

人做过也不要紧。不同的人做一个问题会各有各的做法。这些话可以说充分体现了他的“以我为主”的态度。乍一听,他这话似乎很极端,仔细想想不无道理,因为既然问题是从手头做的工作延伸出来的,应该基本上是自己的领域,国际行情应该大概知道,用不到在杂志中得到核实才放心。

我不是劝大家不要看书、看杂志,我只是劝大家看书时要有“主心骨”,要使书中的东西为我所用,既不要变成卡片箱,储存了一大堆实验数据和结论,但是串连不起来;也不要被书本牵着鼻子走,自己没有主见,一会儿觉得这个有兴趣,一会儿又觉得那个重要,自己无所适从。

现在这个年代当然和三、四十年前不一样,生物学的技术日新月异,生物学的论文以惊人的速度积累。正因为如此,如果不以我为主,

可能还是要被动,或者甚至更厉害。如果想从文献中找题目,试想,如果你看到的是最新的文献,从作者整理材料到文章在杂志上发表出来,时间至少要半年,这半年作者不会闲着,如果工作可以引伸出有兴趣的问题,作者在半年之前就下手了。你看到文献后才做,还是跟在人家后面,一步跟在后面,步步跟在后面。

也许有人会讲,朱洗有本钱,做得到以我为主,我们没有本钱,恐怕很难做到。本钱是积累起来的,恐怕很难要求任何人一下子做到以我为主,但是认识到以我为主对科研工作的重要性,学习着从自己的工作中找题目,我想是可以逐渐做到以我为主的。我借纪念朱洗的机会提出这一点,恳切地希望大家注意,尤其希望在培养青年人时注意这一点。我认为,能不能做到以我为主,对于提高我们的细胞生物学研究水平,是至关重要的。

专论与综述

G蛋白在细胞信息转导中的作用

吕志良 张惟杰

(浙江大学生物科学与技术系 杭州 310027)

概 况

鸟苷酸结合调节蛋白(guanine nucleotide-binding regulatory proteins)曾先后被不同实验室命名为N(指具有核苷酸结合特性)蛋白或G/F(指与鸟苷酸/氟离子有关)蛋白,近年来则称之为G蛋白^[1]。G蛋白的发现和研究只有不到20年的历史,却已是继作为胞内信使cAMP现之后生物信息转导领域中又一划时代的大事。

60年代末期,在研究激素对脂肪细胞代谢的调节中发现5种不同的激素虽各有其特异的受体,却能激活同一种腺苷酸环化酶。由此推断,受激素活化的腺苷酸环化酶系统是一个多

酶体系,没有激素作用时,受体分子与环化酶各自分开,独立存在;在激素的刺激下才能联结到一起,发挥功能,这个设想在1976年用细胞融合/受体-腺苷酸环化酶重组方法得到证实。

70年代初发现:在胰高血糖素与肝细胞膜结合导致腺苷酸环化酶活化过程中,GTP起着重要的作用,接着在不同激素-靶细胞系统中证实GTP在激素对靶细胞作用中的重要意义。

(1) GTP结合成分是一种与受体及腺苷酸环化酶分开的蛋白质,分子量约为40000;(2) GTP作用位点也是GTP酶活性中心,GTP发生水解,而激素与受体的结合,促使GDP从G蛋白上释放,至此已初步勾划出G蛋白的基

本特征。

G蛋白作为细胞膜上信号转导中间环节的意义,很快超出了腺苷酸环化酶系统,得到了相当普遍的证实。在视柱细胞光信号转导中,G蛋白(称为Gt)参与调控依赖于cGMP的磷酸二酯酶活性;在绿头苍蝇唾液中,G蛋白参与调节5-羟色胺对磷脂酶C的活化。在多种系统中,G蛋白还参与离子通道的激素调节^[2]。于是G蛋白被公认为是广泛的信号转导中间环节,并且先后从牛视柱细胞分离出参与视觉转导的G蛋白;从一株淋巴细胞突变株纯化出调节腺苷酸环化酶活性的G蛋白,还进一步证实了G蛋白是 α 、 β 和 γ 三个亚基组成的三聚体。

G蛋白的种类和亚基结构

G蛋白是一个大家族,在已经知道的G蛋白中,研究较多的有以下几种^[3]:

