

近年各国工作者所取得的测定结果可见表1。

也有的作者只获得与 Cercek 部分相同或完全不同的结果。譬如 Preece<sup>[9,10]</sup> 等的实验结果表明健康者与肿瘤患者外周血淋巴细胞对 PHA 和 CaBP 的反应无差别,而发现荧光素从细胞中的漏出率和 FDA 的酶解率变化在这两者呈明显不同。这些观察都有待于今后进一步探讨。

## 2. 细胞表面移植抗原识别的检测

由于估计了 SCM 反应可能和淋巴细胞活化有关,本文作者<sup>[14]</sup>试以小鼠脾淋巴细胞作为主要材料,将 SCM 测定用于移植免疫学的 MHC (Major Histocompatibility Complex) 配型方面,取得一定进展。

不同个体淋巴细胞表面组织相容性抗原的识别,以往只能借助于淋巴细胞活化后期 DNA 合成增高的原理,用同位素标记的 DNA 合成前体掺入这一方法来测知。实验费时较长,干扰也多。而测定细胞识别早期的生物物理状态改变即 SCM 测定方法,实验只需几小时,结果也较稳定可靠。我们以  $RR_{SCM} = \frac{P_{\text{实验}}}{P_{\text{对照}}}$  表示其反应差异,则两细胞来自同品系时(即组织相容时)  $RR_{SCM} > 0.95$ , 两细胞来自不同品系时(即组织不相容时)为 0.7—0.8 之间。此结果与传统同位素方法平行。

除此以外, SCM 方法在激素敏感细胞及

细胞免疫功能的检测方面预计可得到成功的应用。

SCM 概念的提出至今尚不足十年,各方面工作都做得不够充分。由于 SCM 测定技术上的困难,成功地重复这一实验的作者还不很多。今后如能建立起精确可靠的 SCM 试验方法,则为医学临床应用和淋巴细胞活化的分子生物学水平机理等理论研究提供了一个新的途径。

## 参 考 文 献

- [1] Rotman, B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 134, 1966.
- [2] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **10**, 187, 1974.
- [3] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **9**, 105, 1973.
- [4] Cercek, L. et al.: *Biophysik*, **2**, 109, 1973.
- [5] Cercek, L., et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **21**, 445, 1972.
- [6] Cercek, L. et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **22**, 539, 1972.
- [7] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, **29**, 345, 1974.
- [8] Hashimoto, Y. et al.: *Br. J. Cancer*, **40**, 156, 1979.
- [9] Preece, A. W. et al.: *Br. J. Cancer*, **38**, 197, 1978.
- [10] Balding, P. et al.: *Br. J. Cancer*, **14**, 73, 1980.
- [11] Blakeslee, D.: *JNCL*, **23**, 325, 1979.
- [12] Cercek, L. et al.: *Biophys. J.*, **23**, 403, 1979.
- [13] Cercek, L. et al.: *Eur. J. Cancer*, **13**, 903, 1977.
- [14] 张人德: 研究生论文,上海第二医学院,1982.
- [15] RJASAETER, H. et al.: *Br. J. Cancer*, **40**, 628, 1979.
- [16] Cercek, L. et al.: *Immunology*, **29**, 885, 1975.
- [17] Cercek, L. et al.: *Eur. J. Cancer*, **17**, 167, 1981.
- [18] Cercek, L. et al.: *Br. J. Cancer*, **33**, 539, 1976.

[本文于1982年12月1日收到]

# 钙离子活化的磷脂依存性蛋白质磷酸化酶

于秉治

西塚泰美

(中国医科大学生化组)

(日本神户大学医学部第二生化)

多种多样的细胞机能,适应性及分化等现象均受激素或神经介质等生理活性物质所调节。其机理的研究从来就是生物学研究的主要课题。自发现了 cAMP 后,使人们产生了一种激素的作用原理似乎已完全清楚了的想

