

消失,与转化细胞Fn改变雷同的现象,并不是十分令人惊奇的。问题在于,什么原因导致Fn含量下降。在进入有丝分裂期之前,细胞陷于广泛的Fn密网中。有丝分裂时,细胞变圆,并从Fn密网中脱离出来。细胞从Fn密网中挣脱,可能是由于失去对Fn的亲合力,或者是局部将Fn密网击破。这些问题尚未解决。

九、结 语

综上所述,Fn是一类重要的大分子糖蛋白,与细胞的许多生物活性有关。最近五年内,有关Fn的研究进展迅速。由于Fn与肿瘤转移,凝血以及MPS功能的维持关系密切,引起许多学者注意,正致力于弄清Fn在体内的作用机制。这些研究有着重要的理论和实际意义。

(本文由李玉瑞教授审阅)

参 考 文 献

- [1] Yamada, K. M. et al.: *Nature*, **275**, 179, 1978.
- [2] Morrison, P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**: 3103 1948.
- [3] Pearlstein, E. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, **29**, 103, 1980.
- [4] Yamada, K. M. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **9** (6) 506, 1981.
- [5] Pearlstein, E. et al.: *Cancer Reserch*, **36**, 1475, 1976.
- [6] Coll, J. M. et al: *Biochem.*, **16**, 3169, 1977.
- [7] Olden, K. et al: *Cell*, **11**, 957, 1977.
- [8] Saba, T. M. et al.: *J. Reticuloendothel. Soc.*, **22**, 16a Abstract, 1977.
- [9] Mosesson, M. W. et al.: *Blood*, **56**, 145, 1980.
- [10] Furcht, L. T. et al.: *J. Cell. Biol.*, **83**, (2 part) 61a, 1979.
- [11] Bensusan, H. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 5864, 1978.
- [12] Santoro, S. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 2644, 1979.

[本文于1982年9月3日收到]

胰 岛 素 受 体

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

激素和受体这两个概念在上世纪末已形成。八十多年来,激素的研究取得了巨大的进展,但相对来说受体的研究却落后了很多。1921年胰岛素为Banting和Best首次从小牛胰脏分离得到,至今六十多年中,在结构(一级结构,晶体结构),合成(人工化学全合成,遗传工程生产),生理生化性质,结构功能、临床应用等各方面都研究得相当透彻。但是胰岛素作用机制的研究,即胰岛素分子与细胞膜上的胰岛素受体分子特异结合的相互作用^[1]所诱导的一系列从

分子水平到细胞水平的复杂变化,最后导致整体的生物效应的过程至今仍然了解得很少。要彻底了解胰岛素的作用机制,最终解决糖尿病等医学实践问题,受体的研究是十分重要的。尽管50年代初就有人尝试直接研究受体,但直至1971年Freychet^[2]和Cuatrecasas^[3]分别制备了保存活力的碘同位素标记的胰岛素分子,并用此定义了具有生物特异性的胰岛素受体的结合之后,才有可能直接研究胰岛素受体。此后,发现几乎所有脊椎动物的组织和细胞中都存在胰岛

