

# 生物化学的现状与展望

邹承鲁 主编

科学出版社

廣東省立第一師範學校

第一冊

58.57  
647

# 生物化学的现状与展望

邹承鲁 主编

中科院植物所图书馆



S0011855

科学出版社



24401

## 内 容 简 介

本书汇集第五次全国生化学术会议的综述报告和特约论文共十篇。这些论文既概括了当前国际上生化发展的动向,也介绍了我国生化科学工作者在有关领域中的贡献和成果。主要内容:蛋白质的结构、运动与功能;膜脂-膜蛋白的相互作用;叶绿体中电子传递与磷酸化;胰岛素分子结构与功能关系的复杂性;遗传工程用于细菌性腹泻疫苗的研究;血清脂蛋白和载脂蛋白的研究;癌基因与肿瘤酶学及癌变原理的研究;农业生化的研究进展等。

## 生物化学的现状与展望

邹承鲁 主编

责任编辑 吴铁双

科学出版社出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1987年1月第一版 开本, 787×1092 1/16  
1987年1月第一次印刷 印张, 9 3/4  
印数: 0001—4,000 字数: 225,000

统一书号: 15031·3380

本社书号: 4861·13-10

定价: 2.30 元



# 前 言

生物化学是当代各门学科中发展最为迅速的学科。首先从生物化学研究工作的工作量来看,根据美国出版的 *Science Citation Index* 统计,在各国出版的包括自然科学基础和应用各个领域的四千余种期刊中,无论以发表的论文篇数或者以被引用其文章的次数统计,生物化学方面的杂志都占领先地位。例如以被引用次数统计 *J. Biol. Chem.*, *Biochim. Biophys. Acta* 和 *Biochemistry* 分别占第一、五、十位,而且在前十名中的 *Nature*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 和 *Science* 三种综合性刊物中有关生物化学的论文也都占有极大的比重。其次再从生物化学一些重要发展的深远影响来看,五十年代以来由于在生物化学方面的贡献而获得诺贝尔奖金的占了生理及医学奖的一半以上,同时还占了化学奖的三分之一,这一比例已经远远超过在本世纪的上半世纪中由于核物理研究方面的贡献而得奖的比例。这些事实充分说明了生物化学在现代科学发展中的领先地位。

在我国,生物化学的发展有较长的历史,特别是解放以来取得了不少重要成果,发展尤为迅速。在《第五次全国生物化学学术会议论文摘要汇编》上发表的论文在数量及质量两方面都远远超过了过去的水平。这次大会所组织的综述报告也和过去不同,做到既概括了当前国际上生物化学发展的动向,又介绍了我国工作者在这些领域中的贡献。特别可喜的是,一些中年科学家也在大会作了重要的综述报告并受到普遍的欢迎。由于会议时间所限和其他原因,还有一些重要的综述未能在大会报告。因此我们将大会综述报告和一些特邀的综述论文收集在这本小册子中,供广大生物化学及有关学科特别是分子生物学和生物物理学的科研、教学和其他工作者参考。对于有关专业的研究生和大学高年级学生了解这一学科动态也是十分有益的。

由于我们对于全国生物化学工作者的专业了解不够,特别是对近年来在国内外的工作中获得重要成果并充分掌握本专业动态的同志了解不够,这本小册子对于生物化学领域中一些极为重要的方面不免有所遗漏。我们希望以后每届全国生物化学学术会议上的综述报告和一些特邀的综述论文都能出版,这对于促进我国这一重要学科领域的发展并迅速赶上世界先进水平必将有所裨益。

邹承鲁

# 目 录

前言 .....	( i )
蛋白质的结构、运动和功能 .....	邹承鲁( 1 )
膜脂-膜蛋白的相互作用.....	杨福愉 黄 芬 王金凤( 15 )
叶绿体中电子传递与磷酸化.....	李有则( 37 )
胰岛素分子结构与功能关系的复杂性 .....	王志珍 梁栋材( 52 )
遗传工程技术用于细菌性腹泻疫苗研究的评述 .....	黄翠芬( 68 )
血清脂蛋白和载脂蛋白的结构、功能与代谢 .....	王克勤( 80 )
癌基因与肿瘤酶学及癌变原理的研究 .....	李士诤( 109 )
肿瘤同工酶研究进展 .....	陈惠黎( 119 )
农业生物化学的研究进展 .....	阎隆飞( 137 )
发展我国的生物工程.....	孙玉昆( 145 )

# 蛋白质的结构、运动和功能

邹承鲁

(中国科学院生物物理研究所)

## 一、蛋白质构象研究的重要性

## 二、蛋白质的晶体结构

### 1. $\alpha$ 螺旋蛋白

### 2. $\beta$ 折叠蛋白

### 3. $\alpha + \beta$ 蛋白

### 4. $\alpha/\beta$ 蛋白

### 5. 无规卷曲(random coil)蛋白

## 三、蛋白质分子的运动性

## 四、寡聚蛋白亚基的微观不均一性

### 1. 不同亚基不同功能

### 2. 相同亚基相同功能

### 3. 相同亚基非对称排列

### 4. 相同亚基构象的微观不均一性

## 五、蛋白质肽链的伸展与卷曲

### 1. 伸展与卷曲过程

### 2. 伸展与卷曲过程中的活性变化

## 六、结束语

## 一、蛋白质构象研究的重要性

分子生物学是通过对生命体的物质基础,特别是蛋白质、酶、核酸等生物大分子的结构和运动规律的研究揭示生命现象本质的科学,其核心是研究生物大分子结构、运动与功能的关系。有关生物大分子化学结构的研究,已经达到了相当高的水平,就蛋白质而言,已有上千种蛋白质的化学结构得到阐明,其中包括较大的分子,如 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)中的1,021个氨基酸的排列顺序<sup>[1]</sup>。现在,核酸序列测定技术也取得了新的突破, $\lambda$ 噬菌体DNA的全部核苷酸48,502个碱基对的排列顺序的测定则是这一领域中一个突出的成就<sup>[2]</sup>。许多较大的蛋白质分子的氨基酸序列,现在可以更方便地通过它的基因DNA的序列来测定。

蛋白质分子结构的最重要的特点是它不仅有一定的化学结构,而且有特定的空间结构。这种复杂的空间结构使得不同的蛋白质各自具有各种专一的功能。

在漫长的生物进化历程中,细胞色素c分子的氨基酸序列发生了很大变化,种属相差越远,变化程度越大。人与酵母的细胞色素c分子的100多个氨基酸残基中,有40余个发生了变异。但是,所有真核生物细胞色素c的生物功能却始终保持不变。它们都能够与不同种属的细胞色素氧化酶交叉相互作用。与此同时,十分值得注意的是,已经测定过的几种真核生物细胞色素c的空间结构也是非常相似的,特别是与功能密切相关部分的空间结构更是完全相同。与一级结构相比,蛋白质分子的空间结构在进化过程中更为保守。这说明了空间结构是体现生物功能的决定因素。

致谢:姚启智、刘维帮助收集并整理资料,特此致谢。

脱氢酶与激酶都具有与核苷酸类辅基如 NAD、ATP 等相结合的功能,晶体结构测定结果表明,在这两类酶分子中,确都存在着一个空间结构十分相似的结构域,这种结构域的特征是以数个平行的  $\beta$  折叠片为核心,周围排列着  $\alpha$  螺旋或其他松散结构<sup>[3]</sup>,如图 1 所示。近来还发现一些与 DNA 相结合的并与基因表达的调节控制有关的蛋白质,如  $\lambda$  噬菌体中的  $\lambda$  阻遏蛋白 ( $\lambda$ -repressor)、Cro 蛋白以及 *E. Coli* 中的 CAP 蛋白 (catabolite activator protein) 等,都是具有  $\alpha$ -helix- $\beta$ -turn- $\alpha$ -helix 模式的结构域<sup>[4]</sup>。这些事实都说明了蛋白质的空间结构与其生物功能的密切关系。可以说蛋白质的特定的生物功能寓于其复杂的空间结构之中。

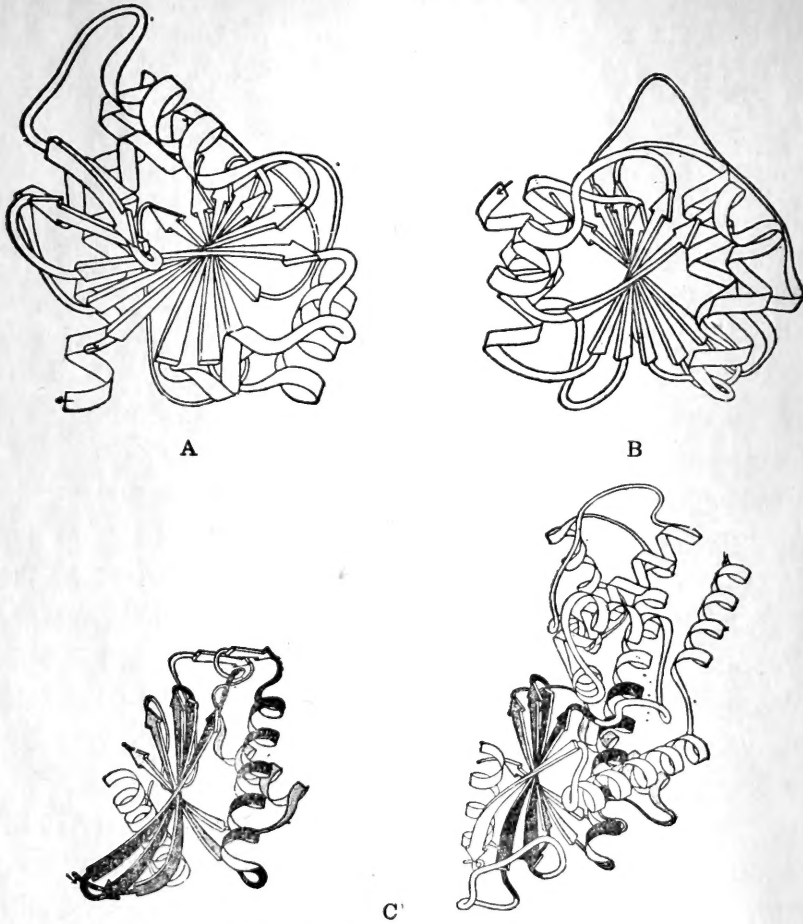


图 1 脱氢酶与激酶分子内与核酸类辅基相结合的结构域  
A:磷酸甘油醛脱氢酶结构域 1; B:醇脱氢酶结构域 2; C:己糖激酶结构域 1 和 2

## 二、蛋白质的晶体结构

X 射线晶体衍射技术对蛋白质空间结构的研究做出了卓越的贡献。自六十年代以来,大约已有 250 个球蛋白的晶体结构在不同分辨率水平上得到了解决。根据现有的蛋白质晶体结构分析结果,可以将蛋白质按结构特点大致分为如下五种类型<sup>[5,6]</sup>。

### 1. $\alpha$ 螺旋蛋白

这类蛋白质分子主要是由  $\alpha$  螺旋结构构成。例如肌红蛋白(myoglobin)分子,是由 8 个  $\alpha$  螺旋结合一个血红素分子构成。其  $\alpha$  螺旋含量高达 79%。图 2 A 给出了蚯蚓肌红蛋白(myohemerythrin)的结构。

### 2. $\beta$ 折叠蛋白

此种分子主要为平行或反平行的折叠片构成。 $\text{Cu}\cdot\text{Zn}$  超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)即是一个典型例子,它是由双层的反平行  $\beta$  折叠片组成。

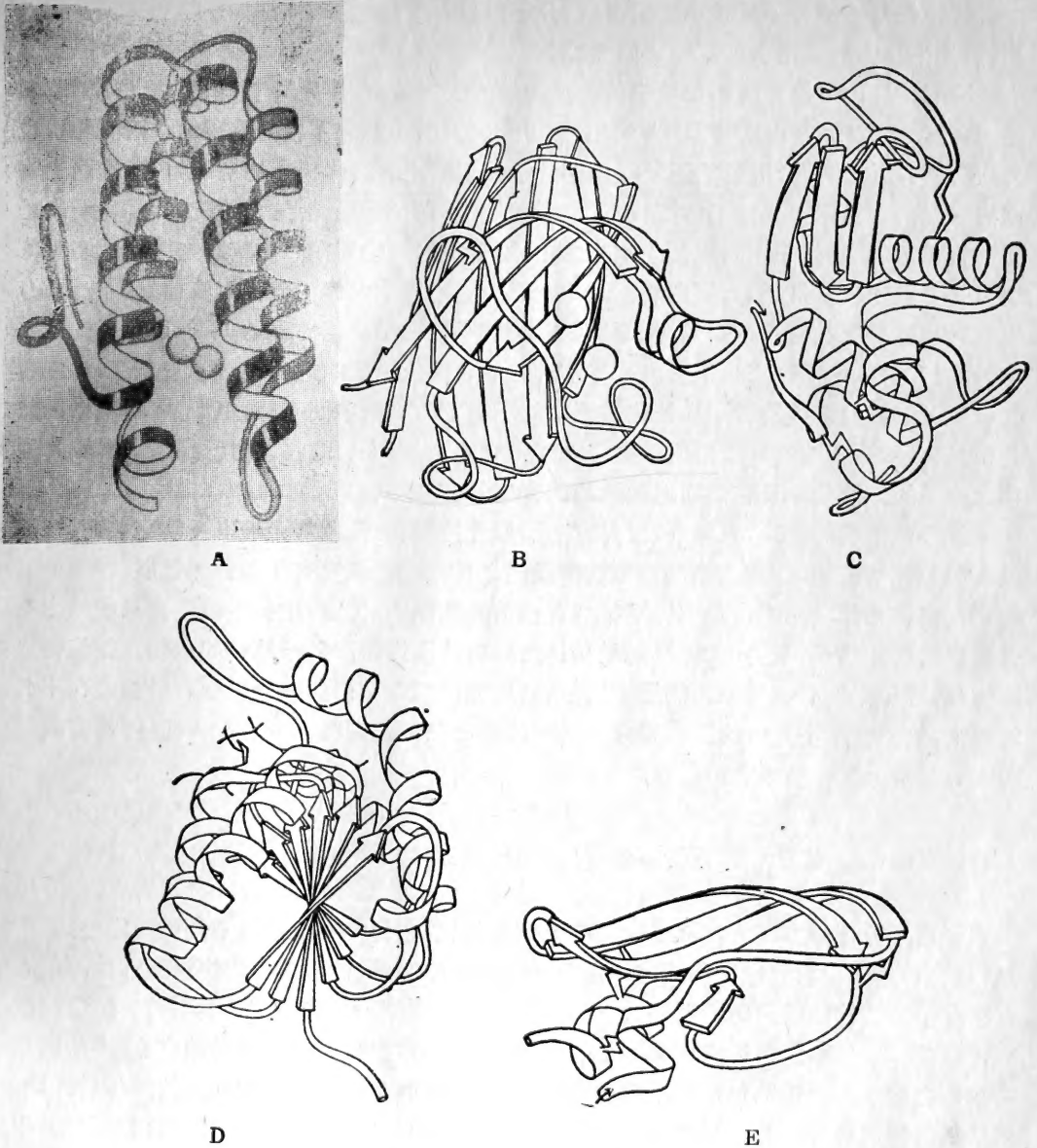


图 2 球蛋白晶体结构的五种类型

A: 全  $\alpha$  结构, 蚯蚓肌红蛋白(myohemerythrin); B: 全  $\beta$  结构,  $\text{Cu}\cdot\text{Zn}$  超氧歧化酶;  
C:  $\alpha+\beta$  结构, 溶菌酶; D:  $\alpha/\beta$  结构, 乳酸脱氢酶中与 NAD 结合的结构域;  
E: 无规卷曲结构, 牛胰胰蛋白酶抑制剂



### 3. $\alpha + \beta$ 蛋白

在这种蛋白质分子内,  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠两种结构同时存在,但在空间位置上彼此分开,分别在分子的不同部位。溶菌酶(lysozyme)的结构就是这样。

### 4. $\alpha/\beta$ 蛋白

这类蛋白质分子中,  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠结构交替出现,前述脱氢酶、激酶都是这种类型。它们与核苷酸类辅基相结合的结构域可见图 1。

### 5. 无规卷曲(random coil)蛋白

这往往是一类分子量较小的蛋白质,分子内只有有限的有序结构,一般含有较多的二硫键,如牛胰的胰蛋白酶抑制剂即属此类。

X 射线晶体衍射方法不仅对于认识蛋白质的空间结构,而且对于阐明蛋白质的功能、酶的作用机制、蛋白质与 DNA 的相互作用等方面,也都起了极为重要的作用。但是,也必须看到,晶体结构分析目前还只能给出分子处于静止的晶体状态的空间结构。然而生物体内的蛋白质实际上是处于溶液状态,或者是处于与生物膜紧密结合的疏水环境,无论是哪种情况,又总是处于不断运动的状态之中。尽管根据一些酶在晶体状态与溶液状态时酶活力的定量比较,可以认为蛋白质在晶体状态的空间结构大体上与其溶液构象是一致的,但有时也还是存在着一定的差异,而这些差异对于蛋白质功能的表达可能正是至关重要的。因此 X 射线结晶学家也在努力寻找各种方法研究蛋白质的运动性,例如在  $-50^{\circ}\text{C}$  左右的低温下去捕捉某些酶分子在催化过程中的不稳定的构象中间态等,但取得的结果仍然是相当有限的<sup>[7]</sup>。随着对蛋白质结构与功能研究的深入,人们的注意力已经越来越转向生物大分子的溶液构象及它们的运动性的研究(注)。

许多波谱学的手段,象紫外、红外、荧光、激光拉曼、圆二色等光谱以及顺磁共振、核磁共振等技术的应用,使蛋白质的溶液构象及运动性问题的研究有了明显的进展。中子衍射与重氢交换相结合的方法也取得了某些有价值的结果<sup>[8]</sup>。但是,这些手段毕竟只能给出有关构象的局部信息,还不能象 X 射线晶体衍射方法那样给出分子结构的全貌。很值得注意的是,近年来核磁共振技术的迅速发展,新建立的二维核磁共振分析很有可能会在不久的将来,给出一个不太大的蛋白质分子——胰蛋白酶抑制剂在水溶液中的全部空间结构<sup>[9]</sup>。

## 三、蛋白质分子的运动性

蛋白质分子一方面有其特定的精确空间结构,但在另一方面它又不是绝对刚性的,而是相对柔性的,即它的空间结构在一定范围内是可变的。蛋白质分子的这种运动性不仅表现在分子的结构能够因环境因素如 pH、温度、盐浓度、某些小分子配体物质的存在而改变,更重要的是,即使在环境因素不变的情况下,分子本身也是处于一种固有的不断运动的状态之中。这种运动包括整个分子在溶液中的运动,也包括分子内部结构的相对运动,诸如氨基酸侧链的摆动,脯氨酸的异构化,局部肽链的扭转移动,结构域间的相对运动,以及肽链的部分伸展与卷曲,等等。Careri<sup>[10]</sup>等结合模型化合物的测定,给出了蛋白质分子内各种运动形式的时间(表 1)。

蛋白质分子在执行其生物功能时,总是伴随着它的运动,特别是分子内的运动。这种



表 1 球蛋白与酶分子的运动时间

运 动 内 容	时 间 (秒)
有关蛋白质表面部分	
紧密结合的水分子的弛豫过程	$10^{-9}$
松散结合的水分子的弛豫过程	$10^{-11}$
侧链旋转相关过程	$10^{-10}$
侧链的质子转移过程	$10^{-7}-10^{-9}$
有关蛋白质构象部分	
局部运动	$10^{-8}-10^{-9}$
异构化过程	$10^{-2}-10^{-7}$
卷曲-伸展过程	$10^{+2}-1$
溶液中酶与底物复合物	
碰撞速率	(受扩散控制) $<10^{-10}$
共价反应过渡态的估计寿命	$10^{-9}-10^{-9}$
金属酶中金属离子配位范围的变化	$10^{-9}$
酶与底物共价中间物的寿命	$10^{-2}-10^{-4}$
酶与底物复合物构象异构化	$10^{-2}-10^{-4}$
酶与底物复合物的伸展过程	$10^{+2}-1$

分子内的运动表现为蛋白质分子的构象变化。而这种构象变化往往是由于蛋白质分子与小分子配体物质的相互作用而引起的,如血红蛋白与氧分子的结合以及其他别构蛋白与效应物,酶与底物,受体蛋白与小分子激素、药物、神经介质等的相互作用均能引起蛋白质分子的构象变化。酶与底物结合时引起酶分子构象变化,即是 Koshland 的著名的诱导契合理论。酶与底物相互作用引起构象变化所需的时间也列于表 1 中。蛋白质与蛋白质、蛋白质与核酸、蛋白质与生物膜的相互作用,也都伴随着蛋白质的构象变化。因此可以认为生物体内的蛋白质是处于一种可以相互转变的多种构象的平衡态中。

在蛋白质分子内的多种运动形式中,结构域间的相对运动颇值得注意。结构域是蛋白质分子空间结构中不可忽视的层次。在由较长肽链组成的蛋白质分子内总是存在两个或多个结构域。每个结构域本身都是紧密装配的,结构域之间则是通过共价的但空间结构却是松散的肽链相联系。由于这种在化学上牢固而在空间结构上柔韧的连接方式,使得每一个结构域可作为一个整体,作较大幅度的相对运动。

现已知道,多结构域酶的活性部位大都是位于两个或多个结构域的界面之间。在催化作用进行的同时,必然伴随着这些结构域的相对运动。Anderson 和 Steitz<sup>[11]</sup> 曾详细地比较了有无底物存在下己糖激酶(hexokinase)的晶体结构,发现它的活性部位是在两个结构域组成的铰链式结构(hinge structure)之中,辅基 ATP 结合于一个结构域,而底物糖分子则结合于另一个结构域。酶分子结合底物时,两个结构域会发生相对运动,V 字形的界面会闭合起来,一方面提供了 ATP 与糖分子之间转磷酸化反应所需要的空间距离和特定构

象,同时也排除了活性部位内水分子的干扰,防止 ATP 水解副反应的发生。这种机制不仅对其他激酶存在,而且在醇脱氢酶<sup>[12]</sup>、柠檬酸合成酶<sup>[12]</sup>等的催化过程中也可能同样存在。它很可能对于催化双分子反应的酶具有一定的普遍意义。

蛋白质分子内的各个结构域,可以是相同的,也可以是不同的。在血清白蛋白分子内有三个几乎完全相同的结构域,每个结构域内又有三个相似的亚结构域<sup>[14]</sup>。这些内部结构的相似性,意味着血清白蛋白的基因是在进化过程中,由较小的基因经过基因重复,然后拼接复制而成的。前面提到的功能各不相同的各种脱氢酶与激酶的与核苷酸结合的结构域构象十分相似,表明这些结构域在进化上是同源的。其基因分别与其他基因拼接,再通过分化进化而形成现在的功能各不相同的各种脱氢酶与激酶的基因。各个结构域的基因,可以分别进行分化进化,然后进行交互拼接,从而形成多种多样、功能各异的蛋白质。真核生物 DNA 序列中的内隐子和外显子,很可能与蛋白质是由多结构域组成有关<sup>[13,14]</sup>。

#### 四、寡聚蛋白亚基的微观不均一性

在所有已知的蛋白质分子中,约 30%是以寡聚体形式存在的。绝大部分细胞内蛋白质也是寡聚蛋白。亚基间的缔合,减少了分子表面的疏水区域,从而使蛋白质分子更加稳定。多亚基也常常是体现多种生物功能的必要条件,某些复杂功能的体现,必须由多种结构不同、功能不同的亚基协同完成。

寡聚蛋白分子的亚基组成,大体有如下几种情形。

##### 1. 不同亚基不同功能

相当多的多亚基蛋白质分子是由结构与功能都不相同的亚基所组成。例如天门冬氨酸转氨甲酰酶(ATCase)分子由十二个亚基组成,其中六个是催化亚基,六个是调节亚基,这两种亚基的化学结构、空间结构和功能都不相同。ATCase 是一个别构酶,它的活性受 CTP 的抑制与 ATP 的激活。催化亚基单独存在时,仍然保持有催化活性,但不受 CTP 和 ATP 的调节,必须与调节亚基共同组成完整的酶分子时,ATCase 才具有完整的别构酶性质。功能比较复杂的酶,如质子泵 ATPase 和 RNA 多聚酶都是由几种不同的亚基组成的。

血红蛋白分子由两个  $\alpha$  亚基和两个  $\beta$  亚基组成,简称  $\alpha_2\beta_2$  结构。 $\alpha$  与  $\beta$  亚基的一级结构与空间结构虽大体相同,但略有差异。正是这种差异,使得血红蛋白与氧的结合有正协同性,它是高等动物血红蛋白正常行使其输送氧的功能的一个重要因素。

##### 2. 相同亚基相同功能

乳酸脱氢酶的某些同功酶、醛缩酶等分子是由结构完全相同的亚基对称排列组成。这些亚基的功能也可能是完全相同的。

##### 3. 相同亚基非对称排列

X 射线晶体衍射结果表明,某些多亚基蛋白分子虽然由相同亚基组成,但亚基是以非对称排列方式相缔合<sup>[15,16]</sup>。这种非对称排列的功能意义,目前尚不十分清楚。

肌酸激酶是由两个相同或十分相似的亚基所组成<sup>[18]</sup>。两个亚基上各有一个反应活性巯基,这两个巯基附近的氨基酸顺序也是相同的,说明两个巯基在一级结构中是处于相同的位置上<sup>[17,18]</sup>。Degani 等<sup>[19,20]</sup>用 2-硝基-5-巯基氰代苯甲酸 (NTCB) 修饰肌酸激酶时,酶分子中两个巯基分别为氰基及芳硫基所取代。但是如果用 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸) (DTNB) 修饰时,先得到一个酶分子的两个巯基均为芳硫基所取代的产物,然后再以氰化钾进行快速氰解,如图 3 所示,也同样可以得到单氰基、单芳硫基的修饰酶。令人惊异的是,用这两种方法所得到的单氰基、单芳硫基修饰酶,虽然其化学结构相同,但前者完全无活性,后者却有相当于天然酶 75% 的活性。不仅如此,酶分子上的芳硫基被进一步氰解的速度也很不相同,前者氰解速度较后者快得多,最后都得到了具有 75% 酶活性的双氰基衍生物。

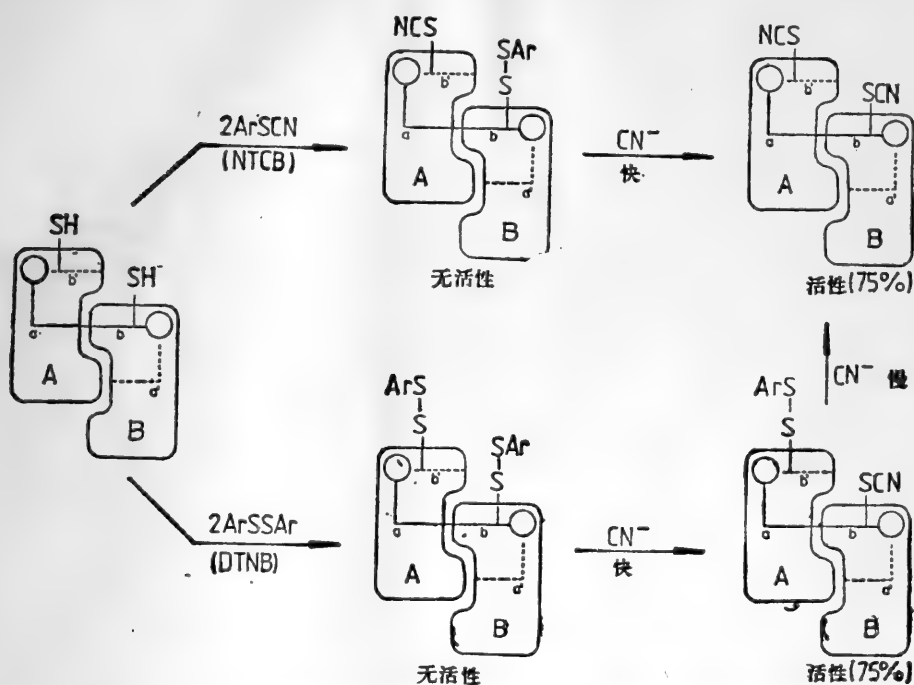


图 3 肌酸激酶在溶液中亚基非对称排列及两个亚基上活性巯基的非对称修饰机制示意图  
图中 A、B 分别代表两个亚基。NTCB 为 2-硝基-5-巯基氰代苯甲酸。DTNB 为 5,5'-二巯基-双(2-硝基苯甲酸)

以上事实说明,肌酸激酶分子内两个反应活性巯基,虽然处在一级结构相同的位置,但是反应性质不同,对酶活性的贡献也不相同,证明它们是处于不同的空间环境。Degani 等提出,肌酸激酶在溶液中两个亚基是非对称排列的<sup>[21]</sup>,两个亚基各自以不同的基团参与亚基间的相互作用,很可能也各自以不同的基团构成整个酶的活性部位。

#### 4. 相同亚基构象的微观不均一性

肌酸激酶分子内两个亚基上的活性巯基的非对称修饰性质可以用相同亚基非对称排列来解释,所有别构蛋白所观察到的半位反应,也都可以用亚基排列的不对称性来解释。

但是,在由相同化学结构的亚基构成的寡聚蛋白分子中,亚基是否可以具有不同的构象,即所谓构象微观不均一性呢?

根据 X 晶体衍射分析结果来看,某些蛋白质晶体结构中,氨基酸序列相同的亚基尽管大体上是对称排列的,但在构象上仍然存在着一些细微差异,其中有些具有功能上的意义,有些则没有。例如三方二锌胰岛素晶体中组成二体的两个单体的空间结构略有不同<sup>[22]</sup>,但是,现在认为生理浓度的胰岛素是以单体形式行使生物功能的,因此晶体中两个单体构象的差异可能并没有确切的功能意义。

Bernhard<sup>[23]</sup>曾提出,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的四个亚基虽然其化学结构相同,但是却存在着“预存不对称性”,即其不对称性是原有的,而不是由配体结合诱导产生的。这四个亚基由于构象上的差异,可区分为两组,即为  $\alpha_2\beta_2$  结构,他称此为二体的二体。其主要实验根据是用底物类似物呋喃丙烯酰磷酸对酶进行酰化,此时酶的四个亚基中只有两个被酰化,即所谓半位反应。他再将其他两个亚基上的巯基用碘乙酸进行羧甲基化,再用砷酸盐经砷酸解,除去呋喃丙烯酰基后,得到含有两个原来能够进行酰化的活性巯基的酶分子,但是此时酶活性仅为原来的一半,并且在所释放出来的两个活性巯基中,也只有一个能够重新被酰化,所以他认为酶分子中四个亚基原来是以两种构象状态存在的。如图 4 所示,□及○分别代表这两种构象,其中□是有活性的能被酰化的构象。

在砷酸解过程中,经过一个亚基构象完全相同的阶段,然后再重排为亚基构象不同的两组亚基,其中一组为活性构象,另一组则是无活性的。因此所得到的砷酸解后酶活性为

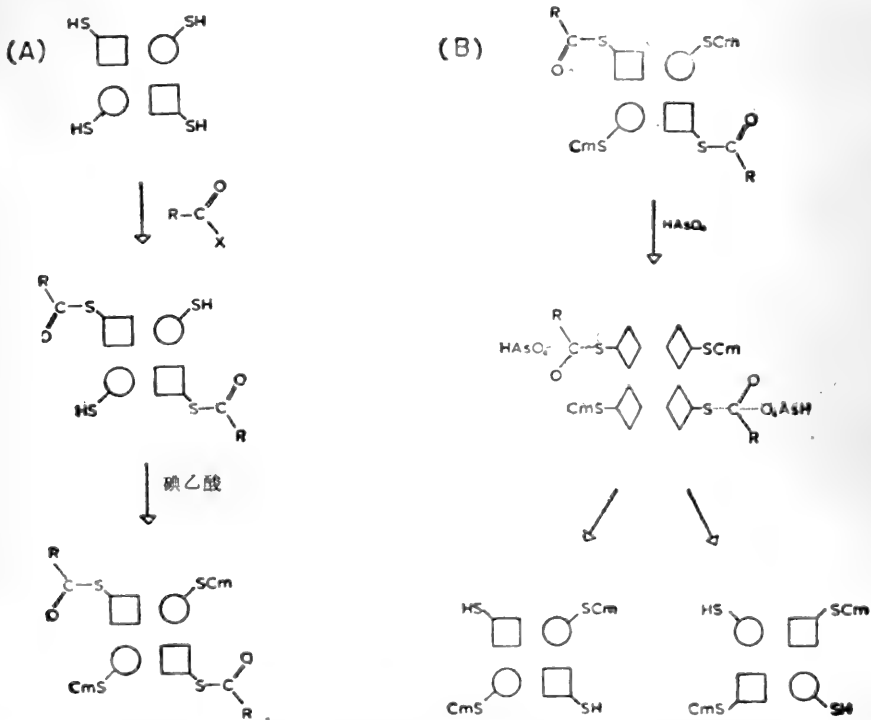


图 4 甘油醛-3-磷酸脱氢酶四个亚基上活性巯基的非对称酰化、羧甲基化机制示意图  
图中○与□分别代表相同亚基的两种不同构象状态

原来的一半,并且平均每一个分子中仅有一个巯基可被重新酰化。这一解释不能令人信服之处在于磷酸解过程中亚基重排的假定,这一重排本身很可能就是配体引起的亚基构象改变,因而也就可以用 Koshland 的序变模型加以解释。

Moras<sup>[24]</sup> 小组对龙虾肌 GAPDH 的晶体结构进行分析的结果表明,这个酶不仅亚基的排列是不对称的,而且亚基的空间构象也存在着细微差异,他也称之为  $\alpha_2\beta_2$  结构。但是 Rossman 等人的结果所反映的是晶体状态下的情况,其分辨率也仅为 3 Å,因而还不足以肯定的结论。

最近,我们的工作对于这个酶在溶液中亚基构象微观不均一性提供了进一步的证据。当这个酶活性部位巯基被羧甲基化之后,经紫外光照,可以形成与酶共价连接的 NAD 荧光衍生物<sup>[25]</sup>,并且进行脱羧<sup>[26]</sup>。这两步光化学反应(图 5)都依赖于酶的构象完整性。经低浓度十二烷基硫酸钠轻度变性,这两步光化学反应即不再发生<sup>[27]</sup>。肌肉酶即使被 NAD<sup>+</sup> 充分饱和后,在四个亚基中也仅能形成两个 NAD 荧光衍生物。特别值得注意的是酵母酶,在一定条件下,在四个亚基中仅能引进两个羧甲基,此时进行光照,虽然仍能形成两个 NAD 荧光衍生物,但是只有其中之一进行脱羧<sup>[26]</sup>。这一事实是很难用 Koshland 的序变模型解释的。如果我们把这个酶四个亚基分别称之为 A, A', B, B'(图 6),假定在两个 A 亚基上进行羧甲基化并光照生成荧光衍生物。由于在 A 亚基上引入一个带负电荷的羧甲基时,并没有阻止在 A' 亚基也引入一个同样的带负电荷的基团,因此在 A 亚基除去一个带负电荷的羧基时,同样也不会由于空间阻碍或诱导产生构象变化等原因,阻止在 A' 亚基上脱去羧基。这个事实看来只能用 A 和 A' 亚基原来就有的细微构象差异来解释。由于酶在光照前就已经为 NAD<sup>+</sup> 所饱和,所以这一亚基构象的微观不均一性,也不是因为配体结合诱导产生的<sup>[26, 28]</sup>。

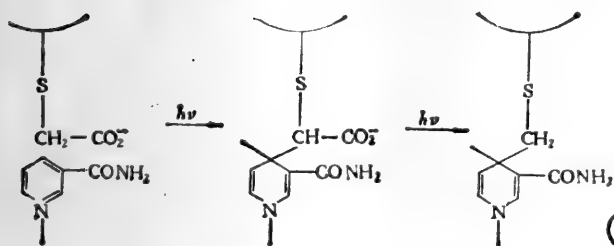


图 5 甘油醛-3-磷酸脱氢酶光化学反应过程

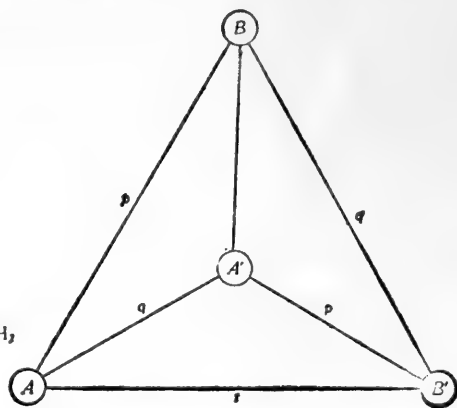


图 6 甘油醛-3-磷酸脱氢酶分子亚基排列的模型

寡聚蛋白的相同亚基或者以不对称方式排列,或者存在着构象上的微观不均一性,看来是比较常见的现象。今后在一些目前认为是以相同亚基、相同构象、对称排列的寡聚蛋白质中,还可能发现新的不对称性或者构象不均一的情况。

由于一级结构完全相同的亚基可以具有某些不同的空间结构,我们认为,对 Anfinsen<sup>[29]</sup>在五十年代末期提出的蛋白质的高级结构完全由其一级结构决定的规律应该提出一点修正,即在寡聚蛋白分子中,一级结构完全相同的亚基有时可能会存在空间结

构上的差异。这种差异可能是使寡聚蛋白处于一个更稳定状态的要求所致,也可能有它功能上的意义。这一点尚待进一步研究。

## 五、蛋白质肽链的伸展与卷曲

所谓蛋白质肽链的伸展,就是在一定条件下,蛋白质分子从紧密有序的天然构象变为随机松散肽链的过程,而从这种无规卷曲态自发形成有序构象的过程就是蛋白质的再卷曲。蛋白质肽链伸展与再卷曲的研究是目前一个十分活跃的领域。这一研究工作的意义不仅在于探索蛋白质肽链伸展与卷曲的中间过程及其机制本身,更重要的是企图用它来作为研究蛋白质生物合成时空间结构形成的模型。但是生物体内蛋白质合成时,肽链是不断延伸的,这与体外变性蛋白分子即伸展了的完整的肽链的再卷曲情形毕竟不同。此外,研究蛋白质肽链伸展与再卷曲过程中生物功能的变化,也是研究蛋白质结构与功能关系的一个重要方面。

### 1. 伸展与卷曲过程

蛋白质肽链的伸展与再卷曲都是复杂的动力学过程。以核糖核酸酶 A(RNase A)为例,Baldwin<sup>[30]</sup>等最早提出了存在着快速与慢速两种变性分子的机制:



其中  $U_F$  与  $U_S$  分子比为 20:80,它们都是肽链完全伸展的分子,因为  $U_F$  与  $U_S$  分子的相对比例不受温度和变性剂浓度影响。97%以上的酪氨酸残基的光吸收变化发生于快相,  $U_F$  与  $U_S$  分子的酪氨酸吸收光谱几乎没有不同,这说明  $U_F \rightleftharpoons U_S$  的转变不涉及酪氨酸残基微环境变化。Brandts<sup>[31]</sup>等提出,  $U_F$  与  $U_S$  两种变性分子之间的主要差别在于肽链中脯氨酸残基的顺反异构化的不同(图 7)。天然 RNase 分子中,四个脯氨酸残基中两个为顺式,Pro-93 和 Pro-114,两个为反式,Pro-42 和 Pro-117(图 8)。当肽链伸展时,  $N \rightarrow U_F$  的过程是肽链迅速随机松散过程,而  $U_F \rightleftharpoons U_S$  的过程则是脯氨酸残基异构化的慢过程。

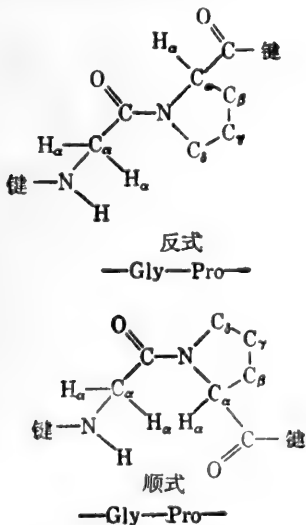


图 7 脯氨酸顺、反式结构图

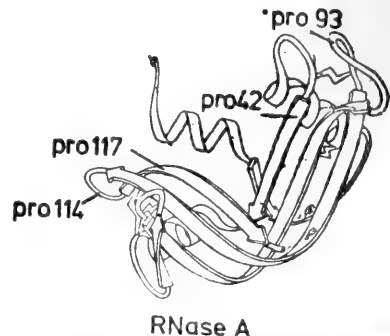


图 8 核糖核酸酶 A 分子中脯氨酸残基位置



Brandts<sup>[32]</sup> 等用对反式脯氨酸肽键有特异性的酶解反应,证明了在生成  $U_s$  分子的慢过程中包括着 Pro-93 由顺式变为反式的异构化过程。对许多蛋白质的伸展与再卷曲机制的研究表明,类似的机制<sup>[33,34]</sup>是很普遍的。

RNase 的再卷曲同样也是两相过程,一相为快速过程( $\tau = 50 \text{ ms}, 25^\circ\text{C}$ ),另一相为慢速过程( $\tau = 20 \text{ s}, 25^\circ\text{C}$ ),如图 9 所示。它们分别反映  $U_F$  和  $U_s$  再卷曲生成天然 RNase 分子的过程。

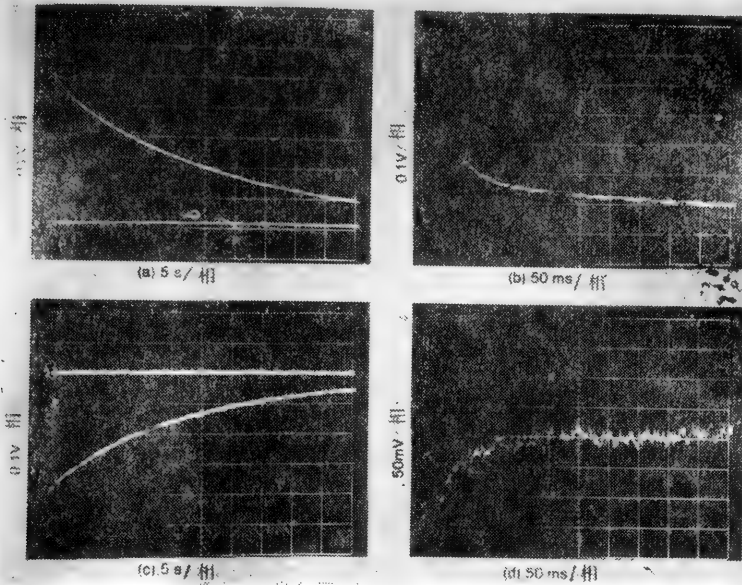


图 9 核糖核酸酶 A 分子再卷曲过程中的快慢两相过程

Baldwin<sup>[35]</sup> 等曾以 RNase 的特异性抑制剂 2'-CMP 与酶的结合为指标,测定再卷曲过程中酶活性部位的结合部位形成情况。酶与抑制剂的结合是异常迅速的过程,通常是在微秒时间范围内完成的,2'-CMP 在与酶结合前后,在 250 nm 的吸收有明显变化,可以用于酶分子卷曲过程中结合部位形成过程的动力学监测指标。实验结果表明,再卷曲过程中 2'-CMP 与酶结合情况的变化与酪氨酸吸收光谱的变化是一致的,这说明构象的恢复与酶和 2'-CMP 这样一个竞争性抑制剂结合能力的恢复是平行的。应该指出,抑制剂结合部位的形成与酶的催化活力的恢复可能是不同步的。因此,伸展与卷曲过程中,生物功能的变化与构象的变化的比较研究,才是更有意义的。

## 2. 伸展与卷曲过程中的活性变化

过去对蛋白质结构与功能关系的研究,主要用化学修饰、部分酶水解等方法,研究蛋白质化学结构的改变对其活力的影响。前已提到蛋白质空间构象的完整性,对于其生物活性的表现至为重要。近年来虽然对于一些蛋白质由于一些物理因素或化学变性剂引起的肽链伸展,以及去除这些因素后的再卷曲的中间过程及其机制,已经作了大量的研究,但是把上述伸展及再卷曲的过程与蛋白质生物活性的变化过程联系起来,研究其构象与活力关系的工作尚不多见。由于伸展以及再卷曲过程的起始部分常常是较快的,在几分钟内

即已完成,经典的终止反应取样测活的方法往往不能适用,必须设计全新的动力学方法,才能研究快速的失活与复活动力学过程。

我们过去在对酶的失活与复活过程中底物变化动力学进行理论上的探讨中<sup>[36]</sup>,曾提出在失活或复活的同时,在底物存在下监测产物生成的动力学方法,来测定失活或复活速度。这一方法最近已经得到实验上的验证<sup>[37]</sup>。应用这一方法,我们进行了肌酸激酶在胍、脲变性过程中构象变化速度与酶失活速度的比较<sup>[38-40]</sup>,结果总结于表2中。

表2 肌酸激酶在胍与脲溶液中变性速度与失活速度的比较

速度比较 变性剂 (mol/L)	变性速度常数 (秒 <sup>-1</sup> ×10 <sup>3</sup> )				失 活	
	紫外差吸收	荧 光	圆二色性	-SH 暴露速度	速度常数 (秒 <sup>-1</sup> ×10 <sup>3</sup> )	剩余活力 (%)
胍 0.5	4.3	3.6	0.77	1.4	3600	15
1.0	53	40	17	a	4300	0
脲 3.0	0.24	0.24	b	0.41	10000	14
4.0	0.32	0.60	b	3.83	13000	5
5.0	2.86	1.02	b	5.75	a	0

a:未测。

b:由于脲在220 nm的吸收无法测定远紫外的圆二色变化。

我们采用了紫外差吸收、荧光、圆二色光谱和测定内埋巯基的暴露四种手段,监测肌酸激酶分子肽链的伸展。其中紫外差吸收和荧光光谱的变化主要是反映色氨酸和酪氨酸残基周围微环境的变化,而圆二色性测定是代表分子内有序二级结构的变化。从表2可见,用上述各种手段测定构象变化速度,虽然各不相同,但大体上都在同一数量级范围内。但是与此形成鲜明对比的是,相同的变化条件下,失活速度却较构象变化速度约快1,000倍左右。胍与脲两种变性剂作用结果相似,在脲变性过程中,失活速度比胍变性时还要快。

前面曾提到,根据 Degani 等的实验结果,可以认为肌酸激酶必须以二体形式存在,才具有催化活性。因此对于变性过程中的快失活的一种可能解释是由于酶在变性时,酶的二体首先发生了快速解聚,从而造成了快速失活。但是我们过去的实验结果已经表明,变性肌酸激酶再卷曲时,无论是构象恢复速度,还是活性恢复速度,都在一定的范围内不受蛋白质浓度的影响<sup>[41]</sup>,表明酶分子的解离聚合可能与活性变化无关。

我们对快速失活的解释是该酶的活性部位处于一个空间结构脆弱的易为胍、脲这一类变性剂所破坏的部位。在活性部位中参与催化反应的各个基团间的完整的空间关系一旦发生变化,就可以引起酶活性的丧失。此时,整个酶分子的空间构象可能尚未发生明显的变化,而我们采用的各种监测构象变化的手段,主要反映的是整体酶分子的构象变化情况。肌酸激酶活性部位的脆弱性也许正是与酶分子的柔性(flexibility)或者运动性(mobility)有关。

酶分子在变性过程中,整个酶分子构象的缓慢变化伴随着活力迅速丧失的现象,究竟是肌酸激酶特有的呢?还是具有一定的普遍意义呢?为此,我们选择了单亚基、分子量较小

而空间结构又因含多个二硫键交联而比较稳定的胰凝乳蛋白酶和胰核糖核酸酶 A, 进行变性与失活的动力学比较研究。结果发现, 在胍、脲变性过程中, 失活速度仍然是明显快于整个分子构象变化速度, 与肌酸激酶的情形一致。

近年来, X 射线衍射晶体结构研究表明, 许多酶的活性部位接近于分子表面, 对于一些分子量较大的酶分子, 活性部位通常位于两个结构域之间的铰链部位, 催化作用常常必须依靠活性部位所具有的柔性或运动性。在胍、脲变性条件下, 首先发生的活性部位的轻微的构象变化, 已经足以导致酶分子的失活。还必须指出的是, 与催化活力相关的活性部位的运动性只能是相对的, 有一定限度的。已经知道在一些蛋白质分子的空间结构中, 存在着一些位于分子表面、空间结构松散或完全不含有序的二级结构肽段, 它们在溶液中有很大柔性或运动性。这些肽段恰恰是在进化中最易改变的, 而且对这些蛋白质的生物功能通常是非必需的。我们所说的活性部位的柔性或运动性与此不同, 它的有关肽段有精确的并且与催化功能密切相关的空间结构, 在进化上也是保守的。因此它的柔性或运动性必然是特定的、相对的、有一定限度的。

前已提到, 用已伸展的肽链的再卷曲作为研究蛋白质生物合成中肽链卷曲的模型是不适当的, 因为在生物合成过程中, 肽链是逐渐延伸的, 这和一条已经具有全部一级结构的肽链的再卷曲当然是不会相同的。当肽链不断延伸时, 二级、三级结构有可能随着肽链的延伸而逐渐形成, 而无需等待肽链全部合成之后再卷曲形成。当然这并不排除在肽链逐渐延伸的同时已经形成的高级结构不断进行调整。如果一个单肽链的酶的高级结构是在肽链生物合成过程中同时形成的, 那么它的酶活性的出现应该不迟于肽链合成的终止。用我们提出的动力学方法<sup>[30]</sup>, 追踪此类酶活力在肽链生物合成过程中的出现, 将可以对上述问题作出比较明确的答案。

## 六、结 束 语

多年来, 蛋白质结构与功能关系的研究一直是生物化学和分子生物学领域内一个主要课题。近年来的发展越来越使人们清楚地看到, 蛋白质分子在生物体内并不具有固定不变的或者说是绝对刚性的结构, 它在一定程度上是柔性的, 可变的, 并且处于一种不断运动的状态。蛋白质分子本身的运动造成蛋白质分子在溶液中处于一个多种构象状态的平衡态。这些不同构象状态在溶液中的相对丰度由各个构象状态的能级决定。而晶体结构则可能捕捉了其中一种能级较低、较为稳定、因而也是丰度最高的构象状态。在不同条件或不同配体分子存在下, 这些构象状态之间的相对丰度可以发生变化, 也可以有新的构象状态出现, 这就是蛋白质分子结构的柔性或可变性。换言之, 蛋白质分子的柔性或可变性的基础是蛋白质分子本身的运动。无论是柔性, 可变性或运动性都和蛋白质分子的生物功能密切相关。今天, 蛋白质结构与功能研究的正确提法, 应该是蛋白质的结构、运动与功能的关系。对于蛋白质的柔性或运动性的研究, 必将会对蛋白质的各种功能, 特别是酶的作用机制、肌肉收缩、能量转化、激素等物质与受体的相互作用以及基因调控等的研究起极大的推动作用, 使分子生物学与生物化学的发展达到一个新的水平。

## 参 考 文 献

- [1] Fowler, A. V., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **253**(1978), 5521.
- [2] Sanger, F., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **162** (1982), 729.
- [3] Eventoff, W., *et al.*, *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, **3**(1975), 111.
- [4] Blake, C. C. F., *et al.*, *TIBS*, April (1984), 100:147.
- [5] Levitt, M., *et al.*, *Nature*, **261**(1976), 552.
- [6] Richardson, J. S., *Adv. Prot. Chem.*, **34**(1981), 167.
- [7] Arthur, M. Lesk., *TIBS*, **9**(1984), 271.
- [8] Kossiakoff, A. A., *Nature*, **296**(1982), 713.
- [9] Wuthrich, K., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **155**(1982), 311.
- [10] Careri, G., *et al.*, *CRC. Crit. Rev. Biochem.*, **3**(1975), 141.
- [11] Anderson, C. M., *et al.*, *Science*, **205**(1979), 27:375.
- [12] Bennett, W. S., *et al.*, *Biopolymers*, **22**(1984), 261.
- [13] Gilbert, W. S., *Nature*, **271**(1978), 501.
- [14] Blake, C. C. F., *Nature*, **273**(1978), 267.
- [15] Anderson, W. F., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **92**(1975), 279.
- [16] Steitz, T. A., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **252**(1977), 4494.
- [17] Watts, D. C., *The Enzymes*, (Ed, Boyer, P. O.,) Acad. press, New York and London, **8**(1973), 383.
- [18] Bickerstaff, G. F., *et al.*, *Int. J. Biochem.*, **9**(1978), 10.
- [19] Degani, Y., *et al.*, *Biochemistry*, **18**(1979), 5917.
- [20] Degani, C., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255**(1980), 8221.
- [21] Degani, Y., *et al.*, *TIBS*, December (1980), **60**:337.
- [22] Blundell, T. L., *et al.*, *Rec. Prog. Hormone Res.*, **27**(1972), 1.
- [23] Bernhard, S. A., *et al.*, *Studies in Organic Chem.*, **10**(1981), 237.
- [24] Moras, D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **250**(1975), 9173.
- [25] 何燕生等, 中国科学, **B 3**(1979), 303.
- [26] 周筠梅等, 中国科学, **B 10** (1983), 904.
- [27] 赵康源等, 中国科学, **B 8**(1979), 809.
- [28] Tsou, C. L., *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, **11**(1983), 425.
- [29] Anfinsen, C. B., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **236**(1961), 1361.
- [30] Baldwin, R. L., *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **51**(1982), 459.
- [31] Brandts, J. F., *et al.*, *Biochemistry*, **14**(1975), 4953.
- [32] Brandts, J. F., *et al.*, *Biochemistry*, **22**(1983), 559.
- [33] Ridge, J. A., *et al.*, *Biochemistry*, **20**(1981), 1622.
- [34] Kato, S., *et al.*, *Biochemistry*, **21**(1982), 38.
- [35] Garel, J. R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **73**(1976), 1853.
- [36] 邹承鲁, 生物化学与生物物理学报, **5**(1965), 409.
- [37] Tian, W. X., *et al.*, *Biochemistry*, **21**(1982), 1028.
- [38] 姚启智等, 中国科学, **B 12**(1982), 1084.
- [39] 姚启智等, 中国科学, **B 10**(1984), 903.
- [40] Yao, Q. Z., *et al.*, *Biochemistry*, **23**(1984), 2740.
- [41] 侯立向等, 生物化学与生物物理学报, **15**(1983), 393.
- [42] Westhof, E., *et al.*, *Nature* **311** (1984), 123.

注: 根据温度因子, 或称 B 因子的测定, 可以用 X 射线晶体衍射的方法, 测定蛋白质分子中不同部分的柔性或运动性的程度(见[42])。

# 膜脂-膜蛋白的相互作用

杨福愉 黄芬 王金凤

(中国科学院生物物理研究所)

## 一、膜脂和膜蛋白的概述

### 1. 膜脂

- (1) 膜脂的组成
- (2) 膜脂的多形性

### 2. 膜蛋白

## 二、生物膜的流动性

### 1. 膜脂的流动性

- (1) 膜脂运动的几种方式
- (2) 膜脂的分相
- (3) 影响膜脂流动性的因素

### 2. 膜蛋白的运动性

- (1) 侧向扩散
- (2) 旋转扩散

## 三、膜脂对膜蛋白的作用

### 1. 脂质体——研究膜脂与膜蛋白相互作用的模型

### 2. 膜脂组分对膜蛋白功能的表现的专一性问题

### 3. “界面脂”

### 4. 膜脂流动性对膜蛋白的影响

### 5. 金属离子影响膜脂-膜蛋白的相互作用

## 四、膜蛋白对膜脂的影响

### 1. 膜蛋白与膜脂的结合

- (1) 外周蛋白的结合
- (2) 内在蛋白的结合

### 2. 膜蛋白结合对膜脂的作用

## 五、膜脂-膜蛋白相互作用的研究与农业、医药的联系

### 1. 药物对膜脂-膜蛋白相互作用的影响

### 2. 细胞膜的流动性与疾病

### 3. 植物的抗冷性与生物膜的流动性

## 六、结束语

生物膜系由蛋白质、脂质以及碳水化合物等组成的超分子体系。研究生物膜的结构与功能不仅需要膜脂、膜蛋白等单一组分进行研究,更重要的还应对构成生物膜各组分之间的相互关系,如膜蛋白-膜蛋白、膜脂-膜脂及膜蛋白-膜脂等进行探讨。一般认为,膜脂是膜的基本骨架,膜蛋白是膜功能的主要体现者。因此,膜脂-膜蛋白的相互作用是当前大家注意力比较集中的一个问题,对这一问题的探讨也可以说是生物膜结构与功能研究的一个中心环节。本文首先将对生物膜的主要组分:膜脂和膜蛋白的概况以及生物膜结构的主要特征——流动性作一扼要介绍,然后就膜脂对膜蛋白,膜蛋白对膜脂的影响分别进行讨论,最后对膜脂-膜蛋白相互作用的研究与医药、农业方面的联系作一些介绍。

## 一、膜脂和膜蛋白的概述

### 1. 膜脂

#### (1) 膜脂的组成

据估计生物膜约含 100 种不同的脂质,虽然膜是一个非常复杂的体系,但如果膜脂组成发生 1—2% 的变化(例如,胆固醇/磷脂的比值)就足以影响细胞的存活<sup>[1]</sup>。

一般来讲,所有哺乳动物细胞及其细胞器含有相同种类的脂质,然而有些膜脂在某些生物膜内有较多的分布。例如,二磷酸甘油酯(DPG)在线粒体内膜、溶酶体膜以及微生物细胞膜中含量较多;磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰乙醇胺(PE)分别是动物细胞膜和细菌细胞膜的主要组分;糖脂则在植物细胞膜占有主要的位置;胆固醇主要分布在动物细胞膜、溶酶体膜和高尔基体膜;谷甾醇(sitosterol)和豆甾醇(stigmasterol)在植物细胞膜中有较多的分布;神经鞘磷脂和神经节苷脂(gangliosides)一般分布在动物细胞的质膜中,而很少在植物或细菌中发现<sup>[2]</sup>。

在膜脂中,脂肪酸侧链组分也有相当的变动范围,绝大多数膜脂脂肪酸侧链均含偶数个C,其中含C<sub>16</sub>,C<sub>18</sub>,C<sub>20</sub>脂肪酸的约占80%以上。膜脂的脂肪酸侧链可含1—6个不饱和键,但是,18:1,18:2,20:4这几种几乎占90%以上。每一种膜所含饱和酰链/不饱和酰链的比值也有相当的差异。含有支链或环状结构的脂肪酸侧链的膜脂为数十分稀少。

## (2) 膜脂的多形性

生物膜以脂质双分子层为其基本骨架已为大家所公认。但是除脂双层结构外是否还存在其他结构,一直是人们感兴趣的问题。早在1962年Luzzatti等<sup>[3]</sup>用X射线衍射技术发现脂质分子在脂质体中除脂双层排列外,还具有形成多种相的能力,如立方晶系或单斜晶系结构,六角形I(H<sub>I</sub>),六角形II(H<sub>II</sub>)结构等,近年来由于<sup>31</sup>P-NMR与冰冻断裂电子显微镜技术的应用,在生物膜上脂质分子的排列尚存在非脂双层结构,已得到进一步证实。1979年荷兰学者Verkleij等<sup>[4]</sup>首次提出生物膜的非脂双层结构的概念。他们用<sup>31</sup>P-NMR测定含不饱和脂肪酸链的PE脂质体。在低温时,<sup>31</sup>P-NMR谱给出低场肩高场峰的不对称线形,此谱线形状反映了典型的脂双层结构。温度逐渐升高,<sup>31</sup>P-NMR谱线形状也发生改变,最后出现高场肩和低场峰,反映了磷脂分子的排列从脂双层转变为六角形II(H<sub>II</sub>)结构<sup>[5]</sup>。由冰冻断裂电子显微镜技术可观察PE脂质体从脂双层转变为六角形II(H<sub>II</sub>)结构的中间过程,即在低温时脂质体为脂双层结构,其冰冻断裂面较光滑;当温度超过PE相变温度时,冰冻断裂面上出现直径为60—140Å的脂质颗粒,它可能是脂质体从脂双层转变为六角形II(H<sub>II</sub>)结构的中间过渡结构(图1)。

膜脂呈现多形性与其组分有关。一般认为,PC及鞘磷脂在生物膜上往往形成稳定的脂双层结构,而含不饱和脂肪酸链的PE、单葡萄糖甘油二酯以及单半乳糖甘油二酯则容易形成六角形II(H<sub>II</sub>)结构。在Ca<sup>2+</sup>存在的情况下,DPG脂质体也能从脂双层结构转变为六角形II(H<sub>II</sub>)结构。

生物膜某些脂质分子形成六角形(H<sub>II</sub>)结构可能与适应生物膜某些重要生理功能有关,如细胞融合、Ca<sup>2+</sup>的运送。膜中脂质分子作翻转运动时,膜上也可能出现六角形II(H<sub>II</sub>)结构。看来,生物膜非双层脂结构对流动镶嵌模型是一个补充。

## 2. 膜蛋白

据估计膜蛋白约有50余种<sup>[1]</sup>。一般可分为两大类:外周蛋白和内在蛋白。大多数膜蛋白疏水氨基酸的含量较高,差不多一半以上的膜蛋白的极性率(polarity)低于40%(水溶性的球蛋白为47±6%)。值得提出的是,几乎所有的内在蛋白的跨膜疏水部分含有一个或一个以上的α螺旋结构片段,有的含有更多,如嗜盐菌紫膜的菌紫质和蛙视杆外端圆



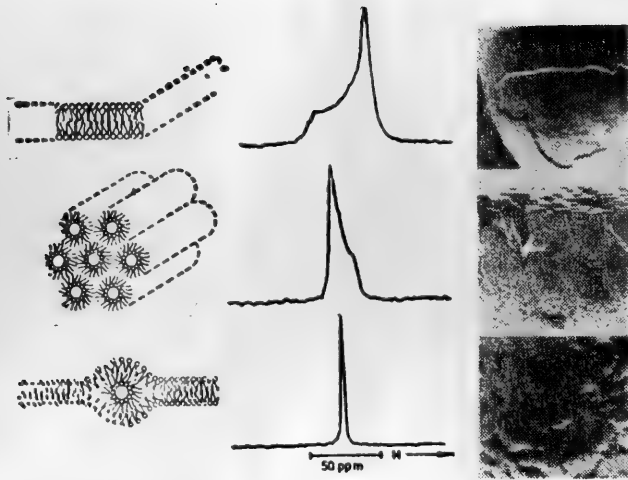


图 1 <sup>31</sup>P-NMR 与冰冻断裂电镜技术研究磷脂酰乙醇胺等脂质体脂双层(上)六角形 II (H<sub>II</sub>)(中)以及类脂颗粒图形(下)  
(引自 De Kruijff, *et al.*, Membrane transport, Vol. I, pp. 43-49, 1982)

盘膜视紫质嵌入膜的疏水部分均含有七个  $\alpha$  螺旋片段。大肠杆菌  $\beta$  半乳糖苷透酶也是一个内在蛋白,它含有 12 个  $\alpha$  螺旋片段,以曲折(zig-zag)形式分布在膜内,片段之间由亲水的环相连接<sup>[7]</sup>。

## 二、生物膜的流动性

1972 年美国学者 Singer 和 Nicolson 提出的“流动镶嵌”模型的特点之一,在于突出了膜的流动性,即膜脂和膜蛋白分子按二维排列,处于不停的运动状态。换言之,生物膜具有一种动态结构。

有关膜的流动性,早期主要指膜脂脂肪酸烃链部分的运动状态,目前,就广义而言,它既包括膜脂,也包括膜蛋白的运动状态。有时,也将膜蛋白的运动状态称为“运动性”(mobility)。

流动性是生物膜结构的主要特征。大量研究的结果表明,合适的流动性对生物膜表现正常功能具有十分重要的作用。例如,能量转换、物质运送、信息传递、细胞分裂、细胞融合、内吞外排(endocytosis or exocytosis)以及激素作用等都与膜的流动性有密切关系。

### 1. 膜脂的流动性

膜脂的基本组分是磷脂。在生理条件下,纯磷脂大多呈液晶态。当温度降至相变温度时,它们可以从流动的液晶态转变为类似晶态的凝胶状态。凝胶状态也可以“溶解”为液晶态(图 2)。各种膜脂由于组分不同而具有各自的相变温度。由于生物膜脂质组成很复杂,其相变温度的范围就很宽,有时可宽达几十度。

#### (1) 膜脂运动的几种方式

在相变温度以上时,磷脂的运动可归纳为下列几种方式:

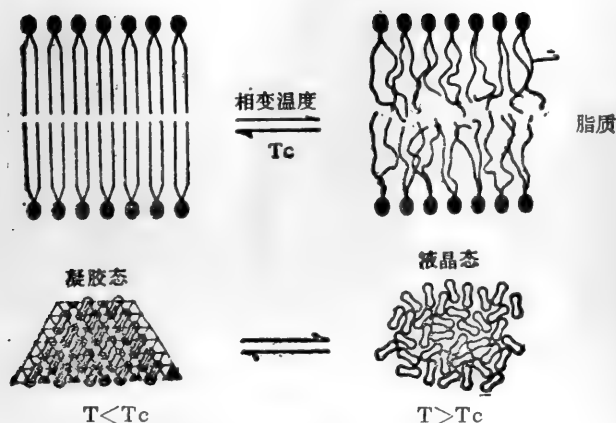


图 2 膜脂的相变

a. 脂酰链围绕 C—C 键旋转而导致异构化运动。膜脂分子脂肪酸的 C—C 键具有全反式(all trans)和偏转(gauche)两种构型(图 3)。在低温条件下膜脂主要以全反式构型存在,随着温度上升,偏转构型增多,流动性增大。

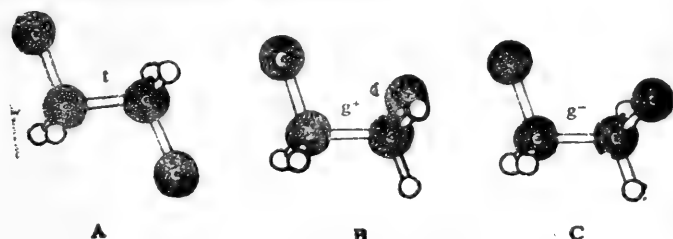


图 3 全反式和偏转构型示意图

A 全反式; B 和 C 分别为 A 旋转 120° 后形成的偏转构型: g<sup>+</sup>(顺时针方向旋转)和 g<sup>-</sup>(逆时针方向旋转)

b. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴左右摆动。值得注意的是,从整个磷脂分子来看,这种运动还表现出梯度现象。极性基团部分的运动较快,甘油骨架的运动较慢,脂肪酸链部分的运动又较快,尤以“尾部”运动得最快。

c. 磷脂分子围绕与膜平面相垂直的轴作旋转运动。

d. 磷脂分子在膜内作侧向扩散或侧向移动。表 1 列举了一些膜脂在人工膜和生物膜中的扩散系数。

表 1 人工膜和生物膜中膜脂的侧向扩散系数(D)

膜	检测方法	T(°C)	D (厘米 <sup>2</sup> 秒 <sup>-1</sup> )
卵磷脂(PC)	电子顺磁共振 (ESR)	20	10 <sup>-9</sup>
卵磷脂(PC)	核磁共振 <sup>1</sup> H-NMR	20	10 <sup>-9</sup>
肌质网微囊	ESR	40	6 × 10 <sup>-8</sup>
	NMR( <sup>1</sup> H)	50	10 <sup>-9</sup>
大鼠肝微粒体	ESR	40	10 <sup>-7</sup>
淋巴细胞质膜	荧光	20	10 <sup>-9</sup>
电鳗(Torpedo)的电器官	NMR( <sup>1</sup> H)	33	10 <sup>-9</sup>
大肠杆菌(E. coli)	NMR( <sup>1</sup> H)	31	10 <sup>-9</sup>
	ESR	40	10 <sup>-9</sup>

e. 磷脂分子在脂双层中作翻转(flip-flop)运动。由于膜脂分子是一种兼性分子,作翻转运动时必须通过脂双层的疏水区,因此,与其他运动方式相比较,这种运动速度要慢得多。表 2 列举了 PC 分子在一些生物膜中作翻转运动的速率。

表 2 磷脂酰胆碱(PC)或顺磁标记的 PC 类似物在生物膜内的翻转运动速率

膜	T(°C)	半存期(h)
大鼠红细胞	37	4.5
红细胞膜囊泡	37	2.3
内翻外的红细胞膜囊泡	37	5.3
莱氏衣原体( <i>Acholeplasma laidlawii</i> )膜	0	≤15秒
肝微粒体	25	<1
线粒体内膜	22	>24

上述膜脂的几种运动形式总结于图 4。在相变温度以下,有些方式的运动仍可进行,但是速度变慢。例如,膜脂的侧向扩散系数由  $>10^{-8}$  厘米<sup>2</sup>/秒(高于相变温度)变为  $10^{-10}$  厘米<sup>2</sup>/秒(低于相变温度)<sup>[2,8]</sup>。

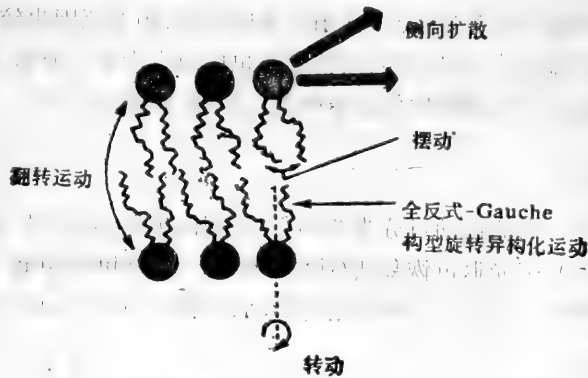


图 4 膜脂运动的几种方式

## (2) 膜脂的分相

当两种或两种以上纯磷脂混合时,由于它们的相变温度互不相同,因此,当温度降至某一值时,有的已转变为凝胶态,有的则仍处于液晶态,处于凝胶态和液晶态的磷脂分子分别各自汇集,这一现象称为分相(phase separation)。在生物膜中,由于脂类的组分比较复杂,又有膜蛋白以及其他各种因素的影响,即使在生理温度,这种分相现象也是存在的,从而形成一些流动性不一的微区(domain)。

