

信息跨膜传递的分子机制

徐 友 涵

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

提 要

胞外信息作用于质膜表面的受体, 转变为胞内信使分子完成信息的跨膜传递。 β 受体结合配体后活化 G 蛋白(通过 α 亚基与 β 、 γ 的解离)影响环化酶的活性。而钙联受体则通过触发肌醇磷脂的代谢, 生成胞内信使甘油二酯 (DG) 和三磷酸肌醇酯 (IP_3), 胞内游离 Ca^{2+} 浓度瞬间增高 (Ca^{2+} 动员过程), 通过不同的蛋白激酶引起特定的生理效应。DG 活化蛋白激酶-C, IP_3 动员胞内 Ca^{2+} , 它们通过二个相互独立而协同的过程调节细胞的代谢。

外界信息分子(激素、神经递质、药物等)特异性地结合于质膜表面的受体, 刺激细胞产生一定的生理反应。这是信息跨膜传递的过程。质膜上参与此过程的信息传递系统至少有以下三个成分^[1]:

1. 质膜外表面。能识别胞外信息分子的专一受体;
2. 产生胞内信使的酶体系;
3. 受体与效应器之间的偶联成分。

质膜上这种信息传递链的结构, 在不同组织不同细胞中可以有很大的差异, 但对于绝大多数组织来说, 它可以分成两大类: 一类是以 β -肾上腺受体为代表, 它产生的胞内第二信使是 cAMP; 另一类属于 Ca^{2+} 联受体 (Ca^{2+} -linked Receptor), 它的活化触发膜肌醇磷脂的代谢, 生成二个第二信使, 即甘油二酯 (DG) 和三磷酸肌醇 (IP_3), 胞内 Ca^{2+} 浓度的瞬间增高, 引起花生四烯酸释放或 cGMP 的生成等。cAMP、DG、 IP_3 和 Ca^{2+} 等胞内信使分别通过活化蛋白激酶 A、蛋白激酶 C、依赖 CaM 的激酶, 磷酸化不同的靶蛋白, 引起特定的生理效应。

1. cAMP 信使体系

目前已发现几十种刺激性受体 (R_s , 如 β -肾上腺受体、ACTH 受体和促性腺激素受体等)和几种抑制性受体 (R_i , 如 α_2 -肾上腺受体、阿片受体、ACh 毒蕈碱型 M_1 受体等), 它们接受胞外信息, 分别刺激或抑制腺苷酸环化酶 (ACase) 的活性, 通过 cAMP 影响胞内的反应。对受体分子的性质目前了解还不多。儿茶酚胺 β -肾上腺受体已被纯化, 它是单一肽链的膜糖蛋白, 分子量约 64 K 道尔顿, 朝向质膜外侧^[2]。它与环化酶之间的偶联体系是一种结合鸟苷酸的调节蛋白, 简称为 G 蛋白或 N 蛋白 (Guanine Nucleotide binding protein)。目前已知有两种 G 蛋白: G_s 和 G_i , 分别偶联刺激性、抑制性受体与环化酶(见图 1)。 G_s 和 G_i 最近已被分离、纯化^[3], 结构均为异三聚体, 含 α 、 β 、 γ 亚基。 G_s 和 G_i 的 α 亚基不同, 分子量分别为 45 和 43K。而 G_s 和 G_i 的 β 、 γ 亚基从氨基酸成分及水解肽谱上看似乎是等同的^[4], β 分子量为 36K, γ 分子量约 8K, 亲和标记证明 α 亚基含有结合鸟苷酸的位点^[3], 具有

