

普通高等教育“十五”国家级规划教材

全国高等学校医学规划教材

(供临床·基础·预防·护理·口腔·药学等专业用)

生物化学

主 编 赵宝昌

副主编 宋惠萍 孙黎光 马文丽

编 者 (以姓氏笔画为序)

马文丽(第一军医大学)

王学敏(第二军医大学)

付明德(四川大学)

安玉会(郑州大学)

刘兴汉(哈尔滨医科大学)

孙黎光(中国医科大学)

严 哲(温州医学院)

宋惠萍(中南大学)

汪 渊(安徽医科大学)

杨翰仪(吉林大学)

赵君庸(西安交通大学)

赵宝昌(大连医科大学)

赵学信(新疆医科大学)

崔 行(山东大学)

崔秀云(大连医科大学)

曾昭淳(重庆医科大学)

燕 秋(大连医科大学)



高等教育出版社

Higher Education Press

内容提要

生物化学是高等医学教育重要基础课程之一。本书为适应我国高等医学院校本科教学的需要,同时兼顾国家执业医师考试和研究生入学考试的要求,由全国15所高等医学院校的17位教授编著。全书分四篇,内容包括核酸、蛋白质、糖复合物、维生素、酶的结构与功能,糖、脂、氨基酸、核苷酸的代谢,以及生物氧化和代谢调节;DNA、RNA、蛋白质的生物合成,基因表达的调控,癌基因、抑癌基因与生长因子,基因技术;生物膜,细胞信号转导,血液、肝、脑的代谢,以及无机物的生化等23章。有插图340余幅。与之配套的有学生和教师用光盘。学生用光盘包括各章的课件、附有题解的题库、生物化学学术语英文读音,以及取得重大成就的名人故事。教师用光盘包括教师备课所需的深一层知识、扩展的理论和有关最新进展。生化理论与临床医学的联系内容、生物化学发展年表也在其列。

图书在版编目(CIP)数据

生物化学 / 赵宝昌主编. —北京:高等教育出版社, 2004.5
ISBN 7-04-014570-7

I. 生... II. 赵... III. 生物化学—高等学校—教材 IV. Q5

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第029335号

总策划 栾钢 张妤 策划编辑 刘晋秦 责任编辑 薛玥 封面设计 张楠
责任绘图 朱静 版式设计 马静如 责任校对 朱惠芳 责任印制

出版发行 高等教育出版社

社址 北京市西城区德外大街4号

邮政编码 100011

总机 010-82028899

购书热线 010-64054588

免费咨询 800-810-0598

网址 <http://www.hep.edu.cn>

<http://www.hep.com.cn>

经销 新华书店北京发行所

印刷

开本 850×1168 1/16

印张 30.5

字数 930 000

版次 年月第1版

印次 年月第 次印刷

定价 56.00元(含光盘)

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

序

记得在十多年前,我在原华西医科大学做呼吸专业教授,每每授课之余,我都在想这样的问题:教育究竟承载着怎样的重荷、责任?在我走上领导岗位后,从最初医科大学副校长、省卫生厅厅长、卫生部副部长,到现在的中国医师协会会长,虽从未主管过教学工作,但上述问题却时常萦绕着我,思考从未停止过,时至今日,答案越来越清晰,明确!那就是教育要发展,要进步,首先教育理念必须发生深刻的变革,教育的内涵必须大幅度外延,教学方式必须改革。具体到医学教育,我个人有几点看法:

在教学上:第一,医学是关系到生命、健康的科学,必须强调严谨性;第二,医学是一门边缘性科学,且发展很快,因此应强调教师知识不断更新,增强和接受新理论、新知识的能力,满足学生扩大知识面的需求;第三,医务工作除了治病救人外,还涉及伦理、道德、法律等一系列问题,医学教育应增加大量社会科学知识,并加强培养医学生的人文关怀精神;第四,医学专业的形态学课程较多,学习时需要强记硬背,但实际运用时非常强调灵活性。因此,注意培养学生的形象思维与逻辑思维,即平时我们所说的临床思维能力,尤为重要。

在教材上:第一,内容在强调“三基”的同时,应能及时反映疾病谱的变化及学科的发展;第二,内容在注重科学性的同时,应为所教所学者着想,即将复杂、高深的知识,用最简单易懂的文字或图表表述出来;第三,教材应充分反映医学这门学科的特点,即形态学、方法学的内容较多。因此,应做到图文并茂,有些内容甚至可用视频来表达。

虽然自己对教学工作和教材建设有一些想法,但高等教育出版社请我来为这套医学教材做序时,使我十分为难。一是我离开教育、临床工作多年;二是先前我对其他很多专家邀请做序或跋拒绝多多,此次执笔搞不好会有厚此薄彼之嫌。但我细读此套教材的策划及部分章节后,眼前一亮,不禁释怀。

这套教材在内容、形式上有许多新颖之处:1. 基础学科教材注意了理论与临床紧密结合,删减了为使学科系统化而舍简求繁的内容,突出了为临床服务,打基础的特点;2. 临床学科教材则根据近些年来疾病谱的变化,突出重点地介绍了临床常见病、多发病的诊疗知识、技术手段,而且增加了近年来被公认、成熟的新知识、新技术;3. 这是一套真正意义的立体化教材,不但图文并茂,且配有学生用光盘及教师授课多媒体光盘。光盘中内容丰富,有大量彩图、病案分析、进展讲座、习题。大大丰富了教材内容,达到了医学教育应以视觉教学为主的目的;4. 本套教材作者队伍年轻化,主编平均年龄50余岁,多为留学归国人员,且为活跃在教学、临床一线的骨干。

更为可贵的是,本套教材由于策划得当,在丰富了教材内容、提高印刷质量的同时,却未增加篇幅、提高书价,减轻了学生的经济负担。以《病理学》为例,全书彩色印刷,有近500幅彩图,并附学生用光盘,有病理报告库(内有17个CPC)和图库(内有302幅较为罕见的彩图),而全书定价不过60元。作为教材,能有如此的印刷质量、定

价 ,在我国也是少见的 ,为此 ,我深感欣慰 !

谨以此文 权当为序 ,有些提法不知当否 ,还请教育界、医学界有关同仁指正。

A handwritten signature in black ink, consisting of the characters '殷大奎' (Yan Dajin) in a cursive style.

中国医师协会会长

2003 年 6 月 12 日于北京

出版说明

为贯彻教育部关于“教材建设精品化,教材要适应多样化教学需要”(教高[2001]11号)的精神,在全国高等学校教学研究会、中国医师协会以及数十所高等医学院校大力支持下,经两千余名具有丰富教学经验的医学专家及学者的共同努力,高等教育出版社出版了全国高等学校医学规划教材。愿此凝聚着众多学者智慧与汗水的教科书,能给我国的医学教材建设注入活力,以推动医学教育改革加速发展。

全国高等学校医学规划教材(供临床、基础、预防、护理、口腔、药学等专业用)以全球医学教育最低基本要求及教育部“新世纪高等教育教学改革工程”重点项目——临床医学专业本科教学基本要求为准则;突出对学生创新意识、创新能力和批判性思维方式的培养,强调与医疗卫生的联系,囊括了国家执业医师考试所需的知识。整套教材中各学科相关内容有机衔接、循序渐进,既防止各学科之间脱节,又避免了重复,更为有特色的是书后配有包含信息库、习题库、案例库、图像库等内容的学生用光盘,部分学科还配有教师用光盘。全套教材论述严谨,语言流畅、简洁,层次分明,编排格式新颖,图文并茂,并根据学科特点,采用了全彩色印刷或彩色插页,有些内容甚至用视频形式来表达。

全国高等学校医学规划教材(成人教育)针对成人医学教育特点而编写,主编及编写人员均是具有多年医学教育经验的专家和学者。与同类教材相比,此套教材在以下几方面进行了创新和探索:(1)在确定编写体系和选择教材内容时,注重对学生创新思维、分析解决问题能力以及综合素质的培养,尽量做到以问题为中心,与临床紧密结合,学以致用。(2)注重素质教育,加强对学生伦理、道德素质和法制观念的培养。

建立面向现代化、面向世界、面向未来的立体化、系列化精品医学教材,是高等教育出版社追求的目标。尽管我们在出版教材的工作中力求尽善尽美,但仍避免不了存在这样或那样的不足和遗憾,恳请广大专家、教师及学生提出宝贵的意见和建议,为促进我国高等医学教育的进一步发展共同努力。

全国高等学校医学规划教材 (供临床、基础、预防、护理、口腔、药学等专业用)

基础化学	主编 祁嘉义	内科学	主编 张 运
医用有机化学	主编 唐玉海	外科学	主编 郑树森
生物化学	主编 赵宝昌	妇产科学	主编 孔北华
医用物理学	主编 洪 洋	儿科学	主编 王卫平
临床医学导论(第2版)	主编 孙宝志	眼科学	主编 葛 坚
医学伦理学	主编 孙慕义	耳鼻咽喉头颈科学	主编 韩德民
系统解剖学	主编 钟世镇	口腔临床医学导论	主编 樊明文
局部解剖学	主编 王怀经	神经病学	主编 张淑琴
断层解剖学	主编 刘树伟	精神病学	主编 李凌江
组织学与胚胎学	主编 高英茂	传染病学	主编 李兰娟
医学微生物学	主编 黄汉菊	法医学	主编 侯一平
医学寄生虫学	主编 汪世平	中医学	主编 陆付耳
生理学	主编 王庭槐	循证医学	主编 李幼平
病理学	主编 王恩华	全科医学	主编 梁万年
病理生理学	主编 肖献忠	康复医学	主编 纪树荣
药理学	主编 颜光美	预防医学	主编 施 榕
诊断学	主编 张桂英	流行病学	主编 姜庆五
医学影像学	主编 孟俊非	医学统计学	主编 倪宗瓚
核医学	主编 黄 钢	医学信息检索	主编 徐一新

全国高等学校医学规划教材 (成人教育)

内科学	主编 刘远厚	生理学	主编 徐斯凡
外科学	主编 高居忠	生物化学	主编 万福生
妇产科学	主编 林仲秋	人体解剖学	主编 席焕久
儿科学	主编 黎海芪	药理学	主编 凌保东
病理学	主编 章宗籍	医学伦理学	主编 卜 平
医学免疫学	主编 张昌菊	预防医学	主编 钟才高
医学微生物学	主编 吴移谋		

前 言

在 21 世纪之初,经教育部批准,本部《生物化学》被列入普通高等教育“十五”国家级教材规划,同时也是纳入了由中国医师协会、教育部全国高等学校教学研究中心和高等教育出版社启动的“全国高等学校医学规划教材”。

生物化学是高等医学教育的重要基础课程之一。本书为适应我国高等医学院校本科教学的需要,同时兼顾国家执业医师考试和研究生入学考试的要求,由全国 15 所医科大学的 17 位在教学与科学研究上卓有成就的教授编著。全书分 4 篇,内容包括核酸、蛋白质、糖复合物、维生素、酶的结构与功能、糖、脂类、蛋白质、核苷酸的代谢,以及生物氧化、代谢调节;DNA、RNA、蛋白质的生物合成,基因表达的调控,癌基因、抑癌基因与生长因子,基因技术;生物膜、细胞信号转导,血液、肝胆、脑的生物化学,以及无机物的生物化学等 23 章。在本书的编写过程中,我们参照了卫生部医师资格考试委员会制订的《临床执业医师医师资格考试大纲(2002 年版)》的要求,根据多年的教学实践和各院校教学中的经验体会,对教材的体例、格式和内容的编排进行了充分的讨论,与以往的教材进行了比较,力求使这本教材适应我国 21 世纪现代化建设的要求。我们对教材内容进行了周密安排、仔细精选,使本书的内容定位准确,在医学教育的大前提下,坚持对学生进行基础理论、基础知识和基本技能的训练,培养学生的创新意识和创新能力,引导学生全面发展,满足 21 世纪对医学人才的要求。

本着面向现代化、面向世界、面向未来的精神,我们考虑到分子生物学、细胞生物学和神经生物学是本世纪生命科学的热点,本书增加了生物膜和脑生物化学内容,同时考虑到糖生物学的飞速发展,对糖复合物的结构与功能给予了足够的重视,从生物化学角度为后续的学习打下基础。虽然全书的基本内容要求学生掌握和熟悉,但为适应研究生入学考试的要求,有些内容可不必对医学本科生一一讲述,各校可酌情加以取舍。为了便于学生自学,全书力求语言流畅、图文并茂、深入浅出。与本书相配套的还有学生和教师用光盘。学生光盘包括课件、附有题解的题库、生化术语英文读音,以及取得重大成就的名人故事,用来帮助学生学习和理解课堂讲授的内容,为学有余力的学生提供一个更广阔的空间,培养学生自学能力和创新精神。教师光盘包括教师备课所需的深一层知识、扩展的理论和有关最新进展,以及生化理论与临床医学的联系内容等,作为教师的参考,以利提高教学水平。

本书在编写过程中,得到了教育部高等教育司的亲切关怀和高等教育出版社生命科学分社有关领导和编辑的鼎力支持和关心,得到了各参编学校的支持与鼓励,以及大连医科大学和新疆医科大学领导的大力帮助,在此一并表示感谢。由于我们的水平有限,本书难免存在不妥之处,敬请同行专家、使用本书的师生和其他读者批评指正。

赵宝昌 宋惠萍 孙黎光 马文丽

2003 年 11 月

目 录

绪论	1
第一篇 生物分子的结构与功能	
第一章 核酸	7
第一节 核酸的基本组成单位——核苷酸	7
一、核苷酸的组成	7
二、核苷酸的连接方式	10
第二节 DNA 的结构	11
一、DNA 的一级结构	11
二、DNA 的二级结构	11
三、DNA 的高级结构	13
四、线粒体 DNA	14
第三节 RNA 的结构与功能	14
一、信使 RNA	15
二、转运 RNA	16
三、核糖体 RNA	17
第四节 核酸的理化性质	18
一、核酸的一般性质	18
二、核酸的紫外吸收	19
三、核酸的变性与复性	19
第五节 核酸的催化性质	20
一、核酶	20
二、脱氧核酶	21
第六节 基因组学与人类基因组计划	21
一、真核生物基因组的特点	22
二、人类基因组计划	23
三、后基因组研究	25
思考题	26
第二章 蛋白质	28
第一节 蛋白质的基本组成单位及其连接方式	28
一、蛋白质的基本组成单位——氨基酸	28
二、氨基酸在蛋白质分子中的连接方式	30
三、生物活性肽	31
第二节 蛋白质的分子结构	32
一、蛋白质的一级结构	32
二、蛋白质的空间结构	35
三、胶原蛋白的分子结构	40
第三节 蛋白质结构与功能的关系	42
一、蛋白质一级结构与功能的关系	42
二、肌红蛋白和血红蛋白的空间结构与功能的关系	45
三、朊病毒与蛋白质构象病	47
第四节 蛋白质的理化性质及其提取、纯化原理	48
一、蛋白质的理化性质	48
二、蛋白质的提取与纯化原理	50
第五节 蛋白质组与蛋白质组学	55
一、蛋白质组	55
二、蛋白质组学	56
思考题	57
第三章 糖复合物	59
第一节 聚糖的结构	59
一、聚糖分子中单糖组分的种类及结构	59
二、单糖的连接方式	60
三、聚糖的一级结构及空间结构	61
第二节 糖蛋白的结构与功能	61
一、糖蛋白的分类与结构	62
二、糖蛋白的功能	64
第三节 蛋白聚糖	67
一、蛋白聚糖的结构	67
二、蛋白聚糖的功能	69
第四节 糖脂	70
一、鞘糖脂的分类与结构	70
二、鞘糖脂的功能	71
思考题	72
第四章 维生素	73
第一节 脂溶性维生素	73
一、维生素 A	73
二、维生素 D	75
三、维生素 E	76
四、维生素 K	76
第二节 水溶性维生素	77
一、维生素 B ₁	77
二、维生素 B ₂	78

三、维生素 PP	78	一、酶的命名	94
四、维生素 B ₆	80	二、酶的分类	95
五、泛酸	80	第三节 酶促反应的特点及机制	96
六、生物素	80	一、酶促反应的特点	96
七、叶酸	81	二、酶促反应的机制	98
八、维生素 B ₁₂	82	第四节 酶促反应动力学	99
九、维生素 C	82	一、底物浓度对酶促反应速率的影响	99
十、硫辛酸	84	二、酶浓度对酶促反应速率的影响	102
第三节 维生素的缺乏与过量中毒	84	三、pH 对酶促反应速率的影响	102
第四节 维生素的协同作用	85	四、温度对酶促反应速率的影响	103
一、吸收时的协同作用	85	五、抑制剂对酶促反应速率的影响	103
二、功能的协同作用	85	六、激活剂对酶促反应速率的影响	107
思考题	86	第五节 酶与医学	107
第五章 酶	87	一、酶与疾病的发生	107
第一节 酶的结构与功能	87	二、酶与疾病的诊断	107
一、酶的分子组成	87	三、酶与疾病的治疗	108
二、酶的活性中心	89	四、酶在医药学上的其他应用	109
三、酶的结构与功能	90	五、酶工程	109
第二节 酶的命名与分类	94	思考题	111

第二篇 物质代谢

第六章 糖代谢	115	第二节 生成高能化合物的生物氧化体系	139
第一节 糖的消化、吸收和转运	115	一、线粒体内膜的转运作用	139
一、糖的消化、吸收	115	二、氧化呼吸链	140
二、糖向细胞内转运	116	三、氧化磷酸化	146
第二节 糖的供能和贮能反应途径	116	四、氧化磷酸化的调节及影响因素	149
一、葡萄糖的分解代谢	116	五、ATP 在能量代谢中的核心作用	150
二、糖原的合成和分解	121	第三节 非供能氧化途径	151
三、葡糖异生作用	124	一、微粒体单加氧酶系	151
四、糖代谢的调节	126	二、超氧阴离子自由基等活性氧的产生与消除	152
第三节 磷酸戊糖途径	130	思考题	154
一、反应过程	130	第八章 脂质代谢	156
二、生理意义	130	第一节 脂质的消化、吸收和分布	156
第四节 果糖和半乳糖的代谢	132	一、脂质的消化与吸收	156
一、果糖代谢	132	二、脂质在体内的分布	157
二、半乳糖代谢	132	第二节 三酰甘油的代谢	157
第五节 血糖及其调节	133	一、三酰甘油的分解代谢	157
一、血糖的来源和去路	133	二、三酰甘油的合成代谢	162
二、血糖浓度的调节	133	三、三酰甘油代谢的调节	165
三、血糖浓度异常	134	第三节 多不饱和脂肪酸与类二十碳化合物	166
思考题	136	一、多不饱和脂肪酸	166
第七章 生物氧化	137	二、前列腺素、血栓 烷及白三烯	166
第一节 生物氧化的特点及其酶类	137	第四节 磷脂的代谢	169
一、生物氧化的特点	137	一、甘油磷脂的代谢	169
二、生物氧化中 CO ₂ 的生成	137		
三、生物氧化的酶类	138		

二、鞘脂质的代谢	171	三、含硫氨基酸的代谢	204
第五节 胆固醇的代谢	174	四、芳香族氨基酸的代谢	206
一、胆固醇的生物合成	174	五、支链氨基酸的代谢	208
二、胆固醇的转化与排泄	176	思考题	211
三、胆固醇生物合成的调节	176	第十章 核苷酸的代谢	212
第六节 血脂与血浆脂蛋白的代谢	177	第一节 核苷酸的功能	212
一、血脂	177	第二节 核苷酸的合成与分解	213
二、血浆脂蛋白的分类、组成及结构	178	一、嘌呤核苷酸的代谢	213
三、血浆脂蛋白的代谢	180	二、嘧啶核苷酸的代谢	217
思考题	185	三、脱氧核苷酸的合成	221
第九章 蛋白质的分解代谢	186	四、核苷二磷酸、核苷三磷酸的合成	222
第一节 蛋白质的营养作用	186	第三节 核苷酸的代谢障碍和抗代谢物	222
一、人体氮平衡及对蛋白质的需要量	186	一、核苷酸的代谢障碍	222
二、蛋白质的营养价值	187	二、抗代谢物	222
第二节 外源蛋白质的消化、吸收与腐败	188	思考题	226
一、蛋白质的消化	188	第十一章 物质代谢的调节	227
二、氨基酸的吸收和转运	188	第一节 细胞水平的代谢调节	227
三、肠内腐败作用	189	一、细胞内代谢调节的基本方式	227
第三节 体内蛋白质的降解	190	二、细胞内酶活性的调节	230
一、组织蛋白降解的溶酶体途径	190	三、细胞内酶含量的调节	233
二、组织蛋白降解的胞液途径	191	第二节 激素对物质代谢的调节	234
第四节 氨基酸的一般代谢	191	第三节 整体水平的代谢调节	234
一、氨基酸的脱氨基作用	191	一、应激状态下的代谢调节	234
二、氨的代谢	195	二、饥饿时的代谢调节	235
三、 α -酮酸的代谢	199	三、糖尿病患者体内代谢调节	236
第五节 一些氨基酸的特殊代谢	200	思考题	238
一、氨基酸的脱羧基作用	201		
二、一碳单位的代谢	202		

第三篇 遗传信息的传递

第十二章 DNA 的生物合成	241	一、DNA 的重组	252
第一节 DNA 复制的概况	241	二、基因突变	252
一、DNA 的半保留复制	241	三、DNA 的损伤及修复	254
二、DNA 复制的一般特点	241	思考题	258
三、DNA 半保留复制的有关酶类及蛋白因子	242	第十三章 RNA 的生物合成	260
第二节 真核生物 DNA 的复制过程	245	第一节 参加 RNA 合成的酶类与因子	260
一、DNA 复制的起始	245	一、DNA 指导的 RNA 聚合酶	260
二、DNA 链的延伸	246	二、转录因子	261
三、端粒 DNA 的合成	247	三、终止蛋白	261
四、线粒体 DNA 的复制	249	第二节 真核生物的转录过程	261
第三节 原核生物 DNA 的复制过程	249	一、转录的特点	261
一、参与原核生物 DNA 复制的酶类及蛋白因子	249	二、转录过程	262
二、原核生物 DNA 的复制过程	250	第三节 转录后核糖核酸的加工	265
第四节 逆转录过程	251	一、信使 RNA 的加工	265
第五节 DNA 的重组、损伤与修复	252	二、核糖体 RNA 的加工	267
		三、转移 RNA 的加工	267

第四节 原核生物的转录	268	思考题	302
一、原核生物 RNA 聚合酶	268	第十六章 癌基因、抑癌基因与生长因子	303
二、原核生物的转录过程	268	第一节 癌基因	303
三、RNA 的复制	270	一、病毒癌基因和细胞癌基因	303
思考题	272	二、癌基因产物的功能	305
第十四章 蛋白质的生物合成	273	三、原癌基因激活的机制	306
第一节 蛋白质生物合成的基本条件	273	第二节 抑癌基因	307
一、mRNA 是蛋白质合成的模板	273	一、抑癌基因的概念	307
二、氨基酸与 tRNA	275	二、重要的抑癌基因及其功能	308
三、核糖体 RNA	275	三、癌基因、抑癌基因与肿瘤的发生	310
四、参与蛋白质合成的酶类	275	第三节 生长因子	311
第二节 蛋白质生物合成的过程	276	一、概述	311
一、翻译的起始阶段	276	二、生长因子的作用机制	312
二、肽链的延长	279	三、生长因子与临床	313
三、肽链合成的终止	281	思考题	314
第三节 翻译后的加工修饰	282	第十七章 基因技术	315
一、翻译后修饰	282	第一节 基因工程	315
二、蛋白质的靶向转运	286	一、基因工程操作中常用的工具	315
第四节 蛋白质生物合成与医学的关系	287	二、基因工程的操作过程	318
一、许多病毒利用宿主蛋白质合成机器	287	第二节 分子杂交	321
二、抗生素对蛋白质生物合成的影响	288	一、核酸探针	321
三、一些活性物质对蛋白质生物合成的干扰作用	288	二、分子杂交的方法	322
思考题	290	第三节 聚合酶链反应	323
第十五章 基因表达的调控	291	第四节 DNA 的序列分析	325
第一节 概述	291	一、双脱氧合成末端终止法	326
一、基因表达与调控的概念	291	二、化学修饰法	326
二、基因表达调控的分类	292	第五节 转基因动物、克隆动物和基因剔除	326
三、基因表达调控的一般特征	292	技术	326
第二节 原核生物基因表达的调控	294	一、转基因动物	326
一、乳糖操纵子	294	二、克隆动物	327
二、色氨酸操纵子	295	三、基因剔除技术	328
第三节 真核生物基因表达的调控	297	第六节 基因诊断	329
一、真核生物基因表达调控的分子结构基础	297	一、基因诊断的常用技术和方法	329
及基因表达调控的特点	297	二、某些疾病的基因诊断	330
二、转录水平的调控	298	第七节 基因治疗	331
三、转录后的调控	300	一、基因治疗的概念	331
第四节 翻译和翻译后水平的调控	301	二、基因治疗的基本程序	331
一、翻译水平的调控	301	思考题	334
二、翻译后水平的调控	301		

第四篇 综 合 篇

第十八章 生物膜	337	一、脂质	337
第一节 细胞膜的分子组成	337	二、蛋白质	340
		三、糖	341

第二节 生物膜的结构	341	一、肝在糖代谢中的作用	384
一、膜结构的不对称性	341	二、肝在脂质代谢中的作用	384
二、膜的流动性	342	三、肝在蛋白质代谢中的作用	385
三、生物膜的分子结构模型	343	四、肝在维生素代谢中的作用	386
第三节 生物膜的转运功能	344	五、肝在激素代谢中的作用	386
一、被动转运	344	第二节 肝的生物转化作用	386
二、主动运输	346	一、生物转化的概念	386
三、胞吞作用和胞吐作用	348	二、生物转化的反应类型	386
第四节 生物膜与医学	349	三、生物转化反应的特点	390
一、红细胞膜与医学	349	四、影响生物转化作用的因素	391
二、脂质体在医学中的应用	350	第三节 胆汁与胆汁酸的代谢	391
三、膜相关疾病	350	一、胆汁	391
思考题	351	二、胆汁酸的代谢	392
第十九章 细胞信号转导	353	第四节 胆色素代谢与黄疸	395
第一节 信号转导的相关概念	353	一、胆红素的来源、生成和运转	395
一、细胞外信号分子	353	二、肝细胞对胆红素的代谢	396
二、细胞内信号分子和转导系统	354	三、胆红素在肠腔内的转变	398
第二节 信号转导的受体	355	四、影响尿胆素原排泄的因素	398
一、G 蛋白和 G 蛋白偶联型受体	355	五、血清胆红素与黄疸	400
二、具有酶活性的受体	356	思考题	402
三、细胞因子类受体	357	第二十二章 脑生物化学	403
四、离子通道型受体	357	第一节 脑神经组织的生物化学成分	404
五、细胞内受体	357	一、脑组织的生物化学组成特点	404
第三节 信号转导途径	358	二、脑组织的脂质	404
一、环核苷酸依赖性蛋白激酶的信号转导途径	358	三、脑神经特异蛋白质	405
二、肌醇磷脂介导的信号转导途径	361	四、脑组织重要的特异酶类和其他蛋白	406
三、生长因子、细胞因子信号转导途径	363	第二节 脑的物质代谢与能量代谢	406
四、细胞内受体信号途径	367	一、糖代谢	406
第四节 信号转导异常与疾病	368	二、脂质代谢	407
一、G 蛋白异常与疾病	368	三、氨基酸和蛋白质代谢	407
二、信号转导障碍与肿瘤	368	四、核苷酸和核酸代谢	408
三、受体异常与疾病	368	第三节 神经递质及神经递质受体	408
思考题	369	一、乙酰胆碱受体	408
第二十章 血液生物化学	371	二、单胺类神经递质和受体	410
第一节 血浆蛋白	371	三、氨基酸类神经递质和受体	410
一、血浆蛋白的组成	371	四、一氧化氮和嘌呤类神经递质	411
二、血浆蛋白的功能	372	思考题	412
第二节 血液凝固与纤维蛋白溶解	374	第二十三章 无机物生物化学	413
一、血液凝固	374	第一节 水和无机物在体内的重要功能	413
二、纤维蛋白溶解	378	一、水的生理功能	413
第三节 血细胞的代谢特点	378	二、主要无机盐的一般生理功能	413
一、红细胞的代谢	378	第二节 水和重要电解质的代谢	414
二、白细胞的代谢	382	一、水代谢	414
思考题	383	二、钠、钾的代谢	415
第二十一章 肝胆生物化学	384	三、水和钠、钾代谢的调节	416
第一节 肝在物质代谢中的作用	384	第三节 钙、磷和镁的代谢	416

一、钙、磷的代谢	416	四、碘	424
二、镁的代谢	420	五、锰	425
第四节 微量元素	421	六、硒	425
一、铁	421	七、其他微量元素	426
二、铜	423	八、微量元素代谢异常的原因	427
三、锌	423	思考题	428
附录一 希腊字母表			429
附录二			430
一、系统国际单位制(System International Units ,SI)单位的前缀			430
二、化合物名词的数字前缀			430
附录三 本书常用英文词汇及缩写			431
附录四			435
一、汉英名词索引			435
二、英汉名词索引			452
附录五 主要参考文献			470

绪 论

生命是物质的一种高级运动形式,核酸和蛋白质是生命的物质基础,生物体内各种物质的化学结构和化学反应过程是生命活动的体现。生物化学(biochemistry)即生命的化学,是在分子水平上研究生物体生命现象的化学本质的一门科学。

生物化学是较为年轻的学科。近代生物化学的研究始于18世纪。18世纪的主要发现是生物体的气体交换作用和对一些有机化合物(如甘油、柠檬酸、苹果酸、乳酸和尿酸等)的揭示。19世纪的主要贡献是对人体化学组成的认识和某些代谢过程的发现。在这一时期人类成功地结晶了血红蛋白,提纯了麦芽糖酶,发现了细胞色素,从无机物合成出尿素,从肝中分离出糖原并证明它可转化为血糖等。19世纪末,酶独立催化作用的发现打开了通向现代生物化学的大门。20世纪生物化学取得了飞速发展,确立了现代生物化学的基本框架。从1903年“生物化学”这一名词问世以来的50年,生化营养学、生物体的分子组成、物质代谢与能量代谢和代谢调节等均取得了显著成果。例如,维生素、辅酶和激素的结构与功能,酶促反应动力学,糖代谢的各条反应途径,脂肪酸的 β -氧化分解,氨基酸的分解代谢与鸟氨酸循环,三羧酸循环等均是这一时期的突出贡献。

20世纪50年代以来,生物化学的发展进入了一个空前突飞猛进的黄金时代,这一时期的主要标志是1953年James D. Watson和Francis H. Crick的DNA双螺旋结构模型的建立。这是20世纪自然科学中的重大突破之一,为进一步阐明遗传信息的贮存、传递和表达,揭开生命的奥秘奠定了结构基础。同年,Frederick Sanger完成了胰岛素一级结构的测定。从此开始了以核酸和蛋白质的结构与功能为研究焦点的分子生物学时代。分子生物学(molecular biology)是生物化学的延伸与发展,是以生物大分子的结构、功能和调控为其主要研究对象,探讨生命本质的一门学科。由于分子生物学涉及生命现象最本质的内容,它全面地推动了生命科学的发展。这一时期人们提出了遗传信息传递DNA \rightarrow RNA \rightarrow 蛋白质的中心法则,破译了遗传密码。对基因传递与表达的调控也取得了可喜的成果。核酸和蛋白质组成的序列分析技术都取得了飞速的发展。20世纪70年代出现的重组DNA技术(基因克隆技术)不仅使人们用微生物生产人类所需的蛋白质和改造生物物种成为可能,而且在此基础上,衍生出的转基因技术、基因剔除技术及基因芯片技术等更大地开阔了人们有关基因研究的视野。方兴未艾的基因诊断和基因治疗技术将给人类对疾病的认识与根治带来一场新的革命。1990年开始的人类基因组计划(human genome project, HGP)已完成了对人类基因组的测序工作。这一工程的完成标志人类生命科学的发展进入了一个新的纪元,为人类破解生命之谜奠定了坚实的基础。继之而来的后基因组计划,包括蛋白质组计划,将在更加贴近生命本质的更深层次上探讨与发现生命活动的规律,以及重要生理与病理现象的本质。这些庞大工程的完成,必将对生命的本质、生命的进化、遗传、变异,疾病的发病机制,疾病的预防、治疗,延缓衰老和新药的开发,以及整个生命科学产生深远的影响。

我国劳动人民对生物化学的发展做出了重要的贡献。早在四五千年前我们的祖先就取得了酿酒的经验。公元前2世纪《黄帝内经》就记载了各种膳食对人体的作用,即“五谷为养,五畜为益,五果为助,五菜为充”。公元5世纪对缺乏维生素B₁引起的脚气病已有详细记载。我国古代对地方性甲状腺肿、维生素A缺乏症、糖尿病等均有详尽的描述。我国近代生物化学家吴宪首创了血滤液的制备和血糖测定法,提出了蛋白质的变性学说。1965年我国科学家首先人工合成了具有生物活性的牛胰岛素,后来又合成了酵母丙氨酸-tRNA。2000年我国生物化学工作者出色地完成了人类基因组计划中1%的测序工作,为世界人类基因组计划的完成贡献了力量。2002年,我国的生物化学工作者又率先完成了水稻的基因组精细图,为水稻的育种和防病奠定基因基础。我国在生物化学的许多领域均已达到了国际先进水平,与全世界的科

技工作者一道 ,冲击生命科学的顶峰。

世界是物质的 ,生物体也是由物质构成的。生物化学的主要内容包括生物体的化学组成、生物分子的结构与功能、物质代谢、能量代谢、信号转导、遗传信息传递和自我复制等生命过程的化学本质。作为医学生物化学 ,其内容还包括有关的生物化学技术和一些组织器官的新陈代谢特点。生物化学的主要研究内容概括如下 :

1. 生物体的化学组成、分子结构及其功能

组成生物体的化学元素主要是 C、H、O、N、P、Ca 和其他一些化学元素。这些元素以无机化合物和各种有机化合物的形式存在于体内。其中 ,蛋白质(包括酶)、核酸(脱氧核糖核酸和核糖核酸)、糖复合物和复合脂质等大相对分子质量的有机化合物称为生物大分子(biomacromolecules)。蛋白质是生命活动的物质基础。核酸是生命遗传信息贮存、传递与个体生命发生的物质基础。这些生物大分子在体内有序地运转 ,执行其特定的功能 ,从而构成特定的生命现象。研究这些生物大分子具有重要的理论意义和实践意义。无机元素在体内也有其独特的地位 ,许多无机元素和蛋白质、酶、核酸结合而发挥其作用 ,无机元素还参与体内物质代谢、能量代谢和信息的传递与调控。

2. 生物体内的物质代谢、能量代谢与信号转导

新陈代谢(metabolism)是生命的基本特征之一 ,研究机体如何消化、吸收外界物质 ,用于塑造细胞本身和为细胞的各种生命活动提供所需要的物质和能量 ,又如何不断更新自身的组成 ,将其转化为代谢的末产物。细胞消耗能量将小分子物质合成为大分子化合物的过程称为合成代谢(anabolism) ;相反的过程则称为分解代谢(catabolism)。合成代谢与分解代谢是新陈代谢相反相成的两个方面 ,是生物化学重要的研究内容之一。机体内的物质代谢是在一系列的调控下有条不紊进行的。外界刺激通过体内神经、激素等作用于细胞 ,通过对酶的不同调节形式 ,改变细胞内的物质代谢。细胞内存在的各种信号转导系统还调节机体的生长、增殖、分化、衰老等生命过程。细胞信号转导机制与网络的深入研究也是现代生物化学的重要课题之一。

3. 基因的贮存、传递、表达及其调控

自我复制是生命过程的又一基本特征。生物体通过个体的繁衍 ,将其遗传信息传给后代。基因是 DNA 分子中可表达的功能片段 ,基因的贮存、传递使生命得以延续 ,基因的遗传、变异与表达赋予生命多姿多彩的特色。研究基因各片段在染色体中的定位、核苷酸的排列顺序及其功能 ,DNA 复制、RNA 转录和蛋白质生物合成过程中基因传递的机制 ,基因传递与表达的时空调节规律等是生物化学极为重要的课题。这将为解开生命之谜奠定坚实的基础。

4. 生物化学技术

生物化学是实验科学 ,生物化学的一切成果均建立在严谨的科学实验基础之上。这些技术包括生物大分子的提取、纯化与检测技术 ,生物大分子组成成分的序列分析和体外合成技术 ,物质代谢与信号转导的跟踪检测技术 ,以及基因重组、转基因、基因剔除、基因芯片等基因研究的相关技术等。生物化学技术不是单纯的化学技术 ,其中还融入了生物学、物理学、免疫学、微生物学、药理学等知识与技术 ,作为自己的研究手段。正是这些技术的发展和新技术、新仪器的不断涌现 ,在加快了生物化学领域发展的同时 ,也大大地带动了其他学科的发展。人们已经能对生理学、药理学、病理学、微生物学、免疫学、遗传学 ,以及临床各学科的认识深入到分子水平。生物化学 ,尤其是其中的分子生物学已经成为生命科学与医学的“ 共同语言 ” ,融合入生物化学与分子生物学的各项技术已成为生命科学与医学研究的“ 通用技术 ”。生物化学与分子生物学的发展也促进一些边缘学科的产生。例如 ,人们利用计算机技术对生命科学研究形成的大量复杂的数据、资料进行整理、分析、综合 ,回答研究中发现的新问题 ,从而形成了新的学科——生物信息学(bioinformatics)。

5. 组织器官生物化学

医学生物化学是人体的生物化学 ,除了上述的内容外 ,还要在分子水平上阐明人体内重要组织器官的新陈代谢特点和与其功能的关系。

生物化学是医学的重要基础学科。生物化学的理论与技术已渗透到医学科学的各个领域,使人们对危害人类健康与生命的许多重大疾病,如遗传性疾病、恶性肿瘤、免疫缺陷性疾病、心血管疾病、代谢异常性疾病的认识提高到分子水平,奠定了包括疾病的发生、发展、转归,疾病的预防等方面的分子基础。尤其是人类基因组和人类后基因组计划的启动与完成,必将为本世纪医学的发展带来新的突破。掌握生物化学的基础理论、基本知识和基本技能必将为进一步学习其他基础医学、临床医学、预防医学、口腔医学和药学等各专业课程,乃至为毕业后的继续医学教育奠定坚实的基础。

(赵宝昌)

第一篇

生物分子的结构与功能

世界是物质的,生命也是物质的。天然存在的 90 余种化学元素中约 30 种是生命必需的。其中,碳、氢、氧、氮占细胞总质量的 99%,是构成细胞内有机化合物的主要元素。生物分子(biomolecules)是指构成人体组成和对于维持人体生命活动所必需的有机化合物,其相对分子质量范围从小于 100 到大于 100 000 000。相对分子质量小于 500 的生物分子有氨基酸、核苷酸、单糖、有机酸、维生素等。蛋白质、核酸、糖复合物等是生物大分子。生物化学首先阐述这些生物分子的结构,以及其结构与其生理功能的关系,为后续章节的学习奠定基础。

组成脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)的基本单位分别是脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸,其连接方式是 3' , 5'-磷酸二酯键。蛋白质的基本组成单位氨基酸则以肽键相连接。这些基本组成单位的连接方式与排列顺序构成这些生物大分子的一级结构。在此基础上,它们进一步形成其特有的空间结构,具有各自的理化性质和独特的功能。

酶是具有高效、特异催化作用的蛋白质。酶的催化作用是生命活动中各种化学反应能有效进行的物质保证。核酶与脱氧核酶的发现大大地充实了生物催化剂的内容,并为生命的起源提供了有说服力的设想。

糖复合物包括糖蛋白、蛋白聚糖等,是一类重要的生物大分子,并且日益受到关注。基因组学、蛋白质组学和糖组学就是对核酸、蛋白质和糖复合物的结构与功能进行全面研究的新兴领域。

本篇除重点阐述核酸、蛋白质、糖复合物和酶等生物大分子的结构与功能外,还对生物分子维生素的结构与功能进行讨论。单糖、脂质、氨基酸、核苷酸等其他直接参与物质代谢的小相对分子质量生物分子的结构与功能将在有关章节进行阐述。

第一章 核 酸

本章教学要求

- 核酸的分子组成
- DNA 的一级结构、二级结构和组装
- RNA 的种类、结构与功能
- 核酸的理化性质
- 核酸的催化性质
- 真核生物基因组的特点
- 人类基因组计划

核酸(nucleic acid)是决定生物体遗传特征,担负着生命信息的贮存和传递的生物大分子。核酸的基本组成单位是核苷酸(nucleotide),核苷酸由碱基(base)、戊糖(pentose)和磷酸(phosphate)三部分组成。自然界中存在的核酸有两类:即脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)。DNA是遗传信息的贮存和携带者, RNA参与遗传信息的表达。某些病毒只含有DNA或RNA,说明RNA也可作为遗传信息的载体。核酸具有复杂而多样的结构,在生命活动过程中发挥着重要的功能。

基因(gene)是含有生物信息,可以编码具有生物功能的产物,包括RNA和/或多肽链的DNA片段。基因组是指一个生物体的全套染色体DNA及其所携带的全部遗传信息。基因组(genome)指一个生物体的所有基因。20世纪90年代初开始的人类基因组计划目的是为了测定人类的全部基因组序列,对于人类从分子水平上认识自身具有重要的意义。

第一节 核酸的基本组成单位——核苷酸

在核酸酶的作用下,核酸的水解产物为核苷酸,所以核酸的基本组成单位是核苷酸。核苷酸则由碱基、核糖(ribose)或脱氧核糖(deoxyribose)、磷酸三种成分通过共价键连接而成(图1-1)。

一、核苷酸的组成

(一) 碱基

参与核苷酸组成的碱基主要有五种(图1-2),它们都是嘌呤(purine)和嘧啶(pyrimidine)类化合物。嘌呤类碱基主要有腺嘌呤(adenine, A)和鸟嘌呤(guanine, G)两种,嘧啶类碱基主要有三种,即胞嘧啶(cytosine, C)、胸腺嘧啶(thymine, T)和尿嘧啶(uracil, U)。

所有核酸中都含有腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶, DNA分子中特有的碱基是胸腺嘧啶,而RNA中则是尿嘧啶。

除了上述五种碱基之外,原核生物及真核生物的DNA和RNA中还含有一些微量的稀有碱基(rare base)。稀有碱基的种类很多,大多数是甲基化衍生物(表1-1),在生物体内具有重要的生理功能。

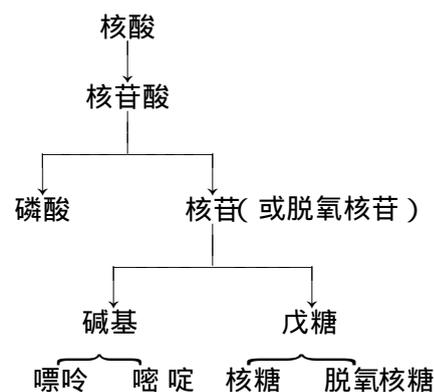


图1-1 核酸的构成

表1-1 核酸中的部分稀有碱基

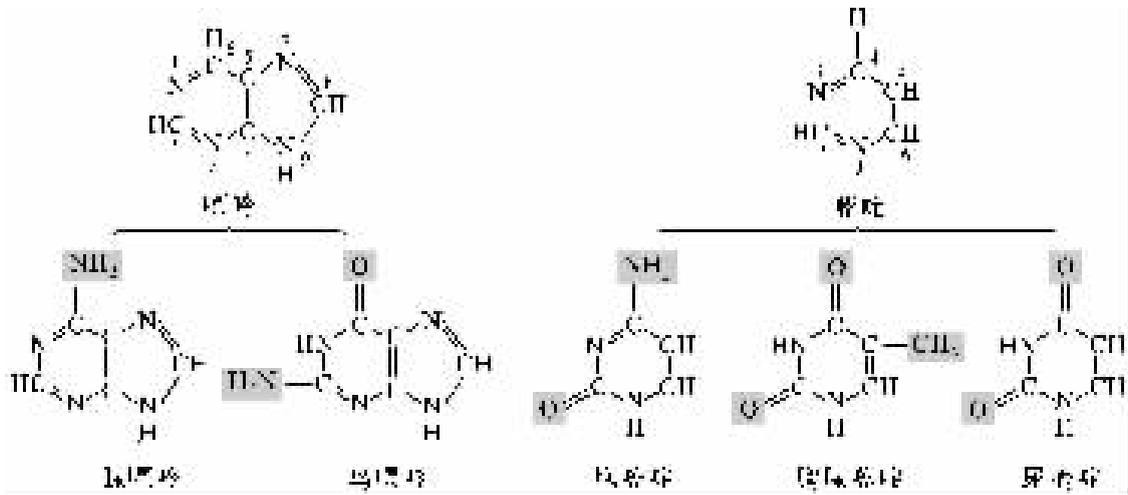


图 1-2 构成核苷酸的主要碱基

	DNA	RNA
嘌呤	7-甲基鸟嘌呤(m^7G) N^6 -甲基腺嘌呤(m^6A)	N^6 -甲基腺嘌呤(m^6A) N^6, N^6 -二甲基腺嘌呤 7-甲基鸟嘌呤
嘧啶	5-甲基胞嘧啶(m^5C) 5-羟甲基胞嘧啶(hm^5C)	假尿嘧啶(ψ) 双氢尿嘧啶(DHU)

嘌呤和嘧啶碱基都是含氮杂环化合物,分子中的酮基或氨基均位于杂环上氮原子的邻位,受介质中 pH 的影响,会发生酮式-烯醇式互变异构,或氨基-亚氨基互变异构(图 1-3)。

嘌呤环和嘧啶环中含有共轭双键,因而都有吸收紫外线的性质,吸收高峰在波长 260 nm 左右。这是碱基的一个重要理化性质,在研究核酸、核苷酸、核苷及碱基时,可被用作定性及定量分析。另外,紫外线照射可引起 DNA 突变,也是由于存在于 DNA 中的核苷酸吸收紫外线造成的。

(二) 戊糖

构成核苷酸的戊糖有两种, DNA 分子中含有 β -D-2 脱氧核糖, RNA 分子中的戊糖为 β -D-核糖。这两种核糖均为呋喃糖。碱基杂环中的原子编号一般以 1 2 3 ... 表示,为了与此相区分,糖环上的碳原子则标以 1' 2' 3' 等(图 1-4)。

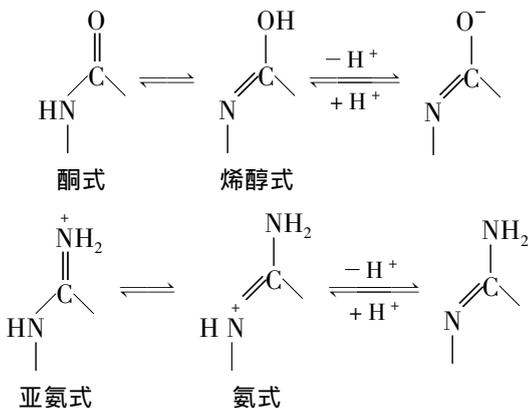


图 1-3 碱基的互变异构

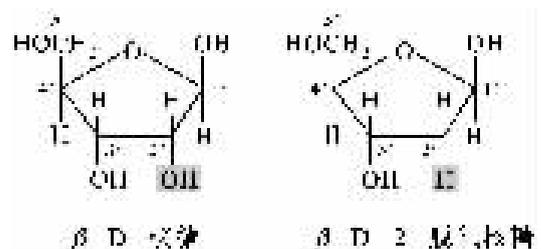


图 1-4 两种核糖的结构

(三) 核苷与核苷酸

碱基与戊糖通过 β -N-糖苷键(β -N-glycosidic bond)缩合形成核苷(nucleoside)。嘌呤类核苷是由嘌呤环上的 N-9 与戊糖的 C-1' 连接,嘧啶类核苷是由嘧啶环上的 N-1 与戊糖的 C-1' 相连。由于

构成核苷酸的戊糖有两种,因此核苷又可分为核糖核苷及脱氧核糖核苷(图 1-5 表 1-2)。

核苷的戊糖羟基与磷酸之间脱水以酯键相连,即形成核苷酸。糖环上的所有游离羟基(核糖的 C-2'、C-3'、C-5'及脱氧核糖的 C-3'、C-5')均能与磷酸发生酯化反应,但最常见的酯化部位是在核糖或脱氧核糖的 C-5'和 C-3'位上。单核苷酸分子中的磷酸主要连接在 C-5'位上,称为 5'-核苷酸。含有一个磷酸基团的核苷酸称为核苷一磷酸(nucleoside monophosphate, NMP);第二个磷酸基团通过酸酐键与核苷一磷酸的磷酸基团相连则形成核苷二磷酸(nucleoside diphosphate, NDP);同样,第三个磷酸基团连在核苷二磷酸的焦磷酸基团上则形成核苷三磷酸(nucleoside triphosphate, NTP),其中第一、二、三位磷酸分别标记为 α 、 β 、 γ 。

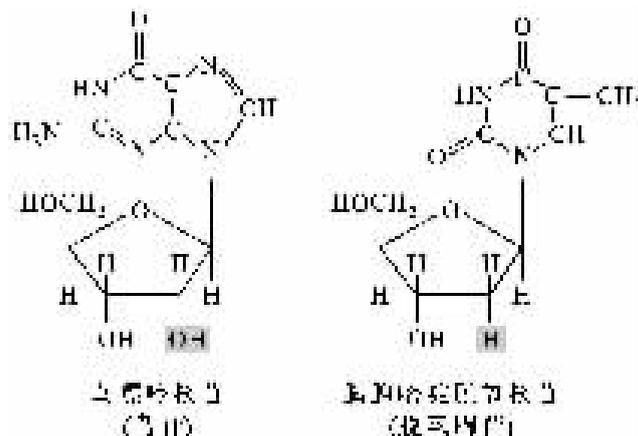


图 1-5 核糖核苷与脱氧核糖核苷

表 1-2 构成 DNA 及 RNA 的碱基、核苷和核苷酸

	碱基(base)	核苷(ribonucleoside)	核苷酸(ribonucleotide)
DNA	腺嘌呤 (adenine ,A)	脱氧腺苷 (deoxyadenosine)	脱氧腺苷酸 (deoxyadenosine monophosphate ,dAMP)
	鸟嘌呤 (guanine ,G)	脱氧鸟苷 (deoxyguanosine)	脱氧鸟苷酸 (deoxyguanosine monophosphate ,dGMP)
	胞嘧啶 (cytosine ,C)	脱氧胞苷 (deoxycytidine)	脱氧胞苷酸 (deoxycytidine monophosphate ,dCMP)
	胸腺嘧啶 (thymine ,T)	脱氧胸苷 (deoxythymidine)	脱氧胸苷酸 (deoxythymidine monophosphate ,dTMP)
	RNA	腺嘌呤 (adenine ,A)	腺苷 (adenosine)
鸟嘌呤 (guanine ,G)		鸟苷 (guanosine)	鸟苷酸 (guanosine monophosphate ,GMP)
胞嘧啶 (cytosine ,C)		胞苷 (cytidine)	胞苷酸 (cytidine monophosphate ,CMP)
尿嘧啶 (uracil ,U)		尿苷 (uridine)	尿苷酸 (uridine monophosphate ,UMP)

在对核苷及核苷酸命名时,须先冠以碱基的名称,如腺嘌呤核苷(简称腺苷),胞嘧啶核苷一磷酸(简称胞苷酸),尿嘧啶核苷二磷酸(简称尿苷二磷酸)等。如为脱氧核苷或脱氧核苷酸,则在相应的核苷或核苷酸前面加上“脱氧”,在缩写名词前加上 d 字符(表 1-2)。

核苷酸除了作为核酸的基本组成单位外,在生物体内还有重要的代谢与调节功能(见第十章 核苷酸代谢)。例如,AMP 参与构成一些辅酶,ADP、ATP、GTP、UTP 等在生物体内的物质和能量代谢中均作为重要的底物和中间产物,环腺苷酸(3' 5'-cyclic AMP, cAMP)和环鸟苷酸(3' 5'-cyclic GMP, cGMP)是细胞内重要的第二信使,在细胞信号转导通路中发挥着多种多样的调控功能。图 1-6 是一些核苷酸的结构式,从这些结构式可以类推出其他核苷酸或脱氧核苷酸的结构。

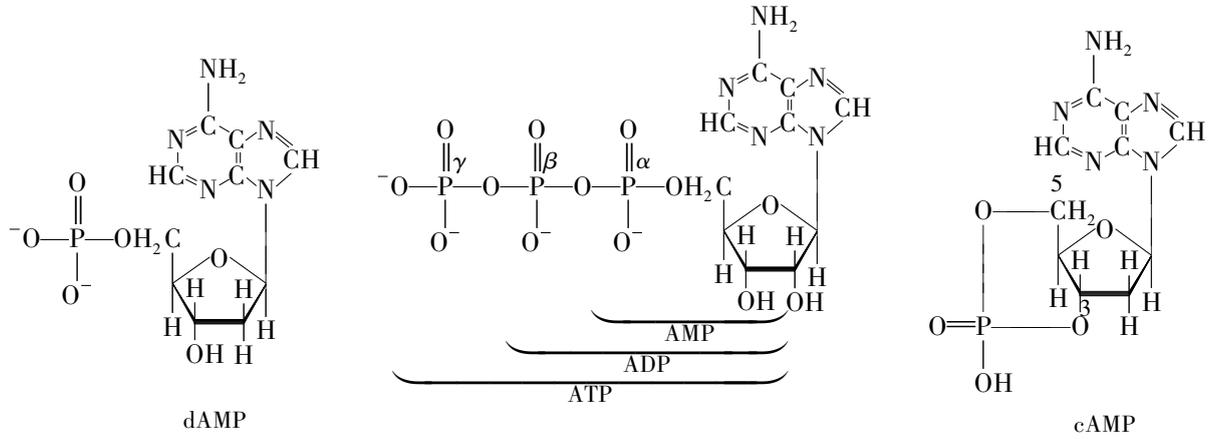


图 1-6 不同类型的核苷酸

二、核苷酸的连接方式

几个或十几个核苷酸连接起来的分子称为寡核苷酸(oligonucleotide),更多的核苷酸连接形成的聚合物就是核酸。不同的核酸其核苷酸的数量相差很大,DNA分子中核苷酸的数量可高达上千万,是真正的生物大分子,而某些RNA分子只含有数十个核苷酸。无论核苷酸的数量多少,DNA和RNA都是通过核苷酸间的3'、5'-磷酸二酯键连接而成,即前一个核苷酸的C3'-OH与下一核苷酸的C5'位磷酸之间脱水形成酯键。

需要强调的是,核苷酸的连接具有严格的方向性。通过3'、5'-磷酸二酯键连接形成的核酸是一个没有分支的线形分子,它们的两个末端分别为5'末端(游离磷酸基)和3'末端(游离羟基),在书写时,方向应该是5'→3'(图1-7)。

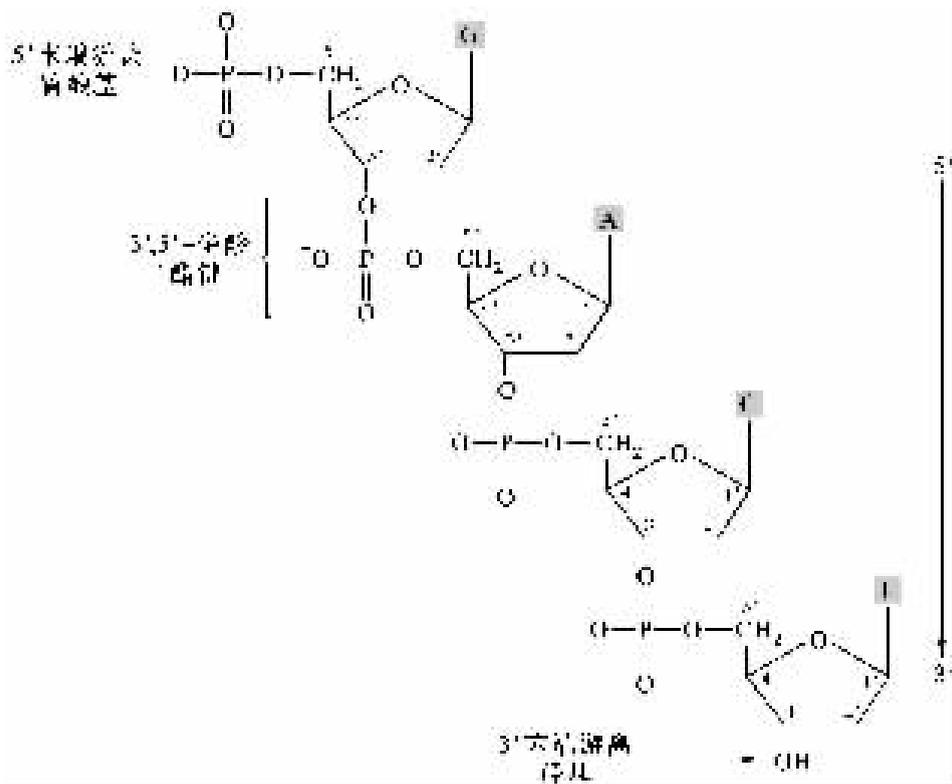
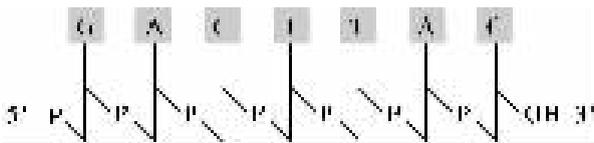


图 1-7 核苷酸的连接方式和走行方向

不同的核苷酸在核酸长链上的排列顺序称为核酸的一级结构。由于核苷酸之间的差异主要是碱基的不同,所以核酸的一级结构也称为核苷酸序列或碱基序列。核酸分子由上百个以至千万个核苷酸连成,书

写时不必要也不可能采用如图 1-7 这样复杂的结构式,通常可将其简写。简写时,各碱基用其英文字母缩写代表,碱基之下的垂直线代表核糖,斜线代表连接各核苷酸的 3' 5'-磷酸二酯键,斜线与垂直线的交点即为 C-3'和 C-5'的位置。最左方为 5'-磷酸末端,最右方为 3'-OH 末端:



该简写式还可进一步简化为 5'-pGpApCpTpTpApC-OH-3'或 5'-GACTTAC-3',AGCT 等缩写字母,既可代表碱基,也可代表核酸中的核苷酸。

第二节 DNA 的结构

1944 年,Oswald Avery 等完成了著名的肺炎球菌转化实验,利用从致病肺炎球菌中提取的纯化 DNA 转移到另一种非致病性肺炎球菌中,使后者的遗传性状发生改变,成为一种致病菌,从而证明了 DNA 是遗传的物质基础。如果 DNA 的结构发生改变,则会发生遗传改变或者造成遗传性疾病。

一、DNA 的一级结构

组成 DNA 分子的脱氧核糖核苷酸主要有四种,即脱氧腺苷酸(dAMP)、脱氧鸟苷酸(dGMP)、脱氧胞苷酸(dCMP)和脱氧胸苷酸(dTMP)。DNA 分子的一级结构就是这四种脱氧核糖核苷酸的排列顺序,或者四种碱基的顺序。遗传信息就是以碱基排列顺序的方式蕴藏在 DNA 分子中的。组成 DNA 的脱氧核糖核苷酸虽然只有四种,但是各种核苷酸的数量、比例和排列顺序不同,并且 DNA 分子中核苷酸的数目巨大,因此可以形成各种特异性的 DNA 片段,从而造就了自然界丰富的物种以及个体之间的千差万别。另外要注意的是,DNA 分子是有方向性的,所以在书写 DNA 序列时,要注明它的 5'端和 3'端,这样才能真正表达 DNA 分子中的遗传信息。

二、DNA 的二级结构

20 世纪 40 年代末到 20 世纪 50 年代初,美国生物化学家 Erwin Chargaff 采用色谱和紫外吸收分析等方法研究了 DNA 的组成成分,发现不同来源的 DNA 分子中,嘌呤类核苷酸和嘧啶类核苷酸的总数总是相等的,腺苷酸(A)的数目总是等于胸苷酸(T)的数目;鸟苷酸(G)的数目也总是等于胞苷酸(C)的数目,即 $A = T, G = C; A + G = T + C$ 。这就是著名的“Chargaff 规则”。

与此同时,英国物理化学家 Maurice Wilkins 等人用 X 射线衍射技术研究 DNA 的分子结构,发现 DNA 是一种螺旋结构。1951 年,英国女物理学家 Rosalind Franklin 拍到了一张十分清晰的 DNA X 射线衍射照片。这些卓有成效的工作为 DNA 双螺旋结构的发现打下了坚实的基础。

在当时这些研究成果的基础上,James Watson 和 Francis Crick 于 1953 年提出了 DNA 的双螺旋(double helix)结构模型。这个模型不仅解释了当时所知道的 DNA 的一切理化性质,而且还将结构与功能联系起来,大大地推动了分子生物学的发展。

(一) DNA 二级结构模型

由于当时技术条件的限制,Watson 和 Crick 所用的资料来自在相对湿度为 92% 时所得到的 DNA 钠盐纤维,这种 DNA 称为 B 型 DNA(B-DNA)。因为在生物体内的生理条件下,DNA 几乎都是以 B-DNA 存在,所以这里将详细地讨论 B-DNA 双螺旋结构模型(图 1-8)。

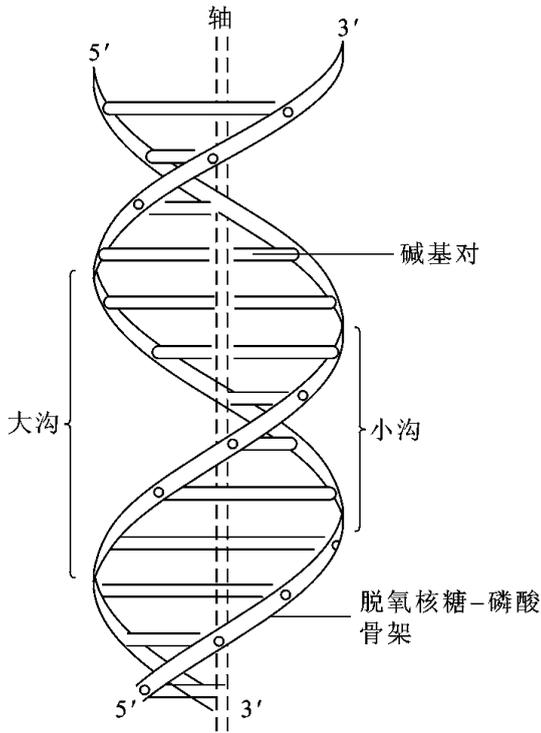


图 1-8 DNA 双螺旋结构示意图

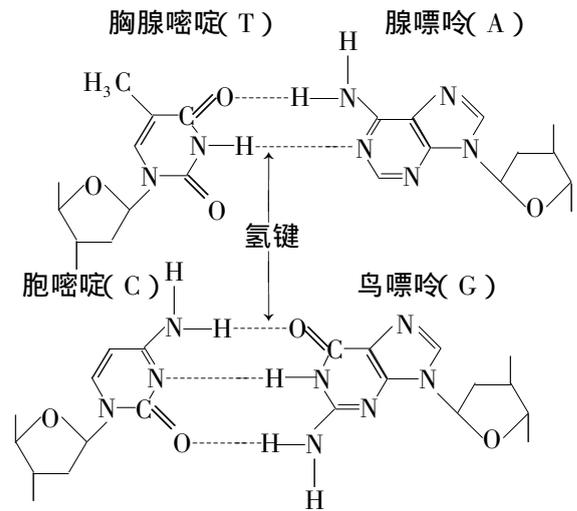


图 1-9 碱基互补原则

1. DNA 分子由两条脱氧核糖核苷酸链组成,两条链的走向呈反向平行。在 DNA 双链中,亲水的脱氧核糖-磷酸位于螺旋的外侧,彼此通过 3',5'-磷酸二酯键连接,形成 DNA 分子的骨架,碱基位于双螺旋的内侧,每个碱基均与对应链上的碱基处于同一平面而以氢键(hydrogen bond)结合。在 4 种碱基中,腺嘌呤(A)总是跟胸腺嘧啶(T)配对,形成两个氢键;鸟嘌呤(G)总是跟胞嘧啶(C)配对,形成三个氢键。这种严格的碱基配对方式称做“碱基互补原则”(图 1-9)。所以,DNA 分子两条链的碱基序列是互补的。碱基平面与双螺旋的长轴垂直,糖环的平面则与长轴平行。

2. DNA 是右手螺旋结构。螺旋的直径为 2 nm,螺距为 3.4 nm,螺旋每旋转一周包含 10 对碱基,所以每个碱基平面之间的距离为 0.34 nm。双螺旋结构上存在着两条凹沟,与脱氧核糖-磷酸骨架平行。较深的沟称为大沟(major groove),较浅的称为小沟(minor groove)。这些沟状结构与蛋白质和 DNA 的识别及结合有关,通过这样的相互作用,实现对基因表达的调控。

3. DNA 双螺旋结构在生理状态下是很稳定的。DNA 分子两条链间互补碱基的氢键维持双螺旋结构的横向稳定性,纵向则靠碱基平面间的疏水性碱基堆积力(base stacking force)来维系,其中碱基堆积力是维持 DNA 分子稳定性的主要因素。

DNA 双螺旋结构模型的提出具有划时代的意义,它近乎完美地说明了遗传物质的主要生化和结构的特征。从此,遗传学和生物学的历史正式从细胞阶段进入了分子阶段。

(二) DNA 二级结构的多样性

DNA 的结构不是一成不变的。B-DNA 是 DNA 分子在生理条件下最稳定的结构,如果改变溶液的离子强度或相对湿度,DNA 螺旋结构的上述特征都会发生变化。例如,在相对湿度低于 75% 时,DNA 分子的结构为 A 型。A-DNA 的螺旋宽而短,每一个螺旋含 11 个碱基对(base pair, bp),并且碱基对不垂直于双螺旋的轴。1979 年,Alexander Rich 等又发现了左手螺旋。他们在研究人工合成的 CGCGCG 片段的晶体结构时,意外地发现这个片段形成的是左手螺旋。后来证明这种结构同样存在于天然的 DNA 分子中。左手螺旋结构的一个明显特征是,脱氧核糖-磷酸骨架在螺旋中呈锯齿形(zigzag),所以,取其英文单词的第一个字母将其命名为 Z-DNA(图 1-10)。Z-DNA 每个螺旋含 12 对碱基,只有一条沟,其功能与基因的表达调控有关。

