

differentiation and evolution in multicellular animals. The medullary thyroid carcinoma (MTC) or osteoporosis would arise supposing that the abnormal expressive regulation

occurs.

Key words calcitonin, calcitonin gene related peptide, alternative expression, medullary thyroid carcinoma

二酰基甘油调控细胞功能的机制

孙俊辉 朱培阁

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 二酰基甘油 (DG) 是一些磷脂水解产生的一种有重要功能的第二信使, 它主要通过激活细胞内的蛋白激酶 C (PKC) 进而磷酸化一系列底物蛋白, 产生相应的细胞效应。在细胞整体水平, DG 还是一种重要的脂类物质的代谢中介产物, 通过若干代谢途径参与脂类和激素代谢循环。目前, 有关 DG 调控细胞生理功能的研究, 主要集中在细胞信号转导方面。

关键词 二酰基甘油, 肌醇磷脂, 第二信使, 细胞信号转导, 蛋白激酶 C

二酰基甘油 (diacylglycerol, DG), 作为一种中性脂类物质, 广泛地存在于动物体的各种组织细胞中。在生物膜的磷脂双分子层结构中, DG 是形成多种磷脂的重要前体。在复杂的脂类物质代谢中, DG 又是重要的中介产物。此外, DG 作为多种激素的前体或中介物还在生物体激素水平调控中起重要作用。特别重要的是, 随着人们对细胞信号转导机制研究的逐步深入, 发现 DG 还是重要的第二信使物质, 它可以将外界的刺激信号, 通过激活细胞内的一种重要的蛋白激酶 C (PKC), 并磷酸化各种底物蛋白, 产生相应的生物学效应^[1,2]。本文将重点阐述 DG 与细胞信号转导的关系。

1 细胞内 DG 的来源及代谢途径

二酰基甘油, 按其化学命名即为甘油骨架上的两个羟基以酯键与两个脂肪酸相连。由于只有脂肪酸链在甘油骨架第 1、2 位上的二酰基甘油, 即 Sn-1, 2-DG 才对 PKC 有明显的激活作用, 而其异构体 Sn-1, 3-DG 及 Sn-2, 3-DG 对 PKC 的活性几乎都没有影响, 所以研究热点集中在 Sn-1, 2-DG (以下简称 DG)。

如图 1 所示, 细胞内 DG 的形成主要通过以下四条途径: a. 由磷脂酶 C (PLC) 直接水解或通过磷脂酶 D/磷酸酶 (PLD/PAP) 途径间接水解某些磷脂; b. 磷脂酸 (PA) 通过相应的磷酸酶的水解; c. 三酰基甘油在脂酶作用下的水解; d. 单酰基甘油在酰基转移酶作用下的酯化。其中前两种形成 DG 的途径与细胞信号转导机制有关, 而后两种主要与体内的脂类代谢平衡相联系。

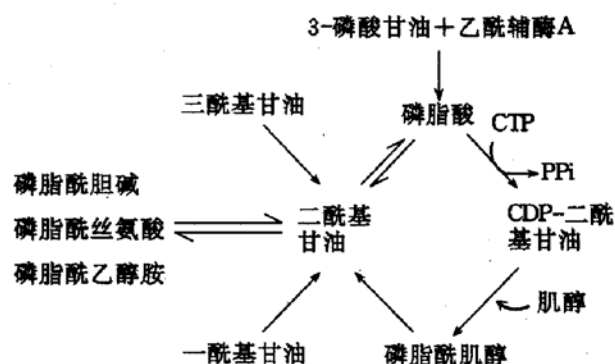


图 1 与形成二酰基甘油有关的脂类代谢途径

CTP: 三磷酸胞嘧啶, CDP: 二磷酸胞嘧啶, PPI: 无机焦磷酸。

DG 在细胞水平的代谢较为复杂, 受许多相关酶类的调控, 其中包括: 第一, 参与 DG 与 PA 直接相互转化的酶, 即把 DG 磷酸化为 PA 的 DG 激酶 (DGK) 和把 PA 水解为 DG 的 PA 磷酸酶 (PAP). 目前, 已分别发现了这两种酶的特异抑制剂, 并已开始应用于研究 DG 和 PA 的相互转化, 如: DGK 的抑制剂 R_{59022} , PAP 的抑制剂心得安和神经鞘氨醇^[3]. 第二, 各种底物及作用位点特异的磷脂酶. 由于各种磷脂酶对不同磷脂的作用位点不同, 因而形成的产物也不同 (图 2).

