

生物老年期的酶

李 忠

(河南中医学院, 郑州)

生物体内几乎所有物质的化学变化, 都是通过酶的催化反应而进行的。生物的生命过程如食物的消化和吸收、肌肉收缩、抗体合成、神经冲动的产生和传递、细胞分裂和分化等都和酶促反应有关。因此, 酶性能的任何变化都会直接影响生物体的正常功能。许多研究资料表明, 老年期, 体液或某些组织细胞的酶性能异常。然而酶与衰老的内在关系是错综复杂的, 既可能是由于酶合成前或合成后的变更, 直接或间接地导致生物的衰老, 也可能由于衰老导致酶性能异常, 也或两者互为因果。

一、酶水平异常

生物老年期, 体液或某些组织细胞酶出现异常, 大多是酶的活性降低。

1. 糖代谢有关酶^[1-2] 老年期生物体对糖的利用率降低, 主要耗能的骨骼肌量减少是重要原因, 而最重要的原因乃是糖代谢有关酶活性降低。这方面研究的比较系统是晶状体。因为晶状体没有直接血供, 它的生理功能主要靠糖酵解供能。组织学分析, 晶状体的整个生命期, 包含出生后的所有细胞, 如同树的年轮一样, 从外表皮层分裂形成新的细胞层, 并不断的复盖老的纤维细胞, 从而形成晶状体核, 因此人们将晶状体外表层赤道部位视为年轻的组织细胞, 中间核部位视为老年组织细胞。Hockwin等分析了牛晶状体赤道和核部位糖酵解酶系活性, 结果以老年组织(核)和年轻组织(赤道)比较, 前者此类酶的活性普遍下降(见表1)。其中活性下降最多的酶有: 磷酸化酶、甘油酸脱氢酶、醛缩酶、磷酸果糖激酶、己糖激酶等。由于这些酶活性下降, 使糖酵解供能异常降低, 以致使晶状体能源供应受阻, 进而影响晶状体透明度及其正常生理功能。这也是造成老年期白

内障增多的根源之一。

肝脏是糖代谢的主要脏器。肝脏老化, 如血供障碍, 细胞体积缩小, 数量减少等, 对糖代谢都有重要影响。从小鼠肝脏糖代谢酶系的研究表明, 许多酶如醛缩酶、乳酸脱氢酶的活性随年龄增长而下降, 致使糖利用缓慢, 供能不足。老年期有些组织由于亚细胞膜的组成和功能异常而影响酶的活性, 如从健康山羊脊髓获得的细胞, 经组织化学试验表明, 由于溶酶体的作用, 使琥珀酸脱氢酶和酸性磷酸化酶活性随年龄增长(从出生到5岁)而显著增加。

2. 有关脂质代谢的酶^[3] 这些酶的活性大多随年龄增加而下降。食物脂肪首先在小肠消化水解为脂肪酸, 脂肪酸在肠粘膜单酸甘油酯酯酰移换酶作用下再脂化, 才能被吸收。人和大鼠肠粘膜中该酶活性随年龄增长而下降。因再酯化作用降低, 使老年人脂肪吸收减少。

合成胆固醇的限速酶 HMG-CoA 还原酶, 在肝微粒体中, 其活性随年龄增加而下降。脂蛋白脂酶(LPL)和卵磷脂-胆固醇脂酰转移酶(LCAT)活性也随年龄增加而下降。在老年动物的肝脏中, 将胆固醇转变为胆汁酸的限速酶 7- α -羟化酶和侧链切断酶的活性显著降低。由此可见, 老年期体内不仅合成胆固醇的作用下降, 转化为胆汁酸的排泄率也降低, 特别是后者大大超过前者, 再加上 LPL 和 LCAT 活性降低, 使细胞内胆固醇代谢不能正常进行, 故细胞中胆固醇堆积。

3. 有关能量代谢的酶^[4-5] Gambert 1983 年首次报告了 63 岁以上老年人红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性变化。受检者是 63—100 岁(平均 76.3 岁)的老年人, 体重在理想体重 15% 之内, 经物理、临床病史、血液学等检查均无疾病。早餐 2 小时后采血、制备红血球膜悬浮液。