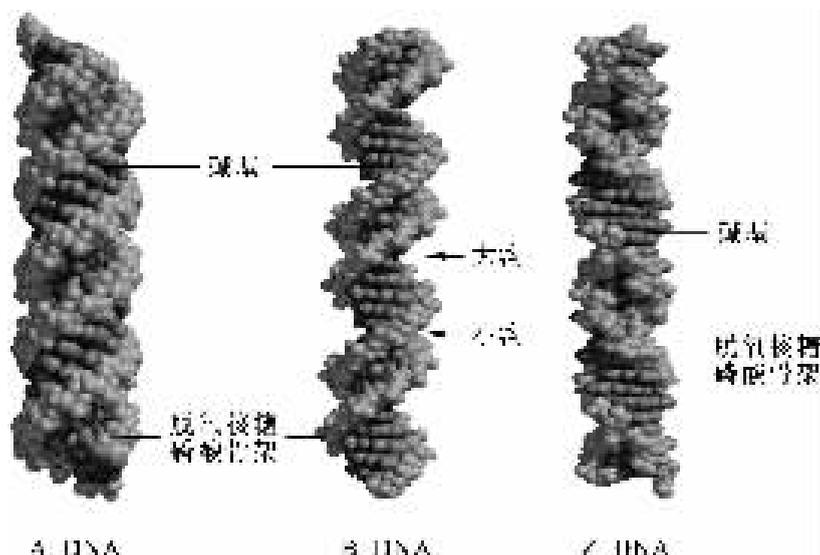


图 1-10 不同类型的 DNA 双螺旋结构

三、DNA 的高级结构

除了少数 RNA 病毒以外,地球上所有生物的遗传信息都贮存在 DNA 分子中。不同物种间的 DNA 分子大小及复杂程度差别很大。一些小的病毒 DNA 可能只含有几千个碱基对,细菌含有数百万个碱基对,而植物及哺乳动物的 DNA 分子则由数十亿碱基对构成。并且,所有生物的基因组 DNA 的长度通常比含此 DNA 的细胞直径大得多。因此, DNA 在形成双螺旋结构的基础上,必须进一步折叠成超级螺旋结构,并且在蛋白质的参与下,再进行精密的包装。这样, DNA 才能存在于小小的细胞中,甚至细胞核中。

(一) 原核生物细胞中 DNA 的组装

绝大部分原核生物的 DNA 都是闭合环状双螺旋结构,裸露而不与蛋白质结合。这种双螺旋分子还需进一步螺旋化形成超螺旋结构(图 1-11),致密压缩才能容纳于细胞内。在细菌中,超螺旋 DNA 分子形成一条染色体后,再与蛋白质及 RNA 相互作用,高度压缩构成原核细胞的类核(nucleoid)。另外,除了染色体 DNA,还有独立于染色体之外的环状 DNA 分子,称为质粒(plasmid)。环状 DNA 分子进一步扭转形成超螺旋。其中,负超螺旋为右手螺旋,是自然界中存在的主要形式,有利于 DNA 的复制与转录。

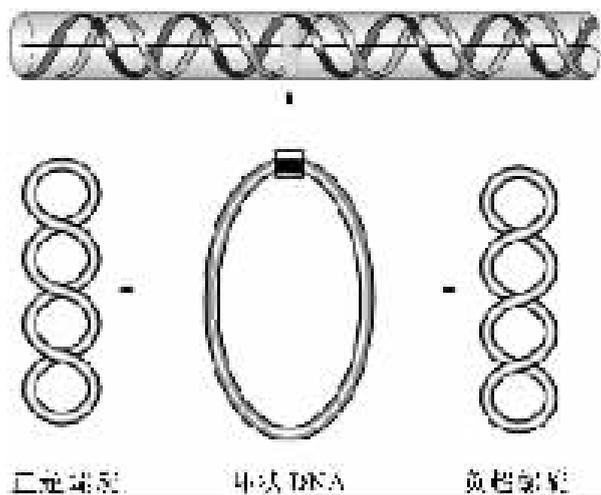


图 1-11 环状 DNA 结构示意图

(二) 真核生物细胞中 DNA 的组装

在真核细胞内,由于 DNA 分子较原核细胞大得多,所以它们压缩得更为致密。真核细胞的 DNA 与蛋白质结合,以染色质(chromatin)的形式存在于细胞核内。在细胞分裂期,染色质进一步压缩折叠,形成光学显微镜下可见的染色体(chromosome)。染色质与染色体都是 DNA 的高级结构形式,并且基本上是一物质,只不过是不同时期(一个是间期,一个是分裂期)的不同形态而已。它们的基本结构单位都是核小体(nucleosome)。

核小体由 DNA 双螺旋缠绕在组蛋白上形成,其核心为四种组蛋白构成的八聚体(octamer)。组蛋白共有五种,分别称为 H_1 、 H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4 。其中 $H_2A - H_2B$ 形成 2 个二聚体,位于核心的一侧;另一侧

的四聚体由两对 H_3 和 H_4 组成。DNA 双螺旋分子在组蛋白八聚体表面绕 1.75 圈,长度约 140 ~ 160 bp,构成核小体的核心颗粒(core particle)。相邻的两个核心颗粒由长约 60bp 的 DNA 连接,连接区结合有一个组蛋白分子 H_1 。这样的结构不断重复,形成所谓的“串珠样”外观(图 1-12)。

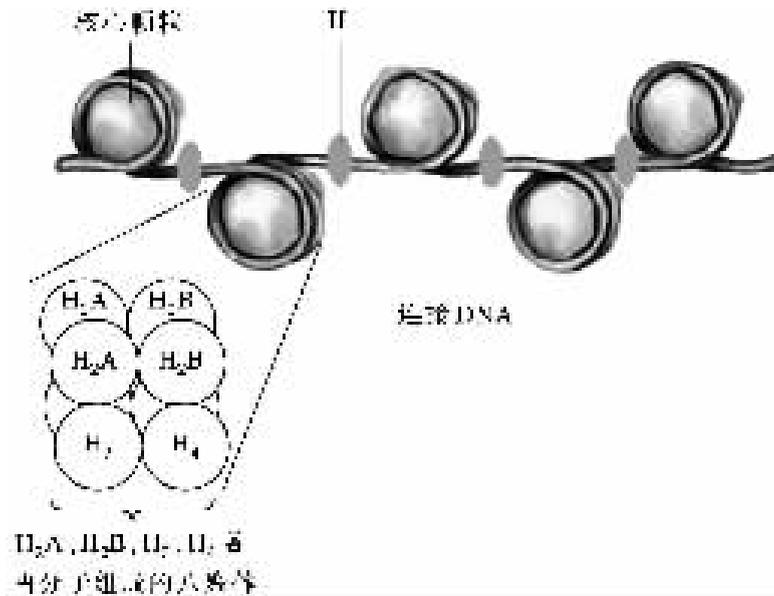


图 1-12 核小体结构示意图

由于核小体的形成,DNA 分子的长度被压缩 $6/7$ 左右。在此基础上,核小体再进一步盘旋折叠,形成纤维状结构及袢环结构,最后形成染色体。经过这样的压缩折叠,将长度超过细胞核直径 10 000 倍的 DNA 分子容纳于其中。

四、线粒体 DNA

对于真核生物而言,DNA 除了存在于细胞核内,还有少量的 DNA 位于细胞的线粒体(mitochondrion)中,称为线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)。mtDNA 与细菌的 DNA 相似,也是超螺旋双链环状分子,裸露而不与组蛋白结合,分散在线粒体基质的不同区域。不同生物细胞线粒体内的 DNA 分子数目大不相同,一个线粒体中可能有一个或几个 DNA 分子。与细胞核内的 DNA 相比,mtDNA 的相对分子质量较小,约为 10×10^6 。mtDNA 中贮存的遗传信息主要用于指导线粒体自身的 RNA 及蛋白质的合成。

人类 mtDNA 的长度为 16 569 bp。其外环为重链(H 链),含有较多的鸟嘌呤,内环为轻链(L 链),含较多互补的胞嘧啶。两条链均具有编码功能,含有 37 个基因,分别编码 2 种 rRNA、22 种 tRNA 和 13 种蛋白质。基因的排列比较紧密,仅被少数(或无)非编码序列隔开。

第三节 RNA 的结构与功能

RNA 由核糖核苷酸通过 3' 5'-磷酸二酯键连接而成。与 DNA 相比,RNA 在结构和功能上有自己独特之处(表 1-3)。虽然 DNA 是遗传的物质基础,但对于某些病毒来说,它们的遗传信息是贮存在 RNA 分子中的。原核和真核生物都含有三类基本的 RNA:信使 RNA(messenger RNA, mRNA)、转运 RNA(transfer RNA, tRNA)和核糖体 RNA(ribosomal RNA, rRNA)。在真核生物中,还含有另外一些少量的 RNA(表 1-4)。

表 1-3 RNA 与 DNA 的比较

	RNA	DNA
碱基	A、G、C、U	A、G、C、T
戊糖	β -D-核糖	β -D-2 脱氧核糖
碱基含量	A 与 U 的含量不一定相同 G 与 C 的含量也不一定相同	A = T G = C
碱基互补配对	A 与 U, G 与 C	A 与 T, G 与 C
分子大小	不等, 从几十至数千个核苷酸	因物种不同而异, 但较 RNA 大得多
结构	单链, 局部互补配对形成双螺旋	双链, 形成双螺旋结构
功能	多样, 涉及遗传信息表达的各个方面	携带遗传信息

表 1-4 真核细胞内 RNA 的种类及功能

种 类	细胞定位	英文缩写	分子大小及沉降系数/S*	功 能
信使 RNA	胞质及细胞核	mRNA	取决于编码蛋白质的大小, 1 000 ~ 10 000 个核苷酸	蛋白质合成的模板
转运 RNA	胞质及细胞核	tRNA	4S, 74 ~ 95 个核苷酸	转运氨基酸
线粒体 RNA	线粒体	mt tRNA	3.2 ~ 4S	
核糖体 RNA	胞质及细胞核	rRNA	28 S, 5 400 个核苷酸 18 S, 2 100 个核苷酸 5.8 S, 160 个核苷酸 5S, 120 个核苷酸	与蛋白质共同构成核糖体
	线粒体	mt rRNA	16S, 1 650 个核苷酸 12S, 1 100 个核苷酸	
不均一核 RNA	胞质及细胞核	hnRNA		成熟 mRNA 及其他 RNA 的前体
小核 RNA	胞质及细胞核	snRNA	100 ~ 300 个核苷酸	参与 hnRNA 的剪接、转运
小核仁 RNA	胞质及细胞核	snoRNA		rRNA 的加工与修饰
小胞质 RNA	胞质及粗面内质网	scRNA/7SL-RNA	129 个核苷酸	信号识别颗粒的组成成分, 选择分泌蛋白

* : S (Svedberg unit) 反应大分子物质在超速离心时沉降速率的一个单位, 可间接反应相对分子质量的大小。

一、信使 RNA

顾名思义, 信使 RNA (mRNA) 的作用就好像是信使, 将存在于细胞核内基因的遗传信息转移到细胞质中, 作为模板指导蛋白质的合成 (见第十四章)。mRNA 的分子大小差别很大, 在不同的细胞及组织中, mRNA 的种类也大相径庭, 这主要是由转录出 mRNA 的相应基因的长短和种类决定的。在各种 RNA 分子中, mRNA 的半衰期最短, 从几分钟到数小时不等。原核和真核生物的 mRNA 在结构上存在很大的差别, 这里主要介绍真核生物 mRNA 的结构特征。

真核生物的 mRNA 并不是细胞核内 DNA 转录的直接产物, 它的前身称为不均一核 RNA (heterogenous nuclear RNA, hnRNA)。hnRNA 分子比 mRNA 要大得多, 在核内经过一系列的剪接、修饰和加工, 成为成熟的 mRNA 并转移到细胞质中 (见第十三章)。成熟的 mRNA 由翻译区和非翻译区构成, 它们具有独特的

结构特征(图 1-13)：

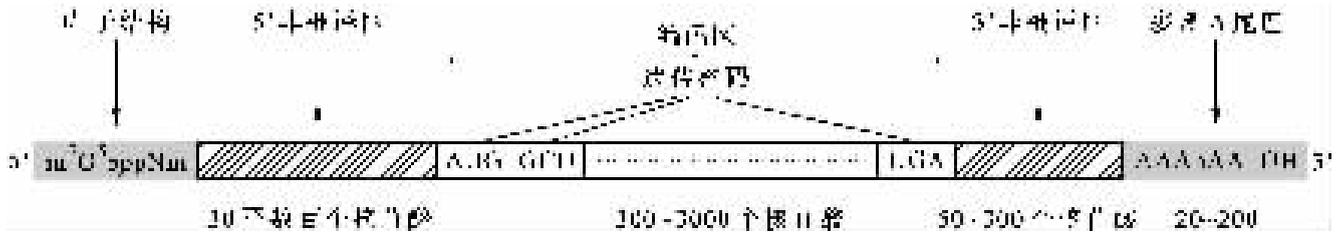


图 1-13 真核生物成熟 mRNA 的结构示意图

(1) 绝大多数真核细胞 mRNA 在 5'-端有一个含有 7-甲基鸟苷的特殊结构 $m^7G-5'ppp5'-Nm-3'-p$ 称为帽子结构。帽子结构与蛋白质合成的正确起始有关,它被核糖体识别并结合,有利于 mRNA 最初翻译的准确性,同时可以增强 mRNA 的稳定性,防止被 5'-磷酸外切酶降解。

(2) 大多数真核 mRNA 的 3'-端有一段长约 20~250 个核苷酸的多聚腺苷酸 (poly A) 称为多聚 A 尾巴 (poly A tail)。它是在转录后经多聚腺苷酸聚合酶的催化作用下添加上去的,并随着 mRNA 存在时间的延续而逐渐变短。poly A 的功能还未完全了解,目前认为它与 mRNA 从细胞核向细胞质的转移有关,并可防止 mRNA 被 3'-核酸外切酶降解,维持其在细胞内的稳定性。

mRNA 的功能是作为蛋白质合成的直接模板。以碱基排列顺序的方式贮存在 DNA 上的遗传信息,按照碱基互补原则,抄录到 mRNA 上并从核内转移到核外,然后通过遗传密码 (genetic code),将碱基顺序翻译成特定的氨基酸排列顺序,合成具有一定功能的蛋白质。由此可见,遗传密码是沟通碱基序列和氨基酸顺序的桥梁,它是指 mRNA 分子上的每三个核苷酸为一组,可以决定多肽链上某一个氨基酸,又称为三联体密码 (triple code)。

二、转运 RNA

转运 RNA 约占细胞中 RNA 总量的 10%~15%,是相对分子质量最小的一类核酸,由 74~95 个核苷酸构成。tRNA 的功能是转运氨基酸,按照 mRNA 上的遗传密码的顺序将特定的氨基酸运到核糖体进行蛋白质的合成。细胞内 tRNA 的种类很多,对于蛋白质合成所需的 20 种氨基酸,每种氨基酸都至少有一种 tRNA 与其相对应。虽然各种 tRNA 的核苷酸顺序不尽相同,但它们具有以下一些共同的特征。

(1) tRNA 分子中含有 10%~20% 的稀有碱基,包括双氢尿嘧啶 (DHU)、假尿嘧啶 (Ψ , pseudouridine) 和甲基化的嘌呤 (m^A, m^G) 等(图 1-14)。这些稀有碱基多分布在 tRNA 分子的非配对区。它们可以影响 tRNA 的结构及稳定性,但对 tRNA 发挥其功能并不是必需的。

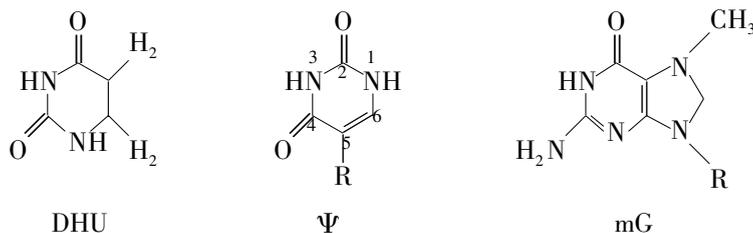


图 1-14 tRNA 中的部分稀有碱基

(2) tRNA 分子的一级结构中存在一些能局部互补配对的核苷酸序列,可以形成局部双链,使 tRNA 的二级结构呈三叶草形 (cloverleaf)。局部配对的双链构成叶柄 (stem),中间不能配对的区域部分则膨出形成环状 (loop),好像三叶草的三片小叶(图 1-15)。三叶草形结构由 DHU 环、反密码环、额外环、T Ψ 环和氨基酸臂等五部分组成。DHU 环和 T Ψ 环是根据其含有的稀有碱基而命名。反密码环中间的三个碱基

称为反密码子(anticodon),可识别 mRNA 上相应的三联体密码并与之互补配对。例如,负责转运色氨酸的 tRNA(tRNA^{Trp})的反密码子 5'-CCA-3'与 mRNA 上相应的三联体密码 5'-UGG-3'反向互补。tRNA 的特异性取决于它的反密码子,借助此反密码子,在蛋白质的生物合成过程中,与反密码子互补的 mRNA 三联体密码才能识别氨基酸。氨基酸臂由碱基配对形成的茎和 3'-末端未配对序列组成,3'-末端序列总是 CCA(5'→3'),氨基酸就是与腺苷酸残基(A)C3'-OH 形成酯键而连接在 tRNA 上。不同的 tRNA 的核苷酸数目不等,这是因为它们的额外环的大小不同,也是 tRNA 分类的重要指标。

(3) tRNA 的三级结构呈“倒 L”形(图 1-15)。在倒 L 形结构中,氨基酸臂和 T ψ 臂组成一个双螺旋, DHU 臂和反密码子臂形成另一个近似联系的双螺旋,这两个双螺旋构成倒“L”的形状。连接氨基酸的 3'-末端远离与 mRNA 配对的反密码子,这个结构特点与它们在蛋白质合成中的作用有关。

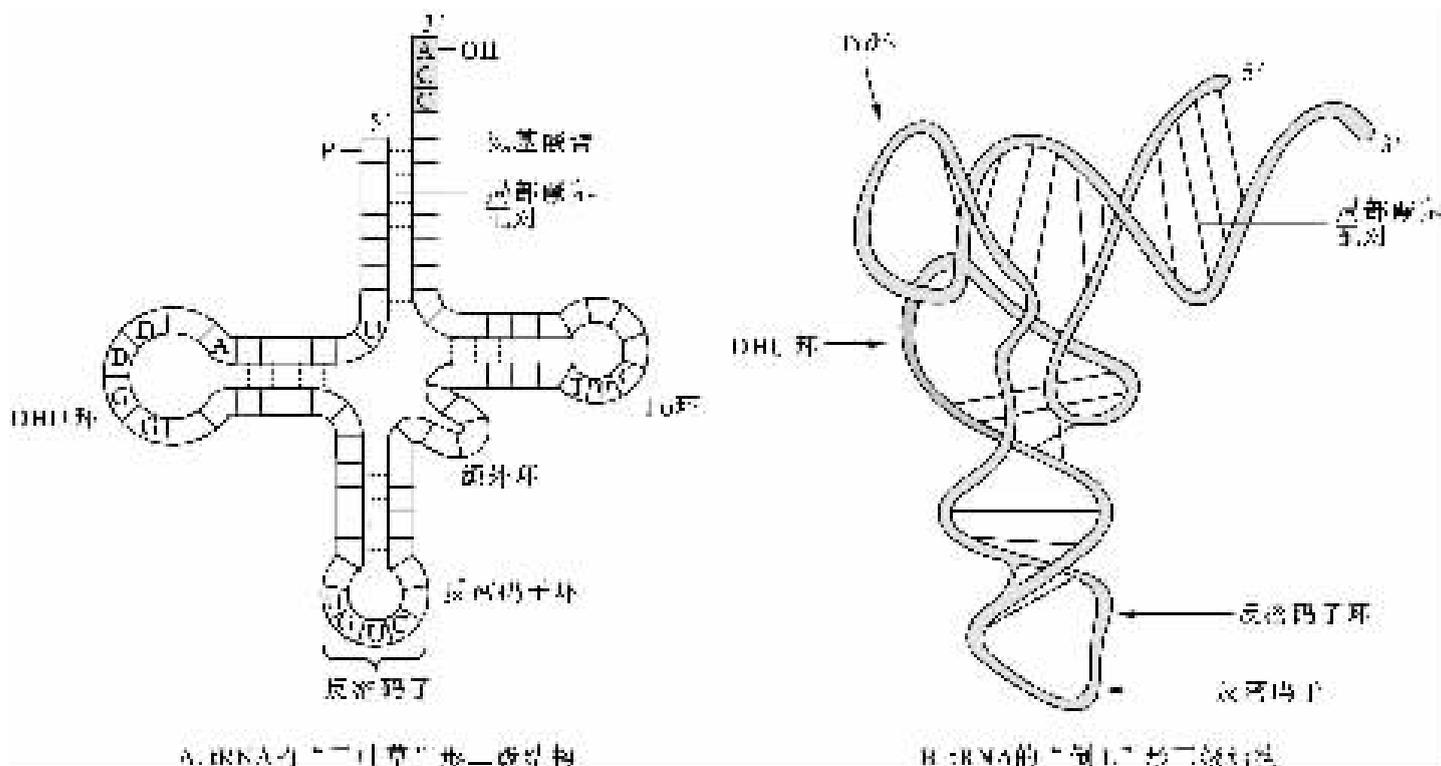


图 1-15 tRNA 的空间结构示意图

三、核糖体 RNA

核糖体 RNA(rRNA)是细胞内含量最多的 RNA,约占 RNA 总量的 75% ~ 80%。rRNA 与蛋白质共同构成核糖体或称为核蛋白体(ribosome),是细胞内蛋白质生物合成的场所。原核生物与真核生物的核糖体均由大亚基和小亚基构成,平时两个亚基分别游离存在于细胞质中,在进行蛋白质合成时聚合成为核糖体,蛋白质合成结束后又重新解聚。

真核生物的核糖体的沉降速率为 80 S,由 40 S 小亚基和 60 S 大亚基构成,小亚基由 18S rRNA 和 30 多种蛋白质构成,5 S、5.8 S 和 28 S 三种 rRNA 加上 50 余种蛋白质构成大亚基。

原核生物的核糖体(70 S)由 5 S、16 S、23 S 三种 RNA 和几十种核糖体蛋白构成。其中 5 S、23 S rRNA 和 30 多种蛋白质构成大亚基(50 S),16 S rRNA 与 20 多种蛋白质构成小亚基(30 S)(表 1-5)。

各种 rRNA 的碱基序列测定均已完成,rRNA 一级结构的一个特征就是甲基化残基的存在,主要的修饰位点在 β -D-核糖的 C2'-OH。二级结构的模型也已构建出来,rRNA 分子内部局部碱基互补,形成许多“茎-环”结构(图 1-16),为核糖体蛋白的结合与组装提供结构基础。rRNA 的功能还未完全清楚,但它们对于核糖体的组装是必需的,并参与 mRNA 与核糖体的结合及多肽链的合成过程。最近的研究表

表 1-5 原核及真核生物核糖体的组成

核糖体	亚单位	rRNA	蛋白质
原核生物(70 S)	小亚基(30 S)	16 S rRNA	21 种
	大亚基(50 S)	5 S rRNA	31 种
真核生物(80 S)	小亚基(40 S)	23 S rRNA	33 种
		18 S rRNA	
	大亚基(60 S)	5 S rRNA	49 种
		5.8 S rRNA	
		28 S rRNA	

明, rRNA 还具有催化活性, 可以加快肽键的形成。

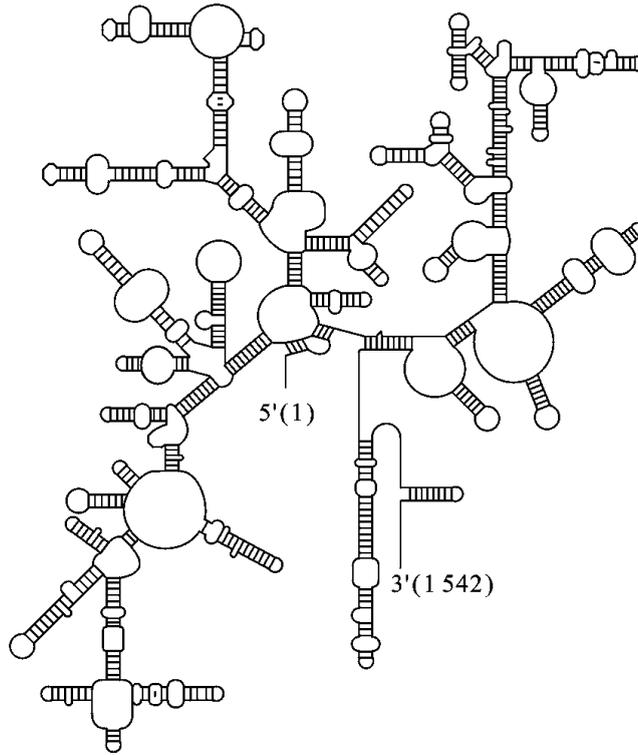


图 1-16 原核生物 16 S rRNA 的二级结构

第四节 核酸的理化性质

一、核酸的一般性质

核酸溶液的黏度比较大, 特别是 DNA。因为 DNA 是线形高分子化合物, 在水溶液中表现出极高的黏性。RNA 分子远远小于 DNA, 所以黏度要小得多。核酸黏度降低或消失, 即意味着变性或降解。DNA 分子的长度与直径之比达到 10^7 , 极易在机械力的作用下发生断裂, 所以在提取细胞的基因组 DNA 时, 要避免剧烈的振荡。

溶液中的核酸分子在引力场中可以下沉, 这是核酸的沉降特性。不同构象的核酸(线形、开环、闭环、超螺旋结构)在超速离心机的强大引力场中, 沉降的速率存在很大的差异, 所以可以用超速离心法纯化核酸, 分离不同构象的核酸, 或者测定核酸的沉降系数和相对分子质量。

二、核酸的紫外吸收

嘌呤和嘧啶碱基具有共轭双键,因此核苷、核苷酸及核酸具有可以吸收紫外光的性质,最大吸收峰位于波长 260 nm 附近,因此人们经常用 A_{260} (在 260 nm 处的吸光度)表示核酸的浓度。鉴于核酸的紫外吸收特性,可以用紫外分光光度法对 DNA 和 RNA 进行定性和定量分析。

三、核酸的变性与复性

(一) 变性

核酸的变性(denaturation)是指核酸的互补碱基之间的氢键断裂。核酸变性时,构成磷酸-戊糖骨架的 3' 5'-磷酸二酯键并未发生变化,3' 5'-磷酸二酯键断裂意味着核酸的降解。对于 DNA 来说,发生变性时,DNA 双螺旋解体,变成两条单链;而 RNA 分子内部形成的局部双链也被破坏,使 RNA 失去原有的空间结构。

温度升高,溶液的盐浓度降低,或者溶液的酸碱度改变,都可以使核酸发生变性。实验室中最常用的使 DNA 分子变性的方法之一是加热。伴随着 DNA 分子的热变性,会发生一系列物理化学性质的改变: A_{260} 增高,黏度降低,浮力密度升高,酸碱滴定曲线改变等,同时失去生物活性。其中,当 DNA 变性时, A_{260} 随之增高,这种现象称为 DNA 的增色效应(hyperchromic effect)。如果在加热 DNA 的过程中,以温度为横坐标,测得的 A_{260} 为纵坐标作图,所得到的曲线称为 DNA 的解链曲线(图 1-17)。从曲线中可以看出,DNA 的变性作用发生在一个相当窄的温度范围内。通常将 A_{260} 达到最大值的一半时的温度称为 DNA 的解链温度(melting temperature),以 T_m 表示。在 T_m 时,DNA 分子内 50% 的双螺旋结构解体。DNA 的 T_m 值的大小与其碱基构成及介质中的离子强度有关:G+C 的比例越高, T_m 值越大,因为 G-C 配对会形成三个氢键,而 A-T 配对只有两个氢键;介质中的离子强度越高, T_m 值也越大。DNA 的 T_m 值可以根据其 G-C 含量计算,计算公式为: T_m 值 = $69.3 + 41(G + C)\%$,少于 20 个碱基的寡核苷酸的 $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$ 。

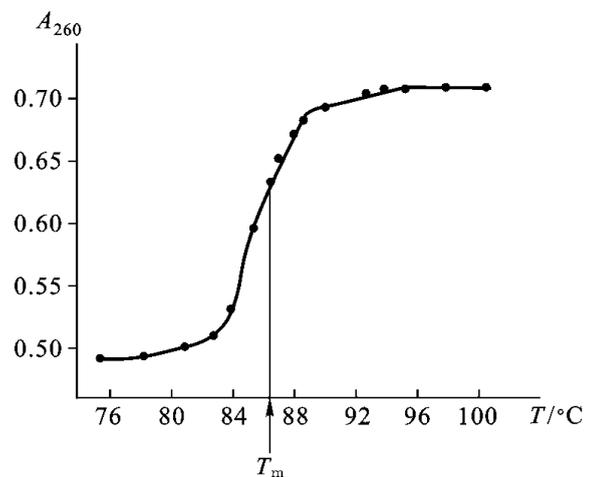


图 1-17 DNA 的解链曲线

(二) 复性与杂交

变性 DNA 在适当条件下,两条互补的单链重新缔合,恢复天然的双螺旋结构,这个过程称为复性(renaturation)。热变性的 DNA 在缓慢冷却时,可以复性,这一过程也称为退火(annealing)。DNA 的片段越大,复性则越慢;DNA 的浓度越大,复性则越快。若将热变性的 DNA 骤然冷却,则 DNA 不可能复性。这一特性可被用来保持变性 DNA 的单链状态。

将不同来源的 DNA 分子放在同一溶液里,经热变性后缓慢冷却,使其复性。若这些不同来源的变性 DNA 单链之间在某些区域有碱基互补的序列,则复性时,它们之间会形成双链,该过程称为核酸分子杂交(hybridization)(图 1-18)。这种现象也会发生在碱基序列互补的单链 DNA 与 RNA 分子之间。杂交技术充分利用核酸的变性与复性的特性,DNA-DNA,DNA-RNA 之间的分子杂交在分子生物学和分子遗传学中的应用十分广泛,已成为生命科学研究不可缺少的技术之一,也是基因诊断最常用的基本技术。

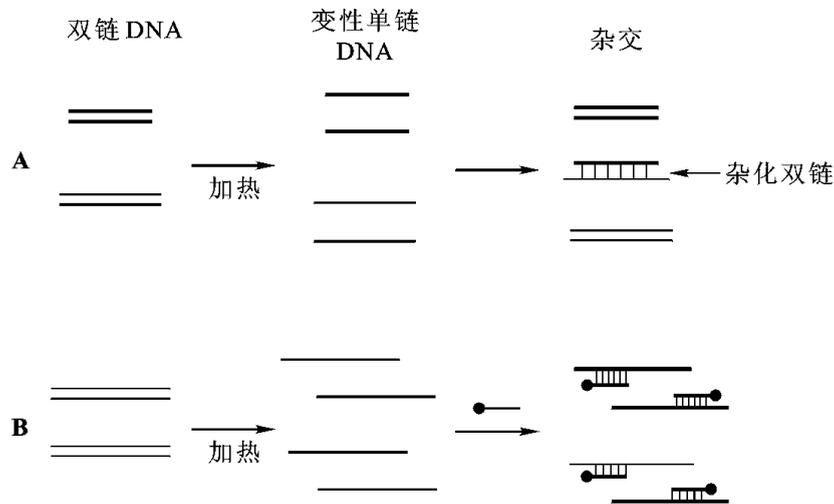


图 1-18 核酸分子杂交原理示意图

- A. 不同来源的 DNA 分子(分别用粗线和细线表示)在加热变性后的复性过程中可以形成杂化双链;
- B. 经标记的寡核苷酸(●)与变性后的单链 DNA 互补结合

第五节 核酸的催化性质

生物体内的各种化学反应几乎都是在生物催化剂的催化作用下进行的。从 20 世纪初发现第一个具有催化活性的蛋白质以来,人们普遍认为蛋白质是生物体内的催化剂,并称它们为酶(参见第五章酶)。直到 20 世纪 80 年代初,在研究 rRNA 的转录后加工时,才发现 RNA 也有催化性质,随后又发现了有催化功能的 DNA 分子。这些有催化活性的核酸分子的发现,不但大大拓展了酶学的研究范围,还对生命的起源和进化研究有重大意义。

一、核酶

核酶(ribozyme)是指一类具有催化作用的 RNA。1981 年 Thomas Cech 在研究四膜虫的 rRNA 剪接时,发现 rRNA 的剪接不需要任何蛋白质的参与仍可完成,说明 RNA 有自身催化作用。随后 Sidney Altman 也发现 RNA 酶 P(RNase P)中的 RNA 部分能够剪切 tRNA 前体 5' 端并催化其成熟。由于这些 RNA 分子具有类似酶的功能,其化学本质为核酸,所以将它们称为核酶。

目前已知核酶所催化的反应主要包括磷酸二酯键的断裂及连接,绝大部分涉及 RNA 的加工和成熟。根据它们的作用机制,核酶主要有四类(1)内含子的自我剪接型,如四膜虫 rRNA 的加工(2)异体催化的剪切型,如 RNase P 催化 tRNA 的成熟(3)自体催化的剪切型,如某些植物病毒从大分子多聚前体生成单个基因组 RNA 分子的过程(4)催化肽键的形成,如一些细菌的核糖体大亚基 rRNA。

许多 RNA 分子的二级结构中都有内部碱基配对形成的局部双链区,这是 RNA 具有催化作用的结构依据。其中一个最简单且最具有代表性的结构就是锤头结构(hammerhead structure)。含有锤头结构的核酶由一条 RNA 链构成,同一分子上包括有催化部分和底物部分。其结构特点是至少有 3 个茎(stem),1~3 个环(loop),含有 GU 序列的剪切位点以及高度保守的一致性序列(图 1-19)。根据锤头核酶的概念人工设计的核酶是由两条分离的 RNA 链构成。其中一

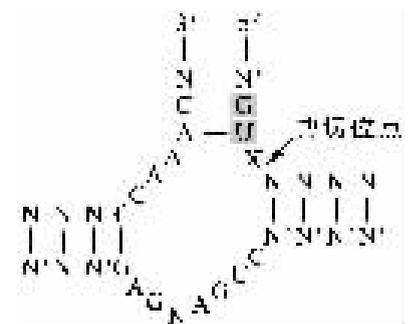


图 1-19 锤头核酶二级结构示意图
N 表示任意碱基, N' 表示与其互补的碱基, X 表示除 G 以外的任何碱基, A、G、C、U 表示一致性序列

条为人工合成的小片段 RNA ,另一条为要破坏其结构的 RNA 或 DNA 分子 ,二者局部碱基互补 ,形成锤头结构 ,即可将目的核酸分子剪切(图 1-20)。

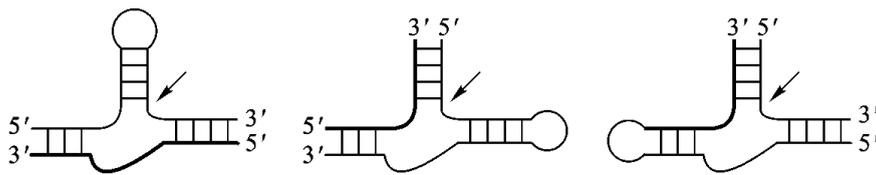


图 1-20 人工设计的核酶可能作用的方式

箭头表示剪切位点 ,粗线代表人工合成的 RNA 片段 ,细线代表欲破坏的目的核酸分子

核酶的发现和深入研究极大地改变了我们对生命起源和进化的概念 ,并拓展了酶学研究范围。首先 ,现在我们认识到 ,RNA 既是催化剂 ,又可携带遗传信息。这预言了一个存在于生物进化初期的 RNA 世界 :即最早的生物完全是由 RNA 构成的 ,DNA 及蛋白质的出现晚于 RNA。其次 ,核酶的发现对传统酶学提出了挑战。从 20 世纪初结晶出第一个生物催化剂以来 ,人们普遍认为生物体内的催化剂——酶的化学本质是蛋白质。核酶的发现极大地丰富了酶学的研究内容。第三 ,许多病毒包括人类的病原体 ,是 RNA 病毒 ,其遗传信息贮存在 RNA 分子中 ,并发现其中一些病毒 RNA 具有催化活性。那么这就为发现 RNA 药物提供了机会。最后 ,更具有现实意义的是 ,通过人工设计核酶 ,在科学研究上将目的核酸分子切成特异的片段 ,这已得到广泛应用 ;在医学上 ,可以通过破坏病原微生物 ,如一些 RNA 病毒 ,以及破坏某些致病基因或癌基因 ,从而达到治疗疾病的目的。但由于核酶具有不稳定性及切割效率低的缺点 ,要使其能够在体内广泛应用 ,还需要进一步加深对核酶的认识。

二、脱氧核酶

具有特定生物催化功能的 DNA 分子称为脱氧核酶(deoxyribozyme)或酶性 DNA(DNA enzyme , DNAzyme)。1994 年以来 ,人们合成了多种脱氧核酶。这是生命科学史上的又一个重要的里程碑 ,充分说明 DNA 并不只是性质不活泼的遗传信息的载体。

根据它们的催化功能 ,脱氧核酶主要分为以下几类 (1) 剪切 RNA 分子 :与剪切 RNA 的核酶相比 ,脱氧核酶的性质相对稳定 ,催化反应受理化因素的影响较小 ,并且脱氧核酶的相对分子质量较小 ,结构相对简单 ,与目的 RNA 分子结合较好 ,剪切速率较快 (2) 剪切 DNA 分子 (3) 催化核酸分子磷酸化 :它们能把 NTP 或 dNTP 上的 γ -磷酸基团转移到单链 DNA 或 RNA 分子的 5' 末端 ,使其磷酸化 ,以便于 DNA 或 RNA 分子的自身连接或进行其他操作 (4) 连接 DNA 分子 :在 ATP 的参与下 ,能催化两个不同的 DNA 分子通过 3' ,5'-磷酸二酯键连接起来 (5) 催化卟啉与金属离子结合。

脱氧核酶的发现 ,对研究生命起源具有重大意义。20 世纪 80 年代初发现核酶后 ,人们认为 RNA 是最先起源的生命物质 ,现在发现了 DNA 也具有催化活性 ,由于 DNA 的复制能力与稳定性均远远大于 RNA ,因而提出了最早起源的生命物质是 DNA 还是 RNA 的新课题。此外 ,脱氧核酶的发现是人们继认识蛋白质和 RNA 之后 ,对酶的化学本质认识的第三次飞跃。最后 ,与核酶一样 ,脱氧核酶的重要意义在于利用它们可以破坏核酸分子的性质 ,来达到抗病毒 ,治疗肿瘤及遗传性疾病的目的。

第六节 基因组学与人类基因组计划

基因的概念首先是由 Wilhelm Johannsen 于 1889 年提出。基因是指位于染色体的特定位置、编码特异的蛋白质或 RNA 的一段核酸序列(通常是 DNA 序列) ,是遗传物质的结构和功能单位。基因组代表了一个生物细胞内的全部基因和染色体组成。

1986年美国科学家 Thomas Roderick 提出了基因组学(Genomics),指对所有基因进行基因组作图(包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱)核苷酸序列分析,基因定位和基因功能分析的一门科学。基因组学包括两方面的内容:以全基因组测序为目标的结构基因组学(structural genomics)和以基因功能鉴定为目标的功能基因组学(functional genomics)。基因组学的研究成果对于人类认识自然和人类本身,阐明所有生物的生命活动的分子基础,具有十分重要的意义。

一、真核生物基因组的特点

真核生物基因组与原核生物基因组比较有很大的差异,有其自身的特点,归纳如下。

(1) 真核生物基因组远大于原核生物的基因组,如哺乳类动物基因组 DNA 约 3×10^9 bp。真核生物基因组 DNA 与蛋白质结合形成染色体,储存于细胞核内,除配子细胞外,体细胞内的基因组是双份的(即双倍体, diploid),即有两份同源的基因组。原核生物基因组较小,没有核膜包裹,且形式多样,如大肠杆菌基因组仅由 4×10^6 bp 组成,约含 4 200 个基因。细菌染色体基因组则常为裸露的环状双链 DNA 分子,并与其中央的 RNA 和支架蛋白构成一致密的区域,称为类核。

(2) 真核生物基因占整个基因组的比例很小,基因组中非编码序列远远多于编码序列,非编码序列可占 80%~90%。如哺乳动物约含 30 000 个~40 000 个基因,只占整个基因组的 5% 左右。原核生物的 DNA 分子绝大部分用于编码蛋白质,只有一小部分是不翻译的,不翻译区(又称间隔区)通常包含控制基因表达的序列。病毒基因组具有重叠基因(overlapping gene)的结构,即多个基因在同一 DNA 分子上部分或完全重叠,该 DNA 序列能够编码两种甚至三种蛋白质分子,而真核基因组及细菌的基因组没有这种结构。

(3) 真核细胞基因转录产物为单顺反子 mRNA,即一个结构基因转录生成一个 mRNA 分子,经翻译生成一条多肽链。原核生物功能相关的几个结构基因常常串联在一起,受一套调控基因的调节,组成操纵子(operon)结构,并转录生成同一个 mRNA 分子,称为多顺反子 mRNA(polycistronic mRNA),作为多种蛋白质合成的模板。

(4) 真核生物存在大量重复序列,即在整个基因组中有许多重复出现的核苷酸序列,重复序列长短不一,短的仅含两个核苷酸,长的多达数百、乃至上千个。重复频率也不尽相同:高度重复序列重复频率可达 10^6 次,包括卫星 DNA(散在于基因组中的一些小片段的重复序列)、反向重复(inverted repeat)

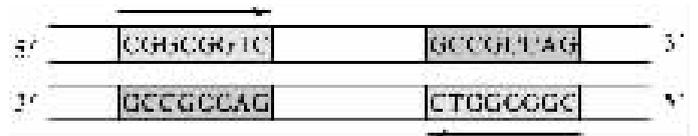


图 1-21 反向重复序列

序列(也称回纹结构,图 1-21,见第十三章第二节)和较复杂的重复单位组成的重复序列;中度重复序列重复频率为 $10^3 \sim 10^4$ 次,一些编码区序列如 rRNA 基因、tRNA 基因、组蛋白基因等都属于这类重复序列;单拷贝或低度重复序列,指在整个基因组中只出现一次或很少几次的核苷酸序列,包括编码蛋白质的结构基因以及基因的间隔序列。重复序列有种属特异性以及个体差异,基因组越大,重复序列越多。

重复序列在基因组中可以是串联存在于 DNA 分子上,也可以是散布在整个基因组中;可以是编码序列,也可以是非编码序列。重复序列是由模板序列通过复制、扩增和/或转座形成,其功能尚不清楚。

(5) 真核生物基因是不连续的,其结构基因内部存在许多不编码蛋白质的间隔序列,称为内含子(intron),编码序列则称为外显子(exon)。内含子与外显子相间排列,转录时一起被转录下来,然后 RNA 中的内含子经一定规律的剪接机制被切掉,外显子连接在一起形成成熟的 mRNA,作为指导蛋白质合成的模板。不同的转录后加工与修饰方式,可以形成不同的 mRNA,翻译出不同的多肽链。原核生物的基因是连续的,基因内部没有非编码序列。

二、人类基因组计划

要探索人类自身的奥秘,就要从分子水平上发现人类所有基因,阐明各种基因的功能,从而从整体上破译人类的遗传信息。因此,20世纪80年代后期兴起的人类基因组计划(HGP)是当前国际生命科学领域内一项引人注目的工程,与“曼哈顿原子弹计划”、“阿波罗登月计划”一起被誉为20世纪人类自然科学史上的三大系统工程。它对于人类认识自身,推动生命科学、医学以及制药产业等的发展,具有极其重大的意义。

人类基因组计划蓝图是由美国科学家 Renato Dulbecco 于1986年3月7日在《Science》上发表的短文中首先提出的。1990年10月经美国国会批准,人类基因组计划正式启动。其目标是在15年时间内(1990—2005年)内至少投入30亿美元,完成人类全部46条染色体的 3×10^9 bp核苷酸序列分析。此后,德国、日本、英国、法国等国家的科学家也先后正式加入该计划。我国于1999年9月获准加入这项计划,负责测定人类基因组全部序列的1%,是参与这一研究计划的唯一发展中国家。

(一) 人类基因组计划的研究内容

人类基因组计划的头等任务是对人类基因组的长达 3×10^9 bp的核苷酸序列进行测定。当前,没有技术可能从头到尾地一次性测出如此长的序列,于是人们就像描绘一条高速公路那样,寻找标志物,建立里程碑和路标,并以此为基础,最后描绘出其全程。人类基因组作图包括遗传图谱、物理图谱、转录图谱及基因组序列分析。

(1) 遗传图谱 遗传图谱(genetic map)又称连锁图谱(linkage map),是表示基因或DNA标志在染色体上的相对位置与遗传距离的基因组图,反映染色体上两点之间的连锁关系。遗传图谱是以细胞减数分裂时同源染色体发生交换的DNA区段为标记的。由于两个连锁基因在染色体上所处位置之间的距离(遗传距离)与它们在每次减数分裂时因交换而重组的频率成正比,因此,遗传距离通常以基因或DNA片段在染色体交换过程中的重组频率来表示。发生1%交换率的遗传距离为1厘摩(cM, 1cM = 1 000 kb),以此作为遗传标记,绘出一个家族的遗传图谱。根据遗传图谱,如果想确定与某种已知疾病有关的基因,即可根据决定疾病性状的位点与选定的遗传标记间的遗传距离,来确定与疾病相关的基因在基因组中的位置。遗传图谱在1994年已经提前完成。两年后,遗传图谱的密度提高到每600 kb一个标记。尽管如此,此分辨率和精确性还是不能用于基因组全序列的分析。于是,人们提出物理图谱。

(2) 物理图谱 物理图谱(physical map)指DNA序列上两点之间的实际距离。其目标是在基因组中每100 kb设一个标志点(即“路标”),即至少设立3万个“路标”。最满意的方法是通过PCR或分子杂交将小段DNA序列(称为序列标记位点,sequencing tagged site,STS)定位于基因组的DNA区段上。以此STS为“路标”,并以DNA的实际长度(bp, kb, Mb)为“图距”绘制基因组的物理图谱。物理图谱是进行DNA序列分析和基因组结构研究的基础。1998年完成的物理图谱含有52 000个STS,标志着该目标已经实现。

(3) 转录图谱 转录图谱(transcription map)又称cDNA(互补DNA, complementary DNA)计划,是以表达序列标签(expression sequence tag, EST)为标志绘制的图谱。人类基因组中只有2%~3%的DNA序列具有编码蛋白质的功能。在人体某一特定的组织中仅有10%的基因被表达。如果将这些基因转录生成的mRNA通过一种反转录的过程获得其相应的cDNA序列,并以此作为EST。在获得足够多的EST序列后,对这些EST片段进行染色体定位,最终绘制成一张可表达的基因图——转录图谱。有了这张转录图谱,我们就可以了解不同基因在不同的时间、不同组织的表达情况,以及正常与异常状况下基因表达的差异。来自不同组织和器官的EST可为基因的功能研究提供有价值的信息,为基因鉴定提供候选基因。目前已测定的人基因组的EST达533万条以上,并且数量还在不断快速增加。

(4) 基因组序列分析 人类基因组计划最终要测定出由 3×10^9 对核苷酸组成的人基因组DNA的全部序列。随着全新测序技术与策略的参与,这项工作的进度大大加快,已远远超越了原定计划的时间表。

2000年6月26日,包括我国在内的、参与人类基因组计划的六国科学家同时宣布完成了人类基因组序列的“工作框架图”2001年2月发表了经过整理、分类和排列的基因组“精细图”及初步分析结果2003年4月科学家们又宣布完成了人类基因组的完整图谱。至此,人类基因组计划的全部目标比预期提前2年完成。

人类基因组计划的直接始动因素就是要从整体上,而不是零敲碎打地解决包括肿瘤在内的人类疾病的分子遗传学问题。在进行全基因组分析的同时,分离和鉴定具有重要生物学功能以及与重大疾病相关的基因是人类基因组计划的核心部分。目前,科学家们已经鉴定了超过15 000个基因。对这些基因进行功能分析,可以为基因诊断、基因治疗及药物开发奠定基础。

人类基因组计划还包括对模式生物基因组的作图与测序。通过对比较简单的模式生物基因组的了解,建立技术,积累经验,为人类基因的功能鉴定提供线索。目前对大肠杆菌、酵母、线虫、果蝇及小鼠等五种重点模式生物基因组的测序已经完成,我国还自行完成了禾本植物的模式生物——水稻基因组的测序。

人类基因组计划的完成离不开对大量生物信息的储存、处理、分析及利用。人类基因组计划以产出大规模序列信息为基本特征,分子生物信息数据以爆炸性速率增长。因此,人类基因组计划一开始就与信息高速公路和数据库技术同步发展。迄今,国际上三个大的生物信息中心,即美国的国家生物技术信息中心(NCBI)、欧洲生物信息学研究所(EBI)和日本信息生物学中心已经分别建立了Genbank、EMBL和DDBJ等大型数据库,储存了源自数百种生物的DNA序列。通过互联网,全世界的研究者均可以直接进入这些数据库对序列信息进行查询、搜索、比较、分析,或者输送有关的基因信息数据。

值得注意的是,人类基因组计划本身就与许多社会价值问题纠缠在一起。因此,人类基因组计划一开始就包含了一个子计划,专门研究人类基因组计划的伦理、法律和社会问题(ethical, legal, and social issues or implications, ELSI)。这是世界上最大的生命伦理学计划,主要的研究问题包括基因信息利用的公平性问题、隐私和保密问题、遗传检测和人口普查问题、生殖问题、基因工程运用中的公平性问题、产品的商业化问题及与人类责任有关的概念和哲学蕴含的问题等。这些问题的研究对人类基因组计划的健康发展,对于医学有关的公共政策的制定以及公众正确理解人类基因组计划都有重要的意义。

除此之外,人类基因组计划的研究内容还包括基因组研究技术的建立、创新与改进,研究人员的培训,技术转让和产业开发,以及其他一些相关课题的研究等。

(二) 人类基因组研究计划的价值

人类基因组研究具有重大的科学价值,人类基因组的破译和解读将导致新的医学革命和生物学革命,并对人类社会产生积极的影响。

人类基因组计划的重要作用首先体现在与人类生命息息相关的医学领域,它将人类感知生命的里程提高到分子水平阶段。人类基因组图谱的确定将大大加速人们对疾病基因的鉴定。

人类基因组研究将促进生物学的发展。该计划的实施将极大地促进生命科学领域一系列基础研究的发展,阐明基因的结构与功能关系,细胞的发育、生长、分化的分子机理,疾病发生的机制等。人类基因组的研究将有利于理解生物是如何进化的。如果我们知道了人类和其他生物基因的全序列,就可以追溯出人类多数基因的起源。

人类基因组的研究将促进生命科学与信息科学相结合,刺激相关学科的发展。生物信息学(bioinformatics)和计算生物学就是在HGP带动下产生的新兴学科。

除了科学价值外,人类基因组研究还具有重大的经济价值,医药、保健、农业和食品制造等产业将率先因此发生革命性变革。随着基因组序列的解读和疾病基因的发现,科学家可以依据已知的基因序列和功能找出控制某种疾病的基因,并针对相应的靶位进行药物筛选,有望找到治疗心脑血管疾病、糖尿病、癌症等目前人类主要疾病的基因药物。

三、后基因组研究

人类基因组计划以测定人类基因组 DNA 全序列为目标,实际上属于结构基因组学的研究内容。随着该计划的完成,生命科学从此进入了后基因组时代(post genome era)。这一阶段的研究内容主要包括以基因功能鉴定、基因表达分析及突变检测为目标的功能基因组学,以及以分析基因编码产物——蛋白质的结构、功能和蛋白质群体内相互作用为目标的蛋白质组学(proteomics)。后基因组研究是人类基因组计划的继续和深入,它所取得的进展将彻底揭开生命的奥秘,推动医学、生物学等生命科学及相关学科的发展,创造巨大的社会与经济价值。

Summary

Nucleic acids are some kinds of biomacromolecules, which determine the genetic characteristics of all organisms. They contain the genetic information and are also responsible for its transmission. Nucleic acids, including DNA and RNA, are linear polymers of a limited number of monomers linked by 3' 5'-phosphodiester bond and the repeating units are nucleotides. A nucleotide is composed of a base, a pentose and a phosphate. In DNA, the sugar is a deoxyribose and the bases are adenine (A), thymine (T), guanine (G) and cytosine (C). While in RNA, the sugar is a ribose and another base, uracil (U), is used in place of thymine.

DNA is the molecule of heredity in all prokaryotic and eukaryotic organisms with the exception of some RNA viruses. The genetic information is encoded in the precise sequence of four types of deoxynucleotides or bases. All cellular DNA consists of two very long and helical polynucleotide chains coiled around a common axis. The two chains are held together by hydrogen bonds between pairs of bases: A is always paired with T, and G is always paired with C. Hence, one strand of the double helix is complementary to the other. The two strands run in opposite directions. Most prokaryotic organisms have circular DNA, which is superhelical. By contrast, the linear genomic DNA in eukaryotic organisms is compacted with a variety of proteins forming chromatin. The fundamental unit of chromatin is nucleosome.

Different from DNA, most RNA molecules are single stranded, but many contain extensive double-helical regions that arise from the folding of the chains into " stem-loop " or " hairpin " structures. Messenger RNAs (mRNAs) serve as templates for the synthesis of protein; they carry information from DNA to the cellular protein synthetic machinery. Transfer RNAs (tRNAs) transfer specific amino acids to ribosomes and ensure their proper alignment. Most RNAs in a cell are ribosomal RNAs (rRNAs) which, together with proteins, construct the ribosomes, the organelles for protein synthesis. Other RNAs in the cell are important in RNA processing and in protein exportation from the cell.

One of the most important physical and chemical characteristics of nucleic acid is its denaturation and renaturation, which means the double-stranded structure of DNA can be separated under some conditions, usually by increasing the temperature and separated strands will reassociate when the factors making DNA denaturation are withdrawn or the physiological temperature is achieved. As the temperature increases, concomitant with this denaturation of DNA molecule is an increase in the optical absorbance at 260nm (A_{260}) of the purine and pyrimidine bases — a phenomenon referred to as hyperchromic effect. The strands of a given molecule of DNA separate over a temperature range. The midpoint is called melting temperature (T_m), which is influenced by the base composition: DNA rich

in G – C pairs has a higher T_m than that rich in A-T pairs. At given conditions a particular polynucleotide strand will associate tightly with a complementary strand regardless of their origin and length. This technique named as hybridization has become an important basic tool of medicine and life science.

In the early 1980 's ,RNA was found to be biocatalytic and so was DNA in 1990 's. RNA and DNA molecules , which possess catalytic activities , are called ribozyme and deoxyribozyme respectively. Discovery of nucleic acid catalysis has greatly altered our concepts of biological evolution and the range of cellular chemistry and these nucleic acid catalysts will become useful research tools and play important roles in the therapies of some diseases ,such as cancer ,genetic disease and infective diseases.

The Human Genome Project (HGP) is an international conspicuous research effort in the field of life sciences. It had several goals including mapping ,sequencing ,and identifying genes ; storing and analyzing data ; and addressing the ethical ,legal ,and social issues (ELSI) that may arise from availability of personal genetic information. The ultimate goal of the HGP was to obtain the DNA sequence of the 3 billion DNA subunits present in human DNA. Technology and resources generated by the Human Genome Project and other genomics research are having a major impact on research across the life sciences. The potential for commercial development of genomics research presents global industry with a wealth of opportunities.

思 考 题

1. 名词解释

核酸分子杂交	T_m 值	增色效应	遗传密码
核酸一级结构	DNA 变性	核小体	HGP
DNA 双螺旋结构	ribozyme		

- 核酸彻底水解后可得到哪些成分？DNA 与 RNA 的水解产物有何不同？
- 简述 B – DNA 双螺旋结构要点。
- 已知某 DNA 双螺旋分子的其中一条链的 $[A] = 0.30$ $[G] = 0.24$,请计算出：(1) 同一条链中 $[C]$ 与 $[T]$ 的含量 (2) 其互补链中 $[A]$ $[G]$ $[C]$ $[T]$ 的含量
- RNA 主要有哪几类 ,功能各是什么？
- 核酸的紫外吸收是由哪些物质引起的？该性质有何生物学意义？
- 根据核酶和脱氧核酶的催化功能 ,各主要有几类？
- 试述真核生物基因组的特点。
- HGP 的研究内容主要有哪些 ,它有何研究价值？

(马文丽)

第二章 蛋白质

本章教学要求

- 蛋白质的基本组成单位氨基酸及其连接方式
- 蛋白质的一、二、三、四级结构 模体、结构域
- 蛋白质一级结构与空间结构和功能的关系
- 蛋白质的理化性质及其提取、纯化原理
- 蛋白质组和蛋白质组学

蛋白质(protein)是生物体含量丰富、功能复杂、种类繁多的生物大分子 ,约占人体干重的 45%。蛋白质是生命活动的物质基础 ,在人体内发挥特异的生物学作用。组织蛋白质作为细胞的构件 ,塑造细胞和组织 ;皮肤、骨骼、肌腱中的胶原蛋白 ,韧带中的弹性蛋白 ,毛发、指甲中的角蛋白等是体内起支持作用的主要结构蛋白质 ;酶是具有催化活性的蛋白质 ;血红蛋白、脂蛋白、运铁蛋白等具有运输功能 ;肌动蛋白等是机体各种机械运动的物质基础 ;免疫球蛋白、补体结合蛋白具有免疫保护作用 ;凝血酶原、纤维蛋白原等凝血因子可防止血管损伤时血液的流失 ;体内还存在许多具有调节功能的蛋白质 ,如某些激素、细胞受体 ,以及与细胞生长、分化、基因表达密切相关的调控蛋白等。此外 ,蛋白质还有许多其他功能 ,血浆清蛋白除具有物质运输、营养作用外 ,还是维持血浆胶体渗透压的重要物质 ,肌红蛋白贮氧 ,铁蛋白贮铁等。有些蛋白质的功能不甚明确 ,有待进一步研究。

第一节 蛋白质的基本组成单位及其连接方式

蛋白质经酸、碱或蛋白酶水解产生游离的氨基酸。其中 ,水解仅生成氨基酸的蛋白质称为单纯蛋白质(simple protein) ;水解产物除氨基酸外还有其他物质的蛋白质称为结合蛋白质(conjugated protein)。结合蛋白质中非氨基酸部分称为辅基(prosthetic group)。辅基是无机离子(铁、铜、锌、锰、钴、钼、磷、硒、碘等)或有机化合物(维生素及其衍生物、卟啉化合物等小分子有机化合物和核酸、多糖、脂质等大分子有机化合物)。组成单纯蛋白质的元素主要有碳(50% ~ 55%)、氢(6% ~ 7%)、氧(19% ~ 24%)、氮(13% ~ 19%)和硫(0 ~ 4%)。蛋白质是体内主要的含氮化合物 ,多种蛋白质的平均含氮量约为 16%。因此 ,可用定氮法来推算样品中蛋白质的大致含量。每克氮相当于 $100/16 = 6.25$ g 蛋白质 ,每克样品中所含蛋白质的质量 = 每克样品中的含氮量 $\times 6.25$ 。

一、蛋白质的基本组成单位——氨基酸

(一) 氨基酸的结构与分类

单纯蛋白质的基本组成单位是氨基酸(amino acid)。虽然自然界存在 300 余种氨基酸 ,但组成蛋白质的编码氨基酸仅有 20 种 ,均为 α -氨基酸。而且 ,除甘氨酸(无不对称碳原子)外 ,均为 L-氨基酸(图 2-1)。

20 种氨基酸的结构除 C_{α} 及与其相连的 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 和 $-H$ 外的其余部分(称 R 基团)各不相同(图 2-2) ,使之具有各不相同的理化性质。20 种氨基酸可根据其 R 基团在中性溶液中的极性和解离状

态分为三类:中性氨基酸(非极性疏水性氨基酸和极性疏水性氨基酸)、酸性氨基酸和碱性氨基酸。中性氨基酸又可按其 R 基团的结构不同,分为脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸、羟基氨基酸、含硫氨基酸、亚氨基酸和酰胺类氨基酸。

半胱氨酸是含硫氨基酸,在蛋白质分子中,有时 2 个半胱氨酸残基上的巯基脱氢,以二硫键(disulfide bond)相连,形成胱氨酸。脯氨酸是唯一的环状亚氨基酸,其

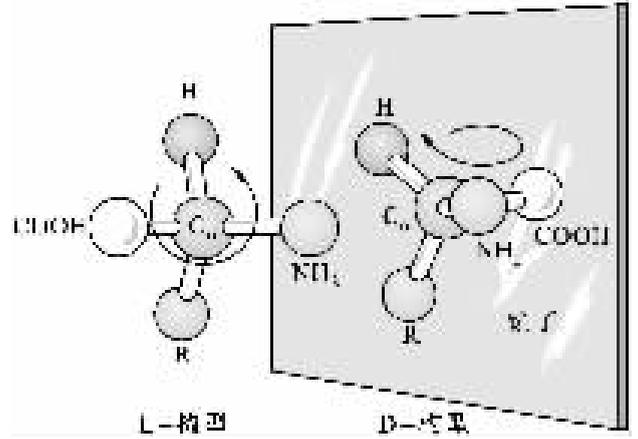
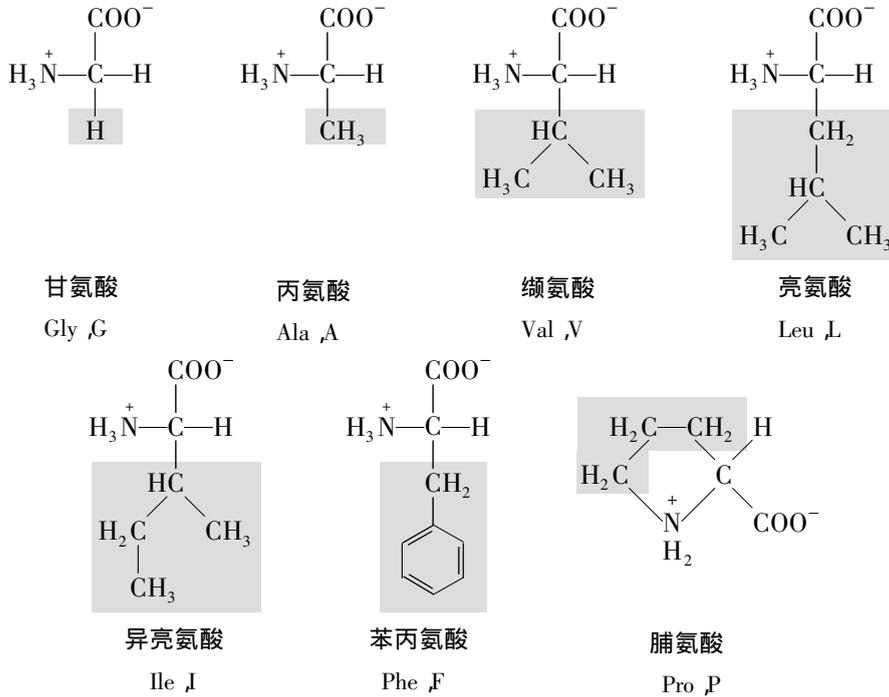


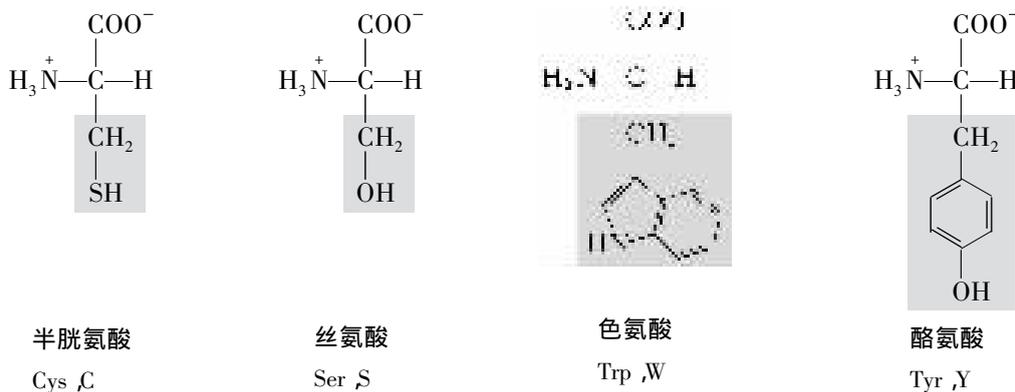
图 2-1 氨基酸的镜像结构

C_{α} 与侧链基团共价相连,形成吡咯环,在蛋白质的空间结构中有其特殊的作用。此外,在一些蛋白质中还含有某些特殊氨基酸。如甲状腺球蛋白含碘代酪氨酸,胶原蛋白含羟脯氨酸和羟赖氨酸。这些氨基酸是蛋白质合成后经修饰生成,在 DNA 中没有相应的遗传密码。

非极性疏水性氨基酸



极性中性氨基酸



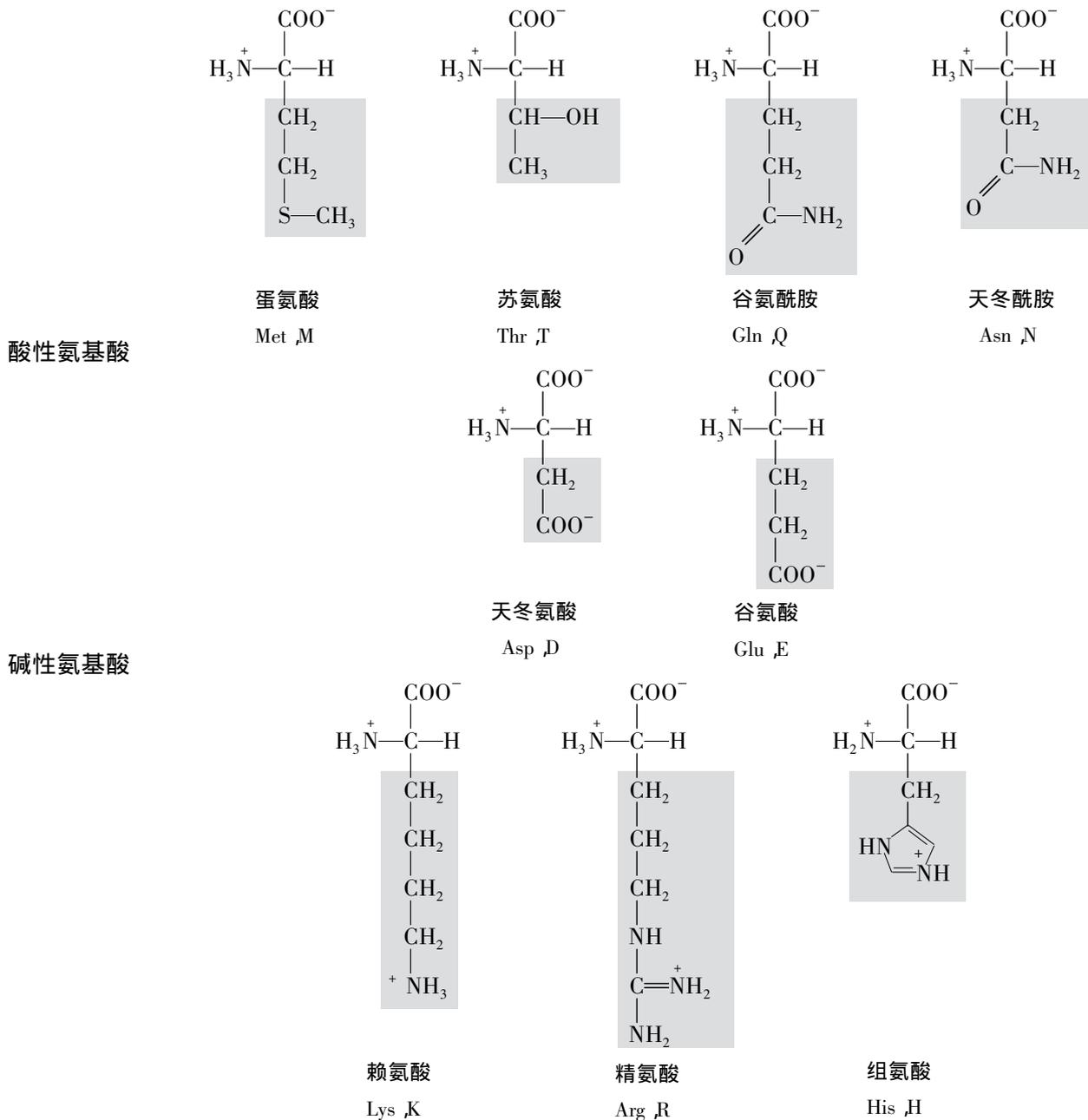
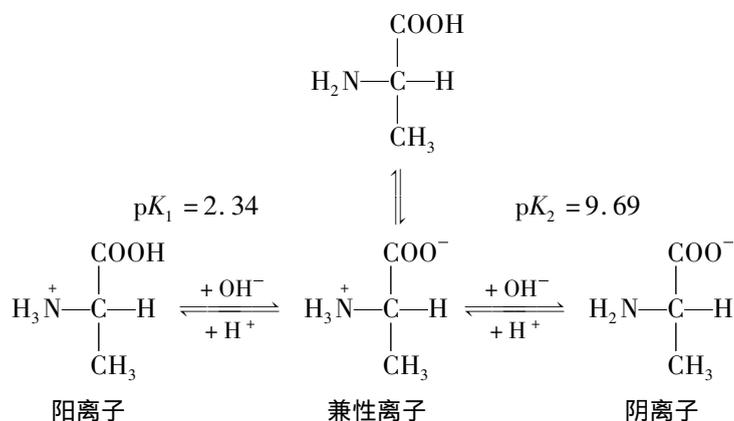