素受体。一般认为,胰岛素受体是一种糖蛋白,存在于细胞表面的质膜中,与其他的膜成份一起形成完整的膜结构^[4],近年来,有人报道在细胞内的亚细胞器上也发现有胰岛素受体,但对其来源和作用尚有许多争议^[5]。与胰岛素不同,体内胰岛素受体的量要比胰岛素少得多,它又存在于复杂的膜结构中,因此至今人们还不能分离到纯的胰岛素受体,而只能根据它的结合特性来鉴定它的存在。近年来在胰岛素受体研究领域内取得了一系列成就,如对胰岛素有灵敏反应的人工培养的细胞、具有胰岛素受体缺失或胰岛素作用异常的变异细胞株。研究胰岛素受体结构的新方法;抗胰岛素受体的抗体的发现和应用等。传统的受体概念是“细胞表面,或亚细胞组份中的一种天然分子,可以识别有生物活力的激素并与其特异结合,生成的复合体能激活,或开动一系列生物化学变化,从而导致激素最终的生物效应”。因此认为只有肝细胞、肌细胞、脂肪细胞才是胰岛素作用的靶细胞。目前由于对胰岛素敏感的人工培养细胞 IM-9 淋巴细胞,成纤维细胞,以及红血细胞,单核细胞的应用,使研究胰岛素受体的来源更加丰富,特别是血细胞可以方便、安全、迅速、一次大量获得,在临床诊治上具有特殊意义。同时受体的概念也发生了变化。现在把细胞上能识别激素,但不一定能激活,或永远不能产生生物效应的分子,或者已从细胞上解离下来但仍可识别激素的分子都定义成“受体”。这里强调的是“识别”,只要结合行为相同,就认为是相同的受体。例如:人工培养的成纤维细胞具有与肝细胞相同的结合胰岛素的特性,但没有刺激葡萄糖转移等急性生物效应,而只有慢性的刺激生长的效应。原来认为单核细胞没有胰岛素刺激的代谢效应,现在则发现它的受体在临床上极有诊断价值。再如用去污剂从细胞膜上溶解下来的受体分子,虽已脱离细胞膜,但与胰岛素结合的行为仍保持与在膜上或在细胞上完全一样,这些也命之为“受体”,即可溶性受体。这样广义的命名就不会遗漏那些暂时还认识不到或测定不到生物效应的细胞上的受体,为受体研究和

糖尿病研究开辟了更广泛的途径;也使过去几十年间对糖尿病病因的误解得到澄清,认识到有些类型的糖尿病实际上与胰岛素无关,是由于受体异常造成的。

一、胰岛素受体的测定和性质

胰岛素受体的鉴定是基于它与胰岛素结合的特性。首先要制备具有结合活力的高比活同位素碘标记的胰岛素。常用的方法有氯胺 T 法^[6],和乳过氧化物酶法。胰岛素分子中 4 个酪氨酸被不同程度地标记,通常只希望得到单碘标记,比度 150—180 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$,这样可以较好地保证胰岛素分子不因引入放射性碘而降低其结合活力。一个理想的标记胰岛素分子其活力应与原来相同,且可在低温下保存一个月之久。完整细胞,细胞膜以及可溶性受体皆可用作测定受体的材料。¹²⁵I 或 ¹³¹I 碘化的胰岛素对受体有高度的亲和力,其结合是快速的,可逆的,并可达到饱和平衡状态,后者主要取决于结合环境的 pH 和温度(图 1)。一般说来,在较高的温

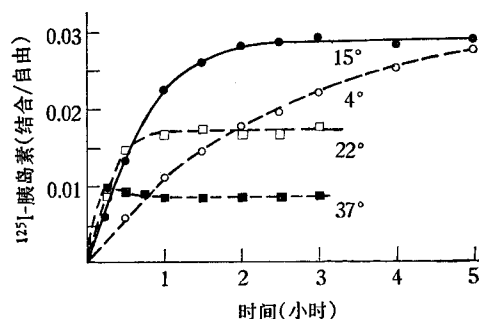


图 1 温度对胰岛素与其受体的影响

¹²⁵I-胰岛素与鸟类红细胞膜在不同的温度下培养,于不同时间,用快速离心分离细胞膜,测其放射性,即为与膜结合的胰岛素。非特异性结合(< 0.005)已被减去

度下,平衡较快达到,但结合较少。受体结合具有严格的 pH 依赖性,最佳结合 pH 在 7.8 和 8.0 之间(图 2)。当 pH 小于 7.0,大于 8.2 时,结合活力下降一半。受体结合最重要的特性或者说受体鉴定最关键的标志是它的特异性。结合能力大小通常用对碘标记胰岛素的结合位点的竞争,即抑制一半碘胰岛素结合所需非标记胰