表1 牛晶状体的酶活性

酶	活性 mU/mg 蛋白质			年龄(岁)
	赤道 (E)	核(N)	E/N (比)	
葡萄糖激酶	0.005	0		4
己糖激酶	0.3	0.02	15	5
己酮糖激酶	0.3	0.06	5	2
醛缩酶	0.6	0.03	20	5
6-磷酸葡萄糖脱氢酶	0.7	0		4
磷酸化酶	3	0.1	30	5
醛糖还原酶	3	0.9	3.3	4
葡萄糖脱氢酶	3	0.5	6	6
磷酸葡萄糖变位酶	4	2	2	4
磷酸果糖激酶	8	0.5	16	4
苹果酸脱氢酶	8.3	2.8	3	5
甘油酸脱氢酶	8.4	0.15	56	6
乳酸脱氢酶	8.5	4	2.1	5
UDPG-磷酸化酶	11	2	5.5	5
磷酸甘油酸变位酶	90	20	4.5	1
磷酸甘油醛脱氢酶	116	14	8.2	1
烯醇化酶	204	47	4.3	11
磷酸葡萄糖异构酶	300	120	2.5	4
磷酸甘油酸激酶	314	150	2.1	1
丙糖异构酶	360	170	2.1	6
谷胱甘肽还原酶	1.5	0.7	2	5
谷胱甘肽过氧化酶	7.5	6.0	1.2	5

以每小时每毫升干重膜释放无机磷的 nmol 表示 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATP}$ 酶活力,并以 18 名 28—35 岁(平均 30.9 岁)的健康人做对照,结果老年组为 14.5 ± 9.3 nmol,年青组为 32.3 ± 10.8 nmol,两组有显著差异 ($P < 0.001$),可见 $\text{Na}^+-\text{K}^+\text{ATP}$ 酶活性随年龄下降。由于该酶产热占细胞总热能 50%,故认为,老年生物产热不足可能主要是该酶活性下降的缘故。

Urdal 等曾测试了与能量储存有关的肌酸激酶活性随年龄变化的关系。按出生、出生后 4 天、1、8、14、25、40、65 岁等分为 8 组,分别测其血清浓度。结果表明,血清肌酸激酶浓度随年龄增加而下降,尤其是出生初期,如一岁组平均为 $9.2 \mu\text{g/L}$,仅为刚出生的 1/25,为 4 天组的 1/2,但仍比成年组高 4 倍。

4. 有关激素代谢的酶^[6-8] 老年生物体的激素代谢异常,激素合成或灭活降低,均与有关酶活性下降有关。如有人测试了催化雌二醇转变为雌酮的 17- β -羟固醇脱氢酶 (17- β -SDH)

活性。在羊的子宫肌细胞培养液中加入 [^3H]-雌二醇,孵育一定时间后,测定细胞和细胞间液形成的雌酮,结果,孵育三分钟后,每个细胞都有雌酮形成,其含量随细胞年龄增加而下降。

Roti 测定了不同妊娠期大鼠胎盘的甲状腺素脱碘酶活性;碘化甲腺氨酸脱碘酶将 T_4 转化成 rT_3 。从妊娠 12、14、16、18、20 天的大鼠胎盘匀浆上清液的测定结果看出,该酶活性在妊娠 16 天达最高水平,14、18、20 天分别为 16 天的 52%,77%,41%,有显著差异。妊娠 18 天羊水中 rT_3 浓度达最高水平,妊娠 16、20 天分别为 18 天的 61%,64%,也有显著差异。妊娠 20 天母体血 T_4 的浓度,也比 14、16、18 天降低,并且有显著差异。大鼠 T_4 -5' 脱碘酶活性的基础水平,5—6 周龄时最大,成年后下降,成人和胎儿的结果一致。

5. 其他酶^[9-11] Fujita 等 1982 年首次报告了 114 例正常人脑脊髓液中多巴羟化酶活力的正常值,他们用酪氨酸做底物,以每分钟形成

的对羟苯- β -羟乙胺的毫克分子数做为酶活力的指标,用荧光扫描高压液相法测定,结果表明,10—15岁,脑脊髓液中多巴羟化酶活力几乎恒定,50岁以后尤其70岁以后明显下降(表2)。该酶主要来自脑的去甲肾上腺素能神经,因而脑脊髓多巴羟化酶活力高低可做为中枢此类神经活动的一个指标。

表2 脑脊髓液多巴羟化酶活力正常值

年龄(岁)	活力 $\mu\text{mol}/\text{分钟}/\text{升}$	
	范围	均值 $\pm$ SD
6	—	0.075
10—19	0.051—0.241	0.163 $\pm$ 0.082
20—29	0.009—0.349	0.147 $\pm$ 0.099
30—39	0.018—0.525	0.163 $\pm$ 0.106
40—49	0.018—0.327	0.159 $\pm$ 0.088
50—59	0.048—0.379	0.129 $\pm$ 0.102
60—69	0.048—0.267	0.136 $\pm$ 0.072
70—77	0.009—0.265	0.101 $\pm$ 0.099
6—77	0.009—0.379	0.146 $\pm$ 0.094