而 20 多年的研究表明  $Ca^{2+}$  也是激素及神经作用的机能调节上的一个不可缺少的物质。

我们在研究 cAMP 及 cGMP 所调节的蛋白质磷酸化酶的过程中偶然发现了一种新的蛋白质磷酸化酶(简称 C-激酶)。此酶的活化与

细胞膜的肌醇磷脂代谢有关, 同时与一直不清楚的乙酰胆碱 (蕈毒碱作用)、儿茶酚胺 ( $\alpha$  作用)、肽激素等生理活性物质的受体机制直接相关。这一新的受体机制是: 在接受外界刺激后, 细胞膜上的肌醇磷脂首先选择性地被水解, 产生甘油二酯, 它与 cAMP 一样起着第二信使的作用, 可使 C-激酶活化, 进而使外界信息的作用得以发挥。如图 1。

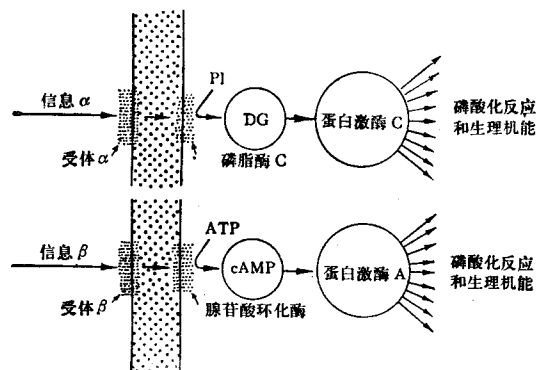


图 1 膜的受体机构

PI: 磷脂酰肌醇 DG: 甘油二酯

本文将概述这一新的蛋白质磷酸化酶-C 激酶的有关性质以及与机体细胞膜受体间的关系等。

### 一、C-激酶的活化机制

在通常状态下, C-激酶是以无活性型的形式存在于细胞的可溶性部分, 可用含 EGTA 的等渗溶液提取。从大白鼠脑<sup>[1]</sup>、各种平滑肌及血小板中用二乙氨基纤维素、凝胶过滤、等电聚焦等方法可使该酶部分纯化。最近又从大白鼠脑中完全提纯。这些从各类组织中得到的 C-激酶显示同样的性质, 至少在动力学性质方面无组织及种属特异性。如表 1 所示其沉降系数为 5.1S, 以此推算分子量约为  $7.9 \times 10^4$ 。从结构上来看目前还未发现有亚基, 且不含有 CDR (Calmoduline、 $\text{Ca}^{++}$  结合蛋白)。在蛋白质磷酸化反应中的磷酸只可从 ATP 获得, GTP 无效, 其它性质详见表 1。

C-激酶的活性可用小牛胸腺  $\text{H}_1$  组蛋白为基质, 测定从 ATP 获得的放射性磷酸来表示。

它在无膜及  $\text{Ca}^{++}$  存在时为无活性型, cAMP、cGMP 都不能使它活化。最初, 曾被认为它是一

表 1 C-激酶的性质<sup>[2]</sup>

| 性 质                    |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| 分子量                    | $7.7 \times 10^4$             |
| 沉降系数                   | 5.1S                          |
| Stoke 氏半径              | 42 Å                          |
| 等电点                    | pH5.6                         |
| ATP 的 km 值             | $6.6 \times 10^{-6} \text{M}$ |
| $\text{H}_1$ 组蛋白的 km 值 | 30 $\mu\text{g/ml}$           |
| 最适 pH                  | 7.5—8.0                       |
| 最适 $\text{Mg}^{2+}$    | 5—10mM                        |

种受  $\text{Ca}^{++}$  依存性蛋白酶有限分解而不可逆活化的一种酶元。后来发现, 即使不受蛋白酶水解, 只要有  $\text{Ca}^{++}$  存在, 便可与脑的轴突膜或红细胞膜可逆地结合, 可逆地活化。随后又发现促使此酶活化的成分是膜质中的磷脂及甘油二酯<sup>[3]</sup>, 这一活化机制可概括如图 2。