图 2-2 氨基酸的分类

(二) 氨基酸的理化性质

1. 氨基酸的两性解离与等电点

氨基酸除含碱性的 α -氨基和酸性的 α -羧基外,碱性氨基酸和酸性氨基酸的 R 基团还分别含有可解离的氨基(或亚氨基)和羧基。这些基团使氨基酸在酸性环境下与 H^+ 结合,带正电荷;在碱性条件下失去质子而带负电荷。所以,氨基酸是两性电解质,具有酸、碱两性解离的特征。在一定的 pH 环境下,氨基酸解离成阴、阳离子的程度相同,所带的正、负电荷相等,呈电中性。此时溶液的 pH 称为该氨基酸的等电点(isoelectric point, pI)。



氨基酸的 pI 取决于它的 α -羧基、 α -氨基和 R 基团的可解离基团的解离常数(见表 2-1)。其计算公式为 $pI = 1/2 [pK_1(\alpha\text{-羧基}) + pK_2(\alpha\text{-氨基})]$ 。对于侧链中含有可解离基团的氨基酸,其 pI 为兼性离子两边 pK(解离常数的负对数)的平均值。

表 2-1 氨基酸的解离常数与等电点

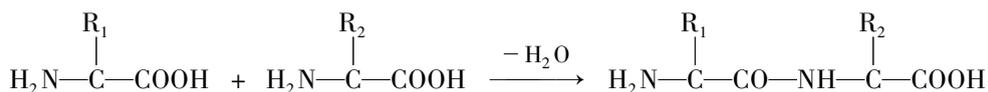
氨基酸	$pK_1(\alpha\text{-羧基})$	$pK_2(\alpha\text{-氨基})$	$pK_R(\text{R 基团})$	pI
甘氨酸 (glycine, Gly, G)	2.34	9.60		5.97
丙氨酸 (alanine, Ala, A)	2.34	9.69		6.02
缬氨酸 (valine, Val, V)	2.32	9.62		5.97
亮氨酸 (leucine, Leu, L)	2.36	9.60		5.98
异亮氨酸 (isoleucine, Ile, I)	2.36	9.68		6.02
苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe, F)	1.83	9.13		5.48
脯氨酸 (proline, Pro, P)	1.99	10.96		6.48
半胱氨酸 (cysteine, Cys, C)	1.96	8.18	10.28	5.07
丝氨酸 (serine, Ser, S)	2.21	9.15	13.60	5.68
色氨酸 (tryptophan, Trp, W)	2.38	9.39		5.89
酪氨酸 (tyrosine, Tyr, Y)	2.20	9.11	10.07	5.66
蛋氨酸 (Methionine, Met, M)	2.28	9.21		5.75
苏氨酸 (threonine, Thr, T)	2.11	9.62	13.60	5.87
谷氨酰胺 (glutamine, Gln, Q)	2.17	9.13		5.65
天冬酰胺 (asparagines, Asn, N)	2.02	8.80		5.41
谷氨酸 (glutamic acid, Glu, E)	2.19	9.67	4.25	3.22
天冬氨酸 (aspartic acid, Asp, D)	1.88	9.60	3.65	2.77
赖氨酸 (lysine, Lys, K)	2.18	8.95	10.53	9.74
精氨酸 (arginine, Arg, R)	2.17	9.04	12.48	10.76
组氨酸 (histidine, His, H)	1.82	9.17	6.00	7.59

2. 氨基酸的紫外吸收和呈色反应

酪氨酸和色氨酸分子中含有共轭双键,在紫外光 280 nm 波长处有最大吸收峰(图 2-3)。此特性可用于蛋白质的定量分析。茚三酮(ninhydrin)水合物遇热被还原,可与氨基酸在加热时释放的氨结合,生成蓝紫色化合物。此化合物在 570 nm 波长处有最大吸收峰,其峰值与氨的生成量成正比,也可用于氨基酸的定量分析。

二、氨基酸在蛋白质分子中的连接方式

蛋白质分子中氨基酸之间以肽键(peptide bond)相连接,肽键是一个氨基酸的 α -羧基和另一氨基酸的 α -氨基



氨基酸以肽键相连接形成的化合物称为肽(peptide)。肽中的氨基酸单位称为氨基酸残基(amino acid res-

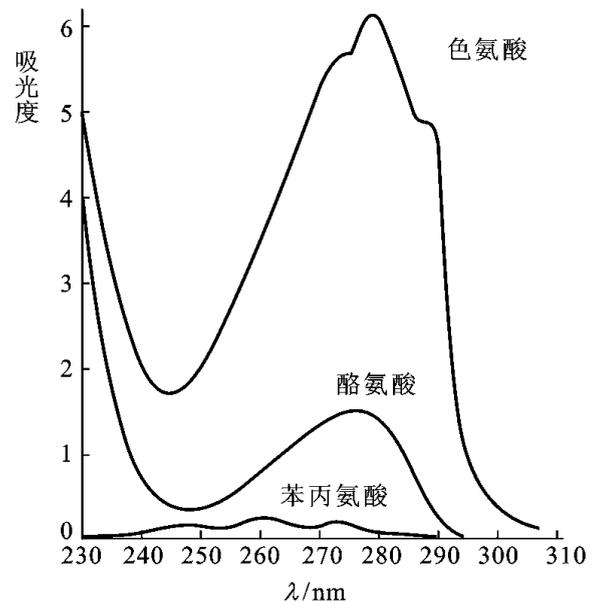


图 2-3 芳香族氨基酸的紫外吸收光谱

idue)。由 2 个氨基酸残基组成的肽称为二肽(dipeptide);由 3 个氨基酸残基组成的肽称为三肽(tripeptide),以此类推。不足 50 个氨基酸残基组成的肽称为多肽(polypeptide),10 个以下氨基酸残基组成的肽又常被称为寡肽(oligopeptide)。大多数蛋白质的氨基酸残基数在 50~2000 之间。

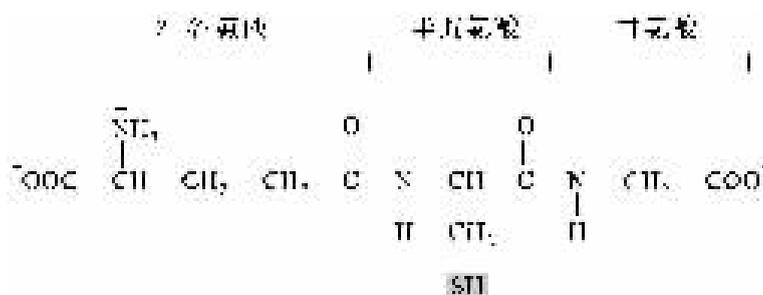
一条多肽链常含有 2 个游离的末端,一端是未参与形成肽键的 α -氨基,称为氨基(末)端或 N(末)端;另一端是未参与形成肽键的 α -羧基,称为羧基(末)端或 C(末)端。多肽链的序号从 N 端计算。书写肽链时,人们习惯上将 N 端写于左侧,用 H_2N- 或 $H-$ 表示;C 端写于右侧,用 $-COOH$ 或 $-OH$ 表示,有时不对末端加以标记,只凭序号或从左到右的排列来指示多肽链的走行方向。

多肽的命名原则是,除 C 端的氨基酸残基外,所有氨基酸残基均按酰基命名,并从 N 端依次列出,最后加上 C 端氨基酸残基的名称。例如,五肽 $T-G-G-F-M$ 的名称是酪氨酰甘氨酰甘氨酰苯丙氨酰蛋氨酸。多肽链中以肽键连接形成的长链称为主链,氨基酸残基的 R 基团称为侧链。

20 种氨基酸在各种蛋白质中出现的概率不尽相同,其平均相对分子质量为 110,可用此数据来估算蛋白质的相对分子质量或蛋白质中氨基酸残基的数目。

三、生物活性肽

人体内有一些生理活性物质是由几个至几十个氨基酸残基组成的肽,统称为生物活性肽。 γ -谷胱甘肽(γ -glutathione)是由 3 个氨基酸残基组成的三肽,特殊之处是谷氨酸以其 γ -羧基与半胱氨酸的 α -氨基形成肽键。谷胱甘肽是很强的还原剂,半胱氨酸残基上的活性巯基($-SH$)可以保护蛋白质的 $-SH$ 基不被氧化。谷胱甘肽常简写成 $G-SH$,以突出其活性巯基。其氧化型则写为 $G-S-S-G$ 。



传递神经冲动的一些肽类称为神经肽(neuropeptide)。例如,脑啡肽(五肽)、强啡肽(十七肽)、孤啡肽(十七肽)、 β -内啡肽(三十一肽)等。它们与中枢神经系统的痛觉抑制有关。此外,体内许多激素属寡肽或多肽类激素。例如,下丘脑分泌的促生长激素释放抑制激素(十四肽)、黄体生成素释放激素(十肽)、促甲状腺素释放激素(三肽)、神经垂体分泌的催产素(八肽)和抗利尿激素(又称加压素)(八肽)。腺垂体分泌的促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和胰岛 α -细胞分泌的胰高血糖素(glucagon)则是分别由 39 个氨基酸残基和 29 个氨基酸残基组成的多肽类激素(见表 2-2)。

表 2-2 一些生物活性肽的结构与功能

名称	分子结构	生理功能
促甲状腺素释放因子	焦谷-组-脯- NH_2	来自下丘脑,促进腺垂体分泌促甲状腺素
蛋氨酸脑啡肽	$H-$ 酪-甘-甘-苯丙-蛋- OH	脑中抑制痛觉的阿片样肽
血管紧张素 II(牛)	$H-$ 天-精-缬-酪-异-组-脯-苯丙- OH	升高血压,刺激肾上腺皮质分泌醛固酮

续表

名称	分子结构	生理功能
抗利尿激素(加压素)	$\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{H}-\text{半-酪-苯丙-谷胺-天胺-半-脯精-甘}-\text{NH}_2 \end{array}$	神经垂体分泌,促进肾保留水
血浆缓激肽(牛)	H-精-脯-脯-甘-苯丙-丝-脯-苯丙-精-OH	血管舒张肽
P物质	H-精-脯-赖-脯-谷胺-苯丙-甘-亮-蛋-NH ₂	神经递质
胰高血糖素(牛)	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{组-丝-谷胺-甘-苏-苯丙-苏-丝-天-酪-丝-赖-酪-亮-天-丝-精-精-丙-谷胺-天-苯丙-缬-谷胺-色-亮-蛋-天胺-苏}-\text{OH} \end{array}$	胰岛 α 细胞分泌的激素,具有升高血糖的作用

第二节 蛋白质的分子结构

一、蛋白质的一级结构

(一) 蛋白质一级结构的概念

每种蛋白质的多肽链都有其各自特定的氨基酸组成和排列顺序。蛋白质的一级结构(primary structure)是指蛋白质分子中多肽链的氨基酸排列顺序,一级结构的化学键是肽键。蛋白质的一级结构是蛋白质的基本结构,是其空间结构和特异生物功能的物质基础。

图2-4列出人胰岛素的一级结构。人胰岛素是由A和B二条多肽链组成,其中A链和B链分别含21和30个氨基酸残基。胰岛素分子中含有3个二硫键。即A链第6位和第11位的半胱氨酸残基之间形成1个链内二硫键。A链第7位和第20位半胱氨酸分别与B链第7位和第19位半胱氨酸形成2个链间二硫键。

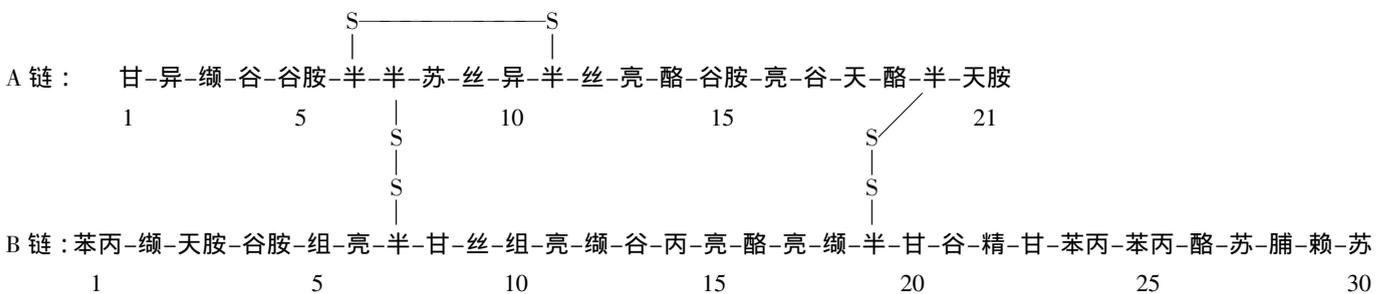


图2-4 人胰岛素的一级结构

(二) 多肽链的氨基酸序列分析

蛋白质一级结构的确定是研究蛋白质结构及其作用机制的前提。比较相关蛋白质的一级结构对于研究蛋白质的同源性和生物体的进化关系是必需的。蛋白质的氨基酸序列分析还有重要的临床意义,可以发现因基因突变造成蛋白质中氨基酸差异所引起的疾病。

1953年Frederick Sanger首先采用2,4-二硝基氟苯(1-fluoro-2,4-dinitrobenzene,FDNB)法,用了10年时间,成功地完成了牛胰岛素的序列分析。现在,随着自动分析仪的问世,人们可以用很短时间确定一个蛋白质的一级结构。氨基酸测序的基本方法是在Sanger测序法的基础上,由Pehr Edman改良的Edman降解法(Edman degradation)。其基本实验步骤分以下三步。

1. 测序前的准备工作

在进行氨基酸序列分析之前,首先用 N 末端分析法确定蛋白质所含多肽链的数目,断裂二硫键,分离纯化单一的多肽链。再将单一多肽链彻底水解,以分析其氨基酸组成(种类与数量)。目前,多采用氨基酸自动分析仪,利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)或离子交换色谱法对溶液中游离的氨基酸进行定性和定量分析(图 2-5)。各种蛋白质的氨基酸组成可作为鉴别不同蛋白质的“指纹”,也可用于比较不同实验室对同一蛋白质测序结果的一致性。

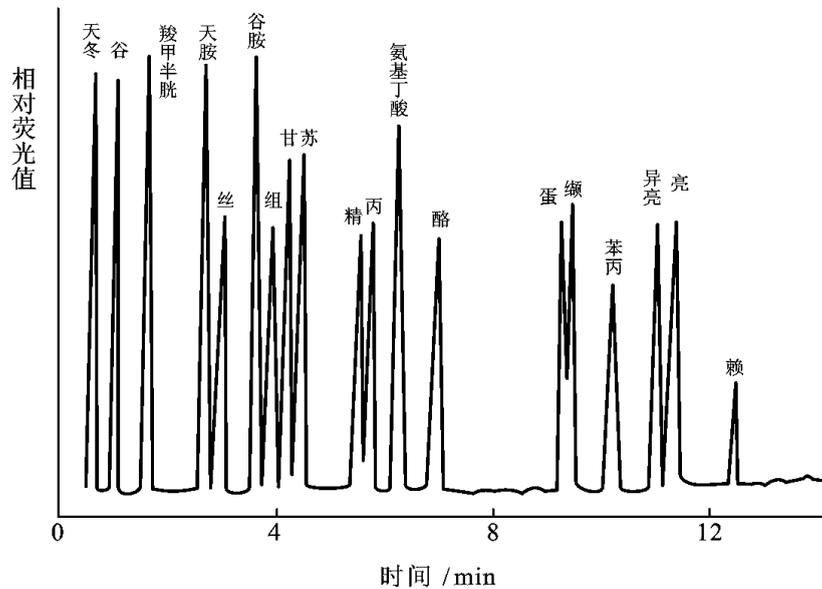
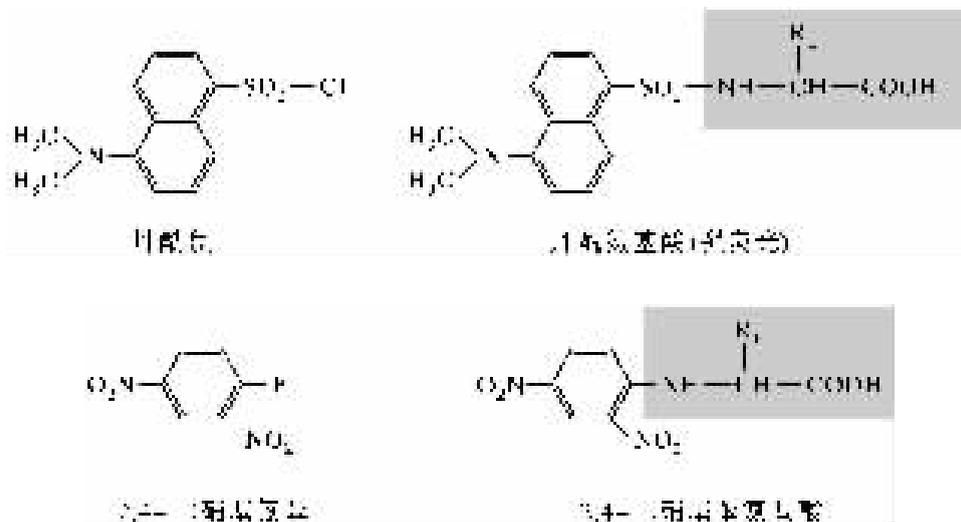


图 2-5 氨基酸的高效液相色谱

2. 多肽链氨基末端与羧基末端分析

测定多肽链的氨基末端和羧基末端氨基酸可作为整条多肽链的标志点。Sanger 曾用二硝基氟苯与多肽链的末端氨基反应,生成二硝基苯氨基酸。再将肽链水解,用标准化合物对比分析此二硝基苯氨基酸是何种氨基酸。目前,人们多采用二甲基氨基萘磺酰氯(丹酰氯,dansyl chloride)作为 N-端氨基酸的标记物,由于丹酰基有强荧光,可以大大提高检测的灵敏度。



羧基端的检测常采用羧基肽酶法。控制反应条件,使 C 端氨基酸逐一释放出来,予以检测。

3. 多肽链的氨基酸序列测定和重叠组合

多肽链的序列测定常采用 Edman 降解法。理论上,此法适用于长度在 30 ~ 40 氨基酸残基以下的多肽链。所以,在对多肽链进行测序前,先将多肽链用几种方法进行限制性水解,生成相互有部分重叠序列

的一系列短肽链,用 Edman 降解法对每个短肽进行测序。最后,将不同方法水解产生的肽链进行比较,找出重叠部分,进行累加,拼出完整的多肽链序列。

多肽链的水解方法很多(表 2-3)。胰蛋白酶水解碱性氨基酸羧基形成的肽键,胰凝乳蛋白酶水解芳香族氨基酸羧基形成的肽键,等等。水解后的肽片段可用色谱和电泳加以分离。

表 2-3 常用的多肽链水解方法与作用点

水解肽段的酶或试剂	对被水解肽段羧基侧 R 基团的要求
胰蛋白酶	精、赖
胰凝乳蛋白酶	芳香族氨基酸 苯丙、酪、色
金黄色葡萄球菌内肽酶 V ₈	谷
溴化氰	蛋
亚磺酰基苯甲酸	色

Edman 降解反应又称 Edman 循环。肽段的 N 端氨基与异硫氰酸苯酯(phenyl isothiocyanate, PITC)在弱碱性条件下反应,生成苯氨基硫甲酰肽。然后,用冷盐酸水解肽链末端的氨基酸衍生物,生成苯乙内酰硫脲氨基酸(phenylthiohydrantoin amino acid, PTH-氨基酸)和 N 端少一个氨基酸的多肽。此氨基酸衍生物可通过色谱分离,与标准氨基酸衍生物对比,鉴定出 N 端第一个氨基酸的种类。再对少一个氨基酸的肽段进行同样的 Edman 降解反应,确定第二个氨基酸的种类。如此反复进行,便可确定此肽段从 N 端到 C 端的氨基酸序列(图 2-6)。

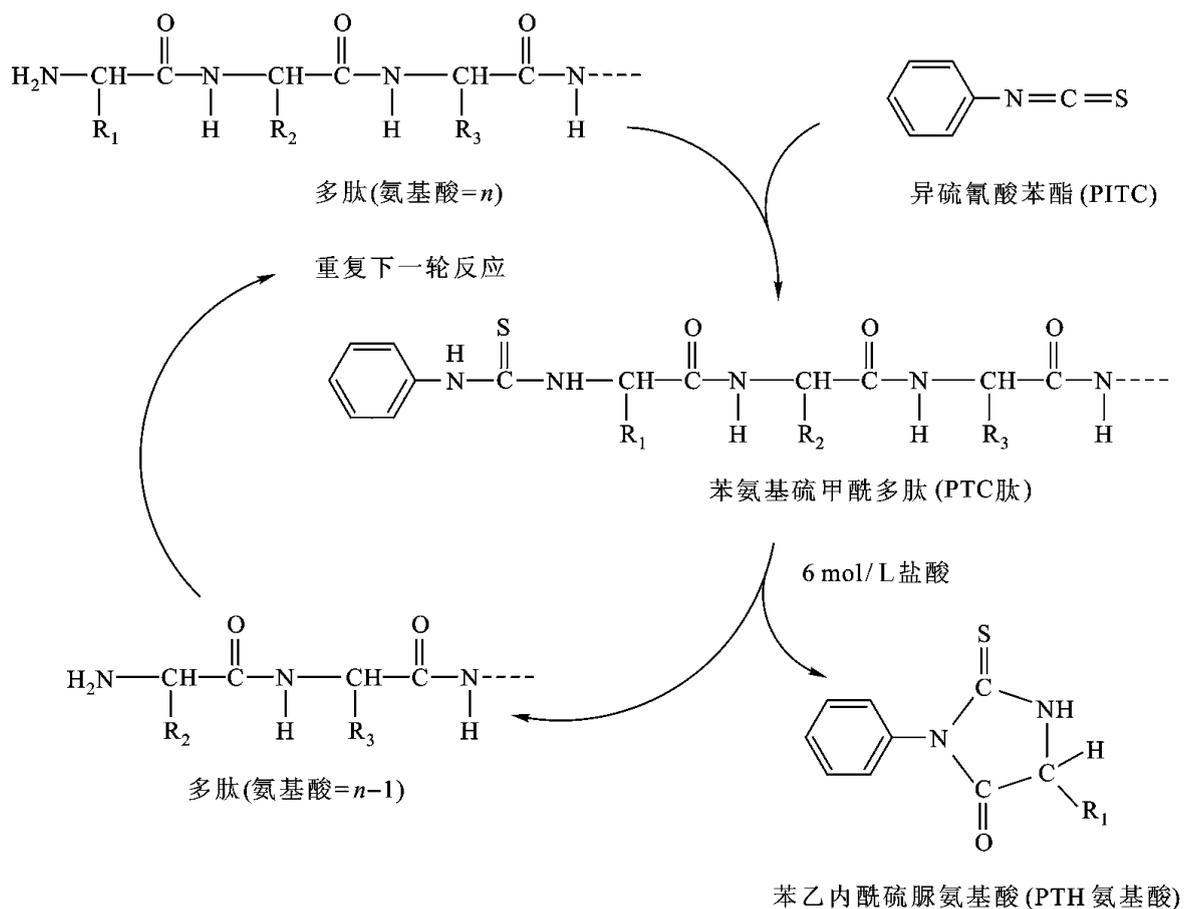


图 2-6 Edman 降解法原理

最后,将不同方法水解的肽段序列进行组合、叠加,得出完整肽链的一级结构。

除了 Edman 降解法外,人们利用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction,

RT-PCR)从编码蛋白质的 mRNA 得到其互补 DNA(cDNA)序列,再根据遗传密码表反推出其相应的氨基酸序列。当然,也可从基因组中找出编码蛋白质的基因,测定其 DNA 序列,再反推出蛋白质的氨基酸序列。上述方法均有其缺点。Edman 降解法不能对环形肽链和 N 端被封闭的肽进行测序,也不能测知某些被修饰的氨基酸。利用 RT-PCR 或测定基因组的碱基序列也不能推测翻译后氨基酸的修饰情况。这些困难可用质谱分析(mass spectrometry)解决。近年来,人们把 Edman 降解法与质谱分析偶联起来测定蛋白质的氨基酸序列取得了非常满意的结果。

二、蛋白质的空间结构

天然蛋白质的多肽链经过分子内部众多单键的旋转,形成复杂的盘旋卷曲与折叠,构成各自特定的三维空间结构。这种由于单键的旋转所形成的空间结构称为构象(conformation)。蛋白质的理化性质与生物学功能主要取决于其特定的空间构象。

(一) 蛋白质的二级结构

蛋白质的二级结构(secondary structure)指蛋白质分子中各段多肽链主链原子的空间分布状态,不涉及其侧链的空间排布。所以,蛋白质的二级结构是蛋白质分子中多肽链主链的空间构象。

1. 肽单元

构成蛋白质一级结构的基本单位是氨基酸,而构成蛋白质主链空间构象的基本单位是肽单元(peptide unit)。20 世纪 30 年代末,Linus Pauling 和 Robert Corey 用 X 射线衍射法分析了某些寡肽和氨基酰胺结晶,发现肽键与其周围相关原子的关系有以下几个特点,从而形成肽单元的概念。

(1) 肽键 C—N 的键长(0.132 nm)介于一般 C—N 单键键长(0.147 nm)和 C=N 双键键长(0.128 nm)之间,并接近于双键。所以,肽键具有部分双键性质,不能自由旋转。而且,围绕肽键 C—N 的三个化学键键角之和均呈 360°。因此,C—N 和与其相连的另外 4 个原子构成一个平面,称为肽单元或肽键平面(图 2-7)。

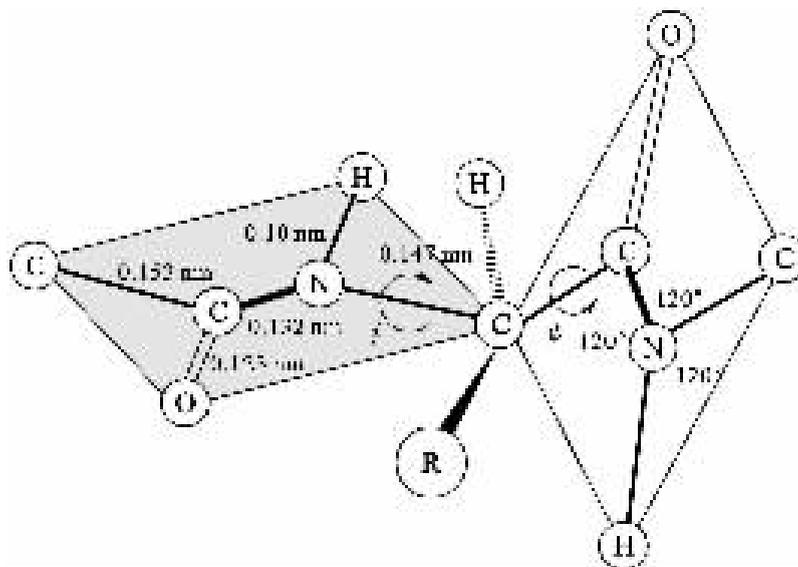


图 2-7 肽单元

(2) 由于肽键具有双键性质,与肽键相连的 4 个原子有顺反异构关系。除脯氨酸参与形成的肽键可为反式或顺式外,其他的肽单元均呈反式构型。

(3) 肽键中的羰基 C 与 C_{α} 相连接形成的 C_{α} —C 键是一般的单键,可以自由旋转,其转角称为 ψ (psi) 角,肽键中 N 与另一 C_{α} 相连接形成的 N— C_{α} 键也可以自由旋转,其转角称为 ϕ (phi) 角。在不同的二级结构类型中, ψ 与 ϕ 角的角度是固定的。

2. 蛋白质二级结构的主要构象

以肽单元为基本单位,依靠 ψ 角与 ϕ 角旋转的角度不同,多肽链通过旋转或折叠,形成不同的构象形式。常见的有 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规卷曲。维系蛋白质二级结构的主要化学键是氢键。

(1) α 螺旋 α 螺旋(α -helix)结构的主要特点是:①以肽单元为基本单位,以 C_{α} 为旋转点,肽单元两端 ψ 角和 ϕ 角按一定角度旋转,形成稳固的右手螺旋。②此右手螺旋中,每3.6个氨基酸残基螺旋沿中心轴上升一圈,其高度为0.54 nm。即每个氨基酸残基上升的跨度为0.15 nm。③每一个肽单元的—CO—基均与其后第四个肽单元的—NH—基形成氢键,以保持 α 螺旋的最大稳定性。氢键基本上与中心轴平行。氢键的氧原子沿肽链至该氢键另一端氢原子处,共包含13个原子。因此,此类型的 α 螺旋又称 $3.6_{13}\alpha$ 螺旋。④每个氨基酸残基的R基团伸向螺旋的外侧(图2-8)。

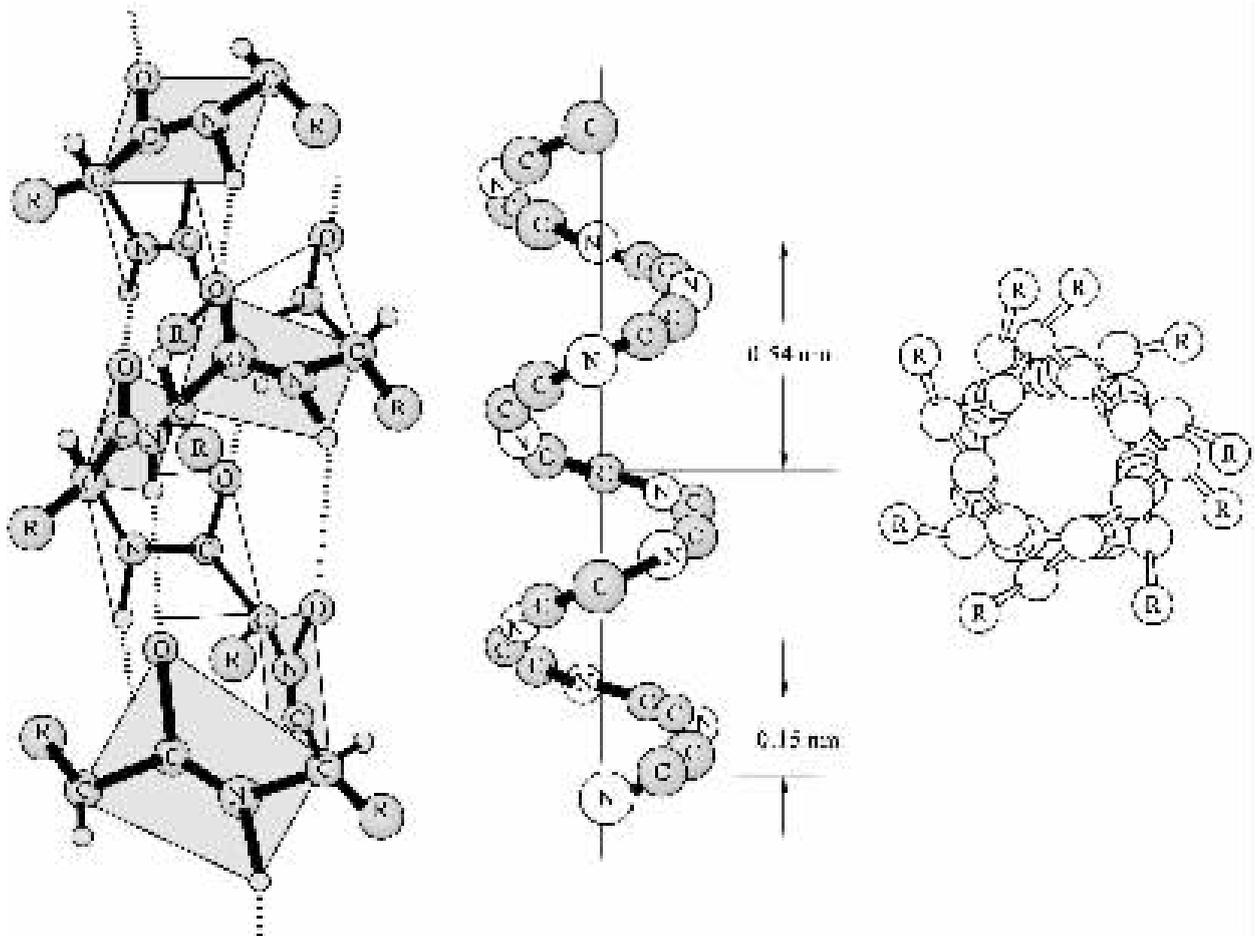
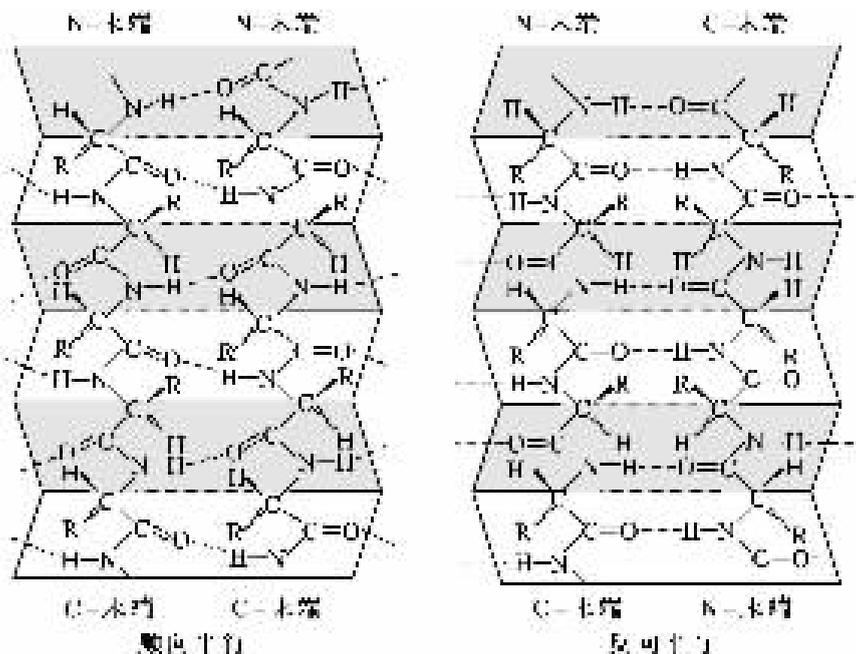


图2-8 α 螺旋结构

R基团的性质可直接影响 α 螺旋的稳定性。例如,含有较大R基团的异亮氨酸和色氨酸比较集中的区域,由于空间位阻的关系,可影响 α 螺旋的形成;酸性氨基酸或碱性氨基酸集中的区域,其静电排斥作用也可影响 α 螺旋的稳定性;甘氨酸的R基团是氢原子,空间占位小,其 α 碳原子两侧的化学键旋转度大,较难形成稳定的 α 螺旋;脯氨酸是环状亚氨基酸,形成肽键后不能参与氢键的形成,而且其 C_{α} 在五元环上,其两侧的键不能自由旋转。所以,脯氨酸不能参加 α 螺旋的形成。

(2) β 折叠 用X线衍射分析 β -角蛋白时发现 β -角蛋白具有一种0.7 nm的重复单位。在湿热条件下拉伸主要为 α 螺旋结构的毛发角蛋白时,可将此 α 螺旋结构变成类似 β -角蛋白样的锯齿结构。肽链中肽单元间折叠成的锯齿样结构称为 β 折叠(β pleated sheet)。 β 折叠以 C_{α} 为旋转点,形成折纸状,其特点是:①肽单元间的夹角为 110° ,形成锯齿状,是肽链中较为伸展的结构。②在蛋白质分子中,常有几条 β 折叠结构的肽段平行排列,形成折纸样的锯齿结构。故 β 折叠又称为 β 片层。③肽段之间通过氢键相连接,即一个肽段上氨基酸残基的—CO—和相邻肽段氨基酸残基上的—NH—形成氢键。所有肽单元

图 2-9 β 折叠结构

中的—CO—和—NH—均形成氢键,以增加 β 折叠的稳定性。④ β 折叠中并行的两条肽段的走向可相同(称为顺向平行)或相反(称为反向平行)(图 2-9)。反向平行肽段的间距为 0.7 nm。⑤侧链 R 基团交替地分布于 β 折叠锯齿平面的上、下方。

(3) β 转角 多肽链中肽段出现 180° 回折时的结构称为 β 转角或 β 回折(β -turn 或 β -bend)。 β 转角多由 4 个氨基酸残基组成,第二个氨基酸残基多为脯氨酸,其他常见的有甘氨酸等。第 1 个氨基酸的羧基氧与第 4 个氨基酸的氨基氢形成氢键,以维系 β 转角的稳定性(图 2-10)。

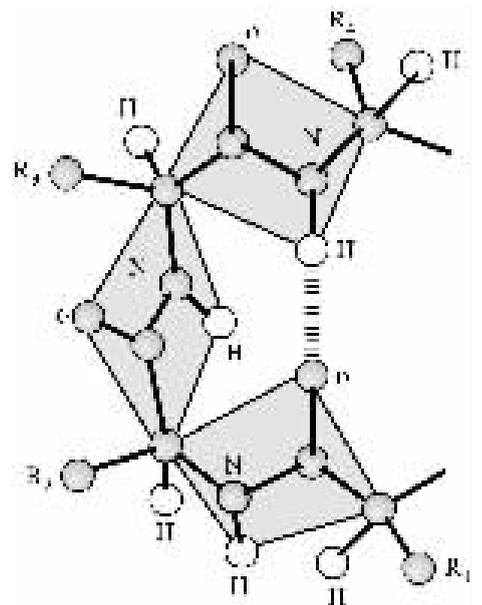
(4)无规卷曲 多肽链的主链构象除上述 3 种外,还存在一些似乎无确定规律可循的折叠方式,它们被称为无规卷曲(random coil)。无规卷曲也是蛋白质分子中一种不可缺少的构象规律(图 2-11)。

3. 模体

在一些蛋白质分子中,常发现几个(多为 2~3 个)具有二级结构的肽段相互靠近,形成具有特定功能的空问构象;或者仅是一个具有特定功能的很短的肽段。这种结构称为模体(motif)。有人将具有二级结构的几个肽段所构成的模体称为超二级结构(super secondary structure),常见的有螺旋-转角-螺旋模体、锌指模体等。

螺旋-转角-螺旋(helix-turn-helix, HTH)模体是存在于许多 DNA 结合蛋白中的典型模体,其结构是 2 个 α 螺旋之间以 β 转角相连(图 2-12)。含 HTH 模体的蛋白质常形成二聚体,其模体突出于分子表面,结合于 DNA 调节部位的相邻两个深沟中,对 DNA 的复制起调节作用。

锌指模体(zinc finger motif)发现于另一些称为锌指蛋白的 DNA 结合蛋白中。锌指模体由 1 个 α 螺旋和 2 个反向平行的 β 折叠组成(图 2-13)。一个 Zn^{2+} 与两对半胱氨酸(或一对半胱氨酸,一对组氨酸)残基的侧链相结合,两对半胱氨酸之间相隔约 12 个氨基酸残基。此模体结合于 DNA 调节部位的深沟中,发挥其调节作用。

图 2-10 β 转角结构

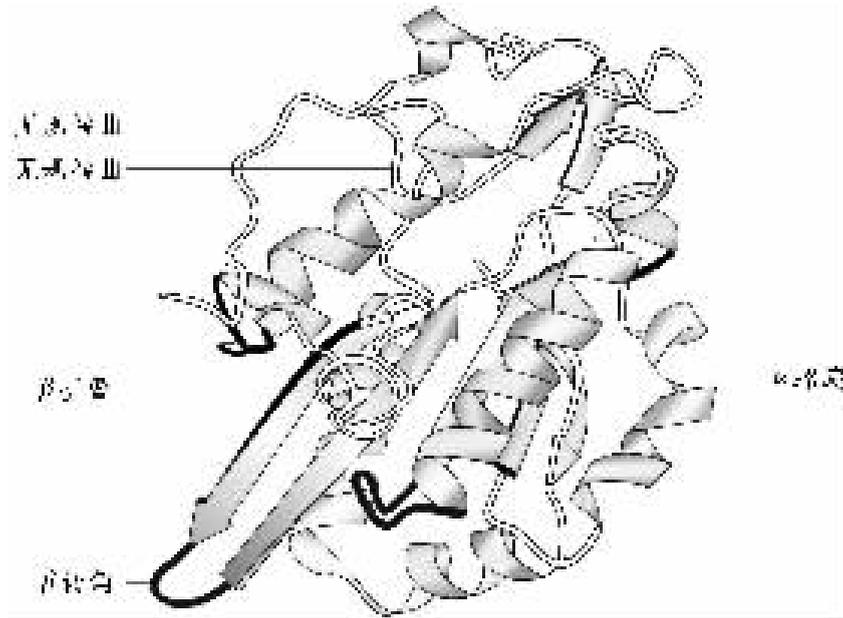


图 2-11 限制性内切核酸酶 *BamH I* 的三级结构
(蛋白质二级结构的 4 种类型)

精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)是最典型的短肽段模体,是蛋白质与蛋白质之间相互结合的靶点,存在于许多蛋白质分子中。如层连蛋白分子中的 RGD 模体(见第三章)和细胞膜上受体相结合有关。

(二) 蛋白质的三级结构

蛋白质的三级结构(tertiary structure)是蛋白质分子中二级结构元件之间的空间相互关系,即多肽链中所有原子(包括主链和侧链)在三维空间的排布位置与它们的相互关系。稳定蛋白质三级结构的力量主要是侧链间的非共价键,如氢键、离子键(盐键)、疏水作用、范德华(van der Waals)力等。这些非共价键统称次级键。有些蛋白质肽链中或肽链间两个半胱氨酸残基的巯基之间形成的二硫键(共价键)也是维系蛋白质三级结构稳定性的重要因素。

氢键的结合力较弱,受温度、离子强度与 pH 的影响,盐键是带电基团的相互吸引,也受离子强度与 pH 的影响。范德华力是原子之间相互靠近到 0.3 ~ 0.4 nm 时,原子间的相互吸引力。疏水作用是非极性侧链之间排斥水而相互聚集的吸引作用。多数极性基团位于蛋白质三级结构的表面,这是球状蛋白质分子易溶于水的缘故;非极性的疏水基团(丙、缬、亮、异、苯丙等疏水侧链)常位于分子的内部,形成“洞穴”或“口袋”状的疏水核心,结合蛋白质的辅基常镶嵌于其中,形成功能活性部位。

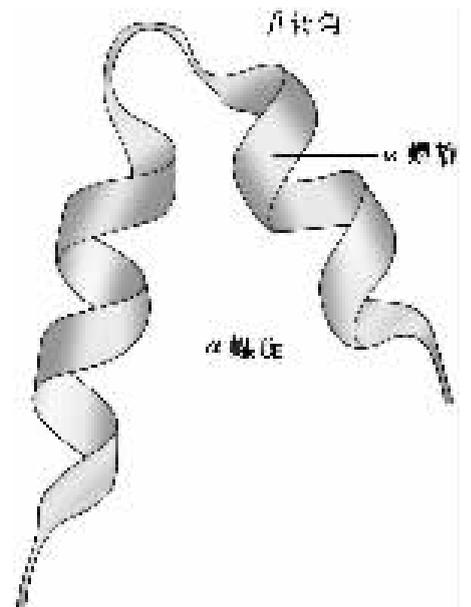


图 2-12 HTH 模体结构

具有二级结构的多肽链,特别是长的多肽链在进一步折叠与盘曲形成三级结构时,可能组合成数个相互连续而又相对独立的疏密不等的区域,以执行某种特定的功能,如结合配体、辅酶、底物等。这些区域称为结构域(domain)。图 2-14 显示细胞癌基因 *src* 表达的 Src 蛋白的结构域。Src 含 SH2、SH3 和蛋白激酶三个结构域。SH2 和 SH3 可以分别识别蛋白质的相应肽段,蛋白激酶结构域具有蛋白激酶活性(见第十九章 细胞信号转导)。

(三) 蛋白质的四级结构

许多蛋白质含有两条以上具有独立三级结构的多肽链,这些多肽链通过非共价键相互连接形成的多聚体结构称为蛋白质的四级结构(quaternary structure)。每条具有独立三级结构的多肽链则称为此蛋白

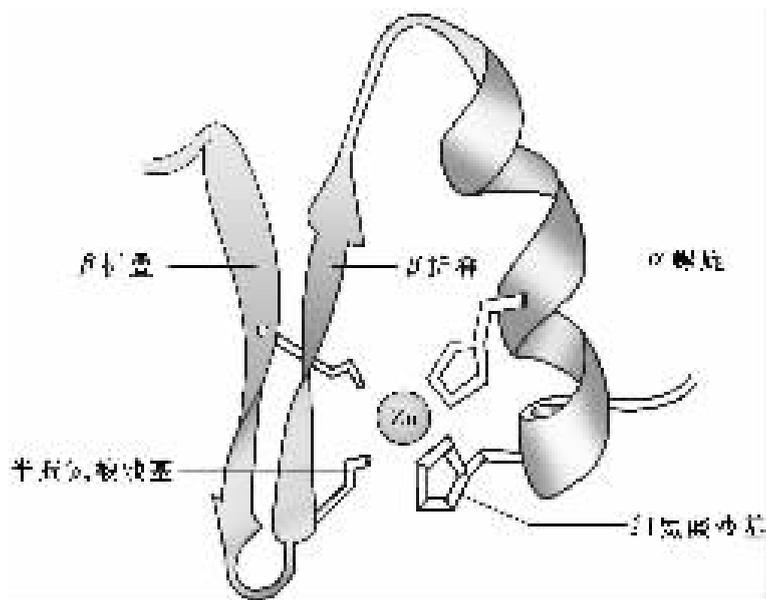
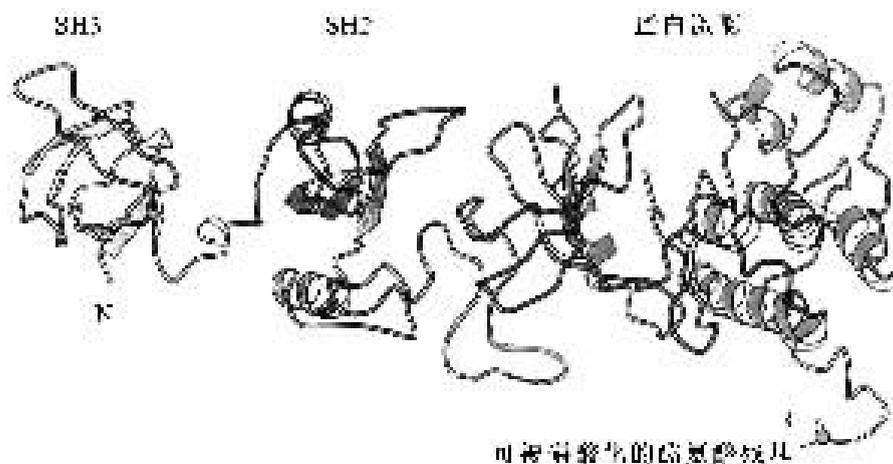


图 2-13 锌指模体结构

图 2-14 细胞癌基因 *src* 表达产物 Src 的结构展开图

质的亚基 (subunit)。所以,蛋白质的四级结构也可以认为是蛋白质分子中各亚基间的空间排布。稳定蛋白质四级结构的化学键是氢键、离子键、疏水作用和范德华力等非共价键。血红蛋白由四个亚基组成,具有四级结构(图 2-15)。一般认为,具有四级结构的蛋白质,单独的亚基无生物活性,只有具有完整的四级结构才有活性。胰岛素虽然含有两条多肽链,但两条多肽链之间以 2 条二硫键相连,所以胰岛素不具有四级结构。

(四) 蛋白质空间结构的确定

分析蛋白质的空间结构比分析蛋白质的一级结构复杂得多。当前测定蛋白质空间结构的主要技术是 X 线晶体分析 (x-ray crystallography) 和核磁共振光谱分析 (nuclear magnetic resonance [NMR] spectroscopy)。到 20 世纪末,已经确定了一万余种蛋白质的空间结构。

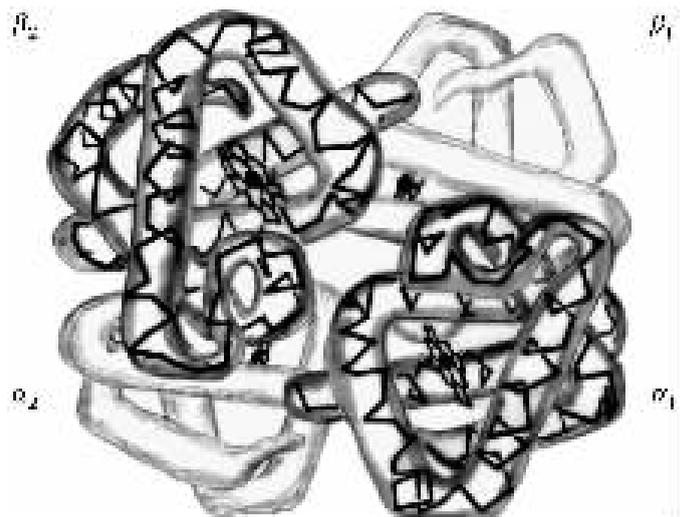


图 2-15 血红蛋白的四级结构

X 射线晶体分析也称 X 射线衍射分析(x-ray diffraction),此技术可以提供出蛋白质分子中各原子非常准确的空间位置。X 射线光束照射到蛋白质晶体上,部分光束向不同的方向发生散射。这些衍射的光点在 X 射线胶片上感光,得出衍射图谱。蛋白质分子中每个原子衍射出光波的振幅与其外周电子的数量成正比,碳原子的振幅是氢原子的 6 倍。每一原子都提供其各自的衍射波,这些衍射波的重组仅取决于原子的排布。所以,衍射图谱中光点的强度和光点的分布类型提供出蛋白质结构的足够信息。John Kendrew 对抹香鲸肌红蛋白晶体进行了 X 射线衍射分析,其衍射图中包含了 25 000 个衍射光点。根据这些衍射光点的密度与分布,通过计算机分析,绘出其三维电子云密度分布图,进而得出空间结构图形。

核磁共振光谱分析是揭示溶液中大分子的原子结构的唯一技术,其依据是大分子中某些原子核(如氢离子)具有内在磁性,即自旋的特性。通过改变外加磁场或电磁辐射(射频)的强度,造成这些原子核频谱(或称“振动”)的飘移。这种化学飘移(chemical shifts)可以检测并记录下来,经分析得出蛋白质的空间结构。

除了从以上的物理学、物理化学等方法描绘蛋白质的空间结构外,人们还试图从已知一级结构和空间结构的蛋白质中发现其一级结构与空间结构之间的关系,从中找出规律,来推测未知空间结构蛋白质的三维结构。

三、胶原蛋白的分子结构

根据蛋白质的形状,可将蛋白质分为球状蛋白质和纤维状蛋白质。上述讨论的是水溶性的球状蛋白质,它们具有催化、运输、调节物质代谢和调节基因表达等功能。纤维状蛋白质是高度延伸的长条形分子,不易溶于水。人体内的纤维状蛋白质主要有胶原蛋白(collagen)、 α -角蛋白(α -keratin)、弹性蛋白(elastin)和原肌球蛋白(tropomyosin)。它们广布于皮肤、肌肉、肌腱、骨骼、韧带,以及血管壁等处,主要对细胞和组织起保护、连接、支持、肌肉收缩等作用。

胶原蛋白简称胶原,具有柔韧性和抗张力作用,在组织中构成框架,增强组织的强度和韧性。胶原主要存在于细胞外基质,是体内含量最多的蛋白质,约占人体蛋白总量的 25%~30%。胶原是结缔组织的主要蛋白成分,在一些组织中含量非常高(表 2-4)。

表 2-4 某些组织中胶原蛋白的含量
(g/100 g 干组织)

组 织	含 量
骨(矿物质除外)	88.0
跟腱	86.0
皮肤	71.9
角膜	68.1
软骨	46~63
韧带	17.0
主动脉	12~24
肝	3.9

(一) 胶原分子的氨基酸组成与一级结构特点

胶原分子又称原胶原(tropocollagen)属于糖蛋白。以皮肤中 I 型胶原为例说明胶原的氨基酸组成。此型胶原富含甘氨酸(占总氨基酸组成的 33%)、脯氨酸(13%),以及脯氨酸和赖氨酸的羟化衍生物 4-羟脯氨酸(9%)和 5-羟赖氨酸(0.6%)。羟脯氨酸仅发现于胶原分子。羟赖氨酸的 δ -羟基是胶原分子中糖的结合部位。

胶原分子的一级结构有其特殊性。各类型胶原分子富含甘氨酸、脯氨酸和羟脯氨酸,其氨基酸序列中都有长段的由这3个氨基酸组成的串联重复序列,顺序为甘-脯-Y或甘-X-羟脯(X和Y代表任意氨基酸残基)。I型胶原每条多肽链约含1000个氨基酸残基,此三肽复重顺序可重复出现200次以上。

(二) 胶原分子的空间结构

胶原分子中每条多肽链的二级结构是左手螺旋。每3个氨基酸螺旋上升一周。胶原分子中富含的脯氨酸和羟脯氨酸虽然均不适合形成球状蛋白质中常见的 α 螺旋,但它们侧链的五元环却迫使C-N键形成有利于左手螺旋的角度。

胶原分子是由三条多肽链组成的三螺旋结构。根据组成的不同,可将肽链分为 α_1 、 α_2 和 α_3 等3种。I型胶原由2条相同的 α_1 (I)和1条 α_2 (I)组成。V型胶原则含有不同的3条链,即 α_1 (V)、 α_2 (V)和 α_3 (V)。三股多肽链在其二级结构的基础上,以右手螺旋的方式相互缠绕成超螺旋结构,形成完整的胶原分子(图2-16)。三股螺旋之间的空间狭小,只有甘氨酸残基的侧链(氢原子)可容于其中。所以,甘氨酸的大量存在有利于三股螺旋的稳定。而且,甘氨酸的氨基氢与相邻肽链的羧基氧形成氢键,可增加三股螺旋的稳定性。

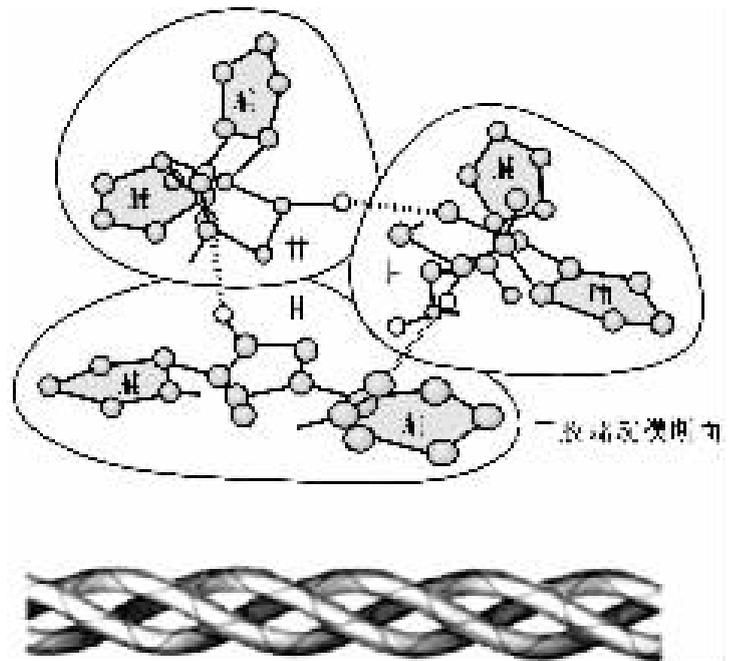


图2-16 胶原的分子结构

数个胶原分子侧-侧并列,形成直径为50~200 nm的胶原原纤维(collagen fibril)。胶原分子内的三股螺旋之间和胶原原纤维内的胶原分子之间还有由赖氨酸残基侧链之间相互作用形成的共价键(图2-17)。数个胶原原纤维再侧-侧并列,形成胶原纤维(collagen fiber)。

胶原分子可溶于温热的稀酸中,经超离心可得到三个组分: α 、 β 和 γ 。 β 和 γ 分别是胶原蛋白 α 链的二聚体和三聚体。到目前为止,至少发现了19型胶原分子。各型胶原分子的肽链具有较高的同源性,氨基酸的差异决定它们的不同理化性质。表2-5列出常见的前5型胶原分子肽链组成的结构特征。

表2-5 几种胶原蛋白的组成、分布与结构特性

类型	肽链构成	结构特性	组织分布
I	$[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I})$	含2种类型的多肽链,低糖,每条链中羟赖氨酸数少于10个	骨、皮肤、肌腱、瘢痕组织、心瓣膜、肠与尿道壁
II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	糖占10%,每条链中羟赖氨酸少于20个	软骨、玻璃体
III	$[\alpha_1(\text{III})]_3$	低糖,羟脯氨酸和甘氨酸含量高,含半胱氨酸	血管壁、新生的皮肤、瘢痕组织、肠与尿道壁
IV	$[\alpha_1(\text{IV})]_3$ $[\alpha_2(\text{IV})]_3$	3-羟脯氨酸含量高,每条链含羟赖氨酸高于40个,低丙氨酸和精氨酸,含半胱氨酸,高糖(15%)	基底膜,晶状体被膜
V	$[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V})$ $[\alpha_1(\text{V})]_3$ $\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{V})$	高糖含量,甘氨酸和羟赖氨酸含量相对较高	细胞表面,细胞外骨架,少量广布于所有组织

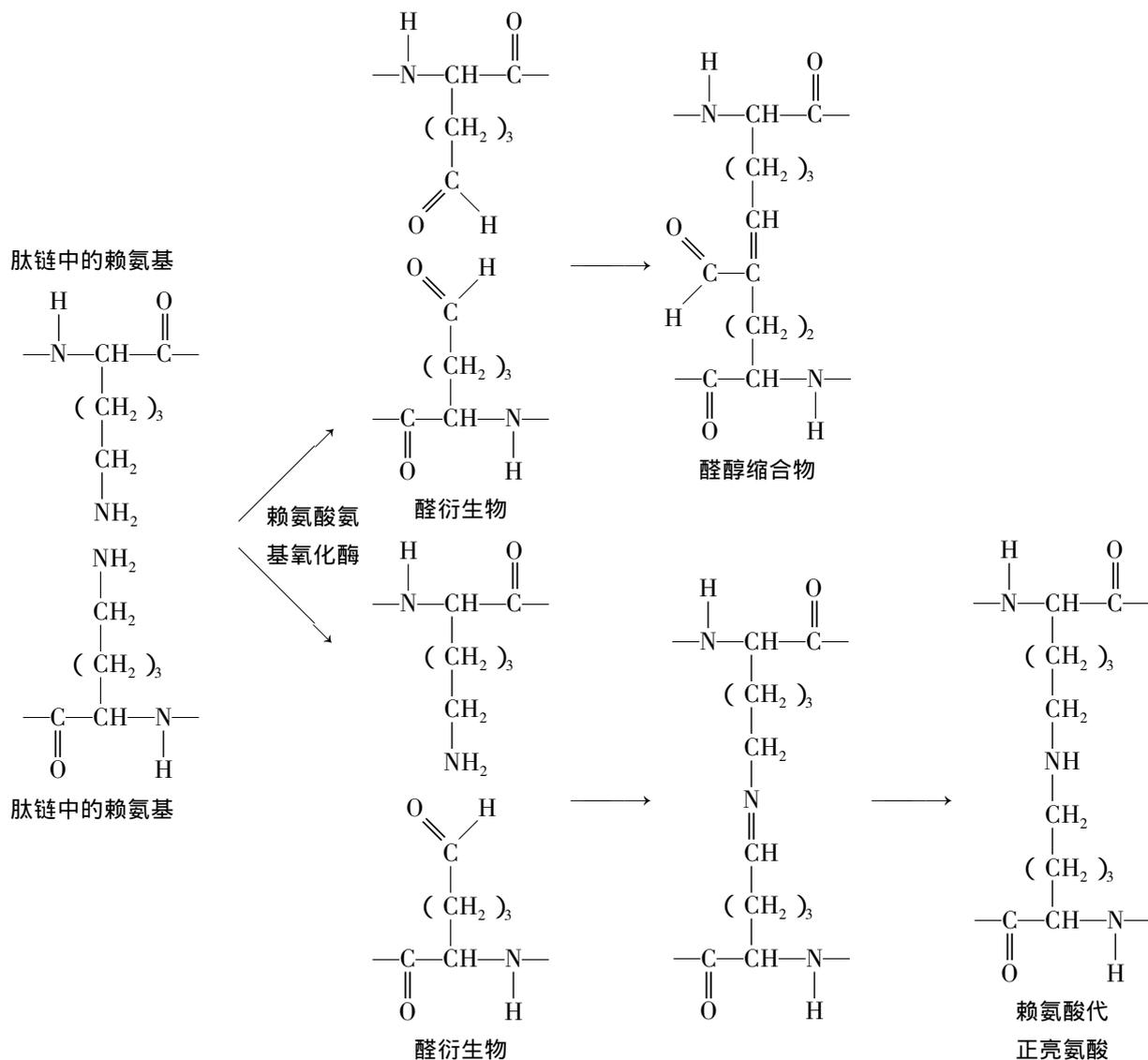


图 2-17 胶原分子间的共价交联

胶原分子结构或生物合成的异常可引起许多病理改变。例如,动脉血管瘤和心瓣膜功能紊乱等心血管疾病,骨骼脆性增加和容易骨折,皮肤伤口不易愈合,关节活动度超常和关节炎,眼晶状体错位等。胶原分子中的羟脯氨酸是肽链中脯氨酸残基在翻译后经羟化生成的。维生素 C 是肽链中脯氨酸羟化酶的辅酶。维生素 C 缺乏可引起胶原合成障碍。

第三节 蛋白质结构与功能的关系

研究蛋白质结构与功能的关系可以帮助人们进一步了解生命的衍化过程、揭示各种生命现象的分子机制、发现各种疾病的分子根源,并为人工模拟蛋白质奠定基础。

一、蛋白质一级结构与功能的关系

(一) 蛋白质一级结构对其空间结构和功能的影响

蛋白质的一级结构是其空间结构的物质基础,而蛋白质的空间结构又是其功能的结构基础。一级结构相似的蛋白质是否具有相似的空间结构和相似的功能,主要取决于那些在维系其空间结构和功能中起关键作用的氨基酸残基的差异,以及这些差异是否足以改变其空间构象和相应的生物学活性。

1. 蛋白质一级结构的某些差异对其功能的影响

(1) 胰岛素一级结构与功能的关系 不同种属来源的胰岛素分子都由 2 条多肽链组成,其中约有 22

个氨基酸残基的种类与位置完全相同,其空间结构也相似。虽然 A 链第 8、9、10 位和 B 链第 30 位的差异最大(表 2-6),但其功能不变,都具有调节物质代谢、降低血糖的作用。有人去除胰岛素 B 链 N 端苯丙氨酸和 C 端脯-赖-苏后,功能不受影响。这说明上述这些氨基酸残基对胰岛素的空间构象和生物学功能并不重要。基于此,人们利用猪和牛胰岛素治疗人类糖尿病取得了满意的疗效。

然而,若将胰岛素 A 链 N 端甘氨酸去除,则此胰岛素仅存 2%~10% 的活性。如果去除 A 链 N 端甘-异-缬-谷 4 个氨基酸,则其活性完全丧失。这说明 A 链前 4 个氨基酸对维系胰岛素的空间结构和功能是必需的。

表 2-6 几种哺乳动物胰岛素分子中氨基酸残基的差异部分

来 源	氨基酸残基的差异部分			
	A8	A9	A10	B30
人	Thr	Ser	Ile	Thr
猪	Thr	Ser	Ile	Ala
狗	Thr	Ser	Ile	Ala
兔	Thr	Ser	Ile	Ser
牛	Ala	Ser	Val	Ala
羊	Ala	Gly	Val	Ala
马	Thr	Gly	Ile	Ala
抹香鲸	Thr	Ser	Ile	Ala

(2) 丝氨酸蛋白酶的一级结构和功能的关系 丝氨酸蛋白酶(serine protease)是一个大家族,包括胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、弹性蛋白酶、缓激肽、尿激酶、凝血酶、凝血因子 Xa 和纤维蛋白溶酶等。虽然这些蛋白酶的相对分子质量和氨基酸序列不尽相同,但它们活性中心的必需基团均为丝氨酸(195)、组氨酸(57)和天冬氨酸(102)。而且这三个氨基酸残基周围的氨基酸序列基本相同(表 2-7)。丝氨酸残基(195)是这些蛋白酶的催化基团,它们都具有催化蛋白质水解的共同机制。故将它们统称为丝氨酸蛋白水解酶。X 射线衍射研究表明,它们具有相似的三级结构,都包含 2 个由 β 片层组成的桶状结构域,只是围绕其外周的无规卷曲有所不同,赋予不同的丝氨酸蛋白酶独特的结合底物和键专一性。

表 2-7 丝氨酸蛋白酶催化基团丝氨酸周围的固定氨基酸序列

蛋白酶	催化基团丝氨酸残基周围的固定氨基酸序列			
胰凝乳蛋白酶 A	C A G—A S G V—S S C M G D S(195) G	G	P	L V
胰蛋白酶	C A G Y—L E G G K—D S C Q G	D	S(195) G	G P V V
胰弹性蛋白酶	C A G—G N G V R—S G C Q G D	S(195) G	G	P L H
凝血酶	C A G Y K P G E G K R G D A C E	G	D	S(195) G G P F V
凝血因子 Xa	C A G Y—D T Q P E—D A C Q G	D	S(195) G	G P H V
纤维蛋白溶酶	C A G H—L A G G T—D S C Q G	D	S(195) G	G P L V
血浆缓激肽	C A G Y—L P G G K—D T C M G	D	S(195) G	G P L I

(3) 镰刀细胞血红蛋白 蛋白质一级结构中某个起关键作用的氨基酸的差异可能引起蛋白质的空间结构与功能的严重变化,给机体带来严重的危害。镰刀形红细胞性贫血(sickle-cell anemia)就是由于正常人血红蛋白 β 亚基的第 6 位谷氨酸被缬氨酸取代所致。这一微小变化致使此种血红蛋白(称为镰刀细胞血红蛋白, HbS)在脱氧时的水溶性大大降低,相互黏着,聚集成丝,使红细胞变成镰刀状而易于破碎,产生贫血。这种由于蛋白质分子中某个氨基酸残基发生变异引起的疾病称为“分子病”,多由基因突变所引起。