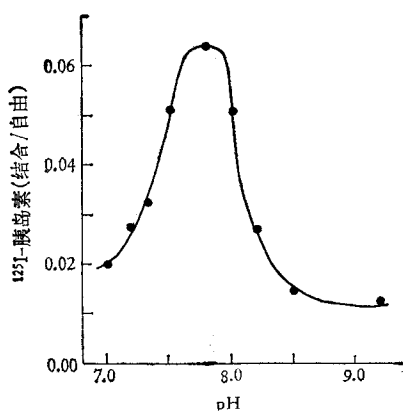


图 2 pH 对胰岛素与其受体结合的影响

^{125}I -胰岛素与鸟红细胞在 pH6.5—9.0, 15°C 培养 3 小时, 离心分离红细胞, 测其放射性, 即为与细胞结合的胰岛素

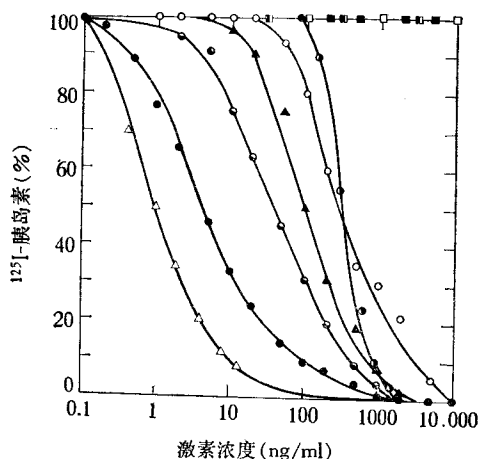


图 3 胰岛素受体的特异性

^{125}I -胰岛素与纯化的鸟类红细胞膜在加有不同浓度的有关激素的条件下培养, 鸡胰岛素(Δ), 猪胰岛素($\bullet$), 胰岛素原($\circ$), 豚鼠胰岛素($\blacktriangle$), 去丙氨酸 B_{30} , 去门冬酰胺 A_{21} 胰岛素($\circ$), 类胰岛素生长因素($\square$), 人生长激素($\blacksquare$), 胰高血糖素($\blacksquare$), 肾上腺皮质激素($\square$)。达到结合平衡后, 快速离心分离细胞膜, 测其放射性。各种激素对在红细胞膜上的胰岛素受体的结合位点的竞争与它们的生物活力平行

胰岛素的浓度来表示(图 3)。所需浓度越低, 说明与受体的亲和力越大, 越易取代已结合的碘胰岛素。一般说来, 对碘胰岛素的竞争力是与它的生物活力成正比的。对竞争曲线作 Scatchard 分析^[7]发现各种来源的胰岛素受体都呈现上凹双曲线, 其物理意义表明存在着多种亲和力的受体(图 4)。但是近年来 De Meyt^[8]等发现受体—受体相互作用会导致受体亲和力发生变化,

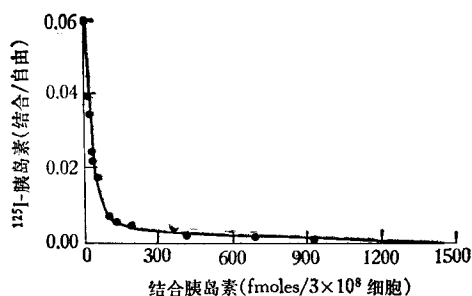


图 4 图 3 中猪胰岛素与其受体结合的 Scatchard 分析

他们用“负协同效应”^{*}来描述这种相互作用。Scatchard 曲线的横截距代表细胞上受体的数目。不同细胞所含受体数目可以相差达 300 倍之多, 例如粒细胞有约 1000 受体位点, 而肝细胞和脂肪细胞则有 200,000—300,000 个受体位点。但是大部分细胞单位面积上的受体数目基本上是同一个数量级, 约 15—60 受体/每平方微米。