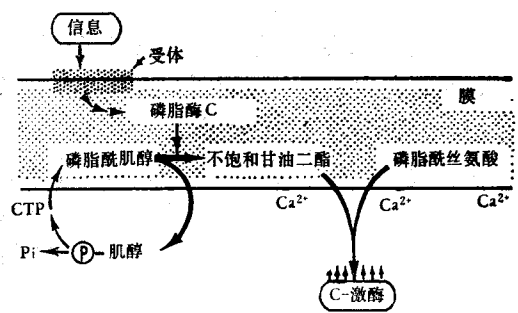


图 2 肌醇磷脂代谢与 C-激酶活化

图 3 表明典型的动力学分析的结果。横轴是  $\text{Ca}^{++}$  浓度的对数值。纵轴为酶的活性。在只有磷脂存在时(磷脂酰丝氨酸)其活化需要高浓度的  $\text{Ca}^{++}$ , 然而生理状态下的  $\text{Ca}^{++}$  浓度是很低的 ( $10^{-6}\text{M}$ — $10^{-5}\text{M}$ ), 因而在通常状态下是无活性型的。但在有少量甘油二酯时, 反应速度显著增加, 达到最大活性所需的  $\text{Ca}^{++}$  浓度却明显减少, 如只有甘油二酯存在则无效。就二价金属而言, 只  $\text{Ca}^{++}$  有效, 而  $\text{Sr}^{2+}$  的有效率仅为  $\text{Ca}^{++}$  的 10%。对于在只有磷脂酰丝氨酸和含不饱和脂肪酸的甘油二酯时,  $\text{Ca}^{++}$  的  $\text{K}_a$  值(指达到最大活性一半时所需  $\text{Ca}^{++}$  的浓

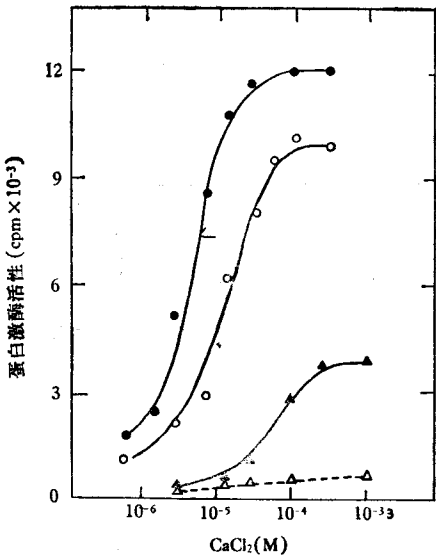


图3 C-激酶的活化机制<sup>[3]</sup>

- 在磷脂存在下, 加甘油二酯 0.8 $\mu$ g/ml
- 在磷脂存在下, 加甘油二酯 0.4 $\mu$ g/ml
- ▲-▲ 只加磷脂 16 $\mu$ g/ml
- △-△ 只加甘油二酯 0.8 $\mu$ g/ml

度)可降至 $10^{-6}M$ 。而且在细胞膜中这种磷脂很多,因而在生理状态下只要有少量的甘油二酯存在,即使 $Ca^{++}$ 的浓度不增加,原来与膜相结合的少量 $Ca^{++}$ 也可使其活化。又因为甘油二酯只有在细胞膜接受外界刺激时才能产生,所以对C-激酶的活化而言,可称之为第二信使。

在促使C-激酶的活化中,各种中性脂质中含不饱和脂肪酸的甘油二酯是极特异的。实验证明: 含不饱和脂肪酸的甘油二酯都有效,而含饱和脂肪酸的则无效。其中甘油二酯的1位或2位中只要有一个是不饱和脂肪酸便可充分发挥其作用,却与另一个位置上的脂肪酸的性质或碳链的长短无关<sup>[4]</sup>,详见表2。酶的动力学分析表明这种甘油二酯可增加酶对 $Ca^{++}$ 的亲合力,图4中虽只表示了甘油二酯的这一作用,但实验证明其它如甘油一酯或甘油三酯、游离脂肪酸都无效。