## (3) 影响膜脂流动性的因素

影响膜脂流动性的因素很多,如膜脂的组成、膜蛋白、物理因素(如温度)、遗传因子、pH、离子强度、金属离子、药物作用等。下面仅对膜脂组成影响流动性的问题作一简单介绍。

### a. 胆固醇的影响<sup>[2,8]</sup>

胆固醇也是一种兼性分子,它对膜脂流动性具有显著的影响,其作用与膜脂的物理状

态密切相关。在相变温度以上,胆固醇增加膜脂的有序性,但在低于相变温度的条件下,胆固醇却又能扰乱膜脂有序性的增加,也即具有“流动剂”的作用<sup>[9]</sup>。NMR 的实验表明,在相变温度以上,胆固醇可使脂质分子脂酰链末端的甲基运动减小,即限制膜的流动性,在相变温度以下,胆固醇可增加脂质分子脂酰链的运动,从而增加膜脂的流动性。综上所述,在生理条件下,胆固醇可能对生物膜膜脂的流动性具有一定的调节作用。

**b. 膜脂脂酰链的不饱和键含量和链长<sup>[8]</sup>**

膜脂脂酰链中不饱和键的存在会降低膜脂分子间排列的有序性,增加流动性,但流动性并不随不饱和键数量的增加而成比例增加。例如,以油酸(C<sub>18:1</sub>)替代硬脂酸(C<sub>18:0</sub>)可明显地增加膜脂的流动性,但是,用亚油酸(C<sub>18:2</sub>)替代油酸,其流动性的进一步增加就不甚明显。膜脂脂酰链的不饱和程度主要通过细胞代谢来调节<sup>[10,11]</sup>,这是细胞为适应温度以及其他变化而调节膜流动性的主要途径。此外,膜脂脂酰链长的增加也会使流动性降低。

**c. 卵磷脂/鞘磷脂的比值**

在哺乳动物细胞膜中,卵磷脂和鞘磷脂含量约占整个膜脂的 50%。由于结构上的差异两者的流动性也有很大的不同。卵磷脂所含脂酰链的不饱和键含量高,相变温度较低;而鞘磷脂脂酰链中饱和键含量较高,其相变温度较高,相变范围也较宽。在 37℃ 即使卵磷脂和鞘磷脂都处于流动状态,后者的微粘度值也比前者大 5—6 倍。此外,在细胞衰老过程中,细胞膜的卵磷脂/鞘磷脂比值逐渐降低,流动性也逐步下降。

**2. 膜蛋白的运动性**

在生物膜中膜蛋白的运动可分为两种方式:侧向扩散和旋转扩散。由于饱和转移电子顺磁共振(ST-ESR)、荧光退色恢复法(fluorescence photobleaching recovery)和闪光光解法(flash photolysis)等新技术的应用,使人们对膜蛋白的运动又增添了不少认识。

**(1) 侧向扩散**

通常用荧光退色恢复法测定膜蛋白的侧向扩散速度。表 3 列举了一些膜蛋白的侧向扩散系数。与膜脂相比较,显然,膜蛋白的侧向扩散速度慢很多。有人认为内在蛋白扩散系数与其疏水部分半径的对数成比例,因此,一个分子量为 100,000 的内在蛋白的扩散系数仅为膜脂扩散系数的 50%。还有人估计膜激素受体蛋白从细胞一端移至另一端平均约需 1 秒钟。此外,膜蛋白的侧向扩散也受到细胞骨架的很大制约。据报道,如果红细胞骨架

**表 3 一些内在的膜蛋白的侧向扩散系数(D<sub>L</sub>)**

蛋白质	样品	T(°C)	D <sub>L</sub> (厘米 <sup>2</sup> /秒)
视紫红质	视杆细胞外段	20	2—6 × 10 <sup>-9</sup>
胰岛素受体	成纤维细胞	23	3—5 × 10 <sup>-10</sup>
刀豆球蛋白A受体	成纤维细胞	22	10 <sup>-11</sup>
血型糖蛋白A (glycophorin A)	重组于双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱 (DMPC)脂质体	>相变温度	10 <sup>-8</sup>
乙酰胆碱受体	肌管(myotubes)	35	10 <sup>-12</sup>
菌紫质	嗜盐菌紫色膜		<10 <sup>-12</sup>

(由收缩蛋白、肌动蛋白、带3蛋白等组成)发生缺陷(例如,球形红细胞),那末膜的内在蛋白的侧向扩散速率就会增加50倍左右<sup>[8]</sup>。

## (2) 旋转扩散

除侧向扩散外,膜蛋白还可围绕与膜平面相垂直的轴进行旋转运动。实验结果还指出,膜蛋白似乎只能旋转而不能改变相对定位作滚动。一般以旋转弛豫时间表示旋转扩散的速率。

与侧向扩散相似,不同的内在蛋白由于本身及微环境的差别,它们的旋转扩散也有很大的差异。由表4可以看到,视杆外段盘状膜的视紫红质的旋转速率比嗜盐菌紫色膜的菌

表4 一些内在的膜蛋白的旋转弛豫时间

膜蛋白	分布	旋转弛豫时间( $\mu$ s)
视紫红质	视杆外段盘状膜	20
细胞色素 a <sub>3</sub>	线粒体内膜	100—300
带3蛋白质	红细胞膜	500
Ca <sup>2+</sup> -ATP酶	肌质网膜	60—100
乙酰胆碱受体	电鳐( <i>Torpedo</i> )电器官	>0.7
菌紫质	嗜盐菌紫色膜	>20,000

紫质快许多,两者的旋转弛豫时间至少相差1,000倍。内在蛋白的旋转扩散还与周围脂质有密切关系。以视紫红质为例,如视杆外段盘状膜经磷脂酶处理去除磷脂后,其旋转扩散将逐步减慢,当70%的脂质被去除后,旋转扩散就不再进行<sup>[12]</sup>。

## 三、膜脂对膜蛋白的作用

### 1. 脂质体——研究膜脂与膜蛋白相互作用的模型

生物膜是一个复杂的多分子体系,因此,如果用生物膜研究膜蛋白-膜脂相互作用就非常复杂。一般是将分离、提纯的膜蛋白重建到人工膜上,形成一个比较简单的模型体系,然后再进行研究。人工膜可分为三种:单分子磷脂层、双分子磷脂平面膜(或称黑色脂膜)和双分子磷脂微囊(或称脂质体),其中脂质体应用最广。它的制备方便,嵌入膜蛋白又较易成功,保存时间也较长。脂质体依大小和层次可分为:多层脂质体(直径范围为0.5—20微米)、单层小脂质体(直径约为0.02—0.05微米)和单层大脂质体。制备方法有:机械振荡法、超声法、微量注射法、压喷法以及溶剂蒸发法等。将膜蛋白重建于脂质体的常用方法有:去垢剂透析法、去垢剂稀释法、冰冻融化法和保温法等。

### 2. 膜脂组分对膜蛋白功能的表现的专一性问题

生物膜的内在蛋白需要一定量的膜脂才能维持其构象,表现其活性。因此,纯化以后的膜蛋白所含膜脂量如果降低到一定程度,有些膜蛋白的活性就剧烈下降,甚至完全不表现。例如,每分子肌质网膜Ca<sup>2+</sup>-ATP酶至少需30个磷脂分子才表现出完全的活性,每毫克细胞色素氧化酶则需0.2毫克磷脂。

那么,内在蛋白对膜脂的需求是否有专一性呢?看来,对于不同的内在蛋白情况不尽相同。有些内在蛋白对膜脂需求的专一性很强,例如,线粒体内膜 $\beta$ -羟丁酸脱氢酶需要磷脂酰胆碱才能表现其活性,而溶血磷脂或神经鞘磷脂只具有部分作用。细菌膜的磷酸乙醇丙酮酸磷酸转移酶需磷脂酰甘油(PG)才表现出最高活性。此外,如糖基转移酶、半乳糖基转移酶需磷脂酰乙醇胺才能激活。曾有报道,莱氏衣原体膜若被磷脂酶 $A_2$ 水解而除去90%的磷脂酰甘油,其ATP酶活性即丧失,若加入PG或磷脂酸(PA),则酶活性又可恢复。这说明该ATP酶需酸性磷脂才能表现活性。我们曾将酸性磷脂加入被磷脂酶 $A_2$ 处理的莱氏衣原体AIH 089,ATP酶活性也可得到一定的恢复<sup>[13]</sup>。

然而,有些膜结合酶对膜脂需求的专一性就不十分强烈。例如,线粒体内膜 $H^+$ -ATP酶<sup>[14]</sup>、细胞色素氧化酶<sup>[15]</sup>、 $Na^+$ 、 $K^+$ -ATP酶以及肌质网膜 $Ca^{2+}$ -ATP酶等。后者甚至可用去垢剂替代磷脂使酶表现其功能。我们实验室曾比较了七种具有不同极性“头部”的磷脂和五种具有不同脂肪酰链的PC对经去脂已丧失活性的猪心线粒体细胞色素氧化酶的影响<sup>[15]</sup>。结果表明,磷脂的极性“头部”和疏水脂酰链对恢复去脂细胞色素氧化酶的活性都有影响。从极性“头部”来看,不同纯磷脂恢复去脂酶活性的顺序为 $PS > DPG > PI > PA > PG > PC, PE$ ,而从含有不同疏水侧链的PC所产生的效果来比较,则 $DOPC > LPC > PC > DPPC, DSPC$ 。对去脂 $H^+$ -ATP酶也进行了类似的研究<sup>[14]</sup>,结果表明,不同磷脂恢复去脂 $H^+$ -ATP酶活性的顺序为 $PS > DPG > PA > PI, PE, PC$ 和 $DOPC \gg DSPC, DPPC, DMPC, DLPC$ ,即酸性磷脂的作用明显地大于中性磷脂的作用,含有不饱和脂酰链的PC的作用大于含饱和脂酰链的PC。但是,酸性磷脂作用大小与所带负电荷数并不呈正相关。

膜内在蛋白(包括膜结合酶)活性的表现有赖于膜脂存在的原因可能是后者使前者的构象发生了一定的变化。圆二色仪的测试证明很多蛋白质或多肽与膜脂结合后,其构象的确发生一定的变化。如蜂毒毒素(melittin)与PC结合后就从伸展链转变为 $\alpha$ 螺旋结构<sup>[16]</sup>。多聚赖氨酸和多聚(赖-苯丙)与PS结合后也可从无序的盘卷状态变为 $\alpha$ 螺旋结构。有些磷脂对某些膜结合酶似乎具有一种“别构效应”,如当 $\beta$ -羟丁酸脱氢酶加入PC之后,可提高酶蛋白与底物或辅酶(NADH)的结合,从而使酶的活性大大增加。

### 3. “界面脂”

“界面脂”这一概念最初是由Jost等人在1973年提出,用以讨论细胞色素氧化酶分子周围的第一层脂的特性。将细胞色素氧化酶重建在自旋标记了的脂质体中,在这一重组体系的ESR谱,他们观察到一个窄谱线成分和一个宽谱线成分,而且宽谱线成分与蛋白质含量成正比关系。他们认为这一宽谱线成分是由于紧邻细胞色素氧化酶的单层脂中的自旋标记探针被固定化的结果。由此,Jost等人首先提出膜内在蛋白周围存在着不可活动的单层“界面脂”。其后,“界面脂”这一术语被广泛用于讨论细胞色素 $b_6$ 、 $\beta$ -羟丁酸脱氢酶、视紫红质、肌质网 $Ca^{2+}$ -ATP酶等周围的这一层脂的特性中。同时,各种类似的术语也相继被提出,并且都假定内在蛋白周围存在一个不活动的脂壳层,把疏水的内在蛋白和流动的脂双层分隔开。有人还更进一步提出,不活动的脂壳层是永久存在的,即使当整个体系中的脂处于非常流动的状态时,脂壳层中的脂和整体脂之间的交换也是非常慢的,1977年Vanderkooi运用“界面脂”这一概念讨论蛋白质周围一个完整的,其特性受蛋白质扰动的脂区域。按照他的定义,凡由于蛋白质的存在而受到影响的脂均称为“界面脂”。这样,在



“界面脂”区域中,内在蛋白外围可运动的氨基酸侧链与脂分子的脂肪酸链相互交错,因此,“界面脂”特性的改变必将影响氨基酸侧链,进而改变蛋白质本身的构象。

尽管“界面脂”概念已被广泛地应用于讨论蛋白质与脂的相互作用,有关不活动的“界面脂”的存在问题却始终有争议<sup>[17]</sup>。Oldfield 和 Rice 等人的 NMR 测试结果明确指出,从实验上不能证实存在“界面脂”和“非界面脂”两种不同的组分,<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>P、<sup>2</sup>H 等核的 NMR 研究只给出一种脂的运动状态。对视紫红质体系的 ESR 研究也给出不同的结果;Pontus 等人从实验上证实了视紫红质周围存在着不活动的界面脂层;而 Devaux 等人则得出,视杆外段盘状膜视紫红质周围的脂是无序的,即处于流动状态。Kang 等人<sup>[18]</sup>观察了具有不同磷脂组分的嵌有细胞色素氧化酶的脂酶体中 <sup>2</sup>H-NMR 信号,他们发现,高于纯脂双层的相变温度时,纯脂双层氧化甲基谱的四极分裂为 3.7 kHz,当脂酶体中含有 90% 细胞色素氧化酶时(即脂酶体中的脂已成为界面脂),氧化甲基的四极分裂为 2.6 kHz,然而,在“界面脂”与“游离”脂之间存在着快速的化学交换( $\geq 10^3 \text{ s}^{-1}$ ),平均了两种脂之间的 1 kHz 差别。因而,在高于相变温度和刚低于相变温度时,脂酶体氧化甲基只给出一种窄谱线成分。温度继续降低,出现两种谱线成分:四极分裂为  $\sim 3$  kHz 的窄谱线和来自与蛋白结合的“界面脂”氧化甲基的,四极分裂为 15 kHz 的宽谱线,即  $10^3 \text{ s}^{-1}$  的交换速度已不足以平均两种脂之间的差别。根据上述实验结果他们提出:即使在“界面脂”中疏水链的运动可能比在纯脂双层中的慢,但是,其运动的幅度比在纯脂双层中的大,即“界面脂”是动态无序的,而且,在大部分情况下与“游离”脂以  $10^3 \text{ s}^{-1}$  的速度进行交换。在大肠杆菌细胞膜中的 <sup>2</sup>H-NMR 实验给出同样的结论。其他一些 NMR 实验也在不同程度上支持了 Kang 等人的结论。

现在,对“界面脂”的争论已趋于统一,认为两种磁共振方法研究结果的矛盾是由于 ESR 和 NMR 具有不同的时标而引起的,ESR 测量的时间范围为  $10^{10}$ — $10^7 \text{ s}^{-1}$ ,对分子的较快速运动敏感;NMR 测量的时间范围为  $10^6$ — $10^4 \text{ s}^{-1}$ ,可探测分子的较慢速运动。并且,有一点可以说已肯定,即不存在长寿命的“界面脂”。但是,另一方面,由于各种膜内在蛋白对其周围脂具有不同程度的专一性或选择性,因此,这些膜脂的组成及物理特性必然与整体脂存在着差异,这种差异可能也是导致生物膜形成很多微区(domain)的重要因素之一。

#### 4. 膜脂流动性对膜蛋白的影响

生物膜的内在蛋白部分或全部嵌入脂双层的疏水部分,因此,通过改变膜脂流动性来观察膜蛋白的变化,在膜脂-膜蛋白相互作用的研究中占有很大的比重。人们往往以膜结合酶活性的对数对反应温度的倒数作图——即绘制 Arrhenius 图,做为一种经常采用的研究方法。改变膜脂组分,Arrhenius 图有时就会出现不同的折点温度。

意大利 Lenaz 实验室通过有机溶剂(如丁醇)对膜脂流动性的影响来观察牛心线粒体  $\text{H}^+$ -ATP 酶活性的变化,结果表明,丁醇能增加膜脂的流动性,从而使  $\text{H}^+$ -ATP 酶活性的 Arrhenius 图的折点降低。他们还对牛心线粒体  $\text{H}^+$ -ATP 酶复合体的可溶性部分(F1)以及 F1 与位于线粒体内膜脂双层疏水部分(F0)的复合体(F1·F0)的 Arrhenius 图分别进行了研究,发现前者在 5—30°C 范围内呈一直线,后者在 23°C 附近出现折点。他们认为可溶性蛋白 F1 本身并不发生构象和活化能的变化,但与 F0 结合后,F0 周围膜脂的

流动性间接地影响 F1 活化能,从而使 Arrhenius 图出现了折点<sup>[16]</sup>。我们对猪心线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶复合体和分离的纯 F1 进行了研究,由酶活或色氨酸内源荧光值的 Arrhenius 图得出:F1 的 Arrhenius 图折点为 17°C,而 F1·F0 复合体的 Arrhenius 图折点则移至 22°C<sup>[20]</sup>。说明水溶性酶蛋白 F1 的 Arrhenius 图也可能出现折点,而且在 F1·F0 复合体中,膜脂的物理状态通过 F0 对 F1 有间接影响,从而改变其折点温度。

有人报道,支原体膜 ATP 酶的 Arrhenius 图的折点温度也受膜脂流动性的影响。支原体本身不能合成长链的饱和及不饱和脂肪酸,它依赖于培养基中提供的外源脂肪酸来合成膜脂,因此,可以通过培养基脂肪酸组分的控制来改变支原体膜的膜脂组分和流动性。De Kruffyff 等报道<sup>[21]</sup>,当反油酸、硬脂酸与棕榈酸渗入莱氏衣原体膜后,结果 Arrhenius 图在 15°C,18.5°C,18°C 出现三个折点;如果用油酸及亚油酸(其流动性均大于棕榈酸、硬脂酸)渗入,则 Arrhenius 图中不出现折点。

对于 Arrhenius 图折点温度的含义存在着不同的看法:(1)认为折点温度是某一膜结合酶“界面脂”的相变温度;(2)折点温度不仅仅只反映膜结合酶邻近单层脂的相变;(3)折点温度与膜脂相变无关,而很可能与膜结合酶本身的构象、运动、底物与酶蛋白的结合、水的结构,甚至 pH 等随温度而变化有关。这些问题需要进一步研究才能澄清,因此,在这里我们不拟对上述看法逐一加以评述。Arrhenius 图的折点温度很可能是反映膜结合酶所处微区的膜脂相变温度。在这方面,Sandermann<sup>[22]</sup>报道了一组很有趣的实验结果。定位于大鼠肝细胞质膜脂双层外层的高血糖素激活的腺苷酸环化酶、5'-核苷酸酶、磷酸二酯酶 I 以及 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,Mg-ATP 酶的 Arrhenius 图,在 25—30°C 范围内有折点出现。但是,在同样的条件下,位于脂双层内层的 CAMP 磷酸二酯酶和 NaF 激活的腺苷酸环化酶的 Arrhenius 图却没有折点出现。

膜脂的流动性对膜内在蛋白嵌入脂双层的深度有一定影响。当膜脂流动性降低,嵌入的膜蛋白暴露于水相的部分就会增加。相反,如果膜脂流动性增加,嵌入的膜蛋白将更多地深入膜脂双层。因此,膜脂流动性的变化无疑将影响膜蛋白的构象与功能。Lippert 等<sup>[23]</sup>应用拉曼散射光谱对溶菌酶与 DPPA 和 DPPC 混合磷脂的相互作用进行了研究。结果表明,低于 27°C 时,磷脂以全反式构型为主,溶菌酶中的螺旋量稍有增加,高于 30°C,酸性磷脂的侧链开始无序,酶蛋白中的 β 折叠结构也开始形成。而且,在整个测试温度范围内,位于 782 cm<sup>-1</sup> 谱带的 O—P—O 伸展模式的拉曼强度在酶与磷脂结合的脂酶体中比脂酶体中要强。这些现象表明,低于有序-无序相变温度,溶菌酶被排除出脂的疏水部分,酶蛋白

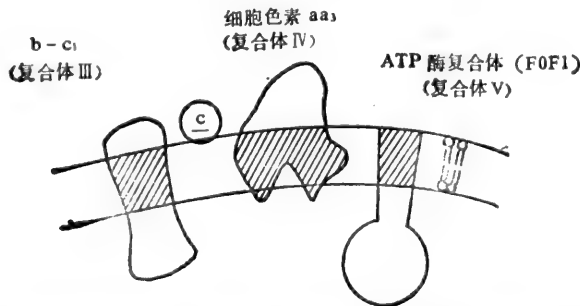


图 5 线粒体内膜三个主要酶复合体,嵌入内膜双分子脂层部分仅占它们总重量的 17—30%(斜线部分)  
(引自 Hackenbrook, C. R., *TIBS*, 1981, 6:151)

仅与脂“头部”相互作用；温度较高时，酶蛋白与脂的相互作用涉及到处于无序状态的酸性磷脂侧链，后者使溶菌酶的构象发生改变。

大量研究表明，膜脂合适的流动性是膜蛋白正常功能表现的必要条件。例如，线粒体的内在蛋白与磷脂的比例虽然高达 3:1，但实际上嵌入脂双层部分的蛋白质所占比例并不大(图 5)，因而仍可进行侧向扩散。最近 Slater<sup>[24]</sup>提出的有关能量偶联机制的“碰撞假说”也是基于上述事实来考虑的。线粒体内膜是组成电子传递链的氧化还原酶系以及实现偶联磷酸化的 H<sup>+</sup>-ATP 酶复合体分布的场所。根据“碰撞假说”，无论电子传递还是偶联磷酸化都是通过随机的碰撞来实现的。显然，这种过程必然依赖于膜脂的流动性。

### 5. 金属离子影响膜脂-膜蛋白的相互作用

金属离子(尤其是二价金属离子)影响膜脂-膜蛋白的相互作用逐渐引起人们的注意。有关 Ca<sup>2+</sup> 影响膜脂-膜蛋白的相互作用已有初步综述<sup>[25]</sup>。我们实验室在研究猪心线粒体 H<sup>+</sup>-ATP 酶的重建过程中发现，如有 Mg<sup>2+</sup> 存在于此过程中，则重建酶的 <sup>32</sup>P-ATP 交换活性、水解活性及其对寡霉素或 DCCD 的敏感性都有非常明显的提高(表 5)<sup>[26-28]</sup>。

表 5 加镁及不加镁条件下重建 H<sup>+</sup>-ATPase 的活性比较

脂酶体 样品	ATPase 活力及活性对抑制剂的敏感性					
	增加		寡霉素		DCCD	
	比活	(%)	比活	抑制 (%)	比活	抑制 (%)
无 Mg <sup>2+</sup>	3.89		3.19	18	3.54	9
有 Mg <sup>2+</sup>	7.76	99	2.41	69	5.04	35

ESR 和荧光偏振实验结果表明，有 Mg<sup>2+</sup> 条件下 H<sup>+</sup>-ATP 酶重组体系脂质表层的流动性明显降低，但 Mg<sup>2+</sup> 对较深层脂的流动性没有明显影响(表 6)<sup>[28-30]</sup>。圆二色测定的结果

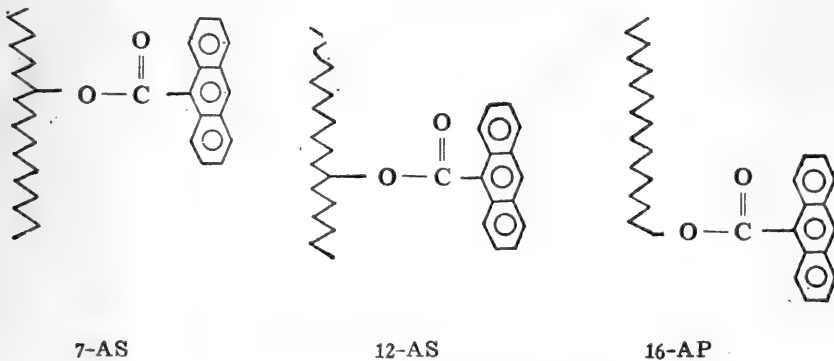


表 6 含镁与不含镁脂酶体荧光偏振度的比较

脂酶体 样品	荧光偏振度(P)		
	7-AS	12-AS	16-AP
无 Mg <sup>2+</sup>	0.163±0.004(7)	0.114±0.005(6)	0.067±0.006(5)
有 Mg <sup>2+</sup>	0.174±0.004(7)	0.114±0.005(6)	0.067±0.008(5)
	P<0.05	n.s.	n.s.

表明,在有  $Mg^{2+}$  条件下重建的  $H^+$ -ATP 酶的脂酶体中, $\alpha$  螺旋的含量比无  $Mg^{2+}$  条件下的增加 26%<sup>[31]</sup>。由此可见, $Mg^{2+}$  的作用很可能是通过脂质分子靠近表层部分物理状态的改变影响  $F_0$ ,并影响与之连接的  $F_1$  构象,而使之呈现较高的酶活性。从实验我们还看到,在嵌有  $H^+$ -ATP 酶的脂酶体中,脂双层两侧含  $Mg^{2+}$  比一侧含  $Mg^{2+}$  对提高酶活以及对寡霉素的敏感性都更明显<sup>[32]</sup>。这一结果提示,在重建过程中, $Mg^{2+}$  可能同时影响两层脂质分子以提供  $F_0$  周围微区的一定物理状态,从而有利于 ATP 酶呈现合适的构象。原子吸收光谱测定  $Mg^{2+}$  的结合位点主要是磷脂分子<sup>[33]</sup>。我们还将  $H^+$ -ATP 酶复合体先用尿素和胰蛋白酶处理以除去  $F_1$ ,然后分成两部分:一部分经  $Mg^{2+}$  处理,在除去未结合的  $Mg^{2+}$  之后再加入  $F_1$  与之重组;另一部分为对照。实验结果表明,经过  $Mg^{2+}$  处理的样品无论是酶活还是对寡霉素的敏感性都明显大于对照样品。这一实验说明, $Mg^{2+}$  的作用位点主要是与脂质紧密结合的  $F_0$  部分<sup>[34]</sup>。综上所述, $Mg^{2+}$  对重建  $H^+$ -ATP 酶酶活促进作用的机制可设想如图 6 所示。

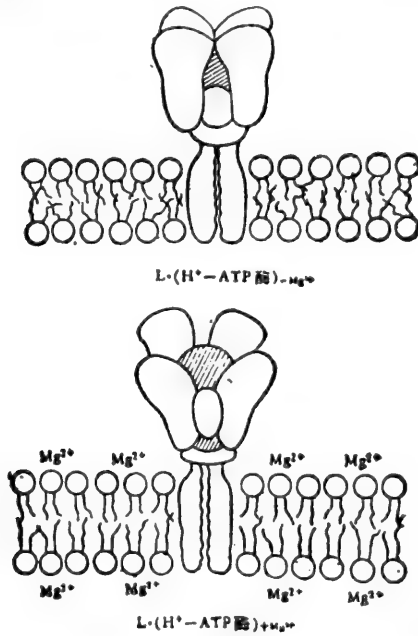


图 6  $Mg^{2+}$  对重建  $H^+$ -ATP 酶酶活促进作用的示意图

除  $Mg^{2+}$  以外,我们还研究并比较了其他二价金属离子,如  $Ca^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  等的作用,看来  $Mg^{2+}$  的作用具有一定的专一性<sup>[27]</sup>。此外,我们也研究了  $Mg^{2+}$  对细胞色素氧化酶、肾外髓  $Na^+$ 、 $K^+$ -ATP 酶等膜结合酶在脂质体中重建的影响,发现在这些重组体系中, $Mg^{2+}$  都有相似的促进作用。

#### 四、膜蛋白对膜脂的影响

##### 1: 膜蛋白与膜脂的结合

膜蛋白按其不同类型可以多种方式与脂双层结合,现叙述如下:

## (1) 外周蛋白的结合

外周蛋白通过静电力(蛋白质带电荷)或范德瓦尔斯(Van Der Waals)力(蛋白质不带电荷)与膜结合。在蛋白质与脂的结合面处含有大量的水。

### a. 静电结合

细胞色素 c 是外周蛋白通过静电力与细胞膜表面结合的一个典型例子(图 7a)。在细

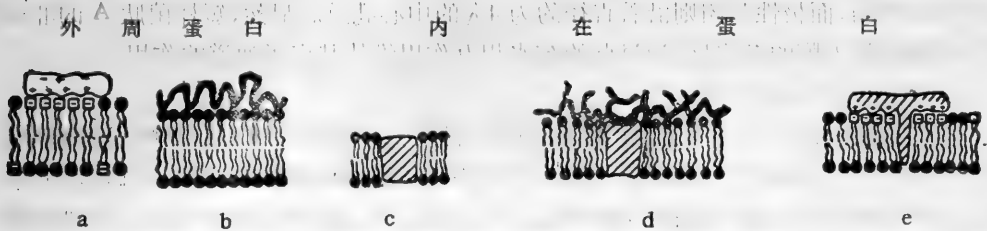


图 7 膜蛋白与膜脂相互结合机制的示意图

- a. 静电结合如细胞色素 c; b. 范德瓦尔斯力相互作用如收缩蛋白; c. 疏水相互作用如短杆菌肽二聚体;  
d. 疏水/亲水相互作用如血型糖蛋白; e. 疏水/静电相互作用如髓鞘碱性蛋白

胞色素 c 分子上有带负电和带正电的区域,整个分子具有可观的非对称电荷分布,在中性 pH 时,它带有过量的正电荷。细胞色素 c 与含有酸性和中性磷脂的脂双层静电结合。当带负电荷的磷脂如 DPG 增加时,结合到脂双层的细胞色素 c 的量也增加。早在 1975 年 Van 和 Griffith<sup>[35]</sup>就已通过 ESR 谱观察自旋标记了的细胞色素 c-磷脂系统的相互作用,并得出细胞色素 c 只是坐落在脂双层表面而对脂双层的特性影响很小的结论。但是,他们也指出,上述结果并不排除细胞色素 c 与脂双层的静电结合对靠近极性“头部”脂双层的扰动以及可能引起的脂的分相。

### b. 范德瓦尔斯力相互作用

范德瓦尔斯力是普遍存在于分子之间的一种引力。分子中非极性基团具有偶极矩和诱导偶极矩,这些偶极矩与偶极矩、偶极矩与诱导偶极矩之间的吸引力,共同组成范德瓦尔斯引力。这种引力在非极性分子短程相互作用中是重要的,它与两个分子之间的距离六次方成反比,同时,与分子的大小、形状有关。

大量的研究表明,红细胞膜收缩蛋白与肌动蛋白组成复合物,起着维持红细胞形状以及限制膜中蛋白侧向扩散的作用。Fung 等人<sup>[36]</sup>将自旋标记物 Mal-6 结合到红细胞膜以及分离出的收缩蛋白-肌动蛋白复合物的巯基上,对这些样品的 ST-ESR 研究指出,从完整膜中以及从蛋白复合物中得到的波谱非常相似。说明蛋白复合物与红细胞膜的结合实际上并不影响蛋白复合物的动态特性,也即收缩蛋白-肌动蛋白复合物与红细胞膜的其他成分之间仅有弱的相互结合。这一结论与这些蛋白质能够很容易地从膜上被提取的事实相符合。因此可以认为,收缩蛋白-肌动蛋白复合物是靠范德瓦尔斯力吸附在红细胞膜表面上的(见示意图 7b)。

## (2) 内在蛋白的结合

内在蛋白主要是通过疏水效应与膜脂相结合。但是,不同类型的内在蛋白与膜脂的相互结合机制又可分为如下几种:

### a. 疏水作用

蛋白质分子上具有非极性基团的氨基酸侧链与脂双层的疏水尾部都与水疏远。在熵的趋动下,这些非极性基团之间存在一种相互趋近的力(称为疏水相互作用),而当非极性基团相互靠近时,范德瓦尔斯力就成为疏水作用的本质。

短杆菌肽 A 在膜中形成跨膜的离子通道,这可以作为内在蛋白通过疏水相互作用与膜脂结合的一个很好的模型(图 7c)。短杆菌肽 A 以二聚体在膜上形成空心柱。其疏水侧链在柱的外围,而极性基团则沿着直径约为 4 Å 的中心孔道。显然,短杆菌肽 A 的非极性氨基酸侧链渗入膜的疏水区,通过强的疏水相互作用维持其离子通道的作用。

### b. 疏水/亲水相互作用

某些跨膜的内在蛋白可表现出疏水/亲水特性。一个典型的例子是 MN 血型糖蛋白,糖蛋白的含糖量为其重量的 60%,有 160 个糖分子(其中唾液酸的含量相当高),16 条寡糖链。这些糖链集中在糖蛋白分子的 N 端,成为蛋白质的亲水头部基团,伸出于细胞膜外表面,与膜脂“头部”相互作用。糖蛋白肽链的中间部分含有高比例的非极性氨基酸侧链,位于脂双层的疏水区,通过疏水相互作用与脂双层结合(图 7d)。

### c. 疏水/静电相互作用

Papahadjopoulos 和 Hartman 在 1977 年和 1978 年曾先后指出,有一类蛋白质与脂的相互作用既涉及静电又涉及疏水相互作用(见图 7e)。人中枢神经系统的髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein)就属于这一类蛋白质。Stollery 等人<sup>[47]</sup>将碘乙酰胺 iodoacetamide 自旋标记共价结合于碱性蛋白 N 端的第 21 位和第 167 位上的甲硫氨酸残基,然后将标记的蛋白质重建在不同组分的脂质体中。应用 ESR 测量了序参数  $S$  和相关时间  $\tau_0$ 。根据这些参数所指出的自旋标记的不活动程度,发现脂质体中磷脂成分不同时,自旋标记深入到脂双层的程度也不同。这表明,在不同的磷脂脂质体中,蛋白疏水片段渗入进脂双层的程度是不同的,从而与脂疏水相互作用的程度也不同。其作用大小秩序为:PG 和 PA 最强,然后是 PS > 脑苷脂硫酸 > PE。他们认为,产生这一现象的原因是由于蛋白质与脂之间发生静电相互作用,例如,PA 带负电的“头部”与蛋白质碱基间的静电相互作用将会破坏相邻的 PA 分子之间的氢键,致使疏水作用可以发生;而 PE 分子则相互之间而不是与蛋白质发生静电作用,因而分子间的网络使蛋白质不能将膜扩张而渗入脂双层中。这一实验结果有力地证明了内在蛋白与膜脂之间存在的疏水/静电相互结合的机制。

## 2. 膜蛋白结合对膜脂的作用

在生物膜中,不同的膜脂组分以及膜脂的动态特性和构型对维持膜结合蛋白的构象,表现其活性起着重要的作用。然而,在膜内蛋白大分子的结合也将影响脂的构造,使脂双层排列变形。总的来说,蛋白质大分子将以两种效应扰乱膜脂链的结构<sup>[38]</sup>:(1)短程效应。由于这种效应,蛋白质只对邻近的脂发生影响。因而,蛋白质疏水核附近的脂链排列(或序参数)将改变(图 8a)。(2)长程效应。当蛋白质的疏水核为非圆柱状,或只有部分渗入脂双层中时,蛋白质将使脂分子排列倾斜,即发生楔形畸变(图 8b);当蛋白质疏水部分的长度与脂分子长度不相符时,则蛋白质的结合将使脂双层压缩(蛋白质疏水部分较短)或膨胀(蛋白质疏水部分较长)(图 8c)。脂与蛋白质之间的相互作用显然在调节蛋白质构象以及维持膜作为极性化合物通透屏障的结构完整性方面起着相当重要的作用。



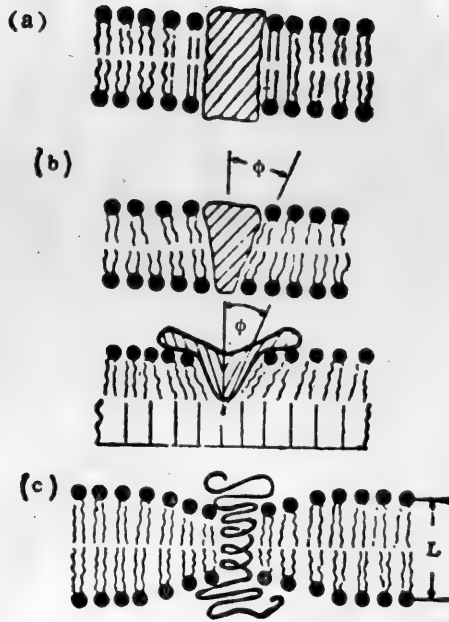


图 8 膜蛋白结合对脂双层的影响

(a) 短程效应: 脂链排列发生变化; (b) 和 (c) 长程效应: (b) 脂分子排列发生楔形畸变; (c) 脂双层排列压缩畸变

有关脂与蛋白质的相互作用已有大量的研究。许多实验结果已表明,膜蛋白的结合可影响膜脂的流动性。近年来,运用波谱、光谱技术对蛋白质结合在膜脂中的影响也进行了大量的研究。NMR 通过  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  等核,而 ESR 通过自旋标记物探针来探测脂质分子结构的动态变化。拉曼光谱则主要通过脂的碳氢链以及极性“头部”基团的振动谱带的强度和频率变化来反映脂的结构和运动状态。

Oldfield 等人<sup>[39]</sup>运用  $^2\text{H}$ -NMR 研究了多肽或蛋白质对 DMPC 脂质体流动性的影响。他们将多肽或蛋白质重组到 DMPC 脂双层中,观察脂链终端氘化甲基的四极分裂信号(图 9)。很明显,短杆菌肽 A、噬菌体 F1 外壳蛋白或牛脑髓蛋白脂质脱辅基蛋白都使  $^2\text{H}$  信号的四极分裂消失。细胞色素氧化酶和  $b_5$  对脂链终端甲基信号影响较小,但是与纯 DMPC 信号相比,其四极分裂值仍略有减小。这些现象表明,蛋白质以某种方式使脂的疏水链的排列趋于无序。对大肠杆菌细胞膜的研究也表明,蛋白质使脂的亚甲基碳氢链片段起伏增大。

对不同蛋白质与 DMPC 脂质体重组系统还进行了  $^{31}\text{P}$ -NMR 研究。由图 10 所示的  $^{31}\text{P}$ -NMR 信号的线形可以看到,蛋白质或多肽重组进脂双层后,使膜脂磷酸基团的各向异性化学位移值  $\Delta\sigma$  减小。例如,肌质网 ATP 酶或细胞色素氧化酶重组进 DMPC 脂质体后,  $\Delta\sigma$  值从  $\sim 50$  ppm 降低到  $\sim 45$  ppm,而当大量的蛋白脂质脱辅基蛋白与脂质体重组后,则将导致  $\Delta\sigma$  值更加减小。同时,还可观察到,蛋白质或多肽的加入使  $^{31}\text{P}$ -NMR 谱线线宽增加。这些实验结果表明,脂分子的“头部”可以直接与膜结合蛋白相互作用,致使“头部”运动变慢,而且脂质“头部”的运动也更加各向异性<sup>[40]</sup>。 $T_1$  和  $T_2$  弛豫研究也给出相似的结果。

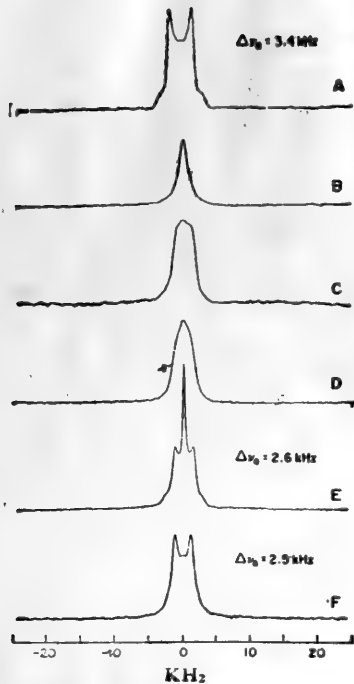


图9 DMPC-d<sub>2</sub>脂双层与含有蛋白质(或多肽)的DMPC-d<sub>2</sub>脂双层的<sup>2</sup>H-NMR谱<sup>[39]</sup>  
 A. 纯DMPC-d<sub>2</sub>, 30℃; B. 含有67%短杆菌肽A的DMPC-d<sub>2</sub>; C. 含有67%噬菌体F1外壳蛋白的DMPC-d<sub>2</sub>; D. 含有67%牛脑髓蛋白脂质脱辅基蛋白的DMPC-d<sub>2</sub>; E. 含有67%细胞色素b<sub>5</sub>的DMPC-d<sub>2</sub>, 32℃; F. 含有80%细胞色素氧化酶的DMPC-d<sub>2</sub>。  
 $\Delta\nu_Q$ 为<sup>2</sup>H四极分裂值

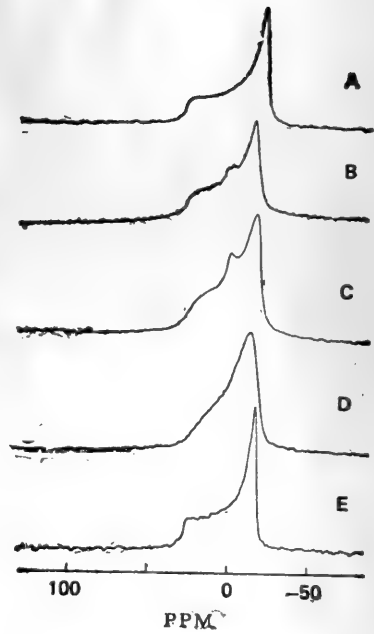
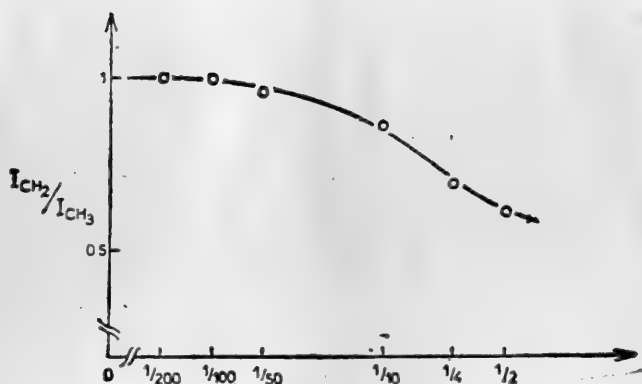


图10 含有蛋白质或胆固醇的DMPC的<sup>31</sup>P-NMR谱<sup>[40]</sup>  
 A. DMPC, 30℃; B. 含有67%细胞色素氧化酶的DMPC; C. 含有65%的肌质网ATP酶的DMPC; D. 含有67%牛脑髓蛋白脂质脱辅基蛋白的DMPC; E. 含有33%胆固醇的DMPC(用以对照比较)。图中横坐标所示的PPM值为相对于H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>的<sup>31</sup>P信号化学位移值

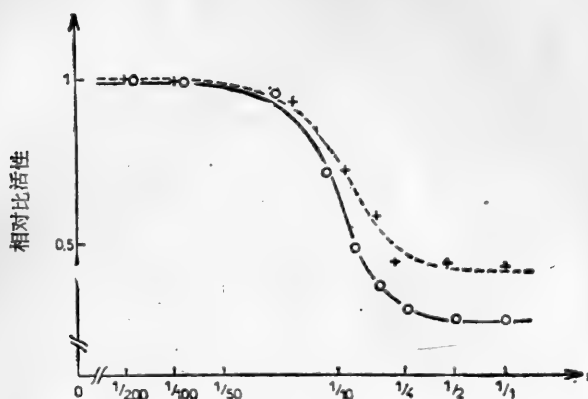
上述研究表明,一些蛋白质与脂的结合可使脂“头部”固定化,而同时蛋白质表面粗糙的特性又导致脂双层的碳氢链排列无序。

膜蛋白与膜脂的结合还将引起脂链的构型发生变化。Taraschi等人<sup>[41]</sup>运用C—C和C—H振动拉曼光谱研究胰高血糖素与DMPC的相互作用。他们指出,存在于胰高血糖素疏水区和磷脂疏水“尾部”之间的强相互作用,导致脂链中形成2—3个附加偏转异构体,而且这些偏转异构体被固定化。进一步增加蛋白质含量会导致脂链间侧向相互作用消失。很显然,这是由于脂链中附加的偏转异构体增多,进一步破坏脂的有序排列,使脂更趋于流动而减弱脂间侧向相互作用的结果。

某些膜表面结合的外周蛋白也对膜脂的流动性产生一定的影响。伴刀豆球蛋白A是一个外源凝集素。Tellier等人<sup>[42]</sup>观察了伴刀豆球蛋白A与骨髓瘤质膜相结合的<sup>1</sup>H-NMR谱,发现随着伴刀豆球蛋白A结合于膜的含量增加,脂链中—CH<sub>2</sub>—峰强度减小、线宽增宽。由图11(a)可以看到,在伴刀豆球蛋白A与膜蛋白重量比为1:10—1:4时,伴刀豆球蛋白A使脂链的流动性明显降低。对于这一系统中的5′-核苷酸酶-膜结合酶的活性也进行了研究,发现随着伴刀豆球蛋白A的量增加,酶的比活性受到很强的抑制(图11(b))。这一实验结果清楚地表明,一种蛋白质对膜的结合,可以影响膜中脂的流动性,而膜脂流动性的变化又可影响另一种膜结合酶的活性。



(a) 伴刀豆球蛋白/膜蛋白



(b) 伴刀豆球蛋白/膜蛋白

图 11 (a)  $CH_2$  和  $CH_3$  峰强度比与伴刀豆球蛋白和膜蛋白重量比之间的关系曲线<sup>[41]</sup>。  
 (b) 不同伴刀豆球蛋白结合量对 5'-核苷酸酶活力的影响(图中所示为两组不同样品)。相对比活性是存在伴刀豆球蛋白时的比值与没有外源凝集素时的比值。

## 五、膜脂-膜蛋白相互作用的研究与农业、医药的联系

膜脂-膜蛋白相互作用的研究不仅具有理论意义,而且与农、医方面也有很密切的联系,具有广阔的应用前景,现略举几例加以说明。

### 1. 药物对膜脂-膜蛋白相互作用的影响

药物作用于细胞首先必须通过细胞膜,而许多药物又能改变细胞膜的性质。研究药物作用对膜脂-膜蛋白相互作用的影响可为探讨药物作用机制提供理论依据,为分子药理学建立一定基础,并为筛选新药寻找途径。

有关麻醉药对膜蛋白的作用有不少报道。例如,局部麻醉药能抑制肌质网  $Ca^{2+}$ -ATP 酶、线粒体电子传递链以及乙酰胆碱受体等等。狄布卡因、普鲁卡因、丁卡因可影响重组于脂质体的细胞色素氧化酶的活性<sup>[43]</sup>。气普马嗪与吩噻嗪可抑制脑细胞膜  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP 酶的活性。据最近报道<sup>[44]</sup>,局部麻醉药普鲁卡因、利多卡因、丁卡因、狄布卡因以及气普马嗪对突触膜上  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP 酶、 $Mg^{2+}$ -ATP 酶均有抑制作用。

在麻醉药影响膜脂流动性方面有大量的研究工作。1968年 Hubbell 与 McConnell<sup>[45]</sup> 应用 ESR 技术研究局部麻醉药丁卡因对肌肉膜、神经膜、线粒体膜以及脂质体的作用。结果表明,丁卡因可增加膜脂的流动性。此后,不少人用各种局部麻醉药,如苯甲醇、普鲁卡因、苯卡因以及利多卡因等作用于脂质体,它们均能增加脂质体的流动性。

最近有人提出麻醉药扰乱膜蛋白“界面脂”的模型<sup>[46]</sup>。他们认为,麻醉药使钠通道丧失正常功能的主要原因可能在于它们进入脂双层后替代了膜内在蛋白的“界面脂”,从而影响了酶功能的正常表现。换言之,麻醉药可能主要扰乱了膜脂与膜蛋白的相互作用,才产生麻醉效应。

我们实验室用 DSC、ESR、荧光偏振等技术研究莨菪类药物对脂质体流动性的影响<sup>[47]</sup>。结果表明,山莨菪碱、东莨菪碱、樟柳碱以及阿托平均能增加 DPPC 脂质体的流动性,其中以山莨菪碱作用最为明显。如果山莨菪碱作用于酸性磷脂脂质体,膜流动性增加幅度更大,相变温度下降 10℃ 左右,并出现分相现象(图 12)。

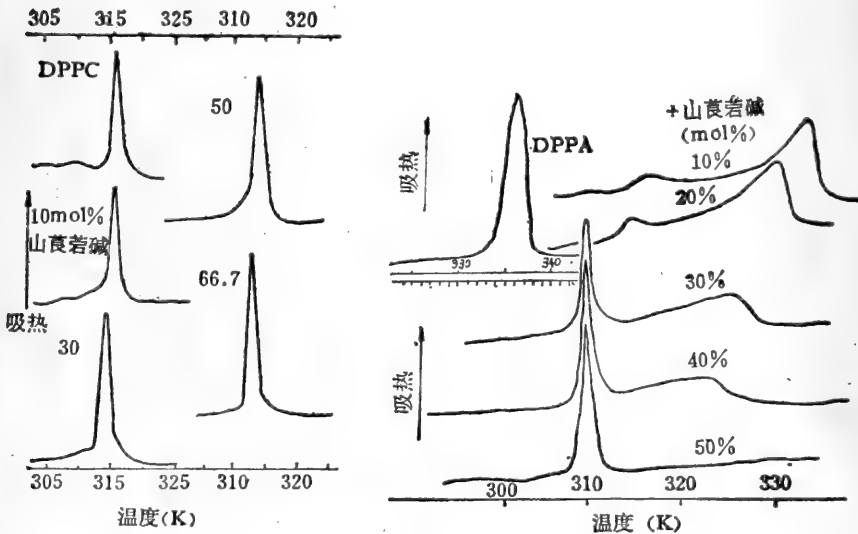


图 12 不同浓度山莨菪碱对 DPPC、DPPA 脂质体热曲线的影响

## 2. 细胞膜的流动性与疾病

生物体可以通过细胞代谢和其他因素对生物膜进行调控,使其具有合适的流动性以表现正常功能。如果超出调节范围,生物膜就不能表现正常功能而产生病变。近年来,发现很多疾病患者的病变细胞膜或红细胞膜的流动性发生异常变化,其中对肿瘤细胞的流动性研究较多<sup>[48-52]</sup>。一般认为,大多数肿瘤细胞膜的流动性大于正常。Inber 等<sup>[48]</sup>用荧光偏振法研究急性淋巴细胞白血病,发现患者淋巴细胞膜的流动性明显高于正常人。还有报道<sup>[53]</sup>,杜兴氏(Duchenne)型进行性肌肉营养不良症患者的红细胞、骨骼肌以及肝细胞膜的流动性都比正常要低。 $\beta$  脂蛋白缺乏症和遗传性球形红细胞症患者的红细胞膜的流动性也明显低于正常<sup>[54]</sup>。

对上述疾病患者细胞膜蛋白的变化也进行了研究。杜兴氏型进行性肌肉营养不良症

患者的红细胞膜  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶活性低于正常<sup>[65]</sup>,腺苷酸环化酶的活性也有明显高于正常的情况<sup>[66]</sup>。还有报道高血压或肝癌等病人红细胞膜的  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶活性也有异常现象。

红细胞膜骨架对维持红细胞的外形及使其具有可变性的特性有重要作用。遗传性球形红细胞症患者的红细胞呈球形,脆性增加,可变性降低,这种红细胞收缩蛋白的含量不同程度地低于正常情况。而遗传性椭圆形红细胞症患者红细胞膜骨架比较不稳定。阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)是我国北方较常见的后天性溶血病,它的基本病变也在红细胞膜。这种PNH病人的红细胞膜总巯基量减少,部分病人红细胞膜区带6蛋白质增多,膜上补体  $\text{C}_3$  受体的亲合力比正常人高,膜上花生四烯酸含量也增加,其红细胞膜经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理会使过氧化物丙二醛比正常人高<sup>[67,68]</sup>。

大骨节病是我国一种比较严重的地方病,有报道,这种病的患儿红细胞膜异常<sup>[59]</sup>。我们实验室通过陕西永寿大骨节病生化考察任务对患儿红细胞膜也作了分析。结果表明,他们的膜脂流动性低于正常, $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶活性也有下降趋势<sup>[60]</sup>。另外,大骨节病患儿红细胞膜的结合硒含量也明显低于非病区对照。对硒与正常人红细胞膜结构与功能之间的关系我们也进行了研究,发现加入微量  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (0.03—0.3 ppm, 相当于生理浓度范围),能使含硒量较低的人的红细胞膜的  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶活性和流动性显著增加<sup>[61]</sup>,同时还能明显地延缓“老化”红细胞膜的膜脂流动性和  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATP 酶活性的降低<sup>[62]</sup>。

综上所述,膜疾病患者细胞膜脂流动性和膜蛋白的异常以及它们之间的内在联系正日益引起人们的注意,这方面的深入研究无疑将有助于膜疾病分子机制的阐明。

### 3. 植物的抗冷性与生物膜的流动性

细胞受冷害后会起细胞膜透性异常,从而导致诸如  $\text{K}^+$  离子等电解质从细胞中外漏,这一现象比较早地被观察到。因而认为细胞质膜很可能是细胞受冷害后较早被影响的部位。最近几年发现,线粒体膜、叶绿体膜对低温也较敏感。

澳大利亚 Raison 等<sup>[63]</sup>在不同温度下测定了线粒体氧化活性并绘制 Arrhenius 图,结果抗冷植物线粒体氧化活性在 0—30℃ 范围呈一直线,而不抗冷植物线粒体则在 10℃ 左右有一折点。他们又应用自旋标记 12 NS 标记甘薯块茎(抗冷)与马铃薯(不抗冷)线粒体膜,比较它们的序参数  $S$  的 Arrhenius 图,发现后者在 10℃ 有一折点,前者没有此现象。根据上述结果来看,抗冷植物线粒体膜的流动性似乎有大于不抗冷植物的规律。但他们研究的都是具有典型抗冷和不抗冷性的植物,对于某一植物的抗冷性程度是否与它们线粒体膜流动性大小呈正相关,并未得出明确的结论。有人认为,抗冷植物生物膜具有较大的流动性,可能与其膜脂脂酰链的不饱和度有关。因而很多实验室<sup>[8,64-67]</sup>从抗冷与不抗冷植物线粒体或叶绿体膜抽提膜脂并测定它们的不饱和指数,结果表明,抗冷性与膜脂的不饱和度呈正相关,而且很多抗冷植物在低温下膜脂脂肪酸的不饱和度有明显增加<sup>[68]</sup>。但是也有不少与此相矛盾的结果。如豌豆类囊体膜脂脂酰链的不饱和指数在正常与低温条件下差异不大,但是脂质/蛋白质比值在低温下却有明显增长<sup>[69]</sup>。所以,对植物抗冷性问题除研究膜脂的作用外,还应考虑膜蛋白的作用<sup>[64]</sup>。更全面的研究似乎应从膜脂-膜蛋白的相互作用来探讨。

我们实验室近年来曾对抗冷与不抗冷的玉米或水稻的抗冷性与线粒体膜的流动性关

表 7 抗冷与不抗冷水稻黄化幼苗线粒体 5-NS 标记后电子顺磁共振谱 S 值比较

样 品	参 数	$2T_{//}$ (G)	$2T_{\perp}$ (G)	S
秋光(不抗冷)		56.4	16.8	$0.749 \pm 0.005$
吉梗 <sub>44</sub> (抗冷)		53.7	17.1	$0.711 \pm 0.006$ $P < 0.001$
早锦(不抗冷)		56.4	17.2	$0.734 \pm 0.005$
吉梗 <sub>60</sub> (抗冷)		54.7	17.2	$0.717 \pm 0.004$ $P < 0.001$

注:表中所列数据为五次的平均值。

系进行了一些研究。我们分别用荧光探针(ANS,1-苯胺-8-萘磺酸;DPH,1,6-二苯基己三烯)或自旋标记化合物(5-NS,12-NS,16-NS,5,12,16-氮氧基硬脂酸)来测试比较抗冷与不抗冷水稻或玉米黄化幼苗线粒体膜的流动性<sup>[70,71]</sup>。这几种探针的测试结果都很一致,即抗冷水稻或玉米的黄化幼苗线粒体膜的流动性都明显大于不抗冷品种。表7系用5-NS作为自旋标记物测试的结果。由表中可见,抗冷水稻品种吉梗44与吉梗60线粒体之间的序参数(S)值差异不大,但它们都明显小于不抗冷品种水稻秋光或早锦线粒体的相应值。用12-NS和16-NS作探针获得相似结果。说明抗冷与不抗冷水稻线粒体膜脂在不同深度的流动性都存在着差异。我们的实验结果提示,玉米或水稻等农作物的抗冷性与其线粒体膜的流动性具有一定的内在联系,因此,测定农作物黄化幼苗线粒体膜的流动性很可能为鉴定其抗冷性提供一些生物物理或生物化学指标。

## 六、结 束 语

生物膜膜脂-膜蛋白相互作用的研究牵涉面很广,内容极为丰富,本文仅仅叙述这方面的一般概况,并结合我们实验室近年来的研究工作作一些扼要而粗浅的介绍。因此,在内容上不可避免会有较大的局限性。

膜脂-膜蛋白相互作用的研究在生物膜研究中占有很重要的位置。它无论在理论还是实际方面都有很重要的意义。对这一问题的深入研究需要学科之间的相互渗透和各方面的紧密配合与协作。而且理论与实践相结合,生物膜与人工膜相配合,以及多种实验技术(包括生物、物理、生化等)的广泛与综合应用也都是很重要的。

## 参 考 文 献

- [1] Sackmann, E., Personal communication.
- [2] Chapman, D., In "Biological Membranes" Vol. 4 (Ed. Chapman, D), 1982, 179.
- [3] Luzzatti, V., et al., *J. Cell. Biol.* 12(1962), 207.
- [4] Verkleij, A. J., et al., *Nature*. 279(1979), 162.
- [5] Cullis, P. R., et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 559(1979), 390.
- [6] Dratz, E. A and Hargrave, P. A., *TIBS* 8(1983), 128.
- [7] Kaback, H. R., In "International Symposium on Biomembranes and Biocenergetics, Beijing (Eds, Fleischer, S., et al.,) 1984.
- [8] Quinn, P. J., *Prog. Biophys Molec Biol.*, 38(1981), 1.
- [9] Oldfield, E., et al., *FEBS Lett.*, 21(1972), 303.



- [10] Quinn, P. J., *Biochem. Soc Trans*, **11**(1983), 329.
- [11] Dickens, B. F., *et al.*, *Biochemistry*, **21**(1983), 3604.
- [12] Baroin, A., *et al.*, *Biochemistry* **18**(1979), 1157.
- [13] 陈建文等, 科学通报 **29**:7 (1984)431.
- [14] 杨福愉、程秋琛, 生物化学与生物物理学报, **17** (1985), 待发表.
- [15] 杨福愉、张玉中, 中国科学 B 辑, **3** (1982), 231.
- [16] Dawson, C. R., *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **510**(1978), 75.
- [17] Chapman, D., *In* "Membranes and Transport", Vol. 1 (Ed. Anthony N. Martonasi), 1982.
- [18] Kang, S. Y., *et al.*, *Biochemistry*, **18**(1979), 3257.
- [19] Solaini, G. and Bertoli, E., *FEBS Lett*, **132**(1981), 127.
- [20] 周立莘、杨福愉, 待发表.
- [21] De Kruyff B., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **330**(1973), 267.
- [22] Sandermann, H., *Biochim. Biophys. Acta*, **515**(1978), 209.
- [23] Lippert J. L., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **591**(1980), 32.
- [24] Slater, E. C., *In* International Symposium on Biomembrane and Bioenergetics. Beijing (Eds. Fleischer, S. *et al.*), 1984.
- [25] Gordon, L. M. and Sauerheber, R. D., *In* "The Role of Calcium in Biological Systems" Vol II (Eds. Anghileri L. J. and Tuffer-Anghileri, A. M.) 1983, 3.
- [26] 郭倍奇等, 科学通报, **6**(1982), 372.
- [27] 杨福愉等, 中国科学, **1**(1981), 85.
- [28] F. Y. Yang (杨福愉), *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **724**(1983), 104.
- [29] 杨福愉等, 中国科学 B 辑, **6**(1983), 519.
- [30] 郭倍奇等, 生物化学杂志, **1** 1984.
- [31] 黄有国等, 科学通报, **21**(1982), 1332.
- [32] 杨福愉, 张先锋, 待发表资料.
- [33] 杨福愉、张日清等, 清华大学学报, **23**(1983), 41.
- [34] 林治焕、李生广等, 待发表资料.
- [35] Van, S. P. and Griffith, O. H., *J. Membrane Biol.*, **20**(1975), 155.
- [36] Fung, L. W. -M., *et al.*, *FEBS Lett.*, **105**(1979), 379.
- [37] Stollery, J. G., *et al.*, *Biochemistry*, **19**(1980), 1219.
- [38] Sackmann, E., *in* "Biophysics" (Ed. Hoppe *et al.*), 1983.
- [39] Oldfield, E., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**(1978), 4657.
- [40] Jacobs, R. E. and Oldfield, E., *Progress in NMR Spectroscopy*. Vol. 14 (1981), 113.
- [41] Taraschi, T., *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **101** (1979), 1050.
- [42] Tellier, C., *et al.*, *Biochem. and Biophys. Research Communication*, Vol. 104, **1**(1982), 113.
- [43] Singer, M. A., *Biochem. Pharmacol.*, **29**(1980), 2651.
- [44] Sidek, H. M., *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **801**(1984), 26.
- [45] Hubbell, W. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **6**(1968), 12.
- [46] Housley, M. D., *et al.*, *Dynamics of Biological membranes*, (1982), 146.
- [47] F. Hwang (黄芬), *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, **736**(1983), 220.
- [48] Inber, M., *et al.*, *Europ. J. Cancer*, **13**(1977), 1231.
- [49] 林克椿等, 生物化学与生物物理进展, **6**(1981), 32.
- [50] 刘树森等, 生物化学与生物物理进展, **3**(1983), 36.
- [51] 赵保路等, 科学通报, **27**(1982), 686.
- [52] 赵保路、忻文娟等, 生物化学与生物物理学报, **16**(1984), 1:43.
- [53] Kunze, D., *et al.*, *Clin. Chin. Chim Acta*, **43**(1973) 333.
- [54] Aloni, B., *et al.*, *Brit. J. Haematol*, **31**(1975), 117.
- [55] Niebroz-Dobosz I, *Zeit fur Neurol*, **214**(1976), 61.
- [56] Mawatari, S., *et al.*, *Arch. Neurol*, **33**(1976), 489.
- [57] 潘华珍等, 中华血液杂志, **2**(1981), 114.
- [58] 张之南等, 中华医学杂志, **94**(1981), 207.
- [59] 李芳生等, 永寿大骨节病考察文集, 1984, 338 页, 人民卫生出版社.
- [60] F. Y. Yang (杨福愉), F. Huang (黄芬), Z. H. Lin (林治焕), *In* 3rd International Symposium of Selenium on Biology and Medicine, Beijing, 1984 (in press).
- [61] 杨福愉、沃维汉, 中国科学, 待发表.
- [62] 沃维汉、杨福愉, 中国科学, 待发表.

- [63] Raison, J. K., *et al.*, in *Engl. Plant Physiology* (Ed. Stumpf, P. K.) 1979.
- [64] Lyons, J. M., *et al.*, in *Low Temp. Stress in Crop Plants* (Eds, Lyons J. M., *et al.*) 1979,1.
- [65] Willemot, C., *et al.*, in *Low Temp. Stress in Crop Plants* (Eds. Lyons, J. M., *et al.*) 1979,441.
- [66] 王育启、王洪春等,植物生理学报, 7(1981),2:185.
- [67] 鲍风等,植物学报, 26(1984),1:60.
- [68] Peoples, T. R., *et al.*, *Plant Physiol*, 62(1979), 326.
- [69] Chapman, D. J., *et al.*, *Plant Physiol*, 72(1983), 225.
- [70] 杨福愉等,科学通报, 6(1983),370.
- [71] 杨福愉等,植物学报,待发表.