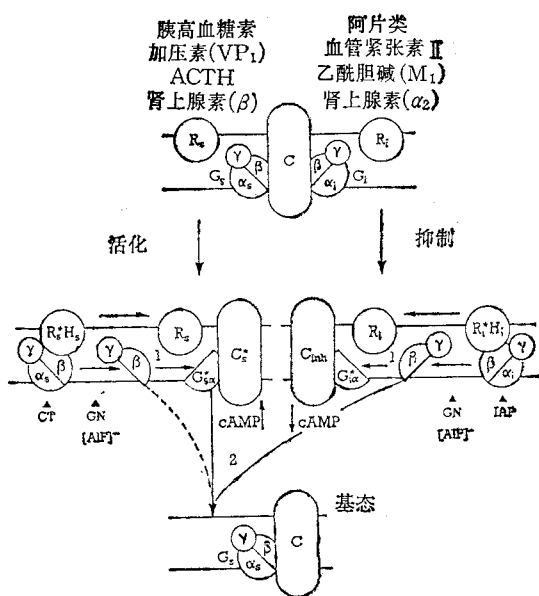


图1 激素调节腺苷酸环化酶活性的模式图

R_s ——刺激性受体
 R_i ——抑制性受体
 H_s ——刺激性激素
 H_i ——抑制性激素
 G ——鸟苷结合蛋白, α, β, γ 为其三个亚基
 C, C^* ——腺苷酸环化酶催化亚基的基态与活性态
 GN ——鸟苷酸非水解性类似物
 CT ——霍乱毒素
 IAP ——小乌活动性蛋白, 即百日咳毒素
 $[AlF]^-$ —— Al^{3+} 与 F^- 的复合物

GTPase 的活性。同时 α 亚基还含有某些负价键修饰位点, 某些毒素催化其依赖 NAD 的腺二磷核糖基化 (ADP-ribosylated), 如霍乱毒素催化 NAD 的腺二磷核糖基转移到 $G_{s\alpha}$ 蛋白的 Arg 残基上, 结果抑制 GTPase 活性, 加强了 GTP 对 G 蛋白的活化, 从而导致环化酶的不可逆活化, 肠表皮细胞内 cAMP 水平持续性升高, 引起大量 Na^+ 和水外流到肠腔造成严重腹泻, 这是霍乱毒素作用的分子机制。相反, 百日咳毒素催化 $G_{i\alpha}$ 的腺二磷核糖化, 阻断 GTP 和激素对 G_i 的活化, 使之丧失抑制功能。

配基与受体的专一性结合, 导致 G 蛋白的 α 亚基与 β, γ 解离, 引起 G 蛋白的活化。信息传递过程几个主要步骤如下: ①激动剂 H 与受体 R_s 结合, 诱导受体分子构变 ($R_s^*H_s$), HR 与 G 蛋白 (结合 GDP) 相互作用形成三元复合物。②三元复合物发生 GDP-GTP 交换, GTP

结合在 $G_{s\alpha}$ 亚基上, 触发 α 亚基与 β, γ 解离, GTP 的类似物 (GN), F^- (存在 Al^{3+} 时) 也可促进 α 亚基解离, 活化 G 蛋白。③结合 GTP 的 $G_{s\alpha}$ 亚基与低活性 ACase 催化亚基结合, 使后者跃迁为活性构象 C_s^* 。④ $G_{s\alpha}$ 结合的 GTP, 被该亚基显示的 GTPase 活性所水解, 生成 GDP- $G_{s\alpha}$, 从而使体系回到基态。(参见图 1)。在此循环中, 激素诱发受体构变, 刺激 GTP 与 $G_{s\alpha}$ 亚基的结合, 使 G_s 蛋白得到活化。与 G_s 的作用相反, 抑制性激素引起的 G_i 活化抑制环化酶活性, 这可以通过二个途径实现: ① $G_{i\alpha}$ -GTP 直接抑制环化酶; ② G_i 的 α 亚基与 β, γ 亚基解离后, β, γ 亚基在膜上可与 $G_{s\alpha}$ 结合生成非活性的 G_s 蛋白, 从而间接抑制环化酶^[3]。由于 $G_{i\alpha}$ 对鸟苷酸的亲和力比 $G_{s\alpha}$ 高, β, γ 亚基主要来源于 G_i 的解离, 因此 G_i 的抑制作用似乎主要靠第二个途径。