表3表示C-激酶活化所需磷脂的特异性。在生理状态的 $Ca^{++}$ 存在下磷脂酰丝氨酸最有效,其它无效。但如图5所示,如磷脂酰丝氨酸

表2 各种脂类对C-激酶活性的影响<sup>[2]</sup>

| 加入脂质           | C-激酶活性* (cpm) |
|----------------|---------------|
| 甘油二酯           | 17,390        |
| 甘油二亚油酸酯        | 16,800        |
| 甘油 1-硬脂酸-2-油酸酯 | 16,750        |
| 甘油 2-硬脂酸-1-油酸酯 | 15,760        |
| 二硬脂酸酯          | 4,180         |
| 油酸             | 3,850         |
| 甘油-油酸酯         | 3,670         |
| 甘油三油酸酯         | 3,480         |
| 胆固醇            | 3,680         |
| 空白             | 3,520         |

\* 酶活性是在  $2 \times 10^{-6}M$   $CaCl_2$  丝氨酸磷脂 10 $\mu$ g, 脂质为 0.2 $\mu$ g 的条件下测定的

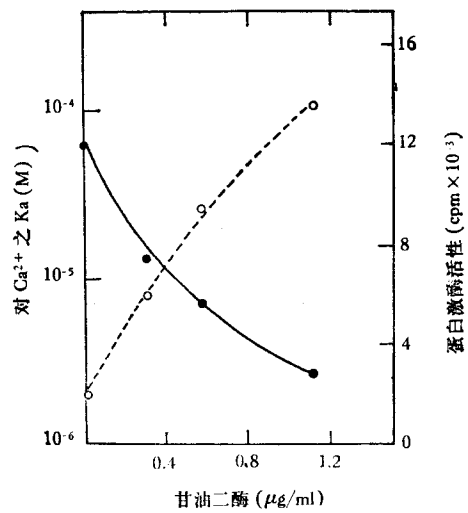


图4 甘油二酯与C-激酶活化

○-○: 酶活性; ●-●:  $K_a$

表3 各种磷脂对酶活性的影响

| 各种磷脂   | C-激酶活性* (cpm) |
|--------|---------------|
| 磷脂酰丝氨酸 | 14,070        |
| 肌醇磷脂   | 1,900         |
| 磷脂酰乙醇胺 | 1,960         |
| 磷脂酸    | 1,760         |
| 神经磷脂   | 680           |
| 卵磷脂    | 670           |
| 空白     | 720           |

\* 酶活性测定的条件是<sup>[2]</sup>  $CaCl_2$ :  $2 \times 10^{-6}M$ , 甘油二酯: 0.2 $\mu$ g, 各种磷脂: 4 $\mu$ g。

与磷脂酰乙醇胺同时存在时,酶的活性进一步增加,相反卵磷脂、神经磷脂却能降低酶的活

性,肌醇磷脂、磷脂酸对酶的活性无影响<sup>[5]</sup>。目前已清楚,在红细胞及血小板中卵磷脂和神经磷脂的大部分是存在于膜的脂质双层的外层<sup>[6]</sup>,可以认为这种在脂质双层中的各种磷脂质的非对称性分布对 C-激酶的活化是非常有利的。尽管这种现象在其它细胞中到底如何还有待研究,但上述结果可提示,在 C-激酶的活化中各种脂质是相互协同,相互竞争地发挥其生理作用的。