2. 一级结构差别很大的蛋白质可能有相似的空间结构

有些蛋白质虽然它们的一级结构和生物学功能不同,乃至在进化上没有任何联系,但它们的空间构象却具有相似的结构域。磷酸丙糖异构酶催化 3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮之间的相互转变,丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸与 ADP 反应生成丙酮酸和 ATP。这两种催化性质完全不同的酶却具有相似的空间结构。它们空间结构的中心是由 8 个 β 折叠环绕成的 β 圆桶(β -barrel), α 螺旋位于外周,与 β 折叠间隔排列(图 2-18)。其成因可能是这种空间排布与其热力学稳定性或动力学的可及性有关。

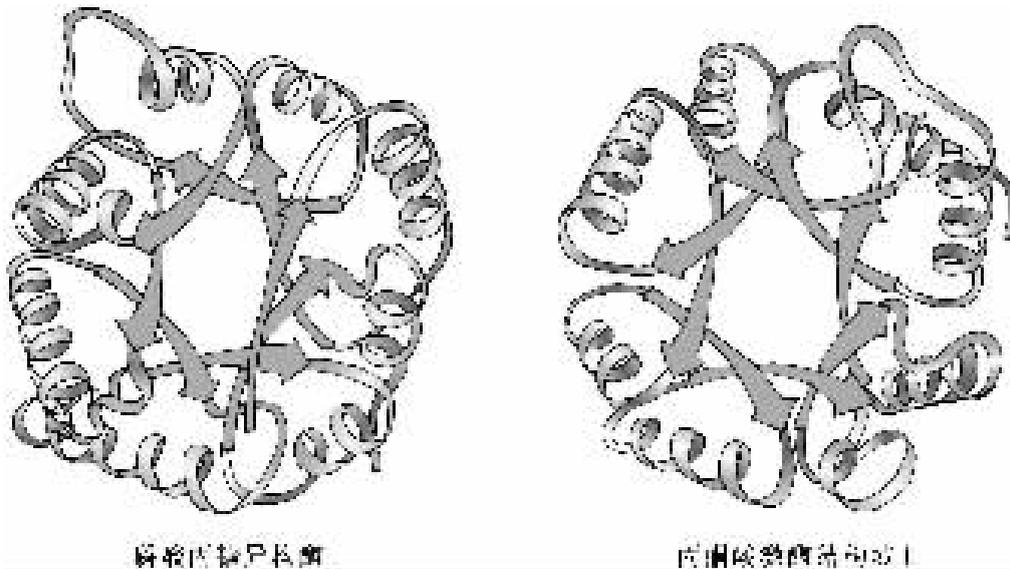


图 2-18 磷酸丙糖异构酶与丙酮酸激酶结构域 1 空间构象的相似性

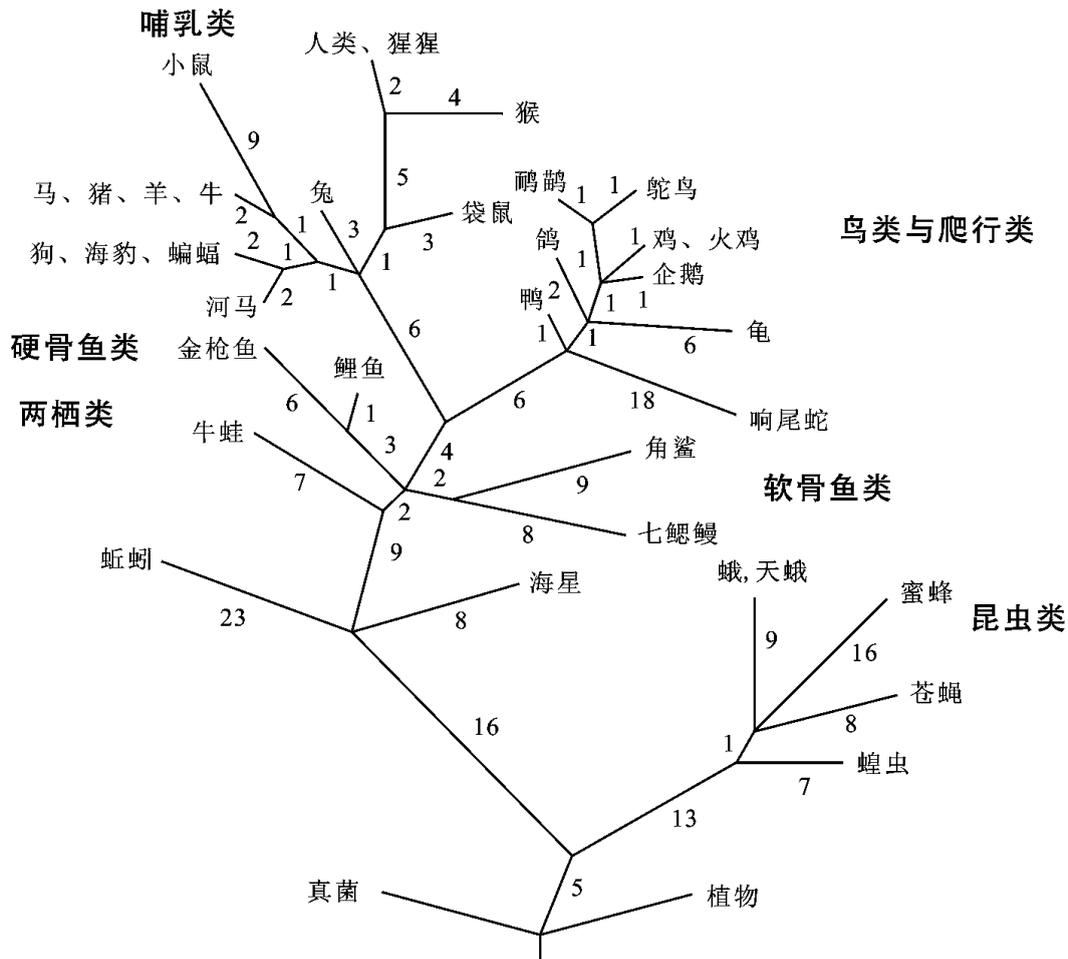


图 2-19 生物体细胞色素 c 一级结构的种系发生树

(图中数字表示该动物与其祖先细胞色素 c 的氨基酸残基的差异数)

(二) 蛋白质一级结构与物种进化的关系

人们比较不同种属之间细胞色素 c 一级结构的差异时发现,它可以帮助了解物种进化之间的相互关系(图 2-19)。物种越接近,细胞色素 c 一级结构的差异越小,其空间结构也越相近。人的细胞色素 c 与猕猴只有一个氨基酸的差异;与马有 12 个氨基酸的差异;与鸡有 13 个氨基酸的差异;与蚕蛾有 31 个氨基酸的差异;与面包酵母有 45 个氨基酸的差异。但是,不能仅把蛋白质一级结构的差异当作生物体进化的基础。人和黑猩猩的细胞色素 c 具有完全相同的一级结构,但两者在解剖和行为上的差异却很大,生物学分类上归属于不同的科。相近物种的基因虽然变异不大,但这些基因在蛋白质表达的多寡、时间与部位等的调控上表现出巨大的差异,这才是生物体属性不同的关键所在。

二、肌红蛋白和血红蛋白的空间结构与功能的关系

肌红蛋白和血红蛋白的结构与功能的关系是说明蛋白质空间结构与功能关系的最好例子。

(一) 肌红蛋白的空间结构与功能的关系

肌红蛋白(myoglobin, Mb)是由 153 个氨基酸残基组成的单一多肽链的蛋白质。其中,约 75% 的氨基酸残基存在于 8 个 α 螺旋中。从 N-端开始,这 8 个 α 螺旋依次称为 A、B、C、D、E、F、G 和 H(图 2-20)。Mb 折叠成 $4.5 \text{ nm} \times 3.5 \text{ nm} \times 2.5 \text{ nm}$ 的球形分子。疏水基团位于分子内部,亲水基团暴露于分子的表面。

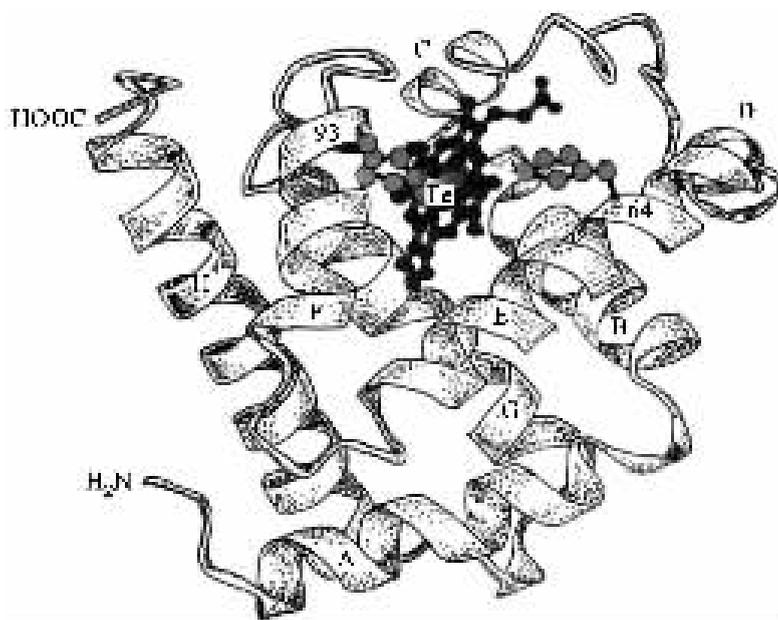


图 2-20 肌红蛋白的三级结构

血红素是 Mb 的辅基,位于 α -螺旋 E 和 F 之间的疏水口袋中。血红素是 4 个吡咯环通过 4 个 $-C=C-$ 基相连形成的平板状铁卟啉化合物。2 价铁离子居于卟啉环的中央。铁离子有 6 个配位键,其中 4 个配位键与 4 个吡咯环的 N 原子相连接,1 个与 F8(α 螺旋 F 中第 8 个残基)组氨酸(93)相结合,氧分子则与第 6 个配位键相结合,并与 E7 组氨酸(64)相接近。

Mb 的主要功能是与氧相结合,贮存氧以备肌肉运动时需要。从 Mb 的氧饱和曲线(图 2-21)可知,肌肉组织中静脉血氧分压(pO_2)为 5.33 kPa(40 mmHg)时,Mb 可被氧所饱和,即使静脉血 pO_2 在 2.67 kPa(20 mmHg)时,Mb 仍能贮存氧于其中。肌肉运动使肌肉中静脉血 pO_2 下降到 667 Pa(5 mmHg)时,则 Mb 释放氧,供肌肉收缩的能量需要。

(二) 血红蛋白空间结构与功能的关系

血红蛋白(hemoglobin, Hb)具有由 4 个亚基组成的四级结构(图 2-15)。成人 Hb 主要是 HbA₁,由 2 个 α -亚基(含 141 个氨基酸残基)和 2 个 β -亚基(含 146 个氨基酸残基)组成,即 $\alpha_2\beta_2$ 。每个亚基含 1 个血红素分子。Hb 中 4 个亚基的三级结构与 Mb 的三级结构相似, β -亚基也具有 8 个 α 螺旋,血红素也是

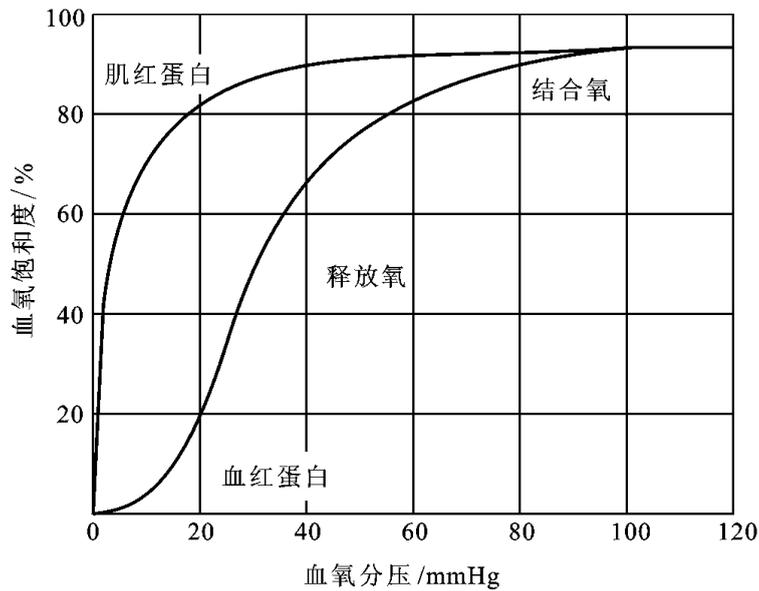


图 2-21 血红蛋白和肌红蛋白的氧解离曲线

位于 E 和 F 螺旋之间的疏水口袋中。 α -亚基的三级结构中只含 7 个 α 螺旋。Hb 各亚基之间和 β 亚基内部共以 8 个盐键相连接(图 2-22) 疏水基团位于分子内部,亲水基团居于分子表面,形成亲水的球状蛋白质。

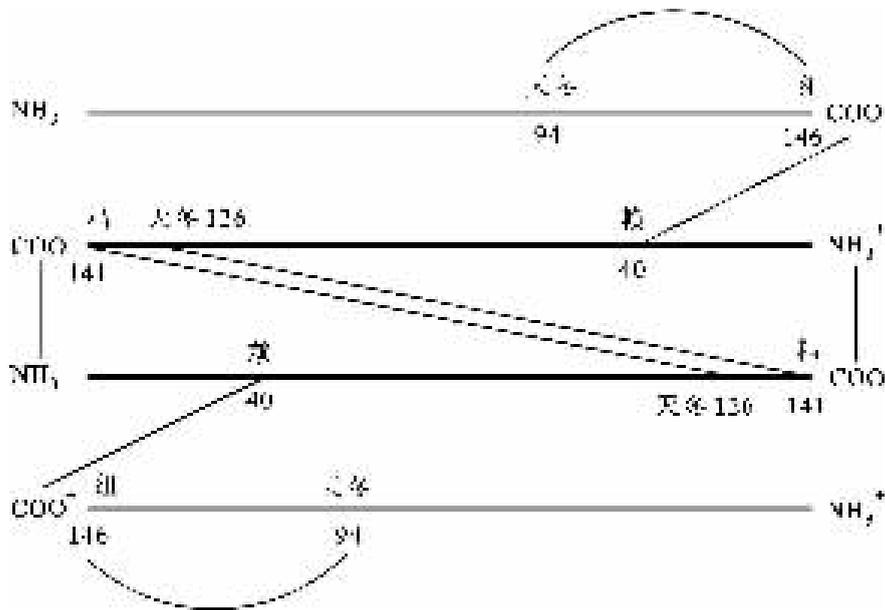


图 2-22 脱氧血红蛋白亚基内和亚基间的盐键

Hb 的氧饱和曲线与 Mb 不同,是 S 形曲线(图 2-21)。由此曲线可见,Hb 在氧分压低时很难结合氧,随着氧分压的升高,结合氧的能力急剧上升。实验证明,Hb 对其先后结合 4 个氧分子的结合常数各不相同,结合第 1 个氧的结合常数最小($K_d = 0.024$),结合第 4 个氧的结合常数最大($K_d = 7.4$)。这说明,Hb 与第 1 个氧分子结合后,促进第 2 和第 3 个亚基对氧的结合,第 4 个亚基最容易与氧结合。第 1 个亚基与配体的结合,通过亚基构象的改变影响其他亚基对配体的结合能力,这一现象称为协同效应(cooperativity)。如果配体的结合促进后续配体的结合,则称此现象为正协同效应(positive cooperativity);反之,称为负协同效应(negative cooperativity)。氧和 Hb 第 1 个亚基的结合对后续氧与其他亚基的结合具有促进作用,即氧对 Hb 的结合具有正协同效应。

氧的结合使 Hb 的三级结构和四级结构发生有利于与氧进一步结合的构象改变。脱氧 Hb 的特点是 4 个亚基以盐键和氢键相连接,形成 $6.4 \text{ nm} \times 5.5 \text{ nm} \times 5.0 \text{ nm}$ 的紧密的结构,此构象形式称为紧张态

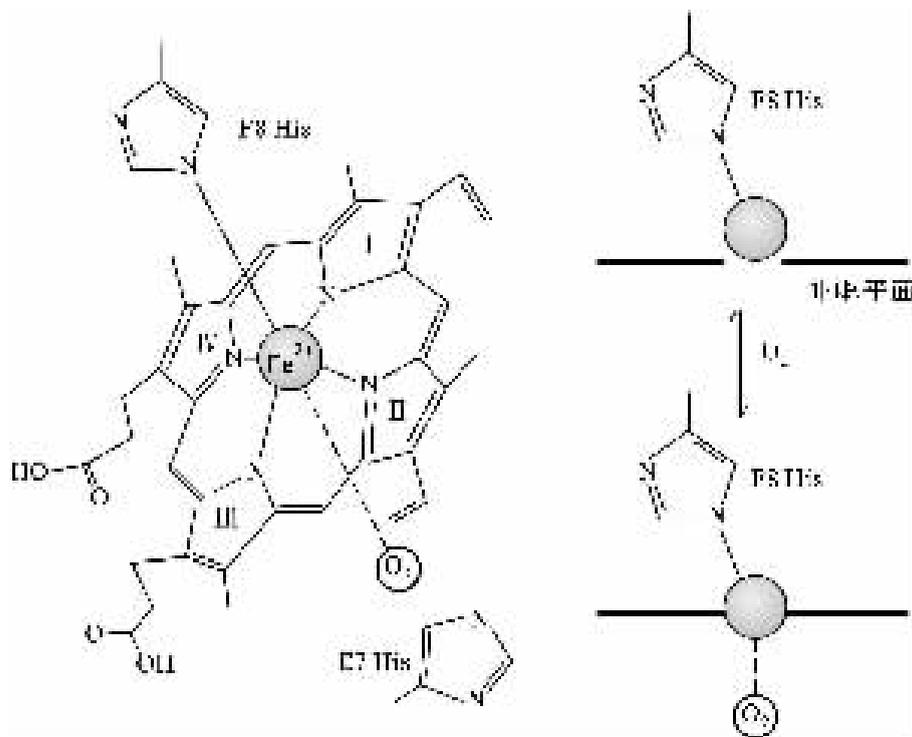


图 2-23 血红蛋白与氧结合示意图

(tense state, T 态) 铁原子偏离卟啉平面约 0.06 nm , 指向 α 螺旋 F8 组氨酸侧; 4 个亚基的排布是 α_1/β_1 和 α_2/β_2 呈双重对称排布。紧张态 Hb 对氧的亲合力低。当第 1 个氧分子与 Hb 第 1 个亚基结合时, 铁原子与氧形成第 6 个配位键, 这样铁原子的自旋速率加快, 铁原子的半径缩小并落入卟啉环内。铁原子的移位使 F8 组氨酸向卟啉平面移动, 同时带动 α -螺旋 F 做相应的移动(图 2-23)。F 螺旋的这一微小移动首先引起 $\alpha-\alpha$ 亚基间盐键的断裂, 使亚基间的结合松弛, 引起 Hb 四级结构的改变。这些改变增高了其他亚基对氧的结合能力。随着氧的结合, 最后使整个 Hb 变成松弛态(relaxed state, R 态)。R 态的特点是铁原子落入卟啉环中, 这种牵动作用使 Hb 亚基的三级结构发生改变; 亚基间的盐键断裂, 亚基间的结合疏松, α_1/β_1 和 α_2/β_2 之间移位 15° (见图 2-24); 松弛态的 Hb 亚基对氧的亲合力高, 容易与氧结合。可见, Hb 第 1 个亚基通过结合氧, 由 T 态向 R 态转变, 同时影响其相邻的亚基也向容易结合氧的 R 态转变。最后, 所有亚基均转变成 R 态。氧分子与 Hb 的一个亚基结合, 引起亚基构象改变的这一现象称为变构效应(allosteric effect)。引起 Hb 发生变构的氧分子称为变构效应剂; Hb 则称为变构蛋白。变构效应广泛存在于生物体内, 酶的变构效应对于调控物质代谢具有重要意义。

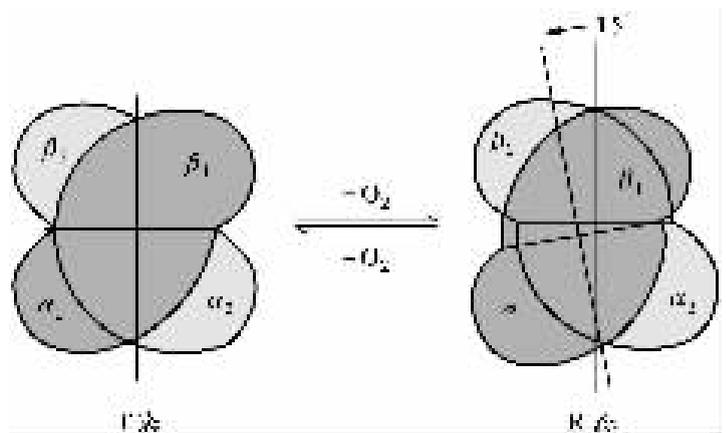


图 2-24 血红蛋白的 T 态与 R 态

三、朊病毒与蛋白质构象病

朊病毒蛋白(prion relative protein, PrP)是正常存在于人体神经元、神经胶质细胞等多种细胞细胞膜上的糖蛋白, 相对分子质量为 $33\ 000 \sim 35\ 000$, 其基因位于 20 号染色体。PrP 的三维结构主要是 α 螺旋。此蛋白对蛋白水解酶非常敏感, 容易被蛋白水解酶破坏。细胞朊病毒蛋白(PrP^c)具有多方面的功能, 包括

摄取铜、抗氧化应激、细胞黏附、分化、信号转导和中枢神经系统的存活等。新近的研究证明,PrPc 的正常功能依赖于它结合铜的能力。PrPc 是一种抗氧化剂,一旦与铜结合,它便具有超氧歧化酶的活性。

1986 年英国首先发现疯牛病(mad cow disease),即牛脑海绵样病,病牛的脑被破坏成海绵样,出现许多小孔。实际上人类也有类似的疾病。研究发现,致病的颗粒中没有核酸,而是一种蛋白质。现在已知,朊病毒蛋白有 2 型:一是正常朊病毒蛋白,即 PrPc,分子中含有约 40% 的 α 螺旋,几无 β 折叠;另一种是异常 PrPc,即 PrPSc[异常(痒症,scrapie)朊病毒蛋白],其分子中含约 30% α 螺旋和 45% β 折叠,此蛋白不易被蛋白酶水解。PrPSc 便是疯牛病的病原体。可见,疯牛病是由于正常 PrPc 的空间构象由 α 螺旋变成 β 片层结构(图 2-25)所致。因此,这类疾病又称蛋白质构象病。一旦食入含朊病毒的牛肉,朊病毒便进入大脑。朊病毒本身不能复制,但它却可以攻击大脑的正常朊病毒蛋白,使其发生构象改变,并与其结合,成为致病的朊病毒二聚体。此二聚体再攻击正常的朊病毒蛋白,形成朊病毒四聚体。这样周而复始,脑组织中的朊病毒不断积蓄,使脑组织发生退行性变。这说明,蛋白质的空间构象对蛋白质的功能是极端重要的。

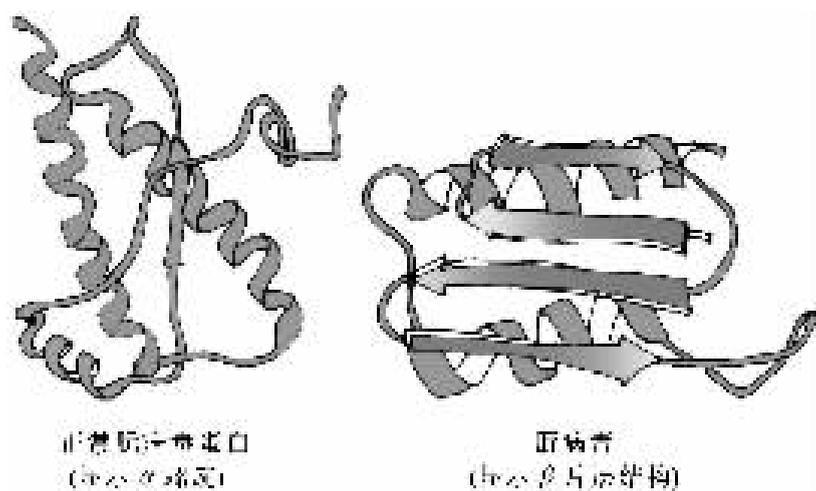


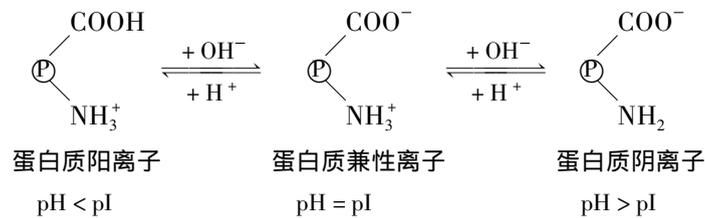
图 2-25 正常朊病毒蛋白和朊病毒空间结构的差异

第四节 蛋白质的理化性质及其提取、纯化原理

一、蛋白质的理化性质

(一) 蛋白质的两性解离

蛋白质是两性电解质。蛋白质分子中含有许多可解离的基团,在一定的 pH 条件下,可以解离成阳离子的基团除 N-端的游离氨基外,还有赖氨酸残基的 ϵ -氨基、精氨酸残基的胍基和组氨酸残基的咪唑基;可以解离成阴离子的基团除 C-端的游离羧基外,还有天冬氨酸残基的 β -羧基和谷氨酸残基的 γ -羧基。在一定 pH 条件下,蛋白质所带的正、负电荷相等,净电荷为零,此时蛋白质成为兼性离子,溶液的 pH 称为该蛋白质的等电点(pI)。溶液的 pH 高于蛋白质的等电点时,蛋白质带负电荷;反之,蛋白质带正电荷。人体内多数蛋白质由于其 pI(约为 5.0)低于体液的 pH(7.4)而带负电荷。少数蛋白质含碱性氨基酸残基较多,其 pI 较高,在人体体液中带正电,称为碱性蛋白质,如鱼精蛋白、组蛋白等。反之,含酸性氨基酸残基多的蛋白质称为酸性蛋白质,如胃蛋白酶、丝蛋白等。



(二) 蛋白质的胶体性质

蛋白质是高相对分子质量的有机化合物,其相对分子质量多在1万以上,甚至高达数百万乃至数千万,其分子直径为1 nm~100 nm,属胶体颗粒。所以,蛋白质溶液是胶体溶液,具有胶体溶液的性质。蛋白质是亲水胶体。球状蛋白质分子的亲水基团位于分子的表面,与水结合。每克蛋白质结合的水可高达0.3~0.5 g,形成包绕分子表面的水化膜(hydration shell)。蛋白质分子之间相同电荷的相斥作用和水化膜的相互隔离作用是维持蛋白质胶粒在水中稳定性的两大因素。

(三) 蛋白质的变性与沉淀

1. 蛋白质的变性

蛋白质在某些理化因素的作用下,维系其空间结构的次级键(甚至二硫键)断裂,使其空间结构遭受破坏,造成其理化性质的改变和生物活性的丧失。这种现象称为蛋白质的变性(denaturation)。引起蛋白质变性的物理因素有加热、紫外线照射、超声波和剧烈震荡等;化学因素有强酸、强碱、有机溶剂和重金属盐等。变性蛋白质仅是其天然空间构象的紊乱,一级结构不被破坏。

变性蛋白质疏水基团外露,丧失水化膜,溶解度降低,由亲水胶体变成疏水胶体。如果此时溶液的pH不在其等电点,蛋白质仍可因电荷排斥作用而不发生沉淀。变性蛋白质空间构象的破坏造成分子的不对称性增大,在溶液中的黏度增大;变性蛋白质分子中各原子和基团的正常排布发生变化,造成其吸收光谱改变,并丧失其生物活性;变性蛋白质由于其盘曲肽链的伸展,肽键外露,易被蛋白酶水解。

变性蛋白质的一级结构未被破坏,有些蛋白质在发生轻微变性后,可因去除变性因素而恢复活性。这种现象称为复性(renaturation)。牛胰核糖核酸酶是由124个氨基酸残基组成的单一多肽链。在8 mol/L尿素和还原剂 β -巯基乙醇存在时,牛胰核糖核酸酶分子中的非共价键和二硫键断裂,丢掉其有规律的三级结构,发生变性,丧失其生物活性。如果用透析的方法去除尿素和保留痕量 β -巯基乙醇,则多肽链又可再次形成非共价键和二硫键,逐步恢复其特定的三级结构,并恢复其生物活性(图2-26)。这也说明,蛋白质的空间结构对其一级结构的依赖性。实际上,大多数蛋白质在变性后,其空间构象遭到严重破坏而不能复性。

2. 蛋白质沉淀

蛋白质从溶液中析出现象称为蛋白质沉淀。已知蛋白质在水溶液中稳定的两大因素是水化膜和电荷。若去除蛋白质的水化膜并中和其电荷,蛋白质便发生沉淀。使蛋白质沉淀的方法很多。向蛋白质溶液中加入大量中性盐可夺取蛋白质的水化膜并中和电荷,使蛋白质从溶液中析出。乙醇、正丁醇、丙酮等有机溶剂可降低溶液的介电常数,夺取蛋白质的水化膜,均可使蛋白质沉淀。生物碱试剂(苦味酸、鞣酸等)、三氯醋酸、磺基水杨酸根离子可与带正电荷的蛋白质结合,使蛋白质沉淀并变性。汞、铅、铜、银等重金属离子可与带负电的蛋白质结合,使蛋白质变性、沉淀。临床上常用口服大量蛋白质(如牛奶)和催吐剂抢救误服重金属而中毒的病人。高浓度中性盐和有机溶剂沉淀法常用于蛋白质的分离和纯化(见本节二)。

3. 蛋白质的凝固

在近于等电点的条件下加热可使蛋白质凝固。这是由于此时变性的蛋白质在高温下肽链伸展并相互缠绕在一起,形成不溶性凝块而沉淀。酸牛奶的pH接近酪蛋白的等电点,不加热或稍加热便可出现沉淀,甚至于凝固成块。蛋白质在强酸、强碱中虽然变性,但因其远离蛋白质的等电点而不出现沉淀。若此时将pH调到蛋白质的等电点,蛋白质便出现絮状沉淀,此沉淀仍可再溶于强酸或强碱中。这种絮状沉淀可因加热而变成坚实的凝块。

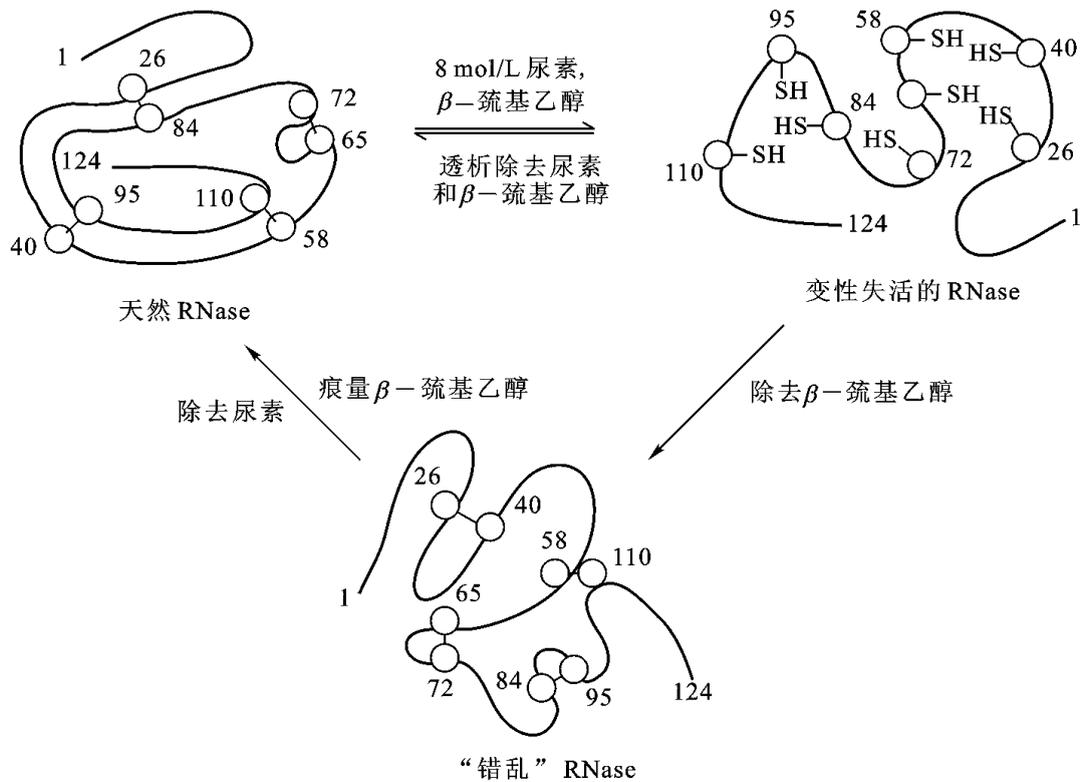


图 2-26 牛胰核糖核酸酶分子的变性与复性

变性的蛋白质不一定沉淀,沉淀的蛋白质不一定变性,但变性蛋白质容易沉淀,凝固的蛋白质均已变性,而且不再溶解。

(四) 蛋白质的光谱吸收与呈色反应

1. 蛋白质的光谱吸收

组成蛋白质的肽键和侧链上的某些基团对一定波长的光有其特征性的吸收峰。色氨酸残基和酪氨酸残基含有共轭双键,使蛋白质在波长 280 nm 紫外光下有最大吸收峰。280 nm 处吸光度的测定常用于蛋白质的定量。

2. 蛋白质的呈色反应

蛋白质分子中的肽键和许多侧链基团均可与一些特定的试剂发生呈色反应。这些呈色反应常用于蛋白质的定性与定量。二缩脲反应(biuret test)的原理是,在碱性溶液中, Cu^{2+} 可与蛋白质分子中肽键形成紫红色络合物。二缩脲反应对蛋白质的检出量为 1 ~ 20 mg。酚试剂呈色反应是最为常用的蛋白质定量方法(又称 Lowry 法)。此法除蛋白质分子中肽键与碱性铜发生二缩脲反应外,蛋白质分子中的色氨酸与酪氨酸残基还将试剂中的磷钨酸和磷钼酸盐还原生成蓝色化合物(钼蓝)。酚试剂法很灵敏,可检测出 5 μg 的蛋白质。

二、蛋白质的提取与纯化原理

破碎组织和细胞,将蛋白质溶解于溶液中的过程称为蛋白质的提取,将溶液中的蛋白质相互分离而取得单一蛋白质组分的过程称为蛋白质的纯化。蛋白质的各种理化性质和生物学性质是其提取与纯化的依据。目前尚无单一的方法可纯化出所有的蛋白质,每一蛋白质的纯化过程常是许多方法综合应用的系列过程。纯化蛋白质的常用方法列于表 2-8。

(一) 改变蛋白质的溶解度

通过改变蛋白质的溶解度沉淀蛋白质的常用方法有盐析和有机溶剂沉淀。此外,还有调节 pH 和改变温度等方法。

表 2-8 蛋白质的理化性质与常用的纯化方法

蛋白质的理化性质	常用的纯化方法
分子质量与体积	离心 凝胶过滤 透析、超滤
电荷	离子交换层析 电泳 等电聚焦
溶解度	调整 pH 调整离子强度 降低介电常数
特异结合部位	亲和层析 亲和洗脱
其他性质	吸附层析 液相层析 气相层析

盐析 (salting out) 是用高浓度的中性盐将蛋白质从溶液中析出的方法。常用的中性盐有硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等。高浓度的中性盐可以夺取蛋白质周围的水化膜,破坏蛋白质在水溶液中的稳定性。对不同的蛋白质进行盐析时,需要采用不同的盐浓度和不同的 pH。盐析时的 pH 多选择在蛋白质的等电点附近。例如,在 pH7.0 附近时,血清清蛋白溶于半饱和硫酸铵中,球蛋白沉淀下来;当硫酸铵达到饱和浓度时,清蛋白也沉淀出来。

与水互溶的有机溶剂(丙酮、正丁醇、乙醇和甲醇等)可以显著降低溶液的介电常数,使蛋白质分子之间相互吸引而沉淀。有机溶剂沉淀蛋白质应在低温下进行,低温不仅降低蛋白质的溶解度,而且还可以减少蛋白质变性的机会。

(二) 根据蛋白质分子大小不同的分离方法

各种蛋白质分子具有不同的相对分子质量和形状,可采用离心、超滤和凝胶过滤等技术将其分离。

1. 离心

离心 (centrifugation) 分离是利用机械的快速旋转所产生的离心力,将不同密度的物质分离开来的方法。按应用实际,离心机可分为制备型离心机 (preparative scale centrifuge) 和分析型离心机 (analytical centrifuge)。

制备型离心用于大量样品的分离。例如,差速离心 (differential centrifugation) 是对含两种以上大小不同的待分离物质的混合液,以不同离心速率分步骤离心沉淀,使之相互分离的离心方法。图 2-27 显示利用差速离心法分离不同的亚细胞结构。由图可见,不同的亚细胞组分可以用不同的离心力,分级的逐步沉淀分离出来。

分析型超速离心可用来测定蛋白质的相对分子质量。蛋白质在高达 $50\,000 \times g$ 的离心力下,可在溶液中逐渐沉降,直到溶液对其浮力 (buoyant force) 与离心力相等时便停止沉降。已知,在离心过程中作用于溶质分子上的离心力为 $\omega^2 x$, 其中 ω 是离心角速率, x 是溶质离开中心轴的距离。当溶质在离心力场中运动达到离心稳态时,溶质分子所受的离心力与反方向的阻力 (摩擦力和黏滞阻力) 相平衡,此时溶质便以恒速沉降。在单位离心力场下,溶质分子的沉降速率为:

$$\omega^2 x \cdot s = \frac{dx}{dt}$$

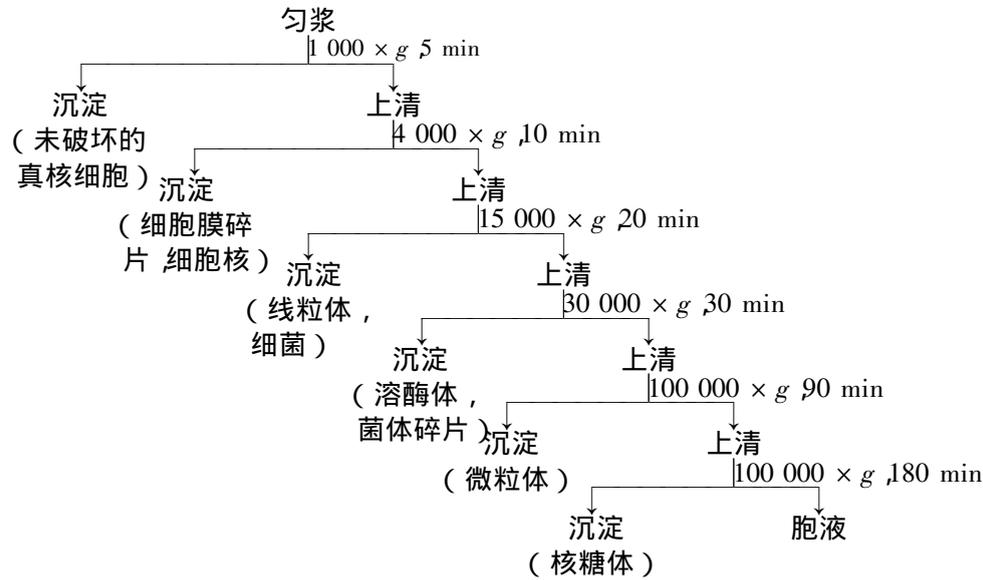


图 2-27 亚细胞成分的差速离心分离

s 为沉降系数(sedimentation coefficient),单位为秒。一般蛋白质沉降系数的数量级为 $10^{-13} \sim 10^{-12} s$, 人们以Svedberg(S)单位来表示沉降系数,即 $1S = 10^{-13} s$ 。沉降系数的大小与蛋白质的密度与形状相关(表 2-9)。

表 2-9 几种蛋白质的相对分子质量与沉降系数的关系

蛋白质分子	相对分子质量	沉降系数/(S)
核糖核酸酶	12 900	1.85
细胞色素 c	15 600	1.90
肌红蛋白	17 200	2.04
胃蛋白酶	37 000	3.3
β -乳球蛋白	41 500	3.12
卵白蛋白	44 000	3.55
马血红蛋白	68 000	4.41
人血清白蛋白	69 000	4.6
血纤维蛋白原	330 000	7.9
脲酶	480 000	18.6
猪甲状腺球蛋白	630 000	19.2

2. 透析与超滤

利用具有半透膜性质的透析袋将大分子的蛋白质与小分子化合物分离的方法称为透析(dialysis)。透析袋的截留极限一般在相对分子质量 5 000 左右。将含有大相对分子质量蛋白质的溶液装入透析袋内,再将透析袋置入水(或某种缓冲液)中,这样,小相对分子质量的物质(无机盐、有机溶剂、小相对分子质量的抑制剂等)便可透过透析薄膜进入水中,大相对分子质量的蛋白质留在透析袋内。透析过程中要更换 3 次~5 次袋外的透析液,以使透析袋内的小分子物质全部去除。有时将装有高相对分子质量蛋白质溶液的透析袋包埋入吸水剂(如聚乙二醇)内,袋内的水与小分子物质可被吸出透析袋,达到将袋内蛋白质浓缩的目的。

超滤(ultrafiltration)是在一定的压力下,使蛋白质溶液在通过一定孔径的超滤膜时,小相对分子质量物质滤过,而大相对分子质量的蛋白质被截留,从而达到分离纯化的目的。这种方法既可以纯化蛋白质,又可达到浓缩蛋白质溶液的目的。

3. 凝胶过滤

凝胶过滤(gel filtration)又称分子筛层析,在层析柱内填充惰性的微孔胶粒(如交联葡聚糖),将蛋白

质溶液加入柱上部后,小分子物质通过胶粒的微孔进入胶粒,向下流动的路径加长,移动缓慢;大分子物质不能或很难进入胶粒内部,通过胶粒间的空隙向下流动,其流动的路径短,移动速率较快,从而达到按不同相对分子质量将溶液中各组分分离的目的(图2-28)。

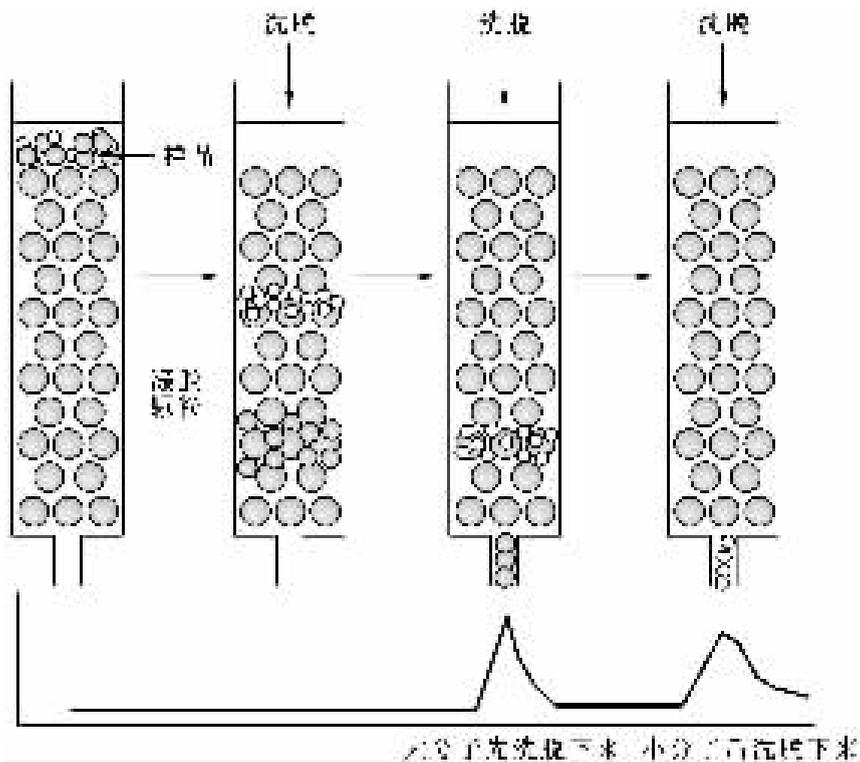


图2-28 凝胶过滤分离蛋白质

(三) 根据蛋白质电荷性质的分离方法

可以根据各种蛋白质在一定的 pH 环境下所带电荷种类与数量不同的特点,分离不同蛋白质。常用的方法有离子交换层析、电泳和等电聚焦。

1. 离子交换层析

离子交换层析(ion-exchange chromatography)应用广泛,是蛋白质分离纯化的重要手段之一。离子交换层析的填充料是带有正(负)电荷的交联葡聚糖、纤维素或树脂等。根据层析柱内填充物(交换剂)的电荷性质不同,离子交换层析可分为阴离子交换层析和阳离子交换层析。阴离子交换层析的交换剂本身带正电荷,而阳离子交换层析的交换剂带负电荷。

以阴离子交换层析为例(图2-29),将阴离子交换葡聚糖填入层析柱内,由于此种葡聚糖颗粒本身带有正电荷,吸附溶液中带负电的蛋白质阴离子。若用带有不同浓度的阴离子(如 Cl^-)溶液进行洗柱。洗脱液中的阴离子取代蛋白质分子与交换剂结合。低盐浓度时带电少的蛋白质被优先洗脱下来,随着洗脱溶液中阴离子浓度的不断升高,带电多的蛋白质也不断地被先后洗脱下来。若用不同 pH 的缓冲液进行洗柱,随着层析柱内溶液 pH 的变化,达到或接近其等电点的蛋白质由于不带电荷而被洗脱下来。这样,利用离子交换层析,便将在洗脱过程中带电程度不同的蛋白质分离开来。

2. 电泳

溶液中的带电粒子在电场中的迁移称为电泳(electrophoresis)。蛋白质在低于或高于其等电点时分别带正电荷或负电荷,在电场中向阴极或阳极迁移。根据蛋白质分子大小和所带电荷的不同,可以通过电泳将其进行分离。根据支持物的不同,电泳有薄膜电泳、凝胶电泳等。薄膜电泳的支持物是滤纸或醋酸纤维素薄膜等。

最常用的凝胶电泳有琼脂糖电泳(agarose electrophoresis)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)。这些支持物可以附于玻璃板上或玻璃柱中, PAGE 还具有分子筛作用。人们常用

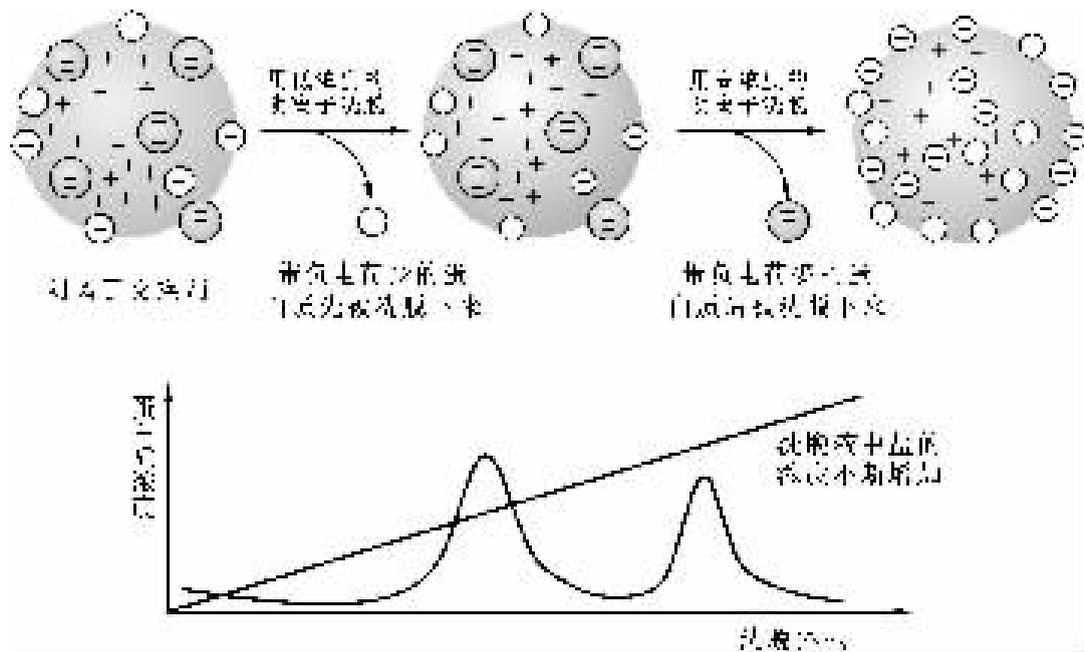


图 2-29 离子交换层析分离蛋白质

十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulfate, SDS) 将欲分离的蛋白质分解为亚基, 并由于 SDS 是负电性很强的物质, 它可使所有的亚基均带上大致相等的负电荷。这样, 在具有分子筛作用的 PAGE 中, 各种蛋白质的泳动速率仅仅取决于其分子大小。这种电泳称为 SDS - PAGE。如有已知相对分子质量的标准蛋白质作对照, 就可用于测定蛋白质相对分子质量。电泳后, 用蛋白质显色剂显色, 可以清楚地看到已分离的各条蛋白质区带。

3. 等电聚焦

等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 与一般电泳的区别在于, IEF 是在具有 pH 梯度的电场中进行的电泳, 蛋白质按其等电点不同予以分离。每种蛋白质均有其特定的等电点, 在 pH 呈梯度的电场中, 按其等电点不同, 带有不同的电荷, 于是向与其带电相反的电极方向泳动。这样, 在电泳时某一蛋白质迁移到电场中 pH 等于其等电点的位置时, 该蛋白质便因不带电荷而停止泳动。这样, 各种蛋白质按其等电点不同

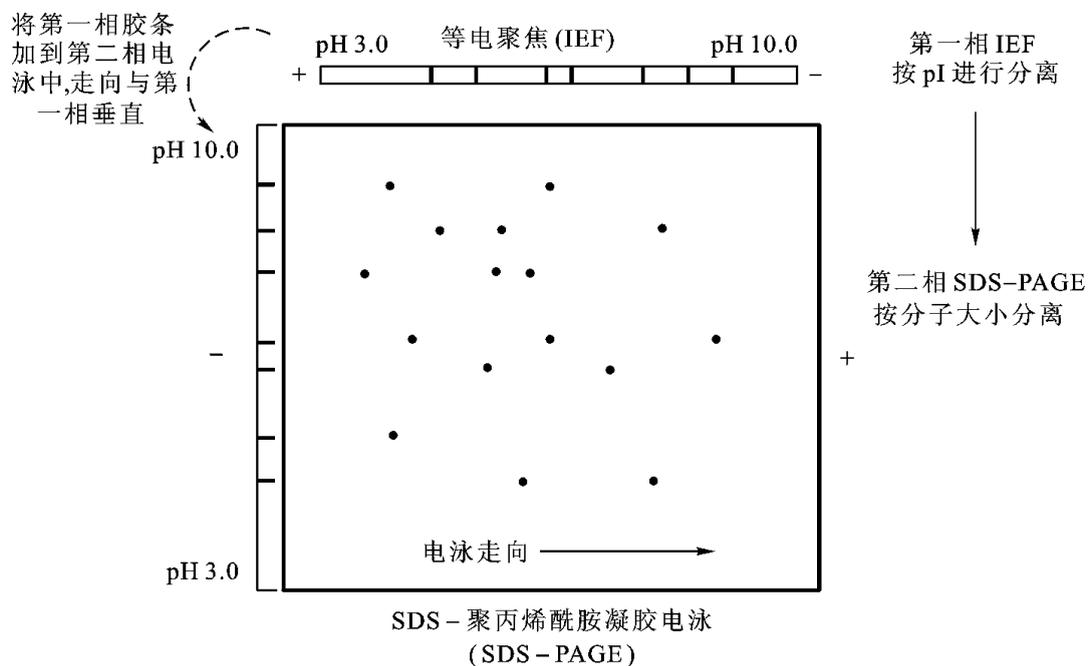


图 2-30 蛋白质的双向电泳示意图

得以分离。

4. 双向电泳

双向电泳(two-dimensional electrophoresis 2-DE)是利用不同蛋白质所带电荷和质量的差异,用两种方法、分两步进行的蛋白质电泳。第一步是以聚丙烯酰胺凝胶为支持物,在玻璃管中进行IEF,使蛋白质按其不同的等电点进行分离。第二步是将IEF的胶条取出,横放在另一平板上,进行SDS-PAGE。第二次电泳的方向与IEF垂直,使已按IEF分离的蛋白质再进行一次按其不同质量的再分离(图2-30)。2-DE的分辨率很高,可将大肠杆菌提取液分离出1400多个蛋白点,每个点基本上代表一种蛋白质。2-DE是研究蛋白质组不可缺少的工具。

第五节 蛋白质组与蛋白质组学

一、蛋白质组

蛋白质是生命活动的物质基础,生命活动主要通过蛋白质的功能来体现。遗传信息的传递与表达都需要蛋白质的参与才能实现。随着人类基因组计划的完成,人类基因组精确图的公布,生命科学已进入了后基因组时代,人们把目光转向探索蛋白质组(proteome)的工作。

蛋白质组的概念是澳大利亚学者M. R. Wilkins和K. L. Williams于1994年首先提出来的。蛋白质组是指一个组织或一个细胞中基因组所表达的全部蛋白质。更确切地说,蛋白质组是指在特定条件下,一个细胞内所存在的所有蛋白质。蛋白质组比基因组复杂得多。人们推测,人类基因组虽然包含约40000个基因,却可编码25万~50万种蛋白质。人的一种细胞内存在的蛋白质总数约为1.5万种,且不同种的细胞中所包含的蛋白质又不完全相同。所以,已知一个基因组序列并不表明可以识别这个基因组所编码的全部蛋白质和各种细胞内实际的蛋白质种类。即使基因组的序列可以用于预测其阅读框,但还是不能准确地掌握其所表达的蛋白质。这是因为基因组中各基因的序列不能反映蛋白质翻译后的剪切与加工修饰。翻译生成的mRNA经不同的剪接,可以生成不同的蛋白质序列。而且翻译后的蛋白质还存在修饰加工过程。因此,只有知道细胞在不同发育时期、不同生理和病理状态下全部蛋白质的结构与功能,才有可能最后反过来明了基因组中各基因的真正功能。

此外,同一生物个体不同体细胞中的基因组具有均一性,而蛋白质组则不同,蛋白质组具有时、空差别。在个体的发育过程的不同阶段,各种基因的表达与关闭各不相同,同一类细胞所包含的蛋白质会有质和量的差异。同一个体的不同体细胞中蛋白质的种类和数量也各不相同。组织细胞在分化过程中,正是由于不同组织细胞中基因表达的质和量的不同,各组织器官各有其特有的蛋白质,才出现千差万别的组织形态和功能表现。另外,即使是成年个体,由于组织细胞处于不同的生命活动状态(如运动、禁食、饱食等物质代谢的不同状态),同一细胞内的蛋白质成分和数量也有不同之处。此外,在病理条件下,病人发病、治疗与转归等过程中,细胞中蛋白质组也会与正常生理状态有所不同。

对于同一种蛋白质来说,在不同的生理和病理条件下,即使其一级结构不变,也可能出现空间结构的改变,并表现出不同的功能。蛋白质构象的变化不但是机体代谢调节的重要模式之一,而且如本章第三节所述的朊病毒,蛋白质构象的改变还可能引起严重的疾病。这又为蛋白质组的研究增加了复杂性。可见,蛋白质组不但比基因组的数量大,而且各组织器官的蛋白质组具有多样性、多变性和可调节性,具有不同时、空的差异和深受机体内、外条件的影响。基于上述原因,蛋白质组的概念应该体现出蛋白质组的这些特性,体现出基因表达后对蛋白质前体剪接加工和修饰的结果。

二、蛋白质组学

蛋白质组学(proteomics)研究和阐述在不同条件下 ,蛋白质组中全部蛋白质的结构、性质与功能 ,影响因素及其相互联系。蛋白质组学是在基因组学的基础上发展起来的 ,是基因组学的延续和发展。

研究基因组的目的是破解人类发生、发展与遗传的秘密。而人类的一切生命活动主要是通过蛋白质的活动实现的。基因组研究不能解决的问题可望在蛋白质组研究中找到答案。蛋白质组的研究能够在细胞和机体的整体水平上阐明生命现象的本质和活动规律 ,并将提供非常丰富且重要的数据资料 ,进一步带动生物信息学和医药产业的发展 ,为人类认识自我、保护自我、预防和战胜疾病、延年益寿等问题找到最终的答案。

蛋白质组和蛋白质组学的概念为我们描绘了一幅通向彻底了解生命奥秘的蓝图。然而 ,由于蛋白质组的特殊属性 ,我们难以绘出各种细胞在任何生理和病理条件下不断变化中的全部蛋白质的结构与功能图谱。于是人们将蛋白质组学分解出许多的“亚蛋白质组学”来进行研究。如“功能蛋白质组学(functional proteomics)”、“结构蛋白质组学(structural proteomics)”、“亚细胞蛋白质组学(subcellular proteomics)”、“疾病蛋白质组学(disease proteomics)”等。它们都是总蛋白质组学的组成部分。功能蛋白质组学是研究在特定时间、特定环境和实验条件下基因组活跃表达的蛋白质 ,即只涉及特定功能机制的蛋白质群体。例如 ,对与信号转导相关蛋白质群的研究。亚细胞蛋白质组学是从亚细胞成分的蛋白质组为切入点 ,建立各亚细胞结构(如细胞膜、细胞器、胞质的各细胞器、细胞核)的蛋白质组 ,最后完成全细胞的蛋白质组分析。疾病蛋白质组学研究心脑血管疾病、肿瘤、糖尿病、和老年病等相关的蛋白质群体 ,可以使人们从动态的、整体的角度认识这些重大疾病的机制。

用于蛋白质组研究的技术还不够完善 ,研究蛋白质组首先需分离细胞或组织中的所有蛋白质。目前主要采用高分辨率的 2 - DE(见图 2 - 30)。对此电泳谱进行扫描并加以数字化 ,再进一步进行计算机图像分析 ,包括对图谱中蛋白质的定位和认定、蛋白质浓度的确定。一张理想的 2 - DE 图谱可分辨出几千种 ,甚至上万种蛋白质 ,可成为蛋白质数据库的参考图(reference map)。此外 ,还有多相分离系统 ,如体积排阻-反相高效液相层析组合(coupled size - exclusion and RP - HPLC)、离子交换与 RP - HPLC 组合、25 °C 与 60 °C RP - HPLC 组合、RP - HPLC 与毛细管电泳组合、金属亲和层析与毛细管电泳组合等。质谱是蛋白质鉴定的核心技术之一 ,可用于测定蛋白质的相对分子质量和短肽的氨基酸序列。蛋白质芯片技术的发展可望为蛋白质组的研究提供新的技术。

蛋白质组计划是国际性的庞大工程 ,国际间的合作与交流可极大地促进这一项伟大工程的完成。生物信息学已经成为生命科学的有机组成部分。数据库、计算机网络和应用软件已经成为蛋白质组学的三大有力支撑。这些都将大大促进蛋白质组学的发展 ,加速此宏伟计划的完成。

Summary

Proteins essentially participate in all cellular processes and have many different biological functions. All natural proteins are constructed by the same set of 20 α -amino acids ,with the exception of glycine ,the only L - amino acid which exists in natural proteins. According to the polarity of the side chains in these amino acids ,amino acids can be classified as neutral (non-polar hydrophobic and polar hydrophobic) ,basic and acidic amino acids.

The primary structures of proteins refer to the sequences of the amino acids. The amino acids in a polypeptide are linked by peptide bonds. The peptide bond is planar (peptide plate) because the C—N bond has partial double-bond character. Automated Edman degradation is employed to sequence proteins. The secondary structures of proteins refer to the conformation adopted by local re-

gions of the polypeptide chains. The major elements of secondary structures are the α -helix ,the β -strand ,the β -turn ,and the random coil. Hydrogen bonds are the major linkages for stabilizing the structures. Motif refers to some arrangements of secondary structure elements that can occur in different protein structures. The tertiary structures of proteins describe the overall folding of the polypeptide chains including the spatial distribution of all atoms in the molecule. A long polypeptide strand often folds into multiple compact semi-independent regions (domains) to perform different tasks in multifunctional proteins. The quaternary structures refer to the spatial arrangements of subunits in a multisubunit complex linked by noncovalent bonds.

Collagen is one of the fibrous proteins ,which are composed of three peptides wrapping around one another with a right-handed twist holding by covalent and noncovalent cross bonds. Each peptide with repeating tripeptide sequence of Gly-Pro-Y or Gly-X-Hyp adopts a left-handed helical structure with three residues per turn.

Globular proteins are hydrophilic and soluble in water ,according to their electrostatic charges and hydration shells. Some physical and chemical factors can denature proteins by destroying the secondary bonds. The methods for separating proteins take advantage of properties such as charge ,size ,solubility ,and affinity for their special ligands ,which vary from one protein to the other.

The primary structure of a protein determines its three-dimensional structure , which determines its function. Insulin and serine proteases are good examples. The sequence comparisons cytochrome c can help people to yield taxonomic insights.

Mb and Hb function in O_2 storage and O_2 transport respectively. The major secondary structure of Mb and Hb is the α -helix. Mb is monomeric , While Hb is a tetramer of 2 subunit types ($\alpha_2\beta_2$ in adult). Heme ,the prosthetic group of Mb and Hb is a planar ,cyclic tetrapyrrole with a central Fe^{2+} . The saturation curve of Mb is hyperbolic ,whereas that of Hb is sigmoidal as a consequence of its cooperative O_2 binding. O_2 binding moves the Fe^{2+} from a position of 0.06 nm out of the heme plane to the center of the heme and causes the conformational change from T state to R state , which makes the binding of subsequent O_2 to next subunit convenient. Sick-cell anemia is a molecular disease of individuals who have a point mutation of Glu $\beta 6$ to Val. An inappropriate conformation of a protein can result in pathological conditions. Striking examples are prion diseases.

Proteome refers to the full complement of proteins of an organism coded by its genome ,or the whole proteins in an organism. Proteomics refers to the systematic study of the complete complement of proteins of organisms. Unlike genome ,proteome is not a fixed characteristic of the cell. Rather ,because it represents the functional expression of information ,it varies in different tissues ,different cell types and different cell organelles and it also changes during different developmental stages and environmental conditions. Proteome is much larger than the genome because of such factors as alternatively spliced RNA ,the posttranslational modification of proteins ,the temporal regulation of protein synthesis ,and the varying protein-protein interactions. Proteome is not static.

思 考 题

1. 组成蛋白质的氨基酸分几类？分类的依据是什么？
2. 何谓蛋白质的一级结构？一级结构与功能的关系如何？
3. 蛋白质的空间结构分几个层次？各有何结构特点？
4. 结合肌红蛋白和血红蛋白的空间结构 ,说明蛋白质的空间结构与功能的关系。

5. 蛋白质的理化性质如何,如何利用这些理化性质进行蛋白质的分离与纯化?
6. 为什么说蛋白质组比基因组复杂?