受体测定在国外糖尿病的诊治中已成为常规的分析手段。如所有的肥胖症, 不管病因和动物类型, 肝细胞膜受体结合的温度、pH、离子依赖性, 结合特异性以及负协同效应皆正常, 但结合能力下降 30%。Scatchard 分析形状不变, 即受体亲和力不变, 但曲线在横轴的截距变小, 说明受体数目下降, 所以肥胖症患者细胞上的受体减少是导致对胰岛素结合能力下降的原因。又如一种产生自发受体抗体的糖尿病患者, 对胰岛素失去了正常反应, 其原因是受体的亲和力严重降低, 但受体数目并没有变化。

二、受体的调节

人是自然界中具有最复杂最完善的自我调节的生物体, 一直到分子水平都有精确的生理性自我调节。胰岛素受体也不例外。其亲和力和浓度一直处于动态的调节平衡过程中。

调节受体的因素很多, 人的主观因素(食物成分、数量, 进食时间以及体力活动), 客观因素(年龄, 各种生理病理状态, 细胞生长分化的不

* De Meyts 由于“负协同效应”的工作而获得 1981 年欧洲糖尿病协会一年一度颁发给四十岁以下的在胰岛素和糖尿病研究中最出色的科学家的 Minskowsky 奖。

同阶段)以及其他诸如药物的影响。受体浓度的主要调节者还是胰岛素本身,在体内外都已证明受体浓度与其环境中的胰岛素浓度成反比关系,这种现象称为同源型受体调节,也称“Down regulation”。^[9] 胰岛素浓度升高似乎促进了受体的分解以致受体浓度下降。这种负反馈调节作用的生理意义是很显然的。上面所述肥胖症患者受体数目下降也是因为体内胰岛素过多造成。受体亲和力的调节因素还有受体一受体相互作用。“负协同效应”就是受体与胰岛素分子的结合而诱导了受体与周围其他受体之间的相互作用,而使受体的亲和力降低,加速了胰岛素自受体上解离下来。

三、受体的抗体

胰岛素的抗体早为人们熟悉,可是受体的抗体是比较新的概念,在 1975 年才被发现^[10],这对胰岛素作用机制研究,受体研究以及糖尿病研究都有很大的意义。

美国国立健康研究院(NIH)糖尿病研究所的 Kahn* 小组在研究一组具有严重胰岛素抵抗症和黑棘皮症的糖尿病患者时发现了他们的血液中含有受体的抗体,这多数是女性患者表现的免疫病,其中三分之一为自免疫症。他们的淋巴细胞与胰岛素的结合能力下降,Scatchard 分析表明主要是因为受体的亲和力降低造成。病人的血清抑制几乎所有各种正常细胞与胰岛素的结合能力,但并不抑制它们与其他激素,如胰高血糖素,生长激素、上皮生长因素、类胰岛素生长因素的结合,也不抑制胰岛素的降解。病人的血清还特异地免疫沉淀可溶性胰岛素受体,这种沉淀作用可被胰岛素抑制,但病人血清并不沉淀生长激素,催乳激素或类胰岛素生长因素的受体,这二个特性正是我们鉴定受体的抗体的最基本的指标。另一方面,碘标记的受体的抗体本身可以直接地特异结合胰岛素受体,这种结合又与受体的数目成正比的,而且特异地被胰岛素和胰岛素类似物所抑制。这样二种类型的竞争性抑制作用证明受体的抗体是直接结合到受体上去的。亲和标记,碘化和 ³⁵S 生

物合成实验^[11]也都证明抗体识别的亚基是与用其他方法测得的胰岛素受体的亚基相同的。受体的自抗体不仅与胰岛素受体结合,抑制胰岛素的结合,而且还模拟胰岛素的许多生物功能。如刺激葡萄糖的转移和利用,抑制脂肪分解,刺激蛋白质合成等。但唯一不能模拟的是胰岛素刺激 DNA 合成的功能。有趣的是,用部分纯化的受体在动物体内诱发的抗体虽然也具有某些自然产生的抗体性质,如可以沉淀受体,有类胰岛素活力,但它们并不能竞争性地抑制胰岛素与受体的结合。受体的抗体已被用于证明受体结构分析中的特异性。