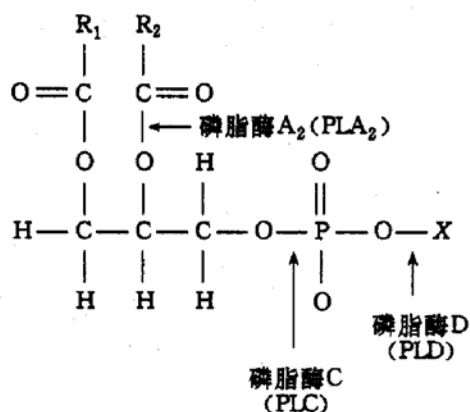


图 2 不同磷脂酶作用于甘油磷脂的位点
X 代表所结合的不同基团.

判断 DG 来源的主要依据是对其脂肪酸组成的分析^[4], 由于组成不同磷脂的脂肪酸类型和比例不同, 所以不同生理来源的 DG 脂肪酸成分亦不同. 专一地水解磷脂酰肌醇的磷脂酶 C (PtdIns-PLC) 已被广泛研究, 它的水解产物之一便是 DG; 另一水解产物是三磷酸肌醇 (IP_3), 它作为第二信使对胞内钙有重要的调控作用. 虽然钙与 DG 协同调控 PKC 活力, 但 IP_3 的作用基本上是独立的, 因此本文将不对此做进一步叙述. 在有关细胞内 DG 来源研究方面新近的一个重要进展是, 在许多实验中已经注意到细胞内 DG 的增加有两个时相, 即出现 DG 累积的“双峰” (图 3). 进一步的研究表明, 开始短暂 DG 的形成 (从细胞接受信号到持续的几分钟内) 主要是由 PtdIns-PLC 水解而来, 由此产生的 DG 通过激活 PKC 进而活化

PLD. 以后 DG 的持续升高 (在某些细胞内可能会维持数小时) 则是磷脂酰胆碱 (PC) 或磷脂酰乙醇胺 (PE) 特异的磷脂酶 D/磷酸酶 (PLD/PAP) 水解的结果, 即 PC 或 PE 先在 PLD 作用下生成 PA, 然后再在 PAP 的作用下生成 DG, 即存在一个 DG 生成的正反馈调节^[5].

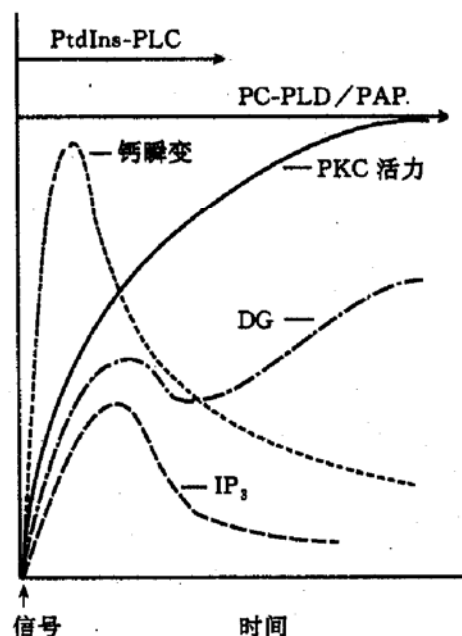


图 3 细胞受刺激或激动剂短暂作用后伴随 PKC 激活的 DG 累积“双峰”示意图

2 DG 的一般生物学效应

DG 对细胞生理功能的调控主要表现在以下几个方面: a. 定位、转运于细胞质膜或各种细胞器膜而参与维持和调控膜的结构和功能; b. 相应于细胞的不同生理条件而影响脂类的代谢水平; c. 作为合成前列腺素等激素的花生四烯酸代谢产物的前体; d. 通过激活 PKC 进而调控细胞的生理功能. 近年来, 随着对肌醇磷脂信使系统和细胞信号转导机制研究的逐步深入, 发现 DG/PKC 信号转导途径与诸如细胞生长、分化, 肿瘤的发生以及神经信号转导等生理功能有着密切的关系, 所以对这一信号转导途径的研究已成为目前生物学研究十分活跃的领域之一. 以下将重点探讨 DG/PKC 途径调控细胞功能的机制.