(赵宝昌)

第三章 糖 复 合 物

本章教学要求

- 聚糖的基本结构单位——单糖的结构及连接方式
- 糖蛋白的种类、结构和主要功能
- 蛋白聚糖的分子组成、种类和主要功能
- 鞘糖脂的结构及主要功能

糖以共价键与蛋白质或脂质结合,形成糖复合物(glycoconjugates),包括糖蛋白(glycoprotein)、蛋白聚糖(proteoglycan)和糖脂(glycolipid)。英语中常以前缀glyco-或后缀-glycan和-saccharide表示分子中含有糖组分或与糖有关。哺乳类动物体内含多种结构不同的糖,有些单独参加糖的代谢(见第六章),有些则构成糖复合物中的聚糖。像核酸和蛋白质一样,聚糖及糖复合物是一类重要的生物大分子。由于糖的结构和功能十分复杂并受到分析方法的限制,使得对糖的认识仍滞后于核酸和蛋白质。糖生物学(glycobiology)是研究糖的分子结构、合成及生物功能的新兴学科。核酸和蛋白质的研究成就,极大地推动了糖生物学的快速发展。糖组学(glycomics)是人类后基因组计划的重要组成部分,随着糖结构和功能的阐明,聚糖及糖复合物在正常生理和疾病中的作用及其机制将逐步被揭示出来,并促进糖在生物医学中的应用。

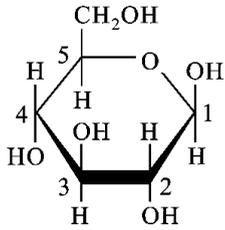
第一节 聚糖的结构

现已知生物体内有400~500种单糖结构及功能不同的聚糖,95%以上的聚糖存在于糖复合物中。聚糖一般含2~30个单糖,并通过特定的糖苷键连接成链式结构,因此,聚糖也称为寡糖链或糖链。单糖是聚糖的基本结构单位。

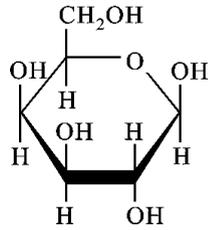
一、聚糖分子中单糖组分的种类及结构

除岩藻糖(fucose, Fuc)和艾杜糖醛酸(iduronic acid, IdoUA)为L-构型外,哺乳类动物中的单糖都是以D-构型存在,而绝大多数参与糖链合成和分解代谢的酶类具有对D-构型的糖的立体异构专一性。单糖通过氧化、还原、乙酰化和N-乙酰化、硫酸化、磷酸化、甲基化及氨基取代反应等生成相应的糖衍生物。例如,葡萄糖(glucose, Glc)的衍生物有葡糖胺(glucosamine, GlcN)、N-乙酰葡糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)、葡糖醛酸(glucuronic acid, GlcUA)等。GlcUA在差向异构酶的作用下,可进一步转化为IdoUA。半乳糖(galactose, Gal)也可衍生成N-乙酰半乳糖胺(N-acetylgalactosamine, GalNAc)和岩藻糖。糖核苷二磷酸,如UDP-GlcNAc,是糖链合成时单糖供体的活性形式,它在特异的GlcNAc糖基转移酶的(glycosyltransferase)作用下,转移到糖链的非还原端。各单糖组分的修饰性变化可增加聚糖结构的多样性,并使其具有更广泛的生物功能。

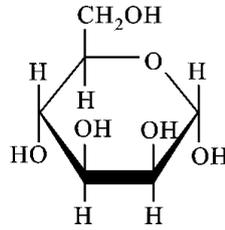
构成不同糖复合物分子糖链的单糖种类不同。例如,构成糖蛋白分子糖链的单糖主要有8种:葡萄糖、半乳糖、甘露糖、N-乙酰葡糖胺、N-乙酰半乳糖胺、岩藻糖、木糖(xylose, Xyl)和唾液酸(sialic acid, SA)。参与蛋白聚糖分子糖胺聚糖构成的单糖主要为葡萄糖、半乳糖、N-乙酰葡糖胺、N-乙酰半乳糖胺、葡糖醛酸及艾杜糖醛酸(见本章第三节)。参与糖复合物糖链构成的常见的单糖结构如下,单糖的代表符



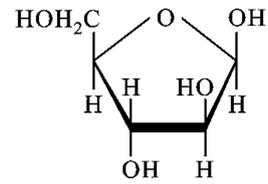
β -D-葡萄糖
(Glc, ▲)



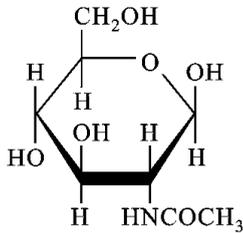
β -D-半乳糖
(Gal, ●)



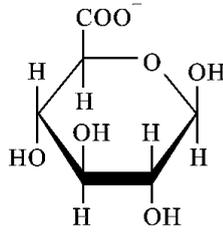
α -D-甘露糖
(Man, ○)



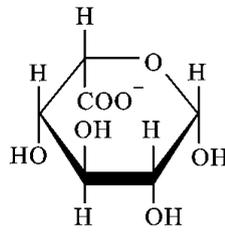
β -D-木糖
(Xyl, ▽)



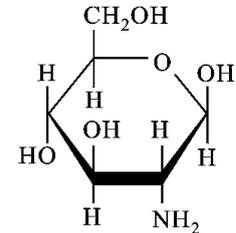
β -D-N-乙酰葡萄糖胺
(GlcNAc, ■)



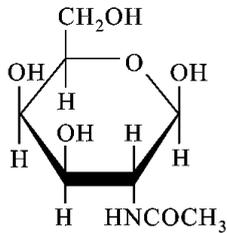
α -D-葡萄糖醛酸
(GlcUA, ◆)



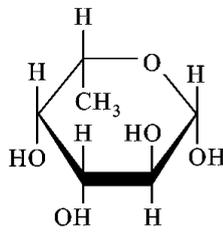
α -L-艾杜糖醛酸
(IdoUA, ◆)



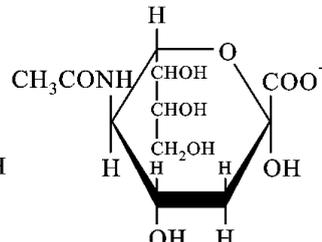
β -D-葡萄糖胺
(GlcN)



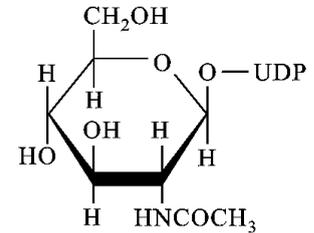
β -D-N-乙酰半乳糖胺
(GalNAc, □)



α -L-岩藻糖
(Fuc, △)



唾液酸
(SA, ◆)



β -D-N-乙酰葡萄糖胺-尿苷二磷酸
GlcNAc-UDP

号也在括号中标明。

二、单糖的连接方式

构成聚糖的基本结构单位——单糖之间的连接键为 O-糖苷键。由于以环状结构存在的单糖分子有 α 和 β 异头物 (anomer) ,并在分子中含有多个游离的羟基,因此,单糖之间所形成的 O-糖苷键可有 α 或 β 及 1 \rightarrow 2, 1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6 等多种连接方式。唾液酸一般位于糖链的末端,以 α 2 \rightarrow 3, α 2 \rightarrow 6 或 α 2 \rightarrow 8 与相邻的糖基成键。构成不同糖复合物糖链的单糖的种类、数目及连接方式不同,有些糖链还可以有分支,还有一些则含有大量的重复单位。与多肽链和多核苷酸链相比,糖链的连接具有更大的可塑性及复杂性,但仍是有序的,这也是糖链可以储存大量信息的结构基础(表 3-1)。

表 3-1 三种生物大分子一些结构特点的比较

生物大分子	核酸	蛋白质	聚糖
结构单位	核苷酸	氨基酸	单糖
连接键	3' 5'-磷酸二酯键	肽键	糖苷键
游离末端	5'磷酸 3'羟基	氨基端 羧基端	还原端 非还原端
多聚体合成方向	5' \rightarrow 3'	N \rightarrow C	还原端 \rightarrow 非还原端
寡聚体数* (n=3)	6	6	>1 056

(* 由 3 个不同氨基酸、核苷酸和己糖分别通过肽键、磷酸二酯键和糖苷键所组成的寡聚体数目)

三、聚糖的一级结构及空间结构

聚糖的一级结构是指单糖的排列顺序及糖苷键的性质。糖苷键的性质包括单糖的连接位置, D 或 L, α 或 β , 及吡喃糖和呋喃糖构型等。—SO₃⁻, CH₃CO⁻, —NH₂ 等非糖基团及蛋白质和脂质的结合位置也在聚糖的一级结构中给予描述。

聚糖的二级结构涉及糖环构象、糖苷键旋转角度及各原子之间的相互作用等。由于糖样品不易纯化, 结构非常复杂, 目前对于聚糖较高级的空间结构规律的认识尚不够清楚。但认识糖一级结构和空间结构对了解糖的生物功能是非常重要的。

聚糖一级结构的测定可选择质谱(MS)、核磁共振(NMR)和 HPLC 等多种仪器分析方法。特异水解聚糖的糖苷酶(glycosidase)是聚糖一级结构测定中常用的工具酶。糖苷酶包括内糖苷酶(endoglycosidase)和外糖苷酶(exoglycosidase)。两种聚糖水解酶作用的位点不同, 内糖苷酶将糖链从内部特异的切开, 而外糖苷酶则从糖链的非还原端特异的水解糖基。图 3-1 是应用基质辅助激光离子解吸时间飞行/质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight, MALDI-TOF/MS)技术, 对一个 N-连接聚糖经不同种外糖苷酶(唾液酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶)逐步水解作用后的荧光标记产物进行的测序分析。

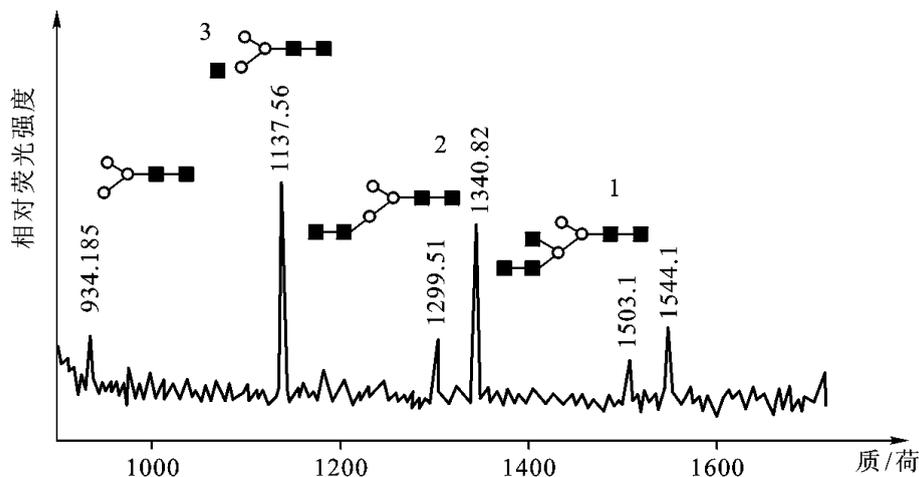


图 3-1 寡糖 MALDI-TOF/MS 测序分析

还有一些其他的生物学方法可用于聚糖的结构分析, 如根据对各种³H 或¹⁴C 标记的单糖放射性前体掺入糖链合成的放射性分析, 可了解糖链结构及合成的特点。化学合成的寡糖、糖抑制剂及糖特异抗体的应用也有助于特定聚糖结构的分析。凝集素(lectin)是一类通过分子中的糖识别结构域(carbohydrate recognizing domain, CRD), 专一识别和结合特定糖基及糖链结构的糖蛋白, 以多种凝集素为探针的糖微阵列技术, 为同时鉴定糖链的多种结构特征提供了更便捷、更有效的方法。有关糖结构分析的网站是了解聚糖结构信息的重要来源。总之, 随着各种糖分析技术的提高及糖相关研究的深入, 对聚糖结构的认识会更加明确。

第二节 糖蛋白的结构与功能

糖蛋白由糖与蛋白质通过共价键连接形成。糖蛋白分子中糖的含量变化很大(1% ~ 85%)。糖蛋白分布广泛, 许多膜蛋白、分泌蛋白及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中的一些结构蛋白等都是糖蛋白。糖蛋白以多种方式, 如酶、载体、激素、抗体、受体和血型抗原等发挥生物学功能。糖蛋白的糖链对整个分子的性质、结构和功能起重要作用。聚糖不仅作为一种结构分子, 而且作为一种信息分子, 参与细胞

间、细胞与细胞外基质间的分子识别和黏附。糖基化(glycosylation)是蛋白质重要的加工和修饰步骤,糖基化的异常可导致多种疾病的发生,如肿瘤、感染和自身免疫病等。

一、糖蛋白的分类与结构

根据糖与蛋白质连接的结构性质,糖蛋白分为三类:N-连接糖蛋白、O-连接糖蛋白和 GPI-连接(锚定)糖蛋白,它们的结构和特点如下:

(一) N-连接糖蛋白

糖链的 N-乙酰葡萄糖胺与多肽链的天冬酰胺的酰胺氮连接,形成 N-糖苷键,此种糖链为 N-连接糖链,也称 N-连接聚糖。连接点的结构为:GlcNAc β -N-Asn(图 3-2-1)。多肽链中的天冬酰胺残基并不都是糖链的结合部位,处于 Asn-X-Ser/Thr 序列子(其中 X 是除脯氨酸外的任一氨基酸)中的 Asn 才具有结合能力,序列子也被称为糖基化位点,可通过蛋白质的序列分析预测。

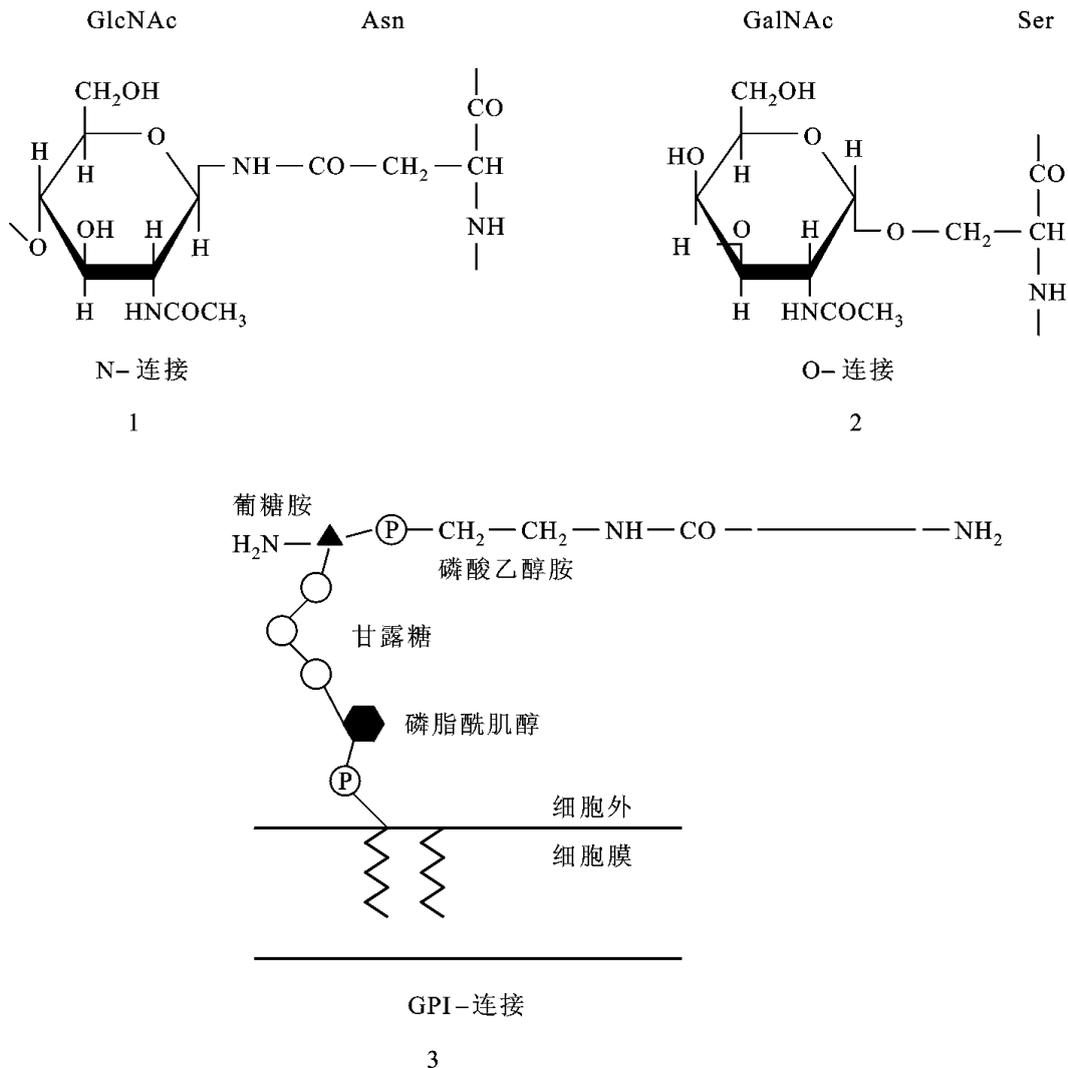


图 3-2 糖链与多肽链连接点的结构

N-连接糖链是糖蛋白糖链最主要的类型,已经发现有上百种。N-连接糖链又可分为三种亚型:高甘露糖型(high-mannose type)、复杂型(complex type)和杂合型(hybrid type)。它们都有一个共同的五糖核心结构($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$),但与核心结构相连的外侧链结构不同(图 3-3)。高甘露糖型糖链的外侧链为 2~6 个甘露糖。大多数复杂型的外侧链可出现 2~5 个糖链分支,分支末端常连有唾液酸。根据其形状、变调性及可作为识别标志等特点,称之为糖链的天线结构。例如,人血清转铁蛋白含有二天线和三天线糖链结构,是反映体内蛋白质糖基化整体水平的一个测定指标。杂合型的糖链则兼有以上二者的结构,多见

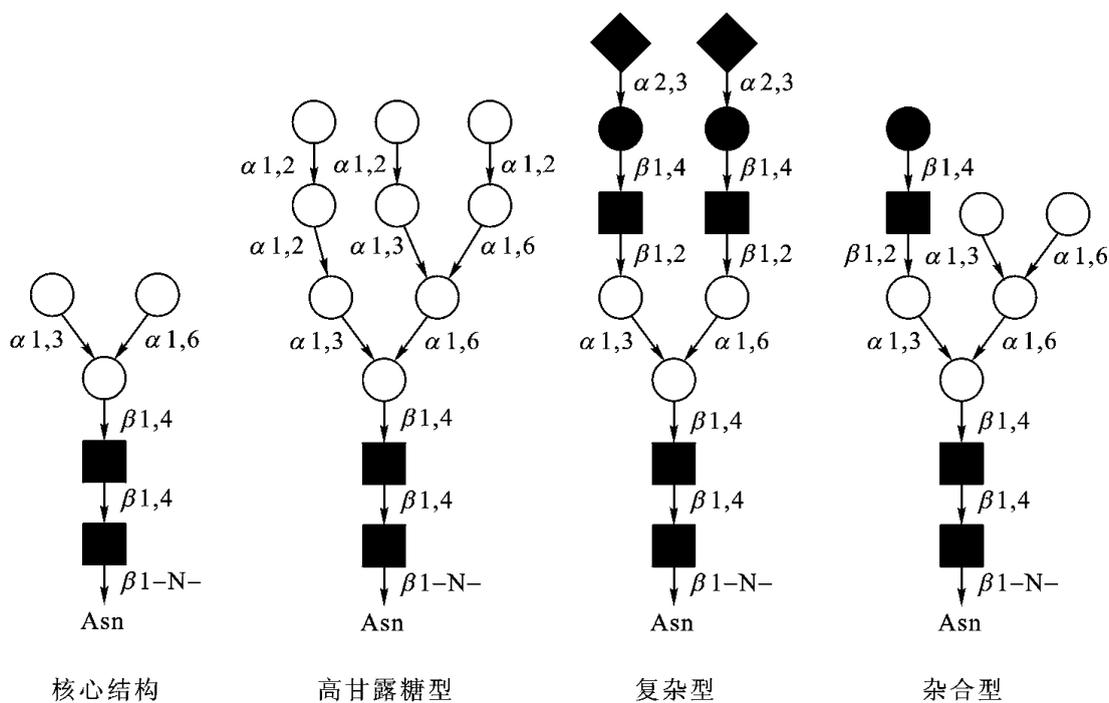


图 3-3 N-连接糖链结构

于膜蛋白和分泌蛋白。

免疫球蛋白 IgG 在两条重链 Fc 段 C_H2 的 Asn297 位点上各结合一条 N-连接糖链。糖链可有 30 余种不同的结构变化,对维持 IgG 分子的空间构象起重要作用(图 3-4)。

(二) O-连接糖蛋白

糖链的 N-乙酰半乳糖胺与多肽链的丝氨酸或苏氨酸的羟基连接,形成 O-糖苷键,糖链即为 O-连接糖链,也称 O-连接聚糖。连接点的结构为:GalNAc α-O-Ser/Thr(图 3-2-2)。此种 O-连接类型较为常见,最初在颌下腺、消化道及呼吸道等的黏液中发现,因而又称黏蛋白型糖蛋白连接。胶原蛋白中存在 Gal β-O-Lys 糖链连接方式,是原胶原蛋白的一个重要的翻译后加工步骤。O-连接糖链多出现在丝氨酸和苏氨酸比较集中,且周围常有脯氨酸的肽链中。例如,免疫球蛋白 IgA 重链铰链区糖基化位点及附近的氨基酸序列为:Pro-Ser-Thr(225)-Pro-Pro-Thr(228)-Pro-Ser(230)-Pro-Ser(232)-Thr-Pro-Pro-Thr(236)-Pro-Ser-Pro-Ser。IgA 分子的 O-连接糖链已经发现有 6 种(图 3-5)。

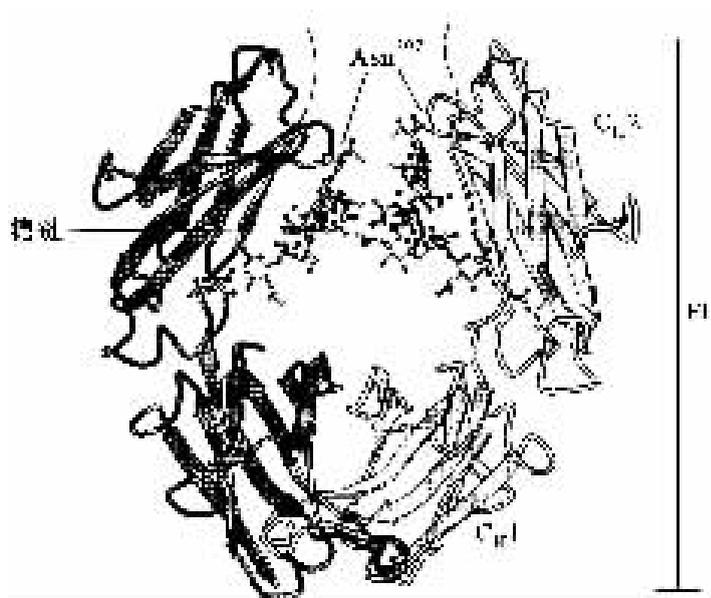


图 3-4 IgG 分子铰链区糖链的空间结构

黏蛋白(mucins)是一类结合有成簇状存在的 O-连接糖链的糖蛋白家族,含糖量超过 50%,多肽链中富含丝氨酸和苏氨酸的串联重复序列。黏蛋白有分泌型和膜结合型两种。其中,分泌型的主要见于黏液中,由于分子中所结合的唾液酸和硫酸基带较多的负电荷,及 O-连接点附近的糖链与多肽链的相互作用,使得分泌型的黏蛋白的结构非常伸展,也带来黏液的高黏滞度。因此,分泌型的黏蛋白可作为上皮表面的一种天然保护性屏障。膜结合型的黏蛋白参与了一些细胞间的识别和黏附作用。

糖蛋白一般可结合 1~30 条糖链,每条糖链含 2~30 个糖基,如人促红细胞生成素(erythropoietin,

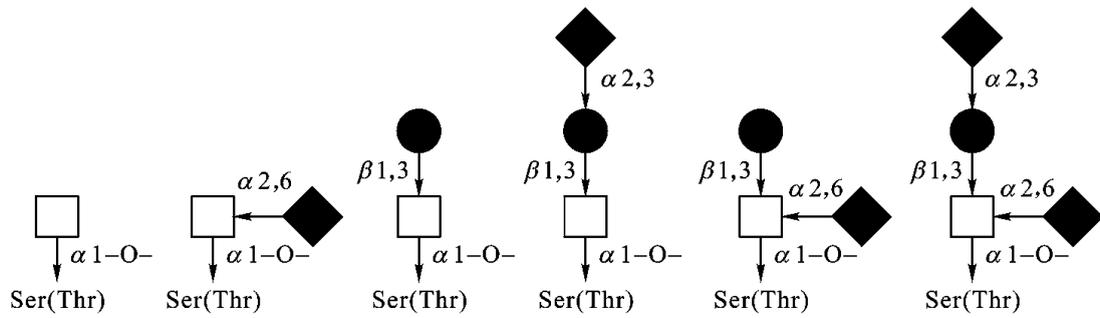


图 3-5 IgA 分子 O-连接糖链结构

Epo)有三个结合于 Asn24、38 和 83 位点的 N-连接糖链和一个与 Ser126 连接的 O-连接糖链。蛋白质常有多个潜在的糖基化位点,如 IgA 的 5 个糖基化位点中,Thr(225)和 Thr(236)仅为潜在的糖基化位点。对于同一个糖基化位点,是否连接糖链,及所结合糖链的长短等与组织类型及表达阶段有关。蛋白质肽链相同,但所结合的糖链不同的一组糖蛋白为糖型(glycoforms)。

(三) GPI-连接(锚定)糖蛋白

糖磷脂酰肌醇(glycophosphatidylinositol,GPI)与多肽链连接,此类蛋白质称为 GPI-连接糖蛋白或 GPI-锚定糖蛋白。GPI 的结构为:磷酸乙醇胺-甘露糖-甘露糖-甘露糖-葡萄糖胺-磷脂酰肌醇(图 3-2-3)。GPI 一端通过磷酸乙醇胺的氨基与肽链的 C 末端的羧基以酰胺键连接,另一端则将磷脂酰肌醇的脂酸链插入质膜。已经发现约 50 余种 GPI-连接糖蛋白,如脂蛋白脂肪酶、乙酰胆碱酯酶和 5'-核苷酸酶等。这种被连接于细胞膜外层的蛋白质比其他类型的膜内在蛋白具有更大的活动度,并可在磷脂酰肌醇特异的磷脂酶作用下从膜上被释放出来。

二、糖蛋白的功能

糖蛋白的生物功能十分广泛,包括组织构成、底物催化、分子转运、润滑保护及分子识别和黏附等,其中许多重要功能的发挥与其糖链的作用密切相关。糖链对糖蛋白的理化性质、空间结构和生物活性等产生较大的影响,糖链的序列及构象中蕴藏着结构信息,通过糖-糖及糖-蛋白分子之间直接或间接的相互作用,参与了细胞间、细胞与细胞外基质间的分子识别和黏附,是糖蛋白极为重要的功能,以下将着重介绍糖链及糖蛋白结构和功能的关系,这对探讨糖相关性疾病的发病机制及将糖应用于生物医学具有重要意义。

(一) 糖链对糖蛋白理化性质、空间结构和生物活性的影响

蛋白质结合糖链后,其分子大小、电荷、溶解度及稳定性等会发生改变,如含多唾液酸糖链的糖蛋白的电负性增加,IgA 分子去掉部分糖链后则出现分子聚集现象,并易受蛋白酶的降解。糖链还参与了糖蛋白新生肽链的折叠、亚基聚合及分拣和投送等过程。如运铁蛋白受体上 Asn251 糖基化位点经基因突变去除后,不能形成正常的二聚体,影响其转运功能。溶酶体内酶类的定位,需要在高尔基体内将酶的 N-连接糖链末端的甘露糖转变成 6-磷酸甘露糖,并与溶酶体膜上的 6-磷酸甘露糖特异受体结合。含非磷酸化甘露糖糖链的溶酶体酶不能进入溶酶体,引起溶酶体酶缺乏性代谢病。一些酶类的活性依赖于其糖链的存在,HMG-CoA(羟甲戊二酰辅酶 A)还原酶去糖链后活性降低 90% 以上。FSH(促卵泡素)、LH(促黄体素)和 TSH(促甲状腺素)等多种糖蛋白类激素的糖链直接影响激素与相应受体的亲和力和作用效应。

(二) 糖蛋白在分子识别和黏附中的作用

1. 糖蛋白在细胞间分子识别和黏附中的作用

受精是卵细胞与精子识别并融合的过程。小鼠卵细胞透明带中含 ZP1、ZP2、ZP3 三种糖蛋白。ZP3 是与精子结合并引发顶体反应的主要糖蛋白。ZP3 含有 O-连接聚糖,用化学方法去除 O-连接聚糖可抑

制精卵结合, 而用内切糖苷酶 F 切去 N-连接聚糖却没有影响, 加入 UDP-半乳糖也可以阻断精卵结合。

炎症浸润是循环中的白细胞被招募到炎症部位的血管内皮细胞上, 滚动(rolling)、黏附和透出血管的过程, 与内皮细胞表面的选凝素(selectin)和白细胞上的特异糖配体的识别和结合有关(图 3-6)。选凝素是含糖识别结构域(CRD)的凝集素样糖蛋白, 包括 L-、E-和 P-选凝素三种, 主要分布于白细胞(L-选凝素)、内皮细胞(E-选凝素)和血小板(P-选凝素)。与选凝素特异结合的糖配体是唾液酸化的 Lewis 抗原(SLe^x , SLe^a)。血管内皮细胞的 E-选凝素在炎症时表达增加, 它通过 CRD 与白细胞的 SLe^x 、 SLe^a 等结合引起初始阶段较弱的黏附, 后期有多种其他分子参与两种细胞间较强的黏附。淋巴细胞归巢(homing)是淋巴细胞从循环中再回流到淋巴组织的过程, 所涉及的糖配体-选凝素识别和结合过程与炎症浸润过程相似。

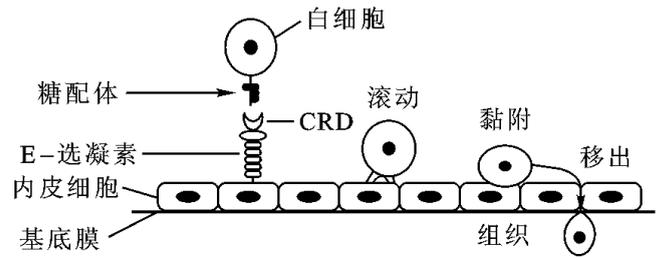


图 3-6 白细胞与内皮细胞的分子识别

2. 糖蛋白在细胞与细胞外基质间分子识别和黏附中的作用

细胞外基质中和细胞表面含有多种细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs), 它们几乎都是糖蛋白。ECM 是细胞黏着并进行细胞内外代谢交换和信息传递的外环境, 主要由糖蛋白(胶原蛋白、弹性蛋白、纤连蛋白、层连蛋白)、蛋白聚糖和透明质酸等构成, 纤连蛋白(fibronectin, Fn)和层连蛋白(laminin, Ln)是 ECM 中的黏附分子。细胞表面的黏附分子为跨膜受体, 包括整合蛋白(integrin)、钙黏蛋白和免疫球蛋白超家族等。以下仅简要介绍 Fn 和 Ln 及整合蛋白的分子结构和功能。

(1) 纤连蛋白 纤连蛋白是 ECM 的主要糖蛋白成分, 由成纤维细胞分泌。Fn 的相对分子质量为 220 000 ~ 250 000, 由两个相似的亚基组成二聚体, 以羧基末端的两个二硫键连成“V”形结构。每个亚基上特定的重复区折叠构成 7 个球状的结构域, 可分别与 ECM 中的多种成分和细胞结合(图 3-7) 结构域之间的肽段对蛋白酶敏感。Fn 含 RGD(Arg-Gly-Asp)序列, 并通过它与细胞膜上特异的整合蛋白受体结合, 人工合成的 RGD 短肽可抑制 Fn 与受体的结合。Fn 的含糖量为 5% ~ 20%, 每个亚单位上可有 4 ~ 5 个 N-连接糖链, 集中分布在与胶原蛋白结合的结构域内, 其影响 Fn 与胶原蛋白的结合力及对蛋白酶的抗性。存在于 ECM 中或细胞表面的 Fn 为不溶性的 Fn 纤维, Fn 还有存在于血液和体液中的溶解形式。不同组织来源的 Fn 糖链结构有差别。Fn 与肝素、纤维蛋白、胶原蛋白、DNA、细胞及与肌动蛋白和蛋白聚糖等的结合, 可引发一系列细胞内和细胞外的变化。因此, Fn 的组织分布和结构特点决定了 Fn 是具有多种生物学功能的糖蛋白, 参与细胞的增殖、分化和迁移、血液凝固、炎症浸润等多种过程。

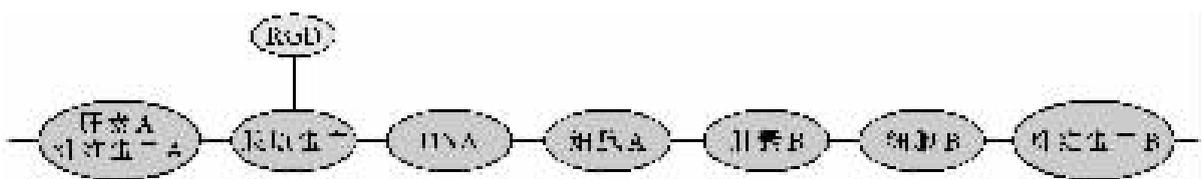


图 3-7 纤连蛋白的结构域示意图

(2) 层连蛋白 层连蛋白主要存在于基底膜中。基底膜也是 ECM 的一种形式, 除 Ln 外, 还包括巢蛋白(entactin, nidogen)、硫酸肝素蛋白聚糖和 IV 型胶原等。Ln 的相对分子质量为 850 000 ~ 900 000。Ln 分子由 3 个不同的亚基(α β γ)通过二硫键连接形成长约 70 nm 的十字型结构(图 3-8)。目前已经发现每种亚基又有 3 ~ 5 个类型, 可组合成多种 Ln 分子。Ln 结构中有与 Ln 受体结合的 RGD 序列, 这类 Ln 受体也为整合蛋白家族成员。Ln 还有巢蛋白、硫酸类肝素蛋白聚糖(主要为串珠蛋白聚糖, perlecan)、IV 型胶原及细胞的结合区。这些分子通过 Ln 相互交织, 构成基底膜的网状结构; Ln 与上皮细胞及内皮细胞的结合, 有助于将这些细胞黏着和固定于基底膜上。Ln 对肾小球基底膜的结构及滤过功能起重要作用。Ln

含糖为 12% ~ 15% ,主要为 N-连接糖链。用 N-连接糖链合成抑制剂衣霉素处理后的 L_n ,则对体外培养细胞的铺展性生长起抑制作用。已经发现 ,L_n 有促进多种肿瘤细胞生长、浸润和转移的作用。除上述提到的整合蛋白受体外 ,与 L_n 结合的还有一类非整合蛋白受体 ,可识别 L_n 分子中的寡糖 ,如细胞膜表面的 $\alpha 1 4$ -半乳糖基转移酶。

(3) 整合蛋白 整合蛋白广泛存在于各种细胞膜上 ,是由 α 和 β 两个亚基构成的异二聚体糖蛋白 α 和 β 亚基的相对分子质量为 90 000 ~ 180 000。 α 亚基有 24 种 β 亚基有 9 种 ,它们所组成的整合蛋白家族是根据 β 亚基分类的 ,如最大的 β_1 整合蛋白家族有 $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$,及 $\alpha_3\beta_1$ 等 12 种。整合蛋白结构分为胞外、跨膜和胞内三部分(图 3-9) β 亚基胞外部分含丰富的二硫键 ,形成较紧密的折叠结构 , α 亚基上有二价阳离子(Ca^{2+} , Mg^{2+})的结合部位 ,并有一个链内二硫键。整合蛋白通过 α 和 β 亚基的胞外部分形成的特异结合区与 ECM 中含 RGD 的黏附分子结合 ,如 $\alpha_1\beta_1$ 与 L_n 和胶原 $\alpha_5\beta_1$ 与 F_n ,及 $\alpha_6\beta_1$ 与 L_n 间的特异结合等。整合蛋白还通过胞内部分与细胞骨架蛋白结合 ,参与细胞黏着斑的构成 ,并介导多种信号转导途径。整合蛋白主要含 N-连接聚糖 ,对维持分子空间构象等有作用。如 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白可分别用 α_5 或 β_1 亚基单克隆抗体以二聚体的形式沉淀出来 ,而用内切糖苷酶切去亚基的聚糖后 ,则两种单抗只能沉淀各自的 α_5 或 β_1 单体。当 β_1 亚基糖基化降低后 ,则使整合蛋白与 F_n 和 L_n 的结合能力减弱。整合蛋白是细胞内外双向交流的桥梁 ,通过所介导的多种信号转导途径引起细胞的多种生物学功能变化。

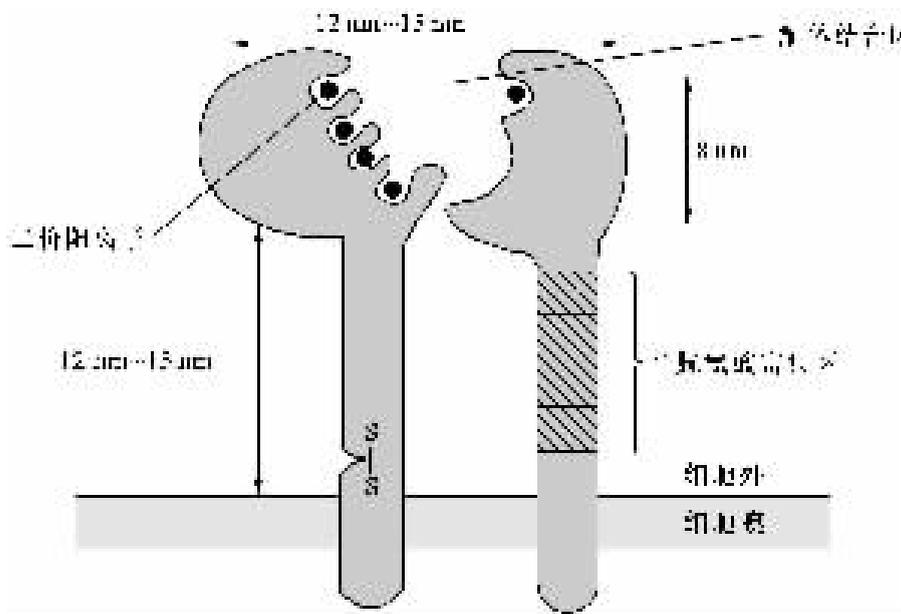


图 3-9 整合蛋白的分子结构示意图

(三) 糖蛋白与医学

目前 ,已经发现许多疾病的发生与糖蛋白糖链的合成和降解、结构和功能的异常密切相关。

例如 ,糖蛋白糖链的降解是溶酶体内多种特异的外切糖苷酶和内切糖苷酶逐步水解的过程(图 3-10)。糖苷酶基因的遗传性缺陷或酶活性降低 ,均可使其未完全降解的糖代谢产物在体内堆积 ,引起多种代谢病。如唾液酸酶或岩藻糖酶的异常 ,可引起相应的唾液酸过多症和岩藻糖过多症。

ABO 血型系统中的抗原为 A、B 和 O(H) ,是连接于糖蛋白和糖脂上的寡糖链。三种抗原结构的差别仅在于 A 和 B 抗原比 O 抗原的糖链末端各多一个 GalNAc 或 Gal(图 3-11)。添加 GalNAc 和 Gal 的是 GalNAc 糖基转移酶和 Gal 糖基转移酶 ,二者分别由位于 9 号染色体的 A 等位基因和 B 等位基因编

码。因此,遗传基因的不同是决定血型的分子基础。血型不同的输血可引起溶血反应。

一些致病微生物的凝集素样物质——黏附素(adhesin)对宿主细胞表面糖结构(配体)的识别和结合,是引起感染的必要因素。例如,肺炎球菌主要识别细胞表面的GlcNAc。自身免疫病,如类风湿关节炎和IgA肾病有相似的发病机制,二者分别有IgG和IgA分子糖链末端唾液酸和半乳糖的缺失,机体将糖链截短的IgG或IgA视为“异己”,并产生相应的自身抗体,所形成的免疫复合物又在关节腔或肾系膜沉积,进而造成病理性损伤。

肿瘤细胞表面糖链可有多种改变,如出现N-聚糖中 $\beta-1,6$ 分支增加等天线数目和结构的改变, SLe^x及 SLe^a含量增加等。它们与肿瘤的生长、侵袭和转移等密切相关。研究发现,肿瘤细胞表面糖链的变化主要是由于相关的糖基转移酶的异常所致。目前,在人类已经发现了300余种糖基转移酶。

依据糖的功能及作用机制所研制的糖类药物和疫苗不断出现。通过基因工程方法生产糖蛋白类药物是现代生物制药的一个标志性成就。重组糖蛋白类药物,如Epo、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子及组织纤溶酶原激活物等分子中的聚糖对其整个分子的结构、稳定性、作用及药代动力学等有很大的影响。因此,控制糖蛋白的糖基化,保证重组糖蛋白具有天然糖蛋白的功能,或通过糖基化条件的优化来延长药物在血液中的半衰期及实现特异组织的靶向等,已经成为药物设计和生产中的关键要素。糖链的唾液酸化程度对于许多重组糖蛋白都非常重要。例如,Epo的三条N-糖链为唾液酸化的,唾液酸化不足的Epo在体内的活性低于其在体外活性的10%,这与前者容易被肝细胞及巨噬细胞中的受体结合,及很快地在肾中被滤过清除,而使有效浓度降低有关。糖类药物包括阻止致病微生物及毒素与宿主细胞黏附、参与血液凝固调节、抑制炎症反应和抗移植排斥反应的聚糖或聚糖模拟物等。由乙型嗜血流感杆菌(*Haemophilus influenzae*)的聚糖和蛋白质载体偶联所制备的细菌疫苗(Hib),可使易感幼儿的发病率降低95%以上。糖在生物医药中的应用显示出广阔的前景。

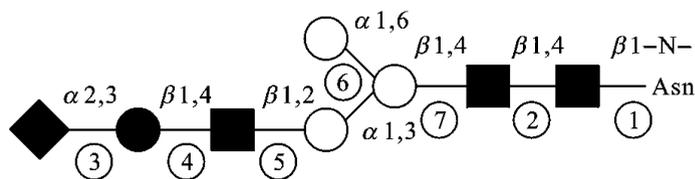


图3-10 糖苷酶对N-糖链的降解作用

① 内切糖苷酶 F ② 内切糖苷酶 H ③ 唾液酸酶 ④ β -半乳糖苷酶 ⑤ β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶 ⑥ α -甘露糖苷酶 ⑦ β -甘露糖苷酶

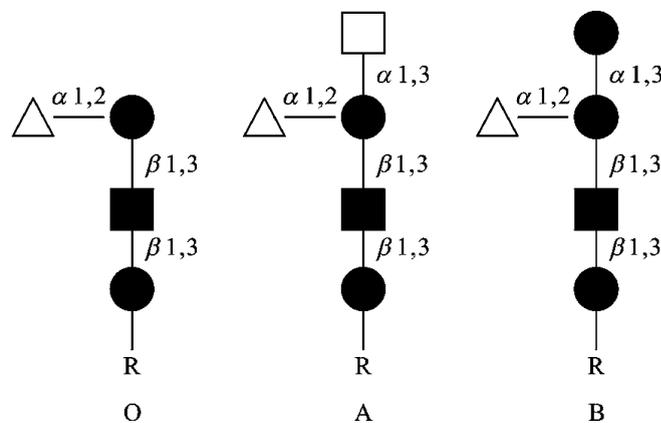


图3-11 ABO血型的糖抗原结构

第三节 蛋白聚糖

蛋白聚糖(proteoglycan)是由糖胺聚糖(glycosaminoglycan,GAG)和核心蛋白通过共价键连接所形成的糖复合物。蛋白聚糖分子中含大量的糖(>85%),因此,整个分子主要表现聚糖的性质。糖胺聚糖和核心蛋白结构与特性的不同,使蛋白聚糖的种类、性质、组织分布及功能等各异。

一、蛋白聚糖的结构

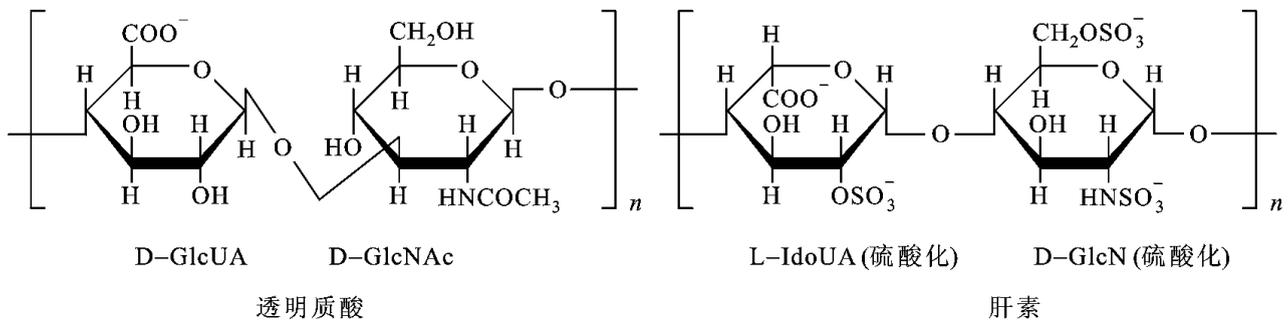
(一) 糖胺聚糖

糖胺聚糖是己糖胺和己糖醛酸二糖重复单位的聚合物,无分支。己糖胺(糖胺聚糖由此命名)为GlcNAc或GalNAc,己糖醛酸为GlcUA或IdoUA。糖胺聚糖主要有6种:透明质酸(hyaluronic acid,HA)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate,CS)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate,DS)、硫酸角质素(keratan sulfate,KS)、肝素(heparin,Hp)和硫酸类肝素(heparan sulfate,HS)。各种GAG的结构及分布特点见表3-2。

各种 GAG 结构间的主要差别为二糖单位组成、GlcUA/IdoUA 比例及硫酸化程度不同。除 HA 和 KS 外, GAG 都含 GlcUA 和 IdoUA。表 3-2 中仅列出主要的糖醛酸类型。KS 不含糖醛酸, 二糖单位为 Gal 和 GlcNAc, 由于此二糖单位在结构上与乳糖类似, 仅 GlcNAc 代替了 Glc, 因此, 又称为乳糖胺。其他的 GAG 都含 GlcUA 和 IdoUA。GAG 常见的硫酸化部位为己糖胺的 C4、C6 及 C2, 或己糖醛酸的 C2 (N-硫酸化), 但透明质酸是个例外, 为非硫酸化 GAG。KS I/II 型的差别在于 GAG 与蛋白多肽链的连接方式, 分别为 N-连接和 O-连接。肝素在 C2-N 和 C6 上有硫酸基, 肝素的 IdoUA 及 C2-N 硫酸化程度均高于硫酸类肝素。这些是区别肝素与硫酸类肝素的重要标志。GAG 的相对分子质量都很大, 二糖单位的重复次数一般在 30~100 次, 透明质酸的二糖重复单位可达 2.5 万次。

表 3-2 糖胺聚糖的结构和分布特点

糖胺聚糖	二糖单位	硫酸化位置	组织分布
透明质酸 (HA)	GlcUA, GlcNAc	无	关节滑液, 玻璃体, 结缔组织
硫酸软骨素 (CS)	GlcUA, GalNAc	C4, C6	骨, 软骨, 角膜
硫酸皮肤素 (DS)	IdoUA, GalNAc	C2, C4, C6	皮肤, 血管
硫酸角质素 (KS) I/II	Gal, GlcNAc	C6	角膜, 结缔组织
肝素 (Hp)	IdoUA, GlcN	C2, C6, C2-N	肥大细胞
硫酸类肝素 (HS)	GlcUA, GlcN	C2, C6, C2-N	皮肤, 成纤维细胞, 血管



(二) 核心蛋白

与糖胺聚糖共价结合的多肽链称核心蛋白。核心蛋白的种类很多, 并已经被克隆和测序。核心蛋白含糖胺聚糖结合结构域, 有些还有特殊功能的结构域, 如蛋白聚糖通过核心蛋白的特殊结构域锚定在细胞表面或细胞外基质的大分子中。

丝甘蛋白聚糖 (serglycin) 的核心蛋白主要含丝氨酸和甘氨酸 (Ser-Gly 序列) 约 2/3 的 Ser 结合有肝素, 主要存在于肥大细胞的颗粒中, 是一种典型的细胞内蛋白聚糖。

(三) 糖胺聚糖和核心蛋白的连接

除透明质酸游离存在外, 其余糖胺聚糖均以蛋白聚糖的形式存在。与核心蛋白的连接具有糖蛋白中糖链和多肽链类似的 N-糖链和 O-糖链的方式。GAG 中, CS、DS、Hp 和 HS 与核心蛋白连接点的结构为: GlcUA-Gal-Gal-Xyl-Ser, 为蛋白聚糖型 (Xyl β -O-Ser) 的 O-连接。KS I 型和 II 型通过 N-糖链和 O-糖链与核心蛋白相连。有些蛋白聚糖含一条 GAG 链, 如饰胶蛋白聚糖 (decorin); 有些则含多条 GAG 链, 如可聚蛋白聚糖。蛋白聚糖分子中除含糖胺聚糖链外, 也可结合少量的 N-连接糖链和 O-连接糖链。

软骨中主要含可聚蛋白聚糖 (aggrecan, 又称大分子软骨蛋白聚糖), 它是以透明质酸分子为主干形成的蛋白聚糖亚基的聚集体 (proteoglycan aggregate) (图 3-12)。HA 结构呈刚性伸展, 相对分子质量为 10^6 的 HA 长约 2 μ m, 蛋白聚糖亚基的间隔为 40 nm 左右。每一蛋白聚糖亚基核心蛋白约含 3 000 个氨基酸, 约 30 个 KS 链 (约 50 个糖基) 和 100 个 CS 链 (约 100 个糖基)。另外还有少量的 O-连接糖链和 N-连接

糖链,分布在核心蛋白的不同区域。蛋白聚糖亚基通过核心蛋白及小分子连接蛋白的 HA 结合区与 HA 结合。整个分子为一个“瓶刷”样结构。

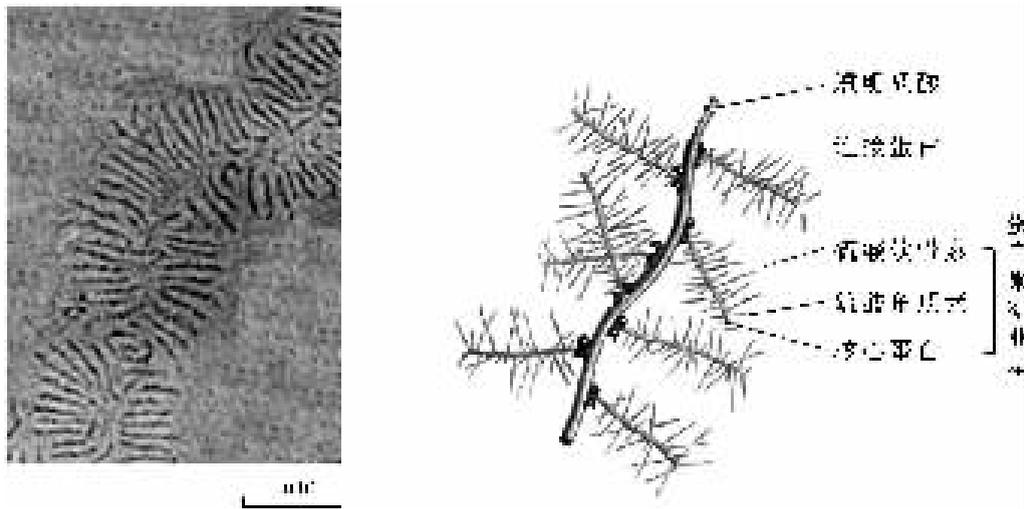


图 3-12 软骨可聚蛋白聚糖的电镜照片及结构示意图

二、蛋白聚糖的功能

哺乳动物细胞产生大量结构复杂、功能多样的蛋白聚糖,它们广泛分布于 ECM、细胞膜及分泌颗粒中。

蛋白聚糖的主要功能是构成 ECM。例如,蛋白聚糖中的 GAG 含有 COO^- 、 SO_3^- 而带大量的负电荷,所结合的 Na^+ 、 K^+ 等阳离子可吸引水并形成凝胶。这种凝胶状的分子筛允许小分子物质的自由扩散,防止细菌通过。可聚蛋白聚糖对维持软骨的柔韧性极为重要。串珠蛋白聚糖为基底膜的主要结构成分,其伸展的核心蛋白由 5~7 个相连的串珠样结构域构成。通过结构域 I 中的 Ser-Gly 连接序列,结合 2~15 条硫酸类肝素链,另外还有 10~12 条 N-连接糖链。在肾小球基底膜中,串珠蛋白聚糖相互聚集,并与基底膜的其他成分如 Fn 和 IV 胶原分子等相互作用,参与基底膜的网状结构的构成。血管的基底膜也是阻止肿瘤细胞扩散的重要屏障。黑色素瘤和淋巴瘤细胞可合成并释放一种特异的内切糖苷酶,该酶能将串珠蛋白聚糖分子中的硫酸类肝素链切除,从而使基底膜的结构遭到破坏,易化肿瘤细胞扩散和转移。膜蛋白聚糖或膜结合型的蛋白聚糖主要含 HS。这类蛋白聚糖的核心蛋白为跨膜蛋白,大多数可具有作为膜受体参与细胞间的通讯。细胞的分泌颗粒中存在高度浓缩的蛋白聚糖,可调节分泌蛋白的活性。一些蛋白聚糖可与 ECM 中的胶原蛋白、Fn、Ln 及成纤维生长因子(FGF)等结合,参与细胞间及细胞与 ECM 间的相互作用,并影响细胞增殖、分化、黏附和迁移等。

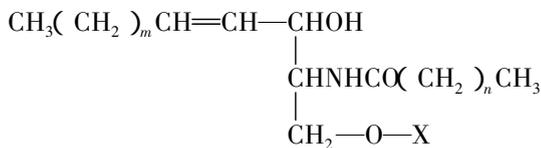
GAG 也可单独发挥作用。例如,透明质酸使软骨、肌腱等结缔组织具有抗压和弹性,因此,可作润滑剂和保护剂。在组织发生和重建中,常伴有 HA 最初大量合成,然后被透明质酸酶降解,这种变化有利于细胞增殖、迁移及定位。某些病原菌分泌的透明质酸酶对基质 HA 的降解,增加了病原菌的侵袭力。HA 与细胞表面透明质酸受体 CD44 的结合,可介导多种细胞生物学行为。肝素存在于肥大细胞中,临床上常用作抗凝剂。肝素的抗凝作用是通过与凝血酶的抑制剂——抗凝血酶 III 结合,使后者构象改变并增强对凝血酶的抑制作用产生的,这也是第一次关于聚糖与蛋白相互作用的研究。肝素还可用于防治血栓。糖胺聚糖最初又称黏多糖,黏多糖累积症(mucopolysaccharidoses, MPS)是一组由于溶酶体内参与糖胺聚糖分解代谢的酶类有缺陷,而造成糖胺聚糖降解不完全所引起的溶酶体贮积病。

第四节 糖 脂

糖脂是糖以糖苷键与脂质连接形成的糖复合物。糖脂是亲水和亲脂的兼性分子,为膜脂的重要组成部分。糖脂分为鞘糖脂(glycosphingolipid)、甘油糖脂(glyceroglycolipid)、胆固醇衍生的糖脂及 GPI。甘油糖脂(第八章第四节)主要见于植物和微生物中,胆固醇衍生的糖脂,如治疗心力衰竭的强心苷类药物等。GPI的发现较晚,是对蛋白质起锚定作用的糖脂。鞘糖脂于1940年首先被从富含脂质的组织中提取出来,后来在红细胞膜及鞘糖脂代谢异常的病人中也发现了鞘糖脂。由于鞘糖脂结构复杂,当时对其功能尚未了解,而将它们称为“谜样的脂”。现已在真核细胞中发现了200余种结构功能不同的鞘糖脂。下面重点介绍鞘糖脂。

一、鞘糖脂的分类与结构

鞘糖脂由糖和神经酰胺(ceramide, Cer)构成,神经酰胺是鞘氨醇(sphingosine)的氨基被脂酰化后所生成的化合物。鞘糖脂因神经酰胺中的两条脂酸链所含双键的数量和长度各不同,而具有结构多样性和组织特异性。糖链通过还原末端的半缩醛羟基与神经酰胺1-羟基以 β -糖苷键相连,X代表各种不同的糖链。



最简单的鞘糖脂只连接一个糖基,最常见的是葡萄糖,其次为半乳糖。参与糖链构成的其他单糖包括 GlcNAc、GalNAc、岩藻糖及唾液酸等。根据糖的性质,鞘糖脂可分为两类:

1. 中性鞘糖脂

含葡萄糖、半乳糖、GlcNAc、GalNAc 和岩藻糖等中性糖。例如,半乳糖神经酰胺,又称半乳糖脑苷脂,在脑和神经组织中含量最高,也是第一个被发现的鞘糖脂,葡萄糖脑苷脂一般见于周围组织中。

2. 酸性鞘糖脂

含唾液酸或硫酸化的单糖。其中,含唾液酸的鞘糖脂又称神经节苷脂(ganglioside, G),主要存在于神经髓鞘中。神经节苷脂一般含有1~4个唾液酸,用M、D、T、Q代表,其字母右下角的数字表示唾液酸以外的糖基数(多用5减去糖基数表示)。如GM₃代表一个唾液酸,两个糖基形成的神经节苷脂。常见的神经节苷脂有GM₁、GM₂、GM₃、GD₂和GD₃等。糖链末端的唾液酸可通过 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 与半乳糖基及 $\alpha 2 \rightarrow 8$ 与唾液酸基结合(图3-13)。含硫酸化糖的鞘糖脂称为硫苷脂。

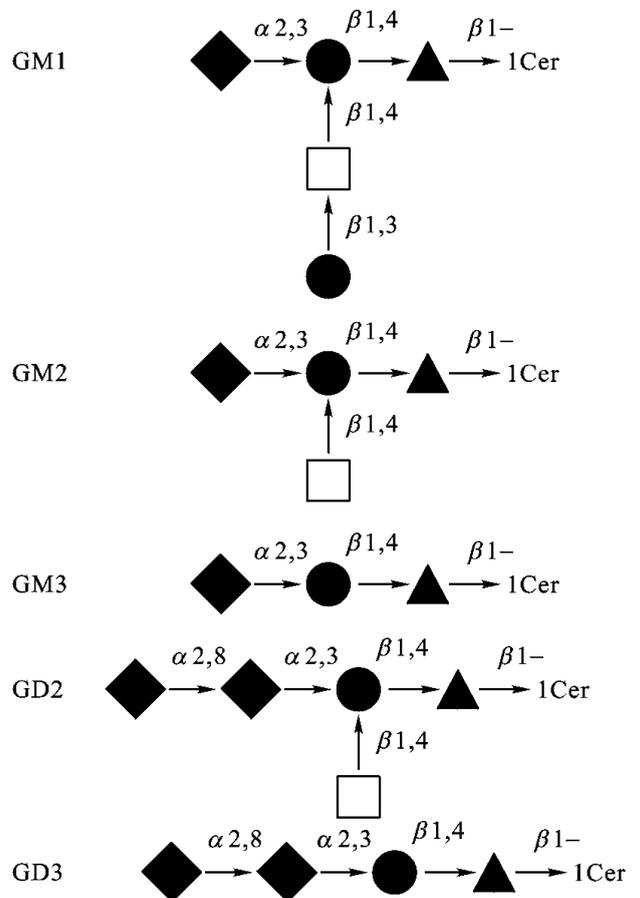


图3-13 神经节苷脂的结构简图

二、鞘糖脂的功能

鞘糖脂是细胞膜的结构组分,它还参与膜蛋白功能的调节、细胞间的识别和信号转导等多种过程,并发挥重要的生物功能。

鞘糖脂位于细胞膜脂双分子层的外层,不同细胞来源的鞘糖脂所占膜总脂的比例不同,如在红细胞膜约为3%,神经髓鞘膜约为28%。鞘糖脂分子容易相互聚集,因所含的脂酸链较长且饱和度高而相对伸展,并使局部细胞膜增厚,形成膜上特殊的微功能区(microdomains)称为脂筏(lipid raft)。脂筏直径约70nm,富含胆固醇。脂筏的形成有利于功能相关的蛋白质之间结合及功能的发挥。糖脂与一些膜受体的特异结合可改变膜受体的功能,如 GM_3 与表皮生长因子受体的结合,抑制其活化时二聚体的形成及酪氨酸残基的磷酸化。神经节苷脂具有受体或辅助受体的作用,能与细胞因子、毒素和病毒等特异结合。如霍乱弧菌分泌的霍乱毒素含1个A亚基和5个B亚基(AB_5),B亚基与小肠黏膜上皮细胞表面的受体 GM_1 结合(图3-14),A亚基则进入细胞内。通过腺苷酸环化酶的激活,使cAMP升高并引起 Cl^- 等电解质平衡紊乱,病人进而出现严重的腹泻和脱水症状。

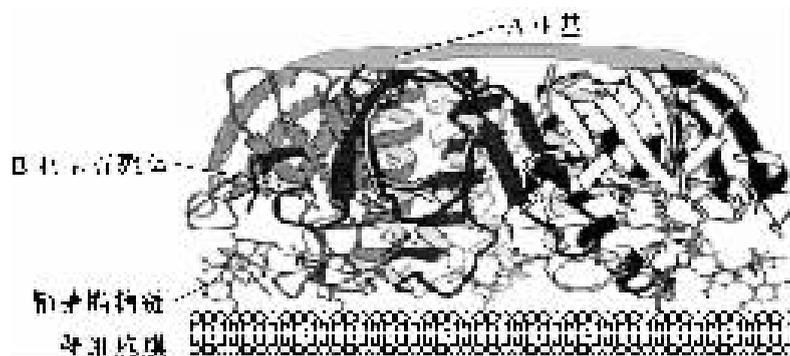


图3-14 霍乱弧菌毒素与糖脂受体 GM_1 结合

对小鼠神经酰胺半乳糖基转移酶基因功能的研究发现,该酶去除后髓鞘仍可以形成,有神经冲动传导障碍,并逐渐出现其他神经系统的异常表现。糖脂降解异常引起的疾病,如Gaucher's病是由溶酶体内葡萄糖神经酰胺酶的缺陷,造成葡萄糖神经酰胺在巨噬细胞内堆积所引起的。含6-磷酸甘露糖的重组葡萄糖神经酰胺酶可与巨噬细胞表面的6-磷酸甘露糖受体结合并进入溶酶体内,清除堆积的葡糖神经酰胺,使病人的症状得到改善。肿瘤细胞可出现多种糖脂的异常改变。一些肿瘤细胞,如黑色素瘤和神经母细胞瘤等 GM_2 和 GD_2 含量的明显升高, GM_2 和 GD_2 不仅可直接促进肿瘤的生长,并可加速肿瘤血管生成。从肿瘤细胞膜上“脱落”(shedding)的糖脂增加,可产生较强的免疫抑制作用。由于一些肿瘤特异性的抗体是针对糖脂糖链决定簇(carbohydrate epitope)的,因此,以糖脂为抗原制备的抗体可用于肿瘤的诊断和治疗。

Summary

There are three classes of glycoconjugates: glycoproteins, glycolipids and proteoglycans. Like other biomolecules, glycoconjugates play important roles in the body. Glycobiology deals with the study of the structure, biosynthesis and function of glycans and glycoconjugates.

Many kinds of glycans show variations in compositions, structures and functions of monosaccharides. Monosaccharides, the structure units of the glycans, are commonly joined by 1→2, 1→3, 1→4, or 1→6 glycosidic bonds with either α - or β -anomeric configuration. The linkage of oligosaccharide

chain is much more complex compared with that of the polypeptide chain and polynucleotide chain.

The combination of glycan and protein makes glycoprotein. Glycoproteins are divided into three categories according to the structure of the linkage between the glycan and the peptide chain : N-linked ,O-linked and GPI-linked. Glycoproteins are widely distributed and exert many crucial functions in the body. The oligosaccharide chain of glycoprotein is critical in maintaining the property ,the structure and the function of most glycoproteins. Moreover ,it is considered as a messenger molecule mediating the recognition and adhesion in cell-cell and cell-ECM interactions. The abnormalities of glycosylations may result in certain diseases ,such as tumor and autoimmune diseases.

Cell adhesion molecules (CAMs) located both in ECM and on the cell surface are mostly glycoproteins ,e. g. ,fibronectins and laminins with RGD motifs in ECM ,as well as integrins on the cell surface. Integrins act as bridges for the inter-and intra-cellular communications. The oligosaccharide chains of CAMs are important for the actions of CAMs.

Proteoglycans are composed of glycosaminoglycans (GAGs) and core proteins. The characteristics of each kind of proteoglycans ,such as disaccharide repeat unit composition ,tissue specificity ,are closely related to their functions. Many membrane bound proteoglycans function as the receptors which mediate the cell communications.

The oligosaccharide chain is linked to the ceramide moiety in glycosphingolipids ,which are classified into neutral and acidic ones. Different types of glycosphingolipids are involved in the physical and pathological processes ,such as GM3 ,a receptor for cholera toxin. The changes of glycosphingolipid in many tumors are predominant so that they can be applied as antigen markers for the treatment of tumor.

思 考 题

1. 名词解释

糖的一级结构 糖基化位点 内糖苷酶 整合蛋白
O-连接糖链 N-连接糖链 蛋白聚糖 神经节苷脂

2. 比较三种生物大分子的一些结构特点。

3. 糖蛋白分为哪几类 ,在结构上各有何特点 ?

4. 举例说明糖蛋白在细胞与细胞、细胞与外基质分子识别和黏附中的作用。

5. 糖链对糖蛋白的理化性质、空间结构和生物活性有何影响 ?