# 叶绿体中电子传递与磷酸化

李 有 则

(中国科学院植物生理研究所)

## 一、引言

## 二、光合电子传递

1. 电子传递途径和成员
2. 电子传递复合体的结构与功能
3. 电子传递复合体在类囊体膜上的横向分布

## 三、电子传递与磷酸化的偶联机制

1. 高能态的发现
2. 化学渗透学说对偶联机制的解释,  $\Delta\mu H^+$

## 推动 ATP 形成的实验证据

3. 有非  $\Delta\mu H^+$  形式的高能态存在的可能性
4. 膜上区域化质子假说的可能解释

## 四、ATP 酶复合体的结构功能

1. 偶联因子( $CF_1$ )的结构功能
2.  $CF_0$ 的结构功能
3. 重组试验

## 五、结束语

## 一、引 言

光合作用是地球上最大规模地贮存太阳能的过程,也是规模最巨大的积累有机物的过程,为人类提供主要的物质来源和能量来源。

光合作用中,光能转变为化学能要经过一系列的能 量转换步骤来完成。被叶绿素所吸收的光能,传递到光系统 II 和光系统 I 的反应中心,进行原初光化学反应,发生电荷分离,再经一系列氧化还原反应的协同作用,进行电子传递,质子转移,并经能量偶联反应,形成 NADPH (还原型辅酶 II)和 ATP,两者共同推动  $CO_2$  同化,最终将化学能贮存在所形成的有机物中。所以光合电子传递和磷酸化在光合作用中承前启后,有重要意义。

叶绿体的光合作用是合成有机物质和释放氧气的过程,线粒体的呼吸作用则是消耗有机物质和吸收氧气的过程。两者在总的反应方向上相反,但其中间过程如电子传递和

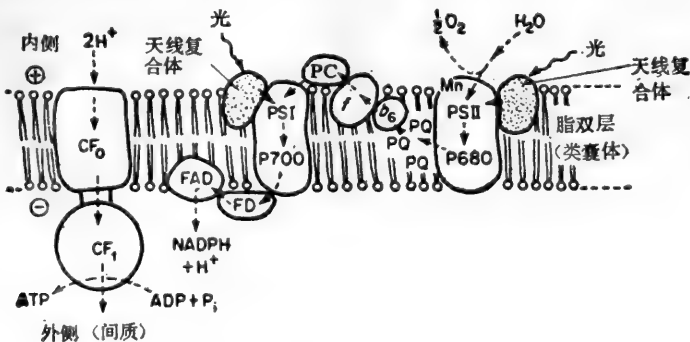


图 1 类囊体膜上光合链的排列<sup>[1]</sup>

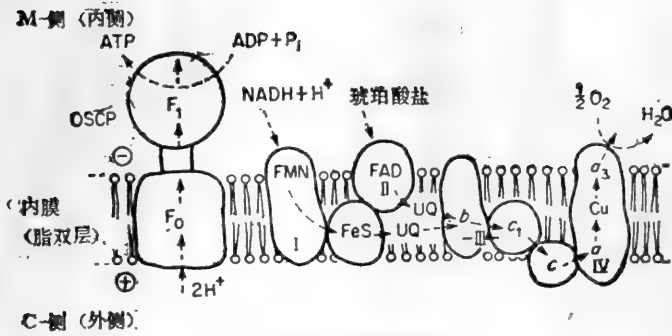


图 2 线粒体呼吸链的排列<sup>[1]</sup>

磷酸化有许多相似之处,例如两个光系统之间电子递体中的质醌、细胞色素复合体等类似于线粒体的;叶绿体类囊体上的 ATP 酶的性质也与线粒体的相似(见图 1,图 2)。但绿色植物光合作用的能量转换有其独特之处,这并非在于其组成成员的特殊性质,而是它们在结构上组成能成功地协调两个光反应中心之间的多步骤的具有高的量子效率的能量转化过程。

下面根据近年来的研究进展,主要讨论光合电子传递与磷酸化这一重要的能量转化过程。

## 二、光合电子传递

### 1. 电子传递途径和成员

三十年代末,英国 Hill 发现离体叶绿体在有氢受体(或电子受体)存在时,即可利用光能来分解水和放出氧气。经过多年的研究,人们认识到光合电子传递是一个复杂的过程。整个过程是在叶绿体的类囊体膜上进行的,大约每一个类囊体膜上嵌有 200 条这样的电子传递链,每一个类囊体膜上约嵌有  $10^5$  个色素分子,即每条链约围绕 500 个天线色素分子。

关于电子传递途径普遍接受的是两个光反应串联方案(或称 Z 方案)<sup>[1]</sup>。在非循环电子传递中,两个光系统经一系列氧化还原反应,将电子从  $H_2O$  传递到  $NADP^+$ 。电子传递途径按链上电子递体成员的氧化还原电位高低作成 Z 形图串联起来。最早是由 Hill 和 Bendall 在 1960 年提出<sup>[2]</sup>,但至今的许多研究基本上仍以 Z 方案作为基础。图 3 中光系统 II (PS II) 的作用是产生一个强氧化剂,氧化还原电位( $E'$ )可达 800 mV,这足以从水中夺取电子,使水氧化生成分子氧。分子氧释放是一个连续进行四步骤的过程,同时释放  $H^+$ 。Q 是 PS II 的一个未知的原初电子受体,推测是处于特殊结合状态的质体醌(PQ)在还原时形成的半醌形式。中间 PQ 含量较多,除了两个光系统之间起传递电子的作用外,还携带  $H^+$  从类囊体膜外入腔内。电子从 PQ 经质体蓝素(PC)传至光系统 I (PS I) 反应中心 P 700。P 700 吸收光能后产生一强的还原剂, $E'$  可达 -500 mV,足以使辅酶 II 还原。X 是 PS I 的未知原初电子受体,可能是结合态的铁氧还素(Fd),在 Fd-NADP(铁氧还蛋白-辅酶 II)还原酶作用下,形成 NADPH,这是线性电子传递。Fd 接受来自 X 的电

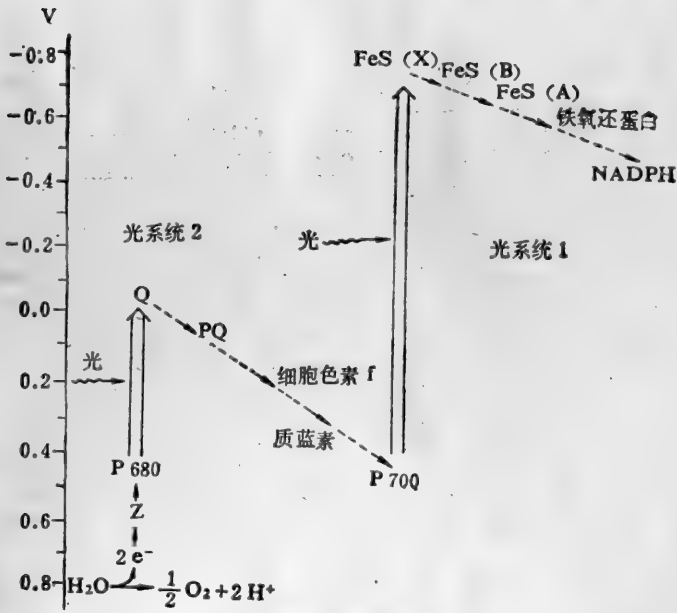


图 3 电子传递的Z方案

子后,也可把电子反向传递给 PS I 氧化侧的任一电子供体部位,从而构成循环电子传递。循环电子流对 PQH<sub>2</sub> 氧化的抑制剂 DBMIB(二溴百里香醌)敏感,但对 PQ 还原的抑制剂 DCMU(二氯苯基二甲基脲)不敏感,所以,循环电子流中 PQ 还原的机制不同于非循环电子流。我们实验室在研究电子传递途径的调节中,发现 PS II 还原端电子传递抑制剂 DCMU 在 Fd-NADP<sup>+</sup> 还原酶有一新的作用部位<sup>[3]</sup>。低浓度(<10<sup>-7</sup>mol/L)的 DCMU 抑制 PS I 还原侧的电子传递。用 Fd-NADP<sup>+</sup> 还原酶抗体作实验,与低浓度 DCMU 结果一致。表明在生理上,Fd-NADP<sup>+</sup> 还原酶可调节光合链上循环与非循环电子流的去向。

电子递体在类囊体膜上是不对称定向排列的<sup>[4,5]</sup>。水裂解系统及 NADP 还原酶系统分别位于膜的内、外表面。PQ 联结外表面 PS II 受体端到位于内侧的 PS I 供体端,在这跨膜定向电子传递中,PQ 是 H<sup>+</sup> 携带者。处于膜内侧的水裂解反应所释放的 H<sup>+</sup> 贮于内部。当进行非循环电子传递时,电子从内侧到外侧定向传递,偶联着两个质子释放部位<sup>[6]</sup>。整个过程中,从水传递两个电子到 NADP<sup>+</sup>,引起四个 H<sup>+</sup> 转移。这样的定向的电子传递,导致质子定向转移,从而形成膜内外电位差及质子浓度差,这是对于用化学渗透假说来解释电子传递与磷酸化偶联机制的重要支持。

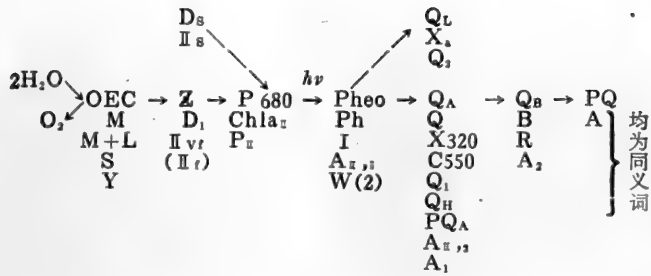
Witt 等从动力学角度研究电子传递及其偶联的质子跨膜转移的时间过程,总结如图 4。可见两个反应中心被光激发发生电荷分离,电子移动速度很快<1 ns,水裂解反应在 0.1—1 ms,PQ 还原为 2 ms,PQ 氧化为 20 ms。整个反应的限制步骤在 PQ 氧化。

2、电子传递复合体的结构与功能

在 Singer<sup>[8]</sup>所提出的膜结构的流体镶嵌模型中(图 5),蛋白质可在流动的脂双层中横向移动,这些蛋白质是内在的(intrinsic)或外周的(extrinsic)。根据流体镶嵌概念对类囊体膜结构功能的研究,现在对类囊体膜上电子传递链上的功能结构单位的分子组成的了解已取得显著的进展<sup>[9,10]</sup>。由类囊体膜上不同的内在的或外在的多肽组成四种集合蛋







反应中心 P 680 可能是 Chla 双分子。由天线色素所吸收的光量子传到反应中心,发生从类囊体膜内侧到膜外侧的电荷分离,电子从 P 680 传到 Pheo(去镁叶绿素)约在 200 PS 内完成,再经次级电子受体 QA、QB 还原 PQ,QA 氧化时间为 200 μs。Z 是 P 680<sup>+</sup> 的直接电子供体。Z<sup>+</sup> 经放氧复合体的 S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> 步骤在 100 μs—1 ms 内被还原。

关于放氧动力学, Joliot 和 Kok 曾先后提出<sup>[12]</sup>且为现在普遍接受的“S 态”图式。即 PS II 在光激发时,放氧复合体(OEC)发生从 S<sub>0</sub>→S<sub>4</sub> 逐渐增加氧化状态的连续过程。在 OEC 达到 S<sub>4</sub> 态,放出氧气,本身回复到 S<sub>0</sub> 态。从图 7 可见,每一状态变化的半时间与 S 态变化偶联的 H<sup>+</sup> 释放。从 S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub> 瞬变,均释放一个 H<sup>+</sup>, 而从 S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub> 则放出两个 H<sup>+</sup>。H<sup>+</sup> 的释放表示结合态水分子的部分氧化,并表明 OEC 在较酸(pH 6)的内部环境中更为稳定。Mn 参与放氧机制。4 Mn/反应中心可得到电子传递的最大恢复活力,其中仅 2 Mn/反应中心是必要的,另两个 Mn 可被任何两价阳离子所取代而不丧失活力。

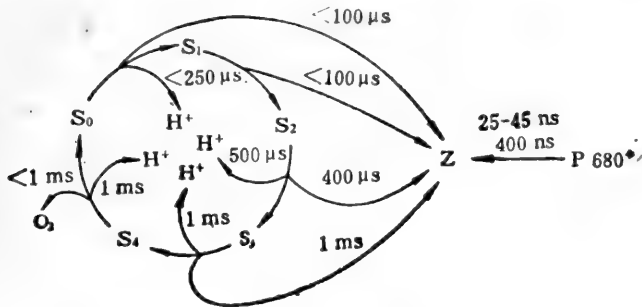


图 7 放氧复合体的 S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> 状态<sup>[1]</sup>

近年来,对 PS II 的多肽分析有显著进展。有三种与放氧有联系的可溶性多肽,位于类囊体膜内侧,分子量分别在 32—34, 23—24, 15—18 kD。33 kD 可能与 Mn 的结合有关。17 与 23 kD 在重组放氧中有协同效应。PS II 的两个 Chla-蛋白复合体分别带有 50, 47 kD 的多肽,每一种多肽含有 4—5 Chla 分子及一 β 胡萝卜素分子。

细胞色素 b<sub>6</sub>-f 复合体存在于所有贮能的膜中。含有 34 kD Cyt f 多肽,两个 23 kD Cyt b<sub>6</sub> 多肽,一高电位的 20 kD Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Rieske 中心(Re), -17 kD 结构蛋白,一小肽 5 kD 及一结合的氢醌(PQH<sub>2</sub>)。PQH<sub>2</sub> 被 Cyt b<sub>6</sub>-f 氧化的机制,可能牵涉到对应于 PQH<sub>2</sub>/PQ(E<sub>0</sub>' = 17mV)的两个连续的电子传递反应:PQH<sub>2</sub>/PQ<sup>•-</sup>(E<sub>0</sub>' = + 385mV)及 PQ<sup>•-</sup>/PQ(E<sub>0</sub>' = - 165 mV)。PQH<sub>2</sub> 被 Cyt b<sub>6</sub>-f 氧化,可能牵涉到电子传递中的 Q 循环。Q 循环在细菌及线粒体的电子传递中已有不少研究。近年来在叶绿体电子传递的研究中,也观察到类似的现象<sup>[13-16]</sup>。图 8 表示 Q 循环最简单的机制。u 为特殊的 Q,氧化时,可给出一电子经 Re 中

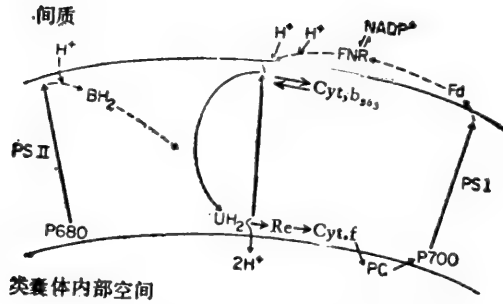
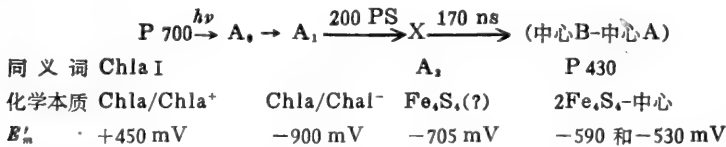


图 8 叶绿体电子传递中可能的 Q 循环<sup>[12]</sup>

心, Cyt f, PC到PS I。另一个电子经一跨膜产生电的反应到位于类囊体膜外表面的 PQ 还原酶V。当分别来自 u 及 PS I 的电子被 V 所用时,就可经一电中性跨膜传递 H<sup>+</sup>,再还原 u(为 PQH<sub>2</sub>),完成 Q 循环。另外, u 也可被结合于 PS II 的 PQ<sub>B</sub> 再还原。Q 循环产生的氧化还原环(loop)在电子传递中所起的作用可从下述现象判断,即电子传递从 PS II 到PS I 的 H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> 比值 > 1, 并因跨膜的额外电场而导致指示电场的 518 nm 吸收的快上升(指示闪光下在 PS II、PS I 反应中心发生的电荷分离)之后紧接着的慢上升,这表明闪光下有 Q 循环的存在。但在恒态及重复饱和闪光下,尚须证明 Q 循环的作用。

光系统 I 包括反应中心复合体及 Chla/b-蛋白复合体(LHC-I)。最近研究支持反应中心 P 700 为单分子 Chla。在反应中心分离的电荷经电子受体链进行快速传递:



从 EPR 讯号表明 P 700:A<sub>0</sub>:A<sub>1</sub> 的分子比为 1:1:1。PS I 复合体可有效地氧化 PC, 并经 Fd 还原 NADP<sup>+</sup>。这个复合体由六—七个多肽组成, 反应中心可能有两个 70 kD 多肽, 每一个联结约 20 个 Chl 分子。

### 3. 电子传递复合体在类囊体膜上的横向分布

近年来对于 PS II 和 PS I 复合体在类囊体膜的垛叠的基粒和裸露的非垛叠区域的空间分布的研究迅速开展起来。我们实验室近来研究短时间低渗阳离子诱导膜的垛叠、松散状态下的性能, 看到垛叠膜中释放入内腔的 H<sup>+</sup> 多于松散膜, 松散膜 H<sup>+</sup> 易渗漏。垛叠膜的光合磷酸化活力高于松散膜。表明垛叠膜能有效地进行能量传递<sup>[17]</sup>。显然, 电子传递和质子转移的动力学过程与电子传递体在空间横向分布有密切关系。冰冻断裂显微观察, 在垛叠和非垛叠区颗粒分布的数目和大小显著不同。两个光系统在垛叠和裸露区的横向分布极不均一。在基粒垛叠区富含 PS II (PS II:PS I = 10:1); 在裸露及非垛叠区则 PS I 占优势 (PS II:PS I 可达 1:30) (见图 9)。经 Yeda Press 机械切剪、相分离所得翻转粒子 (inside-out vesicle) 几乎不含 PS I (见图 10)。这更对横向分布的不均一性提供了证据。Cytb<sub>6</sub>-f 在膜上是否均一分布, 说法不一。从许多不同实验结果归纳的模式图 11, 可表示类囊体的复合体在垛叠膜和非垛叠区的四种可能的不同横向分布, 各有支

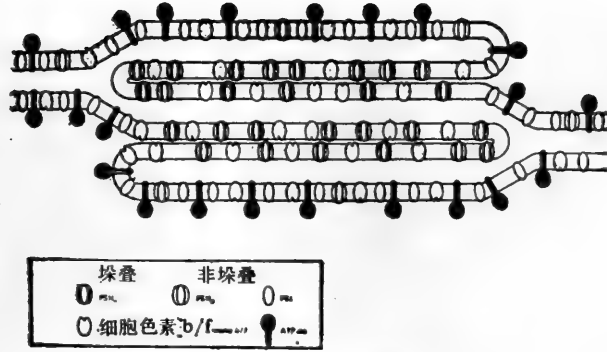


图9 类囊体的复合体在膜上的横向分布<sup>[11]</sup>

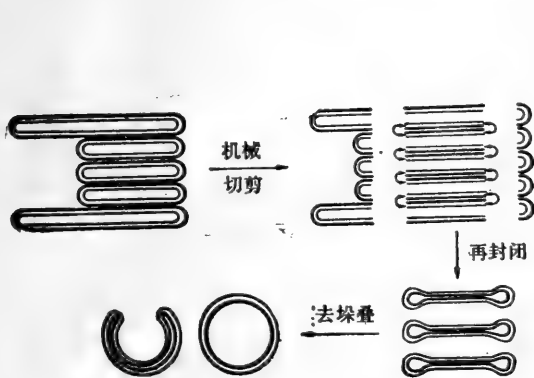


图10 经Yeda Press及相分离制备翻转粒子(inside-out vesicle)<sup>[10]</sup>

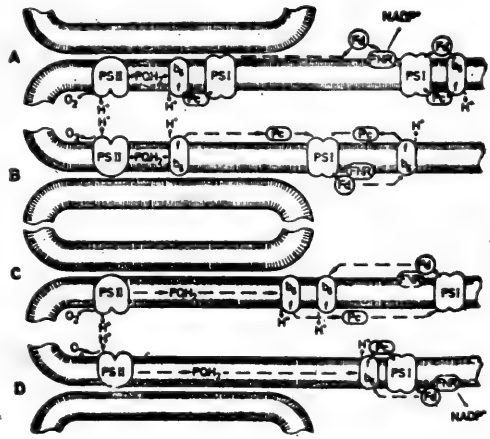


图11 不同横向分布的电子传递模式图<sup>[9]</sup>

持的实验证据。这横向分布的不均一性,提出了电子从堆叠区到裸露膜部分的长距离传递的问题。这是由可移动的PQ、PC、Fd的扩散,将堆叠膜和间质膜连接起来。PC、Fd分别在类囊体膜的内表面和外表面上扩散移动,而PQ/PQH<sub>2</sub>是疏水的e<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>递体,在膜内扩散移动。从上述可知,整个电子传递速度的限制步骤是PQH<sub>2</sub>被Cytb<sub>6</sub>-f的氧化,似是PQH<sub>2</sub>的扩散性质控制光下电子传递的最大速度。PQH<sub>2</sub>的扩散系数为10<sup>-8</sup>cm<sup>2</sup>/s, PQ/PQH<sub>2</sub>扩散最快时间为2ms,这将限制PQH<sub>2</sub>的横向扩散距离在100—150nm,不足以传递电子从堆叠区到间质裸露区(500—1000nm)的距离。这需要从分子水平结合膜的状态去研究电子传递的机制,复合体的确切的横向分布,以及小分子递体怎样进行长距离扩散,以协调不同复合体之间有效地进行电子传递,以获得最适的量子产量,这对研究能量转化和电子传递的生理调节是具有重要意义的。

### 三、电子传递与磷酸化的偶联机制

对于电子传递与光合磷酸化之间的关系,涉及偶联机制,ATP/2e<sup>-</sup>、H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>、H<sup>+</sup>/ATP

等准量关系,循环光合磷酸化的作用及光合控制等问题。这里主要讨论偶联机制。

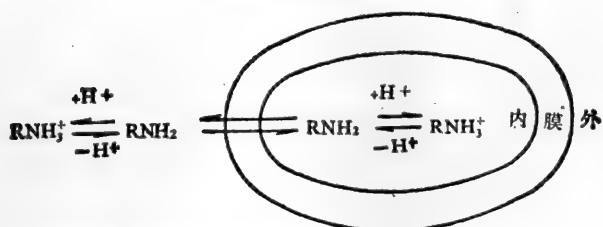
光合作用电子传递的氧化还原反应与 ATP 形成的偶联机制,多年来是一个广泛研究的理论问题,也是一个有争论的问题。电子传递怎样偶联磷酸化,在能量转换中是以怎样的方式贮存能量推动 ATP 形成,许多实验室对这问题进行研究,发展了不少学说,企图予以解释。

## 1. 高能态的发现

沈允钢和沈巩懋于 1962 年<sup>[19]</sup>, Hind 和 Jagendorf 于 1963 年<sup>[20]</sup>,先后发现小麦、菠菜叶绿体在光下形成某种高能态,在暗中可推动 ADP、Pi 形成 ATP。在不同植物的叶绿体及光合细菌的载色体照光后均能形成高能态,表明它在光合作用中是普遍存在的一个基本现象。这种高能态是一种什么物质或状态并不明确。以后曾基于 Slater 所提出的化学中间物假说<sup>[21]</sup>,企图分离或证实所假设的高能中间物的存在,但迄未成功。

## 2. 化学渗透学说对偶联机制的解释, $\Delta\bar{\mu}H^+$ 推动 ATP 形成的实验证据

Mitchell 于 1961 年<sup>[22]</sup>提出化学渗透假说,1966 年<sup>[23]</sup>加以增订,以后在 1978 年获得诺贝尔奖金。这个假说现已被普遍接受,是从另一角度,即不是用中间物而是用膜两侧的电位差和质子浓度差推动 ATP 形成来解释。这大大推动了光合作用的研究。大量实验结果支持 Mitchell 的设想,即在电子传递和 ATP 形成之间,跨膜质子浓度差及电位差是必要的高能中间态<sup>[24-26]</sup>。Mitchell 的理论相当快地得到许多从事光合磷酸化的研究者的支持,并不是很突然的,因为有许多早期的实验观察提供了证据。①Jagendorf 等在 1963 年<sup>[27]</sup>发现叶绿体在没有缓冲的悬浮液中照光,导致介质中 pH 增高,这是由于叶绿体光下从介质中吸收  $H^+$  的结果。以后证明这光下介质中所消失的质子是进入了类囊体腔内,从而内部变酸,外部溶液变碱。 $H^+$  在光下被吸收而在暗中流出的动力学与高能态光下形成而暗中衰减的动力学很相似。②Jagendorf 和 Uribe 在 1966 年<sup>[28]</sup>所进行的著名的酸-碱磷酸化的实验,即先将叶绿体于 pH 4 的介质中暗保温,使膜内外离子浓度达到平衡,然后注入 pH 8 介质(其中含有 ADP、Pi)中,膜外侧立即中和,而在囊内短时间内仍为 pH 4,之后由于内外浓度差, $H^+$  向外运动导致 ATP 形成。这排除了电位差的作用。③人工外加电场<sup>[29]</sup>。Witt 等用高压引起快速电脉冲类似饱和闪光在暗中处理叶绿体,可导致 ATP 形成,这排除了质子浓度差的作用。人工扩散电位<sup>[30]</sup>也可导致 ATP 形成。叶绿体如先在 1 mmol/L KCl 暗中保温,然后注入 100 mmol/L KCl 中(含有 ADP、Pi),有缬氨霉素加速  $K^+$  的透过,由于膜内外  $K^+$  浓度的不平衡,产生扩散电位。④照光类囊体跨膜质子浓度差可达 3—3.5 pH 单位,膜电位差 10—100 mV;进行光合磷酸化时,跨膜质子浓度差减少,并加速 515 nm 吸收衰减。515 nm 光下吸收变化是指示类囊体膜电位差的形成,即进行磷酸化降低了跨膜电势差  $\Delta\bar{\mu}H^+$  (包括电位差  $\Delta\varphi$  和质子浓度差  $\Delta pH$ )<sup>[31]</sup>。⑤ $\Delta pH$  和  $\Delta\varphi$  在光合磷酸化反应起始或恒态下的贡献不同,初态下以  $\Delta\varphi$  为主,恒态下即以  $\Delta pH$  为主,但电位差也有相当贡献<sup>[31]</sup>,二者可单独或共同推动 ATP 形成。⑥肢解耦联作用机制。



### 3. 有非 $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$ 形式的高能态存在的可能性

生物体内的能量转换方式可能是多样的。随着研究的深入,人们观察到的与化学渗透理论相矛盾的现象逐渐多起来: ①按化学渗透理论,在氧化还原反应和 ATP 形成之间的能量转换,是唯一以跨膜  $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$  来调节的,这  $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$  的幅度大小是关键之点。但  $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$  幅度大小与 PSP 的关系是很矛盾、很不一致的,这在我们的工作中也常遇到。②据根化学渗透概念,光合磷酸化与跨膜  $\Delta\text{pH}$  发展有关,跨膜  $\Delta\text{pH}$  幅度与内部缓冲容量有关,增加内部缓冲能力,则延迟  $\Delta\text{pH}$  的形成,这将表现在光合磷酸化的诱导期上,但 Ort 和 Dilley<sup>[32]</sup>以可透过的缓冲剂处理,并未增加光合磷酸化的延迟时间。他们认为跨膜  $\Delta\text{pH}$  对于光合磷酸化来说可能仅仅是第二位的。③在光合细菌载色体中,以低光强引起部分解偶联或以抗霉素A抑制电子流,使  $\Delta\bar{\mu}\text{H}^+$  急剧下降,但光合磷酸化速度不变,推测可能电子流与 ATP 合成酶有更直接的偶联<sup>[33,34]</sup>。④从我们实验室的工作看到,似有除跨膜质子浓度差和电位差以外形式的高能态可直接推动 ATP 形成,这种高能态与膜本身的能量转换直接有关,推测可能有区域化质子的存在<sup>[35,38]</sup>。从对  $\text{H}^+$  释放动力学的研究中看到,与水分解放氧偶联所释放的  $\text{H}^+$  可直接与  $\text{CF}_0$  发生联系<sup>[37]</sup>。Dilley 等基于醋酸酐修饰类囊体膜蛋白的实验<sup>[38]</sup>,认为 PS II 水氧化时所放出的  $\text{H}^+$  可直接到达  $\text{CF}_0$ 。(这个区域不易接近 PS I 反应所放出的质子)(如图 12)。如按化学渗透概念,则如图 13,即  $\text{H}^+$  要先进入内水相,然后经  $\text{CF}_0$  质子通道流出。因此寻求解释这种可能存在的膜直接能量转换的偶联机制就越越来越引起人们的关注了。

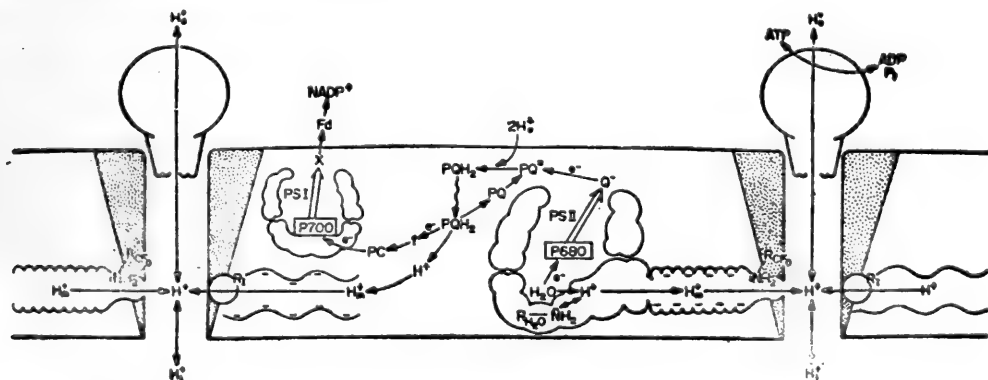


图 12 PS II 水氧化释放  $\text{H}^+$  部位与膜内的  $\text{CF}_0$  (8 kD) 复合体直接联系的模式图<sup>[38]</sup>

### 4. 膜上区域化质子假说的可能解释

Williams 在 1961 年提出这一假说<sup>[39]</sup>。他的着重点是: 偶联于氧化还原反应所产生

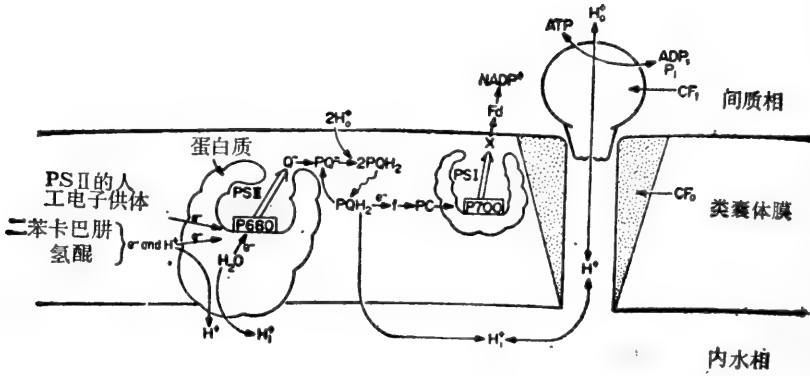


图 13  $H^+$  在直接进入类囊体内水相后,再经  $CF_0$  质子通道流出的模式图<sup>[38]</sup>

的  $H^+$  可贮于膜内,在膜内形成区域化(localized)的高浓度质子势。区域化质子的化学势在能量转换中起直接的的决定性作用,而膜内外两侧水相的势差是一种次生的现象,是与膜内区域化质子势平衡的结果,并不直接参与能量的转换。

区域化质子假说很不同于化学渗透理论将生物膜看成是无活性的介电层的观点,而认为膜本身可贮存质子,在高度复杂化的能量转换膜上的电子传递复合体和 ATP 酶复合体之间具有传导  $H^+$  的结构通道<sup>[40]</sup>。Williams 假说从七十年代中期以来,逐渐引起研究者的重视和接受。Robertson 和 Boardman 等提出<sup>[41]</sup>, $H^+$  从外水相被 PQ 携带进入膜内的疏水区域, $H^+$  能与小的亲脂分子结合,这种亲脂小分子很快横向扩散,携带  $H^+$  可直接到达 ATP 形成部位。现在较多的看法<sup>[42]</sup>是,跨膜势差推动 ATP 形成,但并不排除在膜内存在有  $H^+$  的特殊机制。在类囊体膜内的某些区隔局部可能有高的  $H^+$  浓度,但这需要直接的实验证据,并且区域化质子与光合磷酸化的关系仍是需要研究的问题。我们从图 9 可以看到, $CF_0$ - $CF_1$  复合体位于裸露或非垛叠膜, $CF_1$  突出于表面。而 PS II 在垛叠膜内侧,距离较远,水氧化释放的  $H^+$  怎样与  $CF_0$  发生直接联系?进一步的工作将去探索  $H^+$  运动从产生部位(水分解及  $BQH_2$  氧化)怎样传导到  $CF_0$ - $CF_1$  的机制,而这可能是光合磷酸化的主要限制步骤。

#### 四、ATP 酶复合体的结构功能

高能态的实质是  $H^+$  浓度差。上面所讨论的是与电子传递偶联释放  $H^+$  的机制及与光合磷酸化的关系。但  $H^+$  怎样被传导、利用,这就必须了解 ATP 酶复合体的结构与功能。

叶绿体中 ATP 在光下合成是由类囊体膜上的 ATP 酶复合体所催化。ATP 酶复合体由两部分组成,催化部分是亲水的,为膜的外周蛋白,很容易从膜上摘除下来,经活化处理具有 ATP 酶的水解活力;膜部分  $CF_0$  是疏水蛋白,起质子通道作用。ATP 酶复合体将 ATP 形成和水解偶联于  $H^+$  运动,内部  $H^+$  向外流出推动 ATP 形成,降低质子梯度;而在 ATP 水解时则以相反方向使  $H^+$  向内转移引起内外质子梯度。这种可逆的转移  $H^+$  的 ATP 酶,又叫  $H^+$ -ATP 酶,ATP 合成酶, $CF_1$ - $CF_0$ 。这种酶与细菌及线粒体中的 ATP 酶相似。



类囊体膜上 ATP 酶的含 量经测定<sup>[43]</sup>, 可从 1:500 至 1:1800 Chl, 平均值为 1:860, 与生长状况有关。酶在膜上分布很不均一, CF<sub>1</sub> 突出于膜的间质侧, 而在垛叠基粒区是没有的。

### 1. 偶联因子(CF<sub>1</sub>)的结构功能<sup>[43-45]</sup>

叶绿体 ATP 酶含有八种不同的亚单位, 五种属于 CF<sub>1</sub>, 三种属于 CF<sub>0</sub>。CF<sub>1</sub> 的五种亚单位分别以希腊字母  $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  代表其不同大小的多肽, 分子量依次为 59, 56, 37, 17.5, 13 kD。其分子组成早期测定为  $\alpha_2, \beta_2, \gamma, \delta, \epsilon$ , 最近则认为  $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \epsilon$ , 基于前者所计算的 CF<sub>1</sub> 的分子量为 325 kD, 如基于后者则计算为 410 kD。从图 14 可见,  $\alpha, \beta$  突出于膜外, 上有核苷酸结合部位。但催化部位似在  $\beta$  亚单位上。 $\alpha$  亚单位起调节催化的作用。 $\gamma$  在能量转换中具有传导质子的作用, 早期认为  $\gamma$  不仅起控制 H<sup>+</sup> 流经 F<sub>0</sub> 的阀门作用, 而且在 ATP 形成和水解活力方面起重要的调节作用。 $\gamma$  被修饰后致使其构象变化而改变复合体的 H<sup>+</sup> 透性。故而可能  $\gamma$  既调节在 ATP 酶内 H<sup>+</sup> 的运动, 也调节由 H<sup>+</sup> 所导致的变化。 $\delta$  作用有助于 CF<sub>1</sub> 连接到类囊体膜上的 CF<sub>0</sub>, 但最近看到, 缺  $\delta$  的 CF<sub>1</sub> 重组到残缺 CF<sub>1</sub> 的膜上, H<sup>+</sup> 通道仍然打开, 只有在重组时加有  $\delta$ , H<sup>+</sup> 漏才被阻止。 $\epsilon$  抑制 CF<sub>1</sub> 的 ATP 酶活力, 起调节 CF<sub>1</sub> 的偶联活力和 ATP 酶水解活力的作用。

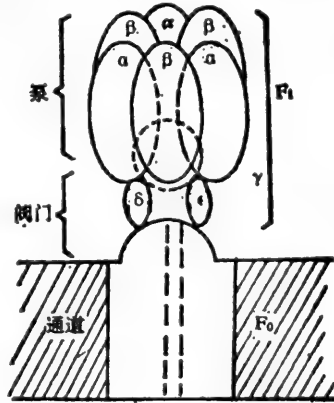


图 14 H<sup>+</sup>-ATP 酶的亚单位组成和相互关系

离体的 CF<sub>1</sub> 上有三个不同的核苷酸结合部位。在部位 1, 有一结合态 ADP, 可与介质中 ADP 或 ATP 交换, 这不是催化部位而可能是调节部位。在部位 2, 可能是 Mg-ATP 的结合部位, 此结合态 ATP 与 CF<sub>1</sub> 为等分子结合, 其离解常数很低, 不起直接的催化作用。在部位 3, 可结合 ADP 和 ATP, 离解常数约为 2/ $\mu$ m, 核苷酸很易离解。荧光共振能量传递测定表明, 这三个结合部位形成一各边为 44, 48, 36 Å 的三角形。

许多实验表明, 类囊体上的 CF<sub>1</sub> 在光下发生构象变化, Ryrie 和 Jagendorf 最早观察到这一现象<sup>[46]</sup>。他们将类囊体悬浮于含有 <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O 的介质中照光或人工质子梯度使之能化。CF<sub>1</sub> 的 H 原子与 <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O 中的 <sup>3</sup>H 发生交换, CF<sub>1</sub> 被氚化, 含有较暗中高得多的 <sup>3</sup>H, 可达 100 <sup>3</sup>H/CF<sub>1</sub>。说明叶绿体能化时, 在 CF<sub>1</sub> 内部的可与 <sup>3</sup>H 交换的基因在光下暴露出来, 因而被氚所标记。此需光氚交换可被解抑制剂、电子传递抑制剂所抑制, 说明类囊体在光下 CF<sub>1</sub> 发生的构象变化是需能的。推测 CF<sub>1</sub> 需能构象变化可能与酶转变成活化状态有关。当叶绿体处于能化状态, 即 CF<sub>1</sub> 在光下发生构象变化时, CF<sub>1</sub> 的亚单位才可被化学修饰剂修饰, 这也提供了证据。现虽有一些方法可检测 CF<sub>1</sub> 需能构象变化, 但没有适合于作动力学分析的, 因此尚不知这种构象变化速度是否快到足够使磷酸化起始或使酶活化。研究还表明, 类囊体在光下形成  $\Delta$ pH, 使得 CF<sub>1</sub> 发生构象变化, 这时牢固结合的核苷酸变成松弛结合的, 这样的 CF<sub>1</sub> 构象状态使类囊体更加易于漏失质子。照光时如有核苷酸存在, 则将减少质子的漏出<sup>[45]</sup>。我们实验室在研究偶联机制时, 发现使电子传递与光合磷酸

化偶联效率降低的主要原因可能是,即使在进行光合磷酸化反应时,仍有不少能量会通过  $CF_1$  无效耗散。发现可用一些偶联效率改善剂改善。这些改善剂如金霉素、多粘菌素和某些多元酸。它们的改善作用都与影响  $CF_1$  的变构有关。它们的作用部位虽有所不同,如金霉素可能作用于  $\gamma$ ,多粘菌素则作用于  $\beta$ ,但它们都导致诱导  $CF_1$  构象变化,减少能量的无效耗散,从而改善偶联效率。它们在  $CF_1$  能量转换中的作用见图 15<sup>[47]</sup>。

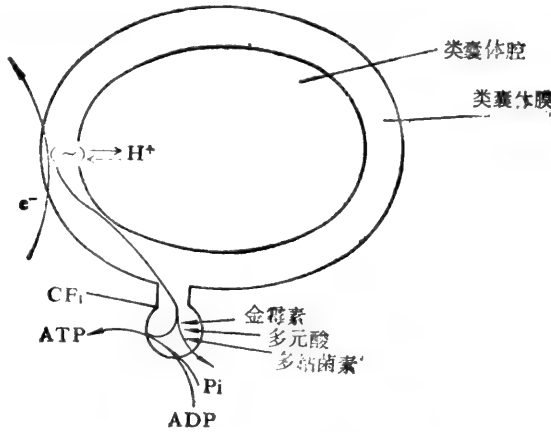


图 15 在  $CF_1$  能量转换过程中偶联效率改善剂的作用部位

## 2. $CF_0$ 的结构功能<sup>[48,43,45]</sup>

由于叶绿体 ATP 酶复合体的分离纯化技术的进步,对疏水的  $CF_0$  的亚单位的研究也有相当进展。现已知  $CF_0$  由三种不同的亚单位 I、II、III 组成,分子量分别为 15,12.5,8 kD。 $CF_0$  的最小亚单位 III 是结合 DCCD 的脂蛋白(proteolipid),这种脂蛋白的作用是作为类囊体膜的质子通道,其生理功能是将内部质子跨膜传导给  $CF_1$ 。这种脂蛋白仅在六聚体形式才能形成质子通道传导质子,其中含有 81 个最疏水的氨基酸(见图 16)。

六聚体中的一个单体如与 DCCD (二环己基碳二亚胺)结合,就将完全阻止  $H^+$  传导,完全抑制类囊体的 ATP 酶活力。最近已证明这种脂蛋白的氨基酸顺序<sup>[49]</sup>。从 DCCD 是作用于 8 kD 多肽上的谷氨酸或天冬氨酸残基,这对于研究传导  $H^+$  的分子机制有可能着手进行了。

对其他两个亚单位的作用了解尚少。可能亚单位 II 是防止脂蛋白的六聚体离解,保持亚单位 III 的六个单体集成为活化的质子通道。亚单位 I 则含有结合  $CF_1$  的部位,在与  $CF_1$  连接后,可避免  $H^+$  经过脂蛋白通道的无用漏失。

最近,我们实验室在研究寡霉素、DCCD 对叶绿体传导  $H^+$  的作用中看到<sup>[50]</sup>,DCCD 可

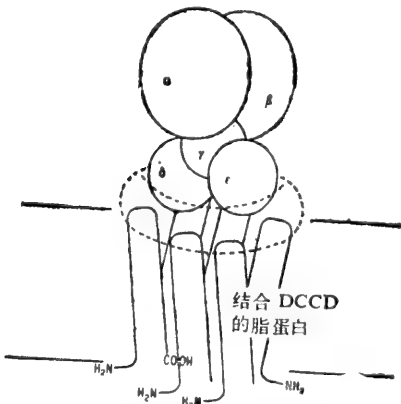


图 16  $F_1$  的多肽和  $F_0$  的结合 DCCD 的脂蛋白在膜上的排列模式图<sup>[49]</sup>

恢复残缺  $CF_1$  的类囊体膜的跨膜  $\Delta pH$  幅度大到正常的  $\sim 80\%$ 。寡霉素完全不能恢复,并可加速叶绿体照光后内部  $H^+$  的流出。这表明寡霉素和 DCCD 的作用部位和机制是不同的,与在线粒体中的作用也不同。这可能有助于对质子通道机制的研究。

### 3. 重组试验<sup>[43,45]</sup>

将叶绿体类囊体膜上进行磷酸化机构的组分分别拆离,然后重组于原来的残缺膜或人工脂质体以重建恢复磷酸化活力,这是研究 ATP 酶( $CF_1$ )的结构功能的重要途径之一。

如以稀溶液 EDTA(乙二胺四乙酸)将  $CF_1$  从膜上摘除,则明显增加膜对  $H^+$  的透性,引起解联,光合磷酸化活力丧失。从膜上将  $CF_1$  摘去,使  $CF_0$  质子通道暴露于外,因而类囊体膜系统在光下不能建立跨膜质子势。如将  $CF_1$  重组于残缺  $CF_1$  的类囊体膜,则因  $CF_1$  阻止  $H^+$  从  $CF_0$  漏出,并参与 ATP 形成的催化作用,从而可重建跨膜  $\Delta pH$ ,因而恢复光合磷酸化活力。

Carmeli 和 Racker<sup>[51]</sup>首次重组成功与光合磷酸化有关的需能的  $^{32}P$ -ATP 交换反应。Nelson 和 Hauska<sup>[52]</sup>用叶绿体组分成功地完成了光合磷酸化功能的重组。离体的 ATP 酶复合体以其活化形式参入脂质体,在酸-碱变化或外加电场均可导致 ATP 形成。虽然这 ATP 形成速度远低于正常叶绿体,但这毕竟是一重要进展。重组时需类囊体中的脂肪如半乳糖甘油二酯(galactosyl diglycerides)、硫酸异鼠李糖甘油二酯(sulfoguinovosyl diglycerides)的存在,粗大豆脂肪对重建活力更为有效<sup>[45]</sup>。

近年来,我们实验室对  $CF_1$ -ATP 酶的结构与功能进行了较系统的试验。当将不同植物种属来源如菠菜、蚕豆的叶绿体上的  $CF_1$  摘下进行互换时<sup>[53]</sup>,发现互换后,在恢复光合磷酸化活力上有彼此增益作用。进而证明残缺  $CF_1$  的类囊体膜可与植物线粒体嵴膜组合成为一种新的功能膜<sup>[54]</sup>,这是介乎残缺膜与嵴膜之间的一种膜组织。最近又进一步证明了菠菜类囊体残缺膜与鼠肝线粒体嵴膜产生了融合膜<sup>[55]</sup>,融合膜的光合链与呼吸链的电子传递体之间相互衔接起来。这就证明了两种能量转化细胞器磷酸化机构的同一性,演化上的相近性。

## 五、结 束 语

关于膜上进行能量转换的几种复合体的结构与功能研究的进展,是在既深入分析能量转换的精细的分子机制,又注意研究生物体内能量转化各步骤之间怎样协调地在工作,以得到高的换能效率的结果。

现已了解,电子传递与磷酸化偶联机制中的能量主要是通过  $H^+$  的运动来转换。生物体内的换能方式可能是多样的,如均通过  $H^+$  的运动来实现,则  $H^+$  存在的方式也可以是多样的。除以跨膜  $\Delta \bar{\mu}H^+$  形式外,也可能以膜上  $H^+$  形式存在。至今对于  $H^+$  产生的机制已较清楚,对于  $H^+$  释放、传导以及怎样被利用于 ATP 形成的机制正在研究之中,对于  $H^+$  在膜上的运动将会有更多的认识。

ATP 作为生物中储能和换能的“通货”已经知道有三十多年了。根据现在的知识,则可认为  $\Delta \bar{\mu}H^+$  更为重要。 $\Delta \bar{\mu}H^+$  就象 ATP 一样是细胞能量转换形式。Skulachev<sup>[56]</sup>总结了  $\Delta \bar{\mu}H^+$  功能,见图 17。可以说,所有活细胞主要作功方式均由  $\Delta \bar{\mu}H^+$  推动,这可能具

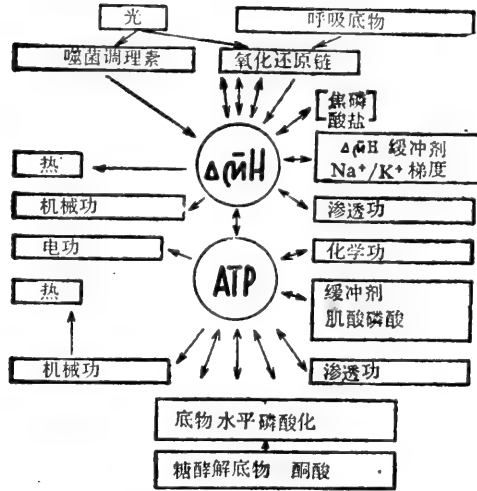


图 17  $\Delta p\text{H}^+$  在细胞能量转换中的作用

有重要的实际意义。

线粒体和叶绿体在进化、结构和功能上都有很多相似之处。光合作用和呼吸作用的能量转换有许多共同点。在机制研究上不少地方可以互相借鉴,这对于探讨生物中能量转换规律来说是重要的。

### 参 考 文 献

- [1] Danks, S. M., Evans, E. H. and Whittaker, P. A., *In Photosynthetic Systems (Structure, Function and Assembly)*, 1983, 1—77, New York Brisbane. Toronto. Singapore.
- [2] Hill, R. and Bendall, E., *Nature*, 1960, **186**:136—137.
- [3] 钱露萍,叶济宇、钱月琴、沈巩懋,生物化学与生物物理学报,1985,**17**(1)103—110.
- [4] Trebst, A., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **25**(1974), 423—458.
- [5] Trebst, A., *Methods Enzymol.*, **69**(1980), 675—715.
- [6] Junge, W., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**(1977), 508—536.
- [7] Witt, H. T., *In Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by Skulachev, V. P. and Hinkle, P., 1981, pp 221—243 Addison-Wesley Publishing Company, London. Amsterdam. Don Mills, Ontario. Sydney. Tokyo.
- [8] Singer, T. J., *In Structure and Function of Biological Molecules*, ed. by Rothfield, L., 1971, pp 146—222, New York. Academic Press.
- [9] Haehnel, W., *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **35**(1984), 659—693.
- [10] Kaplan, S. and Arntzen, C. J., *In Photosynthesis, Vol I. Energy Conversion by Plants and Bacteria*, ed. by Govindjee, 1982, pp 65—151. Academic Press. New York, London.
- [11] Anderson, J. M., *Advances in Photosynthesis Research, Vol 3. 1984*, ed. by Sybesma, C., Hague. Boston. Lancaster. printed in the Netherlands.
- [12] Joliot, P. and Kok, B., *In Bioenergetics of Photosynthesis*, ed. by Govindjee, 1975, pp 388—417, New York, London. Academic Press.
- [13] Crowther, D. and Hind, G., *In Function of Quinone in Energy Conserving Systems*, 1982, pp 499—510 Academic Press.
- [14] Crowther, D. and Hind, G., *In Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by Skulachev, V. P. and Hinkle, P., 1981, pp 245—258, Addison-Wesley Publishing Company, London. Amsterdam. Don Mills, Ontario. Sydney. Tokyo.
- [15] Slovacek, R. E. and Hind, G., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **84**(1978), 901—906.
- [16] Velthuys, B. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**(1979), 6031—6034.

- [17] 钱露萍、叶济宇, 植物生理学报, 1985, 11(4): 344—350.
- [18] Andersson, B., Åkerlund, H. E. and Albertsson, P. A., *In Membranes and Transport*, 1982, Vol 2, ed. by Martonosi, A. N. Plenum Press. New York. London.
- [19] 沈允钢、沈玖懋, 生物化学和生物物理学报, 2(1)(1962), 58.
- [20] Hind, G. and Jagendorf, A. T., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 491(1963), 715.
- [21] Slater, E. C., *Nature*(London), 172(1953), 975—978.
- [22] Mitchell, P., *Nature*, 191(1961), 144.
- [23] Mitchell, P., *Biol. Rev. Cambridge Phyl. Soc.*, 41(1966), 445.
- [24] Jagendorf, A. T., *In Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series Vol 5, Photosynthesis I, Photosynthetic Electron Transport and Photophosphorylation, ed. by Trebst, A. and Avron, M., 1977, pp 307.
- [25] Witt, H. T., *Quart. Rev. Biophys.*, 4(1971), 365—477.
- [26] Witt, H. T., *In Bioenergetics of Photosynthesis*, ed. by Govindjee, 1975, pp 493—554, New York, London. Academic Press.
- [27] Jagendorf, A. T. and Hind, G., *In Photosynthetic Mechanisms in Green Plants*, *Nat. Acad. Sci. Nat. Res. Council*, 1145(1963), 559—610.
- [28] Jagendorf, A. T. and Uribe, E., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 55(1966), 170—177.
- [29] Witt, H. T., *Biochim. Biophys. Acta*, 505(1979), 355—407.
- [30] Uribe, E. G. and Li, B. C. Y., *J. Bioenergetics*, 4(1973), 435—444.
- [31] 李有则, 光合作用研究进展, 第四集, 1986(印刷中).
- [32] Ort, D. and Dilley, R., *Biochim. Biophys. Acta*, 449(1976), 95—107.
- [33] Baccarini-Melandri, A., Casadio, R. and Melandri, B., *Eur. J. Biochem.*, 78(1977), 389—402.
- [34] Casadio, R., Baccarini-Melandri, A. and Melandri, B., *FEBS Lett.*, 87(1978), 323—328.
- [35] 上海植物生理研究所光合作用研究室一组, 生物化学与生物物理学报, 9(2) (1977), 159—167.
- [36] 李有则、卫瑾、汪秀芳、郭保杰; 植物生理学报, 4(1)(1978), 51.
- [37] Junge, W., Hong, Y. Q., Qian, L. P. and Viale, A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81(1984), 3078—3082.
- [38] Dilley, R. A., *In Membranes and Transport*, Vol 2(1982), pp 617.
- [39] Williams, R., *J. Theor. Biol.*, 1(1961), 1—13.
- [40] Ort, D. R. and Melandri, B. A., *In Photosynthesis*, Vol I, Energy Conversion by Plants and Bacteria, ed. by Govindjee, 1982, 537—587, New York, London. Academic Press.
- [41] Robertson, R. N. and Boardman, N. K., *FEBS Lett*; 60(1) (1975), 1—6.
- [42] McCarty, R. E., *In Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by Skulachev, V. P. and Hinkle, P., 1981, pp 221—224 Addison-Wesley Publishing Company, London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney, Tokyo.
- [43] Strotmann, H. and B. -S. Susanne, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35(1984), 97—120.
- [44] Nelson, N., *Curr. Topics in Bioenerg.* 11(1981), 1—29.
- [45] McCarty, R. E. and Carmeli, C., *In Photosynthesis*, Vol I, Energy Conversion by Plants and Bacteria, ed. by Govindjee, 1982, 647—695, New York, London, Academic Press.
- [46] Ryrie, I. J. and Jagendorf, A. T., *J. Biol. Chem.*, 247(1972), 4453—4459.
- [47] 沈允钢, 光合作用研究进展, 第四集, 1986(印刷中).
- [48] Sebald, W. and Hoppe, J., *Curr. Topics in Bioenerg.*, 12(1981), 1—64.
- [49] Hoppe, J. and Sebald, W., *In Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by Skulachev, V. P. and Hinkle, P. C., 1981, pp 449—470, Addison-Wesley Publishing Company, London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney, Tokyo.
- [50] 卫瑾、杜子云、李有则, 植物生理学报, 10(3) (1984), 249—259.
- [51] Carmeli, C. and Racker, E., *J. Biol. Chem.*, 248(1973), 8281—8287.
- [52] Nelson, N. and Hauska, G. A., *In Membrane Bioenergetics* (C. P. Lee, G. Schatz and L. Ernster, eds). 1979, pp 189—202, Addison-Wesley Reading, Massachusetts.
- [53] 李淑俊、蔡剑萍、王国强、王美琪、赵海英, 植物学报, 20(2)(1978), 103—107.
- [54] 李淑俊、肖建平、蔡剑萍, 植物学报, 25(4)(1983), 336.
- [55] 李淑俊、肖建平、蔡剑萍、徐亚南, 中国科学, 5(1984), 419.
- [56] Skulachev, V. P., *In Chemiosmotic Proton Circuits in Biological Membranes*, ed. by Skulachev, V. P. and Hinkle, P. C., 1981, pp 3—48, Addison-Wesley Publishing Company, London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sydney, Tokyo.

# 胰岛素分子结构与功能关系的复杂性

王志珍 梁栋材

(中国科学院生物物理研究所)

## 一、前言

二、胰岛素分子的三维结构与功能——贡献给胰岛素分子与其受体相互作用的可能的结构因素

1. 胰岛素分子的一个表面

2. 胰岛素分子的柔性

三、胰岛素分子与其受体的结合和生物活力

四、胰岛素分子刺激代谢和刺激生长的不同的生物功能与结构的关系

五、非胰岛素物质的胰岛素生物效应

六、胰岛素分子的进化和功能

## 一、前 言

自 1921 年 Best 和 Banting 从小牛胰腺分离到胰岛素以来,人类对胰岛素的研究已有六十多年的历史了,1955 年 Sanger 阐明了胰岛素分子的全部氨基酸顺序<sup>[1]</sup>,六十年代中,中国的科学家以及美国和联邦德国的两个小组先后成功地用化学方法全合成了具有全部生命活力的结晶胰岛素,这是人类历史上人工合成生命物质的首次创举。七十年代初,英国牛津小组<sup>[2]</sup>和中国小组<sup>[3]</sup>解出了高分辨率的胰岛素分子的空间结构(图 1)。对胰岛素

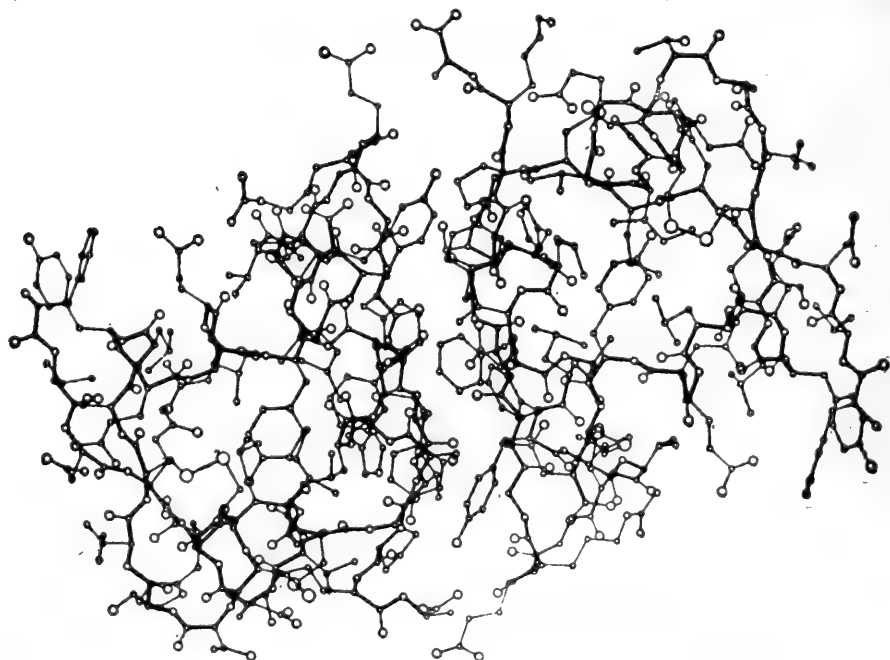


图 1 沿非结晶学二次轴看的胰岛素分子二体的原子位置投影图<sup>[2]</sup>

致谢: 作者衷心感谢邹承鲁教授在本文撰写过程中所给予的多方面的帮助和提出宝贵的意见。

分子结构的这几次认识的飞跃极大地推动了胰岛素分子结构与功能的研究。近廿多年来，用各种化学修饰和合成方法制备了几百种在分子的不同部位作不同修饰的胰岛素衍生物，组成胰岛素分子的 51 个氨基酸残基中至少已有 32 个作过不同的修饰(图 2)<sup>[4]</sup>。从不同种属的动物来源也分离到几十种结构不同的胰岛素<sup>[5-8]</sup>(表 1)。比较这些胰岛素分子的溶液构象和晶体结构，研究它们的各种不同的生物功能的表现，对阐明胰岛素分子结构与功能关系积累了丰富的知识，对揭示激素分子发挥生物功能的作用机制也作出了许多有价值的贡献<sup>[9-11]</sup>。但是离最终揭示胰岛素分子如何发挥生物功能的奥秘仍然还有很远的距离。

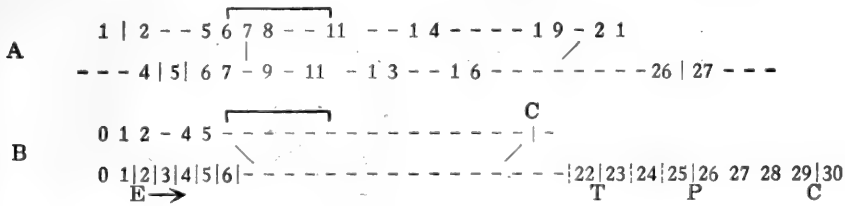


图 2 胰岛素分子的化学修饰

图中数字为用合成方法 A 和半合成方法 B 作过修饰的氨基酸残基位置;E. Edman 降解;C. 羧肽酶 A 或羧肽酶 B;T 胰蛋白酶;P 胃蛋白酶;垂直线段表示从 C 端或从 N 端切去相应的氨基酸或肽段。垂直虚线表示二种酶的作用(T+C 或 P+C)<sup>[4]</sup>

近年来，随着对生命现象认识的深入，在胰岛素研究中也发现了许多全新的有关分子结构与功能关系的现象，这为胰岛素结构功能的研究提出了一系列新的课题，也向胰岛素的研究者们提出了新的挑战。未来，要在胰岛素分子结构与功能关系以及作用机制研究中获得实质性的突破，必须越过以往经典概念所形成的界限，充分地运用近代科学的新概念和新技术，为胰岛素研究开辟新的途径；不仅研究胰岛素分子本身，还必须研究它的受体，特别是两者的相互作用，把胰岛素研究全面地推进到生物科学和医学的前沿。

## 二、胰岛素分子的三维结构与功能——贡献给胰岛素分子与其受体相互作用的可能的结构因素

### 1. 胰岛素分子的一个表面

生物大分子特定的空间结构是其发挥复杂的生物功能的基础，或者说正是在这种特定的三维结构中蕴藏着分子所参与的生物事件的基本信息。现在知道，胰岛素发挥生物功能的第一步是与它的受体的识别和特异结合<sup>[12]</sup>。我们认为这个过程涉及到整个胰岛素分子的协同作用，很难在胰岛素分子内部明确地划分出特定的功能区，诸如结合部位、活性部位或调节部位等。但我们推测胰岛素分子与受体的结合可能主要发生在分子的一个表面上。这个表面由两部分组成，一个是具有相当面积的疏水区，一个是分散于这疏水区周围的一些带电荷的或极性的基团(图 3A)。疏水区是这个表面的主体，主要由 B 24Phe、B 25Phe、A 19Tyr、B16Tyr、B12Val、A2 Ile 和 B 26Tyr 组成。其中的芳香环十分重要，它们除了承担疏水相互作用外，很可能还有一些在与受体识别、结合和结合后诱发受体分子的构象变化中的特殊作用；而其他一些基团或主链部分即使有一些变换，只要这个疏水表



表 1 不同种属动物胰岛素的氨基酸顺序<sup>[5]</sup>

Chain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
A	Gly	Ile	Val	Glu	Gln	Cys	Cys	Thr	Ser	Ile	Cys	Leu	Tyr	Gln	Leu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Asn																
								Ala	Gly	Val																										
								Ala	Gly	Thr																										
								Asp																												
								Asp																												
								Asp																												
								Asp																												
								His																												
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Lys	Pro																										
								His	Lys	Pro																										
								His	Lys	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										
								His	Arg	Pro																										

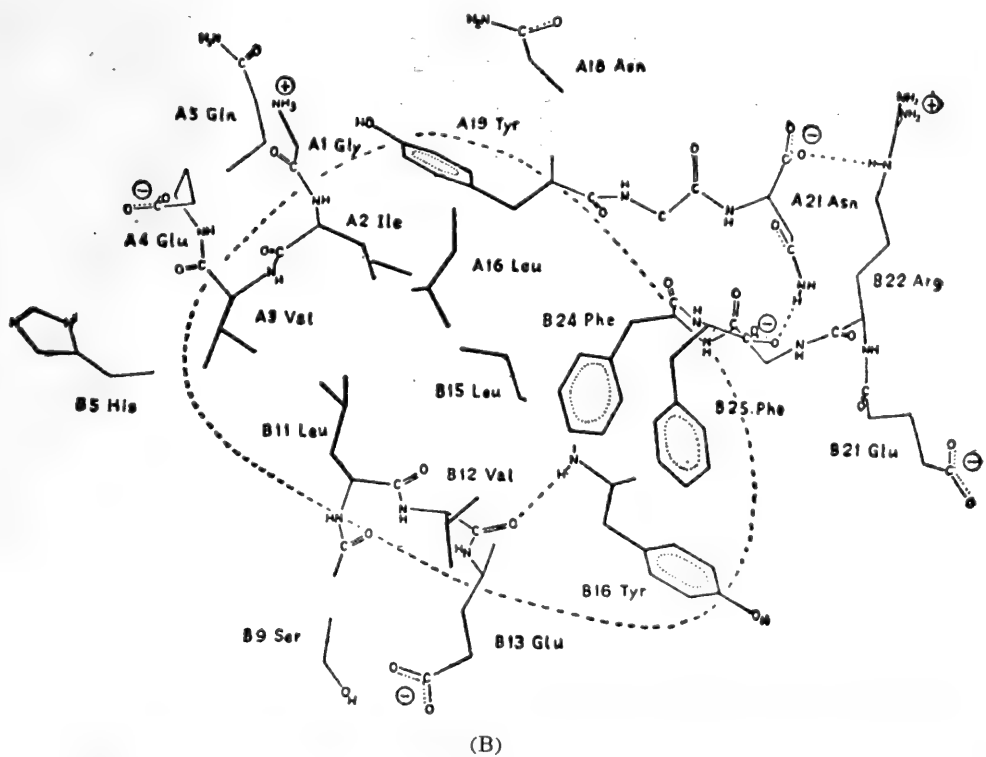
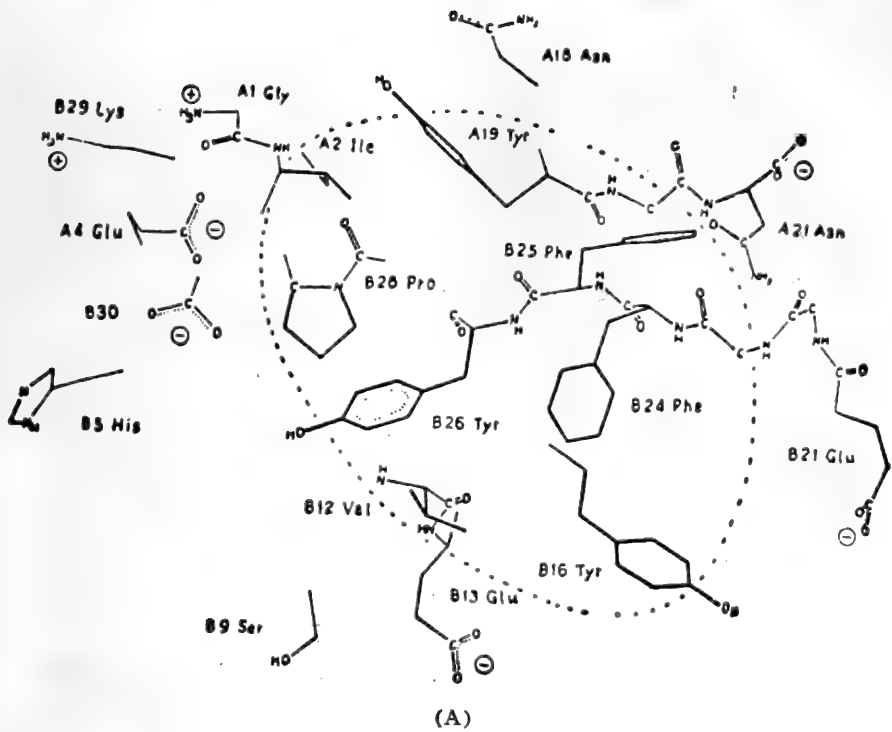


图 3 胰岛素分子(A)和去 B 链羧基端五肽胰岛素分子(B)中可能与其受体结合的一个表面。虚线包含部分为疏水区域,周围分散着一些极性基团

面仍能维持  $150 \text{ \AA}^2$  左右,则不会过于严重影响胰岛素分子与受体的相互作用。去 B 链羧端五肽胰岛素是至今为止测定了空间结构的胰岛素衍生物中唯一的一个在晶体中以单体形式存在的胰岛素衍生物<sup>[13]</sup>。这个分子由于失去 B 链羧端五个氨基酸残基,其疏水内核反倒因此而更加暴露,于是 A 3 Val、A 16 Leu、B 15 Leu 和 B 11 Leu 新表露在原来的疏水表面上,使这个表面的非极性基团的组成与胰岛素分子有明显的差别(图 3 B),但基本上还是维持了  $150 \text{ \AA}^2$  的面积。另一方面,这一疏水表面周围的极性基团基本保持不变。这两点也许正是这个分子仍能保留相当的受体结合能力的重要因素。所以说,这个相当大的面积的疏水表面,就其区域的整体性来说,在空间结构上(或区域构象上)具有很大的保守性。相对来说,极性部位的残基对分子生物功能的表现则显得在化学结构上更加敏感。相应于这两个部位,分子表面和受体之间也涉及到两种相互作用。一种是非极性的,一种是极性的,包括电荷的转移。非极性的相互作用是占优势的、基本的相互作用。在其他激素与其受体的相互作用中往往也是这种情况。

特别有兴趣的是 B 25 Phe,它虽然处于上述构象保守的疏水表面上,但恰恰是一个特殊的例外。这个残基在构象上十分活跃,在去 B 链羧端五肽胰岛素分子中,它的侧链的方向刚好与在胰岛素分子中相反,而且主链出现迥折,说明构象有很大的柔性(图 3);但其化学结构却表现得格外重要,即它的苯环对胰岛素分子的生物功能的表现十分关键。美国 Tager 实验室在 1983 年鉴定到世界上第一个人的天然变异的胰岛素分子(Chicago 变异胰岛素),其变异发生在 B 25 Phe 为 Leu 取代<sup>[14]</sup>。用圆二色和计算机图象显示技术并未发现它与天然胰岛素分子的结构有明显差异<sup>[15]</sup>。但就 B 25 位置上这一个氨基酸残基的改变便使分子的受体结合和生物活力<sup>1)</sup> 分别严重下降到 9%和 2%<sup>[16]</sup>。而在局部构象上与天然胰岛素分子有明显差异的人工半合成的 B 24Leu 胰岛素分子则维持了大约 20%的生物活力<sup>[17,18]</sup>。Tager 实验室不久后又鉴定到第二个天然变异的人胰岛素分子(Los Angeles 变异胰岛素),其变异发生在 B 24 Phe 为 Ser 取代<sup>[19]</sup>,生物活力为天然胰岛素的 16%。半合成的 B 25 Ser 胰岛素则只有 0.5%的生物活力(表 2)。就是说,B 24 Phe 无论为 Leu 还是 Ser 取代,总可维持 20%左右的生物活力;但 B 25 Phe 为 Leu 或 Ser 取代后,活力就严重损失,降到 1%左右。用我们从去 B 链羧端五肽胰岛素分子结构中得到的认识可以对这种奇怪的结构和功能似乎不一致的现象作出部分的解释。B 25 Phe 在分子的局部构象中有很大的柔性,因此其芳香侧链被烷基的取代对周围构象的影响可能不会很大,但苯环共轭平面上的  $\pi$  电子云的丧失则很可能影响整个分子与受体分子的识别,以及与受体结合后的构象变化和相互作用,因此导致生物活力几乎丧失殆尽。而构象十分保守的 B 24 Phe 的苯环被取代后,显然会影响疏水表面的结构,致使与受体结合能力丧失 70—80%,但 Leu 的烷基在一定程度上大概还可以弥补原来苯环在疏水表面上所起的与受体间的疏水作用,因此也弥补了一定的与受体结合的能力。

A 链氨基端的 Gly 是疏水区外面那个极性区的重要成员,其  $\alpha$  氨基在结构上应该比较自由,实际上在各种胰岛素分子中的构象表现却十分稳定,它的正电荷对分子的功能表现非常关键<sup>[20]</sup>。Geiger 制备了一系列 A1Gly 为不同构型的其他氨基酸取代的衍生物,发现所有 L 氨基酸取代的衍生物活力严重降低到 10%左右,而所有相应的 D 氨基酸取代

1) 通常说的胰岛素生物活力是指胰岛素在离体细胞上刺激代谢效应的生物活力。

表 2 人的天然变异胰岛素和人工合成的有关胰岛素衍生物

		变异或修饰位置	生物活力(%)	受体结合(%)
人的变异胰岛素				
Chicago	胰岛素	B 25 (Phe→Leu)	1—2	9
Los Angeles	胰岛素	B 24 (Phe→Ser)	—	—
Wakayama	胰岛素	A 3 (Val→Leu)	—	—
人工合成胰岛素				
(Leu) <sup>B24</sup>	胰岛素	B 24 (Phe→Leu)	21	15
(Leu) <sup>B25</sup>	胰岛素	B 25 (Phe→Leu)	2.1	1.7
(Ser) <sup>B24</sup>	胰岛素	B 24 (Phe→Ser)	16	—
(Ser) <sup>B25</sup>	胰岛素	B 25 (Phe→Ser)	0.5	—

的衍生物则保留 70—80% 的生物活力<sup>[21,22]</sup>。进一步研究这些衍生物的荧光性质<sup>[23]</sup>和对结构的分析,他们认为是因为 L 氨基酸侧链在分子中的排布造成的空间障碍破坏了分子的局部构象而使活力降低。我们对分子模型的分析认为,相对于原来 Gly 没有侧链的情况,确实 L 型比 D 型有侧链氨基酸的取代会在二体中两个分子的结合面上相当拥挤的空间内造成更大的空间障碍,但在胰岛素以单体形式与受体结合时<sup>[24]</sup>,由于 A 链氨基端处于分子表面,这种空间障碍将会获得很大程度的解除。换句话说,在单体中这种空间障碍并不十分严重,因此不致于引起重大的局部构象变化而过于严重影响与受体的结合。更重要的因素很可能是在立体化学上, L 侧链在胰岛素单体分子中允许存在的位置会严重阻挡分子与受体的相互接近,屏蔽了  $\alpha$  氨基的正电荷与受体的相互作用。而 D 侧链的可能取向则仍然允许分子,特别是  $\alpha$  氨基能比较自由地与受体分子相互作用。我们对 [A1 Trp]胰岛素和 [A1 D-Trp]胰岛素的荧光研究<sup>[25]</sup>也表明, A1  $\alpha$  氨基的微环境和侧链取向在 L 型和 D 型两种衍生物分子中是有差异的,而且 L-Trp 的取代还可能造成分子中 A1 的  $\alpha$  氨基和 A4 侧链羧基之间的盐键的破坏,甚至可能通过分子构象传递影响整个分子的构象。我们实验室正在进行这两种衍生物的晶体结构分析。

## 2. 胰岛素分子的柔性

生物大分子结构的可变性,或者说柔性(flexibility),和它的结构的精确性,或者说刚性,是保证生物大分子行使其特定生物功能的两个既对立又统一的性质。胰岛素分子和它的受体也是这样,特定的结构是它们互相识别和结合的基础,而结构的柔性则允许并保证它们在结合过程中和结合以后发生各种需要的构象变化。这些变化可能是局部的,细微的,也可能是广泛的,显著的。胰岛素分子的 B 29—30 的主链可以发生较大的移动而使分子的疏水内核的某些疏水基团外露以形成充分的疏水表面。疏水表面的一些非极性侧链基团的位置可能会作适当的调整,如芳香环的共轭平面可以转向与疏水表面平行,以提供更充分的疏水接触,也可以转到与受体的结合面上某些芳香环的共轭平面相平行的方向,以实现一些特殊的相互作用。在疏水表面周围的一些极性基团,如 B 21 Glu、B 13 Glu、B 29 Lys、A 4 Glu、A 18 Asn 和 A 21 Asn 等也会作较大的构象变化,以满足与受体之间的极性相互作用。

胰岛素分子 A1  $\alpha$  氨基和 B 29  $\epsilon$  氨基之间为二氨基辛酸交联的衍生物的 3.2 Å 分辨率的晶体结构和圆二色研究表明,该分子的结构与天然胰岛素分子相比,可以说是相当相似的<sup>[26]</sup>。10 Å 长度的交联桥联在刚好差不多也是 10 Å 距离的 A 头和 B 尾两个氨基之

间,很可能不会对分子造成过多的额外的拉力或张力而影响分子的整体结构,这一点是可以理解的。但是交联分子的受体结合和生物活力只有天然胰岛素的5%,如此严重的活力损失为什么不能在分子的严格的空間结构中得到反应?难道正是那些“无关紧要”的结构变化,在3.2Å分辨率上不足以发现的细微变化,或者在交联分子中原先存在的,只是在结晶过程中被矫正了的某些细微变化,导致了这样严重的活力损失?固然不能完全排除这些可能性,但更可能的原因是,分子内的交联修饰虽然没有直接引起晶体中分子结构本身的严重畸变,却很可能会在一定程度上屏蔽分子对受体的结合面,特别是在对分子的结构和功能都很敏感的A链氨基端和B链羧端区域形成一个10Å长度的交联桥,十分有可能会降低分子的结构柔性,限制分子发挥生物功能时的构象变化,从而降低生物活力。这同样是对分子结构的损伤,只是在静态时被掩盖了,只有在动态时才暴露出来。这种潜在型的结构变化对功能的影响是十分值得注意的。

一般说来,晶体结构分析本身得到的是静态的结构信息,今天人们对动态的信息更感兴趣。结晶学家迫切希望和生物化学家密切配合以获得各种诸如酶和底物、酶和抑制剂、激素和受体、抗原和抗体、基因和调控蛋白等的复合物的晶体,以及化学反应的中间物的结晶作结构分析。同时使用同步辐射高功率的X射线、电子计算机操作的图象分析、低温结构分析以及改革分析技术等新的手段去捕捉生物大分子发挥生物功能过程中的结构变化的动态信息,把结构功能研究推向新的水平。二维NMR分析技术在获取溶液中生物大分子的三维结构信息方面是一种十分有希望的新的结构分析手段。

天然变异胰岛素是胰岛素结构功能研究中新的极好的材料。它的发现以及结构与生物学性质的鉴定将为胰岛素结构与功能关系、糖尿病医学临床以及胰岛素分子遗传提供有趣的信息。不久还应该可以通过人工诱发胰岛素基因的突变为胰岛素分子结构功能关系研究提供理想的定向变异的胰岛素分子。

### 三、胰岛素分子与其受体的结合和生物活力

胰岛素有多种多样复杂的生物功能,其生物活力可用不同的指标来表示(表3)。现在国际上一般不常用刺激免血糖降低,引起小鼠惊厥等整体生物效应作为胰岛素的活力指标,原因是干扰因素多,不易把胰岛素的刺激与这种整体生物效应直接地定量地联系起来。因此多采用离体生物效应,即测定胰岛素在从动物体内分离出来的诸如脂肪细胞或一些人工培养的细胞上的生物效应,如刺激葡萄糖的传递<sup>[27]</sup>、刺激葡萄糖氧化<sup>[28]</sup>、刺激脂肪生成<sup>[29]</sup>、刺激DNA合成<sup>[30]</sup>等作为活力指标。1972年前后胰岛素受体得以直接研究<sup>[31,32]</sup>,测定I<sup>125</sup>标记的胰岛素与受体的结合<sup>[33]</sup>便成为研究胰岛素生物学性质不可缺少的内容。很长一段时间内,发现几乎所有测定过的不同种属动物的胰岛素和胰岛素衍生物,相对于猪胰岛素,都表现有与受体的结合和生物活力相平行的关系<sup>[34,35]</sup>,于是认为这是一条普遍规律。这意味着各种胰岛素衍生物对受体的亲和力虽有差异,但所达到的相同数量的受体结合是能激发同样数量的生物效应的,也就是说生物效应只依赖于与受体结合,另一方面也意味着在胰岛素分子结构中大概并不能区分负责与受体结合的所谓“结合区”和负责信息传递激发生物效应的所谓“活性区”。尽管结晶学家在分析了胰岛素分子的晶体结构后,曾经推测它可能象某些其他激素分子那样存在这样两个可区分的功

表 3 胰岛素生物活力和受体结合的测定

受体结合 ( <sup>125</sup> I-胰岛素结合)	生物活力 离体活力	整体活力
脂肪细胞	脂肪细胞	小鼠惊厥
IM-9淋巴细胞	葡萄糖氧化	兔血糖下降
单核细胞	葡萄糖传递	
红细胞	脂生成	
肝细胞质膜		
鼠完整肌肉	培养的人的成纤维细胞	
人肌细胞质膜	<sup>3</sup> H-胸腺嘧啶参入 DNA	
胎盘膜		
溶性受体		

能区<sup>[2,3,38]</sup>,但长时间来确实不能成功地用化学修饰直接证明这样的推测。1977年第一次发现胰岛素与其受体的结合和它的生物活力不一致的异常现象,表4中的粘盲鳗(hagfish),一种最原始的脊椎动物的胰岛素,表现有25%的受体结合和仅仅5%的生物活力<sup>[37]</sup>。某些双分子交联的胰岛素是最早发现的半合成的衍生物,具有70—80%的受体结合和仅仅7—38%的生物活力<sup>[38]</sup>。以后发现合成的A 21 Asn为天冬二酰胺取代的胰岛素也表现有两者的分歧,50—60%的受体结合和12—15%的生物活力<sup>[39]</sup>。一组A链氨基端接上1至3个碱性氨基酸的胰岛素衍生物,具有80—90%的受体结合,生物活力却下降到40%左右<sup>[40]</sup>。与粘盲鳗相似,豪猪(porcupine)的胰岛素也表现25%受体结合和4%的生物活力<sup>[41]</sup>。这里受体结合与生物活力的不一致都表现为前者高于后者。新发现的矛盾现象迫使人们对以往的概念作新的考虑。胰岛素发挥生物功能首先是与靶细胞质膜上的胰岛素受体结合,然后起动一系列极其复杂的从分子水平到细胞水平的生物化学变化,最后导致特定的生物效应。因此从上述事实来看,结合是生物效应的必要条件,但并非充分条件。生物效应的表达不仅取决于与受体的结合,还决定于一系列到目前为止基本上还不清楚的“受体结合后”事件。“受体结合后”化学反应链中任何一个环节受阻都会导致生物效应的减弱。但是相同数量的结合能否产生较多的生物效应呢?也就是说“受体结合后”事件有否放大作用呢?1980年Katzoyannis实验室半合成的以Pro取代B 21 Glu的胰岛素衍生物出人意外地证明了这种可能性,这是迄今为止所发现的唯一一个其生物活力(33%)反而高于受体结合(17%)的胰岛素衍生物<sup>[42]</sup>。对这种特殊的性质目前尚不能给予确切的解释。但可以推测,胰岛素分子B 20—23这段很特殊的、对胰岛

表 4 一些胰岛素和胰岛素衍生物的离体生物活力和受体结合两者之间的不一致性<sup>[37-42]</sup>

胰岛素和胰岛素衍生物	受体结合(%)	生物活力(%)
猪胰岛素	100	100
粘盲鳗胰岛素	25	5
豪猪(porcupine)胰岛素	25	5
交联胰岛素		
B 1-B' 29 二体	92	38
B 1-B' 1 二体	70	15
(Arg-Gly <sup>A1</sup> )胰岛素	107	39
(Arg-Arg-Gly <sup>A1</sup> )胰岛素	90.5	35
(Arg-Arg-Arg-Gly <sup>A1</sup> )胰岛素	125	40
(Lys-Arg-Gly <sup>A1</sup> )胰岛素	79.5	36
天冬二酰胺(asparaginamide <sup>A21</sup> )胰岛素	64	13
(Pro <sup>B21</sup> )胰岛素	16	33

素分子的结构和功能很重要的U转折中,B 21 Glu 为结构完全不同的,在各种氨基酸中唯一的亚氨基酸 Pro 取代,一定会改变分子的局部构象,并影响分子的整体构象和构象的可变性,从而降低分子对受体的亲和力。但与此同时却可能恰恰有利于与受体结合后的对诱发生物效应所需要的某些构象的完成。因此 B21 Glu 似乎对受体结合更加重要些,这也许暗示需要重新考虑胰岛素分子的“结合部位”和“活性部位”的概念。此外是否还有一种可能性,即存在着不同的胰岛素受体,它们对不同的胰岛素分子的亲和力和诱发生物效应的能力是不同的,这一点下面还要讨论。总之,胰岛素与受体的结合和它的生物活力之间的关系为胰岛素结构功能研究提出了许多新的课题,需要在充分阐明胰岛素分子和受体分子本身结构的基础上,进一步阐明两者相互作用的细节。胰岛素受体究竟怎样与环境里几亿个各种各样的蛋白质分子中的一个胰岛素分子相识别,两者识别的结构基础,诸如分子形状的契合、电荷的相互作用或特殊的化学组成等是什么?两者结合的本质是什么?结合过程中两者的构象如何互相适应、契合、诱导而发生一系列的变化?结合的信息在传递过程中的“保真”、“放大”、“衰减”、“中止”等作用又有什么相应的结构上的表现?