至于环化酶的分子结构尚不完全清楚, 直到最近才完成了它的纯化^[5], 它是分子量为 150 K 的糖蛋白。

脂囊泡重组实验是了解膜蛋白功能及其调节机制的一个重要途径。将含纯 β 受体的脂质体与爪蟾红细胞(该细胞膜含环化酶和 G 蛋白, 而没有 β 受体)进行膜融合后, 环化酶活性被异丙肾上腺素大大激活, 又被 β 阻断剂心得安阻断。相反, 对照(不含受体的脂质体与该细胞融合)则无此现象^[6]。最近, Lefkowitz 将纯的 β 受体、纯 G_s 蛋白与环化酶重组到具有一定脂成分的脂质体上, 研究该体系各组分之间的相互关系^[7], 证明重组的体系具有体内受体-环化酶体系所有的特征, 重组体系的环化酶活性被肾上腺素刺激, 而又被 β 阻断剂所阻断。

2. 甘油二酯 (DG), 三磷酸肌醇 (IP_3) 和 Ca^{2+} 信使体系

目前已清楚, 另外一大类激动剂的活化细胞功能不是通过 cAMP, 而是通过活化磷脂酶 C, 触发专一磷脂酰肌醇 (PI) 的水解, 导致胞内游离 Ca^{2+} 浓度瞬间增加, 激酶 C 活化, 花生四烯酸的释放以及鸟苷酸环化酶的活化等一系

DG 和 IP_3 分别成为二个胞内信使, 通过二个相互独立、平行的途径, 调节细胞的生理效应(图 2)。

质膜 PIP_2 水解生成的一个产物是脂溶性 DG, 它可被脂酶进一步水解, 生成花生四烯酸, 参与前列腺素、白三烯、凝血烷等代谢调节剂的合成。另一个更重要的功能是活化蛋白激酶 C, 增加该酶对 Ca^{2+} 及磷脂(主要是 PS)的亲水性, 刺激底物蛋白丝氨酸 (Ser), 苏氨酸 (Thr) 残基的磷酸化。实验表明, 甘油三脂, 甘油单脂, 脂肪酸均无此功能, 含饱和脂肪酸的 DG 活化 PK-C 的效能也差得多, 它至少要求含一个不饱和脂肪酸的 DG。天然 PI 水解的产物 (DG) 正是此情况。PK-C 是一个广泛分布的具有单一肽链, 分子量约 77 K 的蛋白, 含一个亲水的催化 P 位和一个疏水的膜合区域。未受刺激的细胞, PK-C 主要分布在胞浆中, 呈非活性构象, 当细胞被刺激后, PIP_2 水解, 质膜上有瞬间的 DG 积累, PK-C 可紧密结合到质膜内表面(如与膜 PS 结合), 使酶跃迁为活性构象^[9], 磷酸化胞浆内的底物蛋白, PK-C 对磷脂有专一性要求, PS 可最强地活化它, PI, PA, CL 也表现一定程度的活性。PC, PE, PG, SM, 神经节苷脂等则无此活性, 这暗示生物膜磷脂的不对称分布可影响 PK-C 的活性。

DG 的信使作用借两种方式中止: ① 被 DG 激酶磷酸化产生 PA, ② 被脂酶进一步水解, 生成单脂酰甘油。DG 的有效浓度取决于生成与降解速度的平衡: 外部信号活化 PIP_2 水解时, 就有 DG 瞬间积累, 通过 PK-C 活化底物蛋白, 在血小板中, 40K 和 20K 蛋白被磷酸化, 引起血小板的释放功能。其中 20 K 蛋白是肌球蛋白轻链, 40K 蛋白的生理功能尚不清楚。在肝细胞中, 催化 68、52、36、16 K 蛋白的磷酸化, 它们的生理意义也同样还不清楚。

最近证明,肿瘤促进子(佛波酯)“phorbol ester”的受体蛋白是 PK-C,该脂与 DG 有类似的结构,特别是其 C—20 的构型^[40]。它可在极低的浓度下,渗入膜,有效地取代 DG 活化