6. ABO 血型分类的分子基础是什么 ?

7. 简述糖胺聚糖的种类和结构组成特点。

(燕 秋)

第四章 维生素

本章教学要求

- 维生素的定义、作用与分类。人体对水溶性维生素的摄入要求。
- 维生素 A、D、E、K、B₁、B₂、叶酸、尼可酰胺、B₆、B₁₂、C 等的来源、主要生理作用与缺乏症。
- 维生素之间的协同作用。“AD 丸中毒症”的原因与症状。
- 维生素缺乏的原因及中国人维生素缺乏现状的特点。
- 各维生素的作用机制。

维生素(vitamin)是维持人体健康所必需的一类营养素,其化学本质为小分子有机化合物,它们不能在体内合成,或者所合成的量难以满足机体的需要,所以必须由食物供给。维生素的需要量甚少(常以毫克或微克计),它们既不是构成机体组织的成分,也不是体内供能的物质,然而在调节物质代谢、促进生长发育和维持生理功能等方面却发挥重要作用。如果长期缺乏,就会导致维生素缺乏症,如果过量也有可能造成中毒症。维生素通常按其溶解性分为脂溶性(lipid-soluble)维生素和水溶性(water-soluble)维生素两大类(表4-1)。

表4-1 两类维生素的区别

	维生素名称	溶解性	储存性	若过量	对摄入要求
脂溶性	A、D、E、K 等	溶于脂质、脂溶剂	储存脂库与肝	可储存	不拘
水溶性	B 族、C 等	溶于水	很少储存	排走	经常、适量

第一节 脂溶性维生素

一、维生素 A

(一) 化学性质、来源及体内转变

维生素 A 通常是由 β -白芷酮环和两分子 2-甲基丁二烯构成的多烯醇。有 A₁(视黄醇,retinal)、A₂(3-脱氢视黄醇)两种形式,并以 A₁为主(图4-1)。其实,视黄醇的可逆性氧化产物——视黄醛(retinal),及不可逆性氧化产物——视黄酸(retinoic acid)也具有活性。

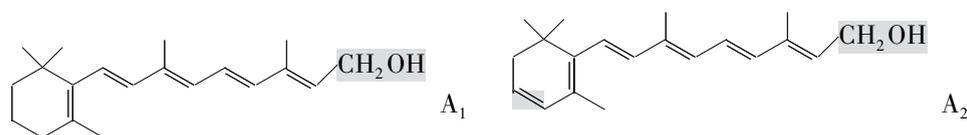


图4-1 维生素 A₁、A₂ 的结构

视黄醇的侧链含有 4 个双键,故可形成多种顺反异构体,其中较重要的有全反型(A-trans)和 11-顺型(11-cis)(图4-2)。

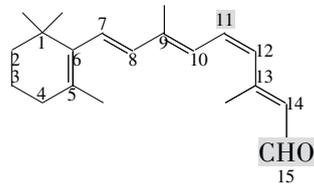
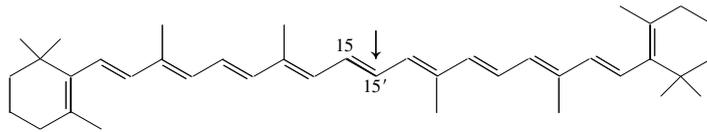


图 4-2 11-顺视黄醛结构

维生素 A 的化学性质活泼,易被空气氧化或紫外线照射破坏而失去生理作用,故维生素 A 的制剂应在棕色瓶内避光贮存。

维生素 A 主要存在于动物肝、蛋、肉中,但是在很多有色植物如胡萝卜、红辣椒等中也富含具有维生素 A 效能的被称为类胡萝卜素(carotenoid)的物质,其中最重要者为 β -胡萝卜素(β -carotene)(图 4-3)。 β -胡萝卜素可被小肠黏膜或肝中的加氧酶转化为视黄醇,所以它又被称作维生素 A 原。尽管理论上 1 分子 β -胡萝卜素可以生成 2 分子维生素 A,但由于胡萝卜素的吸收率仅为 1/3,而在体内的转化率仅为 1/2,所以实际上 β -胡萝卜素转化为维生素 A 的转化当量为 1/6。

图 4-3 β -胡萝卜素结构

食物中的视黄醇多以脂肪酸酯的形式存在,它在小肠受酯酶的作用而水解,所产生的脂肪酸和维生素 A 进入小肠上皮细胞后又重新合成视黄醇酯,并掺入乳糜微粒,通过淋巴转运,贮存于肝,机体需要时向血液释放。血浆中的维生素 A 是非酯化型的。它与视黄醇结合蛋白(retinol binding protein, RBP)结合而被转运,后者又与已结合甲状腺激素的前清蛋白(proalbumin, PA)结合,形成维生素 A-RBP-PA 复合物,当运输至靶组织后,视黄醇与细胞的特异受体结合而再被利用。

(二) 生化作用及缺乏症

1. 构成视觉细胞内感光物质视色素

人体视网膜的杆状细胞是感受暗光与弱光的视觉细胞。其主要感光物质是视紫红质(visual purple, 又名 rhodopsin)。它是由视黄醛与视蛋白结合生成的,这种结合只有在 11-顺视黄醛构型时才能进行。视紫红质对弱光非常敏感,一个光子即可诱发它的光化学反应。当视紫红质感光时,11-顺视黄醛发生光异构反应,转变为全反型的视黄醛。因在感光过程中,视紫红质分解而褪色,又被称为“漂白”。在这一光异构反应的同时,可引起杆状细胞膜的 Ca^{2+} 通道开放, Ca^{2+} 迅速流入细胞,并引发神经冲动,传递至脑引起视觉。而全反型视黄醛可在肝中经还原、异构、氧化,又再生为 11-顺视黄醛(图 4-4)。正是这种再生补充的过程,造成了所谓的“暗适应”。

从图 4-4 可以看出,当维生素 A 缺乏时,11-顺视黄醛得不到足够的补充,杆状细胞内视紫红质的合成减弱,暗适应的能力下降,严重者可致“夜盲症”(night blindness)。

2. 维持上皮结构的完整与健全

维生素 A 可影响上皮细胞的分化过程,是维持一切上皮组织健全所必需的物质。实验证实缺乏维生素 A 培养中的上皮细胞趋向于复层鳞状上皮分化。其中对眼、呼吸道、消化道、泌尿道及生殖系统等的上皮影响最为显著。缺乏维生素 A 时,在眼部由于泪腺上皮角化,泪液分泌受阻,以致角膜、结膜干燥产生干眼病(xerophthalmia)。所以维生素 A 又称为抗干眼

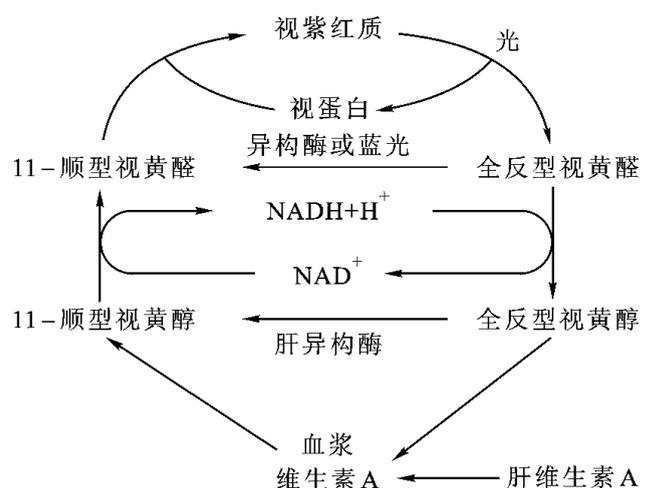


图 4-4 视紫红质的合成、分解与维生素 A 的关系

病维生素。如果上皮组织不健全,机体抵抗微生物侵袭的能力降低,那么就更容易感染。

3. 增加细胞表面的上皮生长因子受体数目而促进生长、发育

缺乏维生素 A 时,儿童可出现生长停顿、骨骼成长不良和发育受阻。缺乏维生素 A 的雌性大鼠则出现排卵减少,影响生殖功能。

4. 维生素 A 的摄入与癌症的发生呈负相关

维生素 A 可促进糖蛋白的合成,特别是作为细胞表面受体的糖蛋白和纤连蛋白的合成。癌变细胞其表面因缺乏纤连蛋白而丧失正常黏附能力,此缺陷可被维生素 A 所逆转。

二、维生素 D

(一) 化学性质、来源及体内转变

维生素 D 系固醇类衍生物,在动物的肝、蛋黄中含量丰富,但人体内维生素 D 主要是由皮肤细胞的 7-脱氢胆固醇(维生素 D₃ 原)经紫外线照射转变而来,称为维生素 D₃ 或胆钙化醇(cholecalciferol)。植物中的麦角固醇(维生素 D₂ 原)经紫外线照射后生成维生素 D₂ 或麦角钙化醇(ergocalciferol)(图 4-5)。不论是维生素 D₂ 或 D₃,本身都没有生理活性,它们必须在体内进行一定的代谢转化,包括在肝线粒体中的 25-羟化酶和在肾微粒体中的 1-羟化酶的作用下才能生成强活性的化合物——活性维生素 D₃,即 1,25-(OH)₂-D₃,再经血液运输到小肠、骨骼及肾等靶器官才能发挥其生理作用(见第二十三章 无机物的生物化学)。

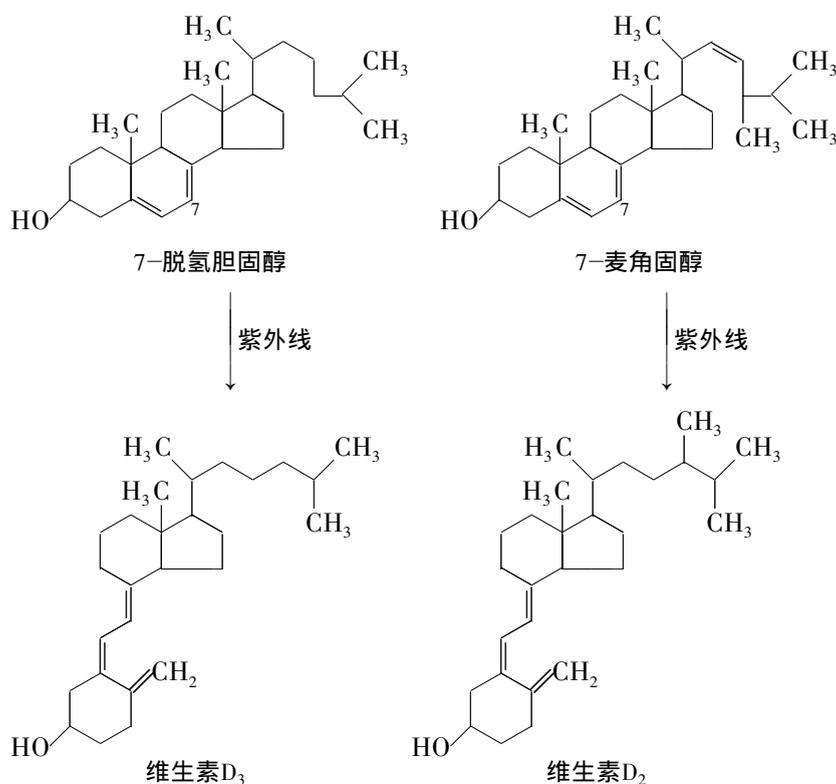


图 4-5 维生素 D₂ 和 D₃ 的生成

维生素 D₂ 及 D₃ 均为无色针状结晶,易溶于脂肪和有机溶剂,除对光敏感外,化学性质一般较稳定。

(二) 生化作用及缺乏症

维生素 D 能促进小肠对食物中钙和磷的吸收,促进肾对钙和磷的重吸收,还可影响骨组织的钙代谢,从而维持血中钙和磷的正常浓度,促进骨和牙的钙化作用。当缺乏维生素 D 时,儿童可发生佝偻病,成人易患软骨病。

三、维生素 E

(一) 化学性质、来源及体内转变

维生素 E 又称为生育酚(tocopherol),已经发现的生育酚有 α 、 β 、 γ 和 δ 四种,其中以 α 生育酚的生理效应最强。它们都是苯骈二氢吡喃的衍生物(图 4-6)。主要存在于麦胚油、豆油、深海鱼油及蔬菜中。

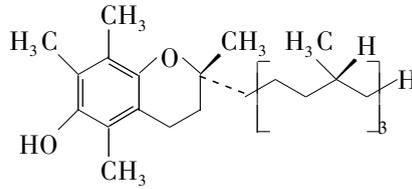


图 4-6 维生素 E 的结构

维生素 E 为油状物,在无氧状况下能耐高热,并对酸和碱有一定抗耐力,但对氧却十分敏感,是一种有效的抗氧化剂。

(二) 生化作用及缺乏症

1. 维生素 E 与动物生殖机能有关

雌性动物缺少维生素 E 就会失去正常生育能力,或虽能受孕,却易流产,所以俗称生育酚。在人类由于单纯缺少维生素 E 而发生的病尚属罕见,但在临床上它作为药物,治疗某些习惯性流产,能收到一定效果。

2. 维生素 E 是体内重要的抗氧化剂

20 世纪 60 年代初,英美几个研究机构在对正常人体细胞进行体外培养实验时,发现在培养基中加入维生素 E,细胞分裂次数由 60~70 代增加到 120~140 代,这一实验轰动了全球。这是因为维生素 E 是一种强还原性物质,能阻止不饱和脂肪酸和类脂等在体内被氧化破坏。正是它的强还原性,还可以保护维生素 C、辅酶 Q 等,可以抑制含硒蛋白、含铁蛋白的氧化,保护红细胞膜免遭溶血的厄运。更重要的是,可阻止代谢过程中产生的过氧化物,尤其是氧自由基如超氧阴离子自由基(O_2^-)、过氧化物自由基($ROO\cdot$)及羟基自由基($OH\cdot$)等对遗传大分子物质的破坏。维生素 E 可以捕捉自由基生成生育酚自由基,再与另一自由基反应生成非自由基产物——生育醌。所以维生素 E 被确认为是抗衰老物质。

维生素 E 可降低血浆低密度脂蛋白(LDL)的浓度,可防止动脉硬化等心脑血管系统疾病的发生。硒作为谷胱甘肽过氧化酶的必需因子,通常被认为是对抗过氧化作用的第二道防线,维生素 E 还可与硒在此抗氧化过程中协同发挥作用。

四、维生素 K

(一) 化学性质、来源及体内转变

维生素 K 又称凝血维生素,是 2-甲基 1,4-萘醌的衍生物,自然界已发现的有两种,存在于绿叶植物中者为维生素 K_1 ,肠道细菌合成者为维生素 K_2 (图 4-7)。人体内的维生素 K 约有 1/2 来自肠道细菌的合成。人工合成的 2-甲基 1,4-萘醌又称维生素 K_3 ,因水溶性便于临床使用,药用维生素 K 多为其还原性衍生物或亚硫酸钠盐。

(二) 生化作用及缺乏症

维生素 K 可以促进肝合成凝血因子 II、VII、IX 和 X,因而促进血液凝固。它们的酶原前体在生成成熟的酶原时,前体的多个谷氨酸残基经羧化变为 γ -羧基谷氨酸。后者具有很强的螯合 Ca^{2+} 能力。催化这一反应的酶是 γ -羧化酶,而维生素 K 为该酶的辅助因子。缺乏维生素 K 的主要症状是易出血。缺乏的原因不外乎是因消化系统疾病导致脂质吸收障碍,以及大剂量、长时间使用抗生素,抑制了肠菌,减少了维

生素 K 的来源。

双香豆素的结构与维生素 K 相似,作用相拮抗,在临床上可用于治疗血栓病,过量则易造成内出血。

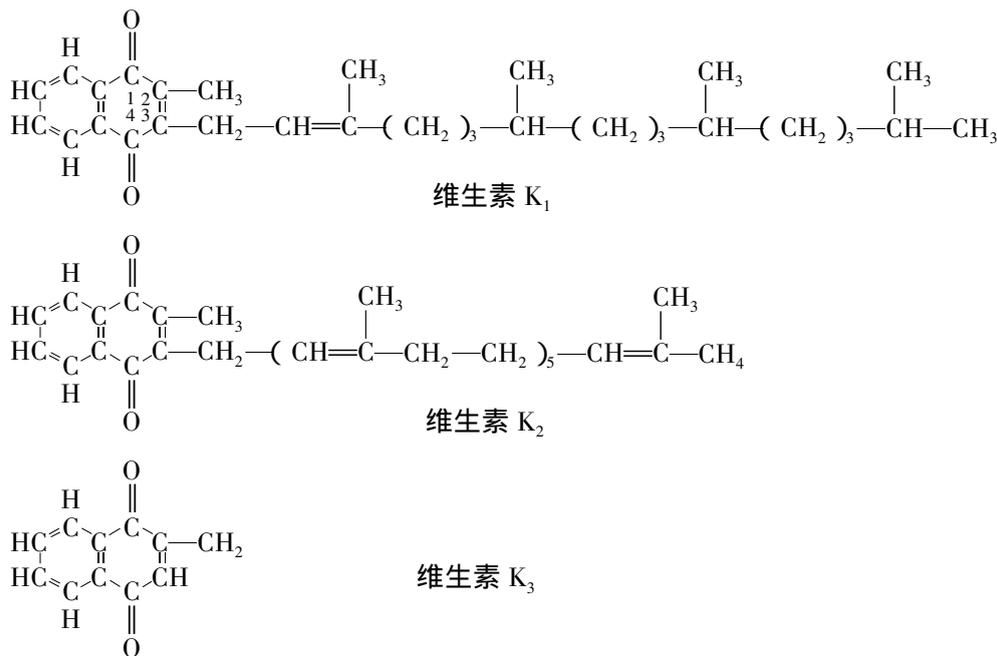


图 4-7 维生素 K 的结构

第二节 水溶性维生素

水溶性维生素包括维生素 B 族和维生素 C。维生素 B 是一个大家族,至少包括十余种维生素。在自然界中维生素 B 族大多共同存在于同一动植物食物中,其中最丰富的来源是酵母、肝和麸糠种皮等所谓的粗糙食物。B 族维生素往往作为酶的辅基或辅酶而发挥其参与和调节物质代谢的作用,被人类了解得也更为清楚。从性质上看维生素 B 族多易溶于水,对酸稳定,易被碱破坏。

一、维生素 B₁

(一) 化学本质及性质

维生素 B₁ 又名硫胺素(thiamine),因其结构中有含 S 的噻唑环与含氨基的嘧啶环而得名,其纯品大多以盐酸盐或硫酸盐的形式存在。盐酸硫胺素为白色结晶,有特殊香味,它在紫外光下呈荧光蓝色,可用于维生素 B₁ 的检测。

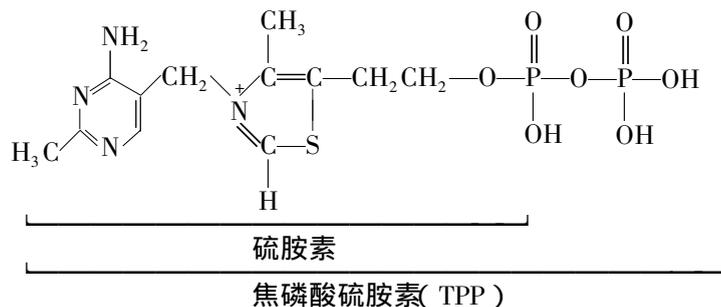


图 4-8 维生素 B₁ 及焦磷酸硫胺素的结构

(二) 生化作用及缺乏症

维生素 B₁ 易被小肠吸收,在肝中维生素 B₁ 被磷酸化成为焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate, TPP)(图 4-8),是 α-酮酸氧化脱羧酶的辅酶,又称脱羧辅酶。它也是磷酸戊糖途径中转酮基酶的辅酶。

当维生素 B₁ 缺乏时,由于 TPP 合成不足,丙酮酸的氧化脱羧发生障碍,导致糖的氧化利用受阻。在正常情况下,神经组织的能量来源主要靠糖的氧化分解供给,当维生素 B₁ 缺乏时,首先影响神经组织的能量供应,并伴有丙酮酸及乳酸等在神经组织中的堆积,易出现手足麻木、四肢无力等多发性周围神经炎的症状。严重者引起心跳加快、心脏扩大和心力衰竭,临床上称为脚气病(beriberi)。因此又称维生素 B₁ 为抗脚气病维生素。

维生素 B₁ 尚有抑制胆碱酯酶(choline esterase)的作用,胆碱酯酶催化神经递质——乙酰胆碱(acetylcholine)的水解。因此,缺乏维生素 B₁ 时,由于胆碱酯酶活性增强,乙酰胆碱水解加速,因为支配胃肠运动的迷走神经是通过释放乙酰胆碱发挥作用的,势必造成胃肠蠕动缓慢、消化液分泌减少、食欲不振和消化不良等症状。所以在临床上补充维生素 B₁,可增加食欲、促进消化。

二、维生素 B₂

(一) 化学本质及性质

维生素 B₂ 又称核黄素(riboflavin),是由核醇与异咯嗪缩合构成的。维生素 B₂ 为橘黄色针状结晶,溶于水呈绿色荧光,在碱性溶液中受光照射时极易被破坏。维生素 B₂ 分子的异咯嗪的第 1 和第 10 位氮原子可反复可逆地接受和释放氢,决定了它可以参与体内传递氢的过程(图 4-9)。

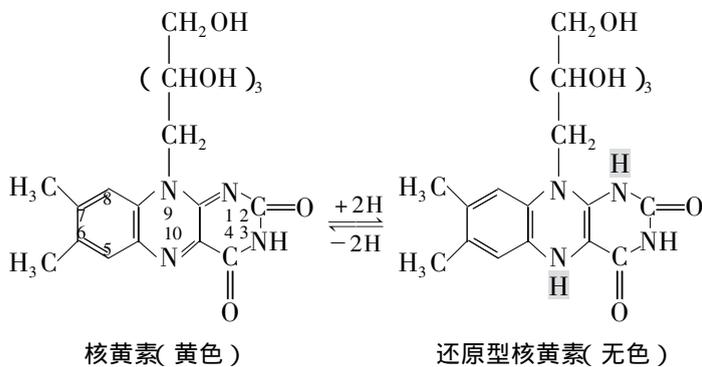


图 4-9 核黄素的结构与递氢过程

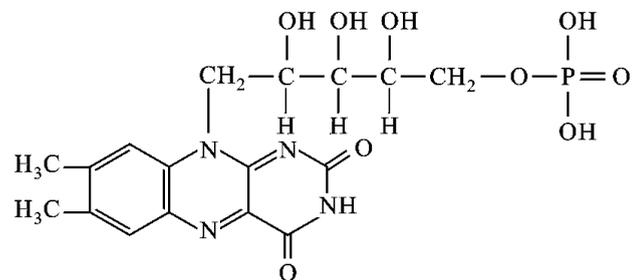


图 4-10 FMN 的组成

(二) 生化作用及缺乏症

核黄素在体内经磷酸化生成黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)(图 4-10)和黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)(图 4-11),它们分别构成各种黄素酶的辅基参与体内生物氧化过程,对于促进蛋白质、脂肪与糖代谢有重要作用。

维生素 B₂ 可促进生长发育,特别是维持皮肤和黏膜的完整性。所以缺乏维生素 B₂ 易发生阴囊炎、舌炎、唇炎、口角炎、脂溢性皮炎等。

维生素 B₂ 对眼的感光过程起重要作用。缺乏它将造成眼干燥、畏光、视力下降、白内障等疾病。

三、维生素 PP

(一) 化学本质、性质及来源

维生素 PP 即抗癞皮病因子,它包括尼克酸(烟酸,nicotinic acid)和尼克酰胺(烟酰胺,nicotinamide),均为吡啶衍生物。

在尼克酰胺的吡啶结构中,1 位的 N⁺ 可以接受一个电子从五价变为三价,吡啶环的共轭双键经过分子重排,4 位的碳原子被活化可接受一个 H 原子。这样,尼克酰胺所组成的辅酶可以在加氢的过程中接受一个氢原子和一个电子,将一个 H⁺ 游离出来,反应可逆(图 4-12)在代谢过程中起着传递氢的作用。

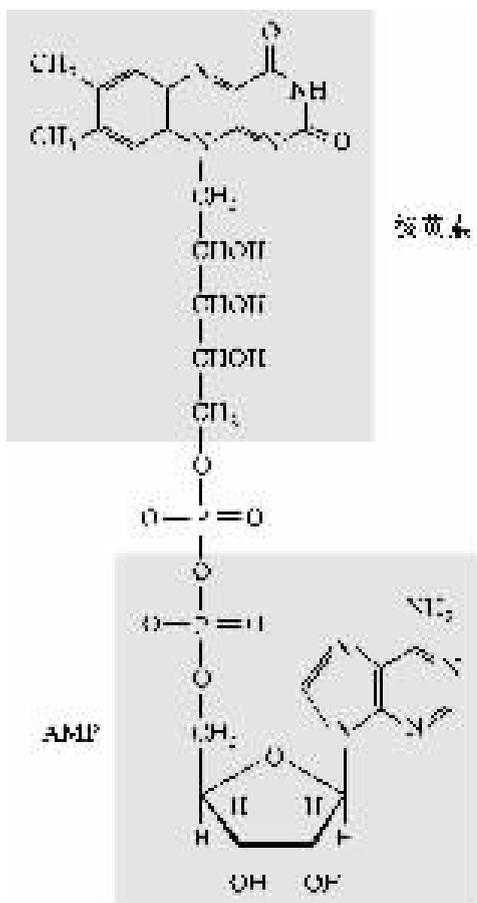


图 4-11 FAD 的组成

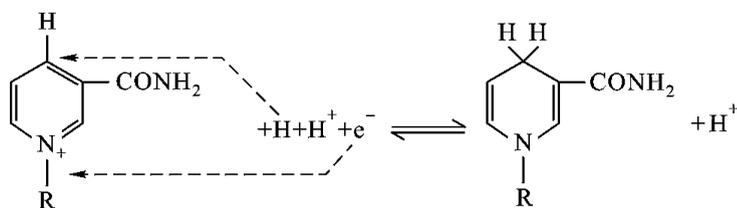


图 4-12 尼克酰胺的递氢过程

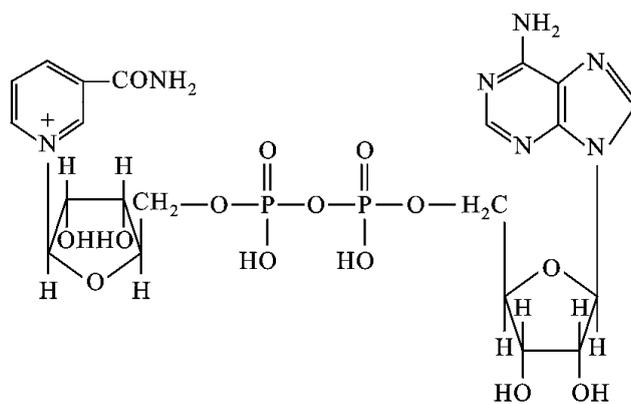


图 4-13 NAD⁺ 的组成

尼克酰胺组成的辅酶包括辅酶 I 和辅酶 II，辅酶 I 又名尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) (图 4-13)，一般将其氧化态写成 NAD⁺，还原态写成 NADH。辅酶 II 则是在辅酶 I 结构中腺嘌呤的核糖 2' 位再连接一个磷酸基而形成的，以 NADP⁺ 表示(图 4-14)。它们都是体内重要的脱氢辅酶。

(二) 生化作用及缺乏症

辅酶 I (NAD⁺) 和辅酶 II (NADP⁺) 结构中的尼克酰胺部分具有可逆地加氢和脱氢的特性，在不同的代谢过程中起着氢传递体的作用。

尼克酸在人体内可由色氨酸生成并可转变成尼克酰胺，但生成量有限，不能满足机体需要，所以仍需从食物中供给。一般饮食条件下，很少缺乏维生素 PP。但玉米缺乏色氨酸和尼克酸，长期以玉米为主食时则有可能引起缺乏。若将各种杂粮合理搭配，可防止缺乏症的发生。另外，抗结核药物异烟肼因结构与维生素 PP 相似，两者有拮抗作用，长期使用异烟肼时可能造成维生素 PP 的缺乏。

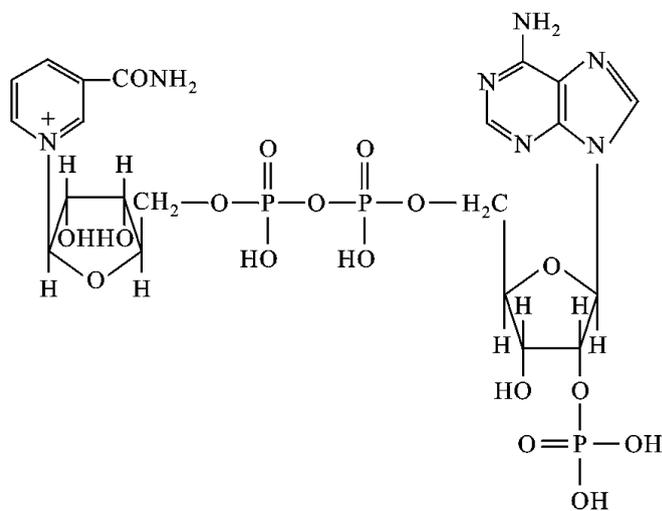


图 4-14 NADP⁺ 的组成

维生素 PP 缺乏时主要表现为癞皮病(pellagra)，其特征是体表暴露部分出现对称性皮炎。此外还有消化不良、精神不安等症状，严重时可出现顽固性腹泻、痴呆和精神失常等。

最近尼克酸被临床用来作为降胆固醇的药物，尼克酸能抑制脂肪组织的脂肪分解，从而抑制游离脂肪酸的动员，可使肝中极低密度脂蛋白(VLDL)的合成下降，而起到降胆固醇的作用。尼克酸还有扩张血管的作用。

四、维生素 B₆

(一) 化学本质及性质

维生素 B₆ 包括吡哆醇(pyridoxine)、吡哆醛(pyridoxal)和吡哆胺(pyridoxamine), 在体内它们可以相互转变, 其活性形式是三种化合物的磷酸酯(图 4-15)。

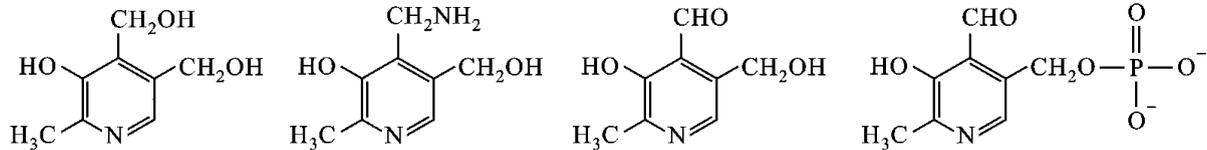


图 4-15 吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛及磷酸吡哆醛的结构

(二) 生化作用及缺乏症

维生素 B₆ 是氨基酸转氨酶、氨基酸脱羧酶的辅酶, 它们参与氨基酸的分解代谢。氨基酸的脱羧产物中有一些具有极重要的生理功能, 如谷氨酸脱羧生成的 γ -氨基丁酸, 是抑制性神经递质。若缺乏维生素 B₆, γ -氨基丁酸合成减少, 可导致兴奋过度, 在稍有外来刺激时就显得过于敏感。如小儿高热惊厥、妇女妊娠呕吐、精神焦虑等都属于这种过度性反应, 临床上常用维生素 B₆ 进行治疗。

维生素 B₆ 是血红素合成的关键酶——ALA 合酶的辅酶。维生素 B₆ 缺乏时, 血红素合成发生障碍, 造成贫血, 称维生素 B₆ 反应性贫血。

近代医学证明, 维生素 B₆ 的作用是多方面的。在许许多多的物质代谢过程中, 维生素 B₆ 经常以配角的身份出现。例如, 维生素 B₆ 与氨基酸转化产物(如牛磺酸及烟酸等) 的生成有关。另外还发现维生素 B₆ 与不饱和脂肪酸的利用有关。磷酸吡哆醛还是糖原磷酸化酶的重要组成部分, 参与糖原分解为葡糖-1-磷酸的过程, 肌肉中磷酸化酶所含的维生素 B₆ 约占全身维生素 B₆ 的 70% ~ 80%。维生素 B₆ 缺乏时, 一般表现为皮肤损害, 眼及鼻两侧出现脂溢性皮炎, 以后扩展至面颊、耳后、阴囊和会阴等。

异烟肼能与磷酸吡哆醛结合, 使其失去辅酶的作用。所以在服用异烟肼时, 应予补充维生素 B₆。

五、泛酸

泛酸(pantothenic acid)是由 β -丙氨酸与羟基丁酸结合而构成, 因其广泛存在于动植物组织故名泛酸或遍多酸。只有在极端营养不良时才造成缺乏。泛酸在机体组织内是与巯基乙胺、焦磷酸及 3'-磷酸腺苷结合成为辅酶 A 及酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)而发挥作用的。辅酶 A 的结构(图 4-16)中, 因其活性基团为 -SH, 故常用 CoA-SH 表示。

糖、脂、蛋白质的代谢过程中都离不开辅酶 A 的参加。所以泛酸缺乏时, 可表现为消化不良, 精神萎靡不振, 疲倦无力, 四肢麻木及共济失调等。

六、生物素

生物素(biotin)的结构包括含硫的噻吩环、尿素及戊酸三部分(图 4-17)。

生物素在体内是作为羧化酶的辅基而起作用的。在生物素的分子侧链中, 戊酸的羧基与酶蛋白分子中赖氨酸残基上的 ϵ -氨基通过酰胺键牢固结合, 形成羧基生物素-酶复合物, 又称生物胞素(biocytin)。生物胞素可将活化了的羧基再转给酶的相应底物。

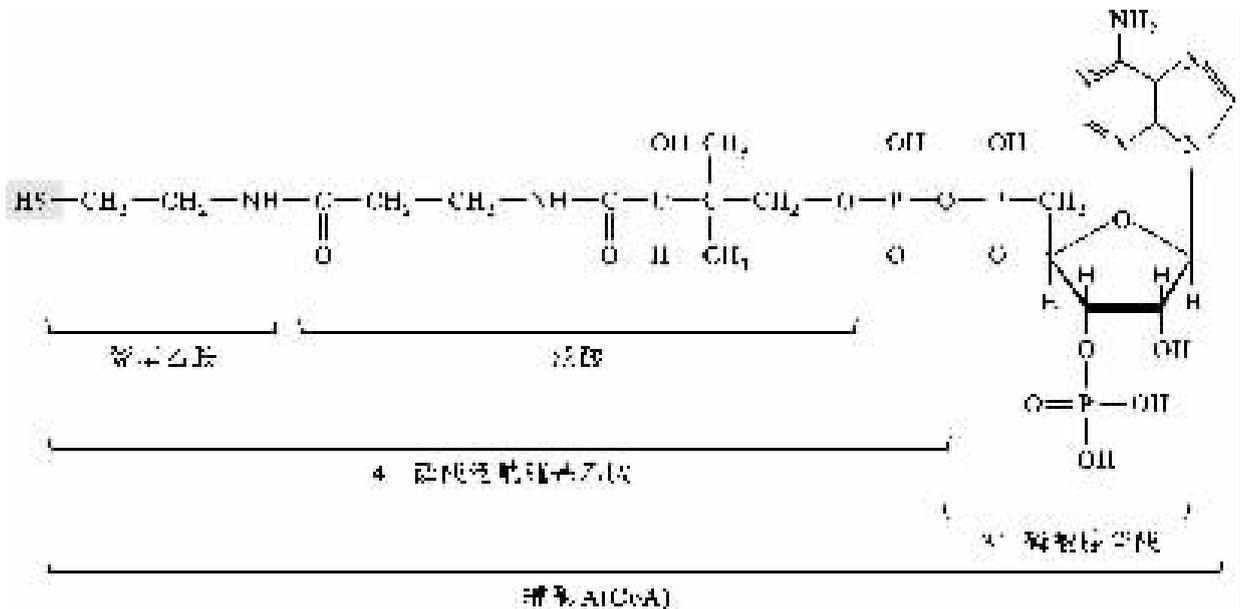


图 4-16 辅酶 A 的结构

鸡蛋中含较多的生物素,但同时含有抗生物素蛋白(avidin),使其难以被吸收利用,所以,生鸡蛋几乎不含可被人吸收的生物素。生物素广泛存在于动植物组织中,人体肠道细菌也能合成,所以一般不至于造成缺乏症。

七、叶酸

(一) 化学本质、性质及来源

叶酸(folic acid)由蝶酸(pterioic acid)和谷氨酸结合构成,因在植物绿叶中含量丰富而得名,其实在酵母中叶酸含量最高,其次在肝也很丰富。

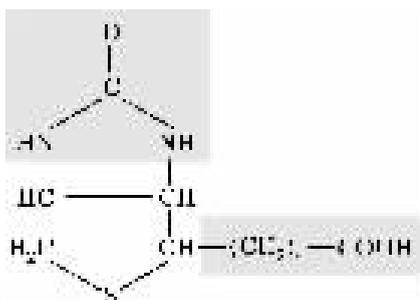


图 4-17 生物素的结构

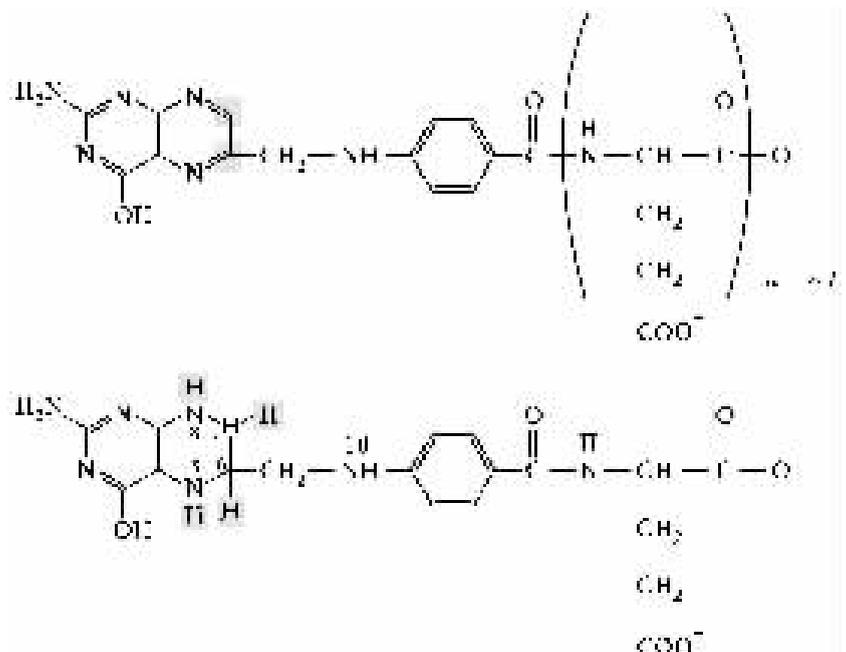


图 4-18 叶酸与四氢叶酸的结构

食物中的叶酸多以含 5 或 7 分子谷氨酸的结合型存在,在肠道中受消化酶的作用,水解为游离型而被吸收。若缺乏此种消化酶则可因吸收障碍而致叶酸缺乏。

叶酸在体内必须还原成四氢叶酸(FH₄ 或 THFA)(图 4-18)才有生理活性。小肠黏膜、肝及骨髓等

组织含有叶酸还原酶,在 NADPH 和维生素 C 的参与下,催化叶酸的还原。

(二) 生化作用及缺乏症

体内核苷酸和某些氨基酸的合成需要提供“一碳单位”以作碳源,而四氢叶酸是一碳基团转移酶系统的辅酶,在四氢叶酸结构的 N^5 、 N^{10} 部位可携带一碳单位(见第九章 蛋白质的分解代谢)。四氢叶酸尤其在体内嘌呤和嘧啶的合成中起重要作用。当体内缺乏叶酸时,“一碳基团”的转移发生障碍,核苷酸特别是胸腺嘧啶脱氧核苷酸的合成减少。幼红细胞可因分裂障碍而使细胞增大,但却不具备运氧功能,造成巨幼红细胞性贫血(megaloblastic macrocytic anemia)。

人类肠道细菌能合成叶酸,故一般不发生缺乏症。但当吸收不良、代谢失常或组织需要过多,以及长期使用肠道抑菌药物或叶酸拮抗药等状况下,则可造成叶酸缺乏。口服避孕药或抗惊厥药物能干扰叶酸的吸收及代谢,如长期服用此类药物时应考虑补充叶酸。

孕妇因细胞分裂增快,代谢旺盛,若缺乏叶酸将造成胎儿先天性缺陷和易流产等,孕妇和乳母更应补充叶酸。

八、维生素 B₁₂

(一) 化学本质、性质及来源

维生素 B₁₂ 因其分子中含有金属钴和许多酰氨基,故又称为钴胺素(cobalamine),是唯一含金属的,而且是相对分子质量最大、结构最复杂的维生素。维生素 B₁₂ 广泛存在于动物性食品中,尤其在肝中含量最为丰富。人体对它的需要量甚少,但体内贮存量很充裕,所以因摄入不足而致维生素 B₁₂ 缺乏者在临床上比较少见。

(二) 生化作用及缺乏症

维生素 B₁₂ 分子中的钴能与—CN、—OH、—CH₃ 或 5'-脱氧腺苷等基团相连,分别称为氰钴胺、羟钴胺、甲基钴胺和 5'-脱氧腺苷钴胺(图 4-19)。

甲基钴胺(CH₃-B₁₂)参与体内甲基移换反应和叶酸代谢,是 N^5 -甲基四氢叶酸甲基移换酶的辅酶。此酶催化 N^5 -CH₃-FH₄ 和同型半胱氨酸之间不可逆的甲基移换反应,产生四氢叶酸和蛋氨酸(见第九章 蛋白质的分解代谢)。缺乏维生素 B₁₂ 同缺乏叶酸一样,也将造成巨幼红细胞性贫血。蛋氨酸经活化后可作为甲基供体促进胆碱和磷脂等有机物的合成,防止脂肪肝的发生,有利于肝的代谢。所以临床上也把叶酸和维生素 B₁₂ 作为治疗肝病的辅助药物。

维生素 B₁₂ 的吸收与正常胃黏膜分泌的一种糖蛋白密切相关,这种糖蛋白叫做内因子(intrinsic factor, IF)。维生素 B₁₂ 必须与内因子结合生成复合物才能被回肠下段黏膜上的受体接纳而被吸收。某些疾病如萎缩性胃炎、胃全切除的病人或者先天缺乏内因子,均可因维生素 B₁₂ 的吸收障碍而致维生素 B₁₂ 的缺乏。对这类病人只有采取注射的方式给予维生素 B₁₂ 才有效。

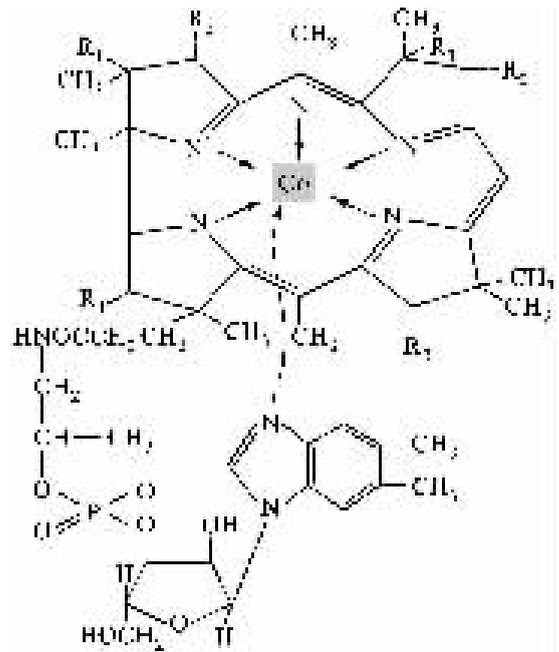


图 4-19 维生素 B₁₂ 的结构

九、维生素 C

(一) 化学本质、性质及来源

维生素 C 又名 L-抗坏血酸(ascorbic acid),它是含有内酯结构的多元醇类,其特点是具有可解离出

H⁺的烯醇式羟基,因而其水溶液有较强的酸性。维生素C有很强的还原性,可被脱氢而氧化,但在供氢体存在时仍可被可逆性还原。维生素C的氧化产物是草酸和苏阿糖酸(图4-20)。

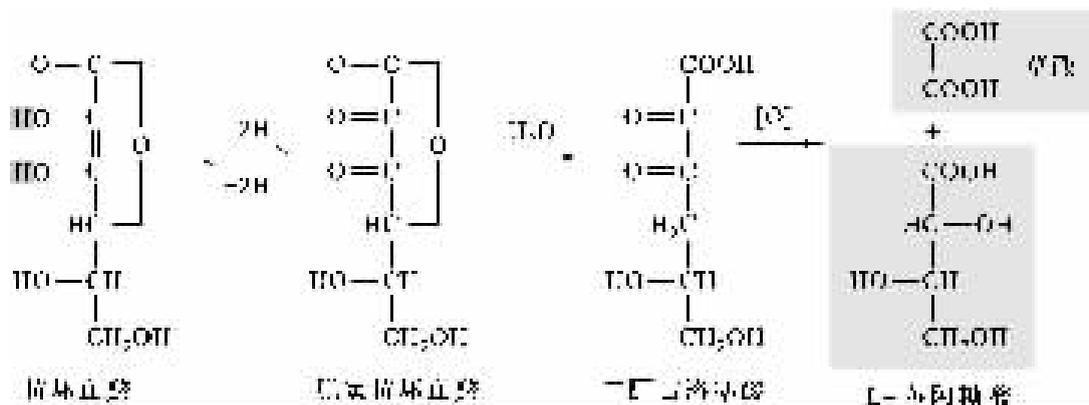


图4-20 维生素C的结构与分解

维生素C在酸性水溶液(pH < 4)中较为稳定,在中性及碱性溶液中易被破坏,有微量金属离子(如Cu²⁺、Fe³⁺等)存在时,更易被氧化分解,加热或受光照射也可使维生素C分解。

维生素C主要存在于绿色新鲜蔬菜和水果。但在植物组织中还含有抗坏血酸氧化酶,能使之氧化分解,所以蔬菜和水果贮存越久,其中维生素C遭到破坏就越严重。

(二) 生化作用及缺乏症

维生素C具有广泛的生理作用,因此是目前临床应用最多的一种维生素。

1. 维生素C是体内重要的还原剂

(1) 保护巯基和促使巯基再生 巯基(-SH)是体内许多重要的酶、蛋白质的极其重要的活性基团,还原性谷胱甘肽(GSH)对其具有保护作用。当它们遭遇体内产生的过氧化物时,GSH就可以将其还原,从而保护生物大分子免遭氧化破坏。但GSH一旦被氧化后,生成氧化型谷胱甘肽(GSSG),不再具有保护功能。维生素C是强还原剂,能在GSH还原酶的作用下使其重新还原。换句话说,维生素C是GSH的强大后盾,可以保护GSH,促使其再生,维持其保护功能(图4-21)。

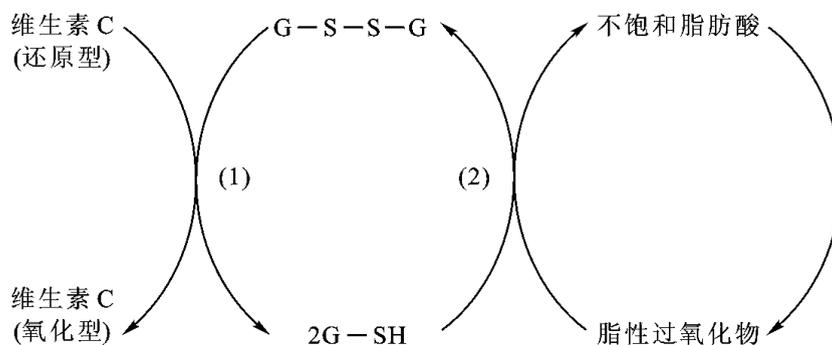


图4-21 维生素C与谷胱甘肽氧化还原反应的关系
(1) :GSH还原酶 (2) :GSH过氧化酶

(2) 促进铁的吸收与利用 食物中的铁一般是Fe³⁺,难以吸收,需经过维生素C的还原,成为Fe²⁺,才利于吸收。维生素C使体内Fe²⁺浓度得以保证,有利于血红蛋白的合成。此外,血红蛋白在携氧过程中难免被氧化成高铁血红蛋白(MHb)而丧失运氧功能,维生素C可以将其重新还原。

(3) 促进抗体的合成 抗体的合成需要半胱氨酸,维生素C可使体内胱氨酸还原成半胱氨酸,且维持半胱氨酸的数量足以满足合成抗体的需要。它还能增强白细胞对流感病毒的反应性以及促进H₂O₂在粒细胞中的杀菌作用等。因此确认维生素C可以增强人体免疫力。

(4) 维生素 C 可促进维生素 A、E、B 族的吸收,还可以保护它们免受破坏,促进叶酸还原成有活性的 FH_4 。

2. 参与体内的羟化反应

维生素 C 参与许多物质的羟化反应过程。例如,胶原的生成、类固醇的合成与转变,以及许多非代谢物如有机药物或毒物的生物转化等。

(1) 胶原的合成 胶原是组成细胞间质的重要成分,而羟脯氨酸和羟赖氨酸是胶原分子中脯氨酸和赖氨酸残基的羟化衍生物。维生素 C 是羟化酶的辅酶,是羟化反应必需的辅助因素之一。当维生素 C 缺乏时,胶原和细胞间质合成减少,毛细血管壁脆性增大,通透性增强,轻微碰撞或摩擦即可使毛细血管破裂,引起出血现象,临床上称为维生素 C 缺乏症(旧称坏血病, *scurvy*)。

(2) 类固醇的羟化 正常情况下,体内胆固醇约有 40% 转变为胆汁酸后排出,在胆固醇转变为胆汁酸的一系列反应中,第一步反应就是胆固醇在 7α -羟化酶(胆汁酸合成的限速酶)作用下,生成 7α -羟胆固醇,而后侧链断裂,最终生成胆汁酸(参看第八章 脂代谢)。缺乏维生素 C,则此步羟化过程受阻,胆固醇难以转变成胆汁酸,在肝中堆积,造成血中胆固醇浓度增高。因此,临床上使用大剂量维生素 C 可降低血中胆固醇。

此外,肾上腺皮质激素合成加强时,皮质中维生素 C 含量显著下降,这也提示皮质激素合成过程中的某些羟化步骤需消耗较多的维生素 C。

(3) 芳香族氨基酸的羟化 苯丙氨酸(*Phe*)羟化为酪氨酸(*Tyr*),酪氨酸转变为儿茶酚胺(*catecholamine*),色氨酸(*Trp*)转变为 5-羟色胺(*5-HT*)等过程中的羟化步骤均需要维生素 C 的参加。

(4) 有机药物或毒物的羟化 药物或毒物在内质网上的羟化过程,是肝中重要的生物转化反应。维生素 C 能强化此类羟化反应酶系的活性,促进药物或毒物的代谢转变,因而有增强解毒的作用。

十、硫辛酸

硫辛酸(*lipoic acid*)又名 6,8-二硫辛酸,其结构式如图 4-22。

硫辛酸分子内含二硫键,故常用 $\text{L} \begin{matrix} \text{S} \\ | \\ \text{S} \end{matrix}$ 表示之。硫辛酸能还原为带有两个

个 $-\text{SH}$ 的二氢硫辛酸,作为硫辛酸乙酰转移酶的辅酶,参与丙酮酸的氧化脱羧反应。硫辛酸有抗脂肪肝和降低血胆固醇的作用。另外,硫辛酸的氧化还原反应,可保护巯基酶免受重金属离子的毒害。

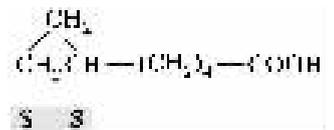


图 4-22 硫辛酸的结构

第三节 维生素的缺乏与过量中毒

引起维生素缺乏的原因有:食物的保存、加工与烹调不当造成维生素被过量破坏;不良的饮食习惯如偏食等造成维生素的摄入不足;某些疾病导致维生素的大量被消耗或肠胃道疾病造成维生素的吸收障碍;以及需要量增加而摄入量没有相应增加。例如,不同的工种、不同的饮食习惯与食谱对维生素的需求是不同的,不同的药物和治疗手段对维生素的额外需求也是不同的。

当摄入量达到某一数值时,人们将没有发生该维生素缺乏症的危险,该数值被称为该维生素的每日需要量(*recommended daily amounts, RDA*)。RDA 对于制定营养干预政策具有重要的参考意义。但也要清醒地看到:它与营养素推荐量、安全量、可耐受量等指标一样,受到诸多因素的影响,且因人而异,因此在使用时要充分考虑。

食物中所含的维生素虽然种类丰富,但相对来讲数量都不多,绝不至于造成摄入过量。而经过人工提纯而被高度浓缩的维生素制剂就不同了。一旦服用过量,就有可能造成堆积,进而导致中毒症。脂溶性维生素由于其脂溶性,能储存于肝和脂肪组织中,所以临床上维生素中毒症多见于脂溶性维生素。如“AD”

丸中毒症,若每日摄入维生素 A 超过 3 000 μg ,即为不妥,若超过 5 000 μg ,有的人将可能出现扁骨痛、头痛、毛发稀疏、食欲不振和生长滞缓等中毒症状。维生素 E 若过量,也会产生副作用,表现为恶心、头晕、腹痛、腹泻,对于青少年,还可能促使乳房胀大,性早熟等。维生素 C 的中毒虽极少见,但对孕妇,若长时间大量服用,将诱导体内抗坏血酸氧化酶的合成,使胎儿体内该酶活性升高,这将增加胎儿出生后患坏血病的可能。过量的维生素 C 将增加患各种结石症的可能性。所以,对于维生素的补充要合理,并且要适量,当然首先应考虑“食补”。

第四节 维生素的协同作用

大量实验和临床表明,各种维生素在被吸收、体内转化以及在发挥作用的过程中,都不是孤立的。它们之间常呈现相互依赖和影响的关系,即协同作用。

一、吸收时的协同作用

维生素 E 可以保护维生素 C、 B_1 、A、 β -胡萝卜素可以保护维生素 C,维生素 C 对维生素 A、E 及部分 B 族维生素也能起保护作用,从而有利于后者的吸收。维生素 D 能促进维生素 A 的吸收。在 B 族维生素之间存在协同作用,维生素 B_6 能帮助 B_{12} 的吸收,而当维生素 B_1 : B_2 : B_6 的比例为 1: 1: 1 时,达到最佳的吸收率。

二、功能的协同作用

维生素 A 在维生素 E 存在时,其功能有较大的增强,而维生素 C 对维生素 E 的功效加强更加明显,维生素 B_6 将减少维生素 C 过量所造成的副作用等。这些协同作用正被不断地发现并应用于临床。

这些协同作用不仅存在于各种维生素之间,而且在维生素与无机盐、微量元素之间也存在,并日益显示其重要性。上述情况都提示我们,在补充维生素时,宜使用合理搭配的组合维生素。尤其是 B 族维生素被复合后,比单一维生素 B 的效果要好得多。

Summary

Vitamins, the essential nutrients of the human body, can be divided into two major types of the lipid-soluble vitamins and the water-soluble vitamins. The lipid-soluble vitamins include Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E, Vitamin K, etc. They often directly participate in physiological activities in vivo. Vitamin A participates in the synthesis of visual purple, maintains the integrity of keratinocytes, and promotes the growth and development of the human body. Moreover, Vitamin A is usually hypothesized to reduce the risk of the cancer. The deficiency of it often leads to nyctalopia and xerophthalmia. The content of Vitamin D and Vitamin A is plentiful in the liver, so the cod-liver oil is also called “the pill of Vitamin A and Vitamin D”. In vivo, Vitamin D has the activity of physiology, after it finishes the reaction of hydroxylation in liver and kidney respectively, meanwhile, it synthesizes $1,25(\text{OH})_2\text{-VD}_3$. Its main function is to promote the calcium and phosphoric absorption, and constitutes the skeleton and teeth. A lack of it often leads to pedo-rickets and osteomalacia. Vitamin E is a kind of valid antioxidant in vivo, can resist all kinds of free radicals and protect the macromolecule not to encounter the breakage in living creature, so it has functions of the anti-decrepitude, anti-tumor, and anti-arterioscle-

rosis. While Vitamin K primarily participates in the process of blood coagulation.

The water-soluble vitamins include the family of Vitamin B and Vitamin C. The family of Vitamin B primarily distributes in yeast, liver and rough foods. In vivo, its main function is to be used as the coenzyme of some enzymes. For example, the thiamine is a kind of coenzyme of α -ketoacid decarboxylase; riboflavin and nicotinamide are the coenzymes of oxidoreductive reactions which can constitute FAD, FMN and NAD^+ , NADP^+ in vivo. In the process of transfer acyl group, the pantothenic acid is a kind of coenzyme which constitutes the CoA and the ACP; Vitamin B_6 is the coenzyme of transaminases and decarboxylases of amino acids; Biotin is the coenzyme of carboxylases; Vitamin B_{12} and folic acids participate in the metabolism of one carbon unit to promote synthesis of nucleic acids. Vitamin C acts as a donor of reducing equivalents to have many biological functions such as protection of some important compounds with sulfhydryl group from oxidation, participation of hydroxylation of proline and lysine in collagen synthesis, promotion of synthesis of the antibody and detoxification of poisons, resistance decrepitude, and so on.

Lacking vitamins will cause some diseases, however, excessive intake also may result in intoxication. In fact, it is impossible that the content of diet is excessive, so the supplement of vitamins is advocated by food intake. Among the vitamins, there are synergistic actions, not only in the process of absorption, but also in the process of developing the physiological functions.

思 考 题

1. 人体对二类维生素的摄入要求有何不同？为什么？
2. 简述维生素 A、D、E、K 的来源、生理作用及其缺乏症。
3. 简述维生素 B 族的主要来源、作用及其缺乏症。
4. 简述维生素 C 的来源、作用及其缺乏症。
5. 各维生素之间的协同作用表现在哪里？有什么意义？

(严 哲)

第五章 酶

本章教学要求

- 酶的概念、分子组成、酶的活性中心、酶的结构与功能的关系
- 变构酶、同工酶、酶原与酶原的激活、酶的共价修饰
- 酶的命名与分类
- 酶促反应特点及机制
- 酶促反应动力学 :底物浓度、酶浓度、pH、温度、抑制剂对酶促反应速率的影响
- 酶与医学

酶(enzymes)是活细胞合成的、具有高度催化效率和高度特异性的蛋白质。生物体内每时每刻都在进行着各种不同的化学反应,这些化学反应几乎都是由酶催化的。如果没有酶,生命也就不复存在。早在18世纪人们就注意到胃液能消化肉类,唾液能将淀粉变成糖。1857年法国著名科学家巴斯德(Louis Pasteur)认为发酵是酵母细胞中酵素(ferments)催化作用的结果。1878年Wilhelm Kühne提出Enzyme一词,中文译作酶。1897年德国科学家Buchner兄弟首次成功地用不含细胞的酵母提取液催化发酵,证明发酵过程并不需要完整的细胞。1926年美国科学家James Sumner首次从刀豆中得到脲酶结晶,并证明脲酶是蛋白质。以后陆续证实已发现的两千余种酶都是蛋白质,因此人们认为酶的本质是蛋白质。直到1982年Thomas Cech在研究四膜虫rRNA前体加工过程中,发现在没有蛋白质存在条件下rRNA具有自我剪切功能,即rRNA具有酶活性。他将这种RNA命名为核酶(ribozymes)。1995年Bernard Cuenoud等发现DNA也有连接酶和磷酸酯酶的活性,称为脱氧核酶(deoxyribozymes)。酶和核酶、脱氧核酶都是生物催化剂。

许多先天性遗传疾病是由于体内某种酶的缺失或酶活性改变造成的。许多药物也是通过影响酶的活性及含量发挥其治疗作用的。

第一节 酶的结构与功能

一、酶的分子组成

(一) 酶的分子组成

酶的化学本质是蛋白质,和其他蛋白质一样可分为两类:单纯酶和结合酶。单纯酶(simple enzyme)是只由氨基酸组成的单纯蛋白质。脲酶、某些蛋白酶、淀粉酶、脂酶及核糖核酸酶等属于单纯酶。结合酶(conjugated enzyme)由蛋白质部分和非蛋白质部分组成,其中蛋白质部分称为酶蛋白(apoenzyme),非蛋白质部分称为辅助因子(cofactor)。辅助因子包括小分子有机化合物和金属离子。酶蛋白与辅助因子组合成全酶(holoenzyme),即全酶=酶蛋白+辅助因子。酶蛋白和辅助因子单独存在时均无催化活性,只有全酶才具有酶活性。酶蛋白决定其催化反应的特异性,辅助因子决定其反应的类型和性质。酶的辅助因子可分为辅酶(coenzyme)和辅基(prosthetic group)。辅酶与酶蛋白结合疏松,以非共价键相连,可以用透析或超滤方法除去。辅基则与酶蛋白以共价键紧密结合,不能通过透析或超滤将其除去。如脱氢酶辅助因子尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+ ,辅酶I)和尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP^+ ,辅酶II)与酶

蛋白结合疏松,称为辅酶,而黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)与酶蛋白结合紧密为辅基。体内酶种类很多,但辅助因子种类却很少,一种辅酶可与许多种酶蛋白结合,如辅酶在反应中作为底物接受质子或基团后离开一种酶蛋白,而与另一酶蛋白结合并将所携带的质子或基团转移。酶蛋白和辅酶在催化反应完成后可分离。酶的辅基则相反,不能与酶蛋白分离。

一些化学性质稳定的小分子有机化合物是重要的辅助因子,其主要作用是在反应中传递电子、质子或一些化学基团。这类辅助因子多含有铁卟啉(其结构和功能见生物氧化)、维生素B等。如维生素B₁在生物体内以硫胺素焦磷酸(TPP)的形式存在。脱氢酶的辅酶NAD⁺含有尼克酰胺(维生素PP)、FAD含有维生素B₂等。其他辅助因子尚有结合CO₂的生物素、结合一碳单位的四氢叶酸(含叶酸)、转移氨基的磷酸吡哆醛(含维生素B₆)、运载酰基的辅酶A(含泛酸)等(表5-1)。

表5-1 辅助因子的种类及作用

名称	缩写名	转移基团	所含维生素
辅酶 I/辅酶 II	NAD ⁺ /NADP ⁺	H ⁺ 、电子	尼克酰胺
黄素腺嘌呤二核苷酸	FAD	氢原子	B ₂
焦硫酸硫胺素	TPP	醛基	B ₁
磷酸吡哆醛		氨基	B ₆
辅酶 A	CoASH	酰基	泛酸
生物素		CO ₂	生物素
四氢叶酸	FH ₄	一碳单位	叶酸
辅酶 B ₁₂		氢原子、烷基	B ₁₂

大多数酶含有金属离子,如碳酸酐酶及羧基肽酶含有Zn²⁺(表5-2)。作为辅助因子的金属离子有K⁺、Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Fe²⁺(Fe³⁺)等。按金属离子与酶分子结合紧密程度不同可将含金属的酶分为金属酶和金属激活酶。金属酶(metalloenzyme)是指金属离子与酶结合紧密,提取过程中不易丢失,如羧基肽酶(Zn²⁺)、谷胱甘肽过氧化物酶(Se²⁺)、碱性磷酸酶(Mg²⁺)等。金属酶中金属离子与酶结合相当牢固,而且加入游离金属离子后其活性不会增加。有的金属离子不与酶直接结合,但为酶活性所必需,这类酶称为金属激活酶(metal activated enzyme)。如丙酮酸羧化酶可被Mn²⁺激活,柠檬酸合酶可被K⁺激活等。这种金属离子在酶的纯化过程中常常丢失,必须再加入金属离子才能恢复活性。金属离子的功能多种多样,它可作为酶活性中心的催化基团传递电子而参与催化反应。金属离子可使底物靠近酶的活性中心与底物反应基团形成正确空间排列,利于反应发生。金属离子可与酶、底物形成三元复合物作为连接酶分子与底物分子之间的桥梁,如丙酮酸激酶催化过程中形成酶-Mg²⁺-底物三元复合物;己糖激酶催化时形成葡萄糖-Mg²⁺-ATP三元复合物等。金属离子所具有的正电荷可中和底物的阴离子,减小静电斥力;还可起稳定酶分子构象等。有一些酶既含有小分子有机辅助因子又含有金属离子。如细胞色素氧化酶以血红素为辅基,也含有Cu离子(表5-3)。

表5-2 一些金属酶和金属激活酶类

金属酶	金属离子	金属激活酶	金属离子
碳酸酐酶	Zn ²⁺	柠檬酸合成酶	K ⁺
羧基肽酶	Zn ²⁺	丙酮酸激酶	K ⁺ , Mg ²⁺
过氧化物酶	Fe ²⁺	丙酮酸羧化酶	Mn ²⁺ , Zn ²⁺
过氧化氢酶	Fe ²⁺	精氨酸酶	Mn ²⁺
己糖激酶	Mg ²⁺	磷酸水解酶类	Mg ²⁺
磷酸转移酶	Mg ²⁺	蛋白激酶	Mg ²⁺ , Mn ²⁺
锰超氧化物歧化酶	Mn ²⁺	磷脂酶 C	Ca ²⁺
谷胱甘肽过氧化物酶	Se ²⁺	磷脂酶 A ₂	Ca ²⁺

(二) 单体酶、寡聚酶、多酶体系

酶是蛋白质,也具有一、二、三级,甚至四级结构。只有一条多肽链(具有三级结构)组成的酶为称单体酶(monomeric enzyme),例如牛胰核糖核酸酶、溶菌酶、羧肽酶A等。由多个相同或不同亚基以非共价键相连的酶称为寡聚酶(oligomeric enzyme)。绝大多数寡聚酶含偶数亚基。寡聚酶多数是可调解酶,在代谢调控中起重要作用。生物体内存在着许多由几种不同功能的酶聚合形成的多酶复合物,其催化作用如同流水线,底物从一个酶依次流向另一个酶,发生连锁反应。此类酶被称为多酶体系(multi-enzyme system)。如丙酮酸脱氢酶系是由三个酶和五个辅助因子组成的复合体,催化丙酮酸脱氢脱羧反应。一些多酶体系在进化过程中由于基因融合,使具有多种不同催化功能的酶形成一条多肽链,这类酶被称为多功能酶(multifunctional enzyme)或串联酶(tandem enzyme),如脂肪酸合成酶系,它由两条多肽链构成,每条多肽链含有7种不同的酶活性。

表5-3 一些酶含有机分子辅酶和金属离子

酶名称	金属离子	有机分子辅基
细胞色素氧化酶	Cu^{2+}	血红素
醇脱氢酶	Fe^{2+} 、 Mo^{6+}	FAD
黄嘌呤氧化酶	Fe^{2+} 、 Mo^{6+}	FAD
丁酰 CoA 脱氢酶	Mo^{6+}	FAD
琥珀酸脱氢酶	Fe^{2+}	FAD
NADH-细胞色素还原酶	Fe^{2+}	FAD
甲基丙二酰 CoA 异构酶	Co^{2+} 、 Co^{3+}	钴胺辅酶

二、酶的活性中心

酶分子中存在着许多化学基团,例如,氨基、羧基、羟基、咪唑基、巯基等,但这些基团不一定都与酶活性有关。酶分子中只有那些与酶活性有关的基团,称作酶的必需基团(essential group)。常见的必需基团有丝氨酸残基的羟基、组氨酸残基的咪唑基、半胱氨酸的巯基、酸性氨基酸残基的羧基(表5-4)等。这些基团多具有独对电子,易与底物形成配位键。酶蛋白分子中能与底物特异结合并发挥催化作用,将底物转变为产物的部位称为酶的活性中心(active center)或活性部位(active site)。

表5-4 一些酶活性中心的必需基团

名称	活性中心的必需基团
胰蛋白酶	His42 Ser180 Asp87
弹性蛋白酶	His57 Asp102 Ser195 Asp194 Ile16
羧基肽酶	Arg145 Tyr248 Glu270
溶菌酶	Glu35 Asp52
乳酸脱氢酶	Asp30 Asp53 Lys58 Tyr85 Arg101 Glu140 Arg171 His195 Lys250
α -胰凝乳蛋白酶	His57 Asp102 Asp194 Ser195 Ile16

酶活性中心的必需基团有两种:一是结合基团(binding group),其作用是识别底物并与其特异结合,使底物与具有一定构象的酶形成复合物;另一是催化基团(catalytic group),其作用是影响底物中的某些化学键的稳定性,催化底物发生化学反应,从而将其转变成产物。有些酶的必需基团同时兼有结合和催化两种功能。除了酶活性中心(图5-1)内的必需基团之外,酶在活性中心以外也有必需基团。它们虽然不直接参与催化作用,但却能维持酶的特殊的空间构象,称为酶活性中心外的必需基团。如酶的这些必需基团被修饰,酶的空间结构会出现较大的改变,影响酶活性中心的形成,丧失催化活性。

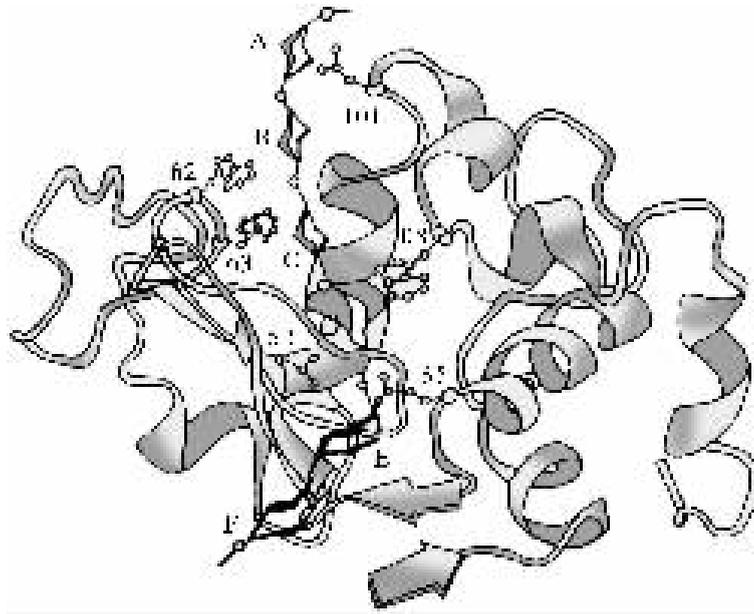


图 5-1 溶菌酶的活性中心

A、B、C、D、E、F 为溶菌酶的底物 $(\text{NAG})_6$ 的 6 个 N-乙酰氨基葡萄糖环，35 为溶菌酶的 35 位 Glu，52 为溶菌酶的 52 位 Asp，均为该酶的催化基团。Glu₃₅ 和 Asp₅₂ 催化 D 环的糖苷键断裂，使 E、F 两个二聚体与 A、B、C、D 四聚体分开。Asp₁₀₁、Trp₁₀₈ 是该酶的结合基团

酶活性中心是由一级结构上可能相距较远，但在三维空间结构上却十分接近的几个氨基酸残基形成的具有一定空间结构的区域。酶活性中心常常是具有三维空间结构的裂缝或裂隙(crevice)。底物分子(或一部分)结合到裂隙内并发生催化反应。此裂缝多为氨基酸残基的疏水基团形成的疏水“口袋”，深入到酶分子内部。非极性基团聚在一起形成一个易与底物结合的环境，利于催化作用的发生。在此裂隙中底物浓度可达很高。酶可由数十个或数百个氨基酸残基组成，而构成活性中心的氨基酸残基只是一小部分，常常只占整个酶分子体积的 1%~2%。酶分子的催化部位常常只由 2 个~3 个氨基酸残基构成。而酶分子中大部分氨基酸残基作为支架用于形成酶分子的三维空间结构。图 5-1 显示了溶菌酶的活性中心，该部位刚好能容纳一个六糖分子 $(\text{NAG})_6$ ，A、B、C、D、E、F 表示 6 个糖残基的位置。第四个糖残基 D 环由于空间限制作用由正常的椅式结构变成能量较高的半椅式构象，导致 D-E 之间的糖苷键稳定性降低，容易断裂。酶分子的 Glu₃₅ 和 Asp₅₂ 催化 D 环的糖苷键断裂，使 E、F 二聚体与 A、B、C、D 四聚体分开。

三、酶的结构与功能

(一) 酶的一级结构、空间结构与酶的活性

酶的一级结构是酶发挥催化功能的结构基础。酶的一级结构改变可能使其催化功能发生一定的改变。与酶活性密切相关的氨基酸序列是维持酶活性的关键。有相同催化功能的同一类酶，其活性中心的一些氨基酸序列有极大的同源性。例如，胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶均属于胰蛋白酶家族，这三种酶活性中心的氨基酸残基有 25% 的同源性，甚至二硫键的位置亦相同。胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶的活性中心均含有 Ser 和 His 残基(见第二章 表 2-7)，而木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶的活性中心则含有 Cys 和 His 残基。

酶的催化活性除了依赖于酶的一级结构，也与它的正确的空间构象密切相关。如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶的活性中心 Ser 残基附近都有一个立体的“口袋”状结构，被水解肽键羧基侧的氨基酸侧链恰好落在这个口袋中。胰蛋白酶的口袋较深，底部含带负电的 Asp₁₈₉，可容纳底物的带正电的长侧链 Arg 或 Lys，使 Arg 或 Lys 的羧基端肽键被水解。胰凝乳蛋白酶的口袋较宽，并由非极性氨基酸残基构成，故可容纳侧链大的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸，使其羧基端肽键被水解。弹性蛋白酶的袋口两侧均

