持续时间的机械刺激在器官/细胞发育、分化以及生长适应过程中均有着重要的生理、病理作用^[1]。近年来, 对于多种类型细胞 (主要是心肌细胞、血管内皮细胞) 受到机械刺激后的细胞内信号分子及生理、病理效应有了比较清晰的认识, 但是由于技术水平及手段的限制, 对细胞初始机械感受机制了解不多^[1,2]。已有实验提示 G 蛋白是心肌细胞和内皮细胞等机械刺激初始反应中的重要环节^[2~4], 鉴于 G 蛋白在受体介导的信号传导机制中处于调控中枢地位, 因此, 阐明 G 蛋白在细胞机械刺激感受中的作用可能是寻找机械感受受体的一条途径。本文重点概述 G 蛋白在心肌细胞和血管内皮细胞机械感受机制中的作用。

1 细胞信号跨膜转导机制研究概况

细胞外信号主要包括细胞外的物理、化学信号以及细胞自身生物大分子的结构信号, 后者包括蛋白质的形状和构象、寡糖链与膜蛋白、膜脂相连而成的天线结构等。

对于细胞外化学信号跨膜转导的认识已比较清楚, 即: 细胞外信号-细胞膜受体-G 蛋白 (或非 G 蛋白)-细胞内第二信使, 受体是刺激-反应偶联信号跨膜通路中的关键部分。

至今, 对于细胞外物理信号, 尤其是机械信号的感受和跨膜传导机制了解甚少。Ingber 等^[5]提出了一个细胞机械刺激信号传递模型, 模型的基础是细胞骨架网络构成的刚性结构和力学作用的转导 (transduction), 而非传递 (transmission, 即化学信号的移位和级联反应), 力学转导的终极点必须能将机械能转化为化学能。与化学信号跨膜转导模型一样, 它们都强调 G 蛋白的作用。大 G 蛋白通过对其亚基上氨基酸残基的脂化修饰作用而锚定在细胞膜上, 从而为其接受细胞膜结构信号提供了结构基础。而小 G 蛋白也可通过细胞外基质-整合素-细胞骨架接受细胞外机械信号, 如 Rab、Arf、Sar 与细胞内蛋白质和囊泡转运有关, Ras 在介导 MAPK 磷酸化级联反应方面发挥关键作用, 而

* 国家自然科学基金资助项目 (39600041)。

¹⁾ 第三军医大学新桥医院心内科, 重庆 400037

Tel: (010) 66931236, E-mail: fengxb12@yahoo.com

收稿日期: 1999-08-27, 修回日期: 1999-12-24

Rho 亚家族负责调节细胞骨架功能 (包括细胞骨架解聚、异位重组形成新的力学形式等)。近年来, 已有很多研究结果提示, 大 G 蛋白和小 G 蛋白是细胞机械刺激反应机制中的重要环节^[3, 4]。

2 G 蛋白与细胞膜的相互作用

血管内皮细胞处于血管腔面, 流动切应力可直接作用于细胞膜上, 因此细胞膜可能起到机械信号感受和转导器的作用。从结构上分析, 内皮细胞膜表面丰富的糖蛋白本身即可作为机械受体发挥作用, 其一端是伸入细胞外长长的分枝寡糖链, 另一端是细胞膜内与信号分子连接的蛋白质构象。切应力可通过改变细胞膜糖链构象, 或改变细胞膜表面电荷分布, 或是改变细胞膜自身的物理性质如流动性、僵硬性、膜扭曲力, 或是改变膜蛋白的存在形式如簇集、构象改变等, 都可能活化与细胞膜连接的 G 蛋白, 进而引起细胞内效应。