胰岛素分子的结构近年来已在日本的 Sakabe(坂部)实验室<sup>[43]</sup>以及我们自己的实验室<sup>[44]</sup>在 1.2 Å 这样比较少有的高分辨率上得到阐明,但解出结构的胰岛素衍生物还不多。至于胰岛素受体,由于在细胞中的含量极微,其分离纯化至今还没有实质性的突破。1983 年美国 Fujita-Yamaguchi (藤田-山口)实验室用连续亲和色谱技术获得的最好结果是在两个正常的人胎盘中分离到 50 微克比活为每毫克蛋白 4.7 nmol 的胰岛素受体,即达到一个受体分子与一个胰岛素分子相结合的纯度<sup>[45]</sup>。近十五年来,用光亲和标记胰岛素<sup>[46]</sup>、双功能团试剂交联<sup>[47]</sup>、细胞表面标记或生物合成标记结合受体的抗体对溶性受体的特异免疫沉淀<sup>[48]</sup>等方法可以测到受体的亚基结构。1985 年初,美国 Ullrich 小组<sup>[70]</sup>和 Ruffer<sup>[71]</sup>小组分别从其 cDNA 序列推测到人胰岛素前体的全部氨基酸序列,在胰岛素受体研究中跨出了重要的一步。未来要获得足够量的纯化胰岛素受体供全面的结构分析的途径可能有以下几条:(1) 利用受体的单克隆抗体<sup>[49]</sup>从根本上改善纯化受体的亲和色谱的效率。(2) 培养具有特殊富含含量的胰岛素受体的变异细胞株。(3) 利用基因工程在微生物中生产胰岛素受体。这些在美国的一些实验室中已获得不同程度的结果,基因工程方法可能最有希望。

至于“受体后过程”目前了解得极少,但根据现有的实验数据,对胰岛素作用机制的认识亦已有了一些线索,主要有这样几方面:(1) 第二信使假设。推测胰岛素与其受体结合后,可能也象胰高血糖素那样通过某种或几种小分子的化学物质发挥生物功能。一些实验室报道已分离到分子量为 1,000—3,000 的可能的胰岛素作用的信使物质,把它们加入破碎的细胞体系或某些细胞器组成的体系中,可以观察到胰岛素的生物效应,如对胰岛素敏感的丙酮酸脱氢酶,糖原合成酶等酶的活力增高<sup>[50]</sup>。需要进一步鉴定这些小分子物质的化学本质,建立它们与胰岛素的刺激和胰岛素的生物效应之间的直接联系。(2) 内部化作用(internalization)。用多种方法比较肯定地证明了胰岛素与受体结合的复合物通过胞饮作用进入到细胞内部<sup>[51]</sup>,但需要进一步追踪它们内部化后的命运,建立内部化作用与胰岛素生物效应之间的直接联系。(3) 受体的自磷酸化作用<sup>[52]</sup>。胰岛素和受体结合后很短时间(t 0.5—30 秒)内就刺激受体本身固有的一种对酪氨酸特异的蛋白激酶的活力,而使受体分子本身,主要是 β 亚基在多点发生磷酸化作用,它可以进一步刺激受体和其他



蛋白质的另一些蛋白激酶的活力而引起一连串磷酸化作用,这些可能是导致胰岛素生物效应的必要事件之一。(4)胰岛素分子和受体分子之间通过二硫键交换可以形成共价的复合物,这可能是两者相互作用导致生物效应的早期必要反应之一<sup>[53]</sup>。(5)胰岛素可能通过某种膜上的丝氨酸蛋白水解酶的水解作用而发挥生理功能,推测这种水解作用可能贡献给受体活化所需要的构象限制的解除<sup>[72]</sup>。总之,受体后过程是胰岛素作用机制研究的焦点,也是今后胰岛素研究的核心内容。

#### 四、胰岛素分子刺激代谢和刺激生长的不同的生物功能与结构的关系

现在认识到的胰岛素在细胞水平的生物效应大体上可以分成两大类<sup>[54]</sup>(表5)。一类是刺激葡萄糖、氨基酸、脂肪酸以及核酸前体的传递、摄取和利用,激活多种酶,促进脂肪和蛋白质的合成等代谢效应。它们对胰岛素较敏感,在少量胰岛素作用后较短时间内即可发生。另一类是促进RNA和DNA的合成,刺激细胞生长分化的生长效应,需要较多胰岛素的刺激,并在较长时间后才发生。胰岛素的代谢效应及其与分子结构的关系已有大量研究,相比之下,其生长效应,特别是与结构的关系则研究得很少。King比较研究了近卅种不同种属来源的胰岛素、化学修饰胰岛素以及一组类胰岛素生长因子IGFs<sup>1)</sup>的代谢效应和生长效应<sup>[55]</sup>。从表6可以看到除了粘盲鳗外,所有其他种属胰岛素,尽管其代谢效应有2—240%这样悬殊的差别,却都有50%以上的生长效应。这说明在胰岛素的进化过程中,刺激生长的能力要比刺激代谢的能力更保守。或者说,生长效应更能经受进化过程或化学修饰带来的分子结构的变化。但是关于刺激生长的效应与分子结构的关系现在还只能作些零星的讨论。

B链羧端B23—30肽段对胰岛素分子与受体的结合以及刺激代谢的生物效应十分重要。随着羧端残基顺序切除,分子的生物活力也逐渐下降<sup>[66]</sup>。但这段肽链对刺激生长的效应似乎并不那么重要,去B链羧端八肽胰岛素尽管只有0.5%的生物活力,仍维持30%的刺激生长活力,A8为His,如同在鸡胰岛素分子中那样,看来不仅能提高分子刺激代谢的活力达240%,也能增加分子刺激生长的活力到360%。这里最引人注目的是一类啮齿类豪猪亚目动物Hystricomorphs的胰岛素。这些胰岛素分子的氨基酸组成与猪胰岛素有许多差别(见表1),也表现有与其他哺乳类动物的胰岛素很不相同的性质,受体结合和生物活力很低,只有5%左右<sup>[57]</sup>。但King发现,它们有异常高的刺激生长的活力,比本身的刺激代谢的活力可高几十倍。更重要的是,在高浓度时它们刺激DNA合成的量要比任何一种胰岛素,甚至比IGFs刺激的DNA合成量还要高得多<sup>[68]</sup>。这种新发现的现象为胰岛素结构功能的研究提出了许多有趣的课题。

胰岛素发挥不同的生物功能是否可能通过与不同的受体相结合而诱导的,或不同的受体后过程来实现的?“不同的受体”现在理解有两种意思:一种是不同结构的胰岛素受体。胰岛素受体有三种亚基, $\alpha$ 亚基(又称结合亚基), $\beta$ 亚基和 $\gamma$ 亚基,分子量分别为

1) 类胰岛素生长因子(insulin-like growth factors)IGFs是一组多肽激素,包括IGF1、IGF2、促生长因子(somatomedin)A、促生长因子C以及[增殖刺激活性MSA(multiplication stimulating activity)]五种组分。它们具有与胰岛素类似的生物功能谱,但其免疫性质不同。它们刺激生长的能力大大高于胰岛素,但刺激代谢的能力比胰岛素弱得多。IGF1和IGF2的结构与胰岛素也相似,有50%的氨基酸顺序是相同的。IGFs有自己的受体,其特异性和某些性质与胰岛素受体不同。

表 5 胰岛素在细胞水平的生物效应<sup>[54]</sup>

生物效应	半最大反应所需时间 (min)	半最大反应所需胰岛素剂量 (nmol/L)
刺激葡萄糖传递和利用	<1	<0.1
刺激氨基酸的传递	180-240	1-10
酶的激活		
糖原合成酶	1-10	0.1-1
乙酰辅酶A羧化酶	1-10	0.1-1
丙酮酸脱氢酶	1-10	0.1-1
酪氨酸转氨酶	180-240	0.1-1
脂蛋白脂肪酶	600	<0.1
抑制脂肪分解	<1	<0.1
刺激蛋白质合成	10-200	0.1-1
改变蛋白质的磷酸化作用	<1	<0.1
刺激 RNA 合成	180-240	1-10
刺激 DNA 合成	600	100

表 6 胰岛素和类胰岛素生长因子(IGFs)的代谢效应和生长效应的比较<sup>[55]</sup>

	(ED <sub>50</sub> 猪胰岛素/ED <sub>50</sub> 类似物) × 100		
	代谢效应 A (刺激葡萄糖氧化)	生长效应 B (刺激 DNA 合成)	B/A
胰岛素			
猪(单组分)	100	100	1.0
牛	100	98	1.0
人(合成)	94	120	1.3
小鼠	82	130	1.6
绵羊	75	100	1.3
马	87	112	1.3
胰岛素原(猪)	2	51	26
胰岛素原(牛)	3	63	21
火鸡	240	350	1.5
狐鲣鱼	42	160	3.8
粘盲鳗	7	8	1.1
豪猪亚目动物 <sup>a</sup> (Hystricomorpha)			
豚鼠	3	12	4
豪猪	3	110	37
河狸鼠	1	190	190
Casiragua	2	43	22
去 B 链羧端八肽胰岛素	0.4	30	75
去 B <sub>30</sub> Ala, 去 A <sub>21</sub> Asn 胰岛素	5	10	2
去 A <sub>1</sub> Gly, 去 B <sub>1</sub> Phe 胰岛素	0.8	14	18
丁氨酸酰 A <sub>1</sub> 胰岛素	50	80	1.6
A <sub>1</sub> -B <sub>29</sub> 己二酰胰岛素	6	98	16
类胰岛素生长因子 I (IGF-I)	0.2	860	4300
类胰岛素生长因子 II (IGF-II)	1.0	430	430
多种增殖刺激活性(MSA)	0.2	120	600

a. 豪猪亚目动物的 ED<sub>50</sub> 为刺激猪胰岛素的半最大反应所需的胰岛素浓度。

135 K、90 K 和 45 K。在细胞膜上,受体是以亚基间由二硫键相连接的不同寡聚体状态存在的,最典型的是象免疫球蛋白那样的  $\alpha_2\beta_2$  形式<sup>[60]</sup>, 还有  $\alpha_2\beta\gamma$ ,  $\alpha_2\beta$ ,  $\alpha\beta_2$ ,  $\alpha_2\gamma_2$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  等<sup>[60,61]</sup>。受体以多种状态存在必然具有重要的生理意义。细胞处于高浓度胰岛素的环境下,会发生下降调节(downregulation),即受体数目减少。此时发现受体的高聚

体组分更易丧失,但受体的亲和力显得升高,高聚体比例越低,受体的亲和力越高,但同时,胰岛素刺激糖原合成酶,酪氨酸转氨酶以及受体 $\beta$ 亚基的自磷酸化作用的生物效应也越降低<sup>[62]</sup>。这表明不同类型寡聚体对胰岛素的亲和力是不同的,传递信息的性质,即诱导的生物效应也不相同。“不同的受体”还指非胰岛素受体。King<sup>[63]</sup>的工作直接证明胰岛素和IGFs都是通过与胰岛素受体结合发挥刺激代谢的功能,两者又都通过与IGFs的某种受体的结合刺激生长效应,只是对“别人的”受体的亲和力和刺激的生物效应弱得多(图4)。那么豪猪亚目的胰岛素的特殊强烈的刺激生长效应是通过什么受体的作用呢?

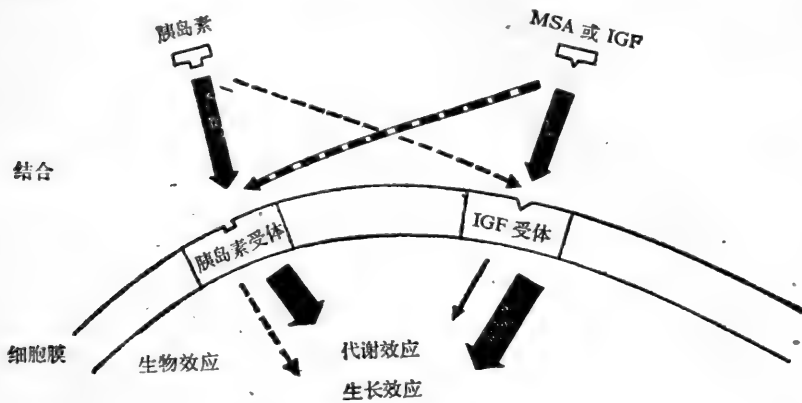


图4 胰岛素和类胰岛素生长因子通过两种受体发挥不同的生物功能的示意图<sup>[63]</sup>

King<sup>[58]</sup>在人的成纤维细胞中发现一种对豚鼠胰岛素特异的受体。但这种受体不能为其他哺乳类动物的胰岛素或IGFs识别。反之,一种血小板来源的生长因子PDGF却能在这种受体特异结合而发挥生长因子的功能,而且不同来源和结构的PDGF抑制豚鼠胰岛素与这种受体结合的能力与它们刺激生长的生物活力平行。因此推测豪猪亚目胰岛素发挥刺激生长的效应不是通过胰岛素的受体,也不是通过IGFs的受体,而很可能是通过PDGF刺激生长效应的受体的作用。胰岛素分子不仅可以与不同结构的胰岛素受体,还可以与不同种类的受体发生相互作用,诱发不同的生物效应,这为胰岛素结构功能研究增加了极大的复杂性。

豪猪亚目中各种胰岛素分子的氨基酸组成中可以发现一些特殊的变化,如B20不是Gly,而是其他的有侧链基团的氨基酸;B10不是His等。但是全面检查这些分子的一级结构,目前还不能在它们和它们的与众不同的生物学性质之间建立确切的肯定的联系。很可能由于进化上的分歧造成这类动物的胰岛素发展成为更接近于某种生长激素,甚至发展成一种特殊的生长激素,因此需要通过特殊的受体的作用。进化过程怎样使胰岛素分子发生功能上的明显分歧?与新的功能相适应的分子结构特别是高级结构有什么变化?分子中哪些结构对刺激生长更加重要?是否可以在分子中划分出负责不同生物功能的部位区域(domain)?总之胰岛素分子生物功能的进化及其相应的结构的进化,以及下面还要谈到的胰外胰岛素的结构功能问题,一定会在今后引起更大的兴趣。

## 五、非胰岛素物质的胰岛素生物效应

前面谈到过一类称为类胰岛素生长因子 IGFs 的多肽激素,它们通过与胰岛素受体的作用也可以表现微弱的胰岛素的生物功能<sup>[63]</sup>。七十年代后半期,在一种稀有的称为 B 型胰岛素抵抗症和胰岛素高血症的病人血清中鉴定到自发产生的胰岛素受体的抗体,初步鉴定主要是 IgG,可以特异沉淀溶性胰岛素受体。现已证明这种受体的抗体与胰岛素受体直接结合,但不能与 IGFs 的受体相结合<sup>[64]</sup>。它模拟胰岛素的除了刺激生长以外的几乎全部的生物效应。刀豆球蛋白 A 与胰岛素毫无共同之处,是一种植物凝集素,却也可以与胰岛素受体相结合而改变胰岛素的结合行为,并刺激靶细胞的某些类似胰岛素的生物效应<sup>[64]</sup>。这些非胰岛素物质是怎样与胰岛素受体相识别、结合并激发胰岛素的生物功能的?它们结合的结构基础又是什么?它们是通过与胰岛素相似的途径还是完全不同的途径体现胰岛素的某些生物功能的?研究这些问题对揭示激素分子与其受体相互作用的本质,以及激素生物功能表达的机制将提供新的途径。

非胰岛素物质具有胰岛素生物功能的现象,还启发我们对以往认为是胰岛素分子携带着胰岛素生物功能的信息的传统概念作新的考虑。现在有人把携带生物信息的情况分成三种<sup>[65]</sup>:一种是象胰岛素那样的多肽激素,或神经递质,或 IgE,导致细胞反应的全部信息储存在它们的受体中,它们与受体的结合促使受体中蕴藏的信息释放并表达。因此非胰岛素物质也可通过胰岛素受体而激发胰岛素的生物功能。第二种如细菌的毒素,病毒的 DNA 是真正的信息使者,而其受体只是对信息使者起浓集、运输或加工的作用。第三种是受精作用,卵子和精子双方都携带信息,缺一不可。从分子结构的角度看,胰岛素受体分子的分子量约为 35 万,是胰岛素分子量的 60 倍,应该可以容纳多得多的生物信息。从进化的角度看,所有脊椎动物的胰岛素受体都保持相同的重要特性,即它们的特异性、温度依赖关系,pH 依赖关系,负协同性以及受体的抗体的相互作用等,所以说在功能上它们是相同的。这表明胰岛素受体在进化过程中十分保守,要比胰岛素本身的进化保守得多<sup>[66]</sup>,因此受体可能是一种比胰岛素更古老的分子。实际上在低等动物,甚至单细胞生物中也发现了胰岛素的结合位点。按照生物大分子结构功能与进化关系的一般观点,功能上不太重要的分子或分子中的某些部分在进化过程中会发生较多的变异。所以胰岛素受体在信息传递中的作用可能比胰岛素更重要。一些激素的 Spillover 现象是,当体内某种激素浓度过高,并与自己的受体达到饱和结合后,多余的激素可以以较低的亲和力与另一些有关激素的受体发生作用,结果导致那些激素的生物效应。这可能是起着某种调节作用,但也常常引起某种内分泌疾病。由此看来,生物效应的信息似乎更可能是在受体内。但是否可以完全排除激素分子、胰岛素分子也含有一定的信息呢?胰岛素生物功能的信息贮存、启动释放以及表达等问题都有待于今后的深入研究。

## 六、胰岛素分子的进化和功能

生命进化到高等的脊椎动物才有特化的内分泌腺分泌激素,胰岛素是胰脏  $\beta$  细胞分泌的一种激素。但是近年来的研究结果对胰岛素的起源和功能的传统观点提出了挑战,

而逐渐形成所谓“激素的新理论”<sup>[67]</sup>。美国 NIH 的 Roth 小组宣布,他们打破了胰岛素仅由胰脏分泌的概念,他们在大鼠的胰脏外组织,如肾、骨骼肌、脾、肺、睾丸、小肠、肝、脂肪,甚至中枢神经系统中都鉴定到“胰岛素物质”的存在<sup>[68]1)</sup>。这种胰外胰岛素的总量约为机体全部胰岛素的 5%,其浓度为胰脏胰岛素的万分之一,但却是血液胰岛素浓度的 5—100 倍。最重要的是他们发现胰外胰岛素的量保持相当稳定,不受循环胰岛素量变化的影响。因此认为胰外胰岛素并非来源于胰脏胰岛素,而是一种独立的胰岛素。几乎所有的细胞都有合成少量胰岛素的能力。这是关于胰岛素的来源和分布的一个非常重要的新的提法。当然目前对此还有激烈的争论,不管怎样,它是胰岛素研究领域中出现的一个新动向。目前推测胰外胰岛素不象是调节糖代谢作用,可能更象是与刺激生长有关,或是一种神经递质,与神经传导神经调节有关。

Roth 小组为探讨胰岛素的起源,在一系列进化程度不同的有机体中检测胰岛素物质。现在他们又进一步打破了胰岛素仅由脊椎动物所有的概念,在节肢动物、环形动物、软体动物、腔肠动物,甚至真菌、单细胞的原生动物的四膜虫(*Tetrahymena*)中都鉴定到“胰岛素物质”。最近他们又在大肠杆菌 *E. coli* K 12 原核细胞中鉴定到“胰岛素物质”<sup>[69]</sup>,这样便把胰岛素的起源推到 20—30 亿年之前。为系统地探讨胰岛素的起源和功能,Roth 小组继续在原生动物中寻找其他的多肽激素,现在有初步正结果的激素包括促肾上腺皮质激素和其前体、 $\beta$ -内啡肽和它的前体、生长激素释放抑制因子、降血钙素、胰高血糖素、精氨酸催产素等<sup>[67]</sup>。

这些崭新的发现大大增加了人们对有机体信息系统的起源、发生、发展和进化的认识。在单细胞生物发现具有胰岛素活性的物质以及其他类似激素的物质的事实,说明承担细胞间的信息传递的物质起源于细胞内的起生长调节作用的物质。前面提到的胰岛素本身具有生长因子活性也正好说明这一点。过去人们曾经为高等动物脑细胞具有专一的结合某些植物碱,如吗啡的受体这一事实而迷惑不解,随着脑啡肽、内啡肽等物质的发现,已经有证据表明,虽然吗啡和这些神经肽的化学结构很不相同,但与受体结合的部位却有相似之处。可以设想它们也都是从同一远祖物质进化而来。这些发现还促进人们对激素和组织因子的关系、内分泌和外分泌的关系、内分泌系统和神经系统的关系、肿瘤与内分泌的关系,甚至动物和植物、真核和原核生物的生长调节因子之间的关系等等进行新的研究和讨论。同时也为生物大分子结构与功能的研究开辟了比以往更加广阔的领域。

## 参 考 文 献

- [1] Ryle, A. P. *et al.*, *Biochem. J.*, **60** (1955), 541—556.
- [2] Blundell, L. T., *et al.*, *Nature*, **231** (1971), 506—511.
- [3] Peking Insulin Structure Research Group *Sci. Sin.* **17**, (1974), 752—788.
- [4] Brandenburg, D., *In Perspectives in Peptide Chemistry*, Editors: Eberle, A.; Geiger, R.; Wieland, T., pp. 88—100, Karger, S., Basel, 1981.
- [5] Blundell, L. T., *et al.*, *Nature*, **257** (1975), 197—203.
- [6] 张耀时等, *生物化学与生物物理学报*, **15** (1983), 511—516.

1) 根据胰岛素的物化性质和生物学性质确定的一组六个指标同时符合,鉴定为“胰岛素物质”或“比任何其他已知的物质更象胰岛素的物质”: (1) 用与从胰脏提取胰岛素相同的酸乙醇法可以提取得到。(2) 在 Sephadex G-50 中的色谱行为与胰岛素相同。(3) 有胰岛素特异的免疫活力。(4) 与胰岛素受体有特异结合。(5) 具有胰岛素生物活力。(6) 其生物活力可被胰岛素抗体中和。

- [7] 许英镐等, 科学通报, **27** (1982), 1142—1143.
- [8] 张耀时等, 中国科学, **8** (1981), 1009—1012.
- [9] Brandenburg, D., et al., In Sheppard, R. C. (Senior Report), Amino Acid, Peptides, and Proteins, 431—451, 1979.
- [10] Katsoyannis, P. G., et al., In Structural Studies on Molecules of Biological Interest. Eds. Dodson, G. G., et al., Clarendon Press Oxford, 454—486, 1981.
- [11] Blundell, L. T., et al., *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **13** (1982), 141—213.
- [12] Roth, J., et al., *Rec. Prog. Horm. Res.*, **31** (1975), 95—139.
- [13] Liang, D. C., et al., *Biochemical Society Transactions*, 600th Meeting, Oxford. **11** (1983), 419—425.
- [14] Shoelson, S., et al., *Nature*, **302** (1983), 540—543.
- [15] Wollmer, A., et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **362** (1981), 581—591.
- [16] Olefsky, J., et al., *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 6098—6105.
- [17] Gattner, H. G., et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361** (1980), 1135—1138.
- [18] Tager, H., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77** (1980), 3181—3185.
- [19] Shoelson, S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 7390—7394.
- [20] Rösen, P., et al., In *Insulin: Chemistry, Structure, and Function of Insulin and Related Hormones*, Brandenburg, D. and Wollmer, A., Eds., Walter de Gruyter and Co., Berlin, 403—408, 1980.
- [21] Geiger, R. et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361** (1982), 563—570.
- [22] Geiger, R., et al., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361** (1982), 1231—1239.
- [23] Schiller, P. W. et al., *J. Protein Chem.*, **2** (1983), 279—287.
- [24] Blundell, T. L., et al., *TIBS* **4** (1979), 51—54.
- [25] Wang, C. C. *Sci. Sin.*, (B), **28** (1985), 19—27.
- [26] Dodson, G. G., et al., In *Insulin: Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones*. Brandenburg, D. and Wollmer, A., Eds., Walter de Gruyter and Co., Berlin 1980, pp. 17—26.
- [27] Olefsky, J. M., *Biochem. J.*, **172** (1978), 137—145.
- [28] Rodbell, M. J. *Biol. Chem.*, **239** (1964) 375—380.
- [29] Moody, A. J. *Horm. Metab. Res.*, **6** (1974) 12—16.
- [30] Rechler, M., et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **39** (1974), 512—521.
- [31] Cuatrecasas, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68** (1971), 1264—1268.
- [32] Freychet, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68** (1971), 1833—1837.
- [33] Kahn, C. R., et al., *J. Clin. Invest.* **60** (1977), 1094—1106.
- [34] Gliemann, J., et al., *Diabetologia*, **10** (1974), 105—114.
- [35] Gammeltoft, S., et al., *Acta Physiol. Scand.*, **91** (1974), 9 A—8 A.
- [36] Pullen, R. A., et al., *Nature*, **259** (1976), 369—373.
- [37] Emdin, S. O., et al., *J. Biol. Chem.*, **252** (1977), 602—608.
- [38] Willey, K. P., et al., In *Insulin: Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormones*. Brandenburg, D. and Wollmer, A., Eds., Walter de Gruyter and Co., Berlin, 1980, pp. 425—431.
- [39] Burke, G. T., et al., *Biochemistry*, **19** (1980), 4547—4556.
- [40] Rösen, P., et al., *Biochem. J.*, **186** (1980), 945—952.
- [41] Horuk, R. et al., *Nature*, **286** (1980), 822—824.
- [42] Schwartz, G. P., et al., *Biochemistry*, **22** (1983), 4561—4567.
- [43] Sakabe, N., et al., In *Proinsulin, Insulin, C-Peptide*, Baba, S., Kaneko, T. and Yanai-hara, N., Eds., Excerpta Medica, Amsterdam, 1978, pp. 73—80.
- [44] Chang, W. R., et al., In *Thirteenth International Congress of Crystallography*, C-16, 01. 5-5, 9-18 Aug. 1984, Hamburg.
- [45] Fujita-Yamaguchi, Y., et al., *J. Biol. Chem.*, **258** (1983), 5045—5049.
- [46] Yip, C. C., et al., *Biochemistry*, **19** (1980), 70—76.
- [47] Pilch, P. F., et al., *J. Biol. Chem.*, **254** (1979), 3375—3381.
- [48] Lang, U., et al., *Biochemistry*, **19** (1980), 64—70.
- [49] Roth, R. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79** (1982), 7312—7316.
- [50] Jarett, L., et al., Insulin action mediated by plasma membrane components. In *The Adipocyte and Obesity: Cellular and Molecular Mechanism*. Angel, C. A.; Hollenberg, C.; Roncare, D. eds. New York, Raven Press, 1983.
- [51] Gorden, P., et al., *Diabetologia*, **18** (1980), 263—274.

- [52] Kasuga, M., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 2137—2141.
- [53] Clark, S., *et al.*, 2nd International Symposium on Insulin Receptors, Receptor Interaction and Insulin. Action. Abstracts of Reports., p. 16, 1983.
- [54] Kahn, C. R., *et al.*, *Rec. Prog. Horm. Res.*, **37** (1981), 477—538.
- [55] King, G. L., *et al.*, *Nature*, **292** (1981), 644—646.
- [56] Zhang, Y. S., *et al.*, *Biochemical Society Transaction 600th Meeting, Oxford*, **11** (1983), 417—419.
- [57] Blundell, L. T., *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362** (1981), 727—733.
- [58] King, G. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 1308—1312.
- [59] Massague, J., *et al.*, *Diabetes*, **29** (1980), 945—947.
- [60] Kasuga, M., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 10392—10399.
- [61] Wang, C. C., *et al.*, *Diabetes*, **31** (1982), 1068—1076.
- [62] Crettaz, M., *et al.*, 2nd International Symposium on insulin receptors, Receptor interaction and insulin action, Abstracts of Reports., p. 11, 1983.
- [63] King, G. L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **66** (1980), 130—140.
- [64] Lawrence, J. C., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **253** (1978), 2104—2113.
- [65] Roth, J., *et al.*, *In Textbook of Endocrinology*, ed. Williams, R. H. pp. 15—74, Philadelphia: Saunders, W. B., p. 1270 1981.
- [66] Muggeo, M., *et al.*, *Endocrinology*, **104** (1979), 1393—1402.
- [67] Kolata, G., *Science*, **215** (1983), 1383—1384.
- [68] Rosenzweig, J. L., *et al.* *Adv. Physiol. Sci.*, **13** (1981), 175—186.
- [69] LeRoith, D., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 6533—6536.
- [70] Ullrich, A., *et al.*, *Nature*, **313** (1985), 756—761.
- [71] Fbina, Y., *et al.*, *Cell.*, **40** (1985), 747—758.
- [72] Cherqui, G., *etal.*, *Biochem. J.*, **227** (1985), 137—147.



# 遗传工程技术用于细菌性腹泻疫苗研究的评述

黄翠芬

(军事医学科学院基础医学研究所)

## 一、腹泻病原菌致病机理

1. 对宿主细胞的吸附能力
2. 产生肠毒素
3. 菌体表面抗原成分

## 二、常用的腹泻预防疫苗

## 三、用遗传工程技术研究腹泻疫苗的进展

1. 大肠杆菌菌毛基因克隆
2. 肠毒素的基因克隆
3. 复合疫苗

预防腹泻疫苗的研究,在充分了解病原菌各种致病因子的分子构成、免疫原性、基因位置等基础上,采用DNA体外重组及体内重组技术,使各种有效成分组合在一起,将构成崭新的预防免疫制剂。本文重点介绍肠毒原性大肠杆菌和霍乱弧菌致病因子的分子遗传学研究以及其免疫制剂研究的进展。

致病性微生物引起人、畜腹泻至今还是个世界性的问题,在发展中国家的发病率仍然相当高,在我国的传染病中,腹泻仅次于肝炎而居第二位。亚洲、非洲等地流行,特别在婴幼儿中常见。发达国家的旅行者腹泻也时有发生。家畜腹泻是常见病,猪、牛、羊等幼畜由于腹泻而死亡或发育不良,使经济蒙受严重损失。长久以来,主要采用疫苗免疫,有一定预防效果,但疫苗质量有待改进。

七十年代以来,由于分子遗传学理论和技术的发展,人们对致病因子的基因结构、调节控制、产物的结构与功能,致病机理、毒力和免疫力的关系等的认识逐步深化,使应用DNA重组技术于新疫苗菌株的构建成为可能。

人类腹泻由于痢疾病原菌所引起的病例约占一半左右,但痢疾菌型复杂,遗传背景不清楚,分子遗传学的研究刚刚开展,一时不易说明。目前肠毒性大肠杆菌(简称ETEC)和霍乱弧菌的遗传知识已相当丰富,致病性与免疫关系相当明确,本文将以此两种病原菌为例,评述用分子遗传学的理论与技术于疫苗菌株构建方面的进展。

## 一、腹泻病原菌致病机理

引起腹泻的病原菌种类很多,包括细菌、病毒、原虫等等。细菌性腹泻除痢疾菌为主要病原菌外,其他以ETEC和霍乱菌为常见。ETEC是旅行者腹泻及婴儿腹泻的主要病因之一,由于临床检验手段缺乏,国内报道尚少,其他发展中国家报道ETEC引起的腹泻在50%左右。霍乱弧菌是引起霍乱的病原菌,1917年以来世界性大流行达七次之多。早期引起流行的致病菌属经典生物01型霍乱菌,1960—1982年属埃尔托生物型(称副霍乱菌),1982年以来又再出现以经典生物型为主要致病菌。ETEC和霍乱弧菌引起的腹泻属

水样性腹泻,与痢疾杆菌引起的脓血样腹泻有别。这两种细菌的致病力与下诸因素有关:

### 1. 对宿主细胞的吸附能力<sup>[1]</sup>

细菌首先要能在肠壁细胞吸附定居才能致病。ETEC等细菌表面有菌毛(亦称粘附素、定居因子、纤毛等),属细菌表面的K抗原,使细菌粘附于小肠粘膜细胞,在其上面繁殖。正常情况下,与大肠不同,小肠蠕动是连续的,能将食物及摄入的细菌连续排除,细菌很难有机会在小肠繁殖。当细菌例如ETEC,肠毒素(Ent)及菌毛(K88)同时存在时,侵入细菌就可以粘附于小肠而繁殖,释出肠毒素至其靶组织而致病。很明显,含Ent<sup>+</sup>K88<sup>-</sup>或Ent<sup>-</sup>K88<sup>+</sup>的细菌不引起腹泻(见表1),只有同时存在才致病(也有少数例外)。

表1 含K88及Ent质粒的大肠杆菌(*E.coli*)对仔猪腹泻的影响

质粒	K88 <sup>-</sup>	K88 <sup>+</sup>
Ent <sup>-</sup>	无影响	轻度腹泻(33%)
Ent <sup>+</sup>	无影响	严重腹泻(89%)

现已发现大肠杆菌粘附素有多种,即引起猪腹泻的K88、987P(有时尚有K99)粘附素;引起牛、羊腹泻的K99粘附素;引起人类腹泻的CFA I、CFA II、E8775粘附素等等,还陆续有新的粘附素发现。这些粘附素的基因除987P未确定外,均由质粒携带。当粘附素质粒丢失后,细菌即不致病。例如人致病性大肠杆菌H10407菌株为CFA<sup>+</sup>,当成为H10407P(CFA<sup>-</sup>)菌株时,致病性丧失(偶亦有CFA<sup>-</sup>LT<sup>+</sup>能致病的报道)。CFAI的抗原性均一,CFA II含三种抗原成分(CS1,CS2,CS3),导致产生不同的生物型。

至于粘附素具宿主特异性问题,其原因与受体的有无相关,若宿主细胞无相应的受体,细菌即不能粘附。

纯化粘附素的免疫效果是良好的,在家畜方面,K88、K99和987P等疫苗预防猪、牛、羊幼畜腹泻十分重要;CFA纯化抗原用于动物免疫试验,抗体的产生亦甚良好,但需同源免疫才有效。实际情况是大肠杆菌的菌株,至今尚未发现同时含有CFA I和CFA II两种粘附素的,如要制备同时含有CFA I和CFA II的疫苗,只有通过DNA重组才有可能。

致病性霍乱弧菌具鞭毛,能运动;不具鞭毛的霍乱弧菌无毒力<sup>[2]</sup>,但鞭毛与致病性的分子关系目前尚不清楚。霍乱菌侵入肠道后,粘附于小肠,约5小时即粘附很牢,10小时后菌体脱落,但肠细胞表面受严重腐蚀。霍乱菌能粘附于肠壁估计是个多因素的过程,包括其运动性,细菌表面与宿主肠道表皮细胞微管的直接相互作用,可溶性血凝素-蛋白酶的媒介作用及脂多糖的特性等,目前还未发现霍乱弧菌有菌毛。

### 2. 产生肠毒素<sup>[3]</sup>

霍乱弧菌和ETEC在小肠粘膜细胞定居后产生肠毒素,这些肠毒素的结构、功能及生物活性已有充分的研究。霍乱弧菌肠毒素简称CT,是霍乱症的主要致病因子。大肠杆菌肠毒素有LT和ST两种。LT为elt基因所编码。LT指对热敏感的肠毒素,加热60℃30分钟即失活,属大分子蛋白质,具抗原性。猪源大肠杆菌的LT(LT-P)与人源大肠杆菌的LT(LT-H)不完全相同<sup>[4]</sup>,但很近似,其核苷酸序列有96%同源,酶切图谱完全相同,只是

片段的大小略有差异,毒素旁侧的 DNA 序列有较大差别,两种来源的毒素的毒力和作用方式相同。ST 为耐热肠毒素<sup>[6,8]</sup>,能耐受 100℃10 分钟的高温,是小分子多肽。对人致病的大肠杆菌的 ST 可溶于甲醇,能使乳鼠肠积水,称 ST-H、STA 或 STI。从猪分离的 ST 不溶于甲醇,在乳鼠肠内不引起积水,只使猪肠积水,称为 ST-P、STB 或 ST II。ST-H 与 ST-P 的 DNA 序列有 69% 同源。其差异是核苷酸的取代而非缺失或插入,从基因序列分析,认为两种基因有一定的进化关系。ST 由于分子量小(1,972),无免疫原性,只能作为半抗原。使人腹泻的 ETEC 菌株也常含有 ST,但致病性较 LT 为轻。ST-H 由 10 个不同氨基酸组成,排列成 18 个氨基酸序列,即 Asn—Thr—Phe—Tyr—Cys—Glu—Leu—Cys—Cys—Tyr—Pro—Ala—Cys—Ala—Gly—Cys—Asn,现已人工合成。人工合成的 ST-H 与细菌产生的 ST 免疫活性相同。

肠毒素大肠杆菌 LT 和 ST 的生物学活性见表 2。

表 2 肠毒素大肠杆菌 LT 及 ST 的生物学活性

性 质	LT	ST
分子量	86,500	1,000—6,000
加热失活	60℃ 30'	100℃ 10'
感染后产生抗毒素	+	-
刺激肠细胞酶	腺苷酸环化酶	鸟苷酸环化酶
基因位置	质粒	质粒

LT 含两种毒素基因(toxA、toxB)<sup>[7,8]</sup>,旁侧有重复序列(称 $\beta$ )。编码 ST 的基因(toxS),旁侧也有反向重复序列(称 $\alpha$ ),位于其中一个 $\beta$ 及 LT 区之间。Yamamoto(山本)建议肠毒素的 DNA 结构为 $\beta$ - $\alpha$ -toxS- $\alpha$ -toxA-toxB- $\beta$ ,认为 LT 区在转座子上,而 ST 也属转座子,位于 LT 转座子之内。肠毒素具转座子性质,对其进化上的意义是很值得研究的。

CT 与 LT 肠毒素由 A 和 B 亚基构成。A 亚基经蛋白酶水解又分为 A<sub>1</sub>(分子量 22,000)与 A<sub>2</sub>(分子量 5,000),B 部分含 5 个相同的亚基(分子量 5×11,600)(见图 1)。

A<sub>2</sub> 使 A<sub>1</sub> 与 B 亚基连接构成三维结构,B 亚基有亲水性,与细胞外膜神经节苷酯(GM1)或糖蛋白受体结合后,分子构象改变,释出 A<sub>1</sub>。A<sub>1</sub> 具酶的性质,为毒素疏水部分,脂溶性,得以穿过双层细胞膜达到内膜,作用于肠细胞内膜的腺苷酸环化酶,激活此酶,使 ATP 分解为 cAMP 及无生物功能的焦磷酸,在胞内积聚,量大增,改变细胞膜的通透性及 Na<sup>+</sup>、

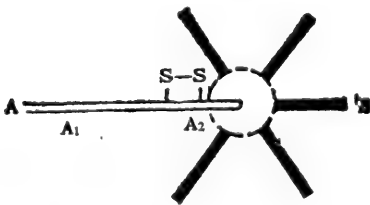


图 1 肠毒素 A、B 亚基结构示意图

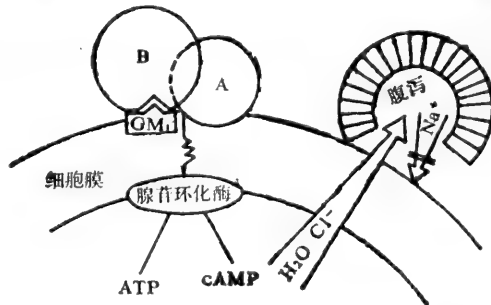


图 2 CT 和 LT 致病作用

K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 等电解质的平衡,细胞内外水分和电解质失调,导致机体产生水样腹泻,这是 CT 和 LT 共同的致病特征。CT 和 LT 作用示意如下(见图 2)。由于毒素亚基的转录顺序从 A 至 B,这就有可能用分子遗传学技术除去 A 基因片段(毒性部分),而保留 B 基因片段(无毒,具免疫原性)。如将 B 亚基基因克隆,提高其表达水平,将成为很好的类毒素。

CT 与 LT 的结构十分近似。Yamamoto 将各毒素的 B 亚基进行了详细分析<sup>[9]</sup>,从 B 亚基基因序列推算其氨基酸序列,认为 LT-H、LT-P 及 CT 含 103 个氨基酸,从核苷酸水平比较有 98% 同源,从氨基酸比较有 95% 同源,指出这些基因可能来自共同的祖先。从免疫学分析,各毒素除共同抗原簇外,各有其独特的抗原决定簇,并且这三种毒素的等电点也不相同。

Yamamoto 比较 LT-H、LT-P 和 CTB 亚基的氨基酸序列(见图 3):

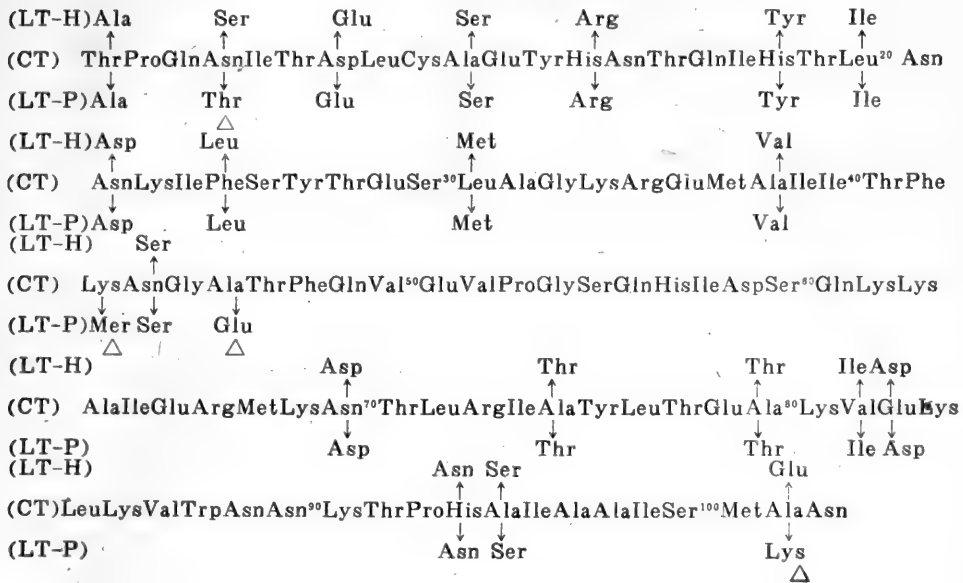


图 3 LT-H、LT-P 及 CT B 亚基氨基酸序列比较氨基酸从 NH<sub>2</sub> 端开始,△表示 LT-H 及 LT-P 亚基之间氨基酸残基的差别

从上述氨基酸序列比较,这三个 B 亚基间有几个共同序列是保守的。例如从 47—69 序列(23 个氨基酸,为总氨基酸的 22%)是最长的共同部分,可以认为这部分与 B 亚基生物功能有关。另一共同性较多的位置是 84—93(10 个氨基酸),其他一些部分少于 6 个氨基酸。估计这些相似的序列与这三种亚基的抗原决定簇共同性有关。

LT-H、LT-P 及 CT 的 B 亚基各具自身独特的抗原决定簇。例如 LT-H 及 CT 存在某些结构是共同的,但不存在于 LT-P;另外,有一些结构 LT-H 和 LT-P 是共同的,而在 CT 中没有。将上图氨基酸序列详细比较,可以看到 LT-H(B 亚基)独有的抗原决定簇至多只需两个氨基酸(4 位的 Ser 和 102 位的 Glu)改变。以 B 亚基而言,LT-H 及 LT-P 各与 CT 有 81% 及 79% 同源(LT-H 及 LT-P 有 96% 同源),假如毒力的表达与宿主特异性有关,则 Lys(43 位)或 Ala(46 位)的序列(只在 LT-H 及 CT 中有)将是人肠道中 LT-H 及 CT B 亚基功能的所在,对考虑组构免疫制剂是有启迪意义的。

LT 和 CT 在免疫上有交叉中和作用<sup>[10]</sup>,在家兔肠结扎试验及免疫琼脂双扩散试验中均得以证明。同样,将 CT-A 与 LT-B 或 CT-B 与 LT-A 亚基经化学结合(carbodiimide)后,仍呈现毒性反应。更有意思的是,将 LT 转入霍乱弧菌 569 B 株,能使霍乱菌 569 B (pCG 86)产生 LT 和 CT 两种肠毒素。一般大肠杆菌产生的 LT 是胞内的,分泌至胞外的 LT 少于 10%,而在 569 B(pCG 86)菌株中,所合成的 LT 却大部分分泌至胞外,说明 LT 的分泌受霍乱菌突变株影响,改变了分泌 LT 的能力,但突变株对 CT 合成的控制对 LT 的产生无影响,说明 LT 和 CT 在霍乱菌中分泌作用的途径是共同的,但其生物合成的调控作用是不同的。

### 3. 菌体表面抗原成分

人大肠杆菌致病原除肠毒素表型和 K 抗原粘附素外,尚与 O:H 血清型有关(O 指表面抗原,H 指鞭毛抗原,O:H 指 O 血清型与 H 血清型的组合)。O 血清型有 06,08,015,020,025,063,078,0115,0128,0148 及 0159。O 血清型的 H 有一定范围。例如,H 16 型为 06;H 11 及 H 12 为 078;H 28 为 0148,不同血清型的菌株常属地区性,在某特定地区流行的往往为特定的血清型。LT 及 ST 质粒的稳定性与 O:H 有关,有些 O:H 的组合特别稳定,并且与 LT、ST 及粘附素也有一定的联系。因此,在构建疫苗株时,这些因素都要考虑。比较理想的应该是采用地区流行菌株作材料(特别选择同血清型)进行适当的组合,以提高免疫效果。

## 二、常用的腹泻预防疫苗

人们长久以来已知用疫苗预防传染病。Koch 1883 年发现霍乱的致病菌后一年即开始研究其预防疫苗,至今已一百多年仍未完美解决。过去制备的疫苗处理方法粗糙。例如将霍乱弧菌用石炭酸处理或加热杀死后即作免疫注射使用。这些疫苗副作用大,免疫期限短,免疫效果弱。另外,也研究用化学、物理或生物因素诱变。使病菌毒力减弱而制成弱毒疫苗,副反应仍大,但免疫效果略佳,属于多位点突变,是否毒力基因已改变不能肯定,从理论上说有返祖的可能,因而弱毒疫苗的使用须十分慎重。由于蛋白质研究技术的发展,六十至七十年代多侧重类毒素的研究和使用。用甲醛、戊二醛等处理毒素,使其脱毒而保留免疫原性,例如破伤风类毒素,效果很好。但霍乱毒素及大肠菌毒素在处理毒性较弱,同时抗原性破坏严重,制成的类毒素免疫效果不好。在此时期内,纯化抗原(有谓化学抗原)性物质以制备预防疫苗的研究很多,虽然安全性好,但免疫原性都不理想。七十年代初,遗传工程技术问世,为研制新的疫苗开辟了途径。

## 三、用遗传工程技术研究腹泻疫苗的进展

传染性腹泻的传播途径是消化道,其发病机理已如上述,是多种致病因子综合作用的结果。因此,新预防疫苗的构建,就应根据这些规律来考虑。例如抗粘附作用、抗肠毒素作用等等,还须注意细胞表面各种型特异的抗原成分。要将这些因素组合在一起,获高效、抗性广(抗菌、抗毒素)、副作用小的疫苗菌株,只有采用 DNA 重组技术,将其有效抗原基

因通过体内或体外重组才有可能,这样构建的新疫苗菌株是过去的疫苗所无法比拟的,是新疫苗发展的方向。

从免疫途径看,腹泻预防疫苗应以口服活疫苗为理想。近来研究证明,分泌免疫球蛋白 IgA 是肠道粘膜免疫防御的第一道防线,要使粘膜 IgA 反应的最好方法是用抗原直接刺激肠道粘膜表面,例如用菌毛抗原、肠毒素抗原,经口服通过消化道,就能达到这个目的,产生局部免疫。

下面将分别介绍用遗传工程技术进行菌毛基因和肠毒素基因克隆的一些例子,并讨论复合疫苗制备的可能性。

### 1. 大肠杆菌菌毛基因克隆

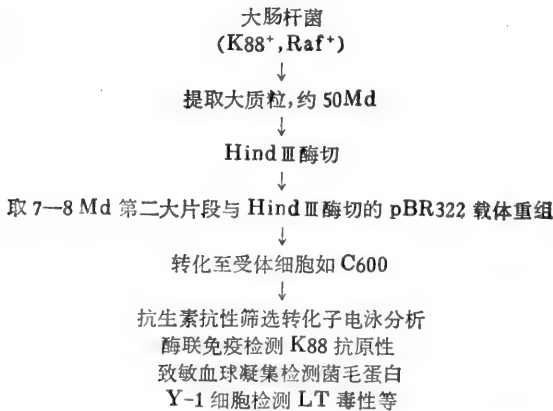
这里将介绍猪源大肠杆菌菌毛 K 88,牛源大肠杆菌菌毛 K 99,人源大肠杆菌菌毛 CFA 基因克隆研究的情况。

#### (1) ETEC K88 抗原基因克隆<sup>[11]</sup>

ETEC K 88 抗原有三种血清型,即 K 88<sub>ab</sub>、K 88<sub>ac</sub>、K 88<sub>ad</sub>,在我国流行的以 K 88<sub>ac</sub> 为主。一般说来,腹泻仔猪分离出的大肠杆菌只要能发酵棉子糖的,就是大肠杆菌 K 88 阳性株,因为 K 88 抗原基因与棉子糖发酵基因同在一个质粒上,两个基因并不紧密连锁,被约为 20 Md 的一段 DNA 所分隔,可用棉子糖(Raf<sup>+</sup>)的 MacConkey 鉴别培养基来检测是否有 K 88 抗原。Schmidt 等发现 K 88 基因与 raf 基因两侧有直接重复序列 IS 1,依赖 recA 重组而移位,并提出这种利用棉子糖合成的细胞壁能抵抗吞噬作用,增强细菌的适应能力。

Shipley 认为 K 88 抗原常为一个分子量 50 Md 的质粒所编码,K 88 抗原虽然有三种不同的血清型,但其质粒 DNA 至少有 97% 的核苷酸同源,三者的酶切图谱也十分近似,用 Hind III 酶解,可切成 13—14 个电泳片段,所含 7—8 Md 的第二大片段是编码 K 88 抗原的定子。

K 88 三种血清型的抗原基因均已分别克隆成功,其过程与一般基因克隆技术相同,大体流程如下:



转化子一般是不多的,在 K 88 抗原的产量上强弱有别。例如从 K 88<sub>ab</sub> 质粒 pRI 8801

所得到的基因克隆转化子,有的抗原产量强,有的产量弱。作电泳分析,发现两者的区别在于与 pBR 322 连接的方向相反,说明这些重组子中 K 88 表达的水平取决于基因组入的方位。取 pFM 38,是 H<sub>2</sub> 和 pBR 322 的重组子,K 88 表达水平低,用 Hind III 酶切后重新连接,得到两种质粒,低水平表达的组入方向同 pFM 38,高水平表达的恰与之相反(从 BamH I 酶切片段长短分析),命名为 pFM 200(见图 4)。用酶联免疫测定(半定量)K 88<sub>o</sub> 的效价,pFM 38 < 2, pFM 200 为 256,后者为野生型 pRI 8801 的四倍(pRI 8801 为 64)。这两个重组子已无 raf 基因的存在,不发酵棉子糖。为进一步了解在 H<sub>2</sub> 片段内 K 88 基因的精确位置,用 EcoR I 切割两个重组子后再连接,得到几个不同 EcoR I 片段缺失的质粒,经测定只有缺失 3.4 Md 片段的 pFM 205 表现为 K 88 阳性(见图 4),其抗原产量同 pFM 200,因而认为此 Hind III—EcoR I 片段包含有完整的 K 88<sub>o</sub> 基因。

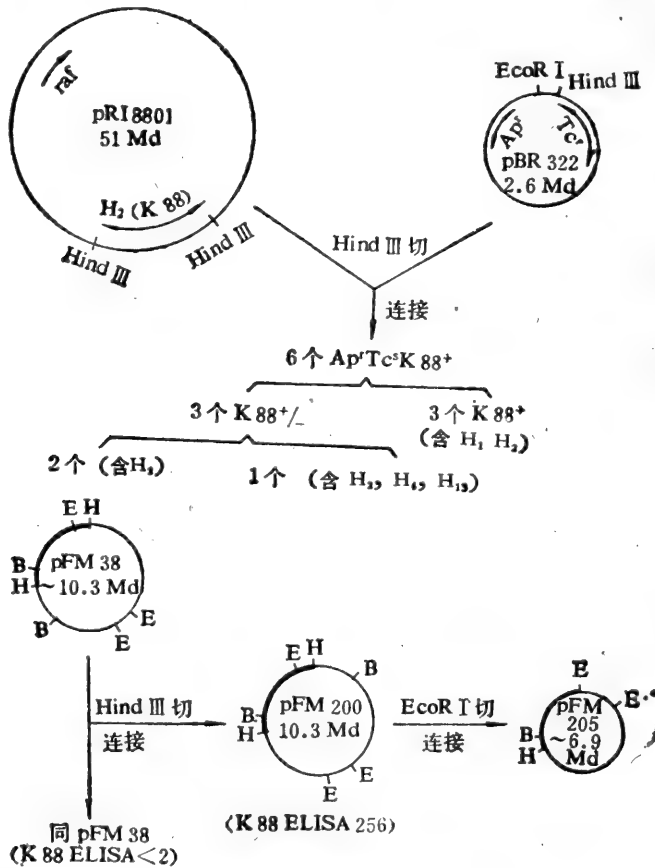


图 4 含 K88<sub>o</sub> 基因的质粒研究示意图

## (2) K 99 基因克隆<sup>[12]</sup>

从自然界分离的含 K 99 基因和 Str<sup>r</sup> 基因的质粒 pRI 9901,分子量为 57 Md,被 Hind III 切割为 13 个以上的片段。van Embden 等用 DNA 体外重组技术将 pRI 9901 的 Hind III 切割片段与载体 pBR 322 连接,筛选得到产生 K 99 抗原的重组子 pRI 9902,它含有 pRI 9901 的约 11 Md Hind III 片段(见图 5)。用 BamH I 酶切 pRI 9902 DNA,然后与 pBR 325 连接,得到表达为 K 99 阳性的次克隆,酶切分析说明含有来自 pRI 9902 的



4.5 Md BamH I 片段。用 EcoR I 与 Xba I 双重酶切,证明重组子 pRI 9906-1 与 pRI 9912-1 的连接向位相反(见图 5),但 K 99 的表达水平是一致的,都比野生型 pRI 9901 的 K 99 产量高 16 倍,这一点与 K 88 表达的情况是不同的。用在 4.5 Md BamH I 片段内有 4 个切点的 Hpa I 构成若干 DNA 缺失株,无一能表达为 K 99 阳性者, BamH I 的 4.5 Md 是目前得到的含 K 99 完整基因的最小片段。含 K 99 基因重组质粒与自然质粒的菌株在血清学、吸附能力、形态特性等方面均无差异。重组质粒在 *E. coli* K-12 菌株中的表达水平较低,可能是因宿主菌特性所致,在肠毒素的研究中也观察到这一点。Graaf 等测定了 K 99 基因的核苷酸序列,与 K 88 相同,其亚基的合成亦先有一个前体,有一个信号肽段。

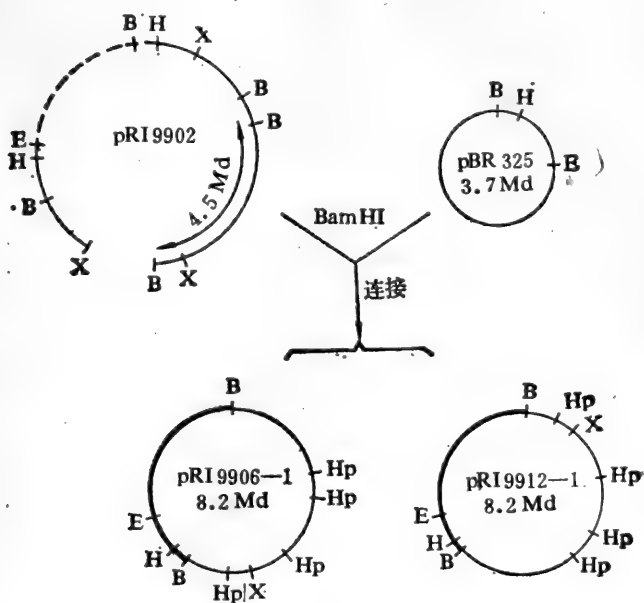


图 5 K99 基因研究示意图  
B-BamH I E-EcoR I H-Hind III Hp-Hpa I X-Xba I

### (3) CFA I 的基因克隆<sup>[13]</sup>

CFA I 基因常与编码耐热肠毒素(ST)的 DNA 在同一质粒上,是一个非接合转移、分子量在 60 Md 左右的质粒,当自发失去质粒时则一起丢失两个表型。从腹泻患者分离的菌株中得到一编码 CFAI 与 ST 的质粒 NTP 113,分子量为 58 Md。Smith 等用内切酶切割得知质粒有 17 个 Hind III 位点, 9 个 EcoR I 位点, 3 个 BamH I 位点(见图 6)。用转座子研究 CFA 基因的位置,发现质粒中两个区域为表达 CFA II 所必需,任何一个区域被转座子插入或造成缺失都不产生 CFA I。图 6 中的突变株 NTP 121、NTP 127、NTP 128、NTP132 和 NTP 137 都不产生 CFA I,即 H4 与 H8 两区域缺一不可,两者被分子量为 25Md 左右的一段 DNA 所隔开,因之合成与调控也较复杂。这可能是至今尚未得到分子克隆、研究上较困难的原因之一,所以目前对此粘附素了解还不很多(1685 年有分子克隆成功的报道)。

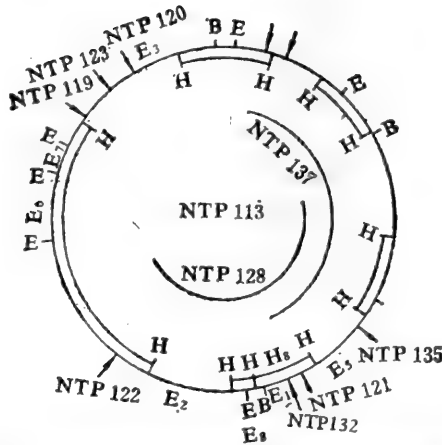


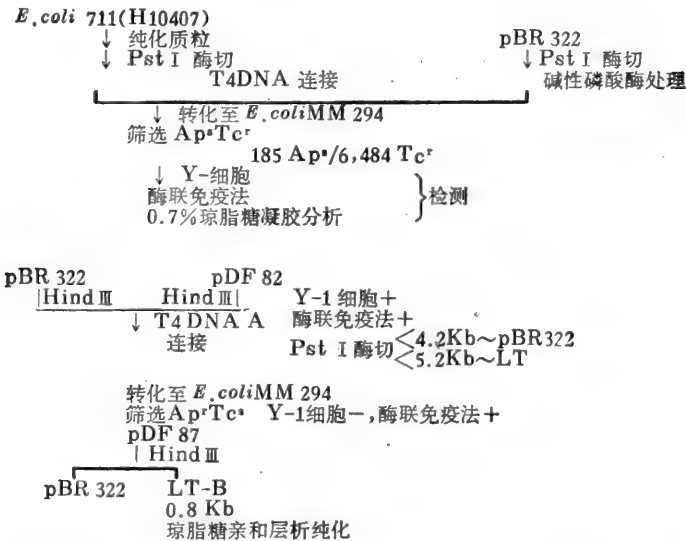
图6 质粒NTP113的酶切位点及转座子插入突变与缺失突变株位置  
 B、E、H分别为BamHI, EcoRI, HindIII的切割位点。  
 EcoRI的片段E9位置未测出, HindIII片段只标出含B或E位点的。  
 箭头表示转座子插入位置及突变株名称。圆圈内为缺失突变株的范围。

## 2. 肠毒素的基因克隆

LT 肠毒素基因位于质粒, CT 基因位于染色体, 因此克隆方法各异, 将分别叙述如下。

### (1) LT-B 亚基基因克隆<sup>[14]</sup>

近年有多个实验室分别获得 ETEC LT-B 亚基克隆, 下面以 Clements 在 1983 年做的工作说明克隆的主要程序:



大肠杆菌 H 10407 的肠毒素质粒从 F'/tslac::Tn 5 质粒获 Km 抗性标志, 然后接合转移至 E. coli K-12 711 菌株。纯化 E. coli 711(H 10407) 质粒, 以 Pst I 酶切, 连接至 Pst I 酶切 pBR 322 载体, 重组子转化至受体菌 MM 294, 从 6,484 个 Tc<sup>r</sup> 转化子中筛选出

185 个  $Ap^r$  转化子,用 Y-1 细胞法和酶联免疫法检测为阳性的几个转化子,作 0.7% 琼脂糖凝胶分析,选含单个质粒的 pDF 82,用 Hind III 酶切,与 Hind III 酶切的 pBR 322 载体连接,重组子转化至 *E. coli* MM 294,筛选  $Ap^rTc^r$  转化子,进行检测分析,获得只含 LT-B 亚基的克隆 pDF 87,此亚基 DNA 的大小为 0.8 Kb,不含 A 亚基。Klipstein 将 LT-B 与 ST 经过碳化二亚胺(carbodiimide)反应,只要两者比率合适(ST/LT~100/1),所用试剂比例合适(10:1),反应时间在 96 小时左右,就能获得良好抗原性的结合毒素,用此结合毒素免疫大白鼠,可保护对 LT 及 ST 的攻毒。

## (2) CT 毒素基因克隆

CT 肠毒素基因位于染色体,经典生物型霍乱菌含两个 *ctx* 毒素操纵区,成不连续重复序列排列;E I Tor 型霍乱菌中,70% 含单拷贝 *ctx*,其余含两个或多个拷贝 *ctx*,成连续重复序列排列。可采用噬菌体诱变方法<sup>[15]</sup>,引起毒素基因的缺失或仅引起 A 亚基基因的缺失。霍乱菌含 VcA I 温和噬菌体,其性质有如大肠杆菌的  $M\mu$  噬菌体,能作用于 DNA 上许多部位,当其插入至 E I Tor 霍乱弧菌 RV 79 *ctx* 操纵区时,可使毒素基因的某些部分缺失,经过筛选,获得了  $A^-B^-$  和  $A^-B^+$  的突变株,但未见动物试验的报道。

近年 Kaper 和 Mekalanos<sup>[16,17]</sup>分别发表了他们结合细胞内重组和 DNA 体外重组的技术,获得了霍乱弧菌无毒株。方法是先在体外把部分缺失毒素基因与质粒重组,然后将其引入霍乱弧菌野生株,通过体内交换,产生  $A^-B^-$  或  $A^-B^+$  的无毒突变株。下面以 Mekalanos 的工作为例,说明构建突变株的工作步骤(见图 7)。

a. 体外构建带有部分缺失毒素基因的质粒。从携带有肠毒素质粒的霍乱弧菌,用 Pst I -EcoR I 酶切,组成带完整毒素基因的重组质粒 pJM 17,再将之改建成 pJM 290.2 和 pJM 290.211。前者缺失 A 亚基的  $A_1$  部分,后者缺失大部分 A 和 B 亚基,中间插入了卡那霉素抗性基因( $Km^r$ ),此两质粒均保留毒素基因两端部分的 DNA 序列,作为体内交换的同源区。

b. 转移 pJM 290.211 至带有两个毒素基因拷贝的经典生物型霍乱弧菌 0395。以 0395( $Str^r$ )为受体,含 pJM 290.11 的菌株为供体,与含诱动质粒 pRK 2013 的大肠杆菌 MM 294 在 LB 平板上杂交,在合适的选择平板上筛选出 0395/pJM 290.211。

c. 从 0395 中消除 pJM290.211。根据质粒 pHI1( $Gm^r$ )与 pJM 290.211 ( $Tc^rKm^r$ )不相容,将 CSH 56/pHI1 与 0395( $Str^r$ )/pJM 290.211 杂交,在含 Sm、Km 和 Gm 的 LB 平板上筛选转移接合子,测定它们对 Tc 的敏感性。 $Str^r$ 、 $Km^r$ 、 $Gm^r$  和  $Tc^r$  的转移接合子证明已失去了 pJM 290.211, $Km$  抗性标记已通过体内交换从 pJM 290.211 转移至 0395 染色体,取代了染色体上的一个毒素基因。再如法处理,经数次培养后,可将另一个毒素基因交换掉,使两个毒素基因拷贝均缺失。

d. 消除质粒 pHI1,获得 0395-NT 菌株。

e. 诱动 pJM 290.2 至 0395-NT,通过同源交换,0395-NT 染色体上的两个抗  $Km$  标记被 pJM 290.2 所携带的仅缺  $A_1$  部分的毒素基因取代,分离  $Km^r$  菌株,再消除质粒 pJM290.2,得菌株 0395-N1。试验表明,0395-NT 是  $A^-B^-$ ,而 0395-N1 是  $A^-B^+$ 。后者表达 B 亚基的水平与亲代 0395 株相同,两个突变株均无毒性,现正进行动物免疫试验。这一工作引起了人们广泛的注意。通过诱变或缺失产生的突变株的优点是安全、稳定。在家兔

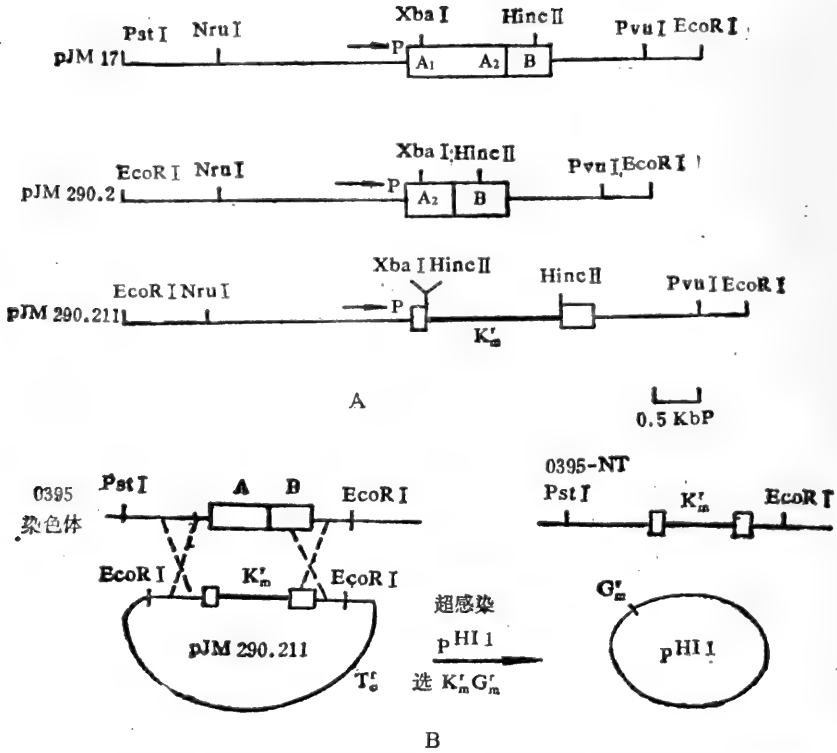


图 7 A. 质粒 pJM17, pJM290.2 和 pJM290.211 携带的霍乱毒素基因的酶切位点; B. 体内标记交换构建株 0395-NT

试验中,从粪便反复分离细菌,证明没有回复突变,也就是启示缺失发生在结构基因,丧失了编码毒素的遗传信息,但仍能在粘膜表面定居繁殖,分泌 IgA 抗体。因此,这种方法获得的突变株可作为构建疫苗的待选菌株。有些突变无毒菌株用作疫苗存在的问题是,在志愿者试验中,约有 20% 的轻度腹泻,可能除霍乱肠毒素 CT 外,尚含有其他毒素成分。

### 3. 复合疫苗

由于腹泻的致病是多因素的,因此研制复合疫苗,尽可能包含抵抗多种致病因素的成分是必要的。经试验,各种抗肠毒素及抗菌抗体单独或复合使用,对同源及异源的 ETEC 和霍乱菌都有一定保护作用<sup>[17]</sup>(见表 3、表 4)。

最近, Svennerholm 等<sup>[18]</sup>(1984)报道用霍乱弧菌灭活菌加上 B 亚基制成疫苗进行志愿者试验,与霍乱患者对比,当一次免疫后,在肠道产生局部 IgA 抗体与恢复患者的情况

表 3 不同抗 LT 制剂对各种 ETEC 及霍乱菌株在家兔肠内的保护作用

抗体制剂 <sup>a</sup>	保护作用		
	ETEC J 3-2 株	H 10407 株	霍乱弧菌 569 B 株
抗 LT(J3-2)	17 <sup>b</sup>	16.0	9.0
抗 LT(411-5)	11.0	8.0	8.0
抗 LT(286 C 2)	6.3	7.5	未试

a. 家兔免疫血清稀释至~1,000 倍,与同源肠毒素进行 GM1-ELISA 抗体测定。

b. 保护系数:在有抗体及无抗体时,细菌菌株的 ED<sub>50</sub> 比值。

表 4 抗霍乱毒素及抗菌性抗体单独及混合使用对实验性霍乱的保护作用

抗 体	对霍乱(569 B)的保护作用
抗霍乱毒素	70 <sup>a</sup>
抗菌性抗体	9
抗霍乱毒素+抗菌性抗体	≥1,000

a. 保护系数:在有抗体及无抗体时细菌菌株 ED<sub>50</sub> 的比值。

差不多,回忆免疫反应亦好。如免疫两次,即可获霍乱菌脂多糖肠道 IgA 免疫反应。口服免疫较注射途径好,但至少要两次免疫。采用灭活霍乱菌的目的是提供脂多糖抗原,该抗原是霍乱菌的主要保护性体抗原,有血清型(Inaba 及 Ogawa)特异性以及共同保护性抗原决定簇,也可能尚提供外膜蛋白抗原包括血凝素等。

ETEC 菌毛抗原与 LTB 亚基复合疫苗在我们实验室已试制成功,经初步试验对仔猪的黄痢和白痢的预防有显著保护作用。

### 参 考 文 献

- [1] Levine, M. M., *Microbiol. Rev.*, **47** (1983), 510.
- [2] Affridge, S. R., *et al.*, *J. Infect. Dis.*, **147** (1983), 864.
- [3] Clements, J. D., *Infect. Immun.*, **29** (1980), 90.
- [4] Gaary, S. J., *et al.*, *Infect. Immun.*, **36** (1982), 215.
- [5] Dallas, W. S., *Infect. Immun.*, **40** (1983), 647.
- [6] Moseley, S. L., *et al.*, *Infect. Immun.*, **39** (1983), 474.
- [7] Clements, L. D. *et al.*, *Infect Immun.*, **40** (1983), 653.
- [8] Yamamoto, T., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **145** (1981), 850.
- [9] Yamamoto, T., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **155** (1983), 728.
- [10] Taketa, Y., *et al.*, *Infect. Immun.*, **34** (1981), 341.
- [11] Shipley, P. L., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **145** (1981), 920.
- [12] Isaacson, R. E., *Infect. Immun.* **40** (1983), 633.
- [13] Levine, M. M., *et al.*, *Infect. Immun.*, **39** (1983), 889.
- [14] Dallas, W. S., *et al.*, *J. Bacteriol.*, **139** (1979).
- [15] Mekalanos, J. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79** (1982), 151
- [16] Kaper, J. B., *et al.*, *Nature*, **308** (1983), 655.
- [17] Mekalanos, J. J., *Nature*, **306** (1983), 551.
- [18] Svennerholm, A. M., *et al.*, *J. Inf. Dis.* **149** (1984), 884.