Gs:转导激素对腺苷酸环化酶的活化过程。

Gi:转导激素对腺苷酸环化酶的抑制作用,

还可能参与一些对百日咳毒素敏感的细胞过程,如肌醇磷脂的水解, K^+ 通道和 Ca^{2+} 通道的调控等。

Go:在许多性质上与Gi相近,但其氨基酸序列与Gi相去甚远。

Gt:参与视觉过程中依赖于cGMP的磷酸二酯酶活性的调控。

Gz:参与介导对百日咳毒素不敏感的细胞过程,如受体介导的磷脂酶C活性的调控;P物质诱导的 K^+ 通道的抑制。

组成G蛋白的3个亚基,按其分子量大小序列,分别称为 α 、 β 和 γ 亚基,各个亚基的性质和特征列于表1。不同来源的G蛋白其主要差别在 α 亚基。 α 亚基具有(1)鸟苷酸结合位点;(2)鸟苷三磷酸水解酶(GTPase)活性;(3)ADP-核糖化位点,有的 α 亚基如Gi和Go还联着一个长链脂酸——十四烷豆蔻酸,增强了它们与脂质双层的相互作用,但Gs α 和Gt α 无此长链脂酸^[4]。

表1 G蛋白各亚基的性质

亚基	分子量($\times 10^{-3}$)	受体	效应	毒素底物
Gs α ($\times 4$)	44.5—46	β 肾上腺素能受体 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体 γ 视紫红质	激活腺苷酸环化酶	霍乱
Gi α ($\times 3$)	40.4—40.5	M-胆碱受体, $\alpha 2$ 肾上腺素能受体,视紫红质 β 肾上腺素能受体	抑制腺苷酸环化酶;参与百日咳敏感的细胞过程	百日咳
Go α	39.9	M-胆碱受体, $\alpha 2$ 肾上腺素能受体,视紫红质	参与百日咳毒素敏感的细胞过程	百日咳
Gt $\alpha 1$	40	视紫红质 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体 β 肾上腺素能受体	视柱细胞cGMP磷酸二酯酶激活	霍乱 百日咳
Gt $\alpha 2$	40.5	锥细胞视蛋白	视锥细胞cGMP磷酸二酯酶激活	霍乱 百日咳
Gz α	40.9	未知	百日咳毒素不敏感的细胞过程	
β ($\times 2$)	37.4		$\beta\gamma$ 亚基参与 α 亚基与受体的相互作用;使G α 失活;直接作用于效应物(?)	
γ ($\times 3$)	8—10		Gt的 $\beta\gamma$ 亚基不同于其它G蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基	

$\beta\gamma$ 亚基形成紧密结合的复合物,只有在变性后才能分开。有趣的是,在体内实验中,Gs, Gi和Gt的 $\beta\gamma$ 亚基可以互换而不影响其

功能^[5]。这说明 $\beta\gamma$ 亚基的专一性不像 α 亚基那样严格,也许在体内条件下, $\beta\gamma$ 亚基库可能就是为若干G α 系统所共有的。