Frangos 等^[6]发现, 不管是单纯层流还是脉动流, 都可迅速引起 G 蛋白活化 (< 1 s)。提取细胞膜囊泡在锥板粘度计中作 7.5 N/m^2 的切应力刺激, 也可使 42 ku 蛋白迅速活化, 说明单纯细胞膜 (脂质双层) 即可作为机械受体感受切应力刺激并通过 G 蛋白向细胞内转导^[7]。流动切应力可直接改变细胞膜物理性质, 如 Berthiaume^[8]发现, 切应力可增加细胞膜通透性, 也即是增加了细胞膜流动性, 向囊泡脂质中加入溶血磷脂酰胆碱 (30%) 或用苯甲基乙醇 (40 mmol/L) 处理, 以增加脂质双层膜流动性, 可升高 G 蛋白基础活性 3~5 倍, 而用半琥珀酸胆固醇处理脂质囊泡则使 G 蛋白基础活性降低 4 倍, 并且抑制切应力诱导的 G 蛋白活化^[9]。应用重组脂质囊泡 (PE/PS = 6:4) 的方法发现, 3.0 N/m^2 以内的切应力即可刺激组装于囊泡膜内的 G 蛋白活化, 并且与 G 蛋白组装含量呈剂量依赖性^[7]。有时膜脂对于膜蛋白发挥生理功能可能是不可缺少的。例如, 在缺少胆固醇时, 尼古丁乙酰胆碱受体不能被激动剂活化, 猜测胆固醇和膜蛋白相互作用可能发生在三个区域即脂质双层、蛋白质自身位点及脂质-蛋白质界面, 最后证实胆固醇作用位点在后两者^[10]。可见脂质微环境在切应力诱导 G 蛋白活化的过程中具有重要调控作用, 同时提示在没有任何蛋白质受体的情况下, 膜脂质流动性和脂质-蛋白质界面相互作用显著影响着膜相关蛋白质的功能, 切应力可能就是通过增加膜质流动性来使 G 蛋白活化的, 更进一步可以说

明细胞膜脂质可能充当机械受体作用。

心肌细胞与血管内皮细胞不同, 它受到的机械作用是室壁应力即牵张刺激, 最主要的机械刺激感受点应该是闰盘或细胞骨架-整合素与细胞外间质的结合点 (粘着斑), 当然不排除对细胞膜的直接挤压作用。有意思的是, 细胞骨架成分 α -辅肌动蛋白 (α -actinin) 和粘着斑蛋白两者均为 PIP2 结合蛋白, 且这类脂质集中于局部粘附点, 这进一步说明细胞膜在心肌细胞机械感受机制中可能也发挥重要作用。另外也很难分清机械刺激是对细胞膜直接作用还是作用于粘着斑, 因此, 要分离出明确的机械感受受体其难度是可想而知的。

3 G 蛋白与整合素-细胞骨架间结构关系

高等生物各类器官均由多细胞组成, 它们不仅排列构筑有序, 而且细胞与细胞之间, 细胞与细胞外间质之间均有特异的连接结构, 从而组合成一个功能合胞体, 依赖细胞自身的骨架系统及其与细胞内各成分、各部位的相互作用产生一个稳定的细胞内张力状态, 细胞才能维持特定的细胞形态和排列。外界环境中的机械作用也必须通过改变这种刚性结构, 引起细胞内各种分子扭曲力平衡的破坏和重建, 在这一破坏和重建的过程中将机械能转化为化学能和新的机械能储存形式。G 蛋白正是在这种能量转换过程中被活化, 发挥化学信号转导作用的。

现已基本明确, 细胞外间质、整合素、局部粘着蛋白和细胞骨架网络相互联系, 构成了一个完善的张力整合系统^[5]。例如整合素的 α 、 β 链均为穿膜蛋白, 每条链两端均有大的细胞膜外 N 端结构域和一胞浆短肽, 胞浆短肽通过一系列的连接蛋白, 如踝蛋白 (talin)、粘着斑蛋白 (vinculin)、聚集粘附激酶 (FAK) 等与细胞肌动蛋白相互作用, 另外含 SH2 和 SH3 结构域的 Src 家族不仅可与上述 FAK 结合, 还与骨架蛋白复合物中富含脯氨酸序列的桩蛋白 (paxillin) 结合。这些复合物又通过生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2)、鸟苷酸释放蛋白 (SOS) 与小 G 蛋白 Ras 家族相互作用。小 G 蛋白 Rho 家族包括 Rho、Rac、Cdc42 三个亚家族, 它们不仅与局部粘附位点和张力纤维形成有关, 还与整合素介导的细胞内信号活化 (如 ERKs 等) 有关。上述网络从结构上保证了细胞一旦受到机械力刺激即可迅速发生反应, 把机械能转化为细胞内化学能。

最近研究表明, 上述网络不仅与小 G 蛋白相联系, 还与大 G 蛋白相互作用, 说明细胞表面粘着位点是一个功能强大的信号整合点. 另外已知微管蛋白 β 亚基具有 GTP 酶活性, 并且微管蛋白二聚体能与 G 蛋白 α 亚基结合形成复合物. 在神经细胞上研究表明, 微管蛋白二聚体通过与质膜上异三聚体 G 蛋白结合而将 GTP 分子传递给后者而使其活化. 由于不同 G 蛋白之间也观察到此类复合物的形成以及 GTP 分子的转移, 从而有人认为微管蛋白二聚化后构象改变而使其 GTP 结合位点激活, GTP 从微管蛋白 β 上转移到异三聚体 G 蛋白上, 以此完成外界信号的跨膜传递. 当然, 大 G 蛋白也与小 G 蛋白 (如 Ras) 在功能上相联系.