3 DG/PKC 途径调控细胞功能的机制

自 1977 年 Nishizuka 等^[6]最先报道存在一种钙/酸性磷脂依赖的蛋白激酶,即现在所称的 PKC 以来,已有许多工作表明 DG 在激素或神经递质引起的细胞信号转导过程中起着非常重要的第二信使作用,即它可以通过结合并激活 PKC 进而调控蛋白磷酸化,从而产生一系列细胞效应。

迄今已明确在动物组织细胞中 PKC 至少有 10 种亚型,它们的激活大都需要磷脂酰丝氨酸(PS)和 DG. 分子生物学的研究进一步表明,PKC 分子一般包含 5 个可变结构域($V_1 \sim V_5$)与 4 个保守结构域($C_1 \sim C_4$). 在 N 端的 V_1 结构域有一个自抑制的假底物区段,通常它占据了催化中心的底物结合位点而使 PKC 处于无活力状态. 当 DG 及 PS 与 C_1 的结构域结合后,即引起 PKC 构象变化,暴露出原先抑制其自身活性的假底物区段,从而激活 PKC^[7].

PKC 激活都表现为 PS 依赖的,但对 DG 和 Ca^{2+} 的需求程度却不同. 对于钙依赖型 PKC (cPKCs), DG 促使 PKC 与膜上 PS 结合的同时, DG 甘油骨架第 1, 2 位羰基和第 3 位羟基与钙形成配体,最终形成激活形式的 PKC-PS- Ca^{2+} 复合体. 整个过程中, DG 与 Ca^{2+} 形成配体是激活 PKC 的重要步骤,并且可能其中存在着某种“引爆”(prime)机制. 而钙不依赖型或称新型 PKC (nPKCs),由于缺少结合钙的 C_2 结构域,只要在 PS 和 DG 存在情况下就能被有效激活. 此外,还存在与上述两类 PKC 不同的非典型 PKC (aPKCs),只需 PS 就能被有效激活,而 DG 或佛波酯却不影响其活力.

在细胞中 PKC 被激活的一个重要特征是该酶从胞浆向膜上的移位(translocation)^[8]. 在对骨骼肌 PKC 活力变化的研究中, Cleland 等^[9]在经电刺激的大鼠骨骼肌上发现伴随 DG 积累的 PKC 向膜上的移位现象. 我们实验室最近的工作表明,经高钾暴露而兴奋的蛙骨骼肌中也有显著的 DG 累积和 PKC 由胞浆向膜移位的激活现象(待发表). 同时也有许多研究表

明, DG 激酶(DGK)可直接被 PKC 磷酸化,磷酸化的 DGK 也存在着由胞浆向膜的移位过程,而且这一过程是 DGK 活化所必需的^[10]. 从而可以推测, DGK 可能通过控制细胞内 DG 的变化来调控 PKC 的活力,并最终影响一系列磷酸化过程,同时 PKC 对 DGK 的反馈调节可能又是通过各自对 DG 的竞争而实现的.

作为肿瘤促进剂的佛波酯,如 TPA (12-O-十四烷酰佛波醇),其分子结构和 DG 相似,故推论它采取与 DG 同样的机制激活 PKC. 由于它们是亲脂性的,可与膜牢固结合,而且缺乏像 DG 能被 DGK 或脂酶迅速降解的终止机制,所以佛波酯对 PKC 的激活较 DG 远为持久. 此外,佛波酯还可以使细胞内的 DG 直接增高,从而对 PKC 的激活起正协同效应^[11]. 在这里,佛波酯并不直接促进磷脂酰肌醇降解,而是通过激活 PKC 从而促使 PC-PLD 酶对 PC 水解生成相应 DG 的能力增加,并进一步地正反馈激活 PKC,从而使得细胞内此种蛋白激酶的活力异常增高. 佛波酯和 DG 在 PKC 上的结合位点不同,而且这两种物质可能还存在对 PKC 结合的竞争性抑制^[12]. 新近还发现另外一种激酶,即蛋白激酶 D (PKD). 该酶的调节区段与 PKC 有高度的同源性,而催化区段表现出较大的差异性,但它同样也能被佛波酯和 DG 激活^[13]. 上述结果提示, DG 和佛波酯激活这些酶可能主要是它们与这些酶调节区段发生某种作用的结果.