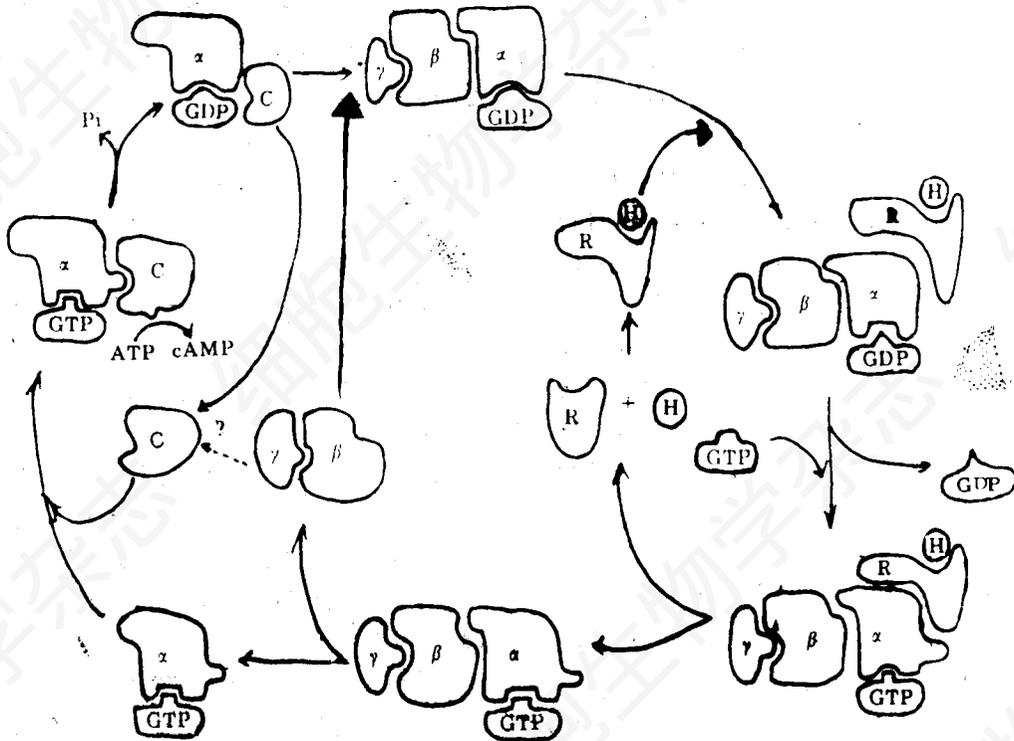


图 受体, G 蛋白, 鸟苷酸及效应器(腺苷酸环化酶)之间的相互作用

α 、 β 和 γ 代表 G 蛋白各个亚基, H 表示激素, R 表示受体, C 为腺苷酸环化酶

G 蛋白的作用机制

目前对 G 蛋白作用过程中的分子机理已有详细的了解, 如图 1 所示, 在受体未受到激素作用之前, G 蛋白与受体是各自分开的。作为基态, G 蛋白以 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体形式存在, 并有 GDP 结合在 α 亚基上。激素与受体的相互作用, 导致 H.R 复合物与 G 蛋白结合, 从而改变了 G 蛋白的构象, 使 α 亚基上的鸟苷酸结合位点“打开”, GDP 解离下来。在胞内 GTP 浓度较低时, 由此可分离得到较为稳定的 H.R.G 高亲和态复合物, 在胞内 GTP 浓度较高的情况下, GTP 很容易结合到鸟苷酸结合位点上去。GTP 结合导致 G 蛋白构象的进一步变化, 引出两种重要的结果:

(1) 使 H 和 R 解离, 即鸟苷酸和激素之间的负异促效应 (negative heterotropic reaction) 解离的结果使受体可以循环使用, 继续参与接

受第二个激素分子的作用, 或从另一个角度讲, 激素与受体的结合能用来“推动”鸟苷酸结合位点的“打开”, GTP 的结合使得 H 容易解离下来, 随之 R 也解离下来, 而激素拮抗剂与受体的结合却不能推动鸟苷酸结合位点的打开, 故 GTP 不改变 H 和 R 的亲合力。

(2) 使 G 蛋白得以活化, 可有效地作用于效应器。活化的结果之一是 $\beta\gamma$ 亚基与 α 亚基解离, 但 GTP 仍结合在 α 亚基上。在腺苷酸环化酶和视觉的 cGMP 磷酸二酯酶系统中已证实, 结合有 GTP 的 α 亚基是该两个效应物酶的真正调节物。 α 亚基和 $\beta\gamma$ 的解离是在有去垢剂的可溶性系统中得到证实, 在完整的膜系统中尚未最终确证。有人从激素激活膜腺苷酸环化酶的动力学分析中, 对亚基解离说法提出了疑问^[9]。

如果 $G\alpha$. GTP 是实际起作用的调节物, 那么 $\beta\gamma$ 亚基在效应物的调节中究竟起什么作

用,这是一个有争议的问题。 G_i 的 $\beta\gamma$ 亚基在腺苷环化酶抑制过程中起很大作用,但需要 G_s 的存在。于是有人认为,激素使 G_i 激活的结果是 $\beta\gamma$ 亚基与 α 亚基解离,使膜双层中 $\beta\gamma$ 亚基浓度增加,导致 $\beta\gamma$ 亚基与 $G_s\alpha$ 亚基结合,间接地抑制腺苷酸环化酶的激活,这就是 G_i 作用的亚基交换模型(subunit exchange model)。确实, G_s 、 G_i 和 G_o 的 $\beta\gamma$ 亚基使 $G_s\alpha$ 亚基失活的作用是等效的。如果认为 $\beta\gamma$ 亚基可以与几种 α 亚基结合,为几种G蛋白所共有,那么在几个信息跨膜转导途径之间,应存在协同的调节机制,也应存在一个有效的G蛋白库,激素与受体作用后,激活这个G蛋白库,增加 $\beta\gamma$ 亚基浓度,抑制某些信号转导途径,而被释放的 α -GTP亚基也可起动另一些信息转导途径^[7]。