4 G 蛋白与整合素-细胞骨架的相互作用

过去认为, 整合素仅是细胞粘附的连接分子. 近来研究表明, 整合素可能是一类重要的双向信号分子. 牵张刺激培养于涂有细胞外基质如 I 型胶原、纤维连接蛋白等的硅酮膜上的心肌细胞, 可快速活化细胞内酪氨酸蛋白激酶 (Src、FAK 等), 进而激活 Ras、Rho 等第二信号系统, 引起立早基因和肥大基因相继表达^[11]. 有实验甚至提示^[11], $\beta 1$ 整合素与 $\alpha 1$ 受体途径介导的心肌细胞肥大反应信号传递有关, 并认为在 $\alpha 1$ 肾上腺素能受体刺激心肌肥大信号通路中, G_{aq} 与 Ras、Rho 相互调节^[12].

至今, 关于机械刺激对 G 蛋白功能直接调控作用的研究尚少见报道, 但已有大量的间接证据. 例如, 最早发现的流体切应力刺激内皮细胞磷脂酶 C 活化, IP_3 和 DAG 浓度升高以及后续的 Ca^{2+} 、PKC 变化, 最终阐明是由 G 蛋白介导的^[13], 因为 Dassouli 首先发现百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 可抑制牵张刺激引起的磷脂酰肌醇的代谢, 提示机械刺激可使 G 蛋白活化. 很多切应力诱导的效应分子如 PGI_2 、磷脂酸、花生四烯酸的释放, 甚至切应力诱导的内皮细胞自分泌生长因子如内皮素、血管紧张素 II、NO 等, 也是 G 蛋白途径依赖的^[3, 13]. 在牵张刺激心肌细胞肥大实验中发现, 转染负显 (negative-dominant) 的 Rho 及用 C3 转移酶预处理, 可显著抑制牵张刺激诱导的 ERK 活化及心肌细胞肥大基因表达, 但不能抑制 Ang II 刺激的心肌细胞肥大, 若用 C3 转移酶预处理心肌细胞, 它们再施以牵张刺激, 其条件培养基刺激心肌细胞肥大活性可被完全抑制^[3]. 提示 G 蛋白不仅

直接介导牵张刺激心肌细胞肥大反应, 还介导了牵张刺激诱导的心肌细胞自分泌功能.

应用低渗肿胀的方法牵张刺激心肌细胞, 可抑制异丙肾上腺素升高 cAMP 的刺激作用, 并且证实, 这种抑制作用是由 G_i 蛋白介导的. 用微管负压吸引牵张心肌细胞, 可刺激乙酰胆碱受体相关钾通道开放, 提示虽无配体结合, 牵张也可刺激受体的基础活性, 而且研究证实, 这种刺激是由 G 蛋白细胞骨架所介导^[13].

对培养成骨细胞施加流体切应力时, 首先可引起肌动蛋白参与的张力纤维的重组. $\beta 1$ 整合素和 α -辅肌动蛋白向局部粘着点的簇聚, 其后出现环氧酶和 c-fos 等的表达^[14]. 若用细胞松弛素 D 处理, 或转染表达负显小 G 蛋白 Rho, 或微注射 α -辅肌动蛋白的蛋白质水解片段, 去抑制 α -辅肌动蛋白介导的肌动蛋白微丝与整合素锚定, 都可抑制切应力刺激的上述基因表达^[15]. 有人应用 Rho 的特异抑制剂 C3 转移酶进一步研究表明, 细胞膜上小 G 蛋白的作用环节主要在介导张力纤维重组和粘着点聚集上. 另外实验发现, 化学刺激如血清、溶血磷脂酸引起的肌动蛋白张力纤维和粘着点装配也都是由 Rho 介导的. 若使微管解聚可直接活化 Rho, 进而介导粘着点簇聚、DNA 合成的后续反应.