- 12 •

PK-C, 但它不象 DG 那样可被迅速降解, 因此使 PK-C 产生长时间, 过度的不可逆活化, 导致细胞不可控制的生长。很可能其它类型的肿瘤促进子如 Mezerein, Teleocidin, Aplysia 毒也通过 PK-C 起作用, 这引起人们对探讨 PK-C 与肿瘤关系的兴趣。

ii) IP_3 动员胞内 Ca^{2+}

以前曾认为某些受体活化后, 可能使质膜上 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 内流引起胞内信使 Ca^{2+} 浓度瞬间提高。但实验表明, 将肝细胞在缺少胞外 Ca^{2+} 的体系中保温时, 加入激动剂也同样引起胞内游离 Ca^{2+} 的增加^[11]。最近报道证实 Ca^{2+} 动员受体活化后触发 PIP_2 水解的一个产物: 水溶性 IP_3 从质膜扩散到胞浆, 引起 Ca^{2+} 从非线粒体 Ca^{2+} 储库 (主要是 ER) 释放^[12]。这是细胞反应初始胞内 Ca^{2+} 增加的主要来源。有人将 IP_3 显微注入接受光的 Limulm 细胞, 结果出现胞内 Ca^{2+} 的瞬间积累^[13]。 IP_3 释放 ER 中 Ca^{2+} 的半最大效应浓度约 $0.1-0.5 \mu\text{M}$, 而肌醇、 IP_2 、 IP 等均无此效应^[14]。还证明 IP_3 中三个磷酸根在肌醇中的部位 (1, 4, 5 位) 与释放 Ca^{2+} 活性有关。若将 IP_3 在 100°C , $5N \text{ HCl}$ 中处理 30 分钟, 导致三个磷酸键在肌醇中随机分布, 产物的活性比 IP_3 (1, 4, 5) 低得多。

IP_3 诱导 ER 释放 Ca^{2+} 的机制还不清楚, 推测 ER 膜上有专一的结合 IP_3 受体, IP_3 与之专一结合, 使 Ca^{2+} 离子通道开放, 类似于烟碱类 Ach 受体的情况。

信使 Ca^{2+} 在胞内的调节机制, 主要通过一系列钙结合蛋白表达其生理功能。CaM 是真核生物中广泛分布的多功能的、依赖 Ca^{2+} 的调节蛋白^[15], 胞内信使 Ca^{2+} 结合到 CaM, 使 CaM 转变成活性的构象, 与靶酶的亲和力提高 1—10 万倍。目前已发现的 CaM 靶酶有十余种。其中包括几种蛋白激酶和磷酸酶。调节环核苷酸代谢、 Ca^{2+} 代谢、细胞收缩运动、神经功能、糖元代谢等^[16], 除上述通过 CaM 的调节外, 胞内 Ca^{2+} 还引起一系列生化变化, 其机制尚不完全清楚, 如抑制 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, 活化依赖 Ca^{2+}

的 K^+ 通道, 引起 K^+ 胞外溢的增加, 活化依赖 Ca^{2+} 的蛋白酶, 活化转谷氨酰胺酶, 使收缩蛋白与其他蛋白交联, 催化带 2.1 转变成 2.2 等。

iii) Ca^{2+} 动员与 DG 活化 PK-C 两套信使系统的协同效应

如前所述, 细胞被活化时, 膜上 PIP_2 的水解产物 IP_3 , 动员胞内 Ca^{2+} 。 Ca^{2+} 的增加又诱发磷脂酶 C 对 PI 的水解, 由于膜上 PI 浓度远大于 PIP_2 , 所以 PI 水解产生的 DG 是该信使的主要来源, 按照这个看法, IP_3 是最初的信使分子, 它动员胞内 Ca^{2+} , 通过 Ca^{2+} -CaM 活化磷酸化酶激酶, 可催化一组底物蛋白的磷酸化。而 DG 通过 PK-C, 磷酸化另一组蛋白。现在人们可分别活化这两套信使体系, 如用 DG 或 phorbol ester 处理肝细胞, 活化 PK-C, 磷酸化三种底物蛋白, 而不引起胞内 Ca^{2+} 的增加。另一方面, 用 Ca^{2+} 离子载体 A_{23187} 处理, 可增加胞内游离 Ca^{2+} , 磷酸化另外七种蛋白^[17]。在血小板中, 肌球蛋白轻链可同时被 PK-C 或 Ca^{2+} -CaM 活化的轻链激酶磷酸化于不同的部位, 似乎代表这两套信使体系的焦点。