各种细胞对外界刺激信号应答所产生的 DG 来源和成分是不同的,这就使得作为信使的 DG 作用相当复杂. 例如:有研究表明,脂肪酸结构不同的 DG 或佛波酯激活各亚型 PKC 的程度和作用方式是不同的^[14]. 综合近年文献来看,磷脂酰肌醇来源的 DG (主要含花生四烯酸)激活的 PKC 可能和细胞的早期应答反应有关,如激素和神经递质分泌或释放等;而磷脂酰胆碱来源的 DG (主要含肉桂酸)可能与后期的应答如细胞生长或分化有关. 这样,细胞可以在不同时间里产生不同类型的 DG,从而选择性地激活不同亚型的 PKC,以此作为细

胞对刺激信号的应答^[15] (图 4)。

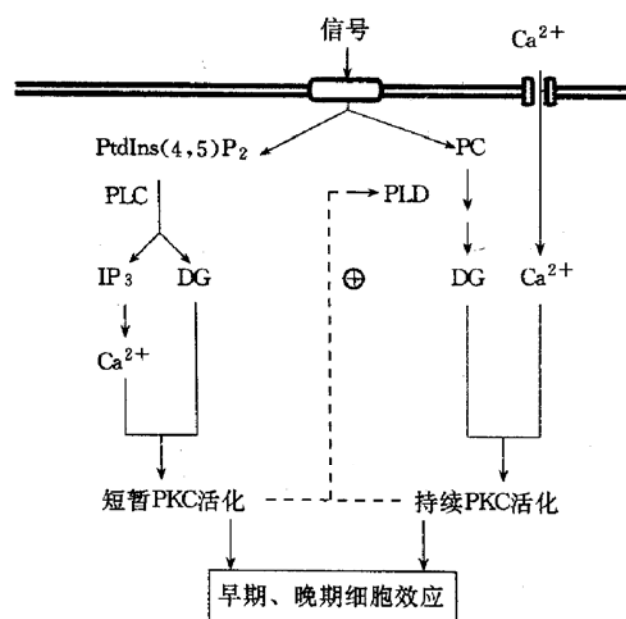


图 4 DG/PKC 信号转导途径对细胞生理功能的调控

PtdIns (4, 5) P₂: 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇; IP₃: 1, 4, 5-三磷酸肌醇. 图中虚线所示为 PKC 对磷脂酶活化进一步生成 DG 的正反馈调节。

4 研究展望

近年来有关 DG/PKC 信号转导的研究主要集中在两个方面: 第一, 应用有关 DG 生化代谢的酶学研究, 通过对细胞内 DG 含量及其组分的测定, 以揭示从激动剂到靶酶这一信号转导中介环节的具体机制. 第二, 利用 DG 及其类似物 (包括佛波酯) 能激活 PKC 的“引爆”性质, 将其做为一种工具应用于 PKC 蛋白磷酸化的细胞效应研究之中. 目前, DG/PKC 这一信号转导途径中还有许多方面值得探讨. 例如: 从 DG 对 PKC 激活的选择性来看, 细胞内产生 DG 的类型及时间的差异与激活的 PKC 亚型之间的关系将是今后研究的一个重点目标. 此外, 对 DG 类似物包括佛波酯的应用和研究, 也将成为今后研究的一个热点。

参 考 文 献

- 1 Nishizuka Y. Science, 1992; **258**: 607
- 2 Berridge M J. Nature, 1993; **361**: 315
- 3 Kanoh H, Yamada K, Sakane F. Trends Biochem Sci,

1990; **15**: 47

- 4 Kanoh H, Sakane F, Imai S *et al.* Cellular Signalling, 1993; **5**: 495
- 5 Exton J H. J Biol Chem, 1990; **265**: 1
- 6 Takai Y, Kishimoto A, Nishizuka Y *et al.* J Biol Chem, 1977; **252**: 7603
- 7 Newton A C. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1993; **22**: 1
- 8 Lester D S, Epand R M. Protein kinase C: current concepts and future perspectives. England: Ellis Horwood Ltd, 1992: 41~61
- 9 Cleland P J F, Appleby G J, Rettigan S *et al.* J Biol Chem, 1989; **264**: 17704
- 10 Payraastre B, Henegouwen P M P, Breton M. J Cell Biol, 1991; **115**: 121
- 11 Bazzi M D, Nelsestuen G L. Biochemistry, 1989; **28**: 9317
- 12 Slater S J, Kelly M B, Taddeo F J *et al.* J Biol Chem, 1994; **269**: 17160
- 13 Valverde A M, Sinnott-Smith J, Lint J V *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; **91**: 8572
- 14 Evans A T, Sharma P, Ryves W J *et al.* FEBS Lett, 1990; **267**: 253
- 15 Siddle K, Exton J C. Peptide hormone action: a practical approach. Cambridge: IRL Press, 1990: 184~187

The Mechanisms of the Modulation of Cellular Functions by Diacylglycerol. Sun Junhui, Zhu Peihong (Shanghai Institute of Physiology, Academia Sinica, Shanghai 200031, China).