对于不同强度、不同性质的机械刺激, 或者是对于不同的细胞类型施以机械刺激, 其生理、病理反应并不完全一致. 对培养的心肌成纤维细胞施以 12 Hz、3% 牵张或 6 Hz、6% 牵张时, 牵张率 (strain rate) 为 1.2%/s, 可刺激 G 蛋白活化, 而施以 6 Hz、3% 牵张时, 牵张率为 0.6%/s, 不能刺激 G 蛋白活化. 用 6% 牵张, 每次为 10 s 或 60 s (牵张率分别为 1.2%/s、0.2%/s), 仅见前者可刺激 G_{aq} 和 G_{il} 活化, 说明 DNA 合成的能力呈压力大小依赖性 (18665.08~26664.4 Pa), 且与 G 蛋白-ERK、JNK 信号活化有关, 而小于 15998.64 Pa 的压力不能刺激 DNA 合成^[16]. 在内皮细胞、平滑肌细胞共培养模型中, 仅有高切应力刺激可活化内皮细胞 G_i 蛋白, 并诱导 G_i 蛋白基因表达, 相反, 仅有高切应力可抑制平滑肌细胞 G_i 活性及 G 蛋白表达, 并且, 平滑肌细胞改变与内皮细胞的环氧酶活化产物如 PGE2 有关^[17]. 为此, Sugden 等^[5, 18] 提出了一个细胞 (以内皮细胞、心肌细胞为主) 机械刺激信号传导模型, 首先, 机械作用通过细胞膜、整合素-细胞骨架等途径刺激 G 蛋白 (包括小 G 蛋白) 活化; 进而通过 G 蛋白-PLC- IP_3 、DG- Ca^{2+} 、

PKC-基因表达, 或 G 蛋白-MAPK-诱导基因表达, 最后的反应 (或称长时程变化) 是通过酪氨酸激酶整合调节的。

参 考 文 献

- 1 Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**: 551~ 571
- 2 Davies P F, Barbee K A, Depaula N, *et al.* Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**: 527~ 550
- 3 Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, *et al.* Rho family small G proteins play critical roles in mechanical stress-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Circ Res*, 1999, **84** (4): 458~ 466
- 4 Akhter S A, Luttrell L M, Rockman H A, *et al.* Targeting the receptor-Gq interface to inhibit *in vivo* pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, 1998, **280** (5365): 574~ 577
- 5 Ingber D E. Tensegrity the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol*, 1997, **59**: 575~ 599
- 6 Gudi S R P, Nolan J P, Frangos J A. Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (5): 2515~ 2519
- 7 Gudi S R P, Clark C B, Frangos J A. Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells: involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res*, 1996, **79** (4): 834~ 839
- 8 Berthiaume F, Frangos J A. Fluid flow increases membrane permeability to merocyanine 540 in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1191** (1): 209~ 218
- 9 Mitchell D C, Lawrence J T R, Litman B J. Primary alcohols modulate the activation of the G protein-coupled receptor rhodopsin by lipid-mediated mechanism. *J Biol Chem*, 1996, **271** (32): 19033~ 19036
- 10 Addona G H, Sandermann H Jr, Kloczewiak M A, *et al.* Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor? *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1370** (2): 299~ 309
- 11 Ross R S, Pham C, Shai S Y, *et al.* $\beta 1$ integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*, 1998, **82** (10): 1160~ 1172
- 12 Sah V P, Hoshijima M, Chien K R, *et al.* Rho is required for G_{aq} and α -adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes: dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem*, 1996, **271** (49): 31185~ 31190
- 13 Cazorla O, Pascarel C, Brette F. Modulation of ion channels and membrane receptors activities by mechanical interventions in cardiomyocytes: possible mechanisms for mechanosensitivity. *Prog Biophys Mol Biol*, 1998, **71** (1): 29~ 58
- 14 Pavalko F M, Chen N X, Turner C H, *et al.* Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton integrin interactions. *Am J Physiol*, 1998, **275** (6 Pt 1): C1591~ 1601
- 15 Liu B P, Chrzanowska W M, Burridge K. Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP binding protein Rho. *Cell Adhes Commun*, 1998, **5** (4): 249~ 255
- 16 Ozaki T, Iizuka K, Suzuki M, *et al.* Threshold-dependent DNA synthesis by pure pressure in human aortic smooth muscle cells: G_{i2} -dependent and -independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **256** (1): 212~ 217
- 17 Rodmond E M, Cahill P A, Sitzmann J V. Flow-mediated regulation of G protein expression in coculture vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (1): 75~ 83
- 18 Sugden P H. Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin? *Circ Res*, 1999, **84** (6): 633~ 646

Role of G Protein in the Mechanism of Cell Mechanosense. FENG Bing, WANG De-Wen, HE Zuo-Yun (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*).

Abstract The physiological activities of organ and cell are affected significantly by mechanical stimulation. Although cells have different responses to each kind of mechanical stimulus, the mechanism of mechanosense are almost similar. First, the mechanical stimulus was sensed by cell membrane or integrin-cytoskeleton, then G protein and other signal molecules were activated, and finally some physiological or pathological effects were caused. So G protein may play a central role in the process of mechanical energy transforming to chemical energy.

Key words mechanoreceptor, signal transduction, cardiomyocyte, endothelial cell