这两条途径在胞内调节的相对重要性可能随时间而异。 IP_3 触发 Ca^{2+} 动员, 诱发初期反应。而 DG 体系对维持细胞的生理效应有较重要的作用。它们可以单独发挥功能, 也可协同作用。如血小板用低浓度 Ca^{2+} 离子载体 A_{23187} 处理 ($0.2 \mu\text{M}$) 或单独用 DG 处理时, 都只引起微弱的分泌效应, 当两者共同使用时才引起血小板的完全分泌效应。协同效应可能是由于 DG 提高分泌过程对 Ca^{2+} 的敏感性。有人认为这两套途径本身都不足以完成信息的跨膜传递, 它们之间的协同作用对于跨膜控制胞内反应, 才是必需的。两套体系的协同效应最近还在其他一些细胞中得到证明: 如胰岛分泌胰岛素, 牛肾上腺皮质释放儿茶酚胺等。

iv) Ca^{2+} 动员受体与磷脂酶 C 的偶联

磷脂酶 C 的活化方式可能类似于 PK-C, 在胞浆中呈现非活性状态, 只有当它结合到含 PI 的膜上才变成有活性的酶, 鸟苷酸结合蛋白

(G 蛋白) 易化此过程^[1]。激动剂触发 PI 水解的细胞,用百日咳毒素处理,不改变胞内 cAMP 浓度,但减少了磷酸肌醇的产生。在非细胞体系中添加 GTP,可以产生类似于添加激动剂的效应。非水解性 GTP 类似物可以刺激嗜中性细胞质膜 PI 的分解。血小板用 GTP 类似物处理可促进 DG 的生成和 5 羟色胺的分泌。

这提示一种新的鸟苷酸结合蛋白参与受体与磷脂酶 C 的偶联,这个蛋白暂时定名为 Np^[11]。它与偶联 β 受体-环化酶的 $N_i(G_i)$ 蛋白在多大程度上类似还不清楚。有人设想 N 蛋白不同亚基的磷酸化可能决定它是偶联腺苷酸环化酶还是偶联磷脂酶 C,似乎是信息传递过程的分歧点。不管这说法是否真实,偶联蛋白确实参与了所有受体介导的信息跨膜的传递。

3. 细胞增殖与 PI 代谢

细胞增殖可以被许多促有丝分裂因子所触发,包括受精、激素、神经递质、生长因子等。细胞增殖开始总伴随胞内游离 Ca^{2+} 的增加和

Na^+/H^+ 交换蛋白的活化。卵受精或成纤维细胞被有丝分裂因子刺激时, H^+ 排出胞外,胞浆 pH 变碱性,同时 Na^+ 进入胞内,说明 Na^+/H^+ 交换可以传递信息^[18]。另一方面 PI 代谢与细胞增殖密切相关(图 3),生长因子如 PDGF 可以触发 PIP_2 水解,使胞内 Ca^{2+} 快速增加,利用测量胞内游离 Ca^{2+} 的荧光探针 Quin-2 的实验证明了这一点^[19]。尽管在胞外无 Ca^{2+} 的情况下,也发生胞内 Ca^{2+} 的增加,说明生长因子通过胞内 Ca^{2+} 动员引起细胞增殖。另一方面,phorbol ester 通过 PK-C 增加胞内 pH,提示 DG 可以活化 Na^+/H^+ 交换体系,影响细胞增殖(图 3)。这现象似乎也有助于解释前述的 Ca^{2+} -DG 两套系统的协同作用,表明促有丝分裂因子触发细胞的 PIP_2 水解在增殖中起关键的作用。