在毒蕈碱型胆碱受体激活心房 K^+ 通道的研究中发现,用鸡心房细胞的膜片断,以纯化的G蛋白亚基灌注其内表面。 $\beta\gamma$ 亚基对 K^+ 通道有激活作用,而未活化的 α 亚基对 $\beta\gamma$ 亚基的活化有逆转作用^[8]。但用豚鼠心房细胞膜片断的类似实验,结果相反,红细胞来源 G_i 类似的G蛋白 α 亚基活化后能激活 K^+ 通道,而脑或红细胞 $\beta\gamma$ 亚基无激活作用^[9]。这个矛盾可能是由于 α 亚基和 $\beta\gamma$ 亚基的纯化方法不同。也有实验证实花生四烯酸及其代谢产物能直接激活 K^+ 通道,高度纯化的 $\beta\gamma$ 亚基能激活磷酸二酯酶A₂,通过花生四烯酸间接调节 K^+ 通道。脂氧合酶抑制剂可阻断 $\beta\gamma$ 亚基和花生四烯酸激活 K^+ 通道^[10,11]。酵母G蛋白基因缺失分析为 $\beta\gamma$ 亚基直接参与效应物的调节提供了有力的证据。单倍体酵母 α 亚基基因缺失突变体仍可实现外激素信号转导^[12], β 或 γ 亚基基因缺失突变体却不能实现外激素信号转导^[13],可见 α 亚基实际上起湮没 $\beta\gamma$ 亚基的作用,但 $\beta\gamma$ 亚基调节的效应物酶尚未阐明。 $\beta\gamma$ 亚基的作用以及它们与 α 亚基的关系尚未有统一的看法,也许答案本身就不是划一的,而是在不同的系统中有不同的情况。

结合在 α 亚基上的GTP在GTPase作用下水解变成GDP,从而使G蛋白失活, $G\alpha$ 、GDP与效应物E解离,重新与 $\beta\gamma$ 亚基结合,回到接受下一个H.R复合物作用前的起始状态。

α 亚基上的GTPase水解GTP的速率常数为 $2-3\text{ min}^{-1}$,计算下来 $G\alpha$ ·GTP的寿命约几十秒。这样一段时间内,效应物的活化足以起到信号放大作用,但视觉过程中对信号转导的直觉经验使人们感到信号终止过程要快得多。也许还有其他因素,如 α 亚基与效应物的相互作用等,使失活过程加快,重要的是GTP水解前后, $G\alpha$ ·GTP与 $G\alpha$ ·GDP同效应物相互作用的相对能力尚未测定,所以究竟 $G\alpha$ ·GDP与 $\beta\gamma$ 亚基的重新结合在前,还是 $G\alpha$ ·GDP与效应物E的解离在前,尚未最终确定。

研究G蛋白作用机制的重要工具

——细菌毒素与GTP类似物

霍乱毒素可催化G蛋白 G_s 和 $G_t\alpha$ 亚基Arg-201 ADP-核糖化,这种不可逆修饰使 α 亚基丧失GTPase活性,结合的GTP不能被水解成GDP,使 α 亚基处于持续活化状态。但霍乱毒素催化 $G_t\alpha$ 亚基ADP-核糖化过程中,需要GMP-P(NH)P(一种不被水解的GTP类似物)的存在。霍乱毒素的这一作用可被称之为ADP-核糖化因子(一种分子量为21 kD的GTP结合蛋白)所加强,但其作用机理不明。

百日咳毒素催化 G_i 、 G_o 和 G_t 的 α 亚基羧基末端四个氨基酸中的半胱氨酸残基ADP-核糖化,使其失去GTP结合能力,最终减少信号转导,目前这两类毒素对鉴别膜G蛋白及研究G蛋白的功能非常有用。