四、受体的结构

由于至今尚未分离到纯化的受体,不可能直接测定其一级结构和三维结构。目前只能用间接的方法,一般可以分成二类,一类是研究具有结合特性和免疫特性的活性状态下的受体。用中性去污剂 Triton X-100 把受体从细胞膜上溶解下来,再用凝胶过滤^[12]或凝胶电泳^[13]鉴定其活性峰。结果表明在 Triton X-100 中的受体分子的半径约为 68—72 Å,相当于分子量 300,000—1,000,000。这里必须考虑到在 Triton 水合颗粒中可能包含不止一个受体分子,其中还可能包含着与受体不易分开的其他膜蛋白。以后发现这种高分子量的受体是具有亚基结构的。第二类便是研究受体的亚基结构,但由于受体纯化和直接鉴定的困难,进展一直很慢,直到三、四年前由于采用了光活性胰岛素衍生物和化学交联剂才有了突破。如前所述,胰岛素与其受体的结合是可逆的,即使用同位素标记的胰岛素与受体结合,当洗去过量的标记胰岛素时,已结合的胰岛素又会与受体解离,因此很难得到足够分析用的结合了标记胰岛素的受体的复合物。双功能团化学交联剂,如辛二酸的琥珀酰亚胺酯,可以在碘化胰岛素与其受体的结合达到饱和平衡状态时,在它们之间形成共

* Kahn 以他在受体的抗体研究中的成就获得 1981 年美国糖尿病协会颁发的 Lilly 奖(性质与 Minskorssky 奖相同)。

价交联桥,使形成不会解离的胰岛素-受体复合物。美国的 Michal Czeck 用此方法作了一系列深入的研究^[14]。胰岛素分子经化学修饰在自由氨基上引入光活性基团,如芳香叠氮化合物,再经¹²⁵I 标记,如能得到高比活且维持其结合活性的胰岛素衍生物,即可用作受体结构研究。这种光活性胰岛素在暗中与受体形成可逆的非共价结合,其行为如同一般的化学修饰胰岛素,但一经紫外照射,光活性基团被激活,就可以与受体分子反应而生成共价键联接的胰岛素-受体复合物(图 5),用 SDS 凝胶电泳结合放射自显影可以鉴定这种共价结合复合物的结构和亚基结构(图 6、7)。西德羊毛研究所和加拿大的 C. C. Yip 制备了质量很好的光活性胰岛素^[15,16]。近年来,在美国 NIH 糖尿病研究所采

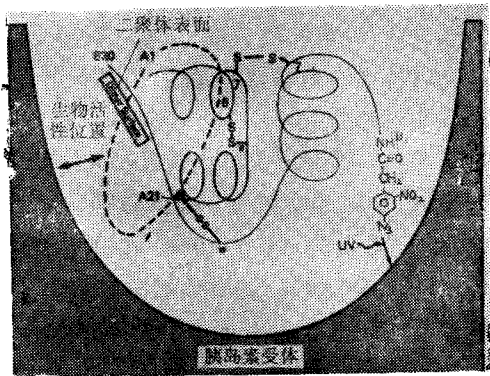


图 5 正常胰岛素和光活性胰岛素与其受体结合的示意图
后者形成不可逆的共价复合物

用受体的抗体,结合细胞表面碘化^[17]或³⁵S 生物合成标记等^[15]方法所进行的受体结构研究工作也十分活跃。IM-9 淋巴细胞经¹²⁵I 碘化,使细胞表面胰岛素受体和其他膜蛋白的酪氨酸被标记,或经与³⁵S-甲硫氨酸培养,使³⁵S 在生物合成中掺入受体蛋白中,然后借 Triton X-100 把受体从膜上溶解下来,再用受体的抗血清把受体蛋白特异性地沉淀下来,经 SDS 凝胶电泳和放射自显影鉴定被标记的受体。在所有胰岛素受体亚基结构研究中,为了检出放射自显影显示的条带中特征的胰岛素受体条带,需加入过量非标记胰岛素或受体的抗体来抑制标记胰岛素与受体的结合(图 7),或用非标记胰岛素抑制