# 血清脂蛋白和载脂蛋白的结构、功能与代谢

王克勤

(中国医学科学院基础医学研究所)

- 一、引言
- 二、脂蛋白和载脂蛋白的分离,提纯和鉴定
- 三、脂蛋白的一般性质和结构
- 四、脂蛋白和载脂蛋白的代谢
  - 1. 乳糜微粒的代谢
  - 2. 极低密度脂蛋白的代谢
  - 3. 低密度脂蛋白的代谢
  - 4. 高密度脂蛋白的代谢
- 五、载脂蛋白
  - 1. 载脂蛋白的结构与功能
  - 2. 载脂蛋白的多态性
- 六、结束语

## 一、引言

血浆脂蛋白是由脂质与蛋白质相互结合形成的大分子复合物。脂质包括胆固醇、胆固醇酯、磷脂和甘油三酯。已知人血清含有五种主要的脂蛋白,即乳糜微粒(Cm)、极低密度脂蛋白(VLDL)、中间密度脂蛋白(IDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)。这些脂蛋白都是球形颗粒,但在分子大小、水合密度以及化学组成上均彼此不同,在结构、功能和代谢上亦均有差异。其中蛋白质称为载脂蛋白(apolipoprotein 或 apoprotein,简称 apo)。它的命名在七十年代以前多以其肽链的羧基末端来命名。1971年 Alavpouic<sup>[1]</sup>提出了 A、B、C……等命名法,得到了大家的公认,均以载脂蛋白发现的先后分别命名为 apo A、apo B、apo C……等。目前已从不同的脂蛋白分子中分离出 18 种载脂蛋白<sup>[2]</sup>(附表 1)。其中六种载脂蛋白的一级结构氨基酸序列已测定清楚,它们分别为 apo A-I、A-II、apo C-I、C-II、C-III 及 apo E。近几年来发现许多载脂蛋白都存在着多态性(poly-morphism),如果将这些多态异构体(isoforms)计算进去,载脂蛋白的数目远不止 18 种了。载脂蛋白不仅是脂蛋白分子结构的重要组成部分,而且具有生物活性。例如一些载脂蛋白是脂蛋白代谢中两种关键酶,即卵磷脂胆固醇酯酰转移酶(LCAT)和脂蛋白脂肪酶(LPL)的激活剂;另一些载脂蛋白则与细胞膜受体有特异的亲和活性,进入细胞后对胆固醇的代谢和脂蛋白的代谢起调节作用。某种载脂蛋白的缺乏、减少或异常将引起脂质代谢的紊乱,出现高胆固醇、高甘油三酯或高脂蛋白血症,从而激发动脉粥样硬化斑块的形成。因此,近十年来国际上对脂蛋白的研究多集中到载脂蛋白的作用,以及一些遗传、生理、病理、激素、环境等因素对其在调节和扰乱脂蛋白代谢的影响。此外,关于载脂蛋白本身的结构和功能的关系,它的多态性与遗传性高脂蛋白血症的分子基础,载脂蛋白与载脂蛋白之间、载脂蛋白与脂质之间的相互反应,脂蛋白与载脂蛋白与免疫调节,甚至载脂蛋白与磷脂及胆固醇形成的蛋白脂质体可能在治疗某些疾病中的可能作用均在研究中。总的说来,血清脂蛋白和其中载脂蛋白的研究近十年来有飞速的发展,特别是后者已日益显示

出其重要的作用,为研究工作提供了广阔的前景和巨大的潜力。

由于篇幅有限,本文只能就血清脂蛋白和载脂蛋白的某些研究进展作一扼要的介绍。

## 二、脂蛋白和载脂蛋白的分离、提纯和鉴定

研究脂蛋白及载脂蛋白的结构、功能和代谢对阐明高血脂症和动脉粥样硬化的机理有重要的意义。开展此课题的研究首先需要较大量的脂蛋白及其亚类。以往制备血清中的 VLDL 和 LDL 及 HDL 多沿用经典的序列超速离心分离法(Sequential Ultracentrifugation)<sup>[3]</sup>。该法每次只能分离一种脂蛋白,每次需 20—24 小时,如果要获得纯净的 HDL 则需 90 小时左右。另一缺点是分离样品少,尚未将 HDL 的两种主要亚类 HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 分离。因此近十年来不少学者不断在寻找新的分离途径,以期缩短离心时间,增加分离样品和提高分离效果。并希望能通过一次超速离心就可分离血清中数种脂蛋白及其亚类和无脂血清。因为目前已知无脂血清中含胆固醇酯转移蛋白、一些生理功能尚不十分明确的载脂蛋白和脂质以及其他脂类结合的脂质体。此外无脂血清还可以用来研究细胞培养和细胞膜上 LDL 等受体,因此不难理解近年有不少人从事这方面的研究。较为成功的有 Patsch 等<sup>[4]</sup>以区带头密度梯度离心的分离法,首先将 HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 分离,然后经过再一次密度梯度离心分离 VLDL 和 LDL。这样缩短分离时间到 27 小时左右,但分离样品量较少,仅 15 ml。1980 年 Chung 等<sup>[5]</sup>用垂直离心头密度梯度超速离心一次分离血清中 VLDL、LDL 和 HDL,但未能将 HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 分开,且所得 HDL 尚有少量血清清蛋白的污染。同年 Chapmann 等<sup>[6]</sup>发表了用水平头密度超速离心血清脂蛋白,声称能一次将 VLDL、LDL 和 HDL<sub>2</sub> 及 HDL<sub>3</sub> 分开,但分离样品亦较少,约 12 毫升左右。从他们分离的图象看,HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 并无明显的界面。取样十分繁琐,易于产生扩散,仍需 48 小时,不适宜制备用。1982 年 Schmitz 和 Assmann<sup>[7]</sup>用较小的区带离心头密度超速离心分离血清中的 HDL<sub>1</sub>、HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub>,但未将 VLDL 和 LDL 分离。因分离样品较少,亦只适宜于分析用。作者实验室<sup>[8-12]</sup>近三年来对血清脂蛋白及其亚类的分离进行了一系列的研究,根据不同的要求和目的建立了多种方法来分离人及数种动物血清中的主要脂蛋白和亚类,获得了良好的效果,兹分述如下:

(1) 以多聚阴离子硫酸右旋糖酐[dextran sulfate 500(DS)]及二价离子 Ca<sup>2+</sup> 沉淀、浓缩血清中含 apoB 的脂蛋白 VLDL 和 LDL,然后以密度梯度(1.00—1.30 g/ml)在区带头中,42,000 rpm,二小时半,一次分离血清中的 VLDL 和 LDL,获得了较浓的纯品,为进一步研究 VLDL、LDL 及其中载脂蛋白提供了新的方法<sup>[8,9]</sup>。

(2) 直接从 120—150 ml 血清中以不连续的密度梯度在区带离心头中一次分离提纯 VLDL 和 LDL。离心条件与上述方法同。但不经 DS 和 Ca<sup>2+</sup> 沉淀,因此比上法更为简便<sup>[10]</sup>。

(3) 以 DS 和 Ca<sup>2+</sup> 沉淀含 apoB 的脂蛋白以后,加大以上两种试剂的浓度于去 VLDL 和 LDL 的上清液中,以沉淀血清中的 HDL。再将 HDL 溶解血清中置区带头中密度梯度超速离心去除其中的 HDL。离心条件为 45,000 rpm,密度梯度 1.00—1.40 g/ml,8 小时。所得 HDL 经多种方法鉴定,如琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺电泳、免疫双扩散免疫电



泳及免疫双相电泳等,均证实为纯品,浓度较高<sup>[11]</sup>。

另一方法是将 DS 与  $Ca^{2+}$  沉淀浓缩后的 HDL 以固定角头密度梯度离心 5 小时左右,(离心速度为 70,000 rpm),可将 HDL 与其他蛋白质分离<sup>[12]</sup>。

(4) 一次直接从血清中分离,提纯血清中的 VLDL、LDL、HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>3</sub> 及无脂血清。上面已谈到,虽然不同工作者以不同的离心头和密度梯度、时间和速度的配比,欲一次从血清中分离各种主要脂蛋白及无脂血清做了尝试,但均未获得满意结果和达到制备的目的。王克勤和何锦麟<sup>[13]</sup>根据分离提纯脂蛋白的经验,改变密度梯度的配比、离心速度和时间,经过多次实验,终于成功地将血清中的 VLDL、LDL、HDL<sub>2</sub>、HDL<sub>3</sub> 和无脂血清分离。图 1 中的离心条件为 Beckman L8-80 超速离心机,Ti-14 区带离心头,不连续密度梯

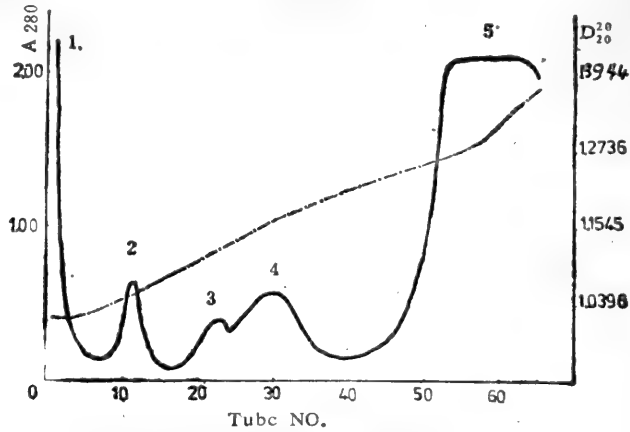


图 1 区带头密度梯度超速离心分离图  
 —: 蛋白质吸收曲线 280nm; - - - : 密度梯度曲线。  
 1. VLDL; 2. LDL; 3. HDL<sub>2</sub>; 4. HDL<sub>3</sub>; 5. 无脂血清

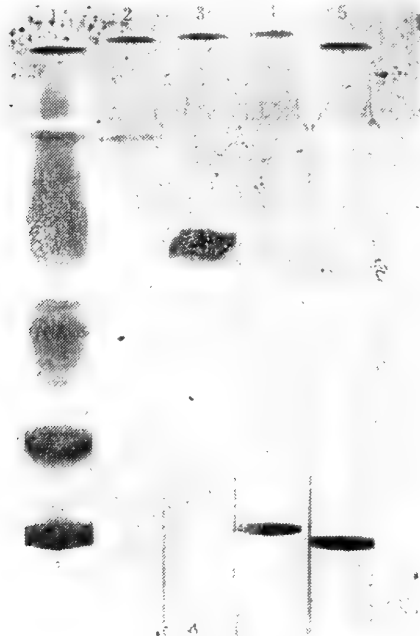


图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳  
 1. 全血清; 2. VLDL; 3. LDL; 4. HDL<sub>2</sub>; 5. HDL<sub>3</sub>; 氨基黑 10 B 染蛋白

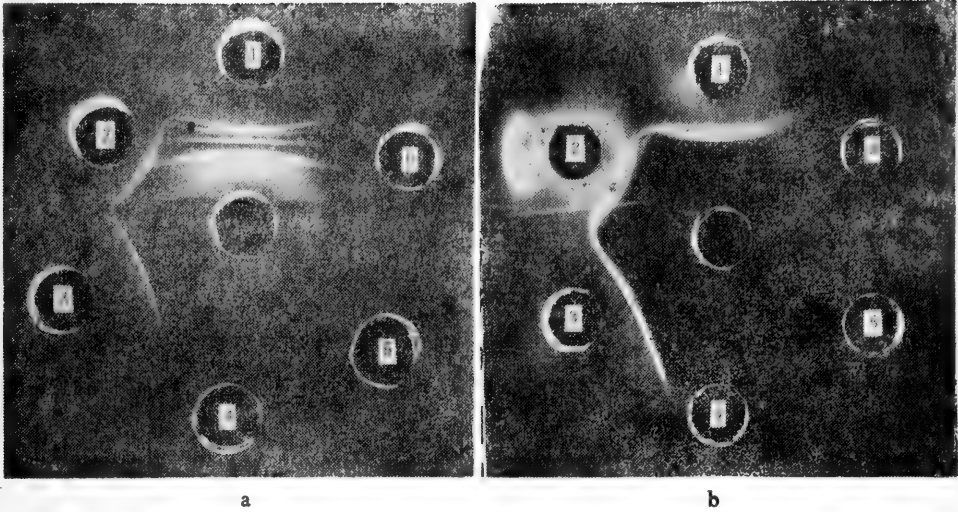


图 3 免疫双扩散

a. 对兔抗人全血清进行扩散:

1. 人全血清; 2.VLDL; 3.LDL; 4.HDL<sub>2</sub>; 5. HDL<sub>3</sub>; 6. 40 管, 中央孔, 兔抗人全血清抗血清

b. 1. 人全血清; 2.VLDL; 3.LDL; 4.HDL<sub>2</sub>; 5.HDL<sub>3</sub>; 6.40 管, 中央孔, 兔抗人  $\beta$  脂蛋白抗血清

度 1.00—1.40 g/ml, 47,000 rpm (160,000  $\times$  g 左右), 22 小时。经琼脂糖、聚丙烯酰胺(图 2)免疫化学(图 3 a,b)及分析超速离心等方法鉴定为纯品。化学组成和文献的经典方法分离提纯者一致。此方法的建立不仅为以上几种脂蛋白和无脂血清的制备提供了较满意的新方法,而且可做分析用,大大增加了该法的应用范围。例如一次超速离心的图象可以用来研究不同年龄性别,正常和家族性高脂蛋白血症各种表型血清脂蛋白的差异,不同膳食、激素和疾病,特别是动脉粥样硬化的影响,以及在脂蛋白之间的相互转化等。王克勤等已将该法初步用于分析男性和女性超速离心图象的差异,男性的 LDL 和 VLDL 均比女性为多,而 HDL 则比女性为少(图 4)。

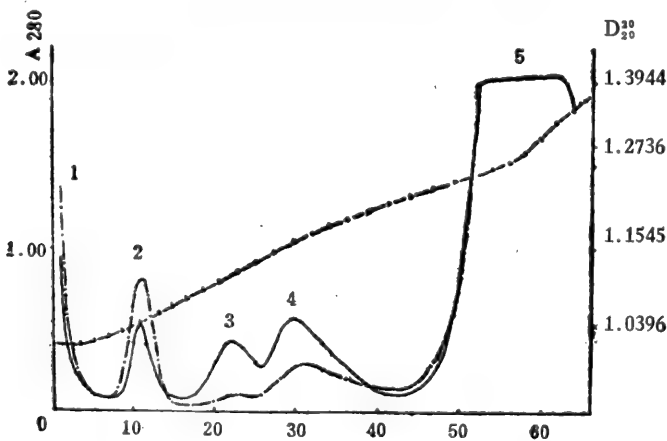


图 4 人不同性别密度梯度超速离心图象的比较

—: 蛋白质吸收曲线(女性);

-▲-▲-: 密度梯度曲线。

1. VLDL; 2. LDL; 3. HDL<sub>1</sub>; 4. HDL<sub>2</sub>; 5. 无脂血清;

- - - - : 蛋白质吸收曲线(男性)

载脂蛋白的分离:纯的脂蛋白经醇醚(1:3)在-12℃脱脂后,经典方法多用 Sephadex G-200 或 G 75 将所含的载脂蛋白分离,然后再以离子交换柱亲和层析等进一步分离出单一载脂蛋白。经 SDS-PAGE、免疫化学、超速离心分析等鉴定为纯品后,再研究其理化性质和生理功能及制备单克隆抗体等。目前国际上已开始用快速高效液相层析来分析和制备载脂蛋白并已获得较好的效果。这一方法将在载脂蛋白的研究中显示其威力。

### 三、脂蛋白的一般性质和结构

血清中五种脂蛋白都含有脂质(包括胆固醇及其酯、甘油三酯、磷脂)和蛋白质,但在理化性质、形状大小、水合密度、化学组成和分子量等方面均有所不同,特别是载脂蛋白的种类和量(表1,2),在功能上亦有所差异。Cm 含有大量的甘油三酯,主要运输从食物中摄入的脂质。VLDL 亦含有较多的 TG,主要是将肝脏合成的脂肪和胆固醇运输到外周组织使用,其中的磷脂和蛋白质主要维持脂蛋白分子的结构,并使其溶于水的介质(载脂蛋白的其他功能将在以后阐述)。Cm 的颗粒和分子量最大,密度最小;HDL<sub>2</sub> 则分子量和颗粒最小、密度最大,不含 apoB,含 apoA 最多。Cm、VLDL、IDL 和 LDL 均含 apoB,Cm 中的为 B<sub>48</sub>,LDL 中者为 B<sub>100</sub>,VLDL 还含有较多的载脂蛋白 C 族,特别是 C-III,还含有 apo E。在结构方面一般都认为脂蛋白有一个非极性的核心,主要是甘油三酯和胆固醇酯,而其表面层则被一层极性化合物(磷脂、自由胆固醇和载脂蛋白)组成的膜所覆盖。VLDL 的核心主要是甘油三酯,LDL 核心主要是胆固醇酯,表面为磷脂、apoB 和胆固醇覆盖<sup>[14]</sup>。以小角度 X 线散射仪和 <sup>13</sup>C-NMR 仪来研究 LDL 的颗粒核心,发现其核心的脂质成分随温度的不同而有所变化。10℃时核心中的胆固醇酯、胆固醇及少量甘油三酯成同心圆的形式整齐地排列着,而在 45℃时这些中性脂肪则变得不规则(图5)<sup>[15]</sup>。关于 LDL 结构的细节尚不十分清楚。

表 1 人血浆脂蛋白族的理化性质

	电泳上的位置	颗粒大小(nm)	分子量×10 <sup>5</sup>	密度(g/ml <sup>-1</sup> )
乳糜微粒	停留在起点	75—1,200	4,000	<0.93
VLDL	前β-脂蛋白	30—80	10—2,000	0.93—1.006
IDL	慢-前-β-脂蛋白	25—35	5—1,000	1.006—1.019
LDL	β-脂蛋白	18—25	23.0	1.019—1.063
HDL <sub>2</sub>	α-脂蛋白	9—12	3.6	1.063—1.125
HDL <sub>3</sub>	α-脂蛋白	5—9	1.75	1.125—1.210

表 2 人血浆脂蛋白的载脂蛋白组成

	VLDL	IDL	LDL	HDL
	总蛋白质的 mol%			
apoA-I	—	—	—	45
apoA-II	—	—	—	22
apoB	2	13	75	—
apoC-I	8	26	—	17
apoC-II	20	9	—	2
apoC-III	60	41	22	7
apoD	—	—	—	5
apoE-II, III, IV	9	13	3	1

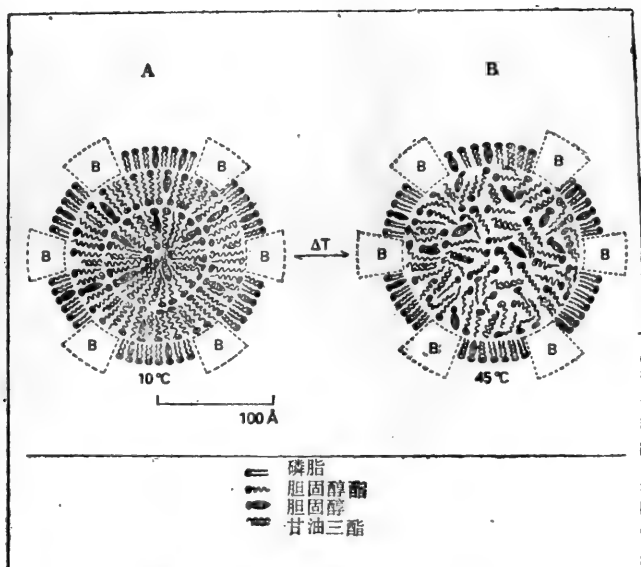


图 5 人血清 LDL 结构示意图  
A. 10°C; B. 45°C

对 HDL 的结构有不少研究者感到兴趣,他们从研究其中载脂蛋白的化学和物理化学性质、重组的载脂蛋白颗粒以及完整的 HDL 的理化性质,提出了一些有关 HDL 结构的观点。认为 HDL 的所有亚类均以球形颗粒存在,并含有相同的化学组成,但颗粒大小和密度则不一致,从 80—120 Å,分子中的极性基团如胆碱磷脂,神经磷脂和载脂蛋白均转移在表面层对着水相。而那些非极性的疏水性脂质(包括胆固醇酯和甘油三酯)则位于颗粒核心(图 6)。关于其中磷脂和载脂蛋白的结合,大多数研究者的意见是以非极性的相互反应为主<sup>[18-20]</sup>,极性反应很微。

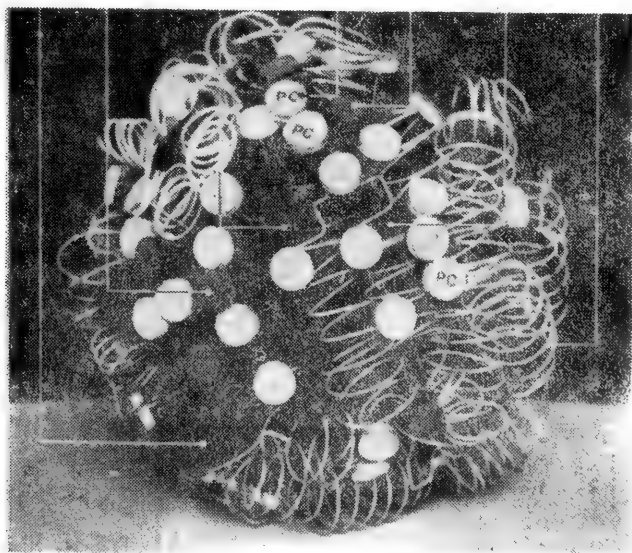


图 6 人血清 HDL 结构示意图  
PC:卵磷脂;SPM:神经磷脂;CE:胆固醇酯。结构中的螺旋的这种长度使球形结构易于形成,其中脯氨酸部分则使折叠有可能

## 四、脂蛋白和载脂蛋白的代谢

### 1: 乳糜微粒的代谢

Cm 含有 apoA-I、A-II、A-IV、B-48、apoC 和 E 多种载脂蛋白<sup>[21-25]</sup>。其中 apoC 和 E 在小肠中新合成的 Cm 中含量很少。当其进入血液循环时与其他脂蛋白相互反应才获得 apoC 和 E<sup>[26,27]</sup>。Cm 在血浆中的生物半寿期仅 4—5 分钟,因此正常人饥饿时的血清不含 Cm。只是在食高脂肪膳食之后才出现。此外 I 型和 V 型高脂蛋白血症患者,即使饥饿 12 小时的血清亦有 Cm。Cm 在琼脂糖或纸上电泳时都于起点不动,因此很容易用电泳法鉴别。

Cm 在脂蛋白脂肪酶(LPL)的作用下裂解为 Cm 核心残体和表面残体。前者含较丰富的 apoE 和胆固醇酯,后者则有丰富的磷脂、胆固醇和 apoC,这些组分至少是部分地转给 HDL<sub>3</sub><sup>[28,29]</sup>,形成较大颗粒的 HDL<sub>2</sub>。其核心残体可通过其中 apoE 与细胞上 apoE 受体结合<sup>[30,31]</sup>,其中载脂蛋白 C 对这种结合可能有抑制作用。肝细胞受体摄入的核心残体对其细胞内胆固醇合成中的 HMGCoA 还原酶有抑制作用。最近 Floren 等<sup>[32]</sup>发现人纤维母细胞可通过 apoB、E 受体摄取 Cm 核心残体,但不摄取天然 Cm。动脉壁平滑肌细胞亦可摄取 Cm 残体,因此应该将其看作是一种致动脉粥样硬化的颗粒<sup>[33]</sup>。归纳起来 Cm 的分解代谢分两步进行(图 7)。

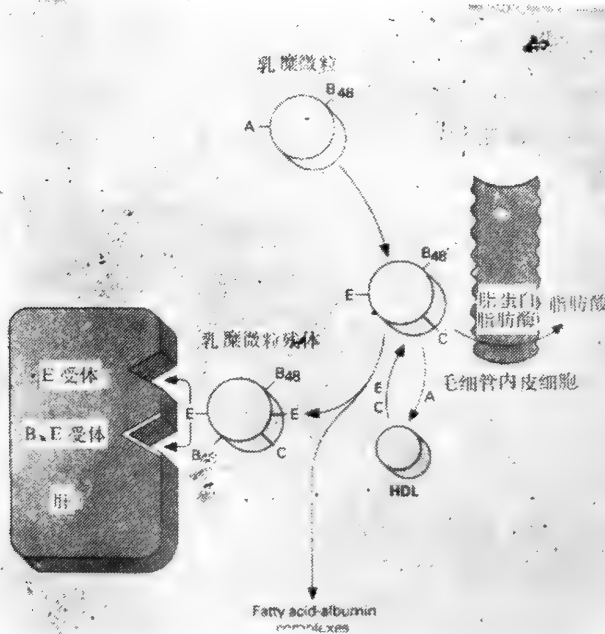


图 7 乳糜微粒分解代谢图解

(1) 在 LPL 作用下水解 Cm 核心中的甘油三酯,形成核心残体和表面残体,后者转移到 HDL<sub>3</sub>。

(2) 肝细胞 apoE 受体可识别 Cm 核心残体,然后摄入肝细胞进行代谢。

## 2. 极低密度脂蛋白的代谢

VLDL 颗粒极不均一,  $S_r$  值 20—400, 颗粒为 300—1,000 Å。在正常情况下以密度梯度超速离心可将 VLDL 分为七个部分<sup>[34,35]</sup>。因此在正常血清中就存在着 VLDL 不同阶段的代谢产物。VLDL 在 LPL 的作用下其核中的甘油三酯被水解后形成 IDL, 然后进一步水解为 LDL。Eisenberg<sup>[36]</sup>和 Tall 等<sup>[37]</sup>曾分别提出, VLDL 在分解代谢过程中, 其核心中的中性脂肪逐渐减少, 核心变小, 因而使其表面过剩, 过剩的表面形成新生的 HDL。后者一般呈盘形结构, 在血液中卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶(LCAT)的作用下, 形成了成熟的球形颗粒。Deckelbaum 等<sup>[38]</sup>和王克勤等<sup>[39]</sup>曾用提纯的 VLDL 和以亲和层析法分离提纯的牛奶 LPL 在体外进行反应, 以密度梯度超速离心分离反应产物, 并以紫外鉴别产物的蛋白质图象的改变, 以电镜观察蛋白质峰脂蛋白的颗粒大小, 发现有新的蛋白质峰出现。其中脂蛋白颗粒比原 VLDL 的直径为小, 与 LDL 者相似。还有盘状颗粒和带触角的颗粒产生。为 Eisenberg 和 Tall 等提出的假设提供了实验依据。

VLDL 含有 35% 的 apoB, 50% apoC (包括 C-I、C-II 和 C-III) 和大约 10% 的 apoE 及其他的脂蛋白。在 VLDL 代谢过程中 (VLDL → IDL → LDL), apoB (B<sub>100</sub>) 不交换。因此 LDL 中的 apoB 来自 VLDL 的代谢<sup>[40]</sup>。另一方面 apoC、apoE、胆固醇及磷脂则转移到 HDL<sup>[41]</sup>。关于 IDL 代谢尚不十分清楚, 有些研究者认为肝组织的 apoE 和 apoB、E 受体参与 IDL → LDL 的代谢<sup>[42,43]</sup>。LPL 在水解 VLDL 的过程中需要 apoC-II 的参与和激活, 而 apoC-III 则可能有抑制作用。作者等曾发现纯的 VLDL、HDL 对 LPL 有激活作用, apoA-I 和 LDL 则无<sup>[44]</sup>(图 8)。

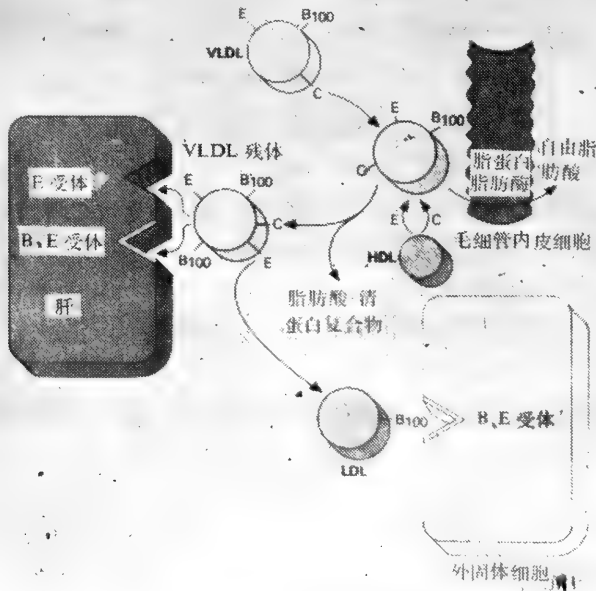


图 8 VLDL 分解代谢图解

目前关于 apoC-II 对 LPL 的作用机理引起不少作者的重视和兴趣, 提出了一些假设, 尚无定论。国际上已发现数例 C-II 缺乏的患者表现出严重的高甘油三酯血症。作者与李

冠周发现由鸭血清 HDL 分离提纯的 apoC-II 对 LPL 亦有激活作用。因此关于 apoC-II 对 LPL 的作用机理的进一步研究有重要的生理和临床意义。

### 3. 低密度脂蛋白的代谢

apoB 是 LDL 的主要蛋白质,主要来自 VLDL 的分解代谢<sup>[38,45-47]</sup>,只有极少量来自 Cm,如果有的话。肝和小肠粘膜细胞是合成 apoB 的部位。外周细胞膜的合成所需胆固醇基本上也在肝脏合成,再通过 VLDL→LDL 的代谢途径输送给肝外细胞使用。无β脂蛋白血症的患者其肝和小肠都不能合成 apoB,这些患者血清中无 VLDL 和 LDL<sup>[48]</sup>(图 8)。

关于 LDL 的分解代谢已由 Goldstein 和 Brown<sup>[49-58]</sup>等阐明得很清楚。他们从组织培养和动物实验证实,在人纤维母细胞、动脉平滑肌细胞和淋巴细胞上均有 LDL 受体(图

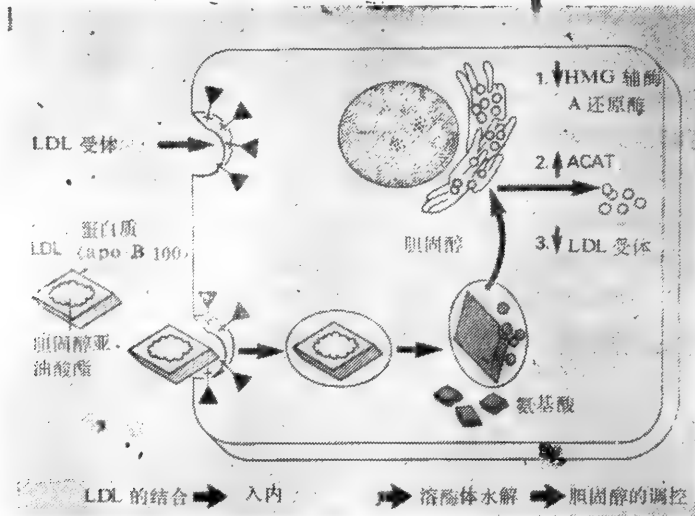


图 9 LDL受体和细胞内胆固醇代谢

9)。这些受体对胆固醇的代谢和防止细胞内胆固醇过多的堆积起到极其精确的调节作用。当 LDL 与细胞膜特异受体 LDL 结合后,LDL 进入细胞内,并在溶酶体中水解,其中 apoB 分解为氨基酸,渗出细胞外,胆固醇则释放到细胞内<sup>[58]</sup>。细胞内的自由胆固醇的增加激活了胆固醇代谢的调节机理,从而使胆固醇在细胞内的浓度不致增加<sup>[57]</sup>。LDL 受体途径对胆固醇的调节机理可归纳如下:

(1) 抑制胆固醇合成中的关键酶(HMGCoA 还原酶)的活性,使细胞内胆固醇合成减少<sup>[58,59]</sup>。

(2) 激活脂酰 CoA、胆固醇酯酰转移酶(ACAT)的活性,从而使过多的胆固醇以胆固醇酯的形式储存起来<sup>[60]</sup>。

(3) 抑制 LDL 受体的合成,从而防止 LDL 进入细胞,防止胆固醇的堆积<sup>[61]</sup>(图 9)。

在高脂血症,特别是家族性高胆固醇血症的情况下,对胆固醇代替丧失了调节作用。目前发现 LDL 受体功能有三种不同的遗传缺陷症涉及到下列三种等位基因<sup>[62-65]</sup>。

R<sup>b°</sup>: 指定形成一种没有很明显结合能力的受体。

R<sup>b-</sup>: 指定形成一种受体,其结合能力明显降低但仍可测出。

R<sup>b+,°</sup>: 指定形成有结合能力的受体,但不能入胞。



Goldstein 和 Brown 测定了一些纯合子家族性高胆固醇血症纤维母细胞的受体遗传情况,发现受体缺乏和受体缺陷的患者的发生率近似<sup>[92]</sup>,而“入内作用”(Internalization)有缺陷的患者则很少。由于 LDL 受体功能缺陷的结果,杂合子和纯合子的患者的 LDL 的分解代谢都减少。LDL 在循环中的浓度有继发增加。正常人的每个纤维母细胞上约有 10,000 受体。大约每天可以分解 LDL 血浆池中的 45%,杂合子患者的每个纤维母细胞上的受体约为 5,000 左右,分解代谢为 30%左右,而纯合子患者(无受体)则只能代谢血浆池的 LDL 15%左右<sup>[55,56,66]</sup>。根据他们体外和体内实验的结果提出了 LDL 分解途径的模型。

按此假设,LDL 是通过受体依赖机理和受体无关的机理从血浆中移走。并假设在所有人中不管他的 LDL 功能受体的数目如何,大约每人血浆中的 LDL 有 15%是通过一种与受体无关的途径代谢的(清道夫细胞)。这些清道夫作用的细胞是网织内皮细胞系统巨噬细胞和组织细胞(histocyte)。在正常人中 30%的 LDL 是通过受体依赖途径,在杂合子只有 10%,纯合子则无。主要是通过清道夫的途径。根据这一假设,家族性高胆固醇血症通过清道夫细胞分解 LDL 的量为正常的 2—3 倍,而纯合子的患者在脾脏的巨噬细胞、肝的 Kuffer 氏细胞、骨髓的组织细胞(histocytis)及其他单细胞来源的单核的巨噬细胞中均有胆固醇的堆积。

与纤维母细胞、动脉壁平滑肌细胞、淋巴细胞及其他许多细胞相比,巨噬细胞不含 LDL 受体,只有在其中的 apoB 被修饰以后,通过电荷依赖的内吞作用,巨噬细胞才以很大亲和力摄取 LDL<sup>[67-69]</sup>。

目前,有一种家兔,称 Watanabe(渡边)或 WHHL,可作为研究 LDL 受体缺乏的一种很好的模型。纯合子的家兔表现出在纤维母细胞、肝细胞和肾上腺皮质细胞完全缺乏 LDL 受体。血清胆固醇非常高(达 500—900 mg/dl,其中 90%是在 LDL 中),有黄色瘤和严重的动脉粥样硬化。这一模型与目前所知道的高胆固醇血症在各方面都十分相同,因此这种动物为研究高胆固醇血症和动脉粥样硬化的机理提供了有力的工具<sup>[70,71]</sup>。

LDL 受体本身的性质和代谢近年来也受到了不少研究者的重视。受体的性质有下面一些特点。

(1) 受体是一种蛋白质,易于被蛋白酶水解、化学修饰,如乙酰化、与戊二醛交连聚合,但不易与糖苷酶(glycosidase)或者水解酶作用,分子量为 160,000<sup>[72]</sup>。

(2) 人纤维母细胞的膜上最多有 20,000 到 50,000 个受体<sup>[61]</sup>。

(3) LDL 受体可以识别 LDL 中 apoB 和 apoE 及 HDLc 的 apoE,因此又称为 apoB、E 受体<sup>[73]</sup>。

(4) 一个 LDL 颗粒与一个受体结合,而一个含 apoE 的 HDLc 颗粒可与四个受体结合<sup>[74]</sup>。

(5) 脂蛋白颗粒中的赖氨酸或精氨酸被修饰后失去其结合力<sup>[75,76]</sup>。

(6) 受体聚集在细胞膜上覆盖的 pits 凹陷上,细胞表面只有 2%被 Coated pits 所覆盖,虽然其中含有 50—80%的受体。

受体的功能和合成及其细胞内的循环(图 10)。

(1) LDL 受体是在与膜结合的微粒上合成的,是一种质膜上的跨膜蛋白质(transmembrane protein of the plasmalemma)。

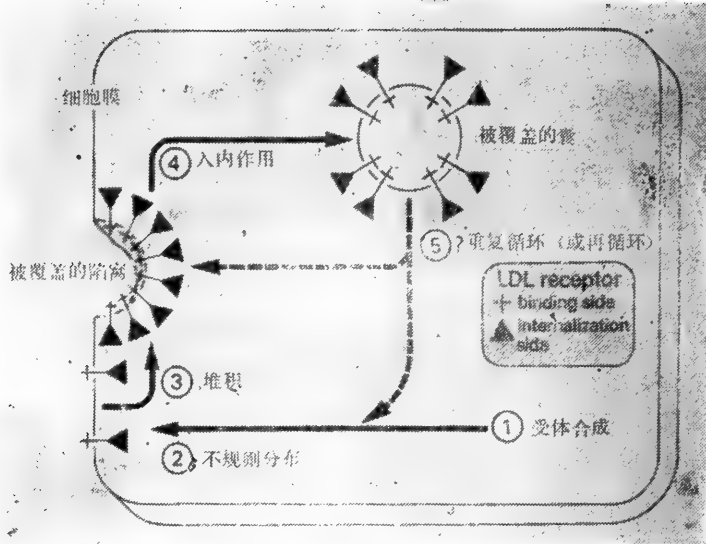


图 10 LDL 受体代谢

- ① 受体的合成;      ② 不规则的分布;  
 ③ 堆积;            ④ 入内作用;  
 ⑤ 再循环

(2) LDL 受体是在高尔基复合体糖化后不规则地分布于浆膜上。

(3) 它具有两种功能区:与细胞外 LDL 的结合区,位于细胞膜的外部;另一为进入区,位于细胞膜的内部,由于进入区的某种氨基酸的序列和它对膜蛋白包涵素 (clathrin) 的特殊亲和力,合成的受体则聚集在覆盖的凹陷。

(4) 在 LDL 进入之后,受体又可重新拼入浆膜并集中到覆盖的凹陷(图 10)。

Goldstein 和 Brown<sup>[77]</sup> 及其他作者通过研究培养细胞或从不同组织分离提纯的浆膜与化学修饰的或 <sup>125</sup>I 标记的 LDL,对胆固醇在调节不同器官中胆固醇的代谢所起的重要作用有了较深入的了解。目前已比较了约 20 种不同的组织细胞膜上的 LDL 受体数目。发现以肾上腺皮质和卵巢黄体 (corpus luteum) 含 LDL 受体数目最多。这种结果说明,LDL 受体的代谢途径可能对这两种器官提供了相当量的胆固醇为其合成甾体激素之用<sup>[78]</sup>。

最近胡詠梅等<sup>[79]</sup>发现,家兔主动脉壁的平滑肌和内皮细胞膜亦有 LDL 受体;比较了正常和高脂血症血清 LDL 对细胞膜受体的影响。正常和高脂血症血清中 LDL 进入细胞内的放射性分别平均为对照组的五倍和七倍。高脂血症为正常组的 1.4 倍。这种差异可能与高脂血症中的低密度脂蛋白所含载脂蛋白与正常者不同有关。

#### 4. 高密度脂蛋白的代谢

血清 HDL 可能有三种来源: 1. 肝脏合成 HDL 前体; 2. 由小肠合成 HDL 前体; 3. 由血浆中的 Cm 和 VLDL 分解代谢时所产生的表面成分形成。以上三种来源的 HDL 都是新生的 HDL,为盘状结构(图 11)。目前认为第三种途径是 HDL 的重要来源。Eisenberg<sup>[36]</sup>和 Tall<sup>[37]</sup>等先后提出了令人瞩目的假设,即当 Cm 和 VLDL 在脂蛋白脂肪酶作用下,它们核心中的甘油三酯迅速水解,核心缩小,表面过剩,过剩的表面在侧面压力影响下形成皱褶和突出,最后与 Cm 和 VLDL 颗粒脱落而形成盘状结构的 HDL。这种盘状结构

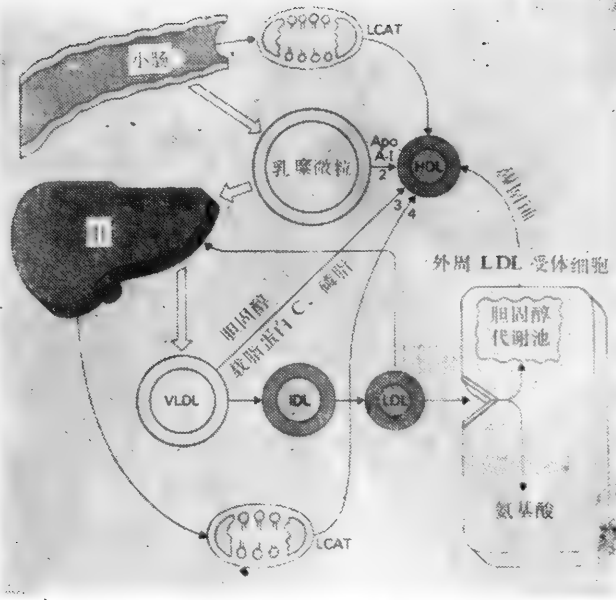


图 11 HDL 的代谢图解

VLDL: 极低密度脂蛋白; IDL: 中间密度脂蛋白; LDL: 低密度脂蛋白;  
LCAT: 卵磷脂胆固醇酯转移酶; apo: 载脂蛋白; HDL: 高密度脂蛋白

是 apo A-I、胆固醇和磷脂结合的双层膜结构,含胆固醇酯极少。新生的 HDL 在 LCAT 作用下,将其中胆固醇酯化为胆固醇酯,后者进入核心使盘状结构 HDL 转变为成熟的球形颗粒。这一假设已得到了一些实验证据。Schaefer 等<sup>[80]</sup>发现将 <sup>125</sup>I cm 注射给人,90% 的放射性出现在 HDL 中。李志高、王克勤<sup>[81]</sup>等以 <sup>125</sup>I apoA-I 标记的 VLDL 在体外与 HDL 保温,发现有 54% 的放射性出现在 HDL 上。李宪周、王克勤<sup>[82]</sup>以 <sup>125</sup>I apoC-II 标记的 VLDL 与 HDL 一同保温时,有 95% 的放射性转移到 HDL。此外 Deckelbaum<sup>[38]</sup>等和王克勤等<sup>[39,44]</sup>在体外研究 VLDL 与牛奶 LPL 一同保温的代谢产物时,以电子显微镜观察产物,发现 VLDL 颗粒变小,并有不规则的颗粒出现,有些带有突角,有些带有尾巴象蝌蚪,还有盘状结构。作者等推测这些突角和尾巴一旦脱离脂蛋白颗粒,即可形成新生的 HDL。以上实验均为 HDL 来自血浆中 Cm 和 VLDL 的代谢提供了直接依据。

此外有些研究者还观察到,人血清 HDL 水平一般血管内脂解作用较快的人比脂解作用慢的为高。相反,家族性脂蛋白脂肪酶缺乏的患者引起的高 Cm 血症,表现了 HDL 胆固醇水平的降低和 apoA-I 的减少<sup>[83-85]</sup>。

关于 HDL 亚类的形成和调控尚不十分清楚,目前认为 HDL<sub>2</sub> 是在脂解过程中释放出的 apoC、磷脂和胆固醇由 HDL<sub>3</sub> 接受而形成的<sup>[86]</sup>。无疑 LCAT 在 HDL<sub>3</sub> 转变为 HDL<sub>2</sub> 和 HDL<sub>1</sub> 中起到重要作用<sup>[87,88]</sup>,HDLc 则由 HDL<sub>1</sub> 接受较大的胆固醇而形成。HDLc 由于它含有大量的 apoE,在胆固醇的代谢中起决定性作用。一方面由于 HDLc 分子中的 apoE 可被肝细胞 apoE 受体所识别,这样分子中的胆固醇可以在肝中合成胆酸而代谢掉<sup>[89]</sup>。另一方面 HDLc 可以从肝外周细胞的 B、E 受体取代 LDL(图 12)。根据一些实验结果,1 mol 的 HDLc 可与 B、E 受体的四个部位结合,而 1 mol LDL 只能与一个 B、E 受体结合。因此 HDLc 可以有效地防止外周组织摄取 LDL。这些结果意味着 HDLc 的主要生理作用可能

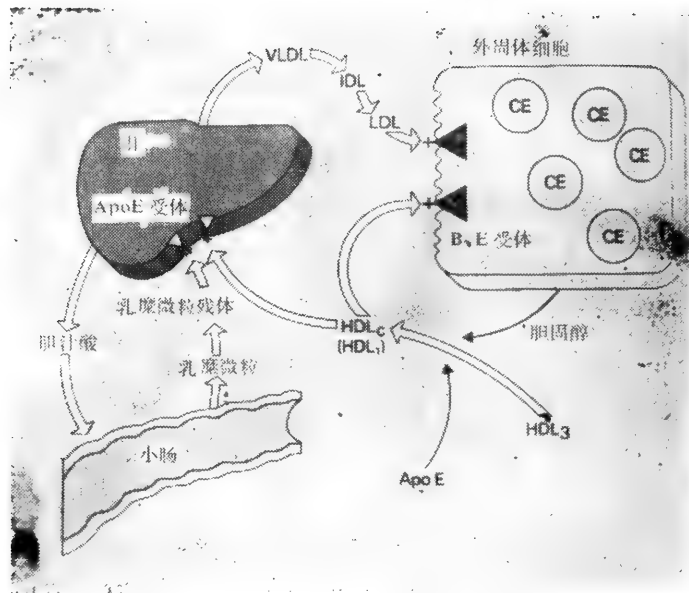


图 12 HDLc 与胆固醇代谢图解

有抗动脉粥样硬化的作用<sup>[90]</sup>(图 11,12)。

此外,HDL 的亚类 HDL<sub>3</sub> 和极高密度脂蛋白<sup>[91]</sup>( $d = 1.21 - 1.25\text{g/ml}$  基本上是磷脂和 apoA-I 的复合体),对细胞中的胆固醇有很大的亲和力,HDL<sub>2</sub> 则对细胞内胆固醇的外流无影响。作者实验室初步用纯 apoA-I、磷脂和胆固醇制备了蛋白脂质体。在电子显微镜下的结构与新生的 HDL 十分相似,具有盘状结构(图 13)。它的功能和代谢正在进行研究中。

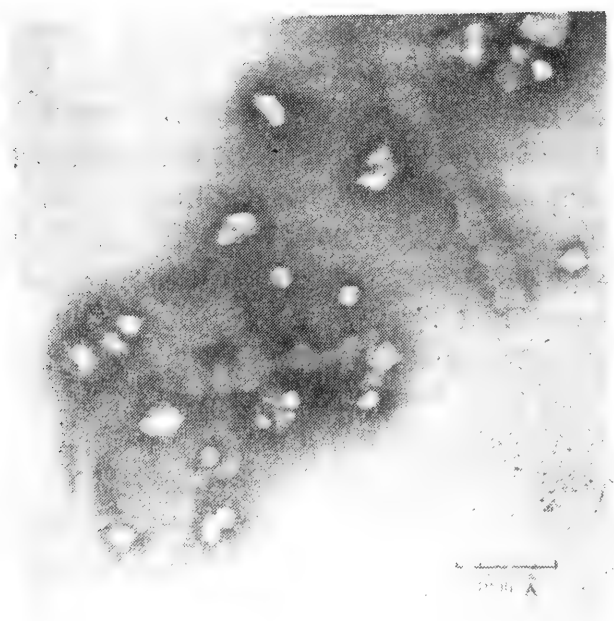


图 13 apoA-I、磷脂、胆固醇形成的蛋白脂质体的电子显微镜图象

关于 HDL 的分解代谢主要在肝脏进行,人 HDL 的生物半寿期为五天左右,其他动物均较短,狗只三天半,大鼠则只有 20 余小时。王克勤<sup>[12]</sup>等以 <sup>125</sup>I apoA-I 注射给鸭,其在 HDL 和血清中的半寿期相同,分别为  $40.1 \pm 1.7$  和  $41.0 \pm 2.7$ 。比人的快三倍。并进一步发现肝为 <sup>125</sup>I apoA-I 的主要代谢器官,肾脏次之,心、脾、肺和小肠再次之,主动脉最少。说明 HDL 不易与主动脉结合,从另一侧面为 HDL 有抗动脉粥样硬化作用提供了依据。

## 五、载脂蛋白

载脂蛋白是脂蛋白颗粒中决定其结构与功能的重要因素。目前已从不同血清脂蛋白和淋巴液中分离、提纯了 18 种载脂蛋白,它们分别为 apoA-I、A-II、A-IV、apoB-48、B<sub>100</sub>、apoC-I、C-II、C-III、apoD、E、Lp(a)、Proline Rich (高脯氨酸) 和 Threonine Poor (低苏氨酸)、淀粉蛋白、 $\beta_2$  糖蛋白<sup>-1</sup>、HLA<sup>-40</sup> 抗原和脂质转移蛋白等。关于它们的分子量和等电点参看附表 1。实际上它们的数目远不止 18 种,因为许多载脂蛋白还存在多态异构体。此外,由于方法学的不断改进和研究工作的不断深入,可以预料将会发现更多的载脂蛋白。同时也将对其生理功能和代谢有更多的了解,将为阐明高脂蛋白血症和冠心病的发病机理提供依据。

目前关于载脂蛋白的结构已有六种 apo 的一级结构弄清。它们的功能至少有四方面:(1) 与脂质结合维持脂蛋白的结构。(2) 运转内源和外源性的脂质。(3) 激活脂蛋白代谢中的一些酶。(4) 与细胞膜上的 LDL 受体 B、E 和受体 E 结合,调节胆固醇和甘油三酯及脂蛋白的代谢。近年来国际上对载脂蛋白的结构与功能的关系、一些载脂蛋白激活酶的作用机理和对其多态性的分子基础及其与遗传性高脂蛋白血症的关系给予极大的关注和兴趣,特别在载脂蛋白 E 的研究方面更为突出。近年来一些作者已从分子水平和细胞水平,甚至基因水平阐明了遗传性 III 型高脂蛋白血症的发病机理。发现载脂蛋白 E 的不同表型由于其中一些重要氨基酸如精氨酸被半胱氨酸所代替,对细胞表面 LDL 受体的结合产生了明显的变化有关,这些研究将为载脂蛋白的结构、功能与代谢及其与动脉粥样硬化的关系的阐明提供新的途径和思路。下面拟就几种载脂蛋白的研究进展及我组在这方面的研究作简要的介绍。

### 1. 载脂蛋白的结构与功能

#### (1) 载脂蛋白的亲脂性

载脂蛋白的亲脂性是 apo 的中心功能,并与它的一级结构有密切关系。目前已有六种载脂蛋白的一级结构、氨基酸序列完全测出(图 14—18,图 23)。它们的氨基酸组成和数目与其他已知蛋白质无明显的差异。但仔细观察可以发现,这些载脂蛋白具有下面几个特征:

- 1) 含有较多的极性氨基酸,而且它们的排列方式多以 1,2 或 1,4 相反的离子对形式出现。即 Glu-Arg, Glu-Lys 或 Asp-Lys, Asp-Arg。
- 2) 其中疏水氨基酸残基一对对地出现在 1,2 或 1,4 相反离子对的附近。
- 3) 蛋白质中极性和非极性氨基酸残基的这种分布很容易形成双性螺旋。不带电荷的

Asp-Glu-Pro-Pro-Gln-Ser-Pro-Trp-Asp-Arg-Val-Lys-Asp-Leu-Ala-Thr-Val-Tyr-Val-Asp-  
 10  
 Val-Leu-Lys-Asp-Ser-Gly-Arg-Asp-Tyr-Val-Ser-Gln-Phe-Gln-Gly-Ser-Ala-Leu-Gly-Lys-  
 30  
 Gln-Leu-Asn-Leu-Lys-Leu-Leu-Trp-Asp-Asp-Val-Thr-Ser-Thr-Phe-Ser-Lys-Leu-Arg-Gln-  
 50  
 Glu-Leu-Gly-Pro-Val-Thr-Glu-Glu-Trp-Phe-Asn-Asp-Leu-Gln-Glu-Lys-Leu-Asn-Leu-Gln-  
 70  
 Lys-Glu-Thr-Gly-Glu-Leu-Arg-Gln-Glu-Met-Ser-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Val-Lys-Ala-Lys-  
 90  
 Val-Gln-Pro-Tyr-Leu-Asp-Asp-Phe-Gln-Lys-Lys-Trp-Gln-Glu-Met-Glu-Leu-Tyr-Arg-Gln-  
 110  
 Lys-Val-Glu-Pro-Leu-Arg-Ala-Glu-Leu-Gln-Glu-Gly-Ala-Arg-Gln-Lys-Leu-His-Glu-Leu-  
 130  
 Gln-Glu-Lys-Leu-Ser-Pro-Leu-Gly-Glu-Gly-Met-Arg-Asp-Arg-Ala-Arg-Ala-His-Val-Asp-  
 150  
 Ala-Leu-Arg-Thr-His-Leu-Ala-Pro-Tyr-Ser-Asp-Glu-Leu-Arg-Gln-Arg-Leu-Ala-Ala-Arg-  
 170  
 Leu-Glu-Ala-Leu-Lys-Glu-Asn-Gly-Ala-Gly-Arg-Leu-Ala-Glu-Tyr-His-Ala-Lys-Ala-Thr-  
 190  
 Glu-His-Leu-Ser-Thr-Leu-Ser-Glu-Lys-Ala-Lys-Pro-Ala-Leu-Glu-Asp-Leu-Arg-Gln-Gly-  
 210  
 Leu-Leu-Pro-Val-Leu-Glu-Ser-Phe-Lys-Val-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Leu-Glu-Glu-Tyr-Thr-  
 230  
 Lys-Leu-Asn-Thr-Gln  
 245

图 14 人 apoA-I 的一级结构

PCA Ala Lys Glu Pro Cys Val Glu Ser Leu Val Ser Gln Tyr Phe Gln Thr Val Thr Asp  
 5 10 15 20  
 Tyr Gly Lys Asp Leu Met Glu Lys Val Lys Ser Pro Glu Leu Gln Ala Gln Ala Lys Ser  
 25 30 35 40  
 Tyr Phe Glu Lys Ser Lys Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys Lys Ala Gly Thr Glu Leu  
 45 50 55 60  
 Val Asn Phe Leu Ser Tyr Phe Val Glu Leu Gly Thr Gln Pro Ala Thr Gln  
 65 70 75

图 15 人 apoA-II 的一级结构

图中示两个相同的链以二硫键在 Cys-6 相连的一半

Thr Pro Asp Val Ser Ser Ala Leu Asp Lys Leu Lys Glu Phe Gly Asn Thr Leu Glu Asp  
 10 20  
 Lys Ala Arg Glu Leu Ile Ser Arg Ile Lys Gln Ser Glu Leu Ser Ala Lys Met Arg Glu  
 30 40  
 Trp Phe Ser Glu Thr Phe Gln Lys Val Lys Glu Lys Leu Lys Ile Asp Ser  
 50

图 16 人 apoC-I 的一级结构





载脂蛋白 A-I 及 C-I 对 LCAT 有激活作用。apoC-II 则对 LPL 有激活作用。对于 apoC-II 激活活性的研究较多,现介绍如下:

载脂蛋白 C-II 的激活作用:apoC-II 含有 78 个氨基酸, Jackson 等于 1977 年测出其全部序列如图。1984 年 Brewer<sup>[127]</sup> 实验室对 apoC-II 的氨基酸序列重新测定; Sharpe<sup>[128]</sup> 和 Gacksori 等又用基因工程方法分析了 apoC-II 的 mRNA 的 cDNA 的核苷酸序列, 他们的结果相互验证 apoC-II 具有 79 个氨基酸而不是 78 个。其中部分氨基酸的顺序与过去测定的也有差异。但 N 端和 C 端的一级结构仍相同。

在 apo-II 序列中有数处含有双性螺旋的潜在性, 与 apoA-I 不同, apo-II 与脂质结合的功能与激活酶的作用位于该分子的不同区域<sup>[92-96]</sup>, 激活酶的片段在羧基端的 55-78 氨基残基。序列 43-50 与 VLDL 结合, 是与脂质结合的部分片段。Kinnunen 等<sup>[94]</sup> 以 CNBr 裂解和以固相酶合成的方法制备了 apoC-II 的片段, 研究这些片段激活 LPL 作用, 发现片段 1-9 和 10-59 氨基残基均无激活作用, 而羧基端的 60-78 片段只有天然 apoC-II 激活 LPL 能力的 50% 左右, 人工合成的片段 60-78 的能力只能增加 LPL 水解力的三倍, 天然 apoC-II 为九倍, 再加上五个氨基残基。从 55-78, 则激活能力增到 12 倍, 几乎与天然 apoC-II 无异。如果减少五个氨基酸, 66-78 则无激活作用, 如果将羧基端的 Gly-Glu-Glu 三个氨基残基移去, 减少了激活作用的 95%。以上结果说明, apoC-II 羧基端的 24 个氨基酸含有激活酶的活性中心。此外 Gly-Glu-Glu 中的 Glu 可能是与 LPL 离子相互反应的部位, 而 55-65 增强了酶促作用, 氨基端的 49 氨基残基可能与磷脂结合, 因而使 apoC-II 与 Cm 和 VLDL 的表面层结合, 而使羧基端可能与毛细管上的 LPL 相互反应<sup>[95]</sup>。

此外, Catapano 等于 1979 年<sup>[96]</sup> 用一缺乏 apoC-II 患者的 VLDL 来研究 apoC-II 分子中  $\alpha$  螺旋能结合脂质的区域, 在体外用三种不同长度合成的 apoC-II 片段及天然 apoC-II 对 LPL 酶水解 VLDL 中 TG 的影响, 结果发现 apoC-II (55-78) 及 apoC-II (43-78) 都可使 LPL 酶活性增加七倍, 但是只有后者可与 VLDL 结合, 因此 apoC-II (43-78) 含有部分能与脂质结合的区域。目前已较清楚地了解, apoC-II 的 35-50 肽片段的  $\alpha$  双性螺旋区对 apoC-II 与 LPL 的结合是十分必要的。50-78 的肽段则是 apoC-II 激活 LPL 酶的片段, 虽然它与磷脂无结合作用。

此外, Smith<sup>[95]</sup> 等分别以 Phe, Trp 和 Gly 来取代 apoC-II (50-70) 片段中的第 62 个氨基酸 Tyr, 则减少了 LPL 活性的 60-78%, 因此 62 位上的 Tyr 对酶的激活也极为重要。

近年 Gotto 实验室的研究人员进一步研究了 apoC-II 的二级结构与激活 LPL 活性的关系, 发现 apoC-II (35-78) 片段中的二个  $\beta$  转折区 (52-55 和 60-64) 对 LPL 的催化作用, 而 62 位上的 Tyr 的替换则严重影响 apoC-II 的活性。Gotto<sup>[97]</sup> 提出: 62-74 的肽段是 apoC-II 与 LPL 结合区。因此 apoC-II 对 LPL 的激活似乎不需要与底物脂蛋白或与 LPL 分子中的高度非极性亲和作用。关于 apoC-II 激活 LPL 的作用机理以及 LPL 如何水解 VLDL 中的甘油三酯尚无定论, 这是目前研究工作者感兴趣的问题。