在G蛋白GTP-GDP调节环路中,可用GTP不被水解的类似物GMP-P(NH)P, GTP γ S代替GTP来证明GTP对G蛋白的调节作用。

GMP-P(NH)P和GTP γ S均可与G蛋白结合,但不被GTPase水解。在有刺激型激素

存在下, GMP-P(NH)P 导致腺苷酸环化酶活化比 GTP 更为强烈和持久。GTP 在 G 蛋白激活效应物过程中的重要作用提示 GTP 结合位点就是 GTPase 的活性中心。GTP γ S 与 GMP-P(NH)P 具有相同的功能, 其差别在于它们活化腺苷酸环化酶的速率不同。G 蛋白的 α 亚基或 $\beta\gamma$ 亚基, 即使在有激素存在的情况下, 也不能单独与 GTP γ S 结合。可见, 在 G 蛋白的调节环路中, $\beta\gamma$ 亚基也是必需的^[14]。近年来还发现, β 肾上腺素能受体可催化 GTP γ S 与 G_i 结合, 使 G_i 上的 GTPase 活化, 其催化效率为 G_s 的 30%。 G_i 与 β 肾上腺素能受体的相互作用也存在于完整细胞上, 但对这种相互作用的机制和意义尚未阐明。

结 语

G 蛋白的发现使人们对细胞信号转导的研究深入到一个新的阶段。某些细菌毒素, GTP 类似物, 特异性抗体, 寡核苷酸探针已成为研究 G 蛋白功能的重要工具。对 G 蛋白的进一步研究, 可能会有一些新的 G 蛋白和新的效应物发现, 但今后的研究工作将着重于阐明特异信号的转导途径, 如 G 蛋白对磷脂酶 C, 磷酸二酯酶 A2 以及一些离子通道的调节作用; G 蛋白

的分子克隆, 重组以及分离纯化, 有助于阐明 G 蛋白及其各种亚基多态性的生物学功能, 揭示它们的氨基酸序列及其高级结构, 它们与受体/效应物作用的功能域。可以预见, 在不远的将来, G 蛋白的研究工作将有更新的进展。

参 考 文 献

- [1] Birnbaumer L., 1990, *FASEB J.*, 4: 3178.
- [2] Brown AM., 1991, *FASEB J.*, 5: 2175.
- [3] Freissmuth M. et al., 1989, *FASEB J.*, 3: 2125.
- [4] Buss JE. et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 7493.
- [5] Kanaho Y. et al., 1984, *J Biol Chem.*, 259: 7378.
- [6] Stryer L., 1986, *Ann Rev Neurosci.*, 9: 87.
- [7] Gilman AG., 1987, *Ann Rev Biochem.*, 56: 615.
- [8] Logothetis DE. et al., 1987, *Nature*, 325: 321.
- [9] Codina J et al., 1987, *Science*, 236: 442.
- [10] Jelsema CL et al., 1987, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 84: 3623.
- [11] Kim D et al., 1989, *Nature*, 337: 557.
- [12] Miyajima I et al., 1987, *Cell*, 50: 1011.
- [13] Whiteway M et al., 1989, *Cell*, 56: 209.
- [14] Kelleher DJ et al., 1988, *Mol Pharmacol.*, 34: 452.

(上接 137 页)

摘 要

采用本实验室新建的人肝癌细胞系 GHC-1 及 GHC-3 分泌的 AFP 作抗原, 经微量法免疫 BALB/c 小鼠, 通过鼠-鼠途径, 获得两株具有较高专一性的分泌抗人肝癌 AFP-McAb 杂交瘤细胞, 定名为 GAH₁ 及 GAH₂。该两株杂交瘤细胞分泌的 McAb 分别为 IgG₃ 及 IgG_{2b} 亚型。用 ELISA-I, DIBA 和 RPHA-I 筛检、鉴定结果, 其中 GAH₁ 和 GAH₂ 分泌的 McAb 可抑制肝癌患者血清和腹水, 对胎血呈不完全抑制, 而对其他各种肿瘤病人均为阴性, 表示

其对人肝癌具有较高的专一性。

本文通过对抗原来源的选择和筛检方法的改进, 取得较为满意的效果。

参 考 文 献

- [1] Heyningen, V. V. et al., 1982, *J. Immunol. Methods*, 50: 123.
- [2] Xu Kai Li et al., 1984, *Chinese Medicine J.*, 97(7): 538.
- [3] 陈尊器、葛曰萍等, 1990, 广州医学院学报, 18(3): 8.
- [4] 葛曰萍、陈尊器等, 1991, 广州医学院学报, 19(4): 7.
- [5] Segal, E. et al., 1979, *J. Clin. Microbiol.*, 10: 116.