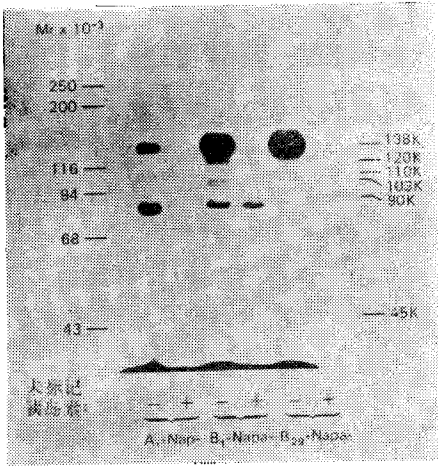


图 7 大鼠脂肪细胞胰岛素受体的光亲和标记
A₁-Nap: A₁-(4-叠氮-2-硝基苯)-胰岛素标记分子量为 138,000 和 110,000—120,000 之间的亚基。
B₁-Nap: B₁-(4-叠氮-2-硝基苯乙酰)胰岛素标记分子量为 138,000 和 110,000—120,000 之间的亚基
B₂-Nap: B₂-(4-叠氮-2-硝基苯乙酰)胰岛素标记分子量为 138,000, 120,000 以及 45,000 的亚基

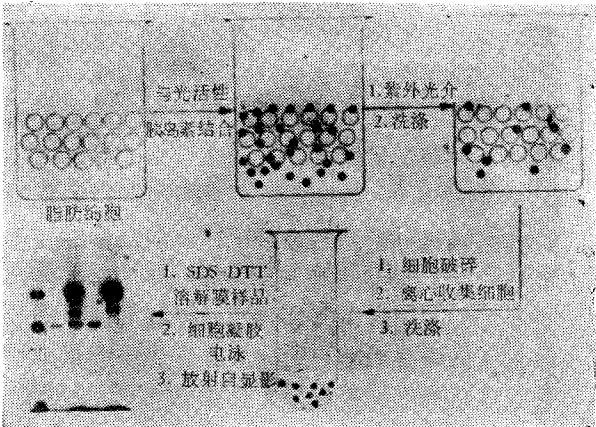


图 6 用光活性标记技术测定大鼠脂肪细胞胰岛素受体结构的方法示意图

受体的抗体对受体的沉淀作用。还有一种放射失活法在研究受体结构方面有独到之处。通常是把受体从膜上提取出来再作鉴定,而提取过程本身很可能会改变受体的天然结构。Harmon^[18] 用高能电子辐射鼠肝细胞膜,电子在射程中与膜物质发生随机的相互作用使受体损伤,应用经典靶理论可分析受体失活与辐射剂量之间的关系, $A = A_0 e^{-VD}$ (A_0 ——未照射样品的生物活力。A——经剂量 D 照射后样品的生物活力。V——辐射敏感体积,代表受体功能

单位的大小,可转换成分子量)。

尽管目前人们对受体结构的认识还十分粗浅,这几年来用多种方法积累的数据相互引证也可以作出一些简单的结构模型。其中 Czeck 的模型尚能反映目前人们对胰岛素受体结构的基本认识^[19](图 8)。胰岛素受体具有类似免疫