为 Val,对侧链大或长的残基的进入有阻碍作用,故该酶易水解侧链小的非极性氨基酸的羧基端肽键(图 5-2)。一些酶具有四级结构,四级结构完整时,酶的催化功能才可正常发挥。因此酶的特异的三维空间结构是酶催化功能的基础。

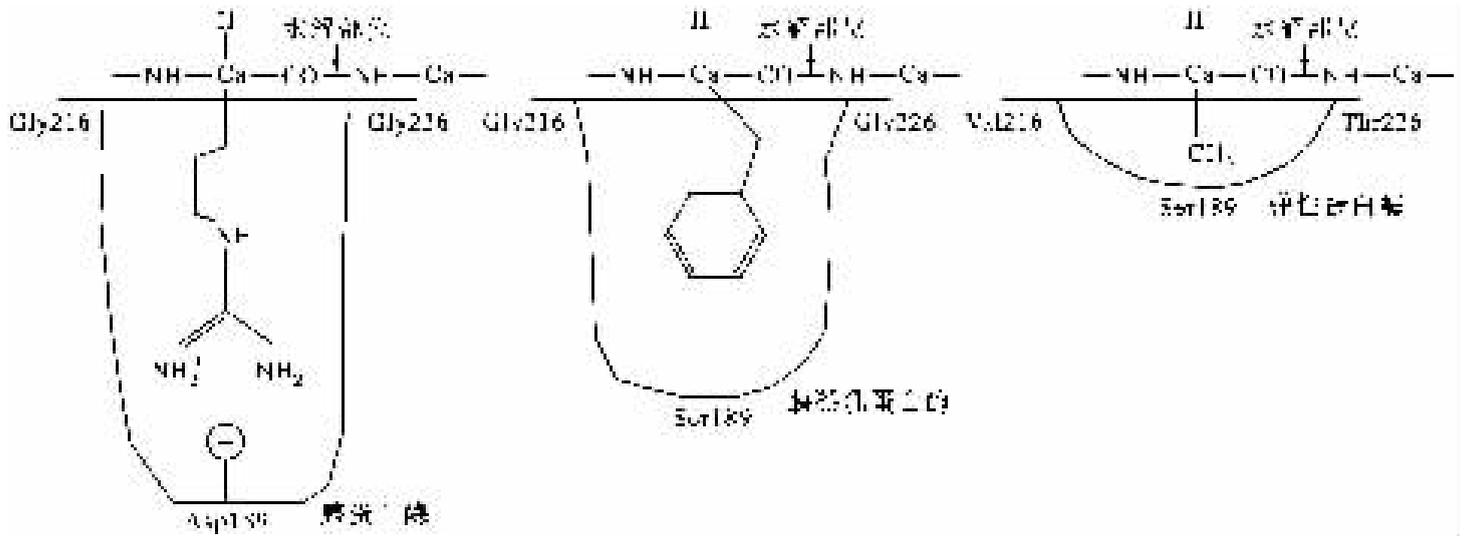


图 5-2 胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶活性中心底物结合口袋

(二) 酶的变构效应

关于血红蛋白的变构调节已在第二章涉及,生物体内许多酶也有类似的变构现象。细胞内一些中间代谢物能与某些酶分子活性中心以外的某一部位以非共价键可逆结合,使酶构象发生改变并影响其催化活性,进而调节代谢反应速率,这种现象为变构效应(allosteric effect)。对酶催化活性的这种调节方式称为变构调节(allosteric regulation)。具有变构调节的酶被称为变构酶(allosteric enzyme)。酶分子中与中间代谢物结合的部位称为变构部位(allosteric site)或调节部位(regulatory site)。能引起变构效应的代谢物称为变构效应剂(allosteric effector)。如果某效应剂能使酶活性增加并加速反应速率,则被称为变构激活剂(allosteric activator);反之,降低酶活性及反应速率者为变构抑制剂(allosteric inhibitor)。

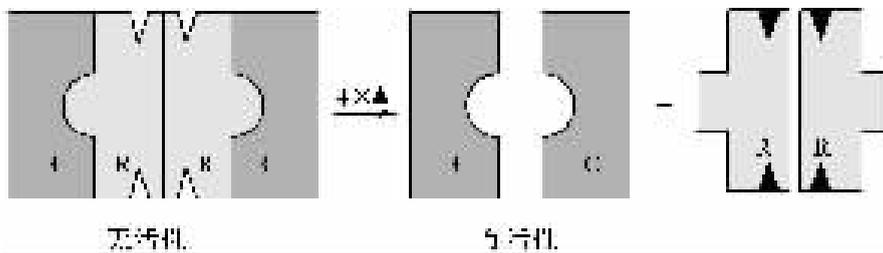


图 5-3 蛋白激酶 A 的变构作用

蛋白激酶 A (R_2C_2) 的 R_2 与 4 个 cAMP ($4 \times \blacktriangle$) 结合后,使 R 亚基对 C 亚基的抑制作用消失,C 亚基则具有催化活性

变构酶均由多个亚基构成,含催化部位(活性中心)的亚基称为催化亚基;含有与变构效应剂相结合的部位(调节部位)的亚基称为调节亚基。有的酶分子的催化部位与调节部位在同一亚基内。具有多个亚基的变构酶与血红蛋白相似,也存在协同效应。当效应剂与酶的第一个亚基结合后可引起寡聚酶的其余亚基构象发生变化,进而与此种效应剂结合的速率加快,这种效应称为正协同效应;反之,使效应剂与酶结合速率下降则称为负协同效应。变构效应剂常常引起酶的紧密构象(T 态)和松弛构象(R 态)之间的互变,亚基的聚合或解聚,如同氧可使血红蛋白发生的变构效应。例如,蛋白激酶 A 由两个催化亚基(C)与两个调节亚基(R)构成(图 5-3),调节亚基对催化亚基的活性有抑制作用。cAMP 是一种变构激活剂,它可与调节亚基结合,使调节亚基发生构象改变,从而与催化亚基分离,游离的催化亚基即具有催化活性。

变构效应剂常常是酶的底物、产物或其他小分子代谢物。这些变构效应剂浓度的变化可通过变构效应改变某些酶的活性,进而改变代谢反应速率或代谢途径的方向。变构酶的动力学特点不符合米氏方程式。在变构效应剂作用下,正协同效应变构酶的反应速率对 $[S]$ 的曲线呈S型(图5-4),而不是矩形双曲线。

例如,磷酸果糖激酶的变构激活剂是ADP、AMP。当它们发挥作用时,S形曲线可左移发生变构激活作用,而变构抑制剂ATP可使曲线右移,发生变构抑制作用。变构调节只引起酶构象的改变,不涉及共价键的改变。

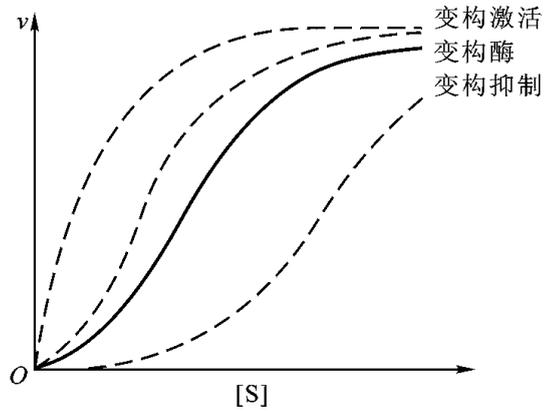


图5-4 变构酶的S形曲线

(三) 酶的共价修饰

酶蛋白肽链上的某些基团可在另一种酶的催化下,与某些化学基团发生可逆的共价结合,从而影响酶的活性。对酶活性的这种调节方式称为酶的共价修饰(covalent modification)或化学修饰(chemical modification)。酶的可逆的共价修饰包括磷酸化(phosphorylation)和去磷酸化(dephosphorylation,图5-5);甲基化(methylation)和去甲基化(demethylation);腺苷化(adenylation)和去腺苷化(deadenylation);尿苷化(uridylation)和去尿苷化(deuridylation);ADP-核糖化(ADP-ribosylation)和去ADP-核糖化(deribosylation)等。酶的磷酸化和去磷酸化是常见的酶化学修饰方式。酶蛋白的磷酸化是在蛋白激酶的催化下,来自ATP的磷酸基团共价地结合在酶蛋白的Ser、Thr或Tyr残基的侧链羟基上。反之,磷酸化的酶蛋白在磷蛋白磷酸酶催化下,磷酸酯键被水解。磷酸化或去磷酸化可使酶从无(低)活性变为有(高)活性。一些酶也可从有(高)活性变为无(低)活性。

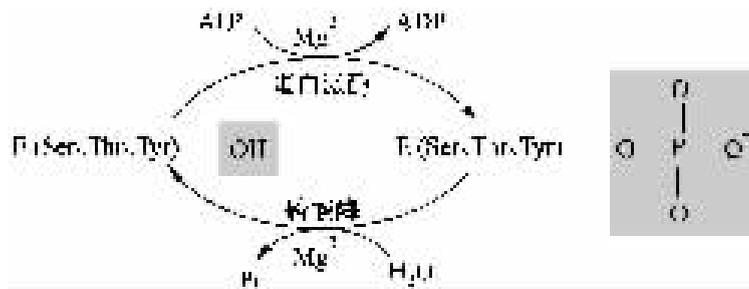


图5-5 酶蛋白的磷酸化与去磷酸化

(四) 酶原与酶原的激活

一些酶在细胞合成时,没有催化活性,需要经一定的加工剪切才有活性。这类无活性的酶的前体称为酶原(zymogen)。在合适的条件下和特定的部位,无活性的酶原向有活性的酶转化的过程称为酶原的激活(zymogens activation)。人体内与肠道消化、血液凝固、免疫系统补体等作用相关的酶在分泌过程时是以酶原形式存在的。酶原分子中没有活性中心或活性中心被掩盖,因此酶原无催化活性。酶原的激活是酶原在另一蛋白水解酶的催化下,切除部分肽段,进而形成或暴露酶的活性中心的过程。例如,胰蛋白酶原(245个AA)经胰腺 α 细胞合成进入小肠时,在 Ca^{2+} 存在下可被肠液中的肠激酶激活,从N端水解下一个六肽,胰蛋白酶一级结构改变后,分子构象改变卷曲形成活性中心,于是无活性的胰蛋白酶原变成有活性的胰蛋白酶(239个AA,图5-6)。

胰蛋白酶原被激活后,生成的胰蛋白酶对胰蛋白酶原有自身激活作用,这大大加速了该酶的激活作用,同时胰蛋白酶还可激活胰凝乳蛋白酶原、羧基肽酶原A和弹性蛋白酶原等(表5-5),加速肠道对食物的消化过程。血液中血液凝固与纤维蛋白溶解系统的激活也具有典型的逐步放大效应,呈级联反应。少量凝血因子被激活时,可通过瀑布式放大作用,使大量凝血酶原转化为凝血酶,迅速引起血液凝固的发生。

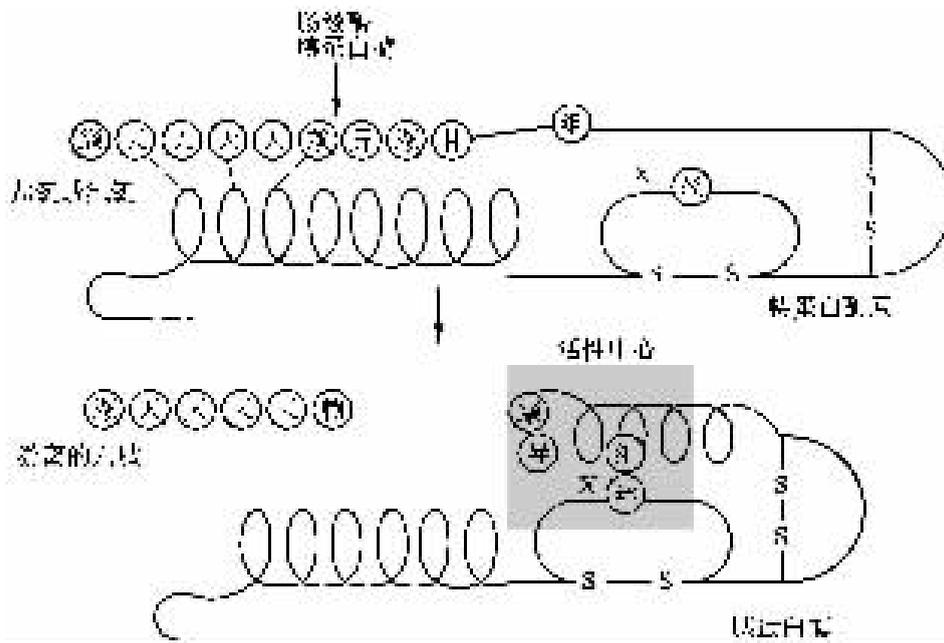


图 5-6 胰蛋白酶原的激活

酶原形式的存在及酶原的激活有重要生理意义。消化道蛋白酶以酶原形式分泌,避免了胰腺细胞和细胞外间质的蛋白被蛋白酶水解而破坏,并保证酶在特定环境及部位发挥其催化作用。正常情况下血管内凝血酶原不被激活,则无血液凝固发生,保证血流通畅运行。一旦血管破损,凝血酶原被激活成凝血酶,血液凝固,催化纤维蛋白酶原变成纤维蛋白阻止大量失血,起保护机体作用。因此,还可以把酶原看成是酶的贮存形式,一旦需要时,便可激活使用。

表 5-5 某些消化酶原的激活

酶 原	激活因素	激活途径	部 位
胃蛋白酶原	H ⁺ 或胃蛋白酶	胃蛋白酶 + 六肽	胃腔
胰凝乳蛋白酶原	胰蛋白酶	胰糜蛋白酶 + 两个二肽	小肠腔
弹性蛋白酶原	胰蛋白酶	弹性蛋白酶 + 几个肽段	小肠腔
羧基肽酶原	胰蛋白酶	羧基肽酶 + 几个肽段	小肠腔

(五) 同工酶

同工酶 (isoenzyme) 是指催化相同的化学反应,但酶分子结构、理化性质及免疫学性质等不同的一组酶。同工酶是由不同基因或等位基因编码的多肽链或由同一基因转录生成的不同 mRNA 翻译的不同多肽链组成的蛋白质。同工酶可存在于不同个体的不同组织中,也可存在于同一个体、同一组织和同一细胞中。在个体发育的不同阶段,同一组织也可因基因表达不同而有不同的同工酶谱,即在同一个体的不同发育阶段其同工酶亦有不同。

哺乳类动物细胞的乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase LDH) 共有 5 种同工酶。该酶是由两种亚基构成的四聚体,一种亚基是骨骼肌型 (M),另一种亚基是心肌型 (H)。这两种亚基以不同比例组成 5 种同工酶 (图 5-7)。由于 5 种同工酶结构上的差异,使各种同工酶的电泳行为及对底物的 K_m 有显著不同,5 种 LDH 具有不同电泳速率,在常规条件下由 1→5 型电泳速率递减。

LDH 同工酶在不同组织中含量和分布比例不同,各器官组织有各自特定的分布酶谱 (表 5-6),因此使不同组织细胞有不同的代谢特点。例如,骨骼肌富含 LDH₅,其对 NAD⁺ 亲和力较低,对 NADH 和丙酮酸亲和力强,催化丙酮酸还原成乳酸,保证肌肉组织在短暂缺氧时仍能快速获得能量;而心肌富含 LDH₁,易使乳酸变成丙酮酸而被利用。可见 LDH₁ 和 LDH₅ 虽然催化同一反应但催化方向不同,对不同组织器官起着重要调节作用。研究指出,在生物体的不同发育期的同工酶种类可不同。如在鼠出生前 5 天时心脏以

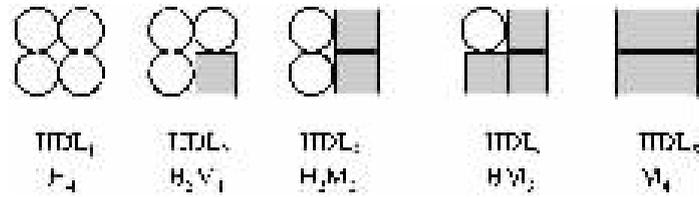


图 5-7 LDH 同工酶

LDH₄ 为主,而后 12 天主要含 LDH₂ 和 LDH₃。肌酸激酶(creatine kinase,CK)是二聚体酶,其亚基有 M 型(肌型)和 B 型(脑型)两种,共有 3 种同工酶。脑中含 CK₁ 型(BB 型);骨骼肌含 CK₃ 型(MM 型);心肌含 CK₂(MB 型)。在电泳中向正极泳动速率从快到慢依次为 CK₁、CK₂、CK₃。

同工酶的测定对于疾病的诊断及预后具有重要意义。当组织细胞病变时,某种同工酶即释放入血浆。血浆同工酶总活性及同工酶谱的分析有助于疾病的诊断及预后的判断。如心肌梗死后 3~6 h 血中 CK₂ 活性升高,24 h 酶活性到达顶峰,3 d 内恢复到正常水平。CK₂ 主要存在于心肌组织中,其他组织和器官含量很少,所以 CK₂ 是诊断心肌梗死的一个极其可靠的生化指标。LDH 释放入血比 CK₂ 迟 1~2 d,发病后 24~48 h 后逐渐升高,3~6 d 达到顶峰,8~14 d 才恢复正常。正常血浆 LDH₂ 活性高于 LDH₁,心肌梗死可见 LDH₁ 高于 LDH₂。此外,急性肝炎时 LDH₅ 明显升高,肝硬化时 LDH₁、LDH₃、LDH₅ 都升高。原发性肝癌 LDH₃、LDH₄、LDH₅ 升高,并且 LDH₅ 高于 LDH₄。转移性肝癌 LDH₃、LDH₄、LDH₅ 升高,但 LDH₄ 高于 LDH₅。

表 5-6 人不同组织器官的 LDH 同工酶谱(LDH 活性的百分数%)

LDH 同工酶	亚基组成	红细胞	白细胞	血清	骨骼肌	心肌	肺	肾	肝	脾
LDH ₁	H ₄	43	12	27.1	0	73	14	43	2	10
LDH ₂	H ₃ M	44	49	34.7	0	24	34	44	4	25
LDH ₃	H ₂ M ₂	12	33	20.9	5	3	35	12	11	10
LDH ₄	HM ₃	1	6	11.7	16	0	5	1	27	20
LDH ₅	M ₄	0	0	5.7	79	0	12	0	56	5

第二节 酶的命名与分类

目前已发现 4 000 多种酶,为了研究和使用方便,1961 年国际生物化学学会酶学委员会推荐一套系统命名法及分类方法。

一、酶的命名

(一) 酶的习惯命名法

1961 年以前人们使用的是酶的习惯命名法,其原则是:① 绝大多数的酶是依据其所催化的底物命名,在底物的英文名词上加尾缀 ase 作为酶的名称。如催化蛋白水解的酶称为蛋白酶(proteinase),水解脂肪的酶为脂肪酶(Lipase)。② 某些酶根据其所催化的反应类型或方式命名,如乳酸脱氢酶,谷丙转氨酶等。③ 在上述命名基础上再加上酶的来源和酶的其他特点,例如,胃蛋白酶,指出酶的来源;碱性磷酸酶和酸性磷酸酶,指出这两种酶在催化时要求反应条件不同等。

(二) 酶的系统命名法

国际生物化学学会酶学委员会提出的系统命名法的原则是以酶所催化的整体反应为基础的。命名时应明确每种酶的底物及催化反应的性质(表 5-7),若有多个底物都要写明,其间用冒号(:)隔开。如乳酸

脱氢酶的系统命名是 L-乳酸 :NAD⁺ 氧化还原酶。该命名法并赋予每个酶专有的编号。这样一种酶只有一个名称和一个编号。缺点是名称过长且繁琐,因此人们还常常使用习惯命名法。国际酶学委员会还建议使用一种习惯名称作为推荐名称,如 L-乳酸 :NAD⁺ 氧化还原酶的推荐名称为乳酸脱氢酶。

表 5-7 酶的分类及系统命名法举例

类别	催化的反应	推荐名称	系统名称	编号
氧化还原酶类	醇 + NAD ⁺ \rightleftharpoons 醛或酮 + NADH	醇脱氢酶	醇 :NAD ⁺ 氧化还原酶	EC 1.1.1.1
转移酶类	L-天冬氨酸 + α -酮戊二酸 \rightleftharpoons 草酰乙酸 + L-谷氨酸	天冬氨酸氨基转移酶	L-天冬氨酸 : α -酮戊二酸氨基转移酶	EC 2.6.1.1
水解酶类	D-葡萄糖-6-磷酸 + H ₂ O \rightleftharpoons D-葡萄糖 + H ₃ PO ₄	葡萄糖 6 磷酸酶	D-葡萄糖-6-磷酸水解酶	EC 3.1.3.9
裂解酶类	酮糖-1-磷酸 \rightleftharpoons 磷酸二羟丙酮 + 醛	醛缩酶	酮糖-1-磷酸醛裂合酶	EC 4.1.2.7
异构酶类	D-葡萄糖-6-磷酸 \rightleftharpoons D-果糖-6-磷酸	磷酸果糖异构酶	D-葡萄糖-6-磷酸酮醇异构酶	EC 5.3.1.9
合成酶类	L-谷氨酸 + ATP + NH ₃ \rightleftharpoons L-谷氨酰胺 + ADP + 磷酸	谷氨酰胺合成酶	L-谷氨酸 :氨连接酶	EC 6.3.1.2

二、酶的分类

国际生物化学学会酶学委员会根据酶催化的反应类型,将酶分为六大类(表 5-7):

1. 氧化还原酶类(oxidoreductases) 催化底物氧化还原反应的酶类。例如,乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、琥珀酸脱氢酶等,还包括氧化酶、加氧酶、羟化酶等。
2. 转移酶类(transferases) 催化底物之间基团转移或转换的酶类。例如,氨基转移酶、甲基转移酶、糖基转移酶、激酶、磷酸化酶等。
3. 水解酶类(hydrolases) 催化底物进行水解的酶类。例如,淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、蔗糖酶、磷酸酶等。
4. 裂解酶类(或裂合酶类,lyases) 催化底物移去一个基团并形成双键的反应或逆反应的酶类。例如,醛缩酶、合酶、水化酶、脱水酶、脱羧酶、裂解酶等。
5. 异构酶类(isomerases) 催化同分异构体的互相转化的酶类。例如,磷酸葡萄糖异构酶、消旋酶、磷酸甘油酸异构酶等。
6. 合成酶类(或连接酶类,ligases) 催化两个底物分子合成一种物质,同时与 ATP 磷酸键断裂放能偶联的酶类。例如,氨基酸 :tRNA 合成酶、谷氨酰胺合成酶等。合成酶(synthetase)与上述的合酶(synthase)不同。合酶为裂解酶类,催化底物移去一个基团或合二为一,如柠檬酸合酶(citrate synthase),且不涉及 ATP 的释能改变。

除按上述六类酶依次编号外,根据酶催化的化学键特点和参加反应基团不同,将每一类分成亚类,亚亚类。每个酶分类编号由四个阿拉伯数字组成,数字前冠以 EC(enzyme commission),如葡萄糖-6-磷酸酶(系统名为 D-葡萄糖-6-磷酸水解酶)的编号为 EC 3.1.3.9,编号中的第一位数字表示该酶属于六大类中的某一类;第二位数字表示该酶属于哪一亚类;第三位数字表示亚亚类;第四位数字表示该酶在亚亚类中的排号。

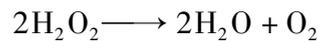
第三节 酶促反应的特点及机制

一、酶促反应的特点

酶是生物催化剂,它遵守一般催化剂的共同性质,如在化学反应前后都没有质和量的改变;只能促进热力学上允许进行的反应,等效地加速正、反两向反应,而不能改变反应的平衡点,即不改变反应的平衡常数。酶和一般催化剂都是通过降低反应活化能而使反应速率加快的。但因为酶的化学本质是蛋白质,因此又具有不同于一般催化剂的特点,其显著特点有以下几点。

(一) 酶的催化效率极高

酶的催化效率通常比非催化反应高 $10^8 \sim 10^{20}$ 倍,比一般催化剂高 $10^7 \sim 10^{13}$ 倍。例如在过氧化氢分解成水和氧的反应中:



无催化剂时,每摩尔需活化能 75 312 J (18 000 cal);当用胶态钨作催化剂时,反应的活化能为 48 953 J (11 700 cal);而用过氧化氢酶作为催化剂时,反应的活化能降至 8 368 J (2 000 cal),即用酶催化可使反应活化能大幅度下降,反应速率可增加千万倍。在任何一种热力学允许的反应体系中底物(酶所作用的物质,也称作用物,substrates, S)分子平均能量较低,只有那些能量较高,达到或超过一定能量水平的分子才有可能发生化学反应,这些分子为活化分子。使底物分子变成活化分子所需的能量为活化能(activation energy),单位为 kJ/mol。化学反应中活化分子占底物的比例愈大,反应速率愈快。要使反应加速进行,或给予能量,如加热,使分子活化提高活化分子所占的比例,或降低反应活化能,如使用催化剂。酶比一般催化剂更有效地降低活化能,能使底物只需较少的能量便可进入活化状态(图 5-8),从而发挥高度的催化效率。

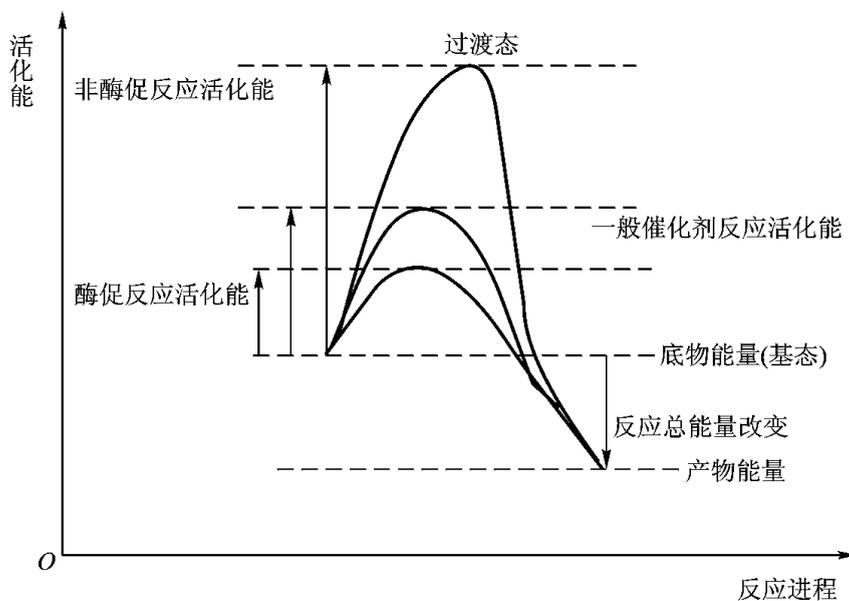


图 5-8 酶促反应活化能的改变

(二) 酶具有高度特异性

一般催化剂可催化同一类型的许多种化学反应。如 H^+ 可催化淀粉、脂肪、蛋白质等多种物质的水解,对底物结构没有严格的选择性。而酶对所催化的底物具有严格的选择性,即一种酶只作用于一种或一类化合物,或一种化学键,催化一定的化学反应并产生一定结构的产物,这种现象称为酶的特异性或专一性(specificity)。根据各种酶对其底物结构要求的程度不同,酶的特异性可大致分为以下三种类型:

1. 相对特异性

大多数酶作用于—类化合物或—种化学键,这种不太严格的选择性称为相对特异性(relative specificity)。脂肪酶不仅水解脂肪,也可水解简单的酯;蔗糖酶不仅水解蔗糖,也可水解棉子糖中的同—种糖苷键(图5-9);蛋白酶则可水解各种蛋白质的肽键。但消化道的蛋白酶对构成肽键的氨基酸残基种类有选择性,如胰蛋白酶仅水解由碱性氨基酸的羧基所形成的肽键,胃蛋白酶能水解中性芳香族氨基酸的羧基所形成的肽键,弹性蛋白酶水解中性脂肪族氨基酸的羧基所形成的肽键,羧基肽酶和氨基肽酶只能分别水解多肽链的羧基末端和氨基末端的肽键(图5-10)。

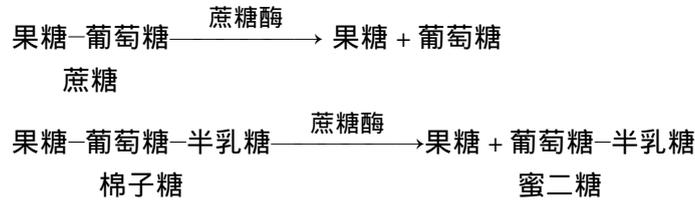


图5-9 蔗糖酶的水解作用

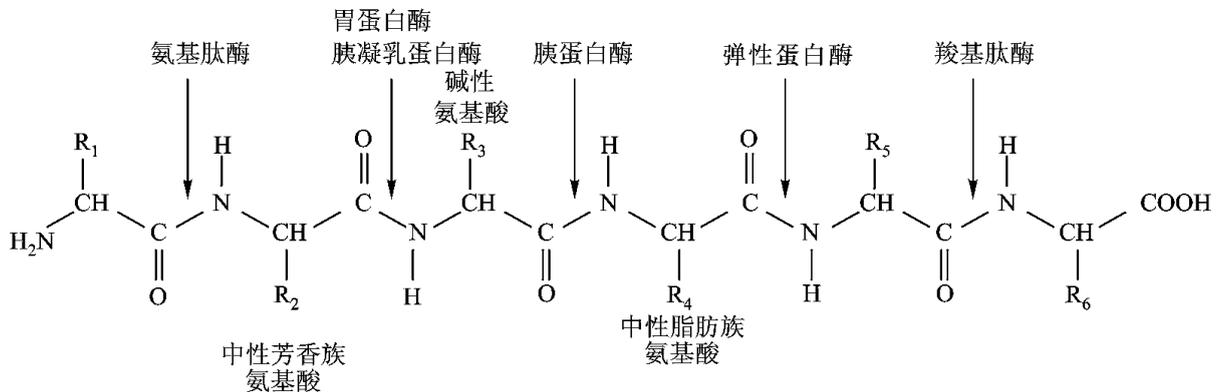


图5-10 消化道中各种蛋白酶的键专—性

2. 绝对特异性

有的酶只能作用于特定结构的底物,进行—种专—的反应,生成特定结构的产物,这种特异性称为绝对特异性(absolute specificity)。例如,脲酶只能催化尿素水解生成 NH_3 和 CO_2 。该酶对与尿素结构相近的甲基尿素就无催化作用。在自然界中只有绝对特异性的酶比较少。

3. 立体异构特异性

—些酶仅对其底物的一—种立体异构体进行催化反应,或其催化的结果只产生—种立体异构体,酶对立体异构物的这种选择性称为立体异构特异性(stereospecificity)。如乳酸脱氢酶仅能催化L-乳酸脱氢,而对D-乳酸不发生作用(图5-11)。另外,肠道的淀粉酶只能水解淀粉中 $\alpha-1,4$ 糖苷键,但不能水解纤维素中葡萄糖残基间的 β -糖苷键,因此人类肠道酶能使淀粉水解,却不能消化纤维素。

(三) 酶活性的可调节性

酶活性是指酶催化化学反应的能力,也称酶活力。机体通过对酶活力的调节,控制机体内的各种代谢反应。以酶为中心的调控系统是机体整体水平调节和激素水平调节的基础。机体对酶促反应速率的调节包括对酶活性、酶含量和底物浓度的调节。这些

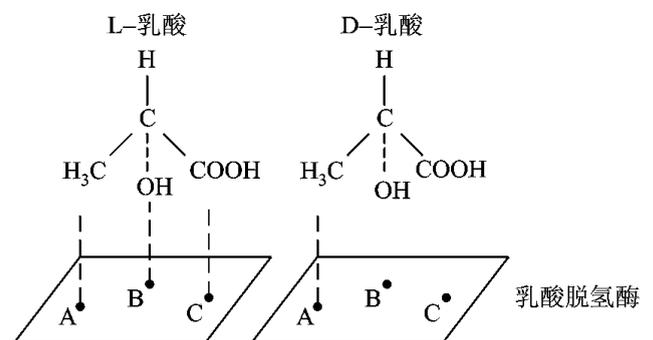


图5-11 乳酸脱氢酶的立体异构特异性

调节将直接影响体内物质代谢的速率。

酶活性的调节是对细胞内现有的酶活性的调节,是一种准确的、快速的、精确的调节。对酶活性的调节主要包括酶的变构调节、酶的共价修饰调节、酶原的激活、同工酶等。

多酶体系、多功能酶、酶分子的聚合及解聚等也是酶活性调节的方式。另外酶在细胞内的区域化分布、环境温度、有机溶剂、pH、金属离子、抑制剂、激活剂等都能影响酶的活性。

酶含量的调节是细胞内一些代谢物通过影响酶基因表达、诱导或阻碍酶蛋白的合成,或改变酶蛋白的降解速率实现的。酶含量的调节是缓慢的、持久的调节过程,引起酶合成的因素去除以后仍能发挥对代谢的调节作用。同工酶是不同组织、不同细胞或不同亚细胞结构在进化过程中获得的固定酶谱,使之具有不同的代谢模式。

二、酶促反应的机制

酶作为生物催化剂具有高度特异性及高催化效率的特点,如何解释这些现象,目前尚未定论,仅有以下几种公认的学说。

(一) 酶底物复合物的形成和诱导契合假说

酶在发挥其催化作用之前,酶和底物相互诱导,相互变形,相互适应,进而二者结合,形成酶-底物复合物。这种酶与底物相互诱导结合的过程,称为诱导契合假说(induced-fit hypothesis)。该假说认为酶分子的构象与底物的结构本身并不是完全吻合的,酶在底物分子作用下发生的构象改变(图5-12),利于酶活性中心的形成,并与底物受催化部位靠近。底物在酶诱导下也发生变形,处于不稳定的过渡态(transition state),易受酶的攻击。

(二) 邻近效应和定向排列

通常酶促反应的底物浓度很低,底物分子之间碰撞的几率很小。在化学反应体系中只有底物分子之间以正确方向相互碰撞才能发生反应。在酶的作用下,底物可聚集到酶的活性中心部位,它们相互靠近形成利于反应的正确定向关系。同时底物与酶活性中心结合时,也可诱导酶蛋白发生一定构象变化,使其催化基团和结合基团正确排列定位,利于底物和酶更好地互补,这一过程称为邻近效应(proximity effect)和定向排列(orientation arrange)。实际上该过程是将分子间的反应变成类似分子内的反应,使反应速率显著提高。用X射线衍射分析已经证明了在溶菌酶及羧肽酶中存在着邻近效应和定向排列作用。

(三) 多元催化

一般催化剂发挥催化作用时,仅有一种解离状态,只有酸催化或只有碱催化,很少酸、碱催化功能兼有之。而酶具有两性解离性质,分子内不同基团的 pK 不等,解离程度不一。即使同一种功能基团,由于各自在蛋白分子中所处的微环境不同其解离度也可不同,即酶活性中心上有些基团是质子的供体(酸),有些是质子的受体(碱),也就是说即可起亲核催化作用,又可起亲电催化作用。可见,酶具有多元催化(multielement catalysis)作用。

例如,胰蛋白酶中丝氨酸残基的—OH是该酶活性中心的必需基团,当底物与酶结合后,此—OH基团中的O原子有非配对电子,能发挥亲核作用,攻击底物肽键中的羰基C(具有部分正电性),导致肽键的断裂,形成

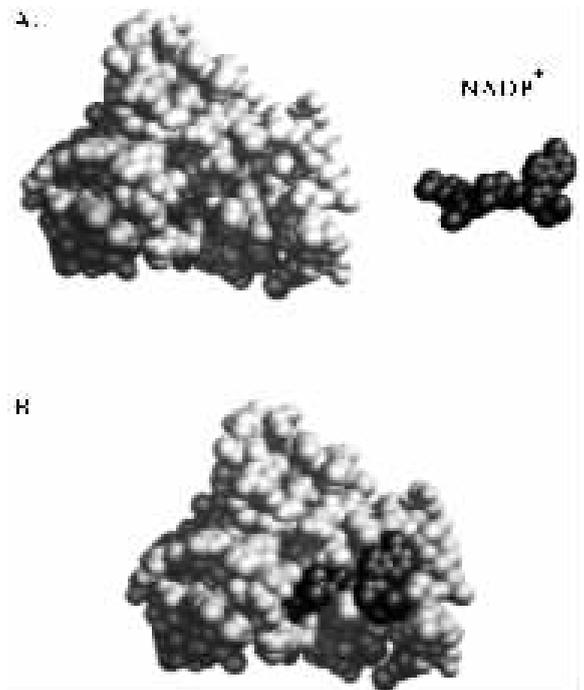
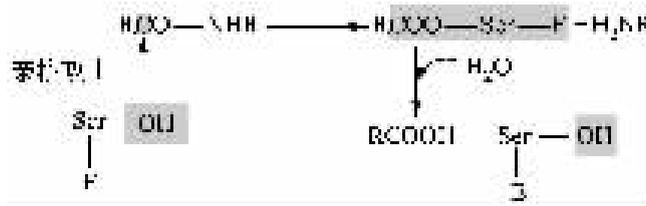


图5-12 酶与底物结合的诱导契合假说

- 二氢叶酸还原酶与 $NADP^+$ (灰色)结合前无口袋状结构;
- 在 $NADP^+$ 的诱导下,酶形成一个口袋状结构容纳 $NADP^+$,形成E-S复合物

一个不稳定的中间产物——酰基化酶,后者易将酰基转移给水完成水解作用。



(四) 表面效应(surface effect)

酶的活性中心多位于其分子内部的疏水“口袋”中,即底物与酶的反应在酶分子内部疏水环境中进行。因为疏水环境能排除周围大量水分子对酶和底物的功能基团的干扰性吸引或排斥,防止二者之间形成水化膜,利于底物和酶分子之间的直接密切接触。所以在疏水环境中进行酶促反应有很大的优越性。

事实上,一种酶的催化反应中常常包括多种催化机制,例如,溶菌酶的催化作用即有表面效应,多元催化、又有邻近效应及诱导契合等。

第四节 酶促反应动力学

酶促反应动力学(kinetics of enzyme-catalyzed reactions)是研究酶促反应的速率及其影响因素的科学。影响酶促反应速率的因素有酶浓度、底物浓度、pH、温度、抑制剂及激活剂等。研究某一因素对酶促反应速率的影响时,其他因素应保持不变。酶促反应速率一般用单位时间内底物的消耗量或产物的生成量表示。因底物的减少量一般仅占底物的很小比例,不易测定,而产物从无到有,易于测定,所以酶活性绝大多数采用测定单位时间内产物的生成量来表示。

通常在研究酶促反应动力学时,必须保证以下两个前提:一是研究中所谓的速率应采用反应的初速率(initial velocity);二是底物浓度必须大大地高于酶浓度,即 $[S] \gg [E]$ 。反应初速率是指反应开始时的速率,即产物生成量与反应时间呈正比阶段(图5-13)。随着反应时间延长底物浓度下降或产物浓度升高、逆向反应速率增加、正向反应速率逐渐降低而引起酶促反应速率逐渐下降。采用初速率可避免反应进行过程中上述因素的影响。

1961年国际生化学会酶学委员会规定使用统一的国际单位(international unit, IU)表示酶活性。在规定的实验条件下(如一定的温度、pH和足够的底物等)每分钟催化 $1 \mu\text{mol}$ 底物转变成产物所需要的酶量为一个国际单位(IU)。1972年国际酶学委员会又推荐以一个新单位开特(Katal,简称Kat)表示酶活性。1 Kat是指在特定条件下,每秒钟内使 1 mol 底物转化成产物所需的酶量。 $1 \text{ Kat} = 6 \times 10^7 \text{ IU}$, $1 \text{ IU} = 16.67 \times 10^{-9} \text{ Kat}$ 。在酶学研究和生产应用中还常用比活性(比活力)酶的比活性是每单位(一般是mg)蛋白质的酶活性,用 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \text{ 蛋白质})$ 表示。酶的比活性代表酶制品的纯度。同一种酶在不同制品中比活性越高者,其纯度也越高。

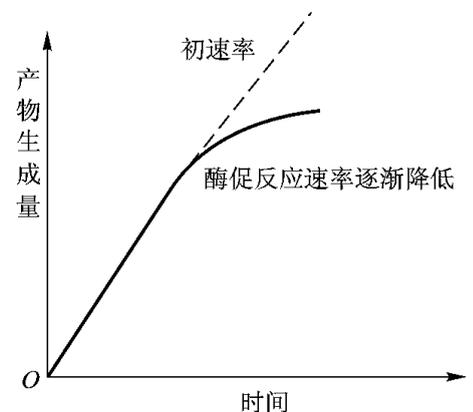


图5-13 酶促反应的初速率

一、底物浓度对酶促反应速率的影响

(一) 底物浓度曲线

酶促反应中,在酶浓度、pH、温度等不变的情况下,反应速率与底物浓度的关系呈矩形双曲线(rectangular hyperbola)(图5-14)。在低底物浓度时,反应速率随底物浓度的增加呈直线上升(在底物浓度—反应速率的曲线上,任何一点都代表底物浓度与速率的关系)这种反应速率与底物浓度呈正比的反应为一

级反应(图5-14中a)。当底物浓度继续增加,反应体系中酶分子大部分与底物结合时,反应速率的增高则渐渐变缓,即反应的第二阶段为一级反应与零级反应的混合级反应(b)。如底物浓度再继续增加,所有的酶分子均被底物饱和,反应速率不再增加,曲线平坦。此时反应速率与底物浓度的增加无关,反应为零级反应(c)。

(二) 米氏方程式

几乎所有的酶都有上述被底物饱和的现象,只是不同的酶达到饱和时所需要的底物浓度不同而已。解释酶促反应中底物浓度和反应速率关系的最合理的学说是中间产物学说。该学说认为酶促反应中酶首先与底物形成酶-底物复合物(ES),即中间产物,然后此复合物再分解为产物和游离的酶。

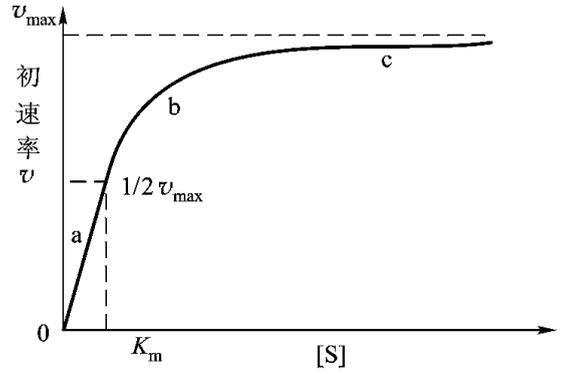
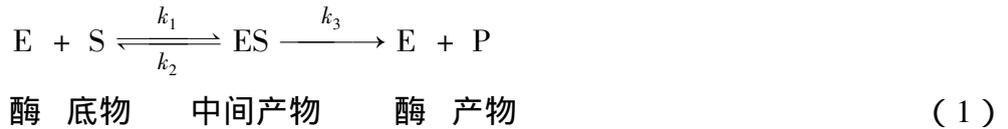


图5-14 底物浓度对酶促反应速率的影响



1913年 Leonor Michaelis 和 Maud Menten 经过大量实验,提出了酶促反应速率与底物浓度关系的数学方程式,即著名的米-曼方程式,简称米氏方程式(Michaelis equation)。

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

方程式中 v_{\max} 为最大反应速率(maximum velocity) $[S]$ 为底物浓度, K_m 为米氏常数(Michaelis constant) v 是不同 $[S]$ 时的反应速率。当 $[S]$ 很低时($[S] \ll K_m$),分母中的 $[S]$ 可忽略不计 $v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m}$,即反应速率与底物浓度成正比,呈一级反应(曲线的直线部分);当 $[S]$ 很高时($[S] \gg K_m$), K_m 可忽略不计,此时 $v \cong v_{\max}$;反应速率达最大速率,此时再增加 $[S]$,反应速率也不再增加,反应呈零级反应,即曲线的平坦段(图5-14的c段)。米氏方程式的推导以两个假设为前提:① 稳态观念,当酶促反应趋于稳态时ES的生成速率与分解速率相等。② 酶促反应中 $[S]$ 大大高于 $[E]$,因此 $[S]$ 的变化在反应过程可忽略不计。反应式中 k_1 、 k_2 和 k_3 代表各反应的速率常数。鉴于反应过程中,不断有一部分E与S结合生成ES,故游离酶浓度为总酶浓度 $[E]$ 中减去生成ES中的酶浓度,即 $[\text{游离酶}] = [E] - [ES]$,这样

$$\text{ES 生成速率} = k_1([E] - [ES]) \cdot [S] \quad (3)$$

$$\text{ES 分解速率} = k_2[ES] + k_3[ES] \quad (4)$$

当反应处于稳态时,ES生成速率 = ES分解速率,即

$$k_1([E] - [ES]) \cdot [S] = k_2[ES] + k_3[ES]$$

$$\frac{([E] - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

设 $\frac{k_2 + k_3}{k_1} = K_m$

K_m 为米氏常数,则 $[E] - [ES] = K_m[ES]$

整理后 $[ES] = \frac{[E][S]}{K_m + [S]} \quad (5)$

由于反应速率 $v = k_3[ES] \quad (6)$

将(5)式代入(6)式：

$$v = \frac{k_3[EIS]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

当[S]很高时,所有E都与S生成ES,反应达最大反应速率,此时[E]=[ES],即

$$v_{\max} = k_3[ES] = k_3[E] \quad (8)$$

将(8)式代入(7)式,即得米氏方程式：

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

(三) K_m 和 v_{\max} 的意义

1. 当 $v = \frac{v_{\max}}{2}$, 即反应速率为最大速率一半时,米氏方程为：

$$\begin{aligned} \frac{v_{\max}}{2} &= \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \\ \therefore K_m &= [S] \end{aligned}$$

这表示 K_m 值等于酶促反应速率为最大反应速率一半时的底物浓度。

2. 一些酶的 $k_2 \gg k_3$, 即ES解离成E和S的速率明显超过分解成E和P的速率 k_3 可忽略不计,则 $K_m = \frac{k_2}{k_1}$, 即此时 K_m 近似ES的解离常数 K_s 。在这种情况下 K_m 可表示酶对底物的亲和力。

$$K_m = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_s$$

K_m 值愈小,酶和底物亲和力愈大,这表示不需要很高的底物浓度就可达到最大反应速率。但并非所有酶促反应中 k_3 都远小于 k_2 , 所以 K_s 值和 K_m 值涵义不同。

3. K_m 值是酶的特征性常数,它与酶的结构,酶所催化的底物和反应环境如温度、pH、离子强度等有关,而与酶浓度无关。 K_m 的单位是 mol/L, 大多数酶的 K_m 值在 $10^{-6} \sim 10^{-2}$ mol/L 之间,不同种类酶的 K_m 值不同(表5-8);如一种酶有多个底物,则酶对每一种底物都有其各自特定的 K_m 。

表5-8 某些酶的 K_m 值

酶名称	底物	$K_m / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
过氧化氢酶	H_2O_2	25
碳酸酐酶	H_2CO_3	9
胰糜蛋白酶	甘氨酸酪氨酰甘氨酸	108
β -半乳糖苷酶	D-乳糖	4.0
己糖激酶	D-果糖	1.5
	ATP	0.4
	D-葡萄糖	0.015

4. v_{\max} 是酶被底物完全饱和时的反应速率。

当[ES]等于总酶浓度 $[E_T]$, 即酶被底物完全饱和时：

$$v_{\max} = k_3[E_T]$$

如果知道酶的总浓度和 v_{\max} , 即可计算出酶的转换数(turnover number): 当酶被底物完全饱和时, 单位时间内每个酶分子(或活性中心)催化底物转变成产物的分子数。

$$k_3 = \frac{v_{\max}}{[E_T]}$$

k_3 即为酶的转换数,大多数酶的转换数在(1 ~ 10⁴) /s 之间。

(四) K_m 和 v_{\max} 的测定

从图 5-14 中可知,由于底物浓度对反应速率影响呈矩形双曲线,难以从该图中准确测得 v_{\max} 和 K_m 。如将米氏方程两侧取倒数处理,便得到下面方程式:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

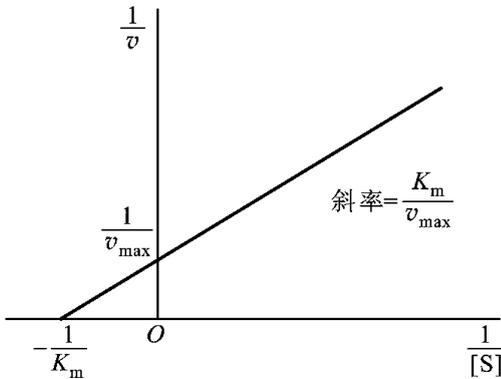


图 5-15 双倒数作图法

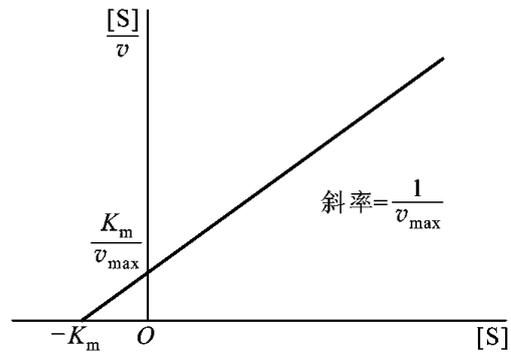


图 5-16 Hanes 作图法

以 $\frac{1}{v}$ 对 $\frac{1}{[S]}$ 作图,可得直线图(图 5-15)称林-贝氏(Lineweaver-Burk)作图或双倒数作图。从此图可见,直线在横轴上截距为 $-\frac{1}{K_m}$,纵轴上截距为 $\frac{1}{v_{\max}}$,由此直线可较容易地求得 v_{\max} 和 K_m 。

此外,在上述双倒数方程式两边同时乘以 $[S]$,得下式 $\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{v_m} + \frac{1}{v_m}[S]$,以 $\frac{[S]}{v}$ 对 $[S]$ 作图称为 Hanes 作图法(图 5-16),其横轴截距为 $-K_m$,直线斜率为 $\frac{1}{v_{\max}}$ 。

二、酶浓度对酶促反应速率的影响

在酶促反应中,当底物浓度足够大,使酶被底物饱和时,则反应速率与酶浓度成正比关系(图 5-17)。

三、pH 对酶促反应速率的影响

酶分子中有许多可解离的基团,其不同 pH 条件下解离状态不同,所带电荷的数量和种类也不同。一种酶通常在某一 pH 时的解离状态最有利于酶的正确空间构象的形成。酶催化活性最大时的环境 pH 称为酶促反应的最适 pH(optimum pH)。此时酶的各个必需基团的解离状态,包括辅酶及底物的解离状态适合酶发挥最大活性。各种酶的最适 pH 不同(图 5-18)。动物体内酶的最适 pH 在 6.5 ~ 8 之间,接近中性。但少数酶也有例外,如胃蛋白酶的最适 pH 为 1.8,精氨酸酶的最适 pH 为 9.8。

最适 pH 不是酶的特征性常数,它受底物浓度,缓冲液的浓度和种类以及酶的纯度等影响。

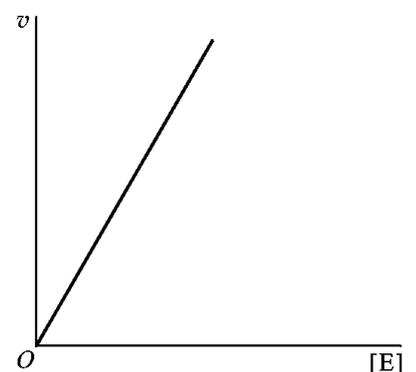


图 5-17 酶浓度对反应速率的影响

四、温度对酶促反应速率的影响

在一般化学反应中,升高温度可使反应速率加快。在酶促反应体系中,低于一定温度时,逐渐增高温度,反应速率随之增加。当温度升高到 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上,继续增加反应温度,酶反应速率反而下降。因为酶的化学本质是蛋白质,升高温度一方面可加速反应的进行,另一方面高温可使酶变性而减小活性,使反应速率降低。大多数酶在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时开始变性, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时多数酶的变性已不可逆。酶促反应速率最大时的环境温度称为酶促反应的最适温度(optimum temperature)。反应体系的温度低于最适温度时,加热可使反应速率加快,每升高 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应速率增加 $1\sim 2$ 倍。当反应温度高于最适温度时,反应速率则因酶受热变性而降低(图5-19)。温血动物组织中,酶的最适温度在 $35\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间。

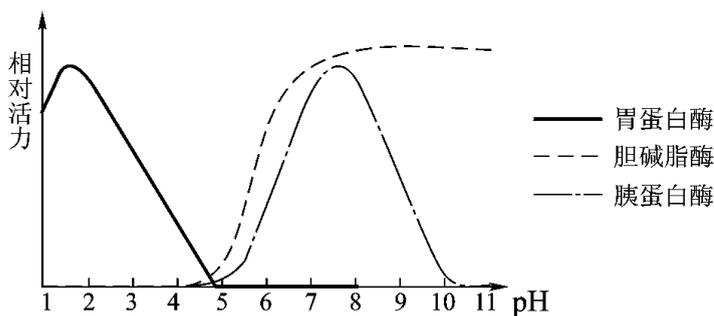


图 5-18 pH 对酶促反应速率的影响

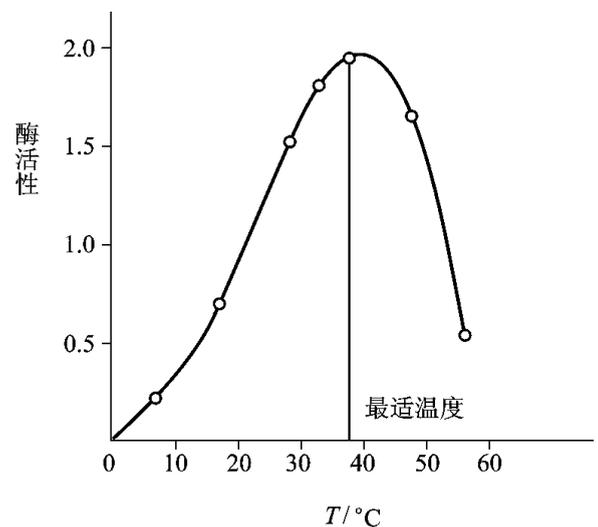


图 5-19 温度对酶促反应速率的影响

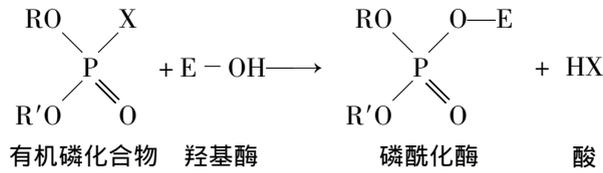
酶的最适温度不是酶的特征性常数,它与反应时间有关。若酶促反应进行的时间短暂,则最适温度要高些;反之,反应时间延长,则最适温度要低些。一般情况下低温不使酶破坏,只是使酶活性降低;当温度恢复后,活性仍可恢复。因此医学上可用低温保持生物制品,如酶、菌种等。临床上也可用低温麻醉,使机体酶活性降低,物质代谢速率减慢,降低组织的耗氧量。

五、抑制剂对酶促反应速率的影响

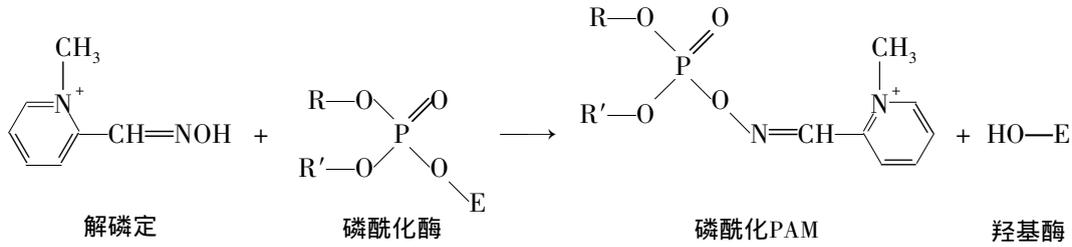
在酶促反应中,凡能使酶催化活性下降但不引起酶变性的物质称为酶的抑制剂(inhibitor)。抑制剂与酶活性中心内或活性中心外的必需基团相结合,抑制酶的催化活性。加热、加酸等理化因素使酶发生不可逆变性而失活,不属于抑制作用的范畴。抑制剂与酶结合紧密程度不同而产生的抑制作用不同。因此酶的抑制作用可分为两类:不可逆抑制(irreversible inhibition)和可逆性抑制(reversible inhibition)。一些抑制剂与酶的活性中心的必需基团以共价键结合,使酶失活,这种抑制剂不能用简单的透析、超滤等物理方法除去,这类抑制称为不可逆性抑制。一些抑制剂与酶和(或)酶-底物复合物以非共价键结合,使酶活性降低或消失,用透析或超滤方法可将其除去,这类抑制是可逆性抑制。

(一) 不可逆性抑制

此类抑制剂一般是非生物来源的,如有机磷农药敌百虫、敌敌畏及1059等。它们是羟基酶的不可逆性抑制剂,可与胆碱酯酶(choline esterase)活性中心的丝氨酸羟基结合生成磷酸化酶,使酶失活,胆碱酯酶的失活导致乙酰胆碱堆积,造成副交感神经兴奋,有机磷农药中毒时,患者可出现恶心、呕吐、多汗、肌肉震颤、瞳孔缩小、惊厥等症状。

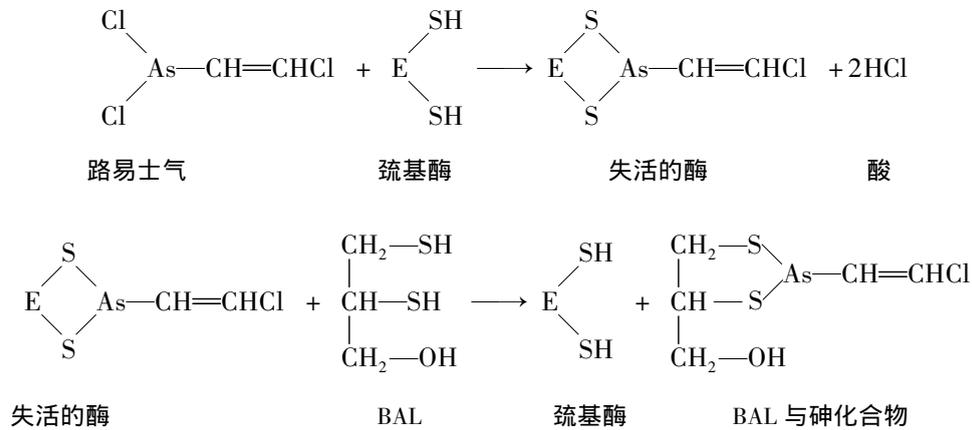


临床上可用解磷定(pyridine aldoxime methylodide , PAM)解除其抑制作用。



另外有一些不可逆性抑制剂与酶分子的巯基结合,使酶失活,如低浓度的重金属离子(Hg^{2+} 、 Ag^{2+} 、 Pb^{2+} 等)及 As^{3+} 等。第二次世界大战时法西斯使用的化学毒气——路易士气(lewisite)是一种含砷化合物,能不可逆的抑制体内巯基酶的活性。

巯基酶的不可逆性抑制引起的中毒可用二巯基丙醇(British anti - lewisite ,BAL)解除其毒性。



细菌细胞壁的主要组成成分是肽聚糖(黏肽)。青霉素可与细菌细胞壁的糖肽转肽酶活性中心的 Ser 共价键连接,形成稳定的无活性复合物,妨碍细菌细胞壁肽聚糖的合成而达到杀菌作用。因此青霉素的抑菌作用属于不可逆性抑制。

(二) 可逆性抑制

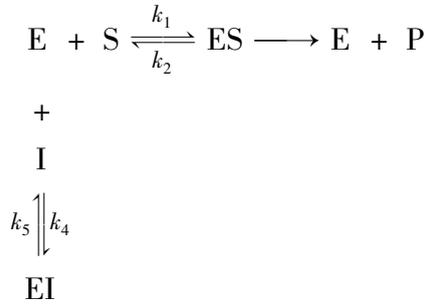
可逆抑制可分为竞争性抑制、非竞争性抑制、反竞争性抑制等。

1. 竞争性抑制

有些物质与酶的底物结构相似,可与底物竞争酶的活性中心,阻碍酶与底物结合而使酶的活性降低,这种抑制作用称为竞争性抑制(competitive inhibition)。由于抑制剂与底物结构相似,并与酶结合是可逆的,其抑制程度取决于底物及抑制剂的相对浓度和酶与它们的亲和力。如果在反应体系中增加底物浓度,可降低甚至解除抑制剂的抑制作用。例如,琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸。如在该反应中加入与琥珀酸结构相似的丙二酸或戊二酸,则可使酶活性降低。而且,丙二酸或戊二酸与酶的亲和力明显大于琥珀酸与酶的亲和力。若增加反应体系中的琥珀酸浓度,此抑制作用可降低。



竞争性抑制的反应过程可用下式表示：



k_i 为抑制常数(即酶与抑制剂结合的解离常数) $k_i = k_5/k_4$, EI 为酶与抑制剂复合物。按米氏方程式的推导方法其倒数方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$$

有不同浓度抑制剂存在时,以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图(图 5-20)可发现其动力学特点 ① 无论竞争性抑制剂浓度多少,各直线在纵轴截距都相同,即当 $[S]$ 足够高时,竞争性抑制剂对酶的竞争作用可被抵消,仍可达到酶促反应的最大速率 v_{\max} ; ② 横轴截距表示的 K_m 值右移,说明有抑制剂时 K_m 值大于无抑制剂的 K_m 值,有抑制剂存在时的 K_m 称为表观 K_m (不是酶的真正的 K_m)。竞争性抑制剂可使酶的表观 K_m 增大。

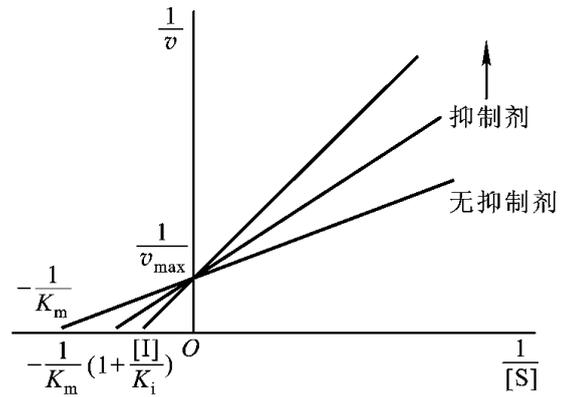


图 5-20 竞争性抑制双倒数曲线

临床应用的某些药物是根据竞争性抑制的原理设计的。例如,抗代谢药物与正常代谢物结构相似,可竞争性抑制某些酶的活性,阻碍代谢进行,达到治疗目的。抗菌素磺胺的抑菌作用即是典型的竞争性抑制作用(图 5-21)。对磺胺类药物敏感的细菌不能直接利用环境中的叶酸,但可在菌体内二氢叶酸合成酶(dihydrofolic acid synthetase, FH_2 合成酶)的作用下以对氨基苯甲酸(*p*-aminobenzoic acid, PABA)为底物合成二氢叶酸。二氢叶酸是核苷酸合成中辅酶四氢叶酸的前体。磺胺类药物的化学结构与对氨基苯甲酸相似,它是二氢叶酸合成酶的竞争性抑制剂,可抑制二氢叶酸的合成,进而达到抑菌的作用。人类可直接利用食物中叶酸,因此人体内核酸合成不受磺胺类药物的干扰。

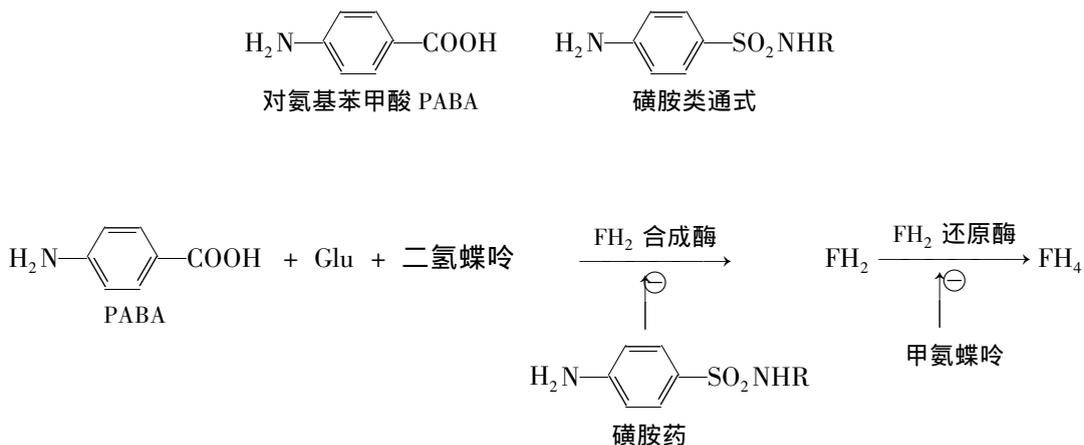


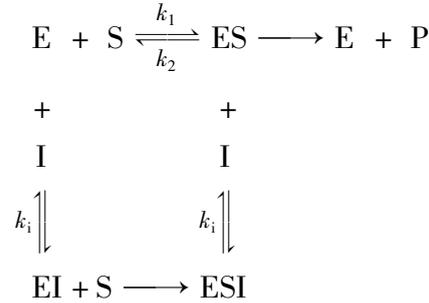
图 5-21 磺胺的抑菌作用

许多抗代谢药,如氨甲喋呤(MTX)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、6-巯基嘌呤(6-MP)等是酶的竞争性抑制剂,分别通过抑制四氢叶酸、脱氧胸苷酸、嘌呤核苷酸的合成,起到抗肿瘤的作用。

2. 非竞争性抑制

有些抑制剂不影响底物和酶结合,即抑制剂与酶活性中心外的必需基团结合,抑制剂既与 E 结合,也与 ES 结合,但生成的 ESI 复合物是死端复合物,不能释放出产物,这种抑制称为非竞争性抑制作用(non-competitive inhibition)。

非竞争性抑制的反应过程可用下式表示:



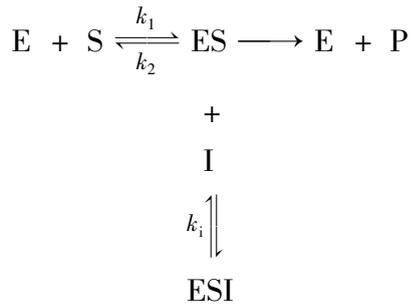
用米氏方程式推导并得出其双倒数方程为:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$1/v$ 对 $1/[S]$ 作图(图 5-22)显示不同浓度非竞争性抑制作用的图形是一组具有不同斜率的直线。其动力学特点如下:① 随抑制剂浓度增加各直线在纵轴上的截距增加,说明该酶促反应的 v_{\max} 因抑制剂的存在而降低。② 抑制程度与抑制剂浓度有关,增加底物浓度不能使抑制程度减少。③ 各直线交于横轴上同一位点,说明非竞争性抑制不改变酶对底物的亲和力 K_m 不变。