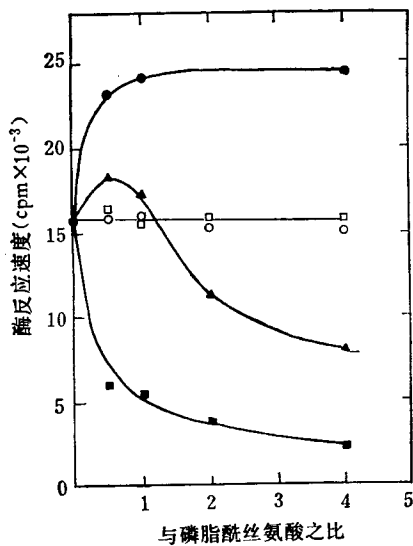


图5 C-激酶活化中各种磷脂的作用<sup>[5]</sup>

- PE (磷脂酰乙醇胺); □—□ PA (磷脂酸);
- PI (肌醇磷脂); ▲—▲ PC (卵磷脂);
- SM (鞘磷脂)。

## 二、C-激酶的可逆性活化与抑制剂

被活化的 C-激酶可用加 EGTA 除去  $\text{Ca}^{++}$  而使其失活,并与膜分离而成为无活性的可溶型。这种可逆的变化对酶本身的活性并无损失。此外, C-激酶与膜的结合并不意味着酶的活化。例如,在有几种可与膜的磷脂质相结合的,局麻药物等存在时, C-激酶虽然也可与膜结合,但如图 6 所示其催化活性明显地抑制<sup>[7]</sup>。这是因为这些药物可与磷脂结合竞争性地抑制 C-激酶的活性,如丁卡因、氯丙嗪、地布卡因等。值得注意的是这些药物不仅作用于神经细胞,与神经细胞的磷脂相结合,而且对淋

巴球、多核白血球等许多细胞的 C-激酶活性也有影响<sup>[8]</sup>。但对于 cAMP 依存性蛋白激酶 (A-激酶)、cGMP 依存性蛋白激酶 (G-激酶)却毫无影响。

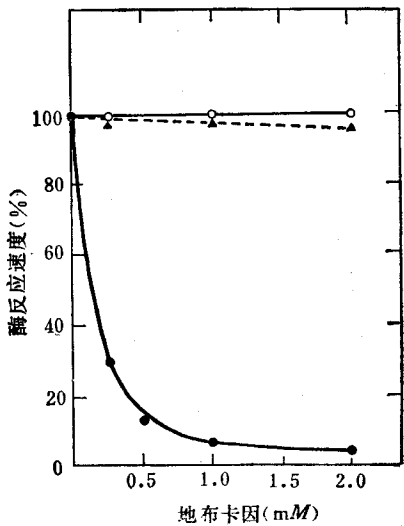


图6 地布卡因对激酶活性的影响

- : G-激酶; ▲—▲: A-激酶; ●—● C-激酶

## 三、C-激酶的另一活化机制

如果用  $\text{Ca}^{++}$  依存性蛋白酶分解,在没有  $\text{Ca}^{++}$ 、磷脂、甘油二酯的存在下, C-激酶也能迅速表现它的酶促活性,也就是说可受有限分解而活化。通过 Sephadex 柱可得到分子量较 C-激酶为小的片段 (分子量 51,000) 用胰蛋白酶代替上述蛋白酶也可得到同样的片段,此时如继续用蛋白酶水解则将迅速失活。

$\text{Ca}^{++}$  依存性蛋白酶广泛地分布于各种组织及脏器的可溶性部分。这种蛋白酶显示广泛的底物特异性,肌肉磷酸化酶激酶,糖元合成酶都可受有限分解分别生成活化型,不活化型。因为这种酶要在  $10^{-3}\text{M}$  这样高浓度的  $\text{Ca}^{++}$  存在下才能发挥作用,所以有关其生理意义一直不清。最近 Mellgren 发现了一种新的可在  $10^{-5}\text{M}$   $\text{Ca}^{++}$  存在下发挥作用的蛋白酶,它也可使 C-激酶水解、活化。图 7 为两种蛋白酶的活性比较。这种受有限分解而活化的 C-激酶的生理意义也还不清楚。也许在许多不可逆的生命现象

中,如消化、分泌、乳汁分泌、增殖等过程中起着某种作用。

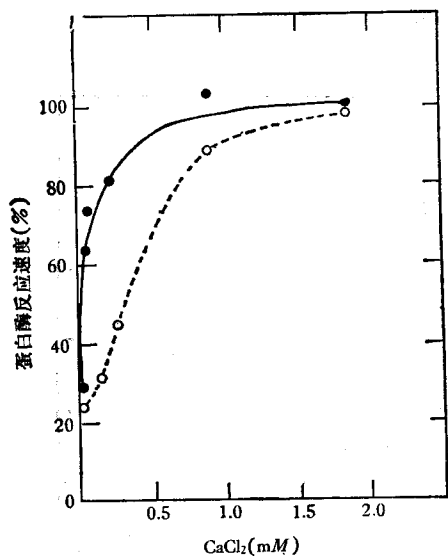


图 7 两种蛋白酶活性比较

●—●  $\text{Ca}^{2+}$ -蛋白酶 I ( $K_a = 4 \times 10^{-5} M$ )  
○---○  $\text{Ca}^{2+}$ -蛋白酶 II ( $K_a = 5 \times 10^{-4} M$ )