Abstract Diacylglycerol (DG), a product of the hydrolysis of some phospholipids, is thought to play important functions as a second messenger. DG can activate intracellular protein kinase C (PKC), which in turn phosphorylates a variety of proteins and generates cellular effects. On the other hand, as an important intermediate of lipid metabolisms, DG *in vivo* is also involved in regulating lipid metabolisms and hormone cycles. The present researches on the mechanisms of the modulation of cellular functions by DG, are mostly concentrating on its effects on cellular signalling transduction.

Key words diacylglycerol (DG), cellular signalling transduction, protein kinase C (PKC)
phosphatidylinositol, second messenger,

谷胱甘肽 S-转移酶基因 P1 的研究进展

刘东远 方福德

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 谷胱甘肽 S-转移酶 P1-1 在癌变细胞和抗药性肿瘤细胞中表达水平发生变化, 提示可以作为恶性转化及肿瘤抗药性的标志物。对大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因上游调控序列的研究发现在 -2.5 kb 及 -2.2 kb 各存在一增强子序列 GPE I、GPE II, -400 bp 存在一沉默子。GPE I、沉默子上均至少结合有 3 种反式作用因子。人谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因上游区域中迄今尚未发现增强子或沉默子, 但却发现了胰岛素及视黄酸的应答序列, 在癌变细胞和抗药性的肿瘤细胞中该基因表达的调控机制有别于正常细胞。

关键词 谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因, 基因结构, 基因表达调控, 肿瘤

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs, E. C. 2. 5. 1. 18) 是一多功能的蛋白质家族, 能够催化还原型的谷胱甘肽的巯基结合到多种亲电子的疏水化合物上, 经一系列代谢反应, 使这些化合物转变为亲水的易排泄的物质^[1], 因此它们在致癌物、诱变剂及其他细胞毒物的胞内解毒中起重要作用。哺乳类 GSTs 被分为 5 类: pi (π), alpha (α), mu (μ), theta (θ) 和微粒体 GST^[2], 其中 pi 类谷胱甘肽转移酶 P1-1 (GSTP1-1) 与细胞的癌变^[3]、肿瘤的形成及癌细胞的抗药性密切相关^[4]。近年来对 GSTP1-1 的研究已经深入到基因水平, 种种迹象表明 GSTP1 基因转录水平的调控是其表达调控的关键环节^[5]。因此搞清 GSTP1 基因结构及转录调控对于癌症的预防和治疗将有十分重要的意义。

1 大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因

Sugioka 等^[6]用合成的 DNA 探针在化学致癌物诱导的大鼠肝癌细胞 cDNA 文库中首先克隆到了大鼠谷胱甘肽 S-转移酶 P1 (rGSTP1) cDNA (pGP5)。Okuda^[7]以 pGP5

为探针从大鼠的基因组文库中筛到了 rGSTP1 基因。序列分析表明该基因约含 3000 bp, 包括 7 个外显子和 6 个内含子, 转录起始位点位于翻译起始位点上游 70 bp, 转录起始位点上游 200 bp 内有一富含 “G+C” (61%) 序列, -27 位置上为 TATA 盒。Sakai 等^[8]对 rGSTP1 基因 5' 上游 -2900 bp 到 +59 bp 范围内调控序列进行了分析。他们用限制性内切酶酶切制备了一系列不同长度的 5' 侧缺失片段, 分别插入细菌氯霉素乙酰转移酶 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 报告基因上游或下游构成系列缺失重组质粒, 转染到肝癌细胞系 dRLh84 中, 检测 CAT 瞬时表达水平。发现 -2.5 kb 和 -2.2 kb 处各存在一个增强子, 分别叫增强子 I (GPE I) 和增强子 II (GPE II)。其中 GPE II (-2.2 kb) 有佛波酯 (TPA) 应答序列 (TRE)。在 rGSTP1 基因转录起始位点上游 -61 bp 区还存在另一 TRE 序列, 它与 -47 位 GC 盒, -27 位 TATA 盒共同调节 rGSTP1 基因的基础转录。另外在 -400 bp 处还存在另一沉默子序列。Sakai 还发现用佛波酯刺激大