### (3) 载脂蛋白与细胞膜受体的结合

载脂蛋白的另一重要功能是控制脂蛋白与细胞膜表面之间的相互反应, 从而调节细胞对脂蛋白的摄取量。自 Goldstein 和 Brown 发现纤维母细胞膜存在着 LDL 受体途径

以来,有关脂蛋白受体在调节胆固醇代谢中的作用,以及 LDL 受体本身基本理论的研究都有很大的进展,关于这方面的综述很多,读者可参阅文献[49,62,65,79,98,99],此处只简要介绍 apoB 和 apoE 在结合 LDL 受体中的重要作用。目前 LDL 受体、(apoB、E) 和 apoE 的受体已在许多组织中发现,包括内皮细胞、平滑肌细胞,肝脏和肾上腺皮质细胞及纤维母细胞。两种载脂蛋白可以作为配基而被细胞膜上的受体所识别。一种是 apoB<sub>100</sub>,另一种是 apoE。关于 apoE 的结构与受体结合功能及胆固醇代谢调节的关系,Weisgraber, Innerrarity 和 Mahley 等已作了许多工作<sup>[100-103]</sup>。他们主要从 apoE 的异构体 apoE-2、E-3、E-4 等的分子结构中的 apoE 精氨酸与半胱氨酸的交换,特别是精氨酸被半胱氨酸代替后在分子结构中引起的变化,严重影响了 apoE 与纤维母细胞受体的结合活性。从而引起了胆固醇或 VLDL、LDL 和  $\beta$ -VLDL 在血清中的堆积<sup>[103]</sup>,从此来阐明结构与功能的关系。Mahley 实验室的研究人员根据 Zannis 和 Breslow 的假设将 apoE 分为六种不同的表型,即 E 3/3、E 2/2、E 4/4 三种纯合子和 E 3/2、E 3/4、E 4/2 三种杂合子。它们在结构上主要在 100—200 之间的片段的一些极性氨基酸如精氨酸或赖氨酸为半胱氨酸或其他中性氨基酸所代替。一般正常型的 apoE 3/3 型在 112 和 158 位分别为半胱氨酸和精氨酸,而 E 2/2 型和 E 4/4 型在上述两处均为半胱氨酸或均为精氨酸。这种氨基酸的改变不但在等电聚焦电泳上泳动速率有明显的差异(图 24,26),而且对细胞受体的结合能力有极大的影响。纯合子 E 2/2 型几乎不能与纤维母细胞或肝细胞膜上的 apoB、E 或 E 受体结合。而纯合子的 E 4/4 型则仍能与 apoB、E 和 E 受体结合,说明在 apoE 的肽链中 158 位上精氨酸在受体的结合上极为重要。另一方面如果用亚胺环己酮(cycloheximidone)处理或还原性甲基化 apoE 分子中的部分精氨酸或赖氨酸,它的受体结合能力受到阻碍,结果延缓了 Cm 残体和 VLDL 在血浆中清除的速度。其他杂合子的受体结合能力则不同程度地降低。这是结构与功能的关系最典型的范例。这方面的研究对阐明家族性遗传性高脂蛋白血症的发病机理提供了分子基础,由于这些高脂蛋白血症的患者一般都过早发生动脉粥样硬化,因此对动脉粥样硬化的发病机理亦提供了重要线索。

## 2. 载脂蛋白的多态性

目前已知的 18 种载脂蛋白中有数种载脂蛋白表现出多态性,已知 apoA 有四—五种异构体,apoC 有三种,apoD 也有两种,apoE 则有六种以上的异构体。这些异构体大都因在等电聚焦凝胶电泳上有不同的泳动速率而被发现,然后再从分子水平和细胞水平来研究其在结构和功能上的差别,新近还用基因工程方法在基因水平来研究载脂蛋白的生物合成,发现了更多的异构体。目前以 apoA 和 apoE 的多态性与遗传性疾病的关系研究得最为广泛深入。

### (1) 载脂蛋白 A-I 的多态性

正常血清载脂蛋白 A-I 主要分布在 HDL 中,占总脂蛋白的 65%,A-II 占 23%,A-IV 只有微量,apoC/S 占 5%,D 占 2%,E 仅占 1%,其他 apo 约占 5%左右。正常 apoA-I 在 Cm 中占 33%,其他脂蛋白中 VLDL、LDL 只有少量。apo A-I 的分子量为 28,000 左右。它的氨基酸序列已搞清楚(图 14)。人血清 apoA-I 在凝胶等电聚焦电泳上表现出有六—七条带,鸭的亦有七—八条,说明它在不同种属血清 HDL 中存在着带不同电荷的异构体,有数种多态型。目前已发现 apoA-I 至少有三种主要的变异型,它们分别为

apoA-I Milano, apo A-I Marburg 和 apoA-I Münster。Weisgraber 等<sup>[104]</sup> 首先分离提纯了 apo A-I Milano 一个家族中五位成员有这种变异的 apo A-I, 它们的甘油三酯水平有轻度增加, 胆固醇接近正常, HDL 和 A-I 的水平则明显降低。A-I Milano 与患 HDL 低的其他疾病的情况不一样, 例如 Tangien disease、LCATase 缺乏症、鱼眼病和脑腱黄色瘤等, 未发现早发的心脏病。

Weisgraber<sup>[105]</sup>研究了意大利的一个家族的三个成员: 父亲、儿子和兄弟。首先发现这三个成员的 HDL 载脂蛋白在 SDS-PAG 凝胶电泳上的图象与正常人的不同。正常人的只见到 apoA-I、apoA-II 和少量的 apoC'S, 而三个 apoA-I Milano 患者 D.V. 及其儿子 D.M. 和兄弟 D.G. 的 SDS 电泳图, 除含正常的 apo A-I 和 apoA-II 外, 它们还含有 55,000 和 35,000 分子量的载脂蛋白 apoA-I 的双聚体及 apoA-I 和 apoA-II 的混合体。经  $\beta$ -巯基乙醇处理后 A-II 和 apoA-I 的 55,000 和 35,000 分子量的 apoA-I 均消失, 只有正常的 apoA-I (28,000) 带有所增加和 apoA-II 的单体(图 19)。

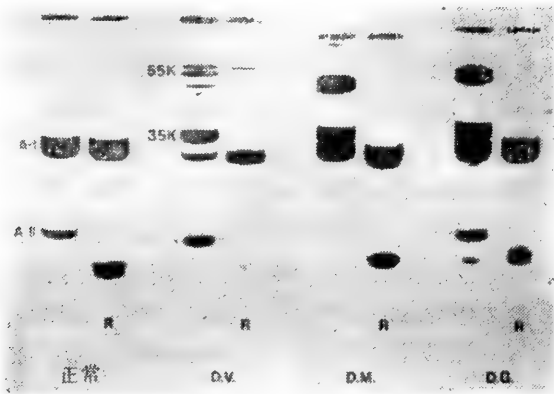


图 19 正常和 apoA-I Milano 变异型的三个家族人员的 HDL 的载脂蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺电泳图  
右: 对照, R: 以巯基乙醇还原的、加入脂蛋白蛋白量 40 $\mu$ g

进一步以等电聚焦电泳观察正常的和 Milano 变异的 HDL 和 apo A-I, 并比较以  $\beta$ -巯基处理前后二者在聚焦电泳上的差异, 发现正常 apo A-I 经  $\beta$ -巯基乙醇处理未产生电荷的变化, 而 A-I Milano 的 apoA-I 和 HDL 均向阴极转移一个电位, 与正常者没有什么差异(图 20), 说明 A-I Milano 除含有正常 apoA-I 以外, 还有一个含半胱氨酸的肽。进一步以制备型聚焦聚丙烯酰胺电泳分离纯化 A-I Milano, 并对它的氨基酸组成

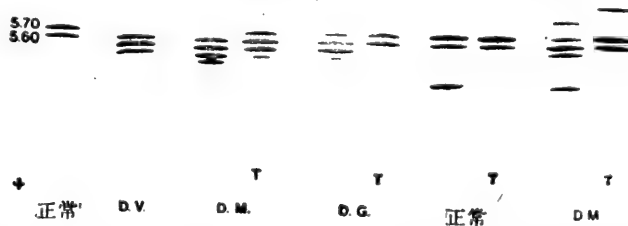


图 20 正常和 D 家族成员 apoA-I 和 HDL 的等电聚焦电泳图(pH4.6-pH6.0)  
T 代表以 0.1%(W/V)  $\beta$  巯基乙醇处理

进行分析,发现 apo a-I Milano 比正常的多一个半胱氨酸,少一个精氨酸,其余氨基酸无差异。说明 apoA-I Milano 的分子中的一个精氨酸被半胱氨酸所代替。为了进一步确定置换的位置,对 apo A-I Milano CNBr 片段 4 的序列进行了分析:发现正常 apo A-I 的 173 位上的精氨酸被半胱氨酸所取代。当用  $\beta$ -巯基丙醇-Sephrose 6 B 层析柱分析正常 A-I 和 D.M 及 D.G.A-I Cys 的含量时,发现两者在分子中的含量分别为 16.1% 和 25.7%。Weisgraber 等认为不同的 A-I Milano 含有不同量的正常 apoA-I,对 apo A-I 的遗传、控制和代谢提出了一系列饶有兴趣的问题,apo A-I 和 apo A-I Cys 之间的差异值得进一步研究。

apo A-I 除了上述 apoA-I Milano 以外,还有 apo A-I Marburg 和 apoA-I Giessen<sup>[106]</sup>以及 apoA-I Münster 1-3<sup>[107]</sup> Münster-3 变异型在等电聚焦凝胶电泳上比正常的多一个阳电荷,这一变异型与正常 apoA-I 有相同的免疫性和分子量。目前有三个不同的家族有 apo A-I Münster 3 型。为了解这些变异型的分子基础,Menzel 等<sup>[108]</sup>分析了这些变异型的部分肽链的氨基酸序列,发现家族 A 的不正常区发生在一个小的 CB<sub>2</sub> 片段(氨基残基 87-112),与正常者不同,氨基酸残基 103 正常的天冬氨酸被天冬酰胺所代替,家族 B 则在 CB-1 肽段的第 4 位上的 Proline 被 Arginine 取代,家族 C 的变异又发生在另一个区域,Proline 被 Histidine 取代。这三个氨基残基的取代都可以解释为在等电聚焦电泳上往阴极移动了一个电位。但家族 A 没有表现出有缺损性高脂蛋白血症(dyslipoproteiremia),家族血清中的胆固醇酯比正常的为少。Menzel 等称这三种 Münster 变异型为 apoA-I Münster-3 为 apoA-I (Asp<sub>103</sub>→Asn), apoA-I (Pro<sub>4</sub>→Arg)与 apo A-I (Pro<sub>3</sub>→His)<sup>[108]</sup>

Münster-3,天冬氨酸→天冬酰胺似乎不影响脂质代谢。天冬酰胺在 103 位,该位置预计是  $\alpha$  螺旋所在。由于天冬氨酸和天冬酰胺都有极性旁链,这种取代可能不致影响疏水和亲水间的性质。 $\alpha$  螺旋对 apoA-I 与脂质反应是十分重要的。

关于 apo A-I 多态性与功能的关系,即对 LCAT 的激活作用目前研究尚不多。新近我组发现鸭血清 apoA-I 在 PAGIF 上有七条明显的带,其中较酸性的一条与 LCAT 可能结合成为一复合体(apoA-I, LCAT)(图 21),这对不同等电点的 apoA-I 与功能的关系的研究将很有意义。

## (2) 载脂蛋白 E 的多态性

apoE 是 Cm 残体、VLDL 和含 apoE 的 HDL 的组成部分(图 22),含有 299 个氨基残基,分子量 34,000 左右。Rall 等 1982 年已测出其全部氨基酸的序列(图 23)<sup>[109]</sup>。该载脂蛋白含有大量的精氨酸,32 个,占 11%。其他载脂蛋白只含 1.3-6.5%,apoA-II 则不含精氨酸。此外 apoE 分子中还含有 12 个赖氨酸,碱性氨基酸的含量达 18.1%。因此 apoE 的等电点较高,Arg 在 apoE 与细胞膜上的 apoE 和 apo B,E 受体的结合有极重要的作用。上面已经谈到,如果 Arg 被一种中性氨基酸所取代,不仅表现在 apoE 的理化性质的改变,而且在功能上,即与细胞膜的受体结合

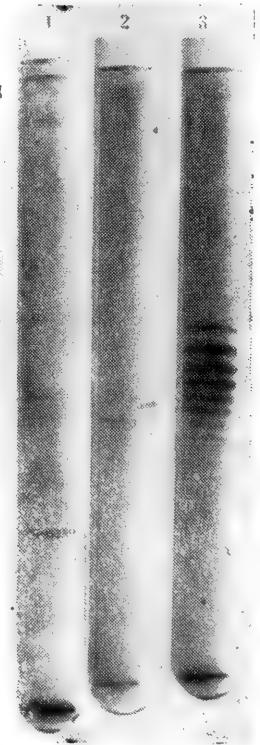


图 21 LCAT 与 apoA-I 的聚焦(PAGIF)电泳图  
1. 标准蛋白; 2. LCAT;  
3. apoA-I, pH4.0-6.5

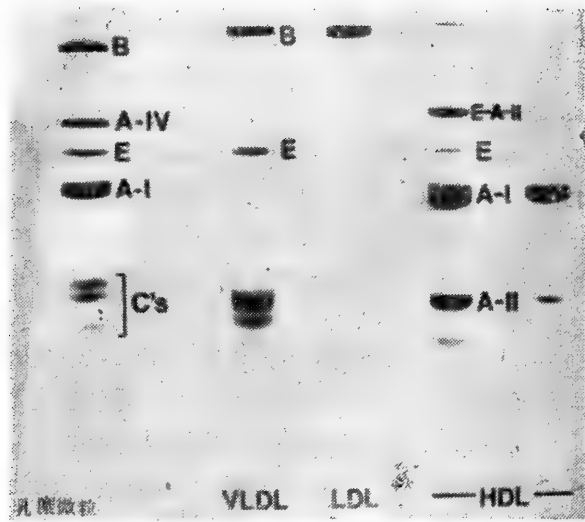


图 22 apoE 在不同脂蛋白中的分布与血清主要脂蛋白的载脂蛋白组分



图 23 人 apoE 的一级结构

也产生明显的变化<sup>[109-113]</sup>。这些情况都在缺损性β-脂蛋白和Ⅲ型高脂蛋白血症的患者血清中得到证实<sup>[113]</sup>。

此外 apoE 含有二个半胱氨酸。精氨酸的六个基因密码中(CAA,CGG,CGA,CGU 和 CGC)有二个密码与半胱氨酸的密码(UGU 和 UGC)仅差一个碱基,这种情况给 apoE 的突变带来方便,形成多种异构体的可能性是不难理解的。

目前已知 apoE 有三种主要的异构体是遗传决定的<sup>[114-116]</sup>,称为 apoE 2、apoE 3 和 apoE 4,因此可以形成三种纯合子: apoE 2/2, apoE 3/3, apoE 4/4,和三种杂合子: apoE 3/2, apoE 3/4 和 apoE 4/2。根据氨基酸序列的分析,这些纯合子的差别主要表现在分子中氨基酸残基 112 和 158 位上精氨酸和半胱氨酸的交换<sup>[113]</sup>(图 24)。

不同作者对 apoE 的表型在人群中进行了调查,见下表 3。

表 3 人群中不同 apoE 表型的分布

表型	Utermann 等	Zannis 等	Havel	Ghiselli 等	Wardell 等	Menzel 等	作者等
	%	%	%	%	%	%	%
E 4/4	3	2	3	4	1	2	1.1
E 3/3	59	49	55	55	51	63	78.9
E 2/2	1	0	1	0	1	1	—
E 4/3	24	15	26	22	25	20	9.5
E 4/2	0	3	3	0	1	3	1.1
E 3/2	13	31	12	19	20	11	9.5
例数	490	61	82	74	426	1000	

此表其他国外作者摘自参考文献<sup>[113]</sup>。

E 3/3 最常见,平均为 55.3%,E 2/2 较罕见,仅占 0.67%。E 4/3,E 3/2 及 E 4/2 分别为 22%,17.6%和 1.7%。最近王克勤、解用虹和何锦麟对部分中青年人群亦进行了 apoE 表型分布的调查,结果与其他作者基本上相同。以 E 3/3 最多,E 4/3 次之,E 4/4 和 E 3/2,E 4/2 很少,E 2/2 无(图 25)。但 E 3/3 的分布比西方国家人群者显著为高。

Zannis 和 Breslow<sup>[115]</sup>根据这种情况提出,apo E 3/3 是 apoE 的母体,而其它表型是 apoE 3/3 的变异型,这些不同的表型主要由于其一级结构的不同,即其中精氨酸和半胱氨酸,特别是在 110 到 162 序列之间所含精氨酸和半胱氨酸的置换(图 23,24) apoE 4 比 apoE 3 多一个精氨酸,即在 112 位上的半胱氨酸由精氨酸所取代,apoE 2 则比 apoE 3 少一个精氨酸(158 位上的精氨酸被半胱氨酸置换)。这些一级结构的差异完全可以说明这些表型在 PAGIF 电泳图谱上的差异:E 4 比 E 3 高一个电荷,E 2 则比 E 3 低一个电荷。

这些多态型在功能上表现明显的不同。以 apoE 能与 <sup>125</sup>I apoB 与纤维母细胞结合的竞争能力来表达 apoE 与受体结合的活性,发现 apoE 2 上 158 位上的精氨酸被半胱氨酸

Ⅲ型高脂蛋白血症

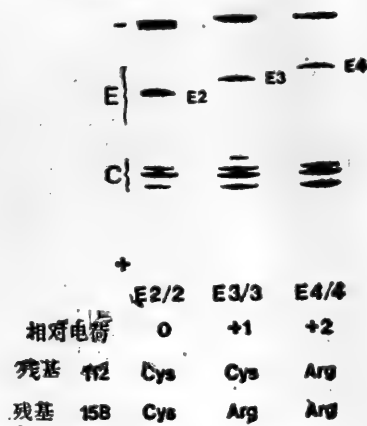


图 24 纯合子 apoE 2, E 3, E 4 的 PAGIF 图及其在氨基酸序列中精氨酸取代半胱氨酸后在电泳上所表现的电荷差别

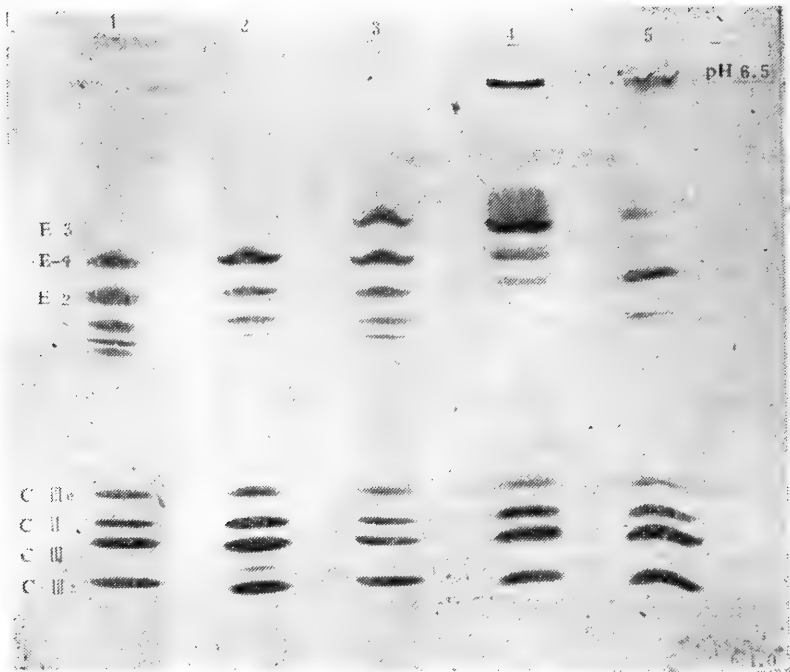


图 25 我国人血清 VLDL 等电聚焦电泳不同多态性的比较  
1. E 4/3 2. E 3/3; 3. E 3/2

所取代对其与脂蛋白受体的结合能力产生了巨大影响<sup>[117]</sup>。从图 26 可以看出 apoE 3 和 apoE 4 可以有效地与 <sup>125</sup>I 标记 LDL 与纤维母细胞膜上 apoB、E 受体结合能力相竞争。膜上的 <sup>125</sup>I LDL 几乎全部被 apoE 3 或 apoE 4 所代替,而 apoE 2 则只能取代 40% 左右(从 III 型高脂蛋白血症患者得到的)。因此说明 158 位上的 Arg 在功能上是十分重要的。158 位上有一个正电荷与受体的结合十分重要的概念,还可从其他实验结果得到支持。当以 β 巯基乙胺将 apoE 肽链中的半胱氨酸转变为精氨酸的类似物时,这样就增加了一个正电荷。从图 27 可以看到 β 巯基乙胺处理对 apoE 3 没有什么影响,而对 apoE 2 的处理则使其在结合竞争能力上有很大的增加。说明 112 位上的精氨酸或正电荷不是结合活性的关键,而 158 位上的精氨酸或增加一个正电荷是关键。

此后 Schneider 等和 Rall 等<sup>[118-120]</sup>将这一处理方法用到更多的 III 型高脂蛋白血症的患者,发现情况则变得比较复杂。不同来源的 III 型的 apoE 2 的结合活性有明显的差异,他们后来显示 apoE 2 在结合能力的不均一性是由于这些患者的 apoE 结构上有所不同,这些患者(D. R., J. T. 和 W. M.)都是 apoE 2 的纯合子,每 mol 的 apoE2 都有二个半胱氨酸,但 D. R. 的 apoE 对受体结合能力非常差,而 W. M. 的 apoE 2 则具有相当多的结合活力,虽然未达到正常 apoE 的水平。对 J. T. 和 W. M. apoE 一个肽片段的氨基酸序列分析,发现 W. M. 的 apoE 某段序列含有二个半胱氨酸残基,一个在 112 位,另一个在新的位置 145 位上,而在此位置上 D. R. 的 apoE 和 apoE3 都是精氨酸,因此发现了一例新的 apoE2 的等位基因(参阅图 28)。

除以上一些 apoE 的多态性以外,新近 Rall 等<sup>[120]</sup>运用等电聚焦电泳,比较以 β 巯基乙胺修饰后或以唾液酸苷酶水解后 apoE 在 PAGIF 电泳图上的变化,测定 apoE 部分活



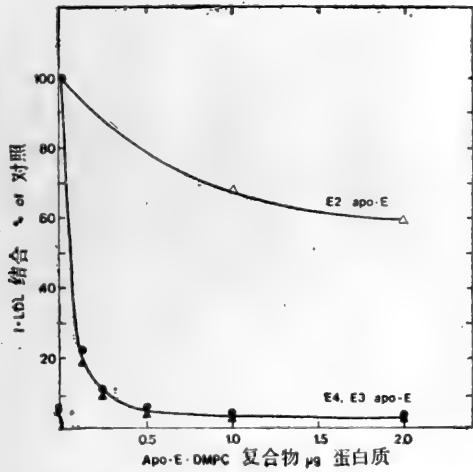


图 26 纯合子患者血清 apo E·DMPC 复合物与人  $^{125}\text{I}$  标记 LDL 结合到人纤维母细胞受体的竞争能力曲线  
 —△—: E2 apo-E; —▲—: E3 apo-E;  
 —●—: E4 apo-E

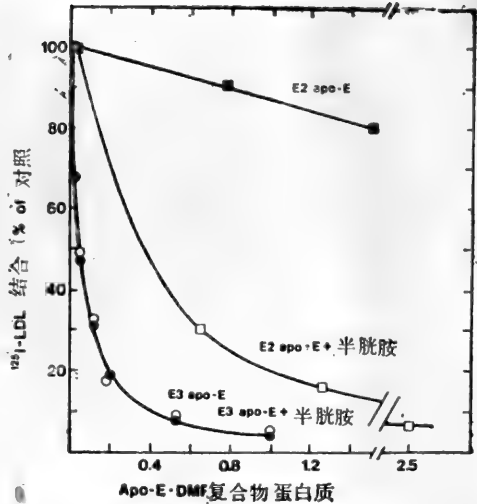


图 27 对照和巯基乙胺处理后的 apoE·DMPC 与  $^{125}\text{I}$  标记 LDL 与人纤维母细胞结合能力竞争的比较  
 —■—: 未处理的 E2 apo E·DMPC; —□—: 巯基乙胺处理的 E2 apo E·DMPC; —○—: 未处理的 E3 apo E·DMPC; —●—: 巯基乙胺处理 E3 apoE·DMPC

	112 Cys	145 Arg	158 Arg	等位基因
正 常	—————			$\epsilon 3$
	Cys	Arg	Arg	$\epsilon 3$
D. R.	Cys	Arg	Cys	$\epsilon 2$
	Cys	Arg	Cys	$\epsilon 2$
J. T.	Cys	Cys	Arg	$\epsilon 2^*$
	Cys	Cys	Arg	$\epsilon 2^*$
W. M.	Cys	Cys	Arg	$\epsilon 2^*$
	Cys	Cys	Arg	$\epsilon 2^*$

图 28 正常与不同类型的 apoE 2/2 的肽片段氨基酸的比较

性片段氨基酸的序列并与 apoE 3/3 比较,再鉴定其与  $^{125}\text{I}$  LDL 与受体结合的竞争能力等方法,又发现两例新的表型,一例为 III 型高脂蛋白血症患者血清 apoE 的多态型,该 apoE 为另一种 apoE 2 型,分子中的 146 位上的赖氨酸由谷氨酰胺取代,112 位上的仍为半胱氨酸残基。因此他们称之为 apoE2(Lys<sub>146</sub>→Gln),此多态形的受体结合能力只有 E 3/3 的 35—40%。另一例为高甘油三酯的患者,其 apoE 分子中的 127 位上的甘氨酸被天冬氨酸所代替,158 位上的精氨酸则被半胱氨酸所代替,由于它只含一个半胱氨酸,是由另一等位基因产生的异构体,称之为 E1 (Gly<sub>127</sub>→Asp, 和 Arg<sub>158</sub>→Cys)。它的受体结合能力很低,只有 E 3 的 4% 左右<sup>[121]</sup>。

用以上方法来研究 apoE 的多态性目前已发现 apoE 的多态型有九种之多,除原来的六种 E 2/2、E 3/3、E 4/4、E 3/2、E 3/4 和 E 4/2 外,现在又增加了 E 2 (Lys<sub>149</sub>→Gln), E 2 (Arg<sub>145</sub>→Cys) 和 E 1 (Gly<sub>127</sub>→Asp, Arg<sub>158</sub>→Cys) 三种多态型。

### (3) 从基因水平研究载脂蛋白的生物合成和多态性

将分子生物学应用于载脂蛋白的生物合成和多态性还是近几年的新事物。Chan 和 Jackson<sup>[122]</sup> 等是最早研究禽类 VLDL 的 mRNA 的合成的,他们作了一系列的工作<sup>[122-124]</sup>。由于人的一些载脂蛋白的一级结构已经弄清,因此有可能研究哺乳动物的 apoA-I 和 apoE 的基因表达和调控。Mahley<sup>[125]</sup> 实验室和其他一些实验室近两年来开始研究大鼠 apoE 的 mRNA 的调控和 cDNA 克隆。新近又研究人 apoEmRNA、cDNA 的克隆和核苷酸的序列,发现一新的多态型<sup>[126]</sup>。他们测定了人肝 apoE 的 mRNA 的全部核苷酸的序列。分析最长的 cDNA 显示 mRNA 有 1,157 核苷酸,其中包括四个区域:(1) 不转录区含 5' 端的 61 个核苷酸;(2) 信号肽区有 18 个氨基酸;(3) 成熟的蛋白区,相当于 apoE 的 299 氨基酸;(4) 3' 端不转录区含 142 核苷酸。从两种 cDNA 推断出的氨基酸序列相同。与过去 Weisgraber 报道的 apoE 3 相符。但第三种 cDNA 与其他两种 cDNA 在五个核苷酸的位置不同。其中三个不同位置发生在氨基酸密码子(Codons)的第三个核苷酸,结果引起氨基酸残基 Val<sub>85</sub>, Ser<sub>223</sub> 和 Gln<sub>248</sub> 的置换,而另两个变异的核苷酸则发生在 Codon 的第一个核苷酸的位置,引起了编码氨基酸的变化。在有变异的序列中,99 位上正常的氨基酸残基丙氨酸被苏氨酸所代替。152 位上的丙氨酸则为脯氨酸所代替。因此他们认为人肝中的 ε 3 遗传表型(genotype)是杂合子的。这一变异型的 cDNA 虽然导致氨基酸的置换,但是由于置换是中性氨基酸对中性氨基酸(即 Ala<sub>99</sub>→Thr 和 Ala<sub>152</sub>→Pro),因此一般用于 apoE 表型分类的聚焦电泳方法不可能检出这种变化。由氨基酸 140—160 氨基酸残基正是 apoE 与受体结合的重要区。脯氨酸取代了 152 位上的丙氨酸的变异型可能引起与受体结合功能上的变化,因此这种变异型在临床上有其重要意义。

## 六、结 束 语

高脂蛋白血症是冠心病的主要危险因素,在欧美等国的卫生机构和医学院校不惜资金大力开展脂蛋白和载脂蛋白的结构、功能与代谢及其与动脉粥样硬化的关系的研究。这些投资在近十余年中已获得了丰硕成果,使脂蛋白和载脂蛋白的研究有了飞速的进展。目前不仅能分离提纯不同密度的脂蛋白的亚类,而且还可分离不同功能的亚类,这对载脂蛋白的结构和功能及其在各种脂蛋白之间的相互交换创造了良好条件,估计今后将会发现更多功能上不同的亚类。

载脂蛋白是目前研究脂蛋白的焦点,不仅在数量上有很大增加,对其结构和功能亦较深入广泛的了解。特别是近年将研究蛋白质、核酸、基因工程、单克隆抗体及受体等先进技术和方法应用到载脂蛋白,使载脂蛋白的研究提高到一个新的水平,可从细胞水平、分子水平和基因水平来探讨其基因多态性与遗传性疾病的发病机理。特别是近年对一些家族性高脂蛋白血症的发病的分子基础得到了阐明,有些作者还提出了“载脂蛋白分子病”的观点。这些成果不仅在理论上具有重要意义,在实际应用中亦很有价值,将对动脉粥

样硬化的发病机理的阐明有所突破,从而对冠心病的诊断和防治提供新的途径和措施。

由载脂蛋白、磷脂和胆固醇相互反应而形成的蛋白脂质体的研究目前尚是一块处女地,它的研究将为脂蛋白和载脂蛋白的研究开辟一个新的领域。可以想象,如果能制备一些具有特异识别功能的蛋白脂质体,它将成为一种“生物导弹”,有目的地治疗一些目前尚无有效办法来治疗的一些疾病,如象遗传性疾病和恶性肿瘤等,它还可降低药物的使用量和副作用,增加疗效。它的潜力是十分巨大的,正等待着一些有卓识远见的有志之士去开拓,前景是十分广阔的!

基因工程和单克隆 cDNA 等技术在脂蛋白中的应用还是近几年的新事,在载脂蛋白的生物合成和调控以及在载脂蛋白多态性的研究中已显示出它的威力,即可发现现有分型方法不易解决的基因多态型,还可了解载脂蛋白的代谢合成、分泌和加工的全过程及其调控机理。这些研究目前虽刚刚开始,但受到一些实验室的关注,做出了可喜的成绩,其前途是十分广阔的,估计不久的将来会有飞跃的发展。

总之,脂蛋白和载脂蛋白的研究愈来愈深入,它们的应用范围也愈来愈广泛,预计今后十年将会涌现更丰硕的成果和更有意义的发现,这将在理论上对动脉粥样硬化的发病机理的阐明提供理论依据,在实际应用上对冠心病的诊断提供新的方法,从而对其预防和治疗提出新的途径和更有效的措施。

附表 1 血清载脂蛋白的某些性质及其分布

载脂蛋白	分子量	等电点	分布
A I	28,300	5.52,5.65(主要),5.36,5.40,5.85(次要)	HDL(60%),淋巴液(7%)
A II	17,400(双聚体)	5.05	HDL(25%),淋巴液(4%)
A IV	46,000	5.5(主要)	Chylos(7%)
B <sub>100</sub>	264,000	3.90,4.75,5.27,5.60	小肠的淋巴液(20%)
B <sub>100</sub>	?	3.90,4.75,5.27,5.60	LDL(98%), VLDL(40—60%)
C I	6,600	~7.5	淋巴液(14%)VLDL(4%) HDL(1—5%)
C II	8,800	4.86(主要),4.69(次要)	淋巴液(14%),VLDL(7—10%) HDL(1—3%)
C III	9,200—9,700	5.02,4.82,4.62	淋巴液(34%)VLDL(35—40%) HDL(3—5%)
D	19,000—26,000	~4.83(主要)	HDL(<4%)
E	33,000—39,000	6.02,5.89,5.78,5.64(主要)>10(次要)	DLDL(13%)HDL(<2%)
F	26,000—32,000	3.7	HDL(次要)
G	72,000		HDL(次要)
$\beta_2$ -糖蛋白 <sup>-1</sup>	40,000—45,000		淋巴液(+)VLDL(4%) HDL(次要)
HLA-A9	86,000		HDL(次要)
Lp(a)多肽	—200,000		Lpa(12%)
脯氨酸丰富蛋白	74,000	6.4	淋巴液(次要)
苏氨酸贫缺	40,000;10,000	6.0,6.5	HDL(痕量)
胆固醇酯转移蛋白			缺血血浆

## 参 考 文 献

- [1] Alaupovic, P., *Atherosclerosis*, **13** (1971), 141.
- [2] Ott, Gary S and Shore Virgie, Analytical and preparative of plasma apolipoproteins. Lawrence Livermore National Laboratory, 1982.
- [3] Havel, R. J., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **34** (1955), 1345.
- [4] Patsch, J. R., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **15** (1974), 356.
- [5] Chung B. H., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **21** (1980), 284.
- [6] Chapman, M. J., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **22** (1981), 339.
- [7] Schmitz, G., *J. Lipid Res.*, **23** (1982), 865.
- [8] 张英珊、王克勤等, 生物化学与生物物理学报, 14卷(1982), 1—8页。
- [9] 王克勤、张英珊等, 生物化学与生物物理学报, 14卷(1982), 207—216页。
- [10] 陈保生、王克勤、王健美, 生理科学, 第四卷, 2期(1984), 40页。
- [11] 王克勤、解用虹, 中国医学科学院学报, 第五卷(1)(1983), 9—15页。
- [12] 王克勤、李志高、郝杆林, 生物化学与生物物理学报, 第17卷(1985), 111页。
- [13] 王克勤、何锦麟, 生物化学杂志, 第2卷(1986), 15。
- [14] Jackson, R. L., *et al.*, *Physiological Review*, **56** (1976), 259.
- [15] Deckelbaum, R. J. G., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **252** (1977), 744.
- [16] Stoffel, W., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71** (1974), 3696.
- [17] Assmann, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71** (1974), 989.
- [18] Stoffel, W., *et al.*, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem.*, **360** (1979), 197., **360** (1979), 685.
- [19] Edelstein, C., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **20** (1979), 143.
- [20] Scanu, A. M., *Lipids*, **4** (1979), 7.
- [21] Schwartz, D. E., *et al.*, *Circulation* **58** Suppl, 2, II-90 (1978).
- [22] Glickman, R. M., *et al.*, *Science*, **193** (1976), 1254.
- [23] Krause, B. R., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **22** (1981), 610.
- [24] Schonfeld, G., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **61** (1978), 1539.
- [25] Green, P. H., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **65** (1980), 911.
- [26] Imaizumi, K., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **19** (1978), 1038.
- [27] Windmueller, H. G., Wu, A. L., *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 3012.
- [28] Patsch, J. R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75** (1978), 4519.
- [29] Redgrave, T. G., Small, D. M., *J. Clin Invest.*, **64** (1979), 162.
- [30] Hui, D. Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 5646.
- [31] Mahley, R. W., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **68** (1981), 1197.
- [32] Floren, C. H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 425.
- [33] Zilversmit, D. B., *Circulation* **60** (1979), 473.
- [34] 王克勤、何锦麟, 生理科学, 第二卷(1982)。
- [35] Patsch, J. R., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **253** (1978), 4911
- [36] Eisenberg, S. In "Progress in Biochemical Pharmacology" R. Paoletti (ed), **P, 139** (1979). S. Karger New York.
- [37] Tall, A. R., and Small, D. M., *New Engl. J. Med.*, **299** (1978), 1232.
- [38] Deckelbaum, R. J. and Eisenberg, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **254** (1979), 6079.
- [39] Wang, K. Q., Chen, B. S., He, J. L., Xie, Y. H., and Wang, D. B. in "Proteins in Biology and Medicine", R. A. Bradshaw *et al* (eds). 281—308. (1982), Academic Press, New York.  
王克勤等, 中国医学科学院学报, 第7卷(4), 1985, 328.
- [40] Assmann, G. Lipid Metabolism and Atherosclerosis, F. K. Schattauer Verlag GmbH., Stuttgart, Germany, (1982) 31.
- [41] Tam, S. P., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **22** (1981), 641.
- [42] Grosser, J., *J. Lipid Res.*, **22** (1981), 437.
- [43] Nicoll, A., Lewis, B., *Eur. J. Clin Invest*, **10** (1980), 487.
- [44] 王克勤、王大宝、陈保生, 中国医学科学院学报, 第7卷(1985)。
- [45] Janus, E. D., *et al.*, *Eur. J. Clin. Invest* **10** (1980), 149.
- [46] Eisenberg, S., Levy, R. L., Lipoprotein Metabolism, *Adv. Lipid Res.*, **13** (1975), 1.
- [47] Sigurdsson, G., *et al.*, *J. Clin Invest*, **56** (1975), 1481.
- [48] Herbert, P. N., *et al.*, In The Metabolic Basis of Inherited Disease, Stanbury J. B., *et al.*, (Eds), McGraw Hill, New York Ch. 28(1977).

- [49] Goldsteins, J. L., Brown, M. S. *Ann Rev. Biochem.*, **46** (1977), 897.
- [50] Brown, M. S., *et al.*, *Ann N. Y. Acad. Sci. USA.* **275** (1976), 244.
- [51] Goldstein, J. L., Brown, M. S., *Metabolism*, **28** (1977), 1257.
- [52] Brown, M. S., Goldstein, J. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76** (1979), 3330.
- [53] Brown, M. S., Kovanen, P. T. and Goldstein, J. L., *Science*, **212** (1981), 628.
- [54] Brown, M. S., *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **348** (1980), 48.
- [55] Basu, S. K., Goldstein, J. L., *et al.*, *Cell* **24** (1981), 493.
- [56] Goldstein, J. L., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **250** (1975), 8487.
- [57] Brown, M. S., Goldstein, J. L. *In* Disturbances in lipid and lipoproteins Metabolism, Dietschy, J. M., Gotto, A. M. Jr. and Ontko J. (Eds), American Physiological Society, Bethesda, p. 173 (1978).
- [58] Brown, M. S., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **249** (1974), 789.
- [59] Chin, J., and Chang. T. Y., *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 6304.
- [60] Goldstein, J. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **71** (1974), 4288.
- [61] Brown, M. S., Goldstein, J. L., *Cell*, **6** (1975), 307.
- [62] Goldstein, J. L., Brown, M. S., *Ann. Rev. Genet.*, **13** (1979), 259.
- [63] Goldstein, J. L., *et al.*, *Cell*, **12** (1977), 629.
- [64] Goldstein, J. L., *et al.*, *Proc. Natl. Academy Sci. USA.*, **72** (1975), 1092.
- [65] Anderson, R. G. W., *et al.*, *Nature*, **270** (1977) 695.
- [66] Goldstein, J. L., Brown, M. S., *Johns Hopkin Med. J.*, **143** (1978), 8.
- [67] Goldstein, J. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76** (1979), 333.
- [68] Mahley, R. W., *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **348** (1980), 265.
- [69] Brown, M. S., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **82** (1979), 597.
- [70] Shimada, Y., *et al.*, *Eu. J. Biochem.* **118** (1981), 557.
- [71] Kita, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78** (1981), 2268.
- [72] Schneider, W. J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 11442.
- [73] Pitas, R. E., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76** (1979), 2311.
- [74] Pitas, R. E., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 5454.
- [75] Mahley, R. W., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **64** (1979), 743.
- [76] Mahley, R. W., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76** (1979), 1746.
- [77] Goldstein, J. L., *et al.*, *Nature*, **279** (1979), 679.
- [78] Kovanen, P. T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 5591.
- [79] Brown, M. S. and Goldstein, J. L., *Scientific American* **251** (1984).
- [80] Schaefer, J. E., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **80** (1978), 405.
- [81] 李志高、王克勤, 生物化学与生物物理学报, 第 17 卷(2) (1985)239.
- [82] 李尧周、王克勤, <sup>125</sup>I apoC-II 标记的 VLDL 和 <sup>125</sup>I apoC-II 标记的 HDL 在脂蛋白之间的转换 中国医学科学院学报(待发表).
- [83] Nikkila, E. A., *et al.*, *Atherosclerosis*, **29** (1978), 497.
- [84] Nikkila, E. A., *Eur. J. Clin Invest.*, **8** (1978), 111.
- [85] Kuusi, T., *et al.*, *Atherosclerosis*, **36** (1980), 589.
- [86] Patsch, J. R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75** (1978).
- [87] Nichols, A. V., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100** (1981), 391.
- [88] Schmitz, G., *et al.*, *Clin Chem Acta.*, **119** (1982), 225.
- [89] Shrill, B. C., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 1804.
- [90] Innerity, T. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78** (1981), 4378.
- [91] Oram, J. F., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 8348.
- [92] Pownall, H. J., Sparrow, J. T. and Gotto, A. M. Jr., *In* High Density Lipoprotein and Atherosclerosis. A. M. Gotto, Jr, *et al.*, (eds), 5—18. (1978). Elsevier/North-Holland, Biomedical press, New York.
- [93] Morrisett, J. D., *et al.*, *Biochimica Biophysica Acta*, **472** (1977), 93—133.
- [94] Kinnunen, P. K. J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74** (1977), 4848.
- [95] Smith, L. C., *et al.*, *Ann NY Acad. Sci.*, **348** (1980), 213—223.
- [96] Catapano, A. L., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **89** (1979), 951—957.
- [97] Gotto, A. M. Jr., *In* "Atherosclerosis VI". G. Schettler *et al.* (Eds), **469** (1983), Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- [98] Brown, M. S., Kovanen, P. T., Goldstein, J. L., *Science* **252** (1981), 628.
- [99] Goldstein, J. L., Anderson, R. G. W., Brown, M. S., *Nature*, **279** (1979), 679.

- [100] Mahley, R. W. and Innerarity, T. L., *Biochimica Biophysica Acta.*, **737** (1983), 197—222.
- [101] Weisgraber, K. H., Rall, S. C. Jr., Mahley, R. W., *J. Biol. Chem.*, **256** (1981), 9077—9083.
- [102] Mahley, R. W., *Ann NY Acad Sci.*, **348** (1980), 265.
- [103] Weisgraber, K. H., Innerarity, T. L. and Mahley, R. W., *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 2518.
- [104] Weisgraber, K. H., Bersot, T. P. and Mahley, R. W., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **68** (1980), 901.
- [105] Weisgraber, K. H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **258** (1983), 2508.
- [106] Utermann, G., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 501—507.
- [107] Menzel, H. J., *et al.*, *J. Lipid Res.*, **23** (1982), 121—138.
- [108] Menzel, H. J. and Assmann, G., *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 3070—3076.
- [109] Rall, S. C., Jr., Weisgraber K. H., Mahley R. W., *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 4171.
- [110] Mahley, R. W., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **252** (1977), 7279.
- [111] Weisgraber, K. H., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **253** (1978), 9053.
- [112] Mahley, R. W., *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **348** (1980), 265.
- [113] Mahley, R. W. and Angelin B. O. *Advances In Internal Med.*, **29** (1984), 385.
- [114] Zannis, V. I. and Breslow J. L., *Biochemistry*, **20** (1981), 1033—1041.
- [115] Zannis, V. I., *et al.*, *Ann. J. Hum. Genet.*, **35** (1981), 111.
- [116] Zannis, V. I., *J. Lipid., Res.*, **23** (1982), 911.
- [117] Weisgraber, K. H., Innerarity T. L. and Mahley. R. W., *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 2518.
- [118] Schneider, W. J., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **68** (1981), 1075.
- [119] Rall, S. C. Jr. Weisgraber, K. H., Innerarity T. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79** (1982), 4696.
- [120] Rall, S. C., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **72** (1983), 1288—1297.
- [121] Mclean, J. W., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 6498—6504.
- [122] Chan, L., Jackson R. L., *et al.*, *J. Clin Invest.*, **58** (1976), 368—379.
- [123] Chan, L., *et al.*, *Biochemistry*, **19** (1980), 5631—5637.
- [124] Chan, L., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **255** (1980), 10063.
- [125] Mclean, J. W., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **258** (1983), 8993—9000.
- [126] Mclean, J. W., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 6498.
- [127] Hospattankar, A. V. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 318.
- [128] Sharpe, C. R., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **12** (1984), 3917.
- [129] Jackson, C. L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **81** (1984), 2945.

# 癌基因与肿瘤酶学及癌变原理的研究

李士谔

(中国医学科学院基础医学研究所)

## 一、肿瘤酶和同工酶活性变化的特点

## 二、癌基因与肿瘤基因表型的变化

### 1. 酶与代谢的不平衡

### 三、基因调控与癌变原理

### 2. 胚胎型酶与同工酶的基因表达

癌细胞的生物学特性,如无限增殖、分化不良、浸润周围组织和转移等,是致癌因素(化学致癌物、病毒、辐射等)引起靶细胞基因表达调控异常的结果。基因调控异常表现为蛋白质生物合成的错乱,产生异常的酶和同工酶谱以及胚胎性抗原和异位性蛋白质、激素等。其中以酶和同工酶的变化最为重要。在正常情况下,酶活性受激素和营养等因素的调节控制;酶在细胞内有一定的组织和定位;有些酶具有一定的组织器官特异性以行使组织器官的特殊功能。酶具有多种分子形式(同工酶),各种同工酶也有其组织特异性和特异的生理功能。在肿瘤及细胞癌变过程中,酶和同工酶发生有次序和规律性的改变,这些改变可能是由于酶基因转录水平的调控异常,因而癌的发生与某些酶基因的调控异常有关。近年来的研究表明,癌基因可能通过其表达产物转化蛋白直接或间接引起某些蛋白质(包括酶和同工酶)的基因表达调控异常,从而引起细胞癌变,而肿瘤中癌基因的激活和表达又可能是通过癌基因的调控如基因的位移、基因促进子的插入等机制,因而可以认为基因调控是癌变原理研究中的一个中心问题,在肿瘤防治研究中具有重要的理论和实际意义。

## 一、肿瘤酶和同工酶活性变化的特点

一般说来,在肿瘤及癌变过程中,与细胞功能分化有关的组织特异酶或同工酶的活性降低或消失(去分化),同时与细胞增殖有关的酶和同工酶活性升高;某些成年型同工酶活性降低或消失,同时出现胚胎型同工酶和胚胎型抗原(返分化);甚至出现异位性酶、激素和多肽物质(异常分化);而一些与维持细胞基本功能必需的酶和结构蛋白质则变化不大。

### 1. 酶与代谢的不平衡

Weber等<sup>[1]</sup>以不同生长速度和分化程度的 Morris 肝癌为材料,发现与合成代谢有关的酶活性及分解代谢有关的酶活性的变化呈相反关系。在核酸代谢中,与嘌呤、嘧啶、RNA、DNA 合成有关的酶活性都较正常肝高;相反,与核苷及核苷酸分解有关的酶活性则降低。在蛋白质代谢中,蛋白质生物合成(氨基酸参入)的活性升高,而氨基酸分解酶的活



性则降低。在糖代谢中,糖酵解(葡萄糖分解)的酶活性升高,糖异生(葡萄糖合成)的酶活性降低。上述酶活性的变化与肝癌生长速度和分化程度有一定的相关关系,生长快、分化差的肝癌的变化程度最大,而某些所谓“最小偏差”肝癌的酶谱接近正常。

肿瘤酶与代谢的不平衡,还表现在细胞增殖与分化的有关酶系的变化方面。在化学致癌过程中,与细胞增殖有关的酶活性升高,同时与功能分化有关的组织特异酶活性降低(表1)<sup>[2-6]</sup>。在二乙基亚硝胺(DENA)诱发大鼠肝癌过程中,尿素合成酶-氨甲酰磷酸合成酶 I (CPS I)和鸟氨酸氨甲酰转移酶(OCT)的活性降低,而嘧啶合成酶-天冬氨酸氨甲酰转移酶(ACT)活性升高,这些变化与发育过程中这两类酶活性的相互变化恰好相反,可见癌变过程是返分化过程。值得注意的是,ACT/OCT 和 ACT/CPS I 活性比值的变化在 DENA 引癌早期是可逆的,可以恢复正常,而在癌变期的变化是不可逆的,直至癌的形成。引癌早期的变化与肝再生过程相似,是非特异性的,而后期的变化则可能与癌变有关<sup>[9]</sup>。在鸟氨酸代谢中,与细胞增殖有关的鸟氨酸脱羧酶(多胺合成关键酶)在肝癌及 DENA 诱发肝癌早期活性升高,而与尿素合成有关的 OCT 活性则降低。糖异生代谢主要存在于肝脏和肾皮质,有一定的组织特异性;糖酵解代谢产生 ATP,用于蛋白质、DNA 合成,因而与细胞的增殖有关。肝癌中糖酵解的关键酶活性升高,同时糖异生的关键酶活性降低,也可看作是细胞增殖与功能分化的不平衡。

表 1 化学致癌过程中酶活性的变化

致 癌 过 程	活 性 升 高	活 性 降 低
3'-甲基胆蒽诱发 小鼠皮肤癌	乳酸脱氢酶 组织蛋白酶 二肽酶	谷氨酸脱氢酶 谷氨酰胺酶 (磷酸激活)
3'-甲基奶油黄 诱发大鼠肝癌	G-6-p 脱氢酶 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶  二肽酶 谷胱苷肽还原酶	鸟氨酸氨甲酰转移酶 谷氨酸脱氢酶 谷丙转氨酶 酪氨酸转氨酶 苏氨酸水酶 谷氨酰胺酶 (磷酸激活)
二乙基亚硝胺 诱发大鼠肝癌	天冬氨酸氨甲酰转移酶 鸟氨酸脱羧酶	鸟氨酸氨甲酰转移酶 鸟氨酸转氨酶 氨甲酰磷酸合成酶 I

由于核苷酸、蛋白质、氨基酸的合成与分解的不平衡,致使细胞的核酸、蛋白质合成旺盛;由于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的增高,致使戊糖代谢活跃,产生较多的 NADPH 和戊糖,用于核酸及其他代谢物的合成;由于腺苷酸环化酶活性降低,同时 cAMP 磷酸二酯酶活性升高,致使 cAMP 水平降低,而 cAMP 对细胞分裂有抑制作用。这些变化的结果都有利于癌细胞的生长。细胞增殖与功能分化的异常平衡将使细胞增殖旺盛,同时失去分化,使细胞趋于不成熟,可能是细胞癌变的重要因素。

## 2. 胚胎型酶与同工酶的基因表达

Greenstein<sup>[7]</sup>最先发现肝癌的酶谱与胎儿的相似,首次提出恶性肿瘤向胚胎回复的概念。Weber 等<sup>[11]</sup>观察到一些代谢中的关键酶在肝癌与发育肝的变化是类似的,例如正常

肝中活性较高的酶如葡萄糖激酶、精氨酸酶、黄嘌呤氧化酶等,在肝癌则降低到胎儿肝的水平。相反,一些在正常肝活性很低的酶,如胸腺嘧啶核苷激酶、核糖核苷酸还原酶、dCMP脱氨酶、TMP 激酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶等活性在肝癌中显著增高,达到胎儿肝及新生肝的水平。但再生肝也出现类似的情况。Knox<sup>[9]</sup>比较了大鼠成年肝、胎儿肝与移植性 Morris 肝癌的 66 种酶,发现胎儿肝与生长快的肝癌不仅缺少相同的成年型酶,而且含有同样的胎儿型酶;在慢速生长的肝癌中,出现胎儿型酶的趋向较之成年型酶的丢失更为典型。

Schapira<sup>[9]</sup>指出,肿瘤组织同工酶的变化是逐渐失去组织特异型,而代之以胎儿组织或其他组织(异位性)的同工酶。表 2 列举了一些表达胚胎型同工酶的例子。

胚胎型同工酶在肿瘤的表达是一种普遍现象,有重要的生物学意义,成年型同工酶与组织的特异代谢功能有关,而胚胎型同工酶则与细胞增殖有关,肿瘤中成年型同工酶减少,使细胞的特异功能降低,同时胚胎型同工酶增高,使细胞增殖旺盛,趋于不成熟状态。再者,受激素、营养因素调控的同工酶如糖酵解同工酶,在肿瘤中往往被不易受这些因素调控的同工酶取代,因而有利于肿瘤不受机体控制的生长<sup>[10]</sup>。同工酶的改变对细胞代谢途径也有影响,例如 CPS I 是肝脏尿素合成的关键酶,CPS II 是嘧啶合成的关键酶,肝癌中 CPS I 减少,CPS II 增多,使尿素合成与嘧啶合成代谢失去正常平衡,以致肝癌的核酸合成旺盛。

表 2 肿瘤中表达胚胎型同工酶的例子

醛缩酶	胸腺嘧啶核苷激酶
丙酮酸激酶	尿嘧啶核苷激酶
糖原磷酸化酶	DNA 聚合酶
己糖激酶	dCMP 脱氨酶
$\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶	氨基葡萄糖-6-磷酸合成酶
醇脱氢酶	核糖核苷酸还原酶
支链氨基酸转氨酶	碱性磷酸酶
谷氨酰胺酶	$\gamma$ -谷氨酰转肽酶
鸟氨酸脱羧酶	谷胱苷肽-5-转移酶
tRNA 甲基化酶	氨基己糖苷酶
纤维蛋白酶原激活因子	

有些肿瘤还出现其来源组织以外的同工酶,即异位性同工酶,例如磷酸果糖激酶、肌酸激酶。也有的酶如尿酸酶,其活性在肝癌中降低,但在再生肝及胎儿肝并不降低<sup>[11]</sup>。这些都说明肿瘤中基因型的改变是由于基因组的表达发生了紊乱,因此癌的发生不能简单地认为是去分化或返分化的问题。

在了解肿瘤酶的变化与细胞癌变关系时,有必要了解肿瘤酶变化的生化机制。除了某些次级同工酶如 rGT 和芳香酰胺酶的糖基部分在肿瘤有所改变外,尚未发现与正常不同的酶和同工酶。动力学和免疫学实验证明,肿瘤酶和同工酶的变化主要是由于酶蛋白量的变化。体内及体外实验证明,肝癌及喂 DENA 大鼠肝 CPS I 活性的降低与酶生物合成速度的降低是相关的<sup>[12]</sup>,肝癌中 CPS I 合成的改变与聚核糖体所含可翻译的酶 mRNA 的变化有关<sup>[13]</sup>。cDNA 分子杂交实验证明,肝癌中 OCT 及 CPS I 活性的降低与其相应的 mRNA 含量的下降有关<sup>[14,15]</sup>,说明肿瘤中酶活性的变化可能发生在转录水平。但是酶和同工酶水平的变化不仅受酶合成的影响,也受酶降解的影响,肿瘤酶和同工酶的变化可

能同时存在着合成与降解的调控问题。例如 LDH 由 A, B 亚基组成, 在心脏主要含 B 亚基, 经证明 B<sub>4</sub> 的合成速度大于 A<sub>4</sub>, 而降解速度较慢<sup>[16]</sup>。另外, 肿瘤酶活性的变化也可能发生在转译水平。例如肝癌中一些与 DNA 合成有关的酶如 dCMP 脱氨酶、TMP 激酶、核糖核苷酸还原酶、胸腺嘧啶核苷激酶等的表达增高, 对转录抑制物不敏感; 相反, 一些肝组织特异酶如色氨酸吡咯酶、苏氨酸去水酶、酪氨酸转氨酶等在肝癌的表达降低, 对转译抑制剂比对转录抑制剂更为敏感。表明癌变时这类酶 mRNA 变得更不稳定, 以致转译的效果降低, 甚至停止, 同时无转译活性 mRNA 的堆集可引起对转录的反馈抑制<sup>[17]</sup>。

## 二、癌基因与肿瘤基因表型的变化

肿瘤酶活性及其他基因表型的变化似有一定的规律性和特异性, 尽管一些正常增生组织如再生肝也有与肿瘤相似的基因表型的变化, 但它们是可逆的, 可以恢复正常, 而肿瘤组织的变化是不可逆的。肝再生时出现返分化, 但可以再分化, 而肿瘤则部分或全部失去自行再分化的能力, 以致无限制生长。因而提出问题, 肿瘤特异基因表型的变化是什么原因引起的, 是否与癌基因的表达有关? 癌基因产物转化蛋白, 与细胞癌变有密切关系, 例如对温度敏感的鸡肉瘤病毒(RSV)变异株(含 src 癌基因), 在允许温度(35℃)下生长, 使正常细胞转化, 当转到非允许温度(41℃), 转化细胞回复到正常状态<sup>[18]</sup>。经证明癌基因产物 pp60<sup>src</sup> 是负责细胞转化的蛋白质。类似实验证明, p21 是大鼠肉瘤病毒引起细胞转化并维持其恶性表型的转化蛋白<sup>[19]</sup>。化学致癌物引起细胞癌变也有转化蛋白的产生<sup>[20,21]</sup>。目前已发现 20 余种癌基因, 因而有多种转化蛋白, 其性质和细胞定位列于表 3。

表 3 癌基因与转化蛋白

癌基因	转化蛋白 (病毒基因产物)	细胞同类物	性质与功能	细胞定位
ras <sup>H</sup> (Harvey, Rasheed,bas)	p21 <sup>v-H-ras</sup>	p21 <sup>c-H-ras</sup>	苏氨酸蛋白激酶活性 GDP/GTP 结合 GTP 酶活性	细胞质膜
ras <sup>K</sup> (Kirsten)	p21 <sup>v-K-ras</sup>	p21 <sup>c-K-ras</sup>		
ras <sup>N</sup> (N-ras)	p21 <sup>N-ras</sup>	p21 <sup>c-N-ras</sup>		
src	pp60 <sup>v-src</sup>	pp60 <sup>c-src</sup>	酪氨酸蛋白激酶活性	细胞质膜
fes	p85 <sup>gag-fes</sup>	p92 <sup>c-fes</sup>	同 上	细胞质膜, 细胞质
fps	p140 <sup>gag-fps</sup>	p98 <sup>c-fps</sup>	同 上	细胞质膜, 细胞质
abl	p150 <sup>gag-abl</sup>	p150 <sup>c-abl</sup>	同 上	细胞质膜
yes	p90 <sup>gag-yes</sup>		同 上	
ros	p68 <sup>gag-ros</sup>		同 上	
fgr	p70 <sup>gag-fgr</sup>		同 上	
erb-B	gp65 <sup>erb-B</sup>	与 EGF 受体 结构同源		细胞质膜
erb-A	p75 <sup>gag-erb-A</sup>	与碳酸酐酶 结构相关		细胞质
mos	p37 <sup>mos</sup>		有酪氨酸蛋白激酶 结构但无该酶活性	细胞质
raf/mht <sup>a</sup>			同 上	
fms			同 上	
rel			同 上	
sib	p28 <sup>sib</sup>	与 PDGF-B 链 结构同源		细胞质
myc	p110 <sup>gag-myc</sup>	p58 <sup>c-myc</sup>	DNA 结合	细胞核
fos	p55		与	同 上
myb			DNA 结合	同 上
ski				同 上
Bly <sup>n</sup>				同 上

a. raf 与 mht 是小鼠肉瘤病毒和鸡 MH<sub>2</sub> 病毒相似的癌基因。

从表 3 可见,一些癌基因如 *src*, *fes/fps*, *abl*, *yes*, *ros*, *fgr* 的产物,位于细胞膜,具有酪氨酸蛋白激酶活性,其特点是自身磷酸化以及使细胞蛋白质磷酸化,磷酸化的部位都是在底物蛋白质的酪氨酸残基。许多事实说明,酪氨酸蛋白激酶活性与细胞癌变有关:(1) RSV 转化细胞中磷酸酪氨酸含量较未转化细胞增加 5—10 倍<sup>[22,23]</sup>。(2) pp60<sup>src</sup> 分子含有磷酸酪氨酸及磷酸丝氨酸,点突变实验证明,不含磷酸酪氨酸及磷酸丝氨酸的 pp60<sup>src</sup> 仍具有酪氨酸蛋白激酶活性及转化正常细胞能力<sup>[24,25]</sup>,但如将 433 位苏氨酸残基换成丙氨酸,则失去其蛋白激酶和转化细胞的活性<sup>[26]</sup>。(3) 许多肿瘤病毒证明是通过酪氨酸磷酸化的途径使细胞转化的<sup>[27]</sup>。另一方面,磷酸化蛋白又可通过磷酸酶的去磷酸作用而使癌细胞向正常逆转<sup>(27a)</sup>。重要的问题是 pp60<sup>src</sup> 如何引起细胞基因型的改变,从而引起细胞癌变。Cooper 和 Hunter 等<sup>[28,29]</sup>发现转化细胞中多种蛋白质被磷酸化,有些已证明是糖酵解酶如烯醇化酶、乳酸脱氢酶、磷酸甘油酸变位酶,这是否与肿瘤糖酵解活性的改变有关,值得探讨。他们还发现转化细胞的骨架蛋白——纽带蛋白(vinculin)被磷酸化<sup>[30,31]</sup>。纽带蛋白位于细胞膜的附着斑(adhesion plaque),后者作为细胞间的联结点,纽带蛋白可使骨架的肌纤蛋白微丝连到细胞膜上,纽带蛋白被磷酸化将使肌纤蛋白微丝与附着斑的联结失去稳定性,从而降低细胞间的联结<sup>[32]</sup>。有趣的是,RSV 转化细胞中某些特异蛋白质的合成降低,例如 RSV 转化小鼠胚胎纤维母细胞时纤维连接蛋白的合成下降,cDNA 分子杂交证明该蛋白 mRNA 量降低。同时发现,细胞特异的前胶原蛋白 $\alpha_2$ 也有同样变化<sup>[33]</sup>。又如 RSV 转化鸡肌肉培养细胞时肌小管的合成降低<sup>[34]</sup>;转化视网膜成黑色素细胞时,黑色素的合成降低<sup>[35]</sup>;转化鸡软骨细胞时,硫酸蛋白多糖的合成降低<sup>[36]</sup>。RSV 转化细胞是通过癌基因产物转化蛋白的作用,说明转化蛋白对细胞特异蛋白质基因的调控有一定影响,致使 Pastan 认为肿瘤的发生是由于细胞的去分化引起的。

另一方面,某些癌基因的产物与正常生长调控因子的结构相似,如 *sis* 基因的产物与血小板生长因子(PDGF)的氨基酸序列相似<sup>[37,38]</sup>,*erbB* 基因的产物与表皮生长因子(EGF)受体的氨基酸序列相似<sup>[39]</sup>,说明这些转化蛋白与 PDGF 或 EGF 受体可能是来自相同的或紧密相连的细胞基因。现已从核苷酸序列分析证明,人原癌基因 *c-sis* 是 PDGF 的结构基因<sup>[40]</sup>。某些肿瘤病毒对细胞的转化作用需要编码 PDGF 或 EGF 受体或类似产物的基因参与。EGF,PDGF,胰岛素,IGF-1(somatostatin)的受体具有酪氨酸蛋白激酶活性,这些生长因子与其受体结合后可激活细胞膜上与受体相联的酪氨酸蛋白激酶,从而加速细胞的分裂和增殖。由此可见,转化蛋白具有调控细胞分化和增殖的双重作用,癌基因可能通过转化蛋白抑制细胞分化,促进细胞增殖而使细胞癌变。

p21 是 *ras* 基因的转化蛋白。*ras* 基因最初发现于 Ha-MuSV 和 Ki-MuSV 转化细胞,以后发现正常人细胞及人癌瘤细胞中存在 *ras<sup>H</sup>*、*ras<sup>K</sup>*、*N-ras* 基因,正常细胞的 *c-ras* 基因与肿瘤中被激活的 *c-ras* 基因的差别仅在 p21 中一个氨基酸的改变(表 4)<sup>[40a]</sup>。p21 位于细胞膜,v-*ras* 基因编码的 p21 通过自身激活酶的作用被磷酸化,由 GTP 供给磷酸基团,而不是由 ATP 供给。*c-ras* 基因和 BJ 膀胱癌细胞编码的 p21 则无此作用。p21 的最大特点是与 GDP/GTP 的结合有较大的亲和力,Kd 为  $10^{-8}$ M<sup>[41]</sup>。正常 p21 第 12 位氨基酸附近的氨基酸序列与牛线粒体 H-ATP 酶  $\beta$  亚基的结构相似,p21 有可能是该酶的组成部分, $\beta$  亚基具有水解 GTP 与结合 ATP 和 ADP 的作用。转化细胞中的 p21 第 12 位氨基酸发生改变,可能导致与 GDP/GTP 结合,而不与 ATP 结合,也可能改变 H-ATP 酶或 GTP

表 4 激活的 *ras* 癌基因中氨基酸的改变

癌基因	第 12 位氨基酸	第 61 位氨基酸
c- <i>ras</i> <sup>H</sup>	甘氨酸	谷氨酰胺
v- <i>ras</i> <sup>H</sup> (Harvey 肉瘤病毒)	精氨酸	谷氨酰胺
v- <i>ras</i> <sup>H</sup> (Balb 肉瘤病毒)	赖氨酸	谷氨酰胺
v- <i>ras</i> <sup>H</sup> (Rasheed 肉瘤病毒)	精氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>H</sup> (EJ/T24 膀胱癌细胞)	缬氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>H</sup> (NIH3T3 自发性激活)	天冬氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>H</sup> (HS242 肺癌细胞)	天冬氨酸	亮氨酸
c- <i>ras</i> <sup>K</sup>	甘氨酸	谷氨酰胺
v- <i>ras</i> <sup>K</sup> (Kirsten 肉瘤病毒)	丝氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>K</sup> (calu-1 肺癌细胞)	半胱氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>K</sup> (SW480 直肠癌细胞)	缬氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>N</sup>	甘氨酸	谷氨酰胺
c- <i>ras</i> <sup>N</sup> (SK-N-SH 神经细胞瘤细胞)	甘氨酸	赖氨酸
c- <i>ras</i> <sup>N</sup> (SW/271 人肺癌细胞)	甘氨酸	精氨酸

酶的组成部分,引起酶活性改变,从而使膜电位异常,引起与癌变有关表型的变化<sup>[42]</sup>。

有些癌基因如 *myc*、*myb*、*fos*、*ski*、*Blym* 以及 DNA 肿瘤病毒 SV 40 的转化蛋白大 T 抗原,位于细胞核,与 DNA 结合,可能与细胞外调控信号引起基因表达的调控有关。近来发现,PDGF、脂多糖、刀豆蛋白 A 等促细胞分裂剂可分别引起 BACB/C3T3 小鼠纤维母细胞、C57BL/6T 小鼠 B、T 淋巴细胞的 c-*myc* mRNA 增高<sup>[43]</sup>。促癌物 TPA 和纤维母细胞生长因子也可引起 c-*myc* mRNA 增高。但胰岛素,EGF 对其表达则无影响。说明 c-*myc* 基因与特异生长因子的相互作用与细胞癌变有关。*myc* 基因的产物是核蛋白,上述促细胞分裂剂的作用可能是通过 *myc* 基因的转化蛋白对细胞增殖有关基因表达的调控。

最近证明,*myc* 基因表达的调控与癌细胞的逆转有关。例如,将维生素 D 的代谢产物 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 与 HL-60 白血病细胞保温,可使癌细胞趋于分化成熟,一些特异蛋白如溶菌酶的合成、α-萘乙酸酯酶的活性都增高,并出现单核细胞表面抗原 63D<sub>3</sub> 和 mac-120,而 c-*myc* mRNA 的水平则降低,并且发现,*myc* 基因表达的降低先于细胞表型的变化,可见癌基因的表达对细胞表型以及癌变有一定影响<sup>[43a]</sup>。此外,*myc* 被证明可提高二氢叶酸还原酶基因和 β 珠蛋白基因的表达<sup>[44]</sup>。腺病毒 12 的 ELA 可以降低 2 型组织相容抗原的表达,使转化细胞免受免疫系统的破坏<sup>[45]</sup>。

上述事实说明转化蛋白对细胞的基因表达有重要的调控作用,癌基因的致癌机制是通过癌基因的激活和不断表达以维持肿瘤的恶性表型,因此转化蛋白对肿瘤的发生和发展具有十分重要的意义。

### 三、基因调控与癌变原理

根据肿瘤基因表型的变化,细胞增殖与分化的调控异常与细胞癌变的关系最为密切。在机体的生长和发育过程中,细胞不断增殖和分化,当组织和器官达到一定大小时即停止生长,表现出特有的分化功能。在损伤修复过程中也有同样现象,可见在正常生长过程中,增殖和分化是受到控制的。在癌细胞中,增殖和分化的调控异常,以致与增殖有关的基因被激活,而与功能分化有关的基因被阻抑(表 5)。细胞增殖与分化的异常贯穿在整个癌变

表 5 肿瘤中增殖基因与分化基因的表达

	增殖基因(激活)	分化基因(阻抑)
	增殖酶活性增高	组织特异酶活性降低
	DNA, RNA 合成酶	尿素合成酶
肝癌	嘧啶合成酶	
	嘌呤合成酶	
	蛋白质合成酶	氨基酸分解代谢酶
	葡萄糖分解代谢关键酶	葡萄糖合成代谢关键酶
多种肿瘤	多胺合成酶(鸟氨酸脱羧酶)	鸟氨酸氨甲酰转移酶
	胚胎型酶和同工酶	成年型酶和同工酶
多种肿瘤	与增殖有关蛋白质的出现或增多	与分化有关的蛋白质的降低或丢失
	神经生长因子	乳白蛋白, 酪蛋白(转化乳腺细胞)
	繁殖刺激因子	血红蛋白(红细胞白血病)
	转化生长因子	肌小管(RSV 转化肌肉细胞)
	癌基因(sis, erb-B)的产物	硫酸蛋白多糖(RSV 转化鸡软骨细胞)
		前胶原蛋白 $\alpha_2$ (RSV 转化胚胎纤维母细胞)
		黑色素(RSV 转化视网膜成黑细胞)

过程中,不仅致癌物质可引起这些异常变化,前已述及,促癌物也具有抑制分化、促进增殖的作用。如 TPA 刺激小鼠乳腺上皮细胞的 DNA 合成,同时抑制酪蛋白、 $\alpha$  乳白蛋白的合成<sup>[46]</sup>。又如,佛波十四烷酸醋酸盐抑制 Friend 红细胞白血病细胞的分化<sup>[47,48]</sup>以及小鼠前脂肪纤维母细胞的终末分化<sup>[49]</sup>。另一方面,TPA 又可激活鸟氨酸脱羧酶及纤维蛋白酶原激活因子,以及促进 DNA 合成及细胞增殖<sup>[50,51]</sup>。也有人认为,癌变的起始阶段可能与细胞分化调控机制的异常有关,而促癌阶段则可能与细胞增殖的调控异常有关<sup>[52]</sup>。另外,肿瘤的发生和发展也可能与细胞增殖和分化的解偶联有关,但肿瘤细胞并未完全失去控制增殖和分化的基因,在适当条件下仍可使之向正常分化<sup>[53]</sup>。

近年来,从癌基因研究中发现正常细胞存在原癌基因,具有高度的进化保守性,对细胞生长和分化的调控必然起重要作用。在化学致癌物、病毒或 X 射线的作用下,原癌基因通过各种机制,如基因重排(原癌基因在染色体上移位)、放大或缺失、病毒基因促进子如长末端重复序列的插入以及点突变等而被激活,产生大量转化蛋白。有些原癌基因与激活后癌基因编码的蛋白质在结构和功能上不尽相同,如 pp60<sup>v-src</sup> 与 pp60<sup>c-src</sup> 在 C 端的氨基酸组成和序列不同,pp 60<sup>v-src</sup> 的表达可使正常细胞转化,而 pp 60<sup>c-src</sup> 则不能<sup>[54]</sup>。有些由于癌基因转化蛋白的增多引起细胞癌变,而 c 癌基因与 v 癌基因的产物相同,如 myc 基因<sup>[55,56]</sup>。当前的中心问题是转化蛋白如何引起细胞增殖基因和分化基因的调控异常,从而导致细胞癌变。

细胞癌变是一个多阶段过程。体外实验表明,细胞转化需要多种癌基因的协同作用,例如大鼠胚胎纤维母细胞的转化,需要 ras 和 myc 基因的同时存在<sup>[57-60]</sup>。又如 Burkitt 淋巴瘤和鸡  $\beta$  细胞淋巴瘤的诱发,需要 myc 和 B-lym-1 基因的激活<sup>[61-63]</sup>。其他如病毒诱发的小鼠乳腺癌<sup>[64,65]</sup>, Abelson 病毒诱发的小鼠前  $\beta$  细胞肉瘤<sup>[66]</sup> 和小鼠浆细胞瘤<sup>[67-69]</sup>,腺病毒转化幼鼠肾培养细胞<sup>[70]</sup>以及 EJ cha-ras1 基因转化地鼠纤维母细胞<sup>[71]</sup>,都需要其他病毒或化学致癌物的共同作用。最近发现,人肿瘤也是由多种癌基因所引起,如急性淋巴白血病和慢性粒细胞白血病含有 myc, ras<sup>H</sup>, ras<sup>K</sup>, fes, fms, fos, myb 基因;人肾癌,卵巢癌、直肠癌、肺癌等含有 fos, myc, ras<sup>H</sup>, ras<sup>K</sup> 基因;同时一种癌基因可存在于多种肿瘤,最常见的是 myc, ras, fos 基因<sup>[72]</sup>。由于各种癌基因的表达和功能不尽相同,很可能某种癌基因对细胞转化是必需的,但不是足够的,还需要其他癌基因的参与才能使细胞转化完全。因而癌变是通过多种癌基因有顺序地激活和表达,癌变过程中各阶段可能需要特异



癌基因的表达,正如发育过程中c-癌基因有顺序的表达一样<sup>[73]</sup>。已有方法测定环境中致突变剂导致 ras 基因的突变,以及某些氧化剂、蛋白酶抑制剂引起 DNA 重排或 myc 类基因的激活<sup>[74]</sup>,这对了解癌基因在致癌起始阶段的作用很有意义。至于促癌阶段,已有实验说明,促癌物 TPA 可刺激纤维母细胞蛋白质酪氨酸磷酸化<sup>[75]</sup>,可能与激活某些与酪氨酸蛋白激酶有关的癌基因或生长因子基因的表达有关。在这方面,一个重要的发现是,src 和 ros 基因的产物不仅具有酪氨酸蛋白激酶活性,还具有磷酸化磷脂肌醇的酶活性<sup>[76]</sup>。已知许多激素和神经介质与靶细胞表面受体结合后,使磷酸化磷脂肌醇分解,生成第二信使二酰甘油和肌醇三磷酸,两者与 Ca<sup>2+</sup> 离子一起激活蛋白激酶 C 的活性,从而引起一系列重要生理效应<sup>[77]</sup>。TPA 具有模仿二酰甘油的作用,促进 Ca<sup>2+</sup>-磷脂依赖性蛋白激酶 C 的活性<sup>[78]</sup>(图 1),这对促癌机制的了解具有重要意义。

虽然目前对生长调控的机制还不了解,相信在生长调控信号传递过程中,正如物质的中间代谢过程一样包含一系列级联反应,在生长调控循环各步都有特异的癌基因蛋白参与,正如代谢循环中需要各种酶的参与一样。有些癌基因蛋白是生长因子(如 sis)或表面受体(如 erb-B),有些则是膜信号的转导因子(如 ras)或细胞核信号的传导因子(如 myc, myb, fos 等),这些调控机制对细胞的生长和发育甚为重要<sup>[41]</sup>。同样在细胞分化成熟过程中,特异蛋白质和酶的合成受时间和空间的控制,分化过程中有顺序的、有限制性和选择性的基因表达,也可能为 c 癌基因表达所调控,已证明在胚胎发育过程各阶段出现不同的癌基因蛋白<sup>[73]</sup>。在癌变过程中,细胞逐渐失去控制生长和分化的机制,以致出现异常生长和分化的基因型,最终形成肿瘤,因此对于这些调控机制的阐明将有助于对癌变原理的彻底了解,这对征服人类对癌瘤是十分重要的。

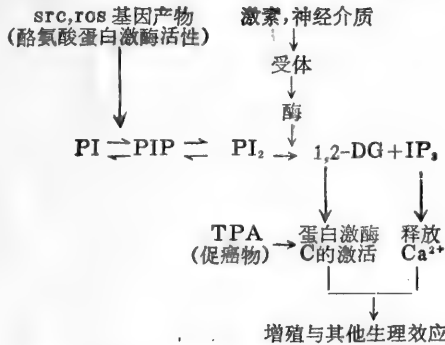


图 1 促癌物与蛋白激酶 C 的激活 PI: 磷脂肌醇; PIP: 磷脂肌醇 4-磷酸; PIP<sub>2</sub>: 磷脂肌醇 4,5-二磷酸; IP<sub>3</sub>: 肌醇三磷酸; 1,2-DG: 1,2-二酰甘油

参 考 文 献

[1] Weber, G., *Cancer Res.*, **43**: 3466, 1983.  
 [2] 李士谔等, 生物化学与生物物理学报, **2** (1962), 163.  
 [3] 李士谔等, 生物化学与生物物理学报, **3** (1963), 256.  
 [4] 谭润生等, 生物化学与生物物理学报, **5** (1965), 186.  
 [5] 李士谔等, 生物化学与生物物理学报, **9** (1977), 113.  
 [6] 李士谔等, 中国医学科学院学报, **4** (1982), 141.  
 [7] Greenstein, J. P., *Biochemistry of Cancer* (2nd ed.) AP, N. Y. 1954.  
 [8] Knox, W. E., *Enzyme Patterns in Fetal, Adult and Neoplastic Rat Tissues*, Basel, Karger AG, 1972.