体内苯丙氨酸可转化为酪氨酸,这种转化也随年龄增加而下降。Jagenburg 研究了L-苯丙氨酸代谢动力学,对50名22—68岁男女健康者,按两室模型设计,于清晨空腹静脉注射苯丙氨酸 300 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体重,用离子交换层析色谱测定注射前后血清苯丙氨酸和酪氨酸浓度,结果苯丙氨酸的总清除率随年龄增加而显著减少,尤其是50岁以上者,每增加10岁减少约5%,说明组织细胞中酶的活性随年龄增加而降低。

在大鼠的肝、肺、心、肌肉中,合成环核苷酸的核苷酸环化酶和分解环核苷酸的磷酸二酯酶活性,也随年龄增长而下降,且以核苷酸环化酶活性下降最显著。

二、酶分子性能异常^[11,12]

许多研究表明,老年动物体内某些酶的电泳行为、免疫活性、热变性等发生异常。这些异常常归因于酶蛋白合成后不能正常修饰,或者是蛋白质发生结构变化。

Hiremath 等研究了大鼠肝中磷酸甘油酸激

酶的性能,发现幼年大鼠(8—10月龄)肝和老年大鼠肝(29—30月龄)中的磷酸甘油酸激酶的 K_m 、分子量、离子,N-末端和C-末端都无变化,但贮藏稳定性、热敏感性、免疫特性均有差异。若贮藏于4℃,老年大鼠酶活性开始下降只需40小时,而幼年大鼠则需100小时;造成大鼠0.4单位磷酸甘油酸激酶失活50%,老年大鼠需80 $\pm$ 3微升抗血清,而幼年大鼠只需72 $\pm$ 1微升,两者有显著差异。老年大鼠再生2天的肝和幼年大鼠肝的酶性质相似;再生4天的肝,酶免疫活性开始老化;再生5天的肝,酶的贮藏稳定性也开始老化;再生9天的肝,酶的各种性能都表现老化。从乳酸脱氢酶的研究也表明,老年大鼠(29月龄)再生2天的肝和幼年大鼠肝的酶特异活性一样,进而可知,老年大鼠和幼年大鼠具有相同的酶蛋白合成的基因编码。已知,衰老动物肝脏蛋白质合成明显降低,蛋白质周转率下降,这和老年大鼠肝脏酶的老化性能一致,这说明,酶的老化是由于蛋白质合成后发生了结构变异。

从老年动物晶状体或晶状体的老年部位(核)提取的酶,其性能也发生异常。某些酶有较大的电泳迁移率,接近阳极,也有些酶移向阴极。在57℃时,醛缩酶和磷酸果糖激酶对热不稳定性随年龄增长而增加。用凝胶过滤法分析牛晶状体的核和赤道的水溶性蛋白,结果表明,磷酸甘油酸变位酶、烯醇酶和磷酸果糖激酶的分子量和形状都发生了变异,说明这些酶分子的结构和形态也不是长期稳定的。用免疫法测定不同年龄的兔和大鼠晶状体的磷酸果糖激酶和醛缩酶,结果表明,老年晶状体或晶状体的老年部位(核)中,这些酶的无活性分子大大增加,可以判断这些酶的性质变化发生在蛋白质合成之后。晶状体蛋白质不像其他组织的蛋白质能不断地进行自我更新,晶状体蛋白质寿命较长,老年晶状体的周转率显著下降,可能是蛋白质合成后发生了分子变异,使得酶性能变更,因而出现无活性分子酶,表现出酶活性下降。

老年动物的同工酶谱也有一定变异。同工酶是酶的不同分子形式,含有两个以上的亚基,

属于多聚体,不同的亚基由各自的基因编码合成。若基因编码的致活因素或抑制因素发生变异,则所合成的各种亚基比例表现异常,最后导致同工酶谱异常。例如丙氨酸氨基移换酶(CAAT),是由亚基A和亚基B组成的二聚体,它有两种同工酶 CAAT-A 和 CAAT-B。用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定大鼠肝胞浆,结果表明,成年大鼠含有这两种同工酶,幼年大鼠仅含 CAAT-A,老年大鼠仅含 CAAT-B。乳酸脱氢酶(LDH)属于亚基H和亚基M组成的四聚体,有5种同工酶: H_4 , H_3M_1 , H_2M_2 , H_1M_3 , M_4 。老年动物的 H_4 增加, M_4 和 H_1M_3 减少。醛缩酶有三种同工酶(A、B和C),老年动物同工酶A明显下降。其他如丙酮酸激酶、肌酸激酶,腺苷酸激酶等同工酶谱,老年期也发生变化。