### 四、C-激酶在细胞活化中的作用

血小板受凝血酶作用后可引起凝集反应及 5-羟色胺的释放反应。这样活化反应与细胞对激素的反应极相似,因此血小板成了多种研究的对象。在血小板的活化现象中值得注意的是伴有分子量大约 40,000(40K 蛋白质)和 20,000(20K 蛋白质)的磷酸化反应,即凝血酶可特异地使此二蛋白质磷酸化,现已清楚 20K 蛋白质是肌球蛋白轻链,CDR 依存性肌球蛋白轻链激酶与此反应有关。而 40K 蛋白质的磷酸化反应与 5-羟色胺的释放密切相关。两反应通常可同时观察到<sup>[9]</sup>。然而,有关 40K 蛋白质如何磷酸化的机制过去一直不清。Rittenhouse-Simmons<sup>[10]</sup> 最近报告在血小板被活化时可迅速生成甘油二酯,它能立即使 40K 蛋白质磷酸化并引起 5-羟色胺的释放反应,随后甘油二酯却迅速消失,这是因为甘油二酯经肌醇磷脂代谢路又合成了肌醇磷脂,或分解成花生四烯酸(图 8)。甘油二酯的生成、5-羟色胺的释放及 40K 蛋白质的磷酸化,三者是同时进行的,这提示由

凝血酶引起的甘油二酯的生成反应是起着极重要的作用。图 9 的实验证明这一点。利用磷脂酶 C 人为地使血小板生成甘油二酯,与凝血酶一样,可平行看到甘油二酯的生成、40K 蛋白质的磷酸化和 5-羟色胺的释放。

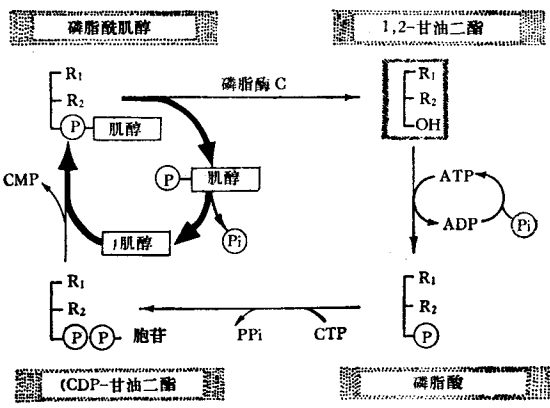


图 8 肌醇磷脂代谢路

血小板中 C-激酶的含量很多。利用已提纯的 C-激酶在试管内试验也证明可使 40K 蛋白质迅速地磷酸化。而且 40K 蛋白质的磷酸化反应能被抑制 C-激酶的前述药物而选择性地被抑制。因此可见,凝血酶作用到血小板后可使 C-激酶活化,在 C-激酶的作用下又使 40K 蛋白质磷酸化从而引起 5-羟色胺的释放<sup>[11,12]</sup>。

以上就 C-激酶的活化机制等性质进行了简单地说明。也对 C-激酶与一个新的受体机制的关系及与肌醇磷脂代谢的关系作了简单地论述。虽然只是以血小板为例,但与此新的受体机制相关的生理活性物质还很多,如儿茶酚胺( $\alpha$  作用)、乙酰胆碱(蕈毒碱作用)、后叶加压素、血管紧张肽 II 及甲状腺刺激素等。这些物质与 C-激酶的关系都还有待进一步研究。此外,虽然 C-激酶在试管内可使 40K 蛋白质、 $H_1$  组蛋白等磷酸化。而  $H_1$  组蛋白也可被 A-激酶及 G-激酶磷酸化。所以在体内究竟是被哪一种蛋白激酶磷酸化的问题也待进一步研究。最近还发现 C-激酶还可使自身磷酸化,但其生理意义并不清楚。另外,虽这一新的受体机制的确立正在被逐渐证明,然而仅用 40K 蛋白质的