- [9] Schapira, F., *Adv. Cancer Res.*, **18** (1973), 77.
- [10] Fishman, W. H. and Singer, R. T., In "Cancer" (Becker, F. F. ed.), Vol III, 57, Plenum Press, N. Y. 1975.
- [11] Weber, C., *New Engl. J. Med.*, **296** (1977), 541.
- [12] 黄胜和等, 中国医学科学院学报, **5** (1983), 21.
- [13] 张海澜等, 中国医学科学院学报, **6** (1984), 410.
- [14] Horwich, A. L., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 4258.
- [15] Ryall, J., et al., *J. Biol. Chem.*, **259** (1984), 9172.
- [16] Fritz, P. J., et al., *Biochemistry*, **12** (1973), 4034.
- [17] Roth, J. S., *Life Sci.*, **3** (1964), 1145.
- [18] Hanafusa, M., In "Comparative Virology" (Frankel-Conrat, H. and Wagnée, R. R. eds.), p. 401, Plenum Press, N. Y., 1977.
- [19] Spih, T. Y., et al., *J. Virol.*, **31** (1979), 546.
- [20] Pady, et al., *Cell*, **28** (1982), 865.
- [21] Guerrero, I., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **81** (1984), 202.
- [22] Hunter, T. and Sefton, B. M., *ibid.*, **77** (1980), 1311.
- [23] Sefton, B. M., et al., *Cell*, **20** (1980), 807.
- [24] Synder, M. A., et al., *ibid.*, **32** (1983), 891.
- [25] Cross, F. R. and Hanafusa, H., *ibid.*, **34** (1983), 597.
- [26] Bryant, D. & Parsons, J. T., *J. Virol.*, **45** (1983), 1211.
- [27] Kolata, G., *Science.*, **219** (1983), 377.
- [27 a.] Erikson, R. L. et al., *J. Cell Biol.*, **87** (1980) 319.
- [28] Cooper, J. A. and Hunter, T., *ibid.*, **94** (1982), 287.
- [29] Cooper, J. A., et al., *Nature*, **302**, (1983), 218.
- [30] Sefton, B. M., et al., *Cell*, **24** (1981), 165.
- [31] Ito, S., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **79** (1982), 4628.
- [32] Max, J. L., *Science*, **211** (1981), 1336.
- [33] Pastan, I., et al., *Nat. Cancer Inst. Monograph*, **60** (1982), 7.
- [34] West, C. M. and Boettiger, D., *Cancer Res.*, **43** (1983), 2042.
- [35] Boettiger, D., et al., *Cell*, **11** (1977), 881.
- [36] Pacifici, M., et al., *ibid.*, **11** (1977), 891.
- [37] Doolittle, R. F., et al., *Science*, **221** (1983), 275.
- [38] Waterfield, M. D., et al., *Nature*, **304** (1983), 35.
- [39] Stiles, C. D., *Cell*, **33** (1983), 653.
- [40] Chiu, I. M., et al., *ibid.* **37**: 123, 1984.
- [40 a.] Shih, T. Y. and Weeks, M. O., *Cancer Investigation*, **2** (1984), 109.
- [41] Shih, T. Y., et al., *Molecular Biology of Neoplasia*, 1984.
- [42] Gay, N. J. and Walker, J. E., *Nature*, **301** (1983), 262.
- [43] Kelly, K., *Cell*, **35** (1983), 603.
- [43 a.] Reitsma, P. H. *Nature*, **306** (1983), 492
- [44] Newmark, P., *ibid.*, **305** (1983), 470.
- [45] Schrier, P. I., et al., *ibid.*, **305** (1983), 771.
- [46] Takefani, Y. and Oka, T., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 1646.
- [47] Rovera, G., et al., *ibid.*, **74** (1977), 2894.
- [48] Yamasaki, H., et al., *ibid.*, **74** (1977), 3451.
- [49] Diamond, L., et al., *Nature*, **269** (1977), 247.
- [50] Cohen, S. and Savage, C. R. Jr., *Rec. Prog. Hormone Res.*, **30** (1974), 551.
- [51] Sivak, A., *In Vitro*, **13** (1977), 337.
- [52] Wille, J. J. Jr., et al., *Cancer Res.*, **42** (1982), 5139.
- [53] Sachs, L., *Cancer Survey*, **1** (1982), 321.
- [54] Parker, R. C., et al., *Cell*, **37** (1984), 131.
- [55] Dalla Favera, R., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **79** (1982), 7824.
- [56] Little, C. D., et al., *Nature*, **306** (1983), 194.
- [57] Gilmore, P. and Martin, G. S., *ibid.*, **306** (1983), 487.
- [58] Bishop, R., et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **115** (1983), 536.
- [59] Mamrack, M. and Slaga, T. J., In "Biological Carcinogenesis" p. 81, 1982.
- [60] Land, H., et al., *Nature*, **304** (1983), 596.

- [61] Cooper, G. M. and Neiman, P. E., *ibid*, **293** (1981), 857.
- [62] Diamond, L. *et al.*, *ibid*, **305** (1983), 112.
- [63] Goubin, G., *et al.*, *ibid*, **302** (1983), 114.
- [64] Lane, M. A., *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **78** (1981), 5185.
- [65] Nusse, R. and Varmus, H. E., *Cell*, **31** (1982), 99.
- [66] Lane, M. A., *et al.*, *Nature*, **300** (1982), 659.
- [67] Cooper, G. M. *Science*, **217** (1982), 801.
- [68] Crews, S., *et al.*, *ibid*, **218** (1982), 1319.
- [69] Calame, K., *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **79** (1982), 6994.
- [70] Ruley, H. E., *ibid*, **304** (1983), 602.
- [71] Newbold, R. F. and Overell, R. W., *ibid*, **304** (1983), 648.
- [72] Slamon, D. J., *et al.*, *Science*, **224** (1984), 256.
- [73] Miiller, R. *et al.*, *Nature*, **299** (1982), 640.
- [74] Cairns, J. and Logan, J., *ibid*, **304** (1983), 582.
- [75] Bishop, R., *et al.*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **115** (1983), 536.
- [76] Sugimoto, Y., *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **81** (1984), 2117.
- [77] Michell, R. H., *Nature*, **308** (1984), 770.
- [78] Niedl, J. E., *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **80** (1983), 36.

# 肿瘤同工酶研究进展

陈惠黎

(上海第一医学院生化教研组)

## 一、同工酶的新概念

## 二、癌瘤组织中同工酶谱的改变及其机制

1. 酶谱改变的类型
2. 早期肝癌的同工酶标志
3. 癌瘤中同工酶谱改变机制研究的进展

## 4. 酶蛋白本身质的异常

## 三、癌瘤组织和血清中的糖基转移酶

1. 半乳糖苷转移酶(Gal-T)
2. 唾液酸基转移酶(ST)

恶性肿瘤(包括癌肿与肉瘤,以下简称癌瘤)和正常组织在代谢上的明显差别主要是某些代谢关键酶的活性不同而引起的,其中同工酶谱的区别是一个重要方面<sup>[1]</sup>。肿瘤同工酶的研究不但有助于阐明癌瘤中基因表达失常的规律,探讨癌瘤的发病机制,还能为临床提供有效的癌瘤诊断指标。因此,有关这方面的研究就成为目前医学生化中一个活跃的领域。本文拟就癌瘤同工酶研究的近代进展作一介绍。

## 一、同工酶的新概念

按照1971年国际生化联合会(IUB)生化命名委员会(CBN)的建议:同工酶是指同一种属中由不同基因位点或同一位点的复等位基因编码的多肽链所组成的单体、纯聚体或杂交体<sup>[2]</sup>。但有些作者认为应将酶蛋白翻译合成后经不同类型的修饰而造成的多种分子形式也列入广义的同工酶中。因而将前一种由不同基因水平引起的同工酶称为原级或基因性同工酶,而后一种称为翻译后或次生同工酶<sup>[3]</sup>。

近年来,对小鼠 $\alpha$ 淀粉酶基因的研究发现肝淀粉酶和唾液淀粉酶是由同一基因的两不同的mRNA所编码。这是由于原始转录产物经不同的剪接而演变成两类部分碱基顺序相同的mRNA,再经翻译而衍生出两类C端氨基酸顺序相同而N端不同的酶蛋白。因此同工酶的产生还可发生在mRNA水平上<sup>[4]</sup>。对丙酮酸激酶(PyK)的研究也提示L、R、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>四种同工酶可能只有两个基因。一个转录出L型和R型两种mRNA<sup>[5]</sup>,另一个在小鼠中位于第9对染色体<sup>[6]</sup>,转录出M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>型两种mRNA<sup>[7,8]</sup>。对PyK作了大量的一级结构分析,包括CNBr裂解肽谱、酶解指纹图谱、氨基酸组成测定及末端分析等,均证明肝中的L型和红细胞中的R型的结构十分类似,互相有交叉免疫<sup>[9]</sup>。但R型较L型多出一个肽段,分子量较大。过去曾认为它们属于翻译后同工酶,即R型可经蛋白酶降解而转变成L型<sup>[10]</sup>。但从肝中提出的mRNA经体外翻译及免疫沉淀后,只发现其合成L型PyK;而来自网织红细胞的mRNA只合成R型PyK,未见有L型。可见L和R型PyK的酶蛋白不能互变,而分别来自不同的mRNA<sup>[5]</sup>。另一方面,遗传学上的证据也说明这两型

PyK 往往同时缺失或变异,支持它们是由同一基因调控的论点<sup>[5]</sup>。研究 M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub> 型 PyK 的关系也获得和 L 及 R 型 PyK 同样的结果,即两者的一级结构虽略有差别,但也相当类似,它们也分别由不同的 mRNA 翻译而成。遗传学上也证明 M<sub>1</sub> 和 M<sub>2</sub> 可能来自同一个基因,或同一个祖先基因经基因重排分化而成的两个同类基因<sup>[7,8]</sup>。然而,R、L 组及 M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> 组之间没有交叉免疫,两组间的结构很少有类似之处,遗传学上也没有联系,可以肯定两组 PyK 是由不同基因所编码的。

据此,可将同工酶分成三大类,分别来自:(1) 不同基因;(2) 同一基因不同 mRNA;(3) 同一 mRNA 不同翻译后的修饰。根据现有的资料,这三大类的性质可区别如下(表 1):

表 1 三类同工酶在性质上的区别

性 质	原级同工酶		同一基因不同 mRNA 的同工酶	次生同工酶
	多基因位点 <sup>a</sup>	复等位基因		
电泳速度,等电点,离子交换层析行为	不同	常不同	不 同	常不同
热稳定性	不同	不同或接近	不同或接近	不同或接近
动力学性质	不同	可不同	不同或接近	常相同或接近 <sup>b</sup>
免疫性质	不同	常交叉	常交叉	常相同
分子量	不同或接近	几乎相同	不同或接近	不同或接近

a. 限于纯聚体。

b. 少数动力学指标可不同。

然而,即使是多基因位点的原级同工酶之间也存在着一一定的同源性,这是它们之所以成为同工酶而能催化相同反应的基础。例如乳酸脱氢酶(LDH)的 A(M)、B(H)两种亚基是由不同位点的基因编码的,相应的基因分别存在于第 11 及 12 对染色体上<sup>[11]</sup>,亚基蛋白间无交叉免疫,但其结构却十分类同。Eventoff<sup>[12]</sup>报道了猪和小鸡 A、B 两种亚基的一级结构,其中猪的 LDH A 亚基由 329 个氨基酸残基组成,B 亚基由 331 个氨基酸残基组成。如果以 A 亚基缺失第 17 及 330 两个残基而与 B 亚基比较的话,可发现约有 75% 的氨基酸顺序是相同的,只有 25% 的残基被置换,并且发现被置换的各个氨基酸中,其 DNA 上相应的三联密码大多仅差一个碱基。因此可以推测 A、B 两类亚基的基因 DNA 有 75% 以上的核苷酸顺序是相同的,具有极大的同源性。

PyK 的 L 和 M<sub>2</sub> 两型亚基,其一级结构尚不清楚,L 型 PyK 的基因定位也未见报道,动力学分析发现它们之间有很大的区别,并受不同的因素调控<sup>[13]</sup>。如 L 型 PyK 可受胰岛素或果糖的诱导,受 cAMP 抑制,而 M<sub>2</sub> 型则不能<sup>[14]</sup>。在肝癌或再生肝中,L 型减少而 M<sub>2</sub> 型增加,显然是不同基因位点的原级同工酶<sup>[15,16]</sup>。但两者之间也存在一定的同源性。最近用基因工程技术将 L 型和 M<sub>2</sub> 型 PyK 的 cDNA 克隆到质粒 pBR 322 中,经大肠杆菌 HB 101 扩增后,再用限制性核酸内切酶切出这两种 cDNA,比较它们内切酶谱,发现有很大区别。L 型 PyK 的 cDNA 中,至少有一个 Pvu II 切点,四个 Hinf I 切点,没有 Pst I 切点;而 M<sub>2</sub> 型 PyK 的 cDNA 则没有 Pvu II 切点,只有两个 Hinf I 切点,却有两个 Pst I 切点。但两种 cDNA 也有类似之处,它们都没有 EcoR I、Hind III、BamH I、Bgl II 及 Sal I 的切点,都有两个相距约 200 个碱基对的 Bgl II 切点及两个相距约 100 个碱基对的 Hinf I

切点<sup>[17-19]</sup>。进一步用点滴印迹杂交法(Dot blot hybridization)发现,在低离子强度时  $M_2$ -PyK 较长的 cDNA 片段虽不能和 L 型 PyK 的 mRNA 分子杂交,但在高离子强度时,也即在杂交专一性不严格的条件下,此  $M_2$ -PyK 的 cDNA 片段就可和 L-PyK 的 mRNA 发生分子杂交,这充分证明了 L 和  $M_2$  型 PyK 的 cDNA 有一定长度的互补顺序,两种 DNA 分子间有相当的同源性。另一方面,即使较短的  $M_2$ -PyK 的 cDNA 片段,且在十分严格的条件下,也能和  $M_1$ -PyK 的 mRNA 发生分子杂交,说明  $M_1$  和  $M_2$  型 PyK 的 cDNA 有极大的同源性,甚至属于同一个编码基因<sup>[19]</sup>。

总之,目前已有不少证据证明,即使是原级同工酶,它们的不同基因也是由同一祖先基因经过分化进化(divergent evolution)而形成的。

## 二、癌瘤组织中同工酶谱的改变及其机制

癌瘤的基因表达发生紊乱,常产生一些相应的正常成年组织所没有的或含量极微的基因表达产物。例如甲胎蛋白、癌胚抗原等多种癌胚蛋白以及一些异位分泌的肽类激素,而同工酶谱的改变也是基因表达失常的重要方面。

### 1. 酶谱改变的类型

癌瘤中同工酶谱的改变,就目前的资料归纳,大致有三种类型<sup>[20]</sup>。

#### (1) 胎儿型表达

指癌瘤组织表达了该组织在胎儿时期的同工酶类型(胎儿型同工酶),伴有成年期同工酶类型(成年型同工酶)的减少。这是最常见的一种异常表达。

在个体发育过程中,从胎儿到新生儿,再到分化成熟的成年,体内各组织的同工酶谱,可随组织的分化和发育,从胎儿型(原始型)同工酶逐渐转变为成年型(分化型)同工酶。前者在胎儿发育的早期即有明显的活力,出生前后活性逐渐降低而被成年型同工酶取代。但也可在另一些成年组织中继续占主要地位。成年型同工酶往往在晚期的胎儿组织中才开始发生,出生后活力逐渐上升,但仅在少数成年组织中表达。这是与各组织在形态和功能上的分化相一致的。以几种糖酵解酶的同工酶为例:葡萄糖激酶(GK)、果糖-1-磷酸醛缩酶(B-ALD)和 L 型丙酮酸激酶是典型的成年型同工酶,仅存在于肝脏及肾皮质等具有糖异生功能的组织中,而已糖激酶(HK)、果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(A-ALD)和  $M_2$  型丙酮酸激酶是典型的胎儿型同工酶,在胎肝中占优势,但也分别存在于脑、肌及肾脏等成年组织中。

肝癌时,上述 GK、B-ALD 及 L-PyK 三种成年型同工酶降低,而 HK、A-ALD、 $M_2$ -PyK 三种胎儿型同工酶明显增加,使同工酶谱返回到胎肝时未分化组织的类型,所以这种改变是一种去分化或反分化的现象,一般和癌瘤的恶性程度成正比。恶性程度愈大或分化愈差,胎儿型与成年型同工酶的比值也愈高<sup>[21,23]</sup>。

#### (2) 胎盘型表达

指癌瘤组织表达了存在于胎盘中的同工酶类型。如支链氨基酸转氨酶,大鼠胎肝中只有 I 型,成年肝中 75% 为 II 型,25% 为 I 型;而肝癌时 II 型降低或消失,出现 III 型,其量可超

过 I 型,这种只含 III 型和 I 型的酶谱和胎盘相同<sup>[24]</sup>。此外,在某些卵巢癌和肺癌病人的血清中找到一种称为 Regan 同工酶的碱性磷酸酶,经鉴定,发现它不论在动力学、热失活和免疫性质方面都和存在于晚期胎盘中的碱性磷酸酶相同<sup>[25]</sup>。

目前已被发现的癌瘤中呈胎儿型或胎盘型表达的同工酶不下 20 余种。Ibsen<sup>[26]</sup>, Weinhouse<sup>[27]</sup>和 Schapira<sup>[28]</sup>等分别在 1979—1982 年总结了各种肿瘤中这两种同工酶出现的情况,今择其原级同工酶的异常表达归纳于表 2。

表 2 各种癌瘤中表达的胎儿型及胎盘型同工酶

同 工 酶	在个体发育中的表达	在癌瘤中的表达
己糖激酶(II型)	胎肝、胎盘	肝癌
(III型)	胎肝、新生儿肝	肾癌、乳癌、横纹肌肉瘤
醛缩酶(A型)	胎肝、胎肠	肝癌、十二指肠腺癌
(C型)	早期胎肝、胎肌	肝癌、横纹肌肉瘤
丙酮酸激酶(M <sub>2</sub> 型)	胎肝、胎肌、胎脑	肝癌、横纹肌肉瘤、脑瘤
乳酸脱氢酶(A型)	胎儿(大鼠)	除肝癌外的多种癌瘤
果糖-1,6-二磷酸酶(肌型)	胎肝	肝癌
糖原磷酸化酶(胎儿型)	胎肝、胎肌、胎盘	肝癌
3-磷酸甘油脱氢酶(阳极型)	胚胎早期胎儿、	腹水性肿瘤
醇脱氢酶(阳极型)	胎肝	肝癌
支链氨基酸转氨酶(I型)	胎肝、胎盘	肝癌
(III型)	胎盘	肝癌
谷氨酰胺酶(肾型)	胎肝	肝癌、乳癌
氨基甲酰磷酸合成酶-2	胎儿	肝癌、乳癌
胸苷激酶(胞液)	胎肝、胎肠	肝癌、胃肠道癌
DNA聚合酶(γ)	胎肝	肝癌
葡萄糖胺-6-磷酸合成酶(低 p <sub>i</sub> 型)	胎肝	肝癌
己糖胺酶(A型)	胎肝	肝癌
碱性磷酸酶(Regan型)	晚期胎盘	多种癌瘤
(肝癌型)	FL羊膜细胞、胎儿小肠	肝癌
(非Regan型)	绒毛膜、早期胎盘	多种癌瘤

### (3) 异位型(ectopic)表达

指癌瘤组织表达了其他成年组织的同工酶类型。例如肌酸激酶(CK),在成年及胎儿的肝、肾中全部为 BB 型,而肝癌及胃癌中可出现 MM 型,这是成年肌肉中的 CK 同工酶类型<sup>[29]</sup>。

## 2. 早期肝癌的同工酶标志

前述各种同工酶在癌瘤中的变化一般发生较晚,在化学诱癌过程的前期病变中,这些同工酶常无明显改变,在分化良好,生长速度较慢的肝癌中,上述 HK/GK,ALD、PyK 和糖原磷酸化酶等同工酶谱也和正常肝脏差别不大<sup>[21-23]</sup>。因此,人们企图寻找早期的以及恶性程度较低的癌瘤的酶学标志。首先引人注目的当然是那些参与致癌剂代谢的生物转化酶系。近年来,这方面的研究已有飞速的发展,找到了令人鼓舞的早期肝癌的同工酶改变。

## (1) 致癌剂代谢和致癌过程

很多化学致癌剂,如 3,4-苯并芘、2-乙酰氨基芴和黄曲霉素 B<sub>1</sub> 等,有时本身并不致癌,称为前致癌剂。它们大多数是非极性化合物,进入机体后,需经肝微粒体的混合功能氧化酶(MFO,是一种单加氧酶系),有时尚需环氧化物水合酶(EH)的作用转化成有极性的环氧化物或羟化物,形成近致癌剂,但后者尚不能致癌,还需进一步经 MFO 或其他酶的作用代谢成具有活泼的亲电子性化合物,才能“攻击”细胞内的生物大分子,和 DNA、RNA 或蛋白质结合而导致突变或癌变<sup>[30-32]</sup>。前致癌剂转变成终致癌剂的过程是一种激活反应,而参与 MFO 酶系组成的细胞色素 p450(或 p448)是这个活化酶系中最重要的关键酶。另一方面,近致癌剂或终致癌剂也可通过一些结合反应转变成水溶性较强而易于排泄的解毒产物,无致癌活性,这类催化致癌剂与特异化合物结合而灭活的酶,主要有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和 UPP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-GT)。一些参与谷胱甘肽(GSH)和葡萄糖醛酸代谢的酶也分别属于致癌剂的激活或灭活酶。如 β-葡萄糖醛酸酶水解 UDP-GT 的产物 β-葡萄糖醛酸苷,使已灭活的致癌剂重新复活成终致癌剂,故属激活酶类。谷胱甘肽过氧化酶(硒依赖性)能氧化 GSH,使 GST 的产物 GSH 减少,结果有利于致癌剂以活化形式存在,也属于激活酶类。谷胱甘肽还原酶则相反,能生成灭活致癌剂所需要的 GSH,故属灭活酶类。而 γ-谷氨酰转肽酶(γ-GTP)因参与从 GSH-致癌剂结合物形成硫酸,也属于灭活酶类<sup>[30]</sup>。

近代关于化学致癌过程的理论,把癌变分成两个阶段:诱发(initiation)和促癌(promotion)。作为诱发电剂(initiator)的终致癌剂作用于靶细胞的生物大分子,使正常细胞发生突变,称为诱发阶段。这种变异后的细胞需再经过促癌剂(promotor)的作用,发生细胞选择的过程,逐渐转化为癌前细胞(preneoplastic cells)。这类细胞可集合成增生结节(HN)或酶变灶(EAF),后者是一种只有酶学改变而尚无形态学改变的病灶,可用酶组织化学染色法与周围正常组织区别开来。HN 和 EAF 都属于早期肝癌病变。最后癌前细胞再经过进展、增殖的过程而转变成癌细胞<sup>[30,33,34]</sup>。

## (2) 肝癌前期细胞的标志酶

Farber 等发现,在增生结节或酶变灶的肝癌前期细胞中,一些有关致癌剂代谢酶类,包括 GSH 代谢酶类的活力已有明显改变。一般地说,激活酶类均见减少,而灭活酶类均见升高。例外的是 EH,此酶既参与前致癌剂的激活,也催化近致癌剂的灭活。它在癌前期的变化和灭活酶一样,是增高的,曾被报道是一种癌前抗原<sup>[30,33]</sup>。今将这些酶以及一些与致癌剂代谢关系不大而也在癌前期有明显变化的酶列于表 3。

图 1 总结了化学致癌剂在引起大鼠肝癌过程中诱发、促癌和进展三个阶段时一些标志酶的变化曲线。在诱发阶段,不论激活酶类或是灭活酶类的活力变动均较大。如细胞色素 p 450 可以受致癌剂的诱导合成而暂时性地升高,然后逐渐降低,灭活酶类可以没有明显的活力变化,也可逐渐升高,这些变化并不是肝癌诱发过程所特有的。乃至促癌阶段出现了增生结节的酶变灶,激活酶就迅速减少而灭活酶明显增加。但灭活酶在进展阶段随着细胞的去分化又重新降低。因而 GST,UDP-GT 等酶类就认为是一类癌前期病变的标志酶。γ-GTP 也在增生结节中增高,但细胞完全癌变后并不降低而仍维持于高水平。一些



表 3 肝癌前期细胞中的标志酶<sup>[30]</sup>

活力降低的酶	活力升高的酶
葡萄糖-6-磷酸酶(微粒体)	环氧化物水化酶(EH)(微粒体)
Ca <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup> -ATP 酶(细胞膜)	UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UDP-GT)(微粒体)
糖原磷酸化酶	O-GT
细胞色素 p-450 族(微粒体)	醛脱氢酶(胞液及微粒体)
芳香烃羟化酶(AHH)(微粒体)	丁酰酯酶(L-I)(微粒体)
β-葡萄糖醛酸酶(溶酶体膜)	GSH 代谢酶类
GSH 过氧化酶(硒依赖性)(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 为底物)	γ-谷氨酰转胺酶(细胞膜)
	GSH-S-转移酶(GST)(胞液)
	A <sub>2</sub> (A)型, P型
	GSH 过氧化酶(硒非依赖性)(以有机过氧化物为底物)
	GSH 还原酶
	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(胞液)
	DT-黄递酶(胞液及微粒体)

糖酵解中的胎儿性同工酶则在灭活酶开始降低时才见缓缓上升<sup>[35]</sup>。

进一步研究发现:GST 和 UDP-GT 具有同工酶。在癌变过程中,并非所有的同工酶形式都见增高,而只是一种或数种同工酶的活性发生明显的改变<sup>[30,36]</sup>。

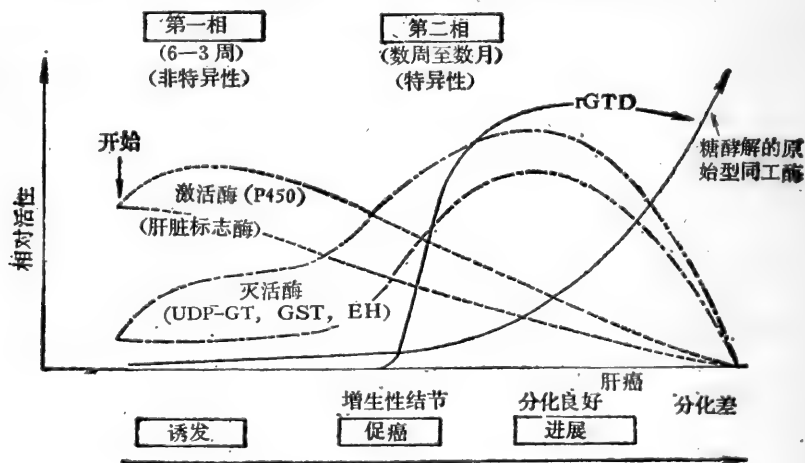


图 1 化学致癌过程中肝脏标志酶的变化<sup>[36]</sup>

### (3) GSH-S-转移酶(GST)

催化药物、毒物等亲电子化合物和 GSH 的结合,活力在肝脏最高,肾、肺次之,脑和胎盘中也有活性。肝中活力 80% 在上清部分<sup>[30]</sup>。在大鼠各组织中,约有 7—10 种 GST 同工酶,是由不同亚基组成的纯二聚体,各有其等电点、动力学和免疫学特异性,至少可分成两组。根据 Mannervik 和 Jensson 命名法,一组为 BL 组, pI 为 9—10, 包括 L<sub>2</sub>(Y<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>)、BL(Y<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>)和 B<sub>2</sub>(Y<sub>1</sub>Y<sub>1</sub>), 旧名曾分别称为连接蛋白(ligandin)、B 和 AA, 其 Y<sub>1</sub> 亚基的 Mr 为 22,000, Y<sub>1</sub> 为 25,000。第二组为 AC 组, pI 为 7—9, 包括 A<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>)、AC(Y<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>)和 C<sub>2</sub>(Y<sub>2</sub>Y<sub>2</sub>), 旧名曾分别称为 A、C 和 D。其亚基 Y<sub>2</sub> 和 Y<sub>2</sub>' 的 Mr 相同, 都是 23,500, 但 Y<sub>2</sub>' 的酸性大于 Y<sub>2</sub>。每组间的两种亚基之间有交叉免疫, 而 BL 组与 AC 组的亚基, 即 Y<sub>1</sub>、

Y<sub>o</sub> 组与 Y<sub>b</sub>、Y<sub>b'</sub> 组之间没有交叉免疫。以上六种同工酶都属于碱性蛋白质。在鼠肝上清部分还存在两种中性或酸性的 GST, 其亚基和性质尚不清楚<sup>[35,36]</sup>。1984 年日本学者佐藤<sup>[37]</sup>又从大鼠胎盘中纯化了另一种 GST, 称为 GST-P(或 GST-P<sub>2</sub>), 由两个分子量为 21,500 的 Y<sub>o</sub> 亚基组成, 具有等电点为 6.7(多数)、6.3 及 6.0 的三种电荷异构体, 与 BL 组及 AC 组均无交叉免疫。GST-P 也分布于其他组织, 但肝中含量最低, 而肾中最高。AC 组中的 A<sub>2</sub>(A) 及 BL 组中的 B<sub>2</sub>(AA) 是胎肝中的主要型式; 而 GST-P 在胎肝中含量甚低。

在用二乙基亚硝胺继以乙酰氨基苄及部分肝切除的 Solt-Farber<sup>[38]</sup>法致癌过程中, GST 总活力在一周后即开始增高, 同时可见 GST-P、A<sub>2</sub>(A) 和 L<sub>2</sub> 的活力上升, 而 GST-AC(C) 和 C<sub>2</sub>(D) 则变化不大, 其中以 GST-P 增加最为明显, GST-A<sub>2</sub> 次之<sup>[36,39]</sup>。用 SDS 聚丙烯酰胺和等电聚焦双相电泳也证明, 组成 GST-P 的 Y<sub>o</sub> 亚基, 以及分别组成 GST-A<sub>2</sub> 和 L<sub>2</sub> 的 Y<sub>b</sub> 和 Y<sub>b'</sub> 亚基也有相应的增加, 而 Y<sub>b'</sub> 和 Y<sub>b</sub> 亚基则变化极少。这种同工酶的变化在增生结节及酶变灶中十分显著, 在高分化及低恶性的肝癌中也较明显。但是随着肝癌分化程度的降低和恶性程度的增加, GST-P、A<sub>2</sub> 和 L<sub>2</sub> 反而愈趋降低, 因此它们都是肝癌早期病变及低恶性肝癌的酶学标志<sup>[39]</sup>。GST-P 和 A<sub>2</sub> 的增高比 L<sub>2</sub> 恒定而常见, 其中 A<sub>2</sub> 的增高可认为是胎儿型表达的一种形式。另一方面, 因 GST-A<sub>2</sub> 及 L<sub>2</sub> 可受苯巴比妥(PB)、多氯代联苯(PCB)、2,3-丁基-4-羟基苯甲醚(BHA)、3-甲基奶油黄(3'-Me-DAB)、3-甲基胆蒎(3MC)及乙酰氨基苄(AAF)等致癌剂及抗氧化剂短期作用的诱导; 而 GST-P 则不能被这些化合物短期诱导, 故具有较高的特异性, 成为目前最佳的肝癌前期指标<sup>[35,39,40]</sup>。

BL 组的 GST, 特别是 B<sub>2</sub> 和 BL, 具有较高的 GSH 过氧化酶的活力。但和硒依赖性的 GSH 过氧化酶不同, 活力不依赖于硒, 且以有机过氧化物(如 cumene-OOH)为底物。由于 BL 组 GST 同工酶在增生结节中并不降低, 反略有升高, 故结节中 GSH 过氧化酶的活力当以 cumene-OOH 为底物测定时, 也见上升趋势, 代偿了硒依赖性过氧化酶活力的降低<sup>[35,39,41]</sup>。

现将上述七种主要 GST 的性质、分布及癌变时的变化总结于表 4。

#### (4) 葡萄糖醛酸转移酶(UDP-GT)

催化 UDP-葡萄糖醛酸和药物、毒物或代谢产物(如胆红素、类固醇激素)之间的葡萄糖醛酸转移反应, 主要存在于肝脏的滑面内质网上, 至少有两种分子形式。能以邻氨基苯酚、邻氨基苯甲酸或 4-硝基苯酚等为底物者称为 o-GT, 而以酚肽、胆红素、睾酮、雌酮等为底物者称为 p-GT。o-GT 的分子量约 54,000, pI 为 6.2; 而 p-GT 的分子量为 58,000, pI 为 6.6, 免疫双扩散试验可见两酶对同一抗体的沉淀线互相融合, 但抗 o-GT 的 IgG 抑制 o-GT 的能力大于 p-GT<sup>[30,42,43]</sup>。

在大鼠个体发生过程中, o-GT 在胚胎晚期迅速上升, 出生前后达高峰, 以后很快下降至成年水平。p-GT 在出生后才缓缓上升, 活力至 2—3 同时达到高峰, 然后缓慢下降。因此 o-GT 和 p-GT 分别被称为胚胎型和新生儿型<sup>[43]</sup>。在成年鼠肝中, p-GT 的活力约为 o-GT 的十倍, o-GT 可被 3-MC, AAF、二乙基亚硝胺等致癌剂及抗氧化剂 BHA 所诱导, 而 p-GT 则受苯巴比妥的诱导<sup>[42,43]</sup>。

在化学致癌的增生结节中, o-GT 的活力可较正常高 3—4 倍, 酶活力的升高程度与增生结节的数量之间呈正相关; 而 p-GT 的活力仅升高 1.3 倍, 与结节数量之间没有平行

表 4. 大鼠组织中七种谷胱甘肽-S-转移酶的比较<sup>[35,36,39]</sup>

比较项目	碱性型						中性型
	BL组			AC组			
分子型式	E <sub>2</sub>	BL	B <sub>2</sub>	A <sub>2</sub>	AC	C <sub>2</sub>	P <sub>2</sub>
旧名	Ligandin B		AA	A	C	D <sup>b</sup>	
亚基组成	Y <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> Y <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub> Y <sub>2</sub>	Y <sub>1</sub> Y <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub> Y <sub>1</sub> '	Y <sub>1</sub> 'Y <sub>1</sub> '	Y <sub>1</sub> Y <sub>1</sub>
分子量( $\times 10^{-3}$ )	44	47	50	47	47	47	43
等电点(pI)	9-10			7-9			6.7(6.3,6.0)
免疫性	同组间交叉			同组间交叉			不与碱性型交叉
分布主要部位	肝	肝	睾丸	肝	肝	肝	肾
相对活力							
以 CDNB <sup>a</sup> 为底物	23.1	20.8	18.6	47.3	33.5	13.1	18.2
以 DCNB <sup>a</sup> 为底物	0.02	0.02	0.02	3.94	2.61	0.40	0.05
GSH 过氧化酶活力							
以 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 为底物	0	0	0	0	0	0	
以 cumene·OOH 为底物	1.23	3.76	9.76	0.22	0.37	0.43	测不出
与有机阴离子结合力							
胆红素	+++	++	±	+	+++	?	?
胆酸	++	+	±	+++	+++	+++	?
诱导剂	PB, PCB			BHA			
	BHA			3'Me-DAB			
	3'MeDAB			AAF			
	3MC						
	AAF						
胎肝中存在							
癌变时变化	↑		+	+	↑↑		↑↑↑

a. CDNB:1-氯-2,4-二硝基苯。DCNB:1,2-二氯-4-硝基苯。  
 b. Oesch 等称为 X 型。

关系。比较不同分化程度肝癌中的 UDP-GT, 也发现在高分化低恶性的肝癌中, o-GT 显著增高, 但略低于增生结节中的活力, 而在中度或低度分化的恶性肝癌中, o-GT 反而依次降低, p-GT 的活力则不论在增生结节或肝癌中均见减少, 分化越差, 减少愈明显<sup>[42-45]</sup>。这些结果表明: o-GT 和 GST-P, GST-A<sub>2</sub> 一样, 也是一个肝癌前期病变或高分化型肝癌的标志酶。

### 3. 癌瘤中同工酶谱改变机制研究的进展

在研究癌瘤中同工酶改变的机制方向, 免疫定量测定占有十分重要的地位, 因为单纯测定酶活力不能完全反映酶蛋白的多少, 不能肯定癌瘤中胎儿型、胎盘型或异位型的表达失常是否由于酶蛋白合成的改变。最近, Taniguchi<sup>[46,47]</sup>比较了  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶活力测定和免疫定量测定的结果, 发现在正常鼠肝中, 两种测定结果基本一致。有线性正比关系。但在肝癌标本中, 免疫测定酶蛋白的增多并不一定伴有活力的上升, 提示在癌瘤细胞中可能合成一种具有抗原特异性而无催化能力或活性降低的酶蛋白<sup>[48]</sup>。因而认为免疫定量测定似乎更能反映基因表达的多少。

在已用免疫定量方法肯定异常表达的酶蛋白增多的基础上, 为了进一步阐明酶蛋白的增多是由于分解的减少, 还是合成增加, 而合成的增加是翻译加强还是转录出较多的

mRNA,目前已有不少作者采用分子克隆技术制备该蛋白 mRNA 的 cDNA,然后以 cDNA 为探针,用分子杂交法直接定量这种特异的 mRNA。例如 Noguchi 等<sup>[19]</sup>用 M<sub>2</sub> 型 PyK 的 cDNA 来定量 M<sub>2</sub>-PyK 的 mRNA,发现在肝大部切除后 24 小时的再生肝中 M<sub>2</sub>-PyK 的 mRNA 比正常肝脏增多 2.6 倍;而在 AH130 吉田腹水肝癌中又比再生肝高出 150 倍。并且证明: M<sub>2</sub>-PyK 酶活力的上升略后于 mRNA 的上升, mRNA 因半寿期短,下降较快,此时酶活力仍可维持一段相当长的时间。由此可见,肝癌中 M<sub>2</sub>-PyK 酶活力的增高是由于转录加强, mRNA 合成增多,并进一步合成较多 M<sub>2</sub>-PyK 酶蛋白的结果。如果这个机制有普遍意义的话,就可以认为癌瘤中胎儿型、胎盘型或异位性表达的同工酶可能是基因调控失常而导致转录增加的缘故。成年组织中这些同工酶的基因本来处于“静止”或“关闭”状态,当细胞恶变时变为“活跃”或“开放”,在某些情况下还可伴有成年型同工酶基因的调控发生相反的变化。由原来的“活跃”状态而变为“阻遏”甚至“关闭”,结果导致同工酶谱表达的失常,至于引起基因调控失常的原因,还在积极研究之中。

#### 4. 酶蛋白本身质的异常

癌瘤细胞中那些活力或合成速度发生变化的酶蛋白和正常的相比,究竟有无质的变化?这是不少研究者颇感兴趣的问题。然而迄今为止,对属于单纯蛋白的酶来说,尚未发现有明显的结构差别,濱田<sup>[49]</sup>比较了子宫平滑肌瘤和子宫肌肉瘤中乳酸脱氢酶 A、B 两种亚基和正常子宫平滑肌中这两种亚基的氨基酸组成,认为基本相同,提示一级结构可能差别不大。仅在圆二色谱测定中,发现来自肌瘤或肌肉瘤的乳酸脱氢酶,其  $\alpha$  螺旋区的百分比低于来自正常平滑肌的相同亚基,以肉瘤中的酶降低尤甚。作者<sup>[50]</sup>比较了正常小鼠腹水型肝癌细胞中 M<sub>2</sub> 型 PyK 的性质,发现在分子量、电泳和层析行为、热稳定性、最适 pH、底物动力学和几种抑制剂和激活剂的动力学参数上均十分接近或完全相同,和抗体的免疫沉淀线也完全融合。

##### (1) 细胞膜上的糖蛋白

近年来,位于细胞膜上属于糖蛋白性质的酶在癌瘤时的变化引起了广泛的重视,其中最出色的工作首推  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GTP)。此酶催化谷胱甘肽(GSH)中  $\gamma$ -谷氨酰残基的转移,受体可以是 L 氨基酸、肽或另一分子 GSH,也可以是水(水解作用)。 $\gamma$ -GTP 属于  $\gamma$ -谷氨酰循环中的第一个酶,分布在肾小管腔刷状缘、小肠绒毛膜以及胰腺、精囊、甲状腺滤泡、胆管、脉络丛、视网膜的上皮细胞上,以肾脏中的活力最高。其功能可能和氨基酸的运输有关<sup>[47,51]</sup>。酶蛋白由两个分子量不同的亚基组成,大亚基的 Mr 约 64,000—68,000。不同动物的 Mr 可略有差别,位对于分子内侧,其 N 端约 50 个氨基酸残基作为锚肽嵌入细胞膜的脂质双层中。小亚基的 Mr 在不同动物中差别较大,可从 26,000 至 45,000,位于分子外侧,并含有活性中心<sup>[52]</sup>。整个  $\gamma$ -GTP 分子的含糖量约为 20—40%,不同种属和不同组织来源的  $\gamma$ -GTP,其氨基酸组成相似,免疫性相同,但含糖量和糖链结构都不一样,组织差别较种属差别更为明显<sup>[47,53]</sup>。牛肾  $\gamma$ -GTP 的糖链结构已由木幡<sup>[53-55]</sup>阐明,它全部是天冬酰胺连接型(N 糖苷键型),结构呈高度不均一性,其中 38% 为中性寡糖链,62% 为带有 1,2 或 3 分子唾液酸残基的酸性寡糖链。中性糖链为高甘露糖型或带有双天线(biantennary)的复合型;而酸性糖链为双、三或四天线的复合型。大部分复合型糖链在

三甘露糖核心中的 $\beta$ -甘露糖基 C-4 位上带有一个 N-乙酰氨基葡萄糖而形成分叉(bisect),并富含作为非还原性末端的 $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖。每分子 $\gamma$ -GTP 平均含糖链 4.8 分子。分别测定大小亚基的糖链,还发现小亚基的糖链总数和复合型糖链多于大亚基,但不含高甘露糖型糖链;而大亚基糖链的含糖量虽少,都含较多的高甘露糖型糖链。在同一组织中,不同分子 $\gamma$ -GTP 的糖链数目和结构也可有不同,致使等电聚焦电泳可呈现多条酶带。大鼠肝脏 $\gamma$ -GTP 的糖链也已清楚,将在下文介绍。

大鼠胎肝中 $\gamma$ -GTP 的活力很高,但出生后迅速降低,以致成年鼠肝中的活力极低。当用亚硝酸胺或偶氮染料诱发大鼠肝癌后四周, $\gamma$ -GTP 的活力可增高 10—100 倍,因而成为实验性肝癌前期病变的最佳标志酶之一,移植性肝癌中 $\gamma$ -GTP 也明显增高,但其活力与恶性程度不成正比。其他恶性肿瘤如肺癌、乳癌、膀胱癌也含有很高活力的 $\gamma$ -GTP<sup>[47,56]</sup>。

佐藤<sup>[56]</sup>从大鼠正常肾脏、吉田腹水肝癌及乙酰氨基苄诱发的肝癌前期增生结节中提纯了 $\gamma$ -GTP,比较三者的免疫性质,发现完全相同。用去污剂提出的肝癌或结节中的 $\gamma$ -GTP,其大亚基较肾脏 $\gamma$ -GTP 较大,而小亚基则完全相同。当用蛋白酶提取 $\gamma$ -GTP 时,肝癌与肾脏的大小亚基均分别相同,然而,胎肝、结节和肝癌中的 $\gamma$ -GTP 较肾脏 $\gamma$ -GTP 的等电点为低,当用神经氨酸酶切除糖链末端的唾液酸后,则四种不同来源 $\gamma$ -GTP 的等电点就趋向一致,提示前三者分子的糖链中含有较多的唾液酸<sup>[45]</sup>。谷口(Taniguchi)<sup>[47,51,57]</sup>也分析了大鼠肾脏、卵黄囊肿瘤、腹水肝癌 AH 66 和偶氮染料诱发肝癌中的 $\gamma$ -GTP,同样发现不同 $\gamma$ -GTP 制剂的氨基酸组成极为类似,和抗 $\gamma$ -GTP 抗体的免疫沉淀线完全融合,此抗体对不同来源 $\gamma$ -GTP 活力的抑制曲线基本一致,并且肿瘤 $\gamma$ -GTP 的免疫性也和正常鼠肝及胎肝完全相同。但卵黄囊肿瘤和 AH 66 中的 $\gamma$ -GTP 所含的己糖和氨基己糖则较肾脏 $\gamma$ -GTP 明显增多,尤以己糖为甚,可高出肾脏两倍。比较人类原发性肝癌和非癌正常区的 $\gamma$ -GTP,也发现其氨基酸组成基本相同,Mr 和 pI 也相同。但肝癌 $\gamma$ -GTP 的氨基葡萄糖含量为正常区 $\gamma$ -GTP 的三倍,用对不同糖基具有特殊亲和力的各种植物凝集素,可发现这两种 $\gamma$ -GTP 的结合曲线都是不同的,提示它们分子中各种糖基的含量比例不同(表 5)<sup>[45]</sup>。

木幡<sup>[58]</sup>鉴于糖蛋白糖链结构的组织特异性,提出肝癌中 $\gamma$ -GTP 的糖链不应和肾脏的 $\gamma$ -GTP 而应和正常肝脏的 $\gamma$ -GTP 比较,才能获得其结构是否改变的结论。他用胼解法分离提纯了正常鼠肝和 AH 66 中 $\gamma$ -GTP 的寡糖链,测定了两者的数量和糖基顺序,发现有明显的不同(表 6,图 2),可归纳如下:(1) 每分子正常鼠肝 $\gamma$ -GTP(L- $\gamma$ GT)中的糖链总数低于 AH 66 肝癌的 $\gamma$ -GTP(A- $\gamma$ GT),约为其 25%;(2) L- $\gamma$ GT 的糖链全部为带有唾液酸的酸性糖链,而 A- $\gamma$ GT 则含 28%不带唾液酸的中性糖链;(3) 虽然 A- $\gamma$ GT 中带有单、双、三个唾液酸的糖链百分比均低于 L- $\gamma$ GT,但因其糖链总数为 L- $\gamma$ GT 的三倍以及含有带 4 个唾液酸的高酸性糖链,故每分子 A- $\gamma$ GT 中唾液酸的含量约为 L- $\gamma$ GT 的三倍;(4) A- $\gamma$ GT 含 16%的高甘露糖型糖链,而 L- $\gamma$ GT 完全没有;(5) L- $\gamma$ GT 中三天线或四天线的糖链常常有 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 的重复顺序,而在 A- $\gamma$ GT 中不能发现;(6) A- $\gamma$ GT 糖链中三个甘露糖核心虽和 L- $\gamma$ GT 一样,但前者的外周部分常缺失 Gal;(7) A- $\gamma$ GT 糖链核心的 $\beta$ 甘露糖残基上约 40%带有 GlcNAc 的分叉,而 L- $\gamma$ GT 中完全没有这种分叉的糖基。这些结果说明肝癌 $\gamma$ -GTP 经核糖体翻译合成的过程中,其

表 5 人类肝癌和非肝癌区域  $\gamma$ -GTP 性质的比较<sup>[45]</sup>

指 标	肝 癌 区	非肝癌区
分子量		
大亚基	64,000	64,000
小亚基	26,000	26,000
等电点		
神经氨酸酶处理前	3.7—3.9	3.7—3.9
	不均一性,但区带图谱不同	
神经氨酸酶处理后	5.7	5.7
	均一性,区带相同	
在聚丙烯酰胺凝胶上的迁移率	相同	
氨基酸组成	相同	
氨基葡萄糖(nmole/mg 蛋白)	362	185
结合于植物抗凝素的量		
伴刀豆球蛋白(ConA)	低	高
麦胚凝集素(WGA)	高	低
植物血凝素(PHA)	高	低
海狸豆凝集素(CB)	高	低
RCA-120		

表 6 正常鼠肝和 AH 66 腹水肝癌细胞中  $\gamma$ -GTP 的 N 糖苷键型寡糖链的比较<sup>[58]</sup>

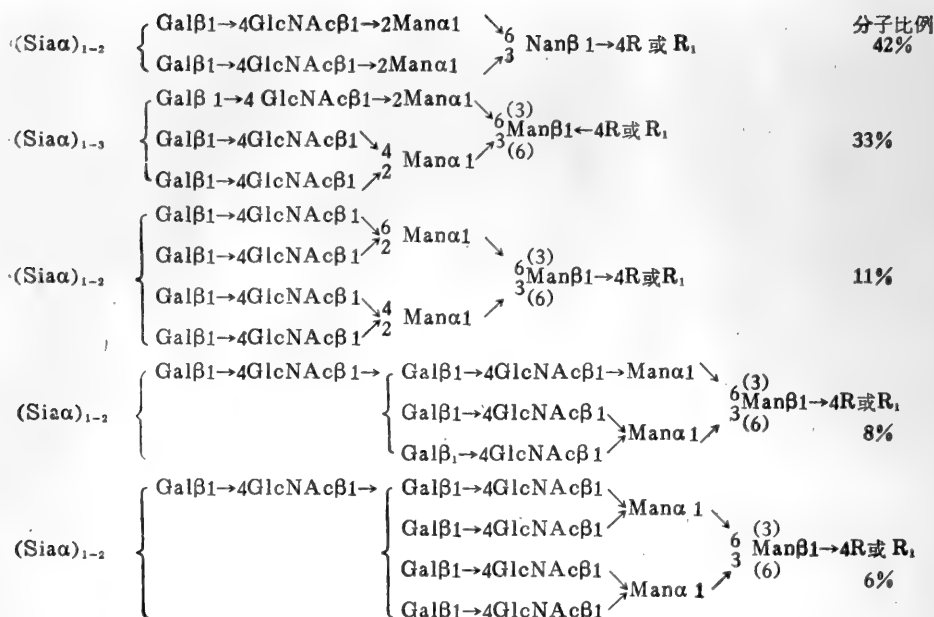
糖链数及种类	正常鼠肝	AH 66
糖链总数(分子/分子酶)	3.7	14.0
酸性糖链总量(%)	100	72
单唾液酸	41	27
双唾液酸	46	30
三唾液酸	13	8
四唾液酸	0	7
唾液酸含量(分子/分子酶)	6.0	19.5
各类糖链分子比(%)		
高甘露糖型(%)	0	16
复合型总量(%)	100	84
双天线	42(0)	59(39)
三天线	33	13
四天线	11	12
三及四天线含有重复程序	14	0

括号内的数字指双天线而在  $\beta$  甘露糖残基上带有 N-乙酰氨基葡萄糖的糖链数。

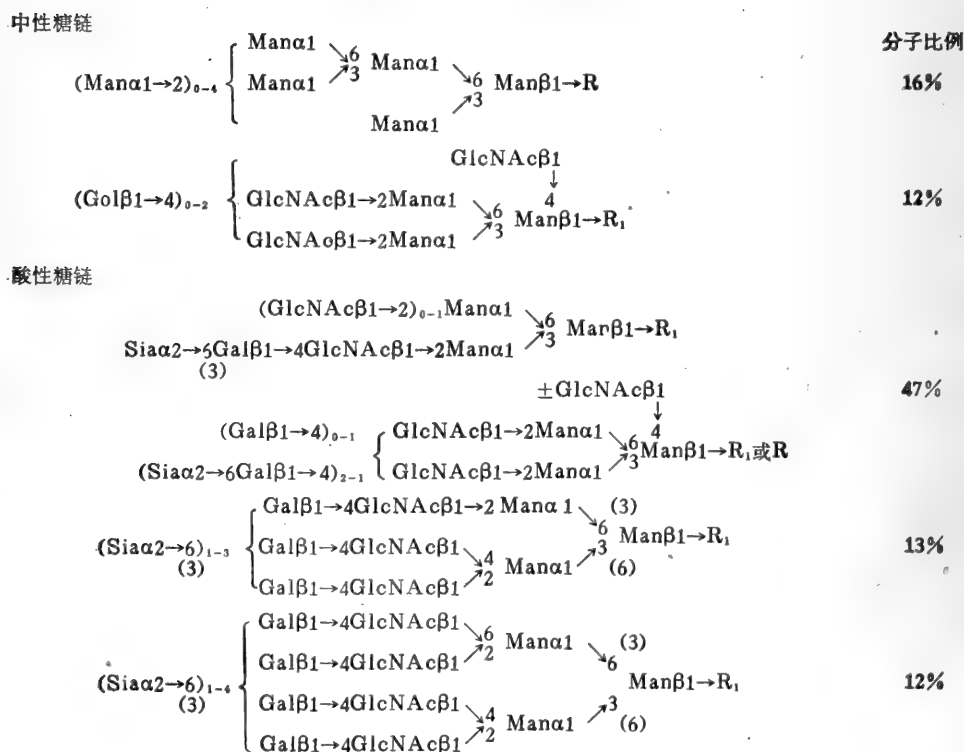
糖基的添加发生了异常,如糖链因合成不完全而缩短,唾液酸和半乳糖缺失,但糖链总数增加,伴有甘露糖核心上附加糖基的分叉现象。

其他癌瘤如乳腺癌和肾癌甚至病毒转化细胞中的  $\gamma$ -GTP 也有糖链结构改变和唾液酸含量增加的现象<sup>[58]</sup>。换句话说,在癌瘤中由于  $\gamma$ -GTP 翻译后修饰不同,形成了一类酶蛋白相同而糖链不同的次生同工酶。

用 4—30% 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳可将血清  $\gamma$ -GTP 分成 12—13 条酶带。自阳极起分别为 I、II、II'、III—VI, VII<sub>a</sub>、VII<sub>b</sub>、VII<sub>c</sub> 及 VIII<sub>a</sub>、VIII<sub>b</sub>, 有时尚出现 I'。这些酶可能来自肝脏,因它们的抗原性是相同的,都能和抗肾  $\gamma$ -GTP 抗体起反应<sup>[46,59]</sup>,故认为它们主要因糖链数目的组成不同,引起分子量和电荷的差别而造成分子的多形性。酶带 I'、II 及 II'



(a) 正常鼠肝中  $\gamma$ -GTP 寡糖链的结构



(b) 大鼠 AH 66 腹水肝癌中  $\gamma$ -GTP 寡糖链的结构

图 2 正常鼠肝(a)和 AH 66 腹水肝癌中  $\gamma$ -GTP 寡糖链的结构

Sia: 唾液酸; Gal: 半乳糖; GlcNAc: N-乙酰氨基葡萄糖; Man: 甘露糖。R = 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc; R<sub>1</sub> = 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\leftarrow$ 1 $\alpha$ Fuc (Fuc: 岩藻糖)



为原发性肝癌所特有<sup>[60]</sup>,称为 Novel  $\gamma$ -GTP,其抗原性也和肾脏  $\gamma$ -GTP 相同<sup>[61]</sup>,因此很可能是上述改变后的分子糖链所引起的特殊酶带。

细胞膜上另一种研究较多的酶是芳香酰胺酶(AAm),它属于 N-氨肽酶的一种,催化肽链氨基末端中性氨基酸的水解,也可水解芳香胺类和中性氨基酸(如丙氨酸、亮氨酸)形成的酰胺。同时存在于高尔基体膜和内质网膜,但它和亮氨酸氨肽酶有不同的免疫性,后者除位于细胞膜外,主要存在于胞液中<sup>[62]</sup>。人类不同组织来源的 AAm,在 pH 8.3 介质中电泳时,迁移率为胎盘>肝>肾>肺>小肠。但它们的分子量约为 24,000,动力学数据十分接近或相同。和抗肾或抗胎盘 AAm 抗体反应的免疫沉淀线完全融合<sup>[63,64]</sup>,胎盘、肾、小肠 AAm 的氨基酸组成也相差无几<sup>[65]</sup>,故认为不同组织中 AAm 的主要差别可能是糖链上唾液酸量的不同。从人类肾癌中提纯的 AAm,其分子量、米氏常数、最适 pH、对热或尿素的稳定性、受两价金属离子的影响、某些氨基酸或巯基试剂的抑制率以及免疫特性完全和正常肾脏的 AAm 相同,只有电泳速度较正常的 AAm 快,TEAE 层析柱上被洗脱的液量也较多,而与胎盘 AAm 接近。如用神经氨酸酶处理,则肾癌和正常肾 AAm 的电荷差别就完全消失<sup>[66]</sup>。进一步用 TEAE 可将其他正常组织及相应癌瘤的 AAm 分成 2—4 个活性峰(I<sub>a</sub>、I<sub>b</sub>、I<sub>c</sub>及 II),肝癌、胃癌、肺癌的 AAm 分别和正常组织相比,其 I<sub>a</sub>—I<sub>c</sub> 除活性峰的数目不等外,普遍有峰值右移的现象,提示人类各种癌瘤中 AAm 的负电荷增加。同样,神经氨酸酶处理也可使正常及癌瘤组织中的 AAm 活性峰左移,并消除分子的不均一性,只呈现一个正常肾脏 AAm-I<sub>a</sub> 重合的活性峰,充分证明癌瘤中 AAm 的唾液酸含量增加<sup>[67]</sup>。但这些实验并未阐明 AAm 糖链上中性糖基的差别。作者<sup>[68,69]</sup>曾从正常小鼠肾、肝及 HepA 腹水肝癌中分别纯化 AAm,比较三者的性质,也主要呈现其糖链有些差别(表 7)。肝癌 AAm 较正常肝 AAm 的糖含量较低,唾液酸也较少,以致肝癌 AAm 带有较少的负电荷,引起电泳迁移率降低及 DEAE 纤维素层析柱上较易洗脱的现象。至于两者受 Co<sup>2+</sup> 激活,受苯丙氨酸抑制的数据不同的原因,可能是由于糖基的多少不同引起空间结构的微小差别以致对效应剂的亲和力不同,而小鼠 HepA 肝癌中的 AAm 含唾液酸少于正常鼠肝 AAm 的现象与人类肝癌不同,其原因可能是种属差异或肝癌种类的不同所致。

上述癌瘤中, $\gamma$ -GTP 和 AAm 发生糖链合成不完全的现象,在分泌性糖蛋白分子中也可发生,如从卵巢囊性癌和支气管肺泡腺癌中分泌出来的异位性淀粉酶和正常颌下腺的  $\alpha$  淀粉酶比较,也发现有外周糖链中半乳糖和岩藻糖的缺失<sup>[70]</sup>。

## (2) 溶酶体中糖蛋白

在癌瘤的溶酶体中,某些化学本质为糖蛋白的酶活力可见明显升高,尚伴有糖链或(和)蛋白部分的磷酸化修饰。

芳香硫酸酯酶(AS)有两型同工酶,A 型催化硫酸脑苷脂中硫酸基的水解,而 B 型的底物是氨基多糖中 N-乙酰氨基半乳糖-4-硫酸。两型之间无交叉免疫,它们可用 DEAE 纤维素从正常人肺的溶酶体中分离开来。A 型的 pI 低于 B 型<sup>[71,72]</sup>。牧田证明:在多种原发性肺癌中,AS 的活力约较相应未被浸润的正常组织为高,其中尤以 B 型活力的上升更为普遍而明显。在外科切除的肺癌标本中,除 A、B 两型外,出现了一种 pI 介于 A、B 之间的同工酶。因其免疫性和其他理化性质和 B 型相同,称为 B<sub>1</sub> 型。B<sub>1</sub> 型同工酶在正常白细胞中也可发现,且在慢性髓细胞白血病的白细胞中明显增高<sup>[71-74]</sup>。

表 7 三种不同来源 AAm 的性质比较

指 标	正常小鼠肾	正常小鼠肝	HepA 肝癌
匀浆比活性(单位/mg 蛋白质)	1.42	0.25	0.27
DEAE 纤维素层析时 NaCl 洗脱液浓度(mol/L)			
神经氨酸酶处理前	0.12	0.23	0.17
处理后	0.12	0.12	0.12
在聚丙烯酰胺凝胶电泳上的相对迁移率			
神经氨酸酶处理前	0.30	0.48	0.37
处理后	0.30	0.30	0.30
在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上的相对迁移率	0.20	0.20	0.20
分子量	213,000	201,000	208,000
亚基数	2	2	2
L-亮氨酸- $\beta$ -萘胺的 $K_m$	$9.5 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^{-5}$	$9.5 \times 10^{-5}$
1mmol/LCo <sup>++</sup> 激活(%)	74	58	33
10mmol/L 苯丙氨酸抑制(%)	68.2	77.6	51.8
苯丙氨酸 $K_i$	$0.3 \times 10^{-3}$	$0.3 \times 10^{-3}$	$0.9 \times 10^{-3}$
尿素半失活浓度	14.0	15.9	8.4
含糖量%	0.6	0.6	0.6
免疫性质	完全相同,沉淀线融合		

用碱性磷酸酶处理来自肺癌或慢性髓细胞白血病的 B<sub>1</sub>, 可使其负电荷减少, pI 增高, 但 pI 仍低于碱性的 B 型。可见 B<sub>1</sub> 分子中的磷酸基团是其 pI 低于 B 型的原因之一。如再用内切  $\beta$ -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 H (内切糖苷酶 H) 切除 B<sub>1</sub> 分子中高甘露糖型链 (其末端带有唾液酸) 后, 则其 pI 可增高至完全和 B 型一样。由此可以认为 B<sub>1</sub> 型的 pI 低于 B 型的原因也与分子糖链的磷酸化及带有唾液酸有关。进一步用 P<sup>32</sup> 磷酸盐给与移植人类肝癌的裸鼠, 使 P<sup>32</sup> 标记肝癌中的 AS, 再用免疫沉淀法纯化 B<sub>1</sub> 型 AS, 经内切糖苷酶 H 处理, 可在蛋白及糖链两个组分中都发现 P<sup>32</sup>, 前者标记在丝氨酸及苏氨酸残基上, 后者标记在甘露糖的 C<sub>6</sub> 上, 证明肺癌中 B<sub>1</sub>-AS 的蛋白质及糖基都发生了磷酸化, 形成磷酸修饰的次生同工酶<sup>[72]</sup>。