三、酶的诱导异常

当有诱导剂和反应底物、代谢物、激素及某些化学物质存在时,或受到某一特异刺激物如温度、食物刺激时,某些酶蛋白的合成便增加,这是机体的一种特异应答反应,是一个适应性过程。老年人和老年动物这种适应能力显著地变的迟缓,某些酶的诱导发生异常,如诱导合成酶的潜伏期延长或缩短,诱导合成酶的数量增加或减少,诱导合成酶的速度增快或减缓等。

1. 气温和食物的诱导^[13,14] 寒冷环境可诱导肝酪氨酸转氨酶的产生,加速酪氨酸转氨基形成乙酰乙酸和延胡索酸,后者参入三羧酸循环,加强产热反应,以增强抵御寒冷的能力。老年小鼠(24日龄)和幼年小鼠比较,这种诱导作用的潜伏期大大延长。又如食物诱导糖酵解酶系的合成,当饥饿的大鼠再喂饲时,老年大鼠与成年大鼠比较,这种诱导作用显著减缓。葡萄糖对肝脏葡糖激酶的诱导作用潜伏期随年龄增长而延长。高蛋白膳食诱导葡糖6磷酸酶,其诱导程度在老年大鼠中显著下降。

2. 激素的诱导^[15-17] 雌二醇能诱导大脑半球乙酰胆碱酯酶的合成,老年动物这种作用显著降低。7、44、108周龄去卵巢大鼠的大脑半球匀浆再和 $[^3H]$ 雌二醇孵化一定时间,再测定

雌二醇特异结合蛋白,结果发现这种蛋白结合雌二醇的特异性随年龄增长而降低,对酶的诱导作用也随年龄增长而下降。这可能因大脑半球雌二醇受体减少,因而失去应有的诱导效应。

类固醇激素诱导 RNA 聚合酶 II 的合成,其诱导过程是:首先激素和胞质中两种不同分子的受体A和受体B结合,每个受体各结合一分子激素,然后激素-受体A和激素-受体B相互结合,形成复合物而活化,最后移向核内染色体,诱导 RNA 聚合酶 II 的合成(见图1)

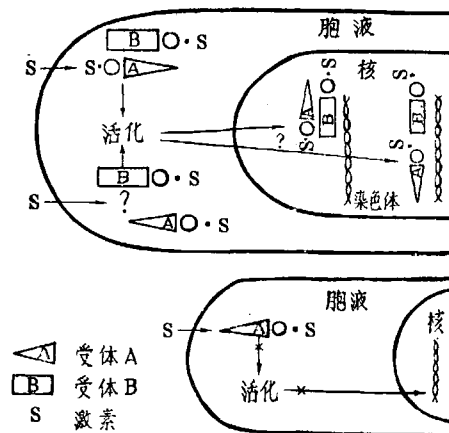


图 1

Boydleinen 等研究了鸡的输卵管类固醇激素受体浓度以及激素对 RNA 聚合酶 II 的诱导作用,先将分离的鸡输卵管,注入 $[^3H]$ -雌激素使和受体结合,再以 Sephadex G-75 等电聚焦法分离测定标记的受体 A(PI:7) 和受体 B(PI:6); 另外再将未标记的雌激素注入鸡体,一小时后杀死,分离输卵管,提取细胞核,测定 RNA 聚合酶 II 活性,结果,生蛋鸡和 不生蛋老鸡输卵管细胞胞液中激素受体浓度分别是 $45,526 \pm 12,200$ 和 $10,993 \pm 3,338 \mu/\text{细胞}$,受体 B 和受体 A 的比值(B/A)分别为 0.7 和 <0.2 ,不生蛋鸡因受体 B 显著减少,激素不能被位移入核,结果核染色体 RNA 聚合酶 II 活性降低, RNA 合成量也随之大大降低。可见老年期雌激素诱导酶的效应降低,是由于激素受体的调节机能降低造成的。