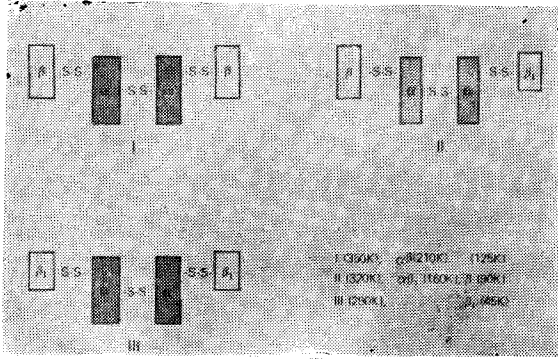


图 8 胰岛素受体结构模型示意图

球蛋白的亚基结构,即由二条重链(分子量 130,000 的 α 亚基)和二条轻链(分子量 90,000 的 β 亚基或 45,000 的 β_1 亚基)组成。亚基之间由二硫键相联,用巯基还原剂可以把它们分开;亚基本身还有链内的二硫键。130,000 α 亚基已被公认为含有受体大部分的结合部位。90,000 β 亚基用受体的抗体鉴定,确认其数量几乎与 α 亚基相等,但用光活性胰岛素标记时往往看不到。至于 45,000 β_1 亚基的确实性尚有争论,有人认为它可能是 β 亚基的水解产物。现在还认识到膜中的受体在生理状态下是以多种寡聚体形式存在的,即 $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta\beta_1$, 或 $\alpha_2\beta_1\beta_2$, 甚至 α ^[20]。总之,用不同的方法,不同的受体来源,不同的试剂,其分析结果不完全一致。从目前情况看来,要最终解出受体的结构,还存在一定的困难。

受体的研究还处于起始阶段,受体识别激素与之结合后发生的在各种水平上的激素生物效应是极其复杂的,通过的途径也可能很不相同。有人认为与其他多肽激素类似,存在着一个第二信使系统传递信息^[21];有人认为胰岛素-受体复合体穿过质膜进入细胞内,其本身起着第二信使的作用^[2]。对各种动物来源的胰岛素

受体的研究表明它们的功能极其相似,似乎在进化上要比胰岛素保守得多^[22]。受体亦可在不同程度上识别与它的激素结构功能类似的其他激素。譬如胰岛素可以与类胰岛素生长因子的受体结合而发挥刺激生长的生物功能,而类胰岛素生长因子可与胰岛素受体结合而发挥胰岛素的生物功能,但亲和力和活力要低得多^[23]。必须把胰岛素分子结构与功能的研究推广到与受体的相互作用以及在各级水平上的生物功能的研究才能最终解决胰岛素的作用机制问题。

参 考 文 献

- [1] Roth, J. *Metabolism*, **22**, 1059, 1973.
- [2] Freychet, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1833, 1971.
- [3] Cuatrecasas, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1264, 1971.
- [4] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 1980, 1972.
- [5] Gordon, P.: *Diabetologia*, **18**, 263, 1980.
- [6] Roth, J.: *Methods Enzymol.*, **37**, 223, 1975.
- [7] Seatchad, G.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51**, 660, 1949.
- [8] De, Meyts, P. et al.: *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, **54**, 154, 1973.
- [9] Blackard, W. G. et al.: *Endocrinology*, **103**, 548, 1978.
- [10] Flier, J. S. et al.: *Science*, **190**, 63, 1975.
- [11] Van Obberghen, E. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1052, 1981.
- [12] Maturo, J. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3070, 1978.
- [13] Lang, U. et al.: *Endocrinology*, **106**, 40, 1980.
- [14] Pilch, P. F. et al.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 3375, 1979.
- [15] Thamm, P. In "Insulin Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones", (Brandenburg, D. and Wollmer, A. ed.) Walter de Gruyter, Berlin New York, 1980.
- [16] Yip, C. C. et al.: *Biochemistry*, **19**, 70, 1980.
- [17] Lang, U. et al.: *Biochemistry*, **19**, 64, 1980.
- [18] Harmon, J. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **255**, 3412, 1980.
- [19] Massague, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7137, 1980.
- [20] Wang, C. C. et al.: *Diabetes*, **31**, 1068, 1982.
- [21] Seals, J. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 77-81, 1980.
- [22] Muggeo, M. et al.: *Endocrinology*, **104**, 1393, 1979.
- [23] King, G. L. et al.: *Diabetes*, **29**, 14A, 1980.

[本文于 1982 年 8 月 3 日收到]