$\beta$  葡萄糖醛酸酶 ( $\beta$ -GL) 水解氨基多糖非还原性末端的  $\beta$  葡萄糖苷键。此酶也含有高甘露糖的糖链, 其活力在肺癌组织中明显增高。等电聚焦证明肺癌的  $\beta$ -GL 较正常肺  $\beta$ -GL 有较大的不均一性, 其主带的 pI 近于 8, 碱性磷酸酶可以去除酶分子上的酸性成分而使均一性增加, 而内切糖苷酶 H 则能切除所有导致不均一性的酸性成分, 使癌肿  $\beta$ -GL 的迁移率和正常肺的  $\beta$ -GL 一致。P<sup>32</sup> 标记法也同样证明酶分子糖链中不均一的磷酸化是造成分子多形性的主要原因。牧田认为: 糖蛋白在翻译后演变成成熟的过程中, 磷酸化糖基的添加可能是糖链生物合成中正常的中间步骤; 而癌肿  $\beta$ -GL 中磷酸化糖链的出现提示, 酶分子糖链成熟缺陷或阻断从而产生未成熟的糖链以及前述的糖链缩短可能都属于去分化的“返祖”现象<sup>[71, 72]</sup>。

### 三、癌瘤组织和血清中的糖基转移酶

癌瘤组织中糖蛋白糖链的结构异常是一种普遍的现象, 不但存在于酶中, 也发生在非酶的蛋白质中, 如肝癌细胞中的维生素 B<sub>12</sub> 结合蛋白和纤维蛋白原的糖链中也有唾液酸

残基的增加,而且不少作者也报道了癌瘤细胞膜表面的糖脂也有糖链结构的变化。有理由认为,糖链结构的异常是有关糖链合成的糖基转移酶类和有关糖链分解的糖苷酶类平衡失常的结果,因此研究这两类功能相反的酶在癌瘤时的变化将有助于阐明糖蛋白糖链结构异常的机制。然而,目前对糖苷酶的研究较少,故本文仅从两种糖苷转移酶为例来介绍这类酶在癌瘤组织和患者血清中的变化。

## 1. 半乳糖苷转移酶(Gal-T)

此酶主要存在于细胞表面膜和高尔基体膜,催化 UDP-Gal 中的半乳糖基转移至寡糖链受体,使糖链得以延长。如受体是 N-糖苷键型的糖蛋白糖链,其末端常是 N-乙酰氨基葡萄糖;受体是 O-糖苷键型的糖链时,则其末端一般是 N-乙酰氨基半乳糖或 N-乙酰氨基葡萄糖,也可以是另一分子的半乳糖;而受体是糖脂(如带有神经酰胺的神经节苷脂)时,其末端常为葡萄糖或乙酰氨基半乳糖。半乳糖和受体末端糖苷的结合,又可有不同的异构体(1→4,1→6,1→3)及异头体( $\alpha$  或  $\beta$ )。这些众多的复杂反应是由一系列的 Gal-T 所催化,但其种类和底物特异性尚不清楚。从广义或单从供体的角度来说,这些酶也属于同工酶的范畴。乳糖合成酶也能催化 UDP-Gal 和蛋白质糖链中 N-乙酰氨基葡萄糖的反应,也是 Gal-T 的一种<sup>[75]</sup>。

关于癌瘤组织中 Gal-T 活性的报告很不一致,随癌瘤部位、细胞类型乃至测定用的受体底物的不同而有差别。Makita 报道:当以去唾液酸牛颌下腺粘蛋白为受体底物时,各型肺癌和正常肺组织中 Gal-T 的活性并无显著差别;但以去唾液酸和半乳糖的胎儿蛋白(ASGF)为受体底物时,则可发现肺癌、子宫癌及膀胱癌中 Gal-T 较其邻近正常组织明显增高,能分泌粘蛋白的肺腺癌和子宫腺癌分别比不分泌的扁平上皮性肺癌和其他类型的子宫癌更为明显。但用同一底物测定消化道腺癌时,则未发现和对照组织存在有意义的差别,甚至也有降低的报道。人类转移性肝癌中的 Gal-T 也是降低的。至于有关动物癌瘤中 Gal-T 的活力的研究甚少,个别报道认为小鼠艾氏腹水癌中以糖蛋白为受体的 Gal-T 以及乳腺癌中的乳糖合成酶的活性增高,且后者不再受雌二醇或生乳素等激素的诱导<sup>[75]</sup>。

Kim<sup>[76,77]</sup>用 ASGF 为底物测定了人血清中的 Gal-T,发现肝脏疾病、主要是乙醇性肝损害及肝炎时此酶活力升高,而其他疾病则在正常活力范围以内。Podolsky<sup>[78,79]</sup>等用同样底物测定,也报道了癌瘤患者血清的 Gal-T 活力虽略高于正常,但与非癌疾病相比,并无统计学上的意义。他进一步用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血清中的 Gal-T,发现正常人只有一条酶带,称 Gal-T I,而73—83%的某些癌瘤患者则多出一条泳动较慢的 Gal-T II,其活力仅占总活力的5—20%<sup>[80]</sup>。将 Gal-T I 及 II 提纯后比较其分子量、氨基酸组成、含糖量、糖链组成和动力学,结果都不相同,提示它们可能是不同基因位点调控的原级同工酶<sup>[81]</sup>。由于 Gal-T II 也存在于癌性渗出液而在良性渗出液中不能检出,故认为该酶来自癌细胞,可作鉴别渗出液为良性或恶性的指标,而胎儿肠粘膜、未成熟的肠隐窝细胞中含有 Gal-T II,而成人肠粘膜绒毛顶端分化成熟的上皮细胞中只有 Gal-T I,没有 Gal-T II,故可以认为它是一种癌胎儿蛋白<sup>[80,82]</sup>。

## 2. 唾液酸基转移酶(ST)

将 CMP-唾液酸中的唾液酸(SA)基团转至糖蛋白或神经节苷脂的糖链末端。如以糖

蛋白的N-糖苷键糖链为受体,其末端常是半乳糖,形成  $SA\alpha 2 \rightarrow 6Gal$  或  $SA\alpha 2 \rightarrow 3Gal$  连接键。如受体糖链为  $\alpha$ 糖苷键型,则 SA 也可连在乙酰氨基半乳糖上形成  $SA\alpha 2 \rightarrow 6GalNAc$  连接键;而受体为神经节苷脂时,则 SA 一般连接在半乳糖(形成  $SA\alpha 2 \rightarrow 3Gal$  连接)或另一分子的 SA 上(形成  $SA\alpha 2 \rightarrow 8 SA$  连接),故 ST 和其他糖基转移酶一样,也有多种类型的同工酶(广义的)。目前已提出了五种不同底物特异性的 ST,它们也主要位于高尔基体及细胞表面膜上<sup>[83]</sup>。

宫城<sup>[83,84]</sup>总结了各种病毒转化细胞、动物和人类肿瘤中以糖蛋白为受体的 ST 的活力,也发现和 Gal-T 一样,不同瘤株和不同底物呈现不同的结果。一般说来,在大鼠实验性肿瘤中,ST 活力较正常的相应组织降低或不变;而人类结肠癌和卵巢癌的 ST,当以去唾液酸胎儿蛋白为底物时,可见活性升高。但这些结果尚不足以解释癌瘤糖蛋白糖链末端 SA 残基增多或减少的机制。

尽管癌瘤组织中的 ST 变化不定,但血清中的 ST 活力从现有的报道来看,几乎没有例外地增高<sup>[83]</sup>,包括大鼠乳癌、接种人黑色素瘤的裸鼠、人类消化系统癌肿、黑色素癌和精囊癌患者的血清。

用 TritonX100 从正常鼠肝和3-甲基奶油黄诱发的大鼠肝癌中提取 $\beta$ -半乳糖苷( $\alpha 2 \rightarrow 6$ )唾液酸基转移酶,经磷酸纤维素柱分离,可见正常肝 ST 有两个洗脱峰, I 和 II;而肝癌的 ST 只有一个洗脱峰与正常 ST 的峰 I 吻合。用神经氨酸酶处理正常鼠肝 ST,可使峰 I 的洗脱位置移后而与峰 II 吻合,而峰 II 的洗脱位置不变。可见 ST 峰 I 本身也是一个带有

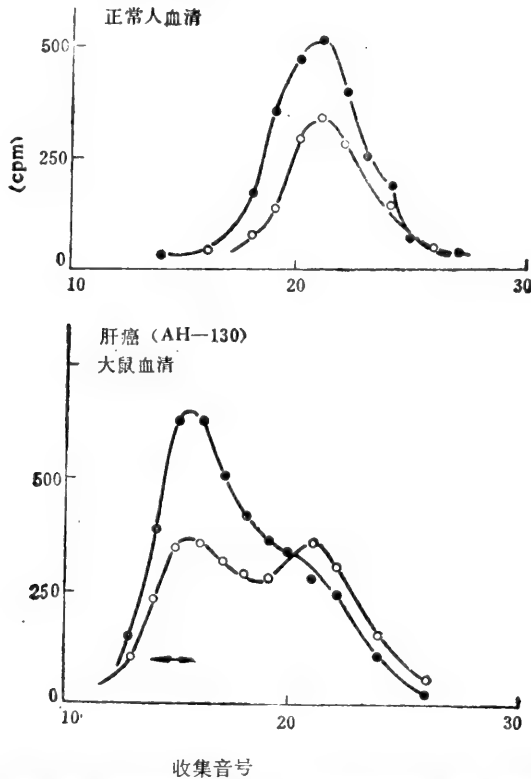


图3 正常和肝癌大鼠血清中唾液酸转移酶和N-乙酰氨基葡萄糖转移酶的葡聚糖G200柱层析图谱  
●为唾液酸转移酶;○为N-乙酰氨基葡萄糖转移酶

唾液酸糖链的糖蛋白,而峰Ⅱ则不带唾液酸。但两种形式ST的区别不单是唾液酸的有无,峰Ⅱ的分子量和热稳定性均大于峰Ⅰ,对底物CMP-唾液酸的Km也大于峰Ⅰ。但两者的免疫性没有区别,因此峰Ⅰ和峰Ⅱ是属于原级抑或次生性同工酶尚有待于研究。有趣的是,峰Ⅱ及去唾液酸的峰Ⅰ可被ST自身催化,使其糖链末端加上唾液酸<sup>[84]</sup>。立木提出,有唾液酸而分子量较小的峰Ⅰ可能是酶的活性形式,缺唾液酸而分子量较大的峰Ⅱ是峰Ⅰ的前身,经过自身催化及蛋白酶解作用转变成峰Ⅰ<sup>[85]</sup>。肝癌中缺乏峰Ⅱ只有峰Ⅰ,也许可用以说明肝癌中ST活力升高和某些糖蛋白糖链末端唾液酸残基增加的现象。

肝癌和正常肝组织中ST同工酶谱的区别可否用于肝癌的诊断也有人作了试探。Tsuiki<sup>[85]</sup>(立木)用Sephadex G 200层析柱分离正常和AH130肝癌大鼠血清的ST及N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶,结果如图3所示:正常鼠血清中这两种酶的分子量较大,呈单活性峰,而肝癌鼠血清中则两种酶都有两个活性峰,其中一个活性峰的分子量低于正常鼠血清中相同酶的分子量。虽然这个工作还刚刚开始,目前还不知道这两个酶活性峰的来源、结构差别及相互关系,但都展示了利用酶谱的不同来诊断疾病的可能性。

### 参 考 文 献

- [1] Weber, G., *New Eng. J. Med.*, **296** (1977), 486—493, 541—551.
- [2] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CUB) Recommendation *Eur. J. Biochem.*, **82** (1978), 1—3.
- [3] Rider, C. C. & Tayler, C. C., *Isozyme, Outline Studies in Biology*, Chapman and Hall, 1980.
- [4] Young, R. A., *et al.*, *Cell*, **23** (1981), 451—458.
- [5] Marie, J., *et al.*, *Nature*, **292** (1981), 70—72.
- [6] Peters, J., *et al.*, *Biochemical Genetics*, **19** (1981), 757—768.
- [7] Noguchi, T. & Tanaka, T., *J. Biol. Chem.*, **257** (1982), 1110—1113.
- [8] Levin, M. J., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **699** (1982), 77—83.
- [9] Saheki, S., *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **704** (1982), 484—493.
- [10] Kahn, A. & Marie, J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **523** (1978), 59—74.
- [11] Moss, D. W., *Isozyme Analysis*, 1979.
- [12] Eventoff, W., *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74** (1978), 2677—2681.
- [13] 今村喜一, 蛋白质·核酸·酵素, **22** (1978), 1799—1804.
- [14] Noguchi, T., *Eur. J. Biochem.*, **128** (1982), 583—588.
- [15] Ibsen, K. H., *Cancer Res.*, **37** (1977), 341—353.
- [16] a. 邵明川、陈惠黎, 生物化学与生物物理学报, **14** (1982), 181—188.  
b. 盛亲梅、陈惠黎, 上海第一医学院学报, **10** (1983), 125—131.
- [17] Noguchi, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **258** (1983), 15220—15223.
- [18] 陈惠黎、田中武彦, 待发表资料.
- [19] Noguchi, T., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **259**(1984), 2651—2655.
- [20] 陈惠黎, 分子酶学, 陈惠黎, 李文杰编著, 人民卫生出版社, 1983, 367—423.
- [21] Stao, S. & Sugimura, T., *Method in Cancer Res.*, **12** (1976), 259—315.
- [22] Tsuiki, S., *Gann Monograph*, **24** (1979), 223—243.
- [23] 佐藤清美, 生化学 **49** (1977), 1091—1119.
- [24] Ichihara, A., *Ann. Acad. Sci. N. Y.* **259** (1975), 347—354.
- [25] 东野一彌、大谷理智子, 内科 Mook, № 18 (1982), 171—179.
- [26] Ibsen, K. H. & Fishman, W. H., *Biochim. Biophys. Acta.*, **560** (1979), 243—280.
- [27] Weinhouse, S., *et al.*, *J. Nat. Cancer Inst.*, **68** (1982), 343—347.
- [28] Schapira, F., *Isozymes, Current Topics in Biological and Medical Research*, **5** (1982), 21—75.
- [29] Shatton, J. B., *et al.*, *Cancer Res.*, **39** (1979), 492—501.
- [30] 佐藤清美, *Oncologia*, **1** (1982), 103—120.
- [31] Gelboin, H. V., *Physiol. Rev.*, **60** (1980), 1107—1166.
- [32] Miller, E. C., *Cancer Res.*, **38** (1978), 1479—1496.
- [33] Faber, E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **605** (1980), 149—166.

- [34] Pitof, H. C. & Sirica, A. E., *Biochim. Biophys. Acta.*, **605** (1980), 191—215.
- [35] Sato, K., *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **417** (1983), 213—223.
- [36] Kitahara, A., *et al.*, *Cancer Res.*, **44** (1984), 2698—2703.
- [37] Sato, K., *et al.*, *Gann*, **75** (1984), 199—202.
- [38] Solt, D. & Farber, E., *Nature (London)*, **263** (1976), 701—703.
- [39] 佐藤清美, *Oncologia*, **14** (1985), 112—115.
- [40] Sato, K., *et al.*, *Carcinogenesis*, **5** (1984), 473—477.
- [41] Kitahara, A., *Gann*, **74** (1983), 649—655.
- [42] 尹宗柱, 弘前医学, **34** (1982), 677—701.
- [43] Yin Zongzhu, *et al.*, *Gann*, **73** (1982), 239—248.
- [44] 尹宗柱、佐藤清美, 延边医学院学报, **5** (1982), 1—23.
- [45] Sato, K., *et al.*, *Gann, Monograph*, **29** (1983), 23—31.
- [46] Taniguchi, N., *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **417** (1983), 203—212.
- [47] Taniguchi, N., *et al.*, *Gann, Monograph*, **29** (1983), 263—272.
- [48] Yokosawa, N., *Oncodevelopmental Biol. Med.*, **4** (1983), C71—C78.
- [49] 瀨田稔, 蛋白质·核酸·酵素, **22** (1977) 1690—1698.
- [50] 陈惠黎等, 生物化学与生物物理学报, **14** (1982), 189—198.
- [51] 谷口直之、横沢纪子, *Oncologia*, **1** (1982), 31—34.
- [52] Tsuji, A., *et al.*, *J. Biochem.*, **87** (1980), 1567—1571.
- [53] 木幡阳, 薬学雑誌 **104** (1984), 823—838.
- [54] Yamashita, K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **258** (1983), 1098—1107.
- [55] Yamashita, K., *et al.*, *J. Biochem.*, **93** (1983), 135—147.
- [56] Tsuchida, S., *et al.*, *Cancer Res.*, **39** (1979), 4200—4205.
- [57] Taniguchi, N., *et al.*, *Carcinoembryonic Proteines, Recent Progress* (Ed. Hirai H. & Tsukada, Y.) 1983, Hokkaido University, School of Medicine, Sapporo, Japan.
- [58] Yamashita, K., *et al.*, *Cancer Res.*, **43** (1983), 5059—5063.
- [59] Tsuchida, S., *et al.*, *J. Biochem.*, **89** (1981), 775—782.
- [60] 澤武纪雄等, 日本临床, **38** (1980), 126—133.
- [61] Sawabu, N., *et al.*, *Gann, Monograph*, **29** (1983), 291—298.
- [62] Ninobe, M. & Fujii, S., *J. Biochem.*, **87** (1980), 195—203.
- [63] Hiwada, K., *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **76** (1977), 267—275.
- [64] Ito, T., *et al.*, *Clin. Chim. Acta.*, **101** (1980), 139—143.
- [65] Hiwada, K., *et al.*, *Biochemical Res.*, **2** (1981), 517—526.
- [66] Yamamoto, H., *Oncodevelopmental Biol. and Med.*, **1** (1980), 169—180.
- [67] Ninobe, M., *et al.*, *Cancer Res.*, **39** (1979), 4212—4217.
- [68] 查锡良、陈惠黎、顾天爵, 上海第一医学院学报, **9** (1982), 361—367.
- [69] 查锡良、陈惠黎, 生物化学与生物物理学报, **17** (1985), 384—392.
- [70] Yamashita, K., *et al.*, *J. Biochem.*, **90** (1981), 1281—1289.
- [71] 贺佐伸省等, *Oncologia*, **1** (1982), 84—101.
- [72] Makita, A., The 4th Chinese-Japanese Meeting on Allergology and Immunology, May 1984, Shanghai Beijing Harbin.
- [73] Gasa, S., *et al.*, *Cancer Res.*, **40** (1980), 3804—3809.
- [74] Gasa, S., *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **116** (1981), 497—503.
- [75] 落合滋子、牧田章, *Oncologia*, **1** (1982), 44—57.
- [76] Kim, Y. S., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **51** (1972), 2024—2032.
- [77] Kim, Y. S., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **51** (1972), 2033—2039.
- [78] Podolsky, D. K., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65** (1975), 545—551.
- [79] Podolsky, D. K., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73** (1976).
- [80] Podolsky, D. K., *et al.*, *New Eng. J. Med.* **299** (1978), 703—705.
- [81] Podolsky, D. K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **254** (1979), 3983—3990.
- [82] 东野一彌、波田寿一, 臨床病理(臨時増刊)特集, **51** (1982), 99—111.
- [83] 宫城妙子, *Oncologia*, **1** (1982), 58—71.
- [84] Miyagi, T. & Tsuiki, S., *Eur. J. Biochem.*, **126** (1982), 253—261.
- [85] 立木蔚, *Oncologia*, **1** (1982), 10—20

# 农业生物化学的研究进展

阎 隆 飞

(北京农业大学植物生化教研室)

- 一、作物品种的鉴定
- 二、种子储藏蛋白的研究
- 三、植物的抗寒性
- 四、植物的抗盐性
- 五、植物的抗病性
- 六、豆科植物的共生固氮作用

农业生物化学起源很早, Liebig 在 1840 年著的《有机化学应用于农业及生理学》就涉及到农业生化。但是农业生化发展缓慢, 远较医学生生化落后。不过, 近年来随着农业现代化的进展, 在农业科学的各个领域, 生物化学的研究日益开展起来, 很多基础理论得到阐明, 有的逐步接近分子水平; 有些在应用方面取得一定效果。现在我们仅就生物化学在作物的品种鉴定、种子的储藏蛋白、植物的抗寒性、抗盐性、抗病性以及豆科植物共生固氮作用等方面的研究趋势作一简单介绍。当然农业生化涉及的方面十分广泛, 除上述问题外, 在畜牧、兽医、昆虫、蚕桑、鱼类等生化也有大量研究, 因此本文介绍的很不全面, 只能看作是农业生化研究的一小部分。我国农业生化虽然起步晚, 但今后也必将在四化建设的进程中作出应有的贡献。

## 一、作物品种的鉴定

作物品种鉴定在农业上是一个很重要的问题。传统方法是将各种作物品种分别在田间栽培, 根据它们的形态特征进行鉴定。这种方法需要土地, 并耗费时间和人力, 因而迫切需要可以在实验室进行鉴定的方法。电泳法就是一种有效的方法, 近年在欧洲已广泛应用。最近 Cooke(1984)总结了作物品种鉴定的电泳技术<sup>[1]</sup>。

作物种子蛋白分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白四大类。禾谷类中的储藏蛋白主要为醇溶蛋白, 豆类则为球蛋白。以小麦储藏蛋白为例, 用电泳将其麦醇溶蛋白分为40—50个组分。这些组分在不同品种中是不同的。麦醇溶蛋白的组分是品种的一个特性, 在英国已将生产中使用的54个小麦品种用电泳进行了鉴定, 所有蛋白质的区带都已编出号码, 并制定出检索表。根据某一品种的蛋白区带即可查出它属于什么品种。现在并用电子计算机进行了数据的储存和查找。

现在常用的电泳法有下列几种: (1) 淀粉胶电泳, 在乳酸缓冲液中进行; (2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在乳酸缓冲液中进行; (3) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳; (4) 超薄等电聚焦 (UTLIEF); (5) 双向电泳 (脲 PAGE/SDS PAGE 或 IEF/SDS PAGE)。双向电泳可以大大提高分辨率, 有利于品种的鉴定。

同工酶也可以用于品种的鉴定, 如大麦、小麦、燕麦等可以比较酯酶、酸性磷酸酯酶,



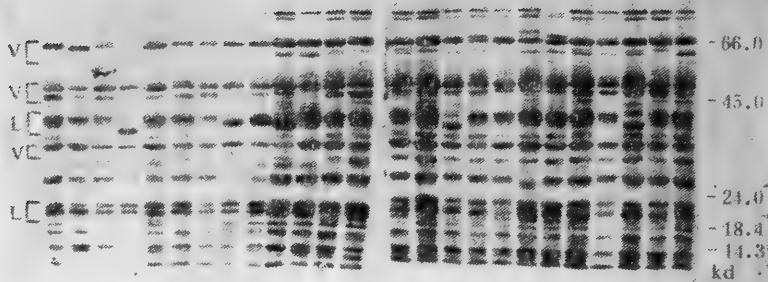


图 1 25个品种豌豆的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质的图  
V 及 L 分别指示 vicilin 及 legumin 类型的多肽(参见 Cooke,1984)

过氧化物酶、 $\alpha$  及  $\beta$  淀粉酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、乙醇脱氢酶、谷草转氨酶、亮氨酸氨肽酶、核糖核酸酶等。

利用电泳技术可以改善品种鉴定的方法,帮助育种学家更快地筛选出新品种。目前我国育种工作者也开始运用电泳技术,例如研究作物的起源问题,今后在农业上电泳技术将会大大推广。

## 二、种子储藏蛋白的研究

种子储藏蛋白的研究近年来受到很大重视,1983年英国皇家学会曾举行过“种子储藏蛋白”的学术会议<sup>[2]</sup>。

谷类种子蛋白含量很低,如小麦只占 9—16%,但是全世界小麦籽粒的蛋白质产量很大,1980年约为 4,000 万吨。因此小麦蛋白在人类营养中占有很重要的位置。所以提高制造面包的小麦蛋白质含量和质量乃成为小麦育种的重要任务,而研究种子储藏蛋白及控制它们的基因就成了重要的课题。

大麦、小麦、玉米等谷类作物和大豆、豌豆及菜豆的储藏蛋白的基因都属于发育调控的基因,就是只在种子形成时期启动,在胚乳或子叶中合成。现在可以从豌豆正发育的种子中分离出豌豆球蛋白(vicilin)及豆球蛋白(legumin)的 Poly(A<sup>+</sup>)mRNA,经过反转录产生 cDNA,并已转移到 pBR<sub>322</sub> 质粒中。

菜豆中含有 50%的菜豆球蛋白(phaseolin),其 cDNA 含有 1,990 bp,共有 5 个内含子。菜豆蛋白的基因已插入 Ti 质粒的 T-DNA 中,然后用质粒转化向日葵组织,15 天后即可收集瘤组织。去年在转化的向日葵组织中菜豆蛋白的 mRNA 在兔的网织红细胞系统中翻译出菜豆球蛋白,最近他们已经将菜豆球蛋白基因转移到烟草组织中,从长出的烟草植株所结的种子中找到了菜豆球蛋白。这为改善作物的蛋白质带来了很大的希望<sup>[3]</sup>。

玉米的储藏蛋白为玉米醇溶蛋白(Zein),它不含赖氨酸及色氨酸或者含量极少,因此营养价值低。近来发现的突变种 opaque-2 的赖氨酸含量很高。普通玉米授粉后 12—50 天合成 Zein,而 opaque-2 合成 Zein 比普通玉米要晚几天,而且合成速度慢,至胚乳发育中期即停止合成。因此,opaque-2 种子比普通玉米所含 Zein 少 50%,而胚乳中清蛋白及

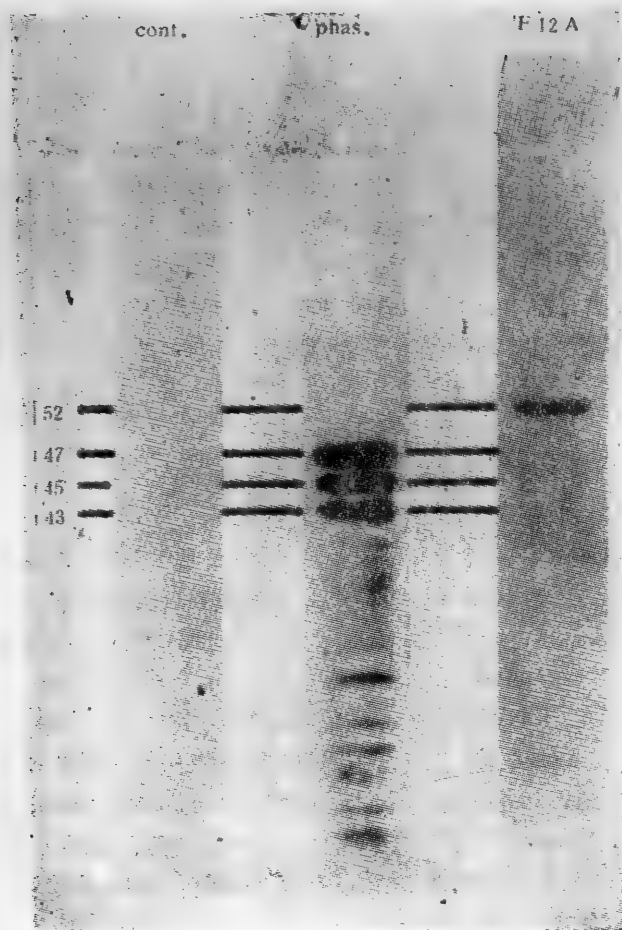


图 2 从向日葵转化组织分离出的菜豆蛋白基因的 Poly(A)RNA 在网织红细胞系统中的翻译产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳图  
 Cont. 对照。Phas. 豌豆子叶组织中的 Poly(A)RNA。F 12A 向日葵组织中的 Poly(A)RNA [F 12 A 为 OCS 基因(章鱼碱合成酶)与菜豆蛋白基因的融合产物,故分子量为 52kd](参见 Murai 等 1983)

球蛋白的含量高,因此赖氨酸含量亦高。现在 Zein 的一级结构已经完全了解,空间结构亦有所了解,其基因的核苷酸序列已测定出来,它虽然是真核生物,但 Zein 基因中没有内含子。

### 三、植物的抗寒性

抗寒性是作物的重要遗传性状,过去育种工作者要在田间鉴定作物的抗寒性,现在可以利用生物化学方法鉴定作物的抗寒性。首先植物的抗寒性与生物膜有密切关系,低温对膜脂的流动性有直接影响,抗寒性强的植物膜脂的流动性大。杨福愉等(1983)用荧光探针及自旋标记物 5-NS 测定证明,抗冷的水稻线粒体膜脂的流动性比不抗冷的水稻膜脂的流动性大。玉米线粒体膜脂的流动性也是抗寒品种比不抗寒品种大<sup>[4]</sup>。此外,抗寒品种膜脂中脂肪酸链的不饱和度与抗寒性有关,如水稻种胚膜脂中的不饱和脂肪酸的

含量与水稻对低温的适应性成正比,抗寒品种不饱和脂肪酸高,不抗寒品种不饱和脂肪酸低。线粒体膜脂的流动性及膜脂不饱和脂肪酸含量高低都可以作为抗寒性鉴定的指标。

另外,低温还影响一些酶的活性,如低温使苹果、马铃薯的苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性增加。超氧化物歧化酶(SOD)也受低温影响。植物叶绿体或线粒体在电子传递过程中产生少量超氧化物 $O_2^-$ ,这种离子是强氧化剂,能氧化脂膜中的不饱和脂肪酸链的双键。SOD将超氧化物转变成 $H_2O_2$ ,使膜脂得到保护,以后 $H_2O_2$ 被过氧化氢酶分解掉。番茄、黄瓜受到低温后,SOD活性即行丧失,抗寒品种的黄瓜的SOD活性比不抗寒品种为高。植物在冻害过程中细胞质膜中的 $Mg^{2+}$ -ATP酶活性降低,直至完全失活。经过低温( $5^{\circ}C$ )抗寒锻炼的植物,其质膜ATP酶仍保持较高的活性,而未经锻炼的细胞质膜ATP酶活性受到抑制<sup>[6]</sup>。

#### 四、植物的抗盐性

盐碱地在我国占有很大面积,共有四亿五千万亩,它是影响我国粮食产量的重要因素。因此研究植物对渗透压的调节,培育抗盐品种是解决盐碱地生产农作物的重要课题。

植物的抗盐能力与体内的脯氨酸或甜菜碱浓度有密切关系。如盐碱地生长的耐盐植物的甜菜碱含量高达 $400\mu mol/克$ 干重,这是它们能抵抗盐碱土的高渗透压的重要原因,因此研究植物对高渗透压的调节成为重要问题。Valentine等(1982)发现克氏杆菌在高渗透压的培养基( $0.8 mol/L NaCl$ )上不能生长,但是如在培养基中加 $0.25-0.5 mmol/L$ 的脯氨酸或甜菜碱,细菌即能生长。他们筛选出一个耐高渗的突变种,其中有一耐高渗的基因( $O_m$ 基因),此基因能产生过量的脯氨酸。他们用遗传工程技术将一种对渗透压敏感的克氏杆菌转变成抗高渗的菌株,此菌株在 $0.6 mol/L NaCl$ 高渗情况下可以过量产生脯氨酸,比培养基无 $NaCl$ 时高十倍之多<sup>[6]</sup>。

Packer等(1983)发现蓝藻(念珠藻 *Nostoc*,或聚球藻 *Synechococcus*)能抗高浓度的盐,在 $0.6 mol/L NaCl$ 条件下积累大量蔗糖,细胞内蔗糖浓度可高达 $0.6 mol/L$ <sup>[7]</sup>。

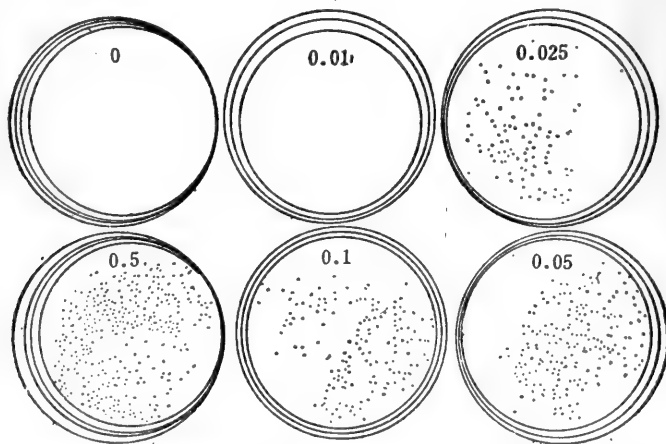


图3 甘氨酸甜菜碱作为渗透调节的化合物在培养基中含 $0.8 mol/L NaCl$ 克氏肺炎杆菌仍能生长。图中数字以 $mmol/L$ 为单位(参见 LeRudulier 1982)

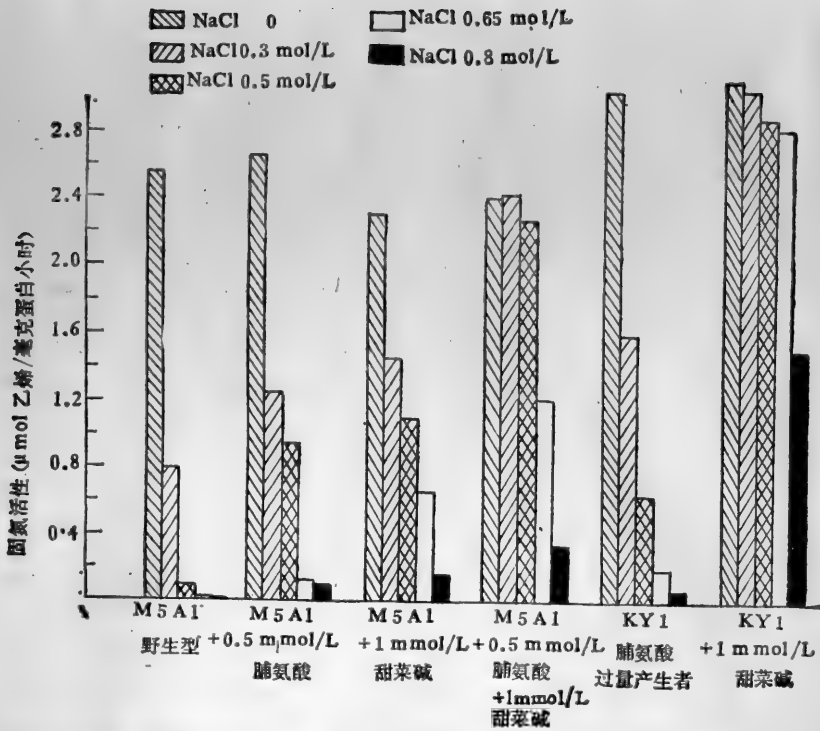


图 4 过量产生脯氨酸的质粒,外源脯氨酸(0.5 mmol/L),外源甘氨酸甜菜碱或上述的结合对克氏肺炎杆菌固氮作用的刺激(参见 LeRudulier 1982)

利用 DNA 重组技术将植物的高渗基因转到作物中去,提高作物的抗盐性,将是今后农业生化重要课题之一。

## 五、植物的抗病性

植物病害是影响农业生产的重要因素之一,通常每年由于病害就使粮食减产 10% 以上。近年植物病害的生化研究受到重视,对提高植物的抗病性会有所帮助。

马铃薯有一种类病毒病,称为马铃薯纺锤块根病毒(PSTV)。类病毒只有小病毒分子的四分之一,由一个裸露的 RNA 分子组成。美国农业研究中心利用遗传工程技术将 PSTV 的 RNA 经过反转录已经得到 cDNA,用同位素标记克隆的 cDNA,通过 cDNA 与 PSTV 的分子杂交,可以进行类病毒的诊断。马铃薯感染极微量的 PSTV,用此法即可检查出来。马铃薯的类病毒病没有治疗方法,现在用这种诊断方法在育种过程中将带病毒的植株清除,从而可以控制病害的蔓延<sup>[8]</sup>。

植物病毒病是威胁作物的严重病害,近年从生化方面研究病毒的防治有不少进展。心叶烟(*Nicotiana glutinosa*)感染 TMV 后,形成局部坏死病斑,即不再感染 TMV 或其他病毒。这种情况与动物病毒很相似,动物细胞感染病毒后产生干扰素。Sela 等(1981)证明将人的干扰素引入烟草叶片中,然后接种 TMV,病毒的繁殖受到明显的抑制。在含有抗病毒基因(N基因)的心叶烟中鉴定出一种抗病毒因子(AVF),它使 TMV 的周身性传播变为局部感染,形成坏死病斑。AVF 为一种磷酸化的糖蛋白,分子量 22,000,与干扰素

十分相似。用纯化的 AVF 能有效地抑制植物病毒的感染,因此有人称之为植物干扰素<sup>[9]</sup>。

此外,White 等(1980)发现一种普通烟草感染 TMV (烟草花叶病毒)后产生一种 b 蛋白,这种蛋白可以用酸性缓冲液(pH 2.0)提取出来。健康植株不含 b 蛋白,感染 TMV 后产生 b 蛋白,即具有抗 TMV 的能力。如果用阿斯匹林(或多聚丙烯酸)注射烟草(50 μg/ml),叶子中也产生 b 蛋白,以后再接种 TMV 即不被感染。他们也认为,这种 b 蛋白的产生与动物感染病毒后产生干扰素很相似<sup>[10,11]</sup>。

烟草不只感染病毒后能产生 b 蛋白,而且感染真菌(烟草黑腐病菌 *Thielaviopsis basicola*)后也产生 b 蛋白,其分子量为 15,600。烟草感染真菌后形成局部的坏死病斑,真菌被包围,不再蔓延。我们相信,今后在这方面生化问题的深入研究必将对植物病害的防治开辟出新的途径。

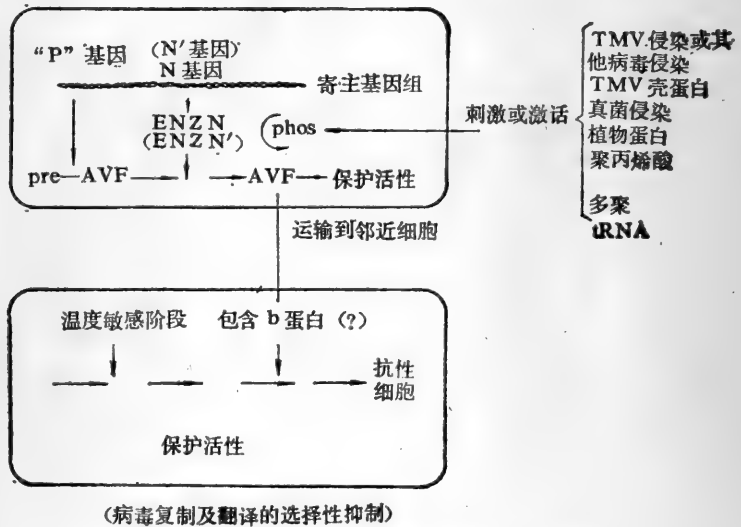


图 5 AVF 产生的机理的示意图(参见 Sela 1981)

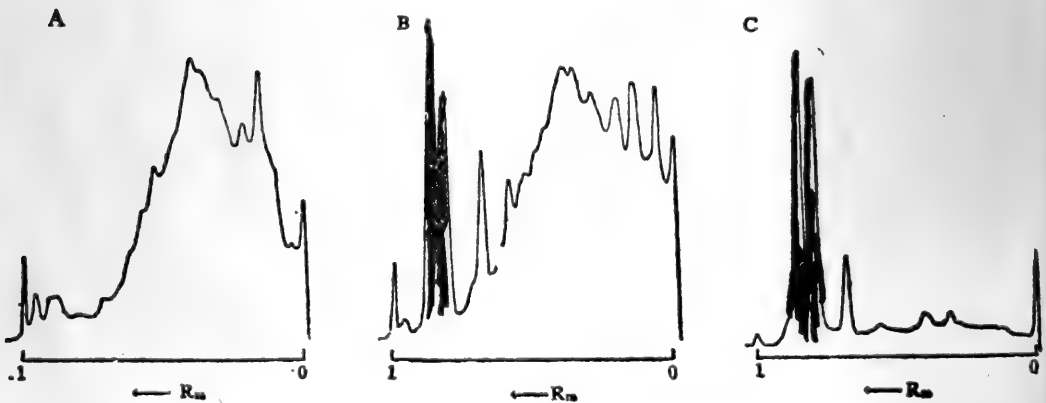


图 6 烟草(White Burley 品种)可溶性蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳的扫描图。

(A) 健康叶片; (B) TMV 侵染的叶片, 接种后 7 天; (C) 瘤组织; (B), (C) 中出现 b 蛋白(参见 Antoniw 等 1983)

## 六、豆科植物的共生固氮作用

近年来在非共生固氮菌固氮酶的作用机理方面已经进行了深入的研究。此外,在豆科植物与根瘤菌的共生关系方面也进行了生化和分子生物学研究。

根瘤菌与豆科植物的共生关系包括以下过程:(1) 寄主植物与根瘤菌的互相识别;(2) 根瘤菌侵入根毛;(3) 形成侵染线,侵染皮层细胞;(4) 根皮层细胞产生根瘤。

现已阐明根瘤菌与豆科植物的识别是由于糖蛋白的作用。Dazzo 等(1982)证明,三叶草能分泌一种糖蛋白——三叶草蛋白 A(trifolinA)到根的周围,其分子量为 50,000,它能与三叶草根瘤菌专一地结合。根瘤菌糖蛋白复合物则与根毛上的受体结合。三叶草蛋白 A 能识别三叶草根毛及三叶草根瘤菌上相似的糖基,以互补方式将它们结合起来,使根瘤菌专一地结合在根毛表面上<sup>[12]</sup>。



图 7 荧光染料先与根瘤菌的荚膜多糖结合,然后将此标记的多糖与三叶草根毛共同保温。根部的荧光摄影表明根瘤菌多糖的结合局限于根毛(单箭头)或根毛原基(双箭头),这些分化的细胞作为根瘤菌侵染的靶细胞(参见 Dazzo, 1981)



图 8 三叶草根瘤菌(*Rhizobium trifolii* 0403)与三叶草根毛尖端结合后 15 分钟的扫描电子显微照相(参见 Dazzo, 1981)

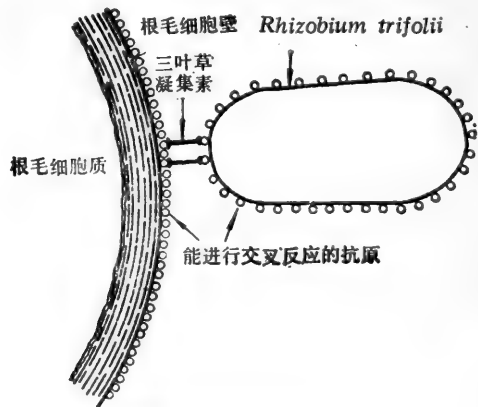


图 9 根瘤菌与根毛结合的模型  
根据此模型,根瘤菌及三叶草上的抗原交叉的糖受体能与三叶草凝集素、三叶草蛋白 A 专一地交联(参见 Dazzo, 1981)

Verma 等(1983)对豆科植物感染根瘤菌以后的变化进行了研究。他们发现根瘤菌感染后根中的豆血红蛋白及结瘤蛋白(nodulin)基因就开始启动,积累大量豆血红蛋白及结瘤蛋白的 mRNA。这些基因的启动比固氮活性的出现要早五天左右<sup>[13]</sup>。

豆血红蛋白对豆科植物的共生固氮非常重要,因为固氮酶是厌氧的,豆血红蛋白有保护固氮酶不受氧毒害的作用。结瘤蛋白具有结瘤作用,根瘤形成之前根瘤菌感染区就开始积累结瘤蛋白的 mRNA,此时根组织快速增长,第 11 天左右根瘤即形成。Verma 用大豆结瘤蛋白的基因的 mRNA 经过反转录得到 cDNA,克隆后作为探针研究结瘤蛋白基因的核苷酸序列,核苷酸分别为 770、1,150、3,150,其翻译产物为 24,000、27,000 及 100,000,此 cDNA 能与大豆 DNA 杂交,而不与根瘤菌的 DNA 杂交,证明结瘤蛋白的基因是寄主产生的。

如果根的培养介质中含有 15 mmol/L 的硫酸铵,则豆血红蛋白及结瘤蛋白的 mRNA 都不能诱导出来。

今后在进一步了解豆科植物结瘤的机理之后,就有可能通过糖蛋白的识别作用扩大优良根瘤菌种的共生寄主范围,并且有可能调节结瘤蛋白的作用,促进豆科植物结瘤,从而增加豆科植物的固氮作用。

### 参 考 文 献

- [1] Cooke, R. J., The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis, *Electrophoresis* 5 (1984) 59—72.
- [2] Fowden, L. and B. J., Mifflin (eds.), Seed Storage proteins, *Philos. Trans. Roy. Soc.* 304 (1984), 1120.
- [3] Murai, N., et al., Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via Ti plasmid vectors, *Science*, 222 (1983), 476—481.
- [4] 杨福愉、蔡同茂、邢菁如、陈文雯, 抗冷与不抗冷水稻线粒体膜流动性的比较, *科学通报*, 28(1983) 370—372.
- [5] Jian, Ling-cheng (简令成), Sun, L. H., Dong, H. Z. and D. L. Sun, Changes in ATPase activity during freezing injury and cold hardening in PlantC old Hardiness and Freezing Stress (P. H. Li and A. Sakai eds), Vol. 2 (1982) 243—259, Academic Press.
- [6] Le Rudulier, D. and R. C. Valentine, Genetic engineering in agriculture: Osmoregulation TIBS, 1982, 431—433.
- [7] Blumwald, E., R. J. Mehlhorn and L. Packer, Studies of osmoregulation in salt adaptation of cyanobacteria with ESR spin-probe technique, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983), 2599—2602.
- [8] Owens, R. A. and T. O. Diener, Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization, *Science*, 213 (1981), 670—671.
- [9] Sela, I., Antiviral factors from virus-infected plants TIBS (1981), 31—33.
- [10] Antoniow, J. F. and W. S. Pierpoint, The purification and properties of the b proteins from virus-infected tobacco plants, *J. Gen. Virol.*, 39 (1978), 343—350.
- [11] Antoniow, J. F., et al., Pathogen-related proteins in plants and tissues of *Nicotiana tabacum* transformed by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant Mol. Biol.*, 2 (1983), 317—320.
- [12] Dazzo, F. B., Bacterial attachment as related to cellular recognition in *Rhizobium-legume* symbiosis, *J. Supramol. Struct. Cell. Biochem.*, 16 (1981), 29—41.
- [13] Fuller, F., et al., Soybean nodulin genes: Analysis of c DNA clones reveals several major tissue-specific sequences in nitrogen-fixing root nodules, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 (1983), 2594—2598.



# 发展我国的生物工程

孙 玉 昆

(中国科学院生物化学研究所)

一、引言

二、基因工程

三、酶工程

四、发酵工程

五、细胞工程

六、有计划地促进生物工程的发展

## 一、引 言

关于生物工程,近来报纸、杂志已经有较多的介绍。“生物工程”这个词,译自英文的 *Biotechnology*,有的也译为“生物技术”或“生物工艺”。

生物工程的内容就是综合利用微生物学、分子遗传学、生物化学、细胞生物学、化学、物理学等的最新研究成果,与化学工程、发酵工程以及电脑相结合形成一门新兴科学技术,为国民经济建设服务,为人类造福,因此引起世界各国政府及企业家的重视并积极投资进行开发研究,以期形成一门新兴产业。

生物工程所以引起人们的重视是因为它有很多优越性。

### 1. 利用再生资源

植物通过光合作用生成的淀粉、纤维素都可以作为生物工程开发的资源,这些资源是可以再生的,因此生物工程不受资源限制,有广阔的发展前景。南美巴西缺乏石油资源,大量利用木薯、甘蔗等发酵生产酒精,代替汽油作为燃料和工业原料。我国利用再生资源发酵生产沼气解决农村燃料也获得很好效果。

### 2. 革新生产工艺

很多化学工业和医药工业在高温、高压条件下进行,有的反应步骤多、产率低、污染环境,而利用微生物或酶催化的反应可在常温常压下进行,微生物能将很多反应集中在细胞中完成,酶催化反应专一而迅速。利用这些特点对现有的化学工业、医药工业中的某些过程进行改革,以提高收率、节约能源、降低成本、减少环境污染是完全可能的。

### 3. 提供新的生产途径

生物工程技术可解决某些传统技术或常规技术难于解决的问题。如生长激素对治疗侏儒症、儿童生长迟缓以及促进伤口愈合等表现出良好的效果。但由于种属特异性限制,人生长激素只能从人的脑下垂体获得,不可能大量提取以满足需要,现在可以利用生物工

程方法用细菌进行生产。另外生物工程技术为一些疾病的诊断、治疗如肿瘤等提供新的解决途径,在农业、能源以及环境保护各方面也能广泛地应用。

#### 4. 改进生物品种

通过基因工程、细胞融合等生物工程技术可以改进动物、植物、微生物的品种以满足人们的需要。

## 二、基因工程

基因工程即 DNA 重组技术,按照人们的需要利用分子生物学的方法分离目的基因或者分离所需要的信使 RNA,经过反转录合成相应的 DNA 基因,经过适当的剪裁与 DNA 载体重组然后导入寄主细胞进行克隆和表达,生产人们所需要的物质。这个过程可以参考图 1。

### 1. 乙型肝炎表面抗原疫苗

据调查全世界的乙型肝炎患者在二亿以上,在肝炎的患者中约 10% 转变成肝硬化,有的还进一步发展成为肝癌。由于肝炎病毒只能在人和黑猩猩的肝脏繁殖,利用细胞进

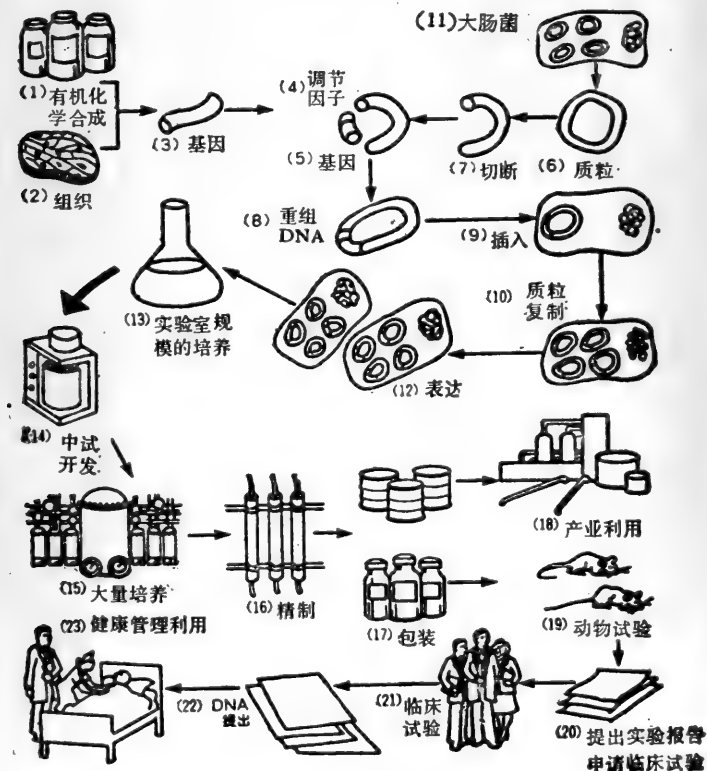


图 1

行培养迄今未获成功。为了制造抗乙型肝炎病毒疫苗,一种工艺是从患者血液中分离乙型肝炎表面抗原蛋白,制造疫苗,需要灭活以防病毒颗粒的存在而引起感染,所有血液必须是乙型肝炎核心抗原阴性,表面抗原阳性,因此血液来源是重要的限制因素。利用遗传工程方法将乙型肝炎表面抗原基因于酵母或动物细胞中进行高效表达,已经获得成功,产品纯化达到临床应用水平,说明基因工程技术解决了常规方法无法解决的问题。

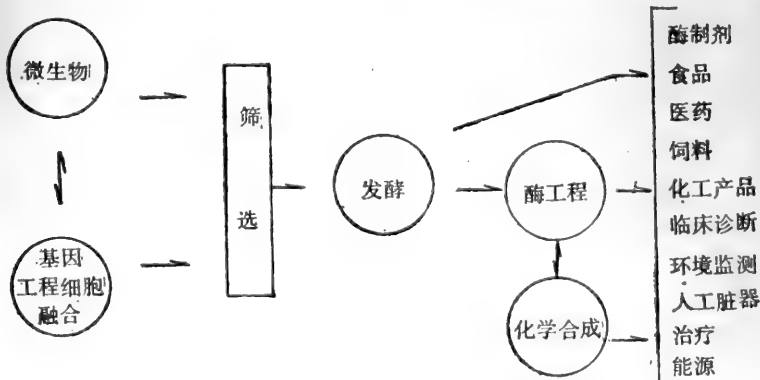
## 2. 人的生长激素

如前所述对于治疗侏儒症、儿童生长迟缓、烧伤、骨折和促进伤口愈合均有疗效。由于种属专一性的限制,人的生长激素只能从人的脑下垂体提取,无法满足需要。基因工程技术使人的生长激素基因在动物细胞或细菌细胞中表达,提供了一个新的解决途径。其他如溶解血栓的酶类、胰岛素、干扰素、细胞介素等蛋白质及多肽的基因工程技术已经获得成功并积累了较多的经验。

为了使生物工程这门新兴科学技术迅速发展,需要进行大量的开发研究工作。DNA合成技术是一个重要的方面,如生长激素约600个碱基对DNA的合成,干扰素 $\gamma$  146个氨基酸相应基因的合成,胰岛素A及B链及胰岛素原基因的合成等。另外DNA片段的合成作为检测的探针,或两大片段的接头等更是常用的技术。目前看来DNA合成技术比多肽合成容易,当然还要建立DNA片段纯化技术、顺序分析技术、多肽的序列分析等,不同寄主细胞质粒的组建,高效表达启动子的开发,分泌性产物表达的研究,还有更为重要的是基因工程产品的分离、纯化,即所谓后处理工艺的开发。除此之外,还必须建立我国自己的试剂供应渠道,如各种限制性内切酶、反转录酶、核酸连接酶等生化试剂, $^{32}$ 磷、 $^{125}$ 碘、氚、 $^{35}$ 硫标记的化合物,以及高压液相层析仪、DNA合成仪、氨基酸序列分析仪。根据我国的基因工程开发情况适当建立一些P2和P3级实验室,建立电脑控制的基因库,因此需要有远见的规划和足够的投资,有组织地进行开发。

## 三、酶工程

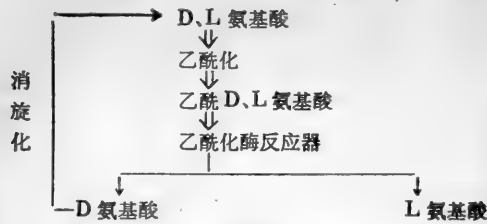
酶是生物体合成生物大分子的催化剂,它的特点是特异性强,催化效率高,并能常温常压下进行反应。现在可以利用适当的材料将酶或微生物细胞固定化,装入反应器应用于生产过程。酶反应器的应用将使医药工业、化学工业的生产发生重大改革,因为酶反应器有体积小、效率高、节省能源、减小污染的特点。酶工程在生物工程中的地位请参看下图。



酶或微生物的固定化方法很多,有共价键连接于载体、吸附于载体、凝胶包埋法等。现在已经应用于工业生产的固定化酶反应器种类有许多种并还在不断增多。

### 1. 氨基酸酰化酶

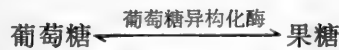
氨基酸作为食品添加剂,饲料添加剂、医药用品等使用。20种氨基酸世界年生产总量超过30万吨,天然氨基酸为L型,化学合成的氨基酸为D、L型混合物。为了将D、L型中的L氨基酸分离出来,先将D、L氨基酸乙酰化,然后用氨基酸乙酰化酶选择地水解L型,残留的D型氨基酸再经过消旋化变成D、L型,继续循环,如下式:



固定化的氨基酸酰化酶已用于工业生产,并获得很好的效果

### 2. 葡萄糖异构化酶

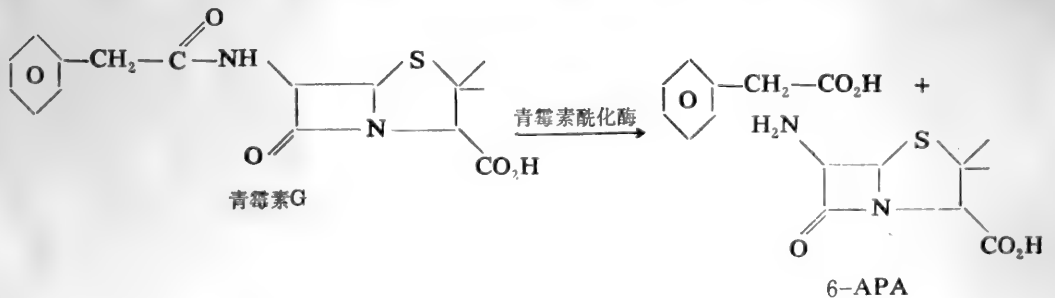
果糖甜味糖浆用于甜味饮料、点心、糖果等食品的制造,甜度、风味比蔗糖好。先将玉米淀粉为原料转化生成葡萄糖,但由于葡萄糖甜度比果糖低得多,因此用葡萄糖异构化酶将葡萄糖转化成果糖,下式反应是一种平衡反应:



反应产物实际上是果糖和葡萄糖的混合物,其中果糖占42%左右,但混合物甜度可达到蔗糖水平。这种果糖浆美国年产量近500万吨,日本近200万吨,每公斤固定化的酶(包括载体重量)可转化葡萄糖5—6吨。

### 3. 青霉素酰化酶

随着青霉素的大量使用,多年来危害人类健康但对青霉素敏感的细菌产生了耐药性,使青霉素的疗效大为降低。为了解决细菌对青霉素的耐药性,合成了许多青霉素衍生物即半合成青霉素,这不仅解决细菌的耐药性而且还扩大了青霉素类药物的抗菌谱。生产半合成青霉素关键的一步是用青霉素酰胺酶将青霉素G的苯乙酰基切断,生成青霉素胺



(6-APA), 然后以青霉素胺为原料, 以不同酰基取代合成了一系列新的衍生物。美国、日本等国家所生产的青霉素类药物中人工半合成青霉素占绝大部分。青霉素酰胺酶固相化反应器在此过程中发挥了巨大的作用。

固定化酶反应器应用很广, 这里不一一列举。

固定化酶方法与电极相结合, 运用于监测系统称为生物传感器, 其特点是利用了酶反应的专一性、迅速、简便, 精确地测定某一系统中的特定成分。下表列举数种以供参考。

检测物质	酶	固定化方法	固定化酶电极	测定浓度范围 mg/l
葡萄糖	葡萄糖氧化酶	共价键	氧电极	$1-5 \times 10^3$
乙醇	乙醇氧化酶	交联法	氧电极	$5-1 \times 10^3$
尿素	脲酶	交联法	氨电极	$10-1 \times 10^3$
胆固醇	胆固醇酯化酶	共价键	白金电极	$10-5 \times 10^3$

生物传感器在生产和临床检查中都发挥了很大作用。

在酶工程开发中应开发稳定性高、含量丰富的酶的来源, 研究适用于工业生产过程固定化酶反应器, 研究辅酶固定化技术与再生技术, 研究多酶系统的固定化技术, 研究酶的分离、纯化技术等。固定化酶和固定化细胞在生产过程中的应用, 在近期取得经济效益是切实可行的。

## 四、发 酵 工 程

发酵工程是在传统发酵工艺的基础上发展而来的, 与传统的发酵相比有下列特点:

传统微生物发酵	发 酵 工 程
间歇发酵	连续或半连续发酵
悬浮细胞	固定化细胞
较低温度	较高温度
细胞利用一次	反复使用
天然菌种或化学物理方法诱变	基因工程、细胞融合
间接测定反应系统中成分	传感器直接测定
简单控制	电子计算机控制

除了上述特点之外, 发酵工程还利用微生物的酶系进行生物转化, 近来发展迅速, 应用范围广泛。

- (1) 甾体化合物的转换
  - 羟化反应
  - 还原反应
  - 侧链切断反应
- (2) 生物碱类的转化
  - 喜树碱的转化
  - 毛地黄的转化

(3) 化工产品的转化

烯烃类化合物的氧化,香料化合物的生产

丙烯腈转化为丙烯酰胺

酮类化合物的转化合成

(4) 抗生素衍生物

人工半合成青霉素、头孢霉素

(5) 糖的转化

(6) 核苷酸类化合物的合成

(7) 氨基酸的合成

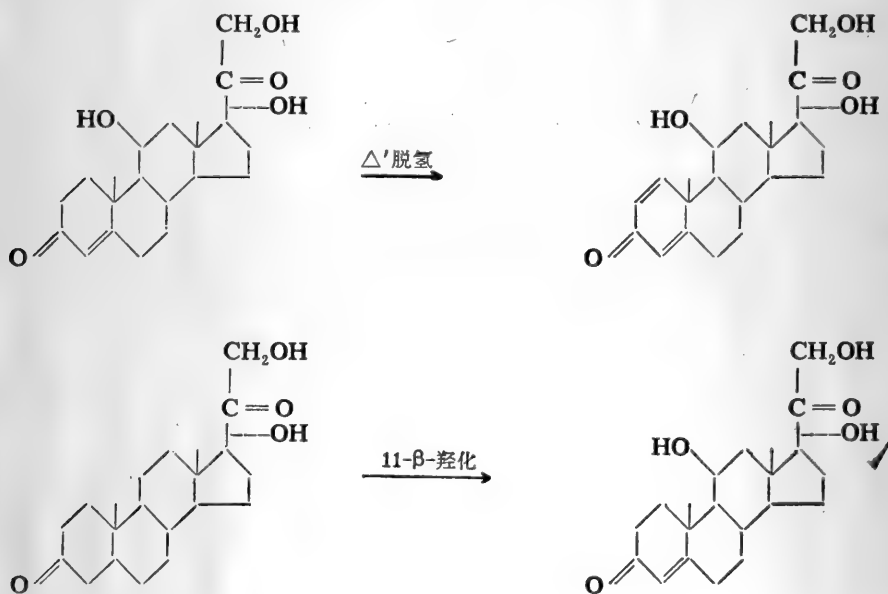
(8) 有机酸的合成

(9) 维生素C的合成

(10) 环境保护中的应用

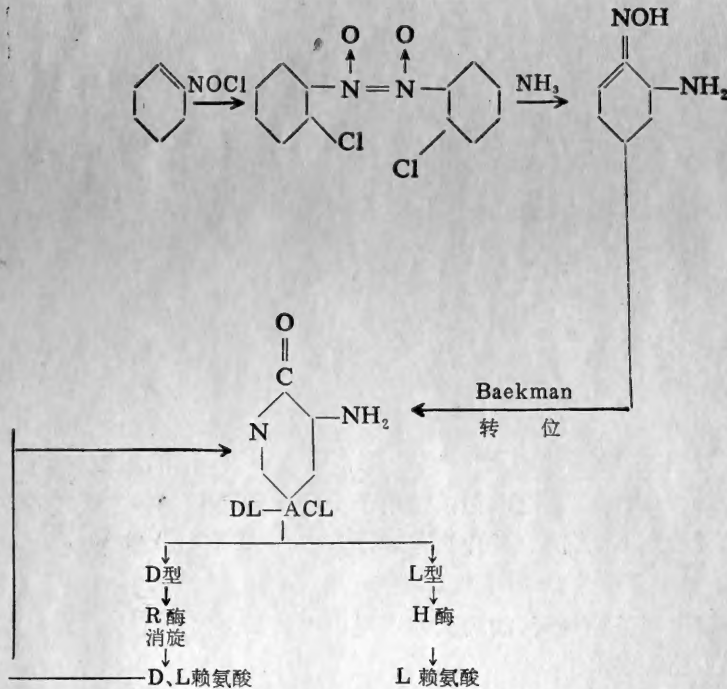
固定化的酵母用于酒精的生产,反应器体积小,酵母浓度高达  $10^8$ /毫升,糖蜜转化率高,维修、管理、能源等费用下降,与传统酒精发酵相比,降低成本约 20%。

甾体化合物的转化,利用丙酮干燥的菌体进行脱氢或羟化,例如:



细菌的固定化采用海藻酸、聚丙烯酰胺等,这些固定化细菌能在有机溶剂中反应,在甾体化合物的生产过程中发挥了重要作用。

利用尼龙生产过程中产生的副产物环乙烯为原料,经过化学合成和发酵工程相结合,开发了万吨量赖氨酸的生产工厂,以满足饲料、食品、医药中对赖氨酸这一必需氨基酸的需要,过程如下图:



ACL=D、L- $\alpha$ -氨基己内酰胺;H酶为己内酰胺水解酶。

传统的用发酵生产赖氨酸方法已被淘汰。

利用酵母菌氧化烷烃产生二元酸方法,可以作为香料和高级树脂的原料,于 35℃ 发酵 100—200 小时,每升含量达 200 克,日本已建立月产 10 吨的工厂。

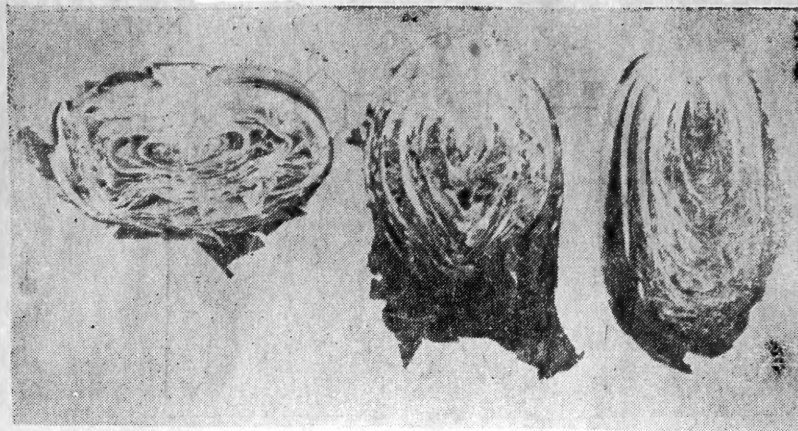
关于发酵工程的开发应在传统发酵工艺的基础上,利用经典的筛选菌种的方法与基因工程、细胞融合技术相结合,开发菌种资源、建立菌种库、开发新的医药、食品、化工工业的生产工艺,开发电脑控制多参数的发酵设备。

## 五、细胞工程

细胞工程是在细胞水平上进行基因工程的精细操作,在离体的条件下大量培养、繁殖特定的细胞株,目的在于人为地改良生物品种,加速繁育动物、植物,并利用大量培养的细胞,生产有用物质。例如烟草细胞以 20 吨规模大量培养 24 小时,细胞增殖一倍,可以生产强心物质作为药物。在以罂粟细胞培养生产的生物碱中,有些成分是阿片组成中没有的中间产物。从最近的发展看,特别是药用植物细胞的大量培养具有重要的经济意义。利用植物细胞原生质体进行融合培育新的植物品种,种内、种间的杂交都已获得成功。植物基因工程的开发将为改良农作物品种、快速繁殖有经济价值的作物开辟新的途径。

动物细胞的大量培养,特别是无血清大量培养技术作为基因工程的寄主细胞,具有很多优点,表达产物分泌到细胞外,并能对表达的蛋白质或肽进行糖基化修饰,这些对于基因工程产品的分离、纯化等后处理过程提供了方便条件。动物细胞进行融合创造的杂交瘤细胞,目前为单克隆抗体的生产基础,单克隆抗体的免疫试剂药箱对于临床检测提供了





准确灵敏的方法,已经创造了数亿元的产值。除用于临床检测外,随着单克隆抗体的大量生产,利用它进行蛋白质纯化。以及尝试应用于治疗也正在开发。如人工肺癌细胞杂交瘤细胞离体培养可达到  $10^7$  细胞/毫升的密度,产生的单克隆抗体量为 960 毫克/升培养液。

利用动物细胞生产各种疫苗,如法国蒙里埃公司每年生产 10 亿份口蹄疫疫苗,以及大量的小儿麻痹疫苗。

在细胞工程领域中应该进行下述开发,如细胞的大量培养技术,生产有用物质;细胞融合技术,显微镜下操作放电融合,电极放电融合以及双电泳融合技术等;细胞水平上的基因工程精细操作,细胞器的移植;细胞的无血清培养技术;细胞工程产物的分离、纯化;杂交瘤的培养,特别是人-人杂交瘤的开发等。

## 六、有计划地促进生物工程的发展

(1) 已经开展生物工程方面工作的研究所和大学,加强培养这一领域的研究生,如细胞专业、基因工程专业、酶及发酵工程专业等。同时也要加强有关专业基础理论方面人才的培养,鼓励研究所和大学合作以解决生物工程新兴领域中师资的不足。

(2) 加强产业部门与专业研究部门的合作,使研究成果尽快地转变为生产力。

(3) 有针对性地选派人员出国进修,引进国外先进技术,加速生物工程开发,特别是后处理工艺的开发。

(4) 加强国际合作,引进必要的技术,聘请国外专家来中国短期工作等。

(5) 加强情报资料工作。

(6) 解决生物工程开发中所需要的试剂和仪器。

收到期	1987.5.19
来源	西单新
书价	2.30元
单据号	0986209
开票日期	1987.5.19

24401		58.173 647
书名 生物化学的现状与展望		
借者姓名	借出日期	还书日期
林忠送	87.6.15	
林忠送	87.6.26	
林忠送	87.7.3	
林忠送	87.8.27	8
	87.11.09	

分类编号	58.173 647
登记号	24401

读者注意

1. 爱护公共图书切勿任意卷折和涂写，损坏或遗失照章赔偿。
2. 请在借书期限前送还以便他人阅读请赐予合作。

成1106-1

统一书号：13031·3380

定 价： 2.30 元

本社书号：4861·13-10

科技新书目：132-31