正常细胞含某些隐性的癌基因,它在一定的条件下(如暴露于致癌因子)可被活化,癌基因编码一些蛋白可作用于细胞自身受体系统,通过 PI 代谢传递信息,使其增殖失去控制。现

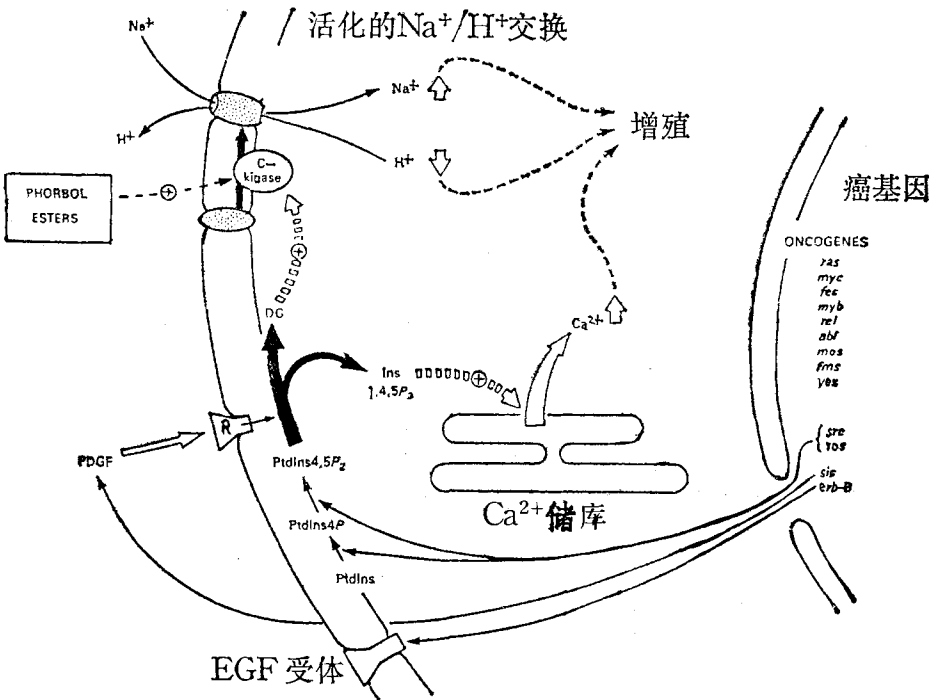


图 3 细胞增殖与 PI 代谢的关系

生长因子触发 PIP_2 的分解,产生两个第二信使 DG 与 IP_3 , 癌基因编码的蛋白促进 PI 的代谢。

PDGF——血小板来源的生长因子 EGF——表面生长因子

在已知癌基因至少编码三种与 PI 代谢有关的蛋白(见图 3): ①猿猴肉瘤病毒 (V-sis) 编码的蛋白(转化因子 P_{88}^{sis})其 66—175 氨基酸顺序与血小板来源的生长因子 B 链 N 末端 109 个氨基酸顺序相同^[20]。② 鸟有核红血球症病毒基因 (erb-B) 编码的蛋白 ($gp65^{erb-B}$) 也类似于 EGF 受体的跨膜区域,并具有酪氨酸蛋白激酶的活性^[21]。③劳氏肉瘤病毒 V-src 编码的转化蛋白 $PP60^{V-SRC}$, 鸡肉瘤病毒 V-ros 编码的蛋白也是酪氨酸蛋白激酶,催化 PI 磷酸化,增加 PIP_2 的生成。由此可见,癌基因编码的蛋白或是生长因子或是生长因子受体,都刺激 PIP_2 分解,而另一个编码的蛋白则增加作为底物的 PIP_2 的合成。目前虽然对其他癌基因编码蛋白的生化功能还不清楚,但很可能也与上述情况类似,编码的蛋白参与以 DG, IP_3 为第二信使的受体体系,增加 PIP_2 的代谢,提高胞内 Ca^{2+} , 不可逆活化 PK-C, 最后导致细胞迅速的增殖,这可能是肿瘤发生的分子机理的一个侧面。