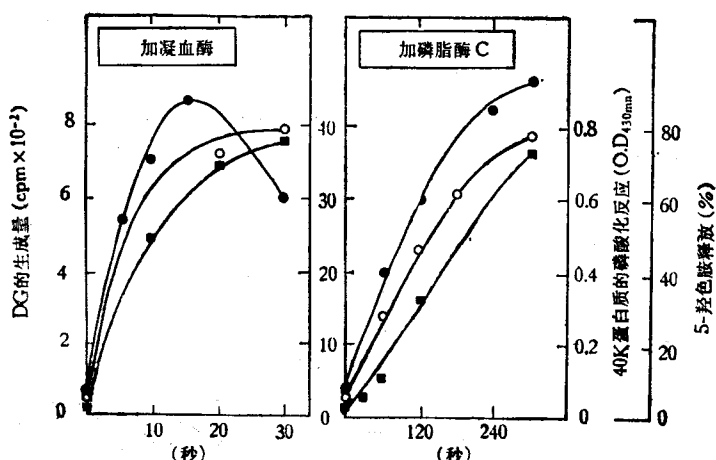


图9 40K 蛋白质的磷酸化反应, DG 的生成反应, 5-羟色胺释放反应的关系  
●—● DG 生成 ○—○ 40K 蛋白质磷酸化 ■—■ 5-羟色胺释放

磷酸化反应去解释许多激素的作用机理实际上是很困难的,也就是说,40K 蛋白质的性质、机能等问题的解决对这一机制的确立是不可缺少的。也许在 40K 蛋白质磷酸化之后又可引起一些连锁反应,最终使激素的作用才得以发挥。值得注意的是,实验已证明,这一 C-激酶系统所活化的细胞机能通常可受 cAMP 抑制。cAMP 的这种作用是通过阻断肌醇磷脂代谢来实现的。同时前列腺素  $E_1$  也可以抑制肌醇磷脂代谢中的甘油二酯的生成。因此在整个调节过程中 cAMP 系统,与 C-激酶系统很可能是两个正、负信息,从而使机体保持在平衡状态,但是机体的上述过程中在膜上的最初引起的现象是什么?肌醇磷脂的水解又是如何引起的? cAMP 能抑制 C-激酶系统的机制是什么? 还并不十分清楚,只有上述问题在分子水平上——得到解决,才能真正理解激素及生理活性物质的作

用机制。

对任永忠、吴治成老师的审阅表示感谢。

## 参考文献

- [1] Inoue, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 7619, 1977
- [2] Binzu, Yu., Kobe. *J. Med. Sci.*, **27**, 225, 1981.
- [3] Kishimoto, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 2274, 1980.
- [4] Mori, T. et al. *J. Biol.*, **91**, 427, 1982.
- [5] Kaibuchi, K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 7146, 1981.
- [6] Opden Kamp, J. A. F. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 47, 1979.
- [7] Mori, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 8378, 1980.
- [8] Seeman, P. *Pharmacol.* **24**, 583, 1972.
- [9] Wallace, W. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1932, 1980.
- [10] Rittenhouse-Simmons, S. *J. Clin. Invest.*, **63**, 580, 1979.
- [11] Kawahara, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 309, 1980.
- [12] Kawahara, Y. et al.: *J. Biochem.*, **88**, 913—916, 1980.

[本文于 1982 年 9 月 24 日收到]

## mRNA 的 5' 末端帽子结构及其功能

曾庆平

(湖南医学院生化教研组,长沙)

真核生物的 mRNA 成为指导蛋白质合成的直接模板,经历了从前体 hnRNA 到成熟

mRNA 的所谓转录后加工过程。这一过程包括形成 5' 末端 m<sup>7</sup>G 冠区和 3' 末端 poly (A) 尾