6 磷酸葡萄糖酶活性随年龄增加而降低, 但 T_3 对大鼠肝微粒体 6 磷酸葡萄糖酶的诱导作用, 老年组显著高于青年组, 由于 T_3 的诱导, 消除了该酶活性的年龄差异. 该诱导酶的年龄差异被认为是衰老的表现. TSH 诱导甲状腺中的碘甲腺原氨酸单脱碘酶的合成, 该酶使 T_4 转变为 T_3 , 并使 T_3 和 rT_3 转变为 T_2 . 用 TSH 处理狗, 狗甲状腺中该酶的活性显著增强. 增加 V_{max} 值(T_4 由 12.3 增加为 53.4 pmol, T_3 由 25.3 增加到 112 pmol, rT_3 由 113 增加到 272 pmol), 并大大加强 T_4 和 T_3 的转换率. 老年动物 TSH 对甲状腺的效应显著高于青年动物, 因此, 该脱碘酶在内源 TSH 作用下合成增加, 活性加强, 甲状腺激素的转换率也大大增加, 致使老年动物甲状腺的 T_4 和 T_3 含量下降.

参 考 文 献

[1] Ohrloff, C. et al.: *J. Gerontol.*, 38(3), 271,

1983.

[2] Vyas, K. N. et al.: *Indian J. Animal Sci.*, 6, 396, 1982.

[3] 野间昭夫:《日本临床》, 39, 536, 1981.

[4] Gambert, S. R. et al.: *J. Gerontol.*, 38, 23, 1983.

[5] Urdal, P. et al.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 42, 621, 1982.

[6] Vallet-Strouve, et al.: *J. Steroid Biochem.*, 17, 95, 1982.

[7] Roti: *Endocrinol.*, 111, 959, 1982.

[8] Tamatu, S. et al.: *Pediat. Res.*, 16, 377, 1982.

[9] Fujita, K. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 1405, 1982.

[10] Jagenburg, R. et al.: *ibid.*, 28, 205, 1982.

[11] 折茂肇·他:《日本临床》, 39, 564, 1981.

[12] Hiremath, L. S. et al.: *J. Gerontol.*, 37, 680, 1982.

[13] Marx, J.: *Science*, 186, 1196, 1974.

[14] Adelman, R. C. et al.: *Federation Proc.*, 38, 1968, 1979.

[15] Boyd-leinen, P. A. et al.: *Endocrinol.*, 111, 30, 1982.

[16] WU, S-Y: *Endocrinol.*, 112, 417, 1983.

[17] Dobrosielski-Vergona, K. et al.: *Endocrinol.*, 111, 953, 1982.

[本文于1984年1月15日收到]

钙调蛋白的结构与功能(下)

徐 友 涵

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

四、钙调蛋白的构象

CaM 分子本身无酶的活性, 在无 Ca^{2+} 情况下, 也无生物活性. 自从 1973 年 Teo 等人鉴定它是一种钙结合蛋白以来, 人们用各种物理、化学手段发现 Ca^{3+} 的结合引起蛋白强烈的构象变化, $Ca^{2+} \cdot CaM$ 复合物才能与靶蛋白结合形成一个活性全酶, 因此 CaM 构象问题是其调控机制的中心问题.

1. 研究构象的方法

(1) 圆二色性与紫外差谱的研究 Klee 测定 CaM 的远紫外 CD 谱, 在 EGTA 存在下, 椭圆度 $[Q]_{221nm} = -11500$ 度 $\cdot cm^2/分 \cdot 克分子$, 相当 35% 螺旋, 50% 无规卷曲, 20% β -折迭. 而在 0.3mM Ca^{2+} 存在下, $[Q]_{221nm}$ 增加约 20%, 相当于 α 螺旋增加 5—8%, 无规卷曲相

应减少, 换言之, CaM 分子结构因 Ca^{2+} 的结合而变得更加致密. CaM 的近紫外 CD 谱也得到类似的结果.

紫外差谱证明 Ca^{2+} 结合后, CaM 中 Tyr、Phe 残基的微环境都有变化. 用 Ca^{2+} 滴定时, CaM 在 279、286nm 的吸收值降低, 其差谱出现双负峰, 表示 Tyr 吸收在结合 Ca^{2+} 时蓝移, Klee 认为负差谱可解释为 Ca^{2+} 结合引起 Tyr 残基更加暴露. Tyr 的 pK 值在 Ca^{2+} 结合后由 10.4 下降到 10.1, 似乎也支持这一说法.

(2) 荧光光谱的研究 脊椎动物 CaM 含 Tyr 138, Tyr 99 常作为内源性荧光探针使用. CaM 不含色氨酸, 其荧光谱属于典型的 A 类蛋白, 在 305nm 处有一特征荧光峰. Ca^{2+} 结合后, 其内源荧光量子产率增加约 2.5 倍. Kilhoffer 比较鼠睾丸与章鱼 CaM(后者只含有一个 Tyr 138)