4. 质膜对信使 Ca^{2+} 的调节

Ca^{2+} 动员激素刺激细胞,诱发胞内 Ca^{2+} 动员。胞内增加的游离 Ca^{2+} 将被质膜 Ca^{2+} -ATPase 泵出胞外。实验表明, Ca 泵活力被几种 Ca^{2+} 动员激素抑制^[22]。这现象的生理意义是明显的,激素活化初期引起胞内游离 Ca^{2+} 的增加,因 Ca^{2+} 泵活力的抑制使信使 Ca^{2+} 得以维持一定时间而不致于很快丧失。最近报道质膜 Ca 泵受 PI 循环的脂的调节,尤其是 PIP_2 , 即便在 CaM 存在下仍强烈刺激泵的活力,降低酶半活化要求的 Ca^{2+} 浓度^[23]。很可能 Ca^{2+} 动员激素活化细胞,分解质膜 PIP_2 , 致使 Ca 泵活力下降,另一个可能是激素结合受体后,影响 Ca 泵的活化剂蛋白或抑制剂蛋白与泵的亲和力。

另外, Ca^{2+} 动员激素增加质膜对 Ca^{2+} 的透性,在无胞外 Ca^{2+} 情况下,激素诱导鼠肝细

胞内 Ca^{2+} 的增加,在 3 分钟内中止,又重新恢复到原来的水平。而当胞外存在生理浓度的 Ca^{2+} 时,加压素或 α -激动剂活化细胞时,所引起的胞内 Ca^{2+} 增加可维持长得多的时间,这是激素增加质膜 Ca^{2+} 透性,胞外 Ca^{2+} 进入胞内的结果^[24]。该机制尚不清楚,目前还没有直接证据表明激素诱导的 IP_3 生成可影响质膜对 Ca^{2+} 的透性,也可能是 PIP_2 水解引起膜结构的变化,改变膜对 Ca^{2+} 的透性,或是因为肌醇脂代谢产物如 PA 或花生四烯酸代谢产物影响质膜对 Ca^{2+} 的透性。

参 考 文 献

- [1] Joseph, S. K.: *Trend in Biochem. Sci.*, **8**, 297, 1985.
- [2] Lefkowitz, R. J. et al.: *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 159, 1983.
- [3] Katada, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 3568, 1984.
- [4] Manning, et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 7059, 1983.
- [5] Pfeuffer, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3086, 1985.
- [6] Cerione, R. A. et al.: *Nature*, **306**, 562, 1983.
- [7] Lefkowitz, R. J., et al.: *J. Memb. Biol.*, **87**, 1, 1985.
- [8] Berridge, M. J.: *Biochem. J.*, **212**, 849, 1983.
- [9] Majerus, P. W. et al.: *Trend in Biochem. Sci.*, **4**, 168, 1985.
- [10] Brasseur, R. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**(3), 969, 1985.
- [11] Joseph, S. K. et al.: *J. Biol. Chem.*, **258**(17), 10425, 1983.
- [12] Burgess, G. M. et al.: *Nature*, **309**, 63, 1984.
- [13] Brown, J. E. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 1137, 1984.
- [14] Streb, H. et al.: *Nature*, **306**, 67, 1983.
- [15] 赵昇皓:《徐州医学院学报》, **6**, 1, 1986.
- [16] 徐友涵:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 17, 1985.
- [17] Garrison, J. C. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**(5) 3283, 1984.
- [18] Moolenaar, W. H. et al.: *Nature*, **304**, 645, 1983.
- [19] Moolenaar, W. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**(13), 8066, 1984.
- [20] Waterfield, M. D. et al.: *Nature*, **304**, 35, 1983.
- [21] Downward, J.: *Nature*, **307**, 521, 1984.
- [22] Pripe, V. et al.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 1382, 1984.
- [23] Hoquette, D. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**(3), 908, 1984.
- [24] Barritt, G. J. et al.: *J. Physiol.*, **312**, 29, 1981.

[本文于 1986 年 3 月 25 日收到]