3. 反竞争性抑制

此类抑制剂只与 ES 复合物结合生成 ESI 复合物,使中间产物 ES 量下降,终产物生成减少而导致酶促反应速率降低,这种现象称为反竞争性抑制(uncompetitive inhibition)。当抑制剂与 ES 结合生成 ESI 后,使游离的酶浓度减少,因此最大反应速率 v_{\max} 必然降低。由于 ES 除了变成产物外,又有一个生成 ESI 复合物的去向,使 E 对 S 的亲和力升高,即 K_m 变小。反竞争性抑制的反应过程可用下式表示:



反竞争性抑制的双倒数方程是:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 作图,不同抑制剂浓度的抑制曲线是多条平行线(图 5-23)。即反竞争性抑制可同时降低反应 v_{\max} 和

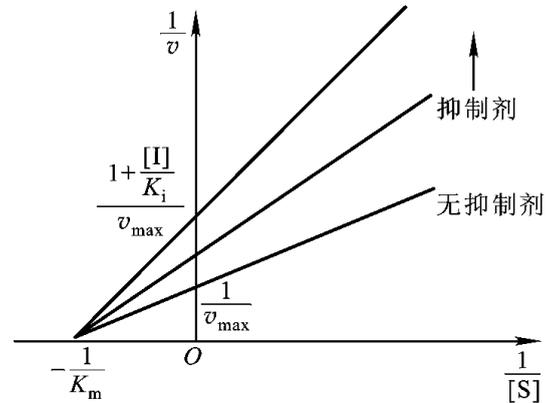


图 5-22 酶的非竞争性抑制双倒数曲线

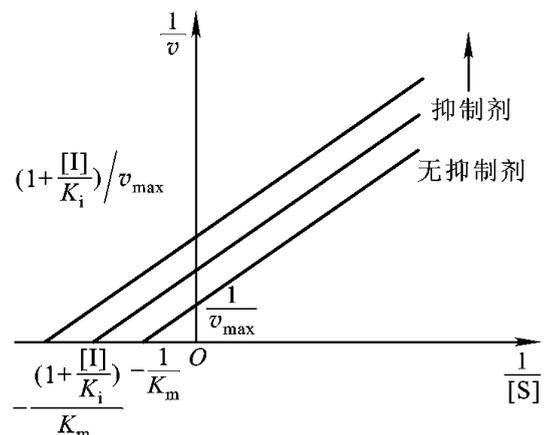


图 5-23 反竞争性抑制双倒数曲线

表观 K_m 。

现将三种可逆性抑制作用的特点总结于表 5-9。

表 5-9 酶的三种可逆性抑制作用的特点

作用特点	无抑制剂	竞争性抑制剂	非竞争性抑制剂	反竞争性抑制剂
与 I 结合的组分		E	E、ES	ES
动力学特点				
表观 K_m	K_m	增大	不变	减少
v_{max}	v_{max}	不变	降低	降低
双倒数曲线				
横轴截距	$-1/K_m$	增大	不变	减少
纵轴截距	$1/v_{max}$	不变	增大	增大
斜率	K_m/v_{max}	增大	增大	不变

六、激活剂对酶促反应速率的影响

使酶由无活性变为有活性或使酶活性增加的物质称为酶的激活剂(activator)。激活剂大多数为金属离子如 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Mn^{2+} 等,少数阴离子也有激活作用,如 Cl^- 能增强唾液淀粉酶的活性。许多有机化合物亦有激活作用,如胆汁酸盐可激活胰脂肪酶。酶的激活剂可分为二种:大多数金属离子对酶促反应是必需的,如缺乏金属离子则测不到酶的活性,这类激活剂称为必需激活剂(essential activator)。必需激活剂的作用类似于底物,但不转变成产物。如己糖激酶中的 Mg^{2+} ,能与底物 ATP 结合形成 $Mg^{2+}-ATP$ 复合物,进而加速酶促反应。另外,有些酶激活剂不存在时,仍有一定活性,此种激活剂称为非必需激活剂(non-essential activator),如唾液淀粉酶在 Cl^- 作用下活性升高, Cl^- 不存在时亦有一定活性。

第五节 酶与医学

一、酶与疾病的发生

酶催化的化学反应是机体进行物质代谢及维持生命活动的必要前提。如酶和酶促反应异常,机体的物质代谢则异常,常可导致疾病的发生。

(一) 酶先天性缺乏与先天性代谢障碍

一些先天性代谢障碍是由于基因突变,不能生成某些特效的酶造成的。如酪氨酸酶缺乏引起白化病;苯丙氨酸羟化酶缺乏引起苯丙酮尿症; β -磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏引起溶血性贫血等。

(二) 酶活性改变与疾病发生

一些酶活性升高或降低也可使机体代谢反应异常,导致疾病发生。如胰腺炎时,由于胰腺生成的蛋白水解酶在胰腺原地被激活,水解胰腺组织,导致胰腺组织被严重破坏。有机磷农药中毒时,抑制胆碱酯酶活性,引起乙酰胆碱堆积,导致神经肌肉和心功能严重紊乱。重金属中毒时,一些巯基酶的活性被抑制而导致代谢紊乱。

一些疾病可引起某些酶产量及活性不足,这种异常又加重已有的病情,如严重肝病时由于肝合成凝血酶原及其他凝血因子不足而导致血液凝固障碍。总之,人体的很多疾患的发生是与酶的变化有密切关系的。

二、酶与疾病的诊断

许多器官组织的疾病除与酶含量和活性异常有关外,有些疾病可使细胞内酶逸入体液中,因此通过对血液、尿等体液中某些酶活性的测定,可以反映某些器官组织的疾病状况并有助于疾病的诊断。血液中某些酶活性升高或降低是因为 ① 某些组织器官损伤后造成细胞破坏,细胞膜通透性升高,细胞内的某些酶可大量释放入血。例如,急性肝炎或心肌炎时,血清中转氨酶活性升高,急性胰腺炎时血清和尿中淀粉酶活性升高等。② 细胞转换率增加或细胞增殖加快,如恶性肿瘤迅速生长时,其标志酶的释放量亦增加,如前列腺癌病人血清中可有大量酸性磷酸酶出现。③ 酶的清除障碍或分泌受阻也可引起血清酶活性升高。例如,肝硬化时,肝细胞表面清除血清碱性磷酸酶的受体减少,造成血清中该酶活性增加。④ 酶的诱导合成增加。如胆管堵塞造成胆汁返流,可诱导肝合成碱性磷酸酶大大增加。⑤ 某些酶合成减少,例如,肝功能严重受损时,许多肝合成的酶量减少,如血液中凝血酶原、因子Ⅶ等。

临床上可通过测定血清中某些酶的含量及活性协助某些疾病的诊断(表5-10)。例如,心肌梗死患者的血清中乳酸脱氢酶和肌酸激酶的活性增高,常用于心肌梗死的诊断。

表5-10 用于诊断的一些血清酶

酶	主要来源	主要临床应用
淀粉酶	唾液腺、胰腺、卵巢	胰腺疾患
碱性磷酸酶	肝、骨、肠黏膜、肾、胎盘	骨病、肝胆疾患
酸性磷酸酶	前列腺、红细胞	前列腺癌、骨病
谷丙转氨酶	肝、心、骨骼肌	肝实质疾患
谷草转氨酶	肝、骨骼肌、心 肾、红细胞	心肌梗死、肝实质疾患、肌肉病
肌酸激酶	骨骼肌、脑、心、平滑肌	心肌梗死、肌肉病
乳酸脱氢酶	心、肝、骨骼肌、红细胞、血小板、淋巴结	心肌梗死、溶血、肝实质疾患
胆碱酯酶	肝	有机磷中毒、肝实质疾患

三、酶与疾病的治疗

医学临床上常应用某些酶作为替代治疗或对症治疗的药物,一些酶是抗菌、抗癌等药物设计的重要依据。

(一) 替代治疗

由于某些酶缺乏所引起的疾病,可补充此酶予以治疗。如消化腺分泌功能不良所致的消化不良,可服用胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰脂肪酶、胰淀粉酶等。某些酶先天性代谢障碍,也可补充相应酶达到治疗目的。近年来发展的用脂质体将所需酶靶向代入体内是一种补充酶的方法。也可用各种方法引入该酶的基因以达补充酶的目的。

(二) 对症治疗

临床上常用链激酶、尿激酶及纤溶酶等溶解血栓,用于治疗心、脑血管栓塞等。一些蛋白酶常用于溶解及清除炎症渗出物。

(三) 抗菌治疗

一些药物是根据酶的竞争性抑制原理而设计的,如磺胺类药物,可竞争性抑制细菌体内的二氢叶酸合成酶,阻碍细菌体内核酸代谢而破坏其生长、繁殖,达到杀菌或抑菌目的。某些抗生素如氯霉素、红霉素通过抑制转肽酶活性,阻断菌体的蛋白质合成而起抑菌作用。青霉素则是阻断细菌细胞壁合成中糖肽转肽酶的活性而杀菌的。

(四) 抗肿瘤治疗

肿瘤细胞有其特殊的代谢方式,若能阻断相应的酶活性即可达到阻止肿瘤生长的目的。应用竞争性

抑制的原理合成代谢物的类似物,使其与酶结合而阻碍代谢,达到治病的目的,这些类似物称为抗代谢物。抗代谢物有多种,主要包括抗菌药物及抗肿瘤药物。很多抗肿瘤药物是根据竞争性抑制的原理设计的,如前所述。

一些药物通过抑制某些酶的活性,而起到纠正机体代谢紊乱的作用,如精神抑郁症是由于脑内兴奋性递质(如儿茶酚胺)与抑制递质的不平衡造成的。若给予单胺氧化酶(使儿茶酚胺灭活的酶)抑制剂,可减少儿茶酚胺的代谢和灭活,使儿茶酚胺含量提高,进而改变神经递质不平衡现象,治疗抑郁症。

四、酶在医药学上的其他应用

酶在医药学上有非常广泛的应用。酶常可作为分析试剂对某些酶活性、底物浓度、抑制剂、激活剂等定量分析,被广泛应用于临床检验和科学研究等方面。酶还可作为工具用于科学研究和生产领域,如在基因工程中,用各种限制性内切核酸酶、连接酶等达到基因重组的目的。PCR反应中应用的热稳定的Taq DNA聚合酶在科学研究和疾病诊断中起很重要的作用。酶还能代替同位素与某些物质结合,使该物质被酶标记,这就是酶标记测定法。当今常用的是酶联免疫测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),可通过测定酶活性来判断被标记物质或与其定量结合的物质存在和含量。此法灵敏度高,又可克服同位素应用的一些缺点。

五、酶工程

酶工程(enzyme engineering)是在1971年第一届国际酶工程会议上提出的一项新技术。酶工程主要是研究酶的生产、纯化、固定化技术、酶分子结构的修饰和改造,以及在工农业、医药卫生、和理论研究等方面的应用的一门技术。由于天然酶不稳定,分离纯化难,成本高,价格贵,因此在开发和应用受到一定限制。目前采用两种方法来解决酶大量应用和开发问题:一是化学方法,即通过对酶的化学修饰或固定化处理,改善酶的性质以求提高酶的效率和降低成本,甚至通过化学合成法制造人工酶;另一种是通过基因重组技术生产酶或对酶基因进行修饰而设计新基因,从而生产性能稳定、具有新的生物活性及更高催化效率的酶。因此,酶工程可以说是把酶学基本原理与化学工程技术及基因重组技术有机结合而形成的新型应用技术。根据研究和解决问题的手段不同可将酶工程分为化学酶工程和生物酶工程。

(一) 化学酶工程

化学酶工程也可称为初级酶工程,是指天然酶、化学修饰酶、固定化酶及人工模拟酶的研究和应用。

固定化酶(immobilized enzyme)是20世纪60年代发展起来的一种新技术。固定化酶是将水溶性酶用物理和化学方法处理,使之成为不溶于水的,但仍具有酶活性的固相状态。固定化酶在催化反应中以固相状态与底物结合,其机械性强,可装入层析柱内让底物以流动相通过该柱,使反应自动化、连续化、管道化。固定化酶很稳定,类似离子交换层析和亲和层析的优点,可长期反复应用。另外固定化酶反应后易与反应产物分离,减少了产物分离纯化的困难,提高了产量和质量。经过固定化的酶不仅仍具有高催化效率和高度专一性,而且还提高了酶对酸、碱和温度的稳定性,增加酶的使用寿命。固定化酶已经在工农业、医药、分析、能源开发、环保和理论等多方面得到了广泛应用。

根据底物的过渡态与酶的活性中心密切结合并易于生成产物的特性,人们设想将过渡态类似物作为抗原,注入动物体内产生相应抗体,该抗体既然能与过渡态类似物相互适应并结合,该抗体就有可能具有催化过渡态反应的酶活性。这种具有酶活性的抗体,称为抗体酶(abzyme)。利用动物免疫系统产生抗体的高度专一性可发展出一系列高度专一性的抗体酶,可用于制备针对性强、药效高的药物或用于蛋白质一级结构测定的工具酶等。另外抗体酶是具有催化功能的抗体分子,抗体酶的制造技术比蛋白质工程简单,是人工制造一些特异性强的、药效高的药物或自然界不存在的新酶的一种捷径。

(二) 生物酶工程

生物酶工程是酶学和以 DNA 重组技术为主的现代分子生物学技术相结合的产物,因此亦可称为高级酶工程。主要包括 3 个方面内容:用基因工程技术大量生产酶(克隆酶);对酶基因进行修饰,产生遗传修饰酶(突变酶);设计新酶基因,进而合成自然界不存在的新酶。

酶基因的克隆和表达技术的应用,使利用细菌和酵母大量生产所需要的酶成为可能。美国食品药品监督管理局(FDA)首次批准的基因工程菌生产的酶制剂是 α -淀粉酶。通过克隆方法使该酶的产量提高了 3~5 倍。目前已有 200 种酶的基因已克隆成功。

20 世纪 70 年代蛋白质工程技术发现后,人们很快地将此方法运用于酶的改造及新酶的制备中。按照既定的酶的改造计划,利用定点诱变技术,改造编码酶基因中的 DNA 序列,再经过细菌和酵母的表达即能生产被改造的具有特定氨基酸序列及空间结构的新酶。通过对酶基因的遗传修饰,酶的催化活性、最适 pH、底物专一性、变构调节功能、金属辅酶的氧化能力、酶的稳定型等均可得到改造,以适应工业、农业、医药业应用及研究等方面的需要。

Summary

Enzymes, produced by living cells, are proteins with high specificity and highly catalytic efficiency. Besides enzymes, ribozymes and deoxyribozymes are also biocatalysts. Enzymes include simple enzymes and conjugated enzymes. Components of simple enzymes are all amino acids, but conjugated enzymes require non-protein constituents for their functions in addition to the protein components. These accessory substances are termed prosthetic group and coenzyme. The active site of an enzyme is a region where some functional groups are contained to bind substrates (and prosthetic group, if any) and catalyze the substrates to form products. All groups essential for maintaining the enzyme activity are termed essential groups. The enzyme active site is structured and many of these weak interactions occur only in the reaction transition state, thus the transition state is stabilized. The energy available from the numerous weak interactions between enzyme and substrate is substantial and can generally account for observed rate enhancements.

Regulation of the catalytic efficiency of enzymes can be achieved by allosteric regulation and covalent modification. The activity of some regulatory enzymes, called allosteric enzymes, is adjusted by reversible, noncovalent binding of a specific modulator to a regulatory or allosteric site. Such modulators may be inhibitory or stimulatory and the substrate may be either itself or some other metabolites. The kinetic behavior of allosteric enzymes reflects cooperative interactions among the enzyme subunits. Other regulatory enzymes are modulated by covalent modification of a specific functional group necessary for activity. Covalent modification of enzyme involves phosphorylation or dephosphorylation. Many proteases are secreted as biologically inactive proenzymes (zymogen) that must undergo selective proteolytic cleavage to form a biologically active enzyme.

Enzyme-catalyzed reactions are characterized by the formation of a complex between substrate and enzyme (an ES complex). The binding occurs in a pocket of the enzyme, which is called active site. The function of enzymes and other catalysts is to lower the activation energy for the reaction and thereby enhance the reaction rate. The catalytic mechanisms include proximity effect, orientation arrange, multielement catalysis (general acid-base catalysis and covalent catalysis) and surface effect. Multiple forms of an enzyme that catalyze the same reaction but differ from each other in their sequence of amino acids, physicochemical properties and immuno characters are called isoenzymes.

Kinetics of enzyme-catalyzed reactions is an important method for the study of enzyme mechanisms. Most enzymes have some common kinetic properties. As the concentration of substrate is in-

creased ,the catalytic activity of a fixed concentration of an enzyme will increase in a hyperbolic fashion to approach a characteristic maximum rate v_{max} ,at which essentially all the enzyme is in the form of the ES complex. The substrate concentration giving one-half v_{max} is the Michaelis-Menten constant K_m ,which is characteristic for any enzyme acting on a given substrate. The Michaelis-Menten equation relates the initial velocity of an enzymatic reaction to the substrate concentration and v_{max} through the constant K_m . Both K_m and v_{max} can be measured ;they have different meanings for different enzymes. Initial velocity is directly proportional to the $[E]$. Each enzyme has an optimum pH and an optimum temperature.

Enzymes can be inhibited by irreversible modification of a functional group essential for catalytic activity. They can also be reversibly ,competitively ,noncompetitively or uncompetitively inhibited. Competitive inhibitors compete reversibly with the substrate for binding to the active site ,but not transformed by the enzyme. Noncompetitive inhibitors bind to some other sites on the free enzyme or to the ES complex.

思 考 题

1. 什么是酶 酶作为生物催化剂有哪些特点？
2. 何谓酶的特异性(专一性) ,举例说明酶的特异性有几种？
3. 什么是单纯酶、结合酶 酶辅助因子有几类？
4. 何谓酶促反应动力学？影响酶促反应速率的因素有哪些？
5. 何谓酶活性中心、酶的必需基团？
6. 试说明酶变构调节的机制及生物学意义？
7. 什么是同工酶及同工酶的生物学意义？
8. 什么是酶的化学修饰调节 ,有何特点？
9. 什么是酶的可逆抑制、不可逆抑制？可逆抑制有几种 ,各有何特点？
10. 简述酶的命名原则和分类。

(孙黎光)

第一篇

物质代谢

物质代谢是生命的基本特征之一。有机体不断地从环境摄取营养物质,为生命活动提供能量和合成机体的构件;同时不断地将代谢未产物排出体外。机体通过新陈代谢与其生存的环境进行物质交换,自我更新,适应外界环境,维持生命活动的正常状态。物质代谢包括合成代谢和分解代谢。合成代谢是从小分子合成机体构件和能量贮存物质的过程;分解代谢是机体构件和能量贮存物质分解成小分子物质的过程。物质代谢的同时伴有能量代谢。合成代谢是耗能反应,分解代谢是释能反应。耗能的合成代谢需与释能的分解代谢相偶联。ATP是体内能量的流通形式。物质代谢的各种反应几乎都是在酶的催化下完成的,对物质代谢的调节主要是通过对酶活性和酶含量的调节实现的,并在神经-体液的调节下有条不紊地进行。代谢的紊乱可导致疾病的发生。

本篇主要从两个角度讨论糖、脂、氨基酸和核苷酸的代谢。一是从机体能量的需求角度讲述葡萄糖和脂肪的供能与贮能代谢,以及ATP的生成过程。二是从机体构件的合成与分解代谢的角度讲述还原力(reducing power)的生成,磷脂、胆固醇、氨基酸和核苷酸的合成与分解代谢。本篇除了分章讲述这些物质的主要代谢途径、关键酶、生理意义和主要的调节方式外,对ATP的生成途径和代谢调节的共性问题均单独进行讨论。DNA、RNA和蛋白质的生物合成涉及遗传信息的贮存、传递和表达,单独列为一篇进行讨论。

第六章 糖 代 谢

本章教学要求

- 葡萄糖有氧氧化与无氧分解的关键酶、基本途径及其生理意义
- 葡糖异生的关键酶、基本途径和生理意义
- 葡萄糖有氧氧化与葡糖异生关键酶的变构调节、共价修饰调节
- 糖原生成与糖原分解的基本过程及其调节
- 磷酸戊糖途径的主要产物及其生理意义
- 血糖来源与去路,血糖的激素调节

糖类是指具有多羟基醛或多羟基酮及其衍生物的一类化合物。正常人体所需能量的50%~70%由糖的分解代谢提供,因此糖是人体能量的主要来源。可被体内利用的食物中的糖类主要是淀粉(starch)。人体内主要的糖类是葡萄糖和糖原。糖原是体内糖的贮存形式。葡萄糖在体内可转变成多种非糖物质;一些非糖物质又可转变为葡萄糖。葡萄糖的某些代谢中间物具有重要的生理功能。由于葡萄糖在糖代谢中占主要地位,故本章将重点介绍葡萄糖的代谢及其与供能贮能的关系。

第一节 糖的消化、吸收和转运

一、糖的消化、吸收

唾液中含有 α -淀粉酶(最适pH6~7),可催化淀粉中 α -1,4-糖苷键水解。此酶对淀粉的催化作用,与食物在口腔中被咀嚼的程度和停留时间有关。一般来说,食物在口腔中停留时间较短,食糜进入胃后,酸性的胃液(pH1~2)和胃蛋白酶的水解作用,唾液中的 α -淀粉酶很快失活。淀粉的主要的消化部位在小肠。肠液中含有胰腺分泌的 α -淀粉酶,此酶也催化淀粉中 α -1,4-糖苷键水解,生成麦芽糖(葡糖- α -1,4-葡糖)、异麦芽糖(葡糖- α -1,6-葡糖)、麦芽三糖(α -1,4-三聚葡糖)、麦芽寡糖(由4个~9个葡萄糖通过 α -1,4-糖苷键聚合而成)和 α -临界糊精(有支链的寡糖)。这些糖的进一步消化在小肠黏膜刷状缘进行。麦芽糖酶水解没有分支的麦芽糖, α -葡糖苷酶水解麦芽三糖和麦芽寡糖,异麦芽糖酶水解异麦芽糖, α -临界糊精酶水解含有 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键的 α -临界糊精,最终生成葡萄糖。小肠黏膜刷状缘还存在蔗糖酶和乳糖酶等,分别水解蔗糖和乳糖。一些成年人由于缺乏乳糖酶导致乳糖不耐受症。他们在饮用牛奶后,由于牛奶中的乳糖不能被机体正常水解而在肠中积聚,经细菌作用后产生 H_2 、 CH_4 和乳酸等,引起腹胀、腹泻等症状,此时可饮用酸奶防止其发生。人体内因无 β -糖苷酶故不能消化食物中的纤维素,但纤维素能促进肠蠕动,起通便排毒作用。

糖被消化成单糖后才能在小肠中被吸收。吸收部位主要在小肠上段,小肠上皮细胞刷状缘侧细胞膜上存在 Na^+ 依赖性葡萄糖转运蛋白(Na^+ -dependent glucose transporter, SGLT)。该转运蛋白上存在 Na^+ 和葡萄糖的结合部位,可与 Na^+ 和葡萄糖结合。当 Na^+ 顺浓度梯度由肠腔进入上皮细胞时,将葡萄糖一起带入细胞内。细胞内过多的 Na^+ 通过钠泵(Na^+ , K^+ -ATP酶)利用ATP提供能量,从小肠上皮细胞的基底侧被泵出细胞外,葡萄糖则顺浓度梯度进入血液经门静脉入肝。此种葡萄糖的主动吸收过程是一种间

接耗能的过程。当肠腔中葡萄糖浓度高于小肠黏膜细胞内浓度时,可通过易化运输吸收入血。

二、糖向细胞内转运

细胞膜上存在葡萄糖转运蛋白(glucose transporter ,GLUT),血液中的葡萄糖通过 GLUT 转运进入细胞内。目前已发现 5 种葡萄糖转运蛋白 GLUT 1~5。它们均有 12 个跨膜结构域,分别存在于不同组织的细胞膜上,如 GLUT 5 存在于小肠黏膜上皮细胞膜上,可使肠腔中的果糖和葡萄糖通过易化运输进入血液。

第二节 糖的供能和贮能反应途径

一、葡萄糖的分解代谢

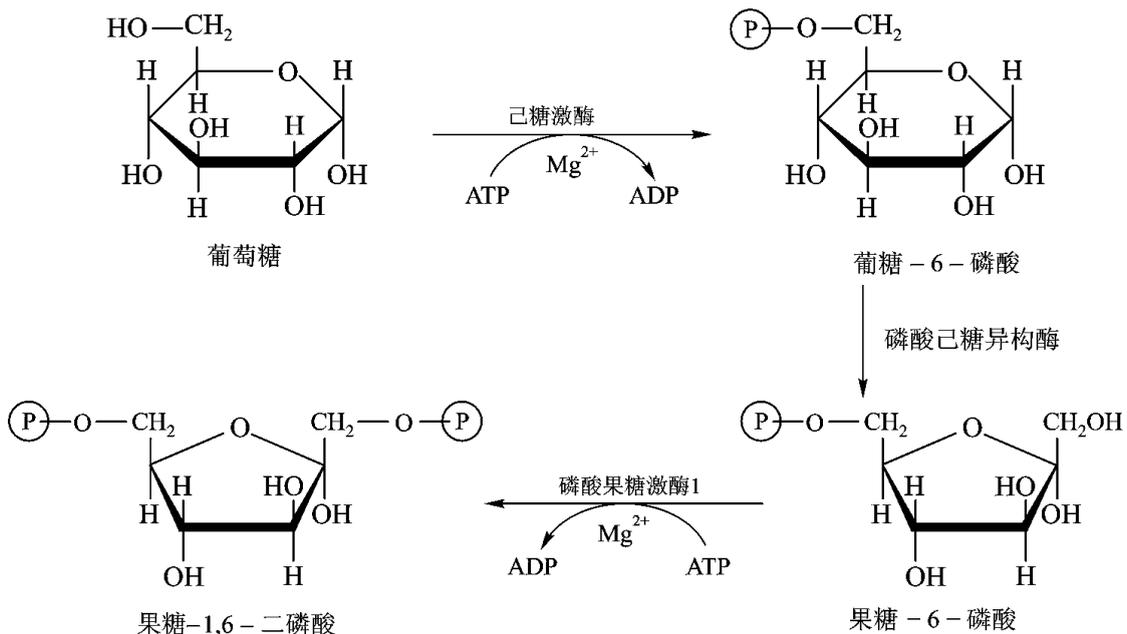
(一) 葡萄糖的有氧氧化

葡萄糖有氧氧化指葡萄糖在分解代谢过程中消耗氧,彻底氧化生成 CO_2 和 H_2O ,并将其分子中的化学能转变成能直接被机体利用的高能磷酸化合物(ATP)的过程。葡萄糖有氧氧化过程首先在细胞浆内进行,以后在线粒体中进行。

1. 胞质内反应阶段

此阶段是葡萄糖分解成丙酮酸的过程。为便于理解和记忆,人为地将其分为三大步,即己糖磷酸化、磷酸己糖裂解为磷酸丙糖和磷酸丙糖氧化为丙酮酸。具体反应过程如下:

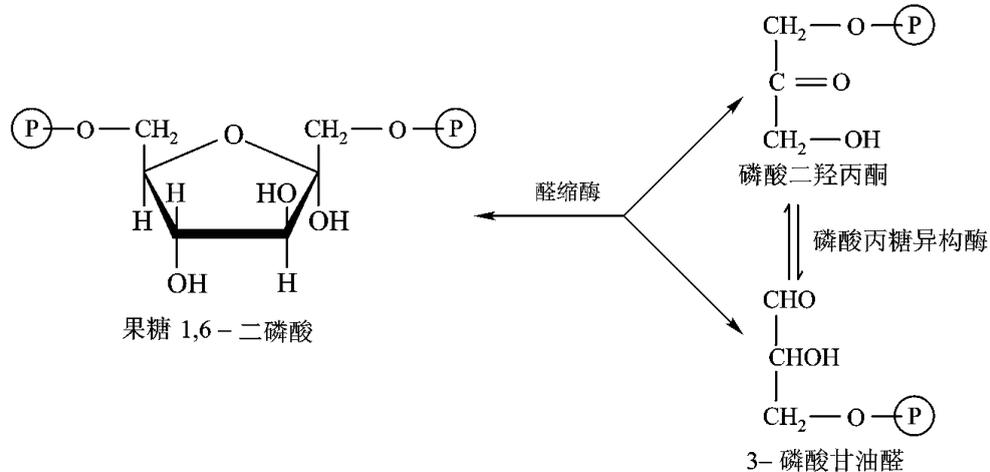
(1) 己糖磷酸化 葡萄糖进入细胞后首先的反应是磷酸化成为葡糖-6-磷酸。磷酸化的葡萄糖分子不稳定,易参与进一步的代谢反应。此外由于磷酸化后的葡萄糖带负电,不能自由通过细胞膜逸出细胞而被保留在细胞内,也有利于参与进一步的代谢反应。催化此反应的酶是己糖激酶(hexokinase, HK),需 Mg^{2+} 参与,并消耗 ATP。此反应耗能较多,所以是不可逆反应。哺乳类动物体内已发现 4 种己糖激酶同工酶(I~IV型),分布于不同的组织细胞中。IV型酶只存在于肝细胞中,由于对葡萄糖有高度的专一性,又称葡糖激酶(glucokinase, GK)。葡糖激酶催化葡萄糖的 K_m 值(10 mmol/L)比其他己糖激酶高约数百倍,且受激素调控。在生理血糖浓度范围内,此酶均处于一级反应状态。因此,当餐后血中葡萄糖浓度升高时,其他己糖激酶的活性已达到最高值,而肝中葡糖激酶的活性可随血糖浓度增高而增高,有利于葡萄糖进入肝细胞内被利用,维持血糖浓度恒定;当血中葡萄糖浓度正常或偏低时,肝中葡糖激酶活性低,葡萄糖进入肝细胞利用减少,此时,其他己糖激酶的活性仍较高,有利于肝外组织利用葡萄糖供能。



生成的葡糖-6-磷酸在磷酸己糖异构酶的作用下转变为果糖-6-磷酸(fructose-6-phosphate)。这是醛糖和酮糖之间的异构反应。

果糖-6-磷酸在磷酸果糖激酶 1(phosphofructokinase 1, PFK-1) 的催化下生成果糖-1,6-二磷酸(fructose-1,6-bisphosphate)。这是第二次磷酸化反应,需 ATP 和 Mg^{2+} 参与,反应不可逆。

(2) 磷酸己糖裂解为磷酸丙糖 在醛缩酶(aldolase)的催化下,1 分子果糖-1,6-二磷酸裂解为 1 分子 3-磷酸甘油醛和 1 分子磷酸二羟丙酮。两者互为异构体,在丙糖磷酸异构酶(triose phosphate isomerase)催化下可互相转变。当 3-磷酸甘油醛在下一步反应中被消耗时,磷酸二羟丙酮可不断转变为 3-磷酸甘油醛。故 1 分子果糖-1,6-二磷酸相当于生成 2 分子 3-磷酸甘油醛。



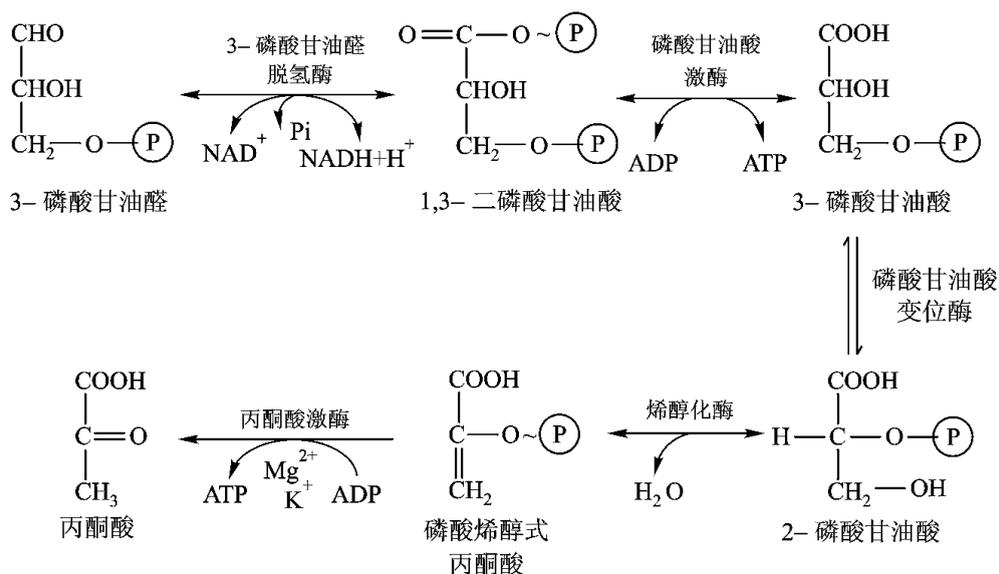
(3) 磷酸丙糖氧化为丙酮酸 3-磷酸甘油醛在 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)催化下,醛基脱氢氧化,与 1 分子磷酸结合生成 1,3-二磷酸甘油酸。脱氢氧化释放的能量经分子内部能量重排,贮存于羧酸与磷酸的混合酸酐内,形成高能磷酸键。脱下的氢由 NAD^+ 接受,生成 $NADH + H^+$ 。

1,3-二磷酸甘油酸是高能磷酸化合物,磷酸甘油酸激酶催化其分子内混合酸酐上的磷酸基转移到 ADP,生成 ATP 和 3-磷酸甘油酸。这种将底物分子中的能量直接转移给 ADP 生成 ATP 的过程,称之为底物水平磷酸化(substrate level phosphorylation)。

磷酸甘油酸变位酶(phosphoglycerate mutase)催化 3-磷酸甘油酸 C-3 位上相连的磷酸基转移到 C-2 位上,生成 2-磷酸甘油酸。

生成的 2-磷酸甘油酸在烯醇化酶(enolase)催化下脱水生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)。此步反应引起分子内部的电子重排和能量重新分布,形成一个高能磷酸键。

磷酸烯醇式丙酮酸也是高能磷酸化合物,在丙酮酸激酶的催化下,分子中的高能磷酸键转移给 ADP 生成 ATP,同时生成烯醇式丙酮酸,此步反应不可逆。烯醇式丙酮酸不稳定,可自发转变成稳定的丙酮酸。

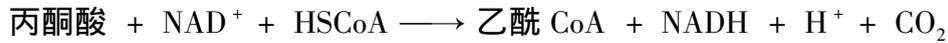


在胞质内反应阶段,己糖激酶、磷酸果糖激酶 1 和丙酮酸激酶是此途径的关键酶,对途径起着调节作用。己糖激酶和磷酸果糖激酶 1 催化的反应是耗能反应,各消耗 1 分子 ATP。本途径有 1 次脱氢反应和 2 次底物水平磷酸化反应,生成 4 分子 ATP。

2. 线粒体内反应阶段

胞质中生成的丙酮酸经线粒体内膜上丙酮酸转运蛋白转运进入线粒体。在线粒体内丙酮酸首先被氧化脱羧生成乙酰辅酶 A (乙酰 CoA),乙酰 CoA 经三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCAC)被彻底氧化。

(1) 丙酮酸氧化脱羧 丙酮酸在丙酮酸脱氢酶复合体(pyruvate dehydrogenase complex)的催化下进行氧化脱羧反应,此反应不可逆。总反应式为:



丙酮酸脱氢酶复合体与线粒体内膜相连。它由丙酮酸脱氢酶、二氢硫辛酸转乙酰酶和二氢硫辛酸脱氢酶按一定比例组成,在催化过程中需 5 种辅酶(辅基)参加,即硫胺素焦磷酸酯(TPP)、硫辛酸、FAD、辅酶 A(HSCoA)和 NAD^+ 。反应过程见图 6-1。

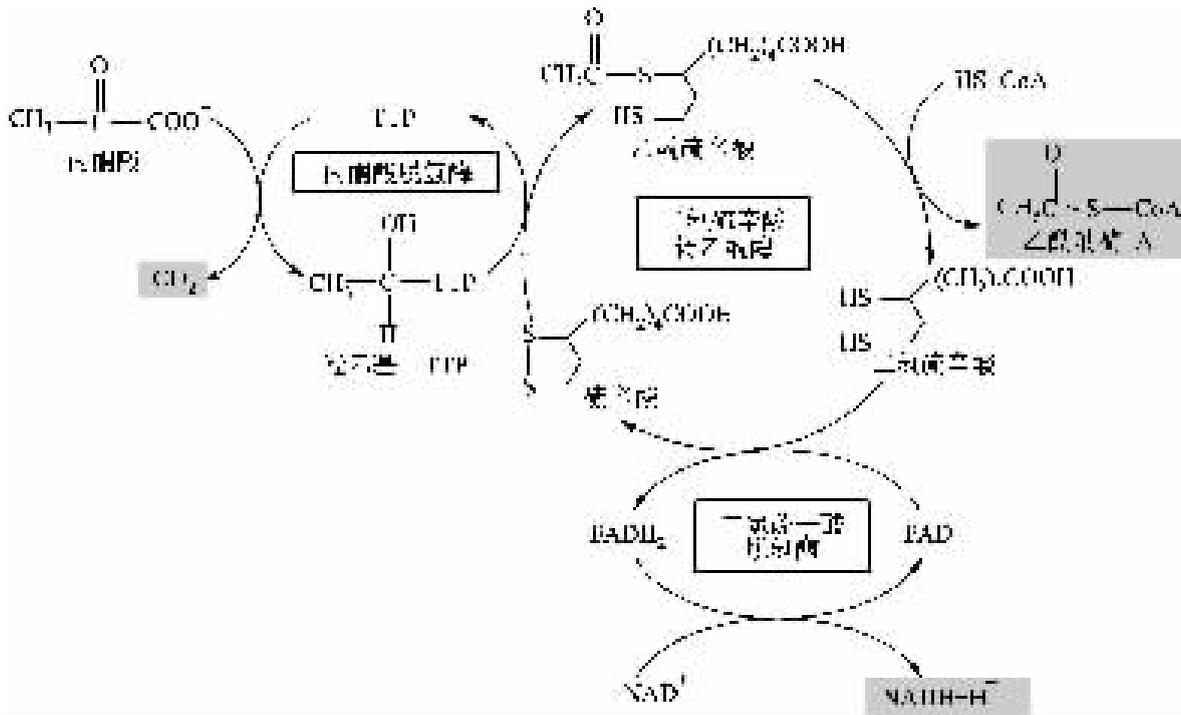


图 6-1 丙酮酸氧化脱羧

(2) 三羧酸循环 循环以乙酰辅酶 A 与草酰乙酸缩合成含有三个羧基的柠檬酸开始,因而被称之为三羧酸循环。又因此循环的第一个产物是柠檬酸,故也称柠檬酸循环。该循环是 Hans Krebs 于 1937 年发现的,又称 Krebs 循环。三羧酸循环的过程如图 6-2 所示:含 2 个碳原子(2C)的乙酰基首先与含 4C 的草酰乙酸在柠檬酸合酶的催化下,缩合成含 6C 的柠檬酸。柠檬酸在顺乌头酸酶的催化下,异构生成异柠檬酸。后者再在异柠檬酸脱氢酶的催化下,脱羧脱氢生成含 5C 的 α -酮戊二酸。 α -酮戊二酸又进行氧化脱羧,生成 4C 的琥珀酰辅酶 A。这步反应与丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应相似。 α -酮戊二酸脱氢酶复合物也包含三个酶和五个同样的辅助因子。琥珀酰辅酶 A 含一高能硫酯键,经底物水平磷酸化将高能键转移给 GDP 生成 GTP 和琥珀酸。琥珀酸脱氢酶催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸,此酶以 FAD 为辅基。延胡索酸酶催化延胡索酸加水生成苹果酸。后者脱氢最终生成草酰乙酸,催化此反应的酶是苹果酸脱氢酶。草酰乙酸再与乙酰 CoA 缩合生成柠檬酸,开始下一个循环。同位素示踪实验显示: CO_2 中的 C 原子来源于循环开始时的草酰乙酸,新合成的草酰乙酸中 2 个 C 来自于乙酰 CoA,另外 2 个 C 来自循环开始时的草酰乙酸。

下面讨论三羧酸循环中的几个要点:

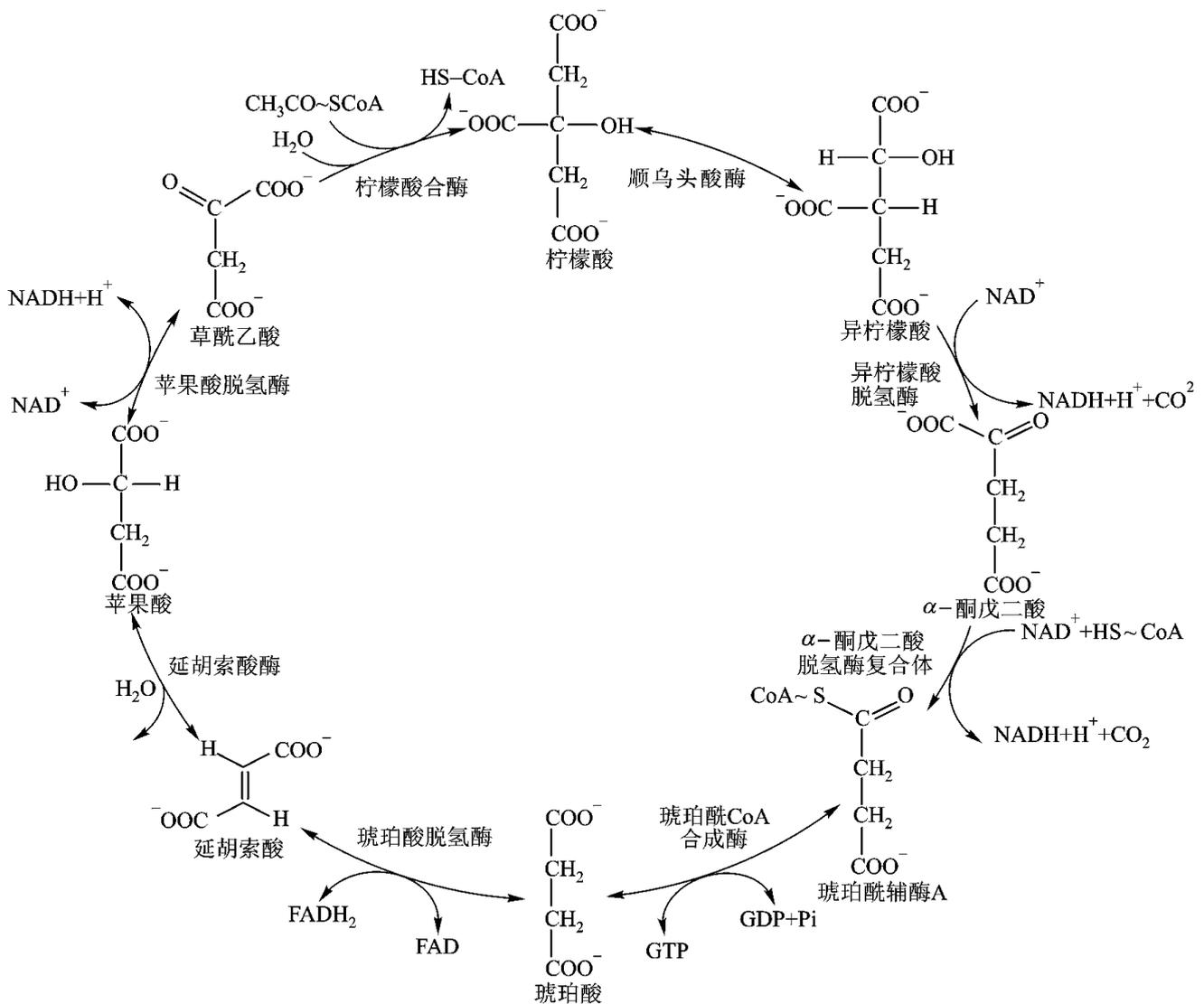


图 6-2 三羧酸循环

① 循环中有两次脱羧反应,分别由异柠檬酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶复合体催化。 α -酮戊二酸脱氢酶复合体的组成和催化反应过程与前述的丙酮酸脱氢酶复合体类似。

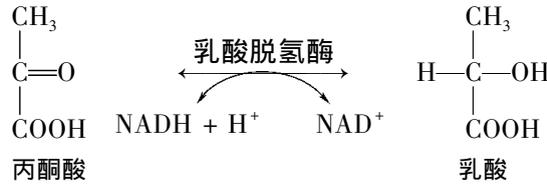
② 循环中有4次脱氢反应。异柠檬酸、 α -酮戊二酸和苹果酸脱下的氢均被 NAD^+ 接受生成 $\text{NADH} + \text{H}^+$,琥珀酸脱氢酶的辅基为 FAD ,接受2个 H 后,生成 FADH_2 。 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 和 FADH_2 经呼吸链氧化最终生成 H_2O 并释放能量,使 ADP 磷酸化为 ATP 。通过 NAD^+ 递氢,每对氢原子氧化后可平均生成2.5分子 ATP 供线粒体外利用,通过 FAD 递氢,每对氢原子氧化后可生成1.5分子 ATP 供线粒体外利用。琥珀酰 CoA 转变成琥珀酸时发生的底物水平磷酸化生成1分子 GTP 。 GTP 可将分子末端的高能磷酸键转移给 ADP 生成 ATP 。所以1分子乙酰 CoA 经过三羧酸循环氧化分解约可生成10分子 ATP 供线粒体外利用。

③ 循环中有三步不可逆反应,即草酰乙酸与乙酰 CoA 缩合生成柠檬酸、异柠檬酸转变成 α -酮戊二酸和 α -酮戊二酸氧化脱羧反应,保证三羧酸循环向一个方向进行。理论上讲,循环中的中间产物可以不断使用不被消耗,但它们可与其他代谢途径中的物质相互转变,如草酰乙酸主要来自丙酮酸的羧化,草酰乙酸可与天冬氨酸相互转变等,因此三羧酸循环的中间产物处于不断更新之中。循环中的中间产物含量增加,可加速三羧酸循环的运行。

④ 三羧酸循环不仅是糖、脂肪和氨基酸在体内氧化的共同途径,也是糖、脂肪、氨基酸代谢联系的枢纽。例如,在能量供应充足的情况下,从食物中摄取的糖一部分可转变成脂肪贮存。这是因为,葡萄糖分解成丙酮酸后进入线粒体内氧化脱羧生成乙酰 CoA ,而乙酰 CoA 可以作为脂肪酸合成的原料,用于脂肪酸的合成(见第八章脂代谢)。草酰乙酸可以与天冬氨酸互变, α -酮戊二酸可与谷氨酸互变。许多氨基酸可以转变成三羧酸循环上的中间产物(见第九章蛋白质的分解代谢)。

(二) 葡萄糖的无氧分解

胞质内葡萄糖分解生成的丙酮酸不进入线粒体,由乳酸脱氢酶催化生成乳酸。葡萄糖分解生成乳酸的过程不消耗氧,称之为葡萄糖的无氧分解。因该过程与酵母使糖转变成乙醇的发酵过程相似,故又称糖酵解(glycolysis)。由于Gustav Embden和Otto Meyerhof对此途径的发现贡献最大,糖酵解又称Embden-Meyerhof途径。目前人们一般将葡萄糖或糖原在胞质内生成丙酮酸或乳酸的过程均称为糖酵解。



葡萄糖无氧分解过程中,1分子葡萄糖生成2分子3-磷酸甘油醛,后者脱氢使2分子 NAD^+ 还原生成2分子 $\text{NADH} + \text{H}^+$,而1分子葡萄糖生成的2分子丙酮酸转变成2分子乳酸的过程中正好使2分子 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 转变成2分子 NAD^+ 。 NAD^+ 在葡萄糖无氧分解过程中可重复利用。

图6-3归纳了葡萄糖的分解代谢途径。

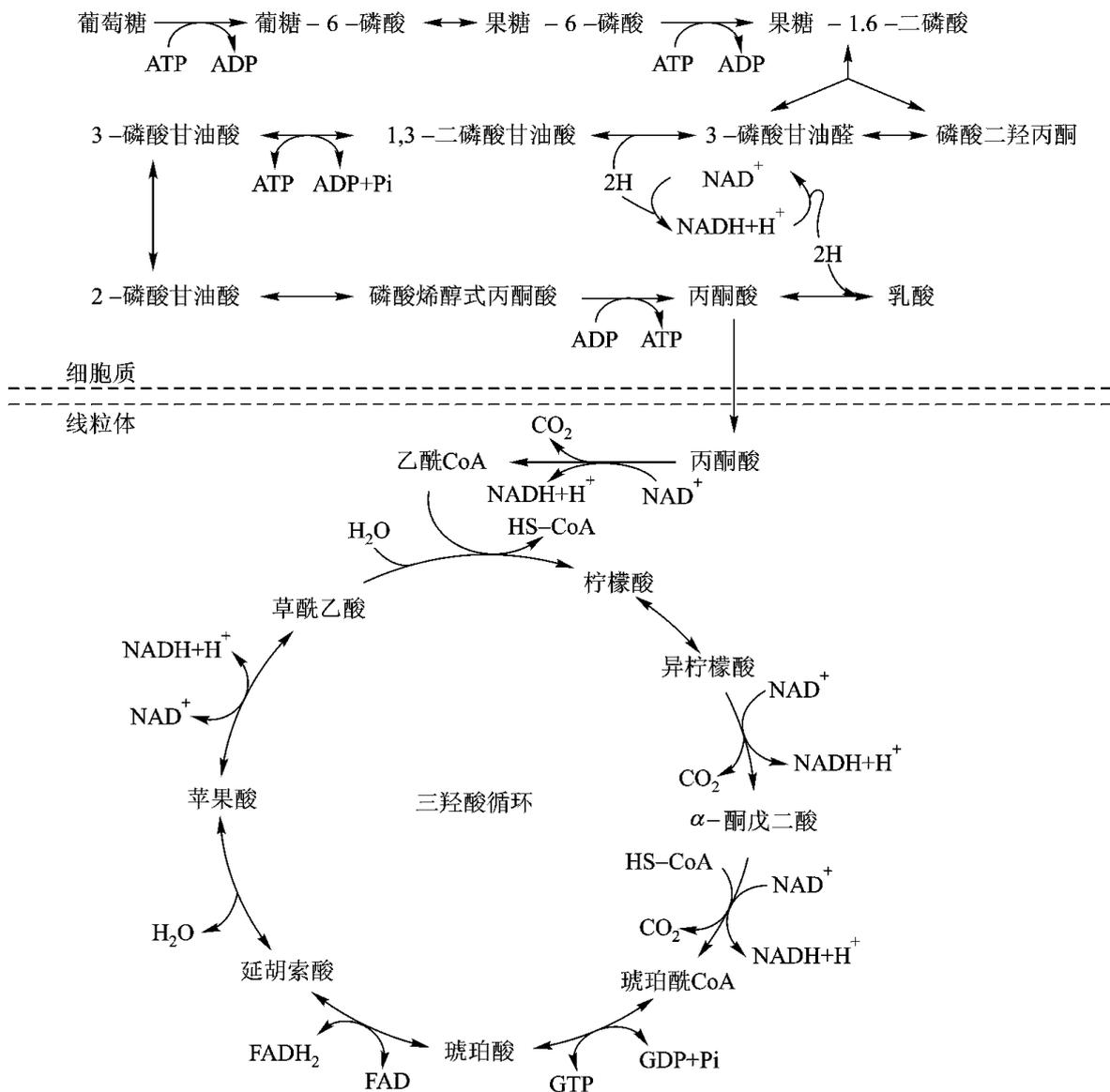


图6-3 葡萄糖的分解代谢途径

大多数砷化物均有毒性,其中三价的亚砷酸盐(AsO_2^-)毒性最强,它能与硫辛酸分子中的两个-SH结合形成稳定的化合物,使以硫辛酸为辅酶的酶(如丙酮酸脱氢酶复合体、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体等)不能发挥催化作用。五价的砷酸盐(HASO_4^{2-})可与无机磷酸竞争使底物磷酸化的酶的活性中心形成不稳定

的砷酸酯,如3-磷酸甘油醛生成1,3-二磷酸甘油酸的反应中若有砷酸盐存在,砷酸与无机磷酸竞争,生成1-砷酸-3-磷酸-甘油酸,后者可自发生成3-磷酸甘油酸,并释放热量,但不生成ATP,使底物水平磷酸化不能进行。

(三) 葡萄糖分解代谢的生理意义

人体内大多数组织细胞主要利用葡萄糖有氧氧化生成的ATP提供其生命活动中能量的需要。体内每分子葡萄糖经有氧氧化释放的能量生成可供线粒体外利用的ATP分子数见表6-1。

表6-1 葡萄糖有氧氧化时ATP的生成

反应过程：	生成ATP数(供线粒体外利用)
胞质内反应阶段	
葡萄糖→葡糖-6-磷酸	-1
果糖-6-磷酸→果糖-1,6-二磷酸	-1
甘油醛-3-磷酸→1,3-二磷酸甘油酸	2 × 2.5 或 2 × 1.5*
1,3-二磷酸甘油酸→3-磷酸甘油酸	2 × 1
磷酸烯醇式丙酮酸→烯醇式丙酮酸	2 × 1
线粒体内反应阶段	
丙酮酸→乙酰 CoA	2 × 2.5
异柠檬酸→ α -酮戊二酸	2 × 2.5
α -酮戊二酸→琥珀酰 CoA	2 × 2.5
琥珀酰 CoA→琥珀酸	2 × 1
琥珀酸→延胡索酸	2 × 1.5
苹果酸→草酰乙酸	2 × 2.5
净生成 32 或 30 ATP	

* 胞质内生成的NADH + H⁺,如果经苹果酸-天冬氨酸穿梭进入线粒体,1分子NADH + H⁺可生成2.5分子ATP;如经 α -磷酸甘油穿梭,则可生成1.5分子ATP(参见第七章生物氧化)。

糖无氧分解时,每分子磷酸丙糖有2次底物水平磷酸化,可生成2分子ATP,因此每分子葡萄糖可生成4分子ATP。但葡萄糖磷酸化和果糖-6-磷酸磷酸化时共消耗2分子ATP。所以每分子葡萄糖经无氧分解过程净生成2分子ATP,比每分子葡萄糖有氧氧化生成32(30)分子ATP少得多。但当氧供应不足时,如登高、百米短跑等剧烈运动时,机体处于相对缺氧状态,需靠葡萄糖无氧分解迅速补充ATP的不足。成熟红细胞由于缺乏线粒体,仅靠葡萄糖无氧分解获能。皮肤、睾丸、视网膜、肾髓质和白细胞等在氧供应充足时也由葡萄糖无氧分解提供部分能量。肿瘤细胞葡萄糖无氧分解酶活力很强,主要靠葡萄糖无氧分解供能。临床上呼吸衰竭、循环衰竭、急性大失血等情况下,由于机体不能得到充分的氧气供应,糖酵解增强,可引起血液乳酸浓度升高,乳酸是酸性化合物,病人可出现乳酸性酸中毒。

二、糖原的合成和分解

糖原是人体的糖的贮存形式,主要存在于肝和肌肉中。肝糖原含量约占肝重的6%,肌糖原含量约占肌肉重量的1%,但由于体内肌肉总量远多于肝,肌糖原总量约为肝糖原总量的3~4倍。肌糖原主要供肌肉收缩时能量的需要,肝糖原主要用来贮存和补充血中葡萄糖以维持血糖浓度的恒定。

糖原是以葡萄糖为基本单位聚合而成的多糖。在糖原分子中,葡萄糖之间以 α -1,4-糖苷键相连形成12~14个葡萄糖单位组成的直链,两直链间以 α -1,6-糖苷键相连形成分支(图6-4)。它们围绕一个同心排列(图6-5)。

(一) 糖原合成

餐后血液中葡萄糖浓度升高时,葡萄糖可在肝和肌肉等组织中合成糖原。由葡萄糖合成糖原的过程

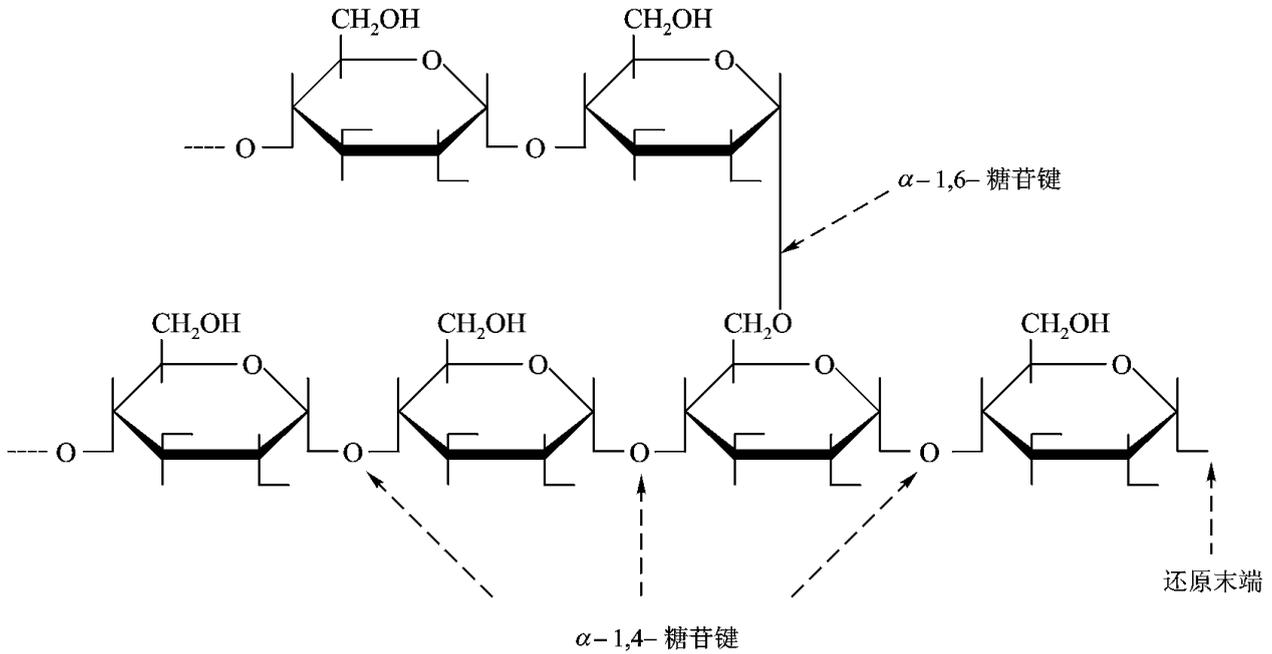


图 6-4 糖原的部分结构

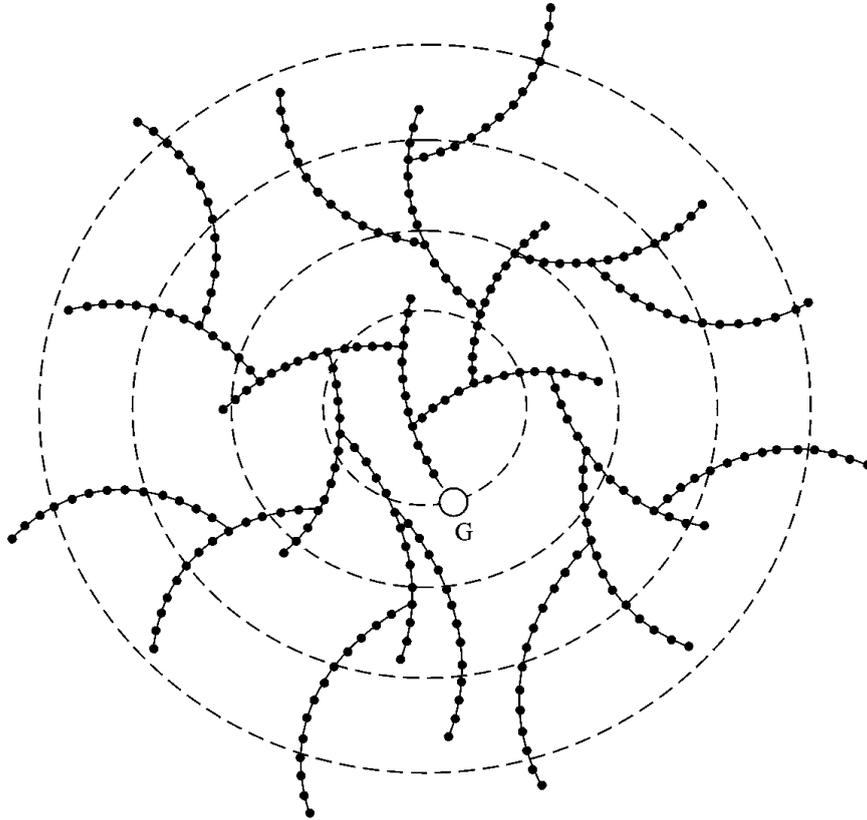


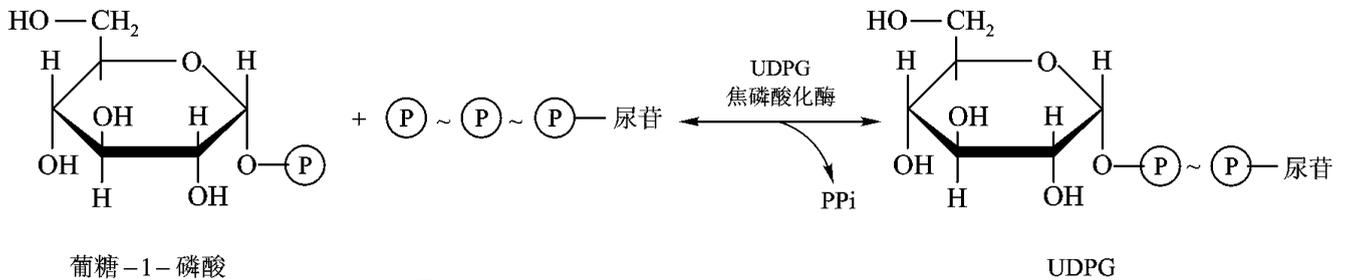
图 6-5 糖原分子的结构

G, 糖原生成蛋白; ●, 葡萄糖残基

称为糖原合成 (glycogenesis)。

进入肝或肌肉中的葡萄糖首先在己糖激酶(肝内为葡糖激酶)的作用下磷酸化成为葡糖-6-磷酸。葡糖-6-磷酸在葡糖磷酸变位酶的作用下转变为葡糖-1-磷酸。葡糖-1-磷酸与尿苷三磷酸(UTP)反应生成尿苷二磷酸葡糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)。UDPG是葡萄糖的活化形式,作为合成糖原时葡萄糖的供体。此反应是由UDPG焦磷酸化酶(UDPG pyrophosphorylase)催化的可逆反应,但由于生成的焦磷酸在体内被焦磷酸酶迅速水解,使反应向合成糖原方向进行。

在糖原合酶(glycogen synthase)的催化下,UDPG上葡萄糖C-1与糖原分子末端葡萄糖残基上的C-4



形成糖苷键, 释放出 UDP。该反应是在预先存在的糖原分子或糖原引物的基础上进行的。糖原引物是糖原生成蛋白(glucogenin), 其分子中的一个酪氨酸残基上的羟基与 UDPG 相互作用后, 与葡萄糖 C-1 上的羟基脱水缩合, 形成 O -糖苷键, 使两者相连。此后, 在第一个与糖原生成蛋白相连的葡萄糖残基上逐个连接葡萄糖分子形成糖原。

糖原合酶是糖原合成的关键酶, 它只能催化葡萄糖残基之间形成 $\alpha-1,4$ -糖苷键, 糖链只能延长, 不能形成分支。当糖链延长到 11 个葡萄糖残基以上时, 分支酶将含 6 个以上葡萄糖残基的糖链转移到邻近的糖链上, 两者以 $\alpha-1,6$ -糖苷键相连, 形成分支(图 6-6)。在糖原合酶和分支酶的交替作用下, 糖原中直链加长, 分支增多, 分子变大, 分子中反应位点的总数增多, 有利于糖原合成和糖原分解。

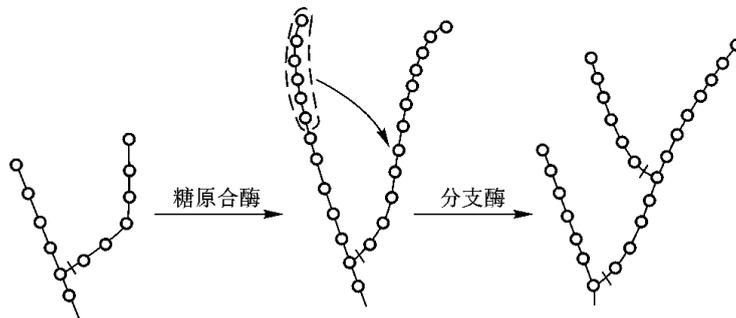


图 6-6 糖原合酶和分支酶的交替作用
— $\alpha-1,4$ -糖苷键; \perp $\alpha-1,6$ -糖苷键

(二) 糖原分解

糖原分解(glycogenolysis)习惯上是指肝糖原分解成葡萄糖。糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase)是糖原分解的关键酶。在糖原磷酸化酶的催化下, 以磷酸解方式从糖原分子最外侧的糖链分支上逐个解离末端以 $\alpha-1,4$ -糖苷键相连的葡萄糖残基, 生成葡糖-1-磷酸。此反应是可逆的, 但由于细胞内无机磷酸的浓度约为葡糖-1-磷酸的 100 倍, 故反应向糖原分解的方向进行。当最外侧分支糖链上的葡萄糖残基逐个解离到距离分支点约 4 个葡萄糖残基时, 由于空间位阻, 糖原磷酸化酶不再能发挥催化作用。这时由脱支酶将此分支末端的三糖单位转移到附近糖链的末端, 两者以 $\alpha-1,4$ -糖苷键相连。糖原磷酸化酶可继续发挥催化作用, 逐个解离该链末端的葡萄糖残基。此时, 分支链上仅留下一个以 $\alpha-1,6$ -糖苷键相连的葡萄糖残基, 在脱支酶(debranching enzyme)的催化下, 水解成游离的葡萄糖。可见, 脱支酶具有寡 $\alpha-1,4 \rightarrow \alpha-1,4$ -葡聚糖转移酶和 $\alpha-1,6$ -葡糖苷酶的双重作用。糖原在糖原磷酸化酶和脱支酶的交替作用下, 分子逐渐缩小(图 6-7)。

经糖原磷酸化酶磷酸解生成的葡糖-1-磷酸在葡糖磷酸变位酶的催化下转变为葡糖-6-磷酸。由葡糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase)催化葡糖-6-磷酸水解成葡萄糖释放入血。葡糖-6-磷酸酶只存在于肝(肾)中, 不存在于肌肉中。所以只有肝(肾)中的糖原可直接补充血糖。

现将糖原合成和糖原分解归纳于图 6-8。

(三) 糖原储积病

糖原储积病(glycogen storage disease)是一类遗传性代谢病, 其特点是体内某些组织器官中蓄积了大

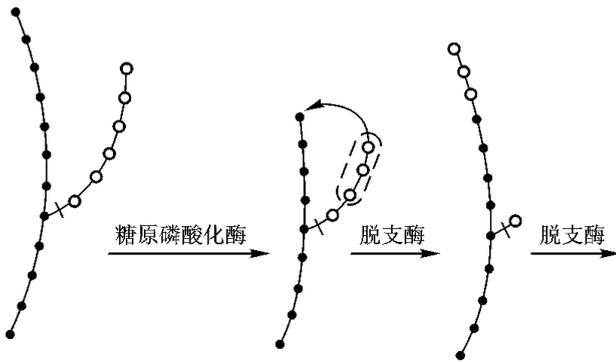


图 6-7 糖原磷酸化酶和脱支酶的交替作用

— $\alpha-1,4$ -糖苷键 ; - $\alpha-1,6$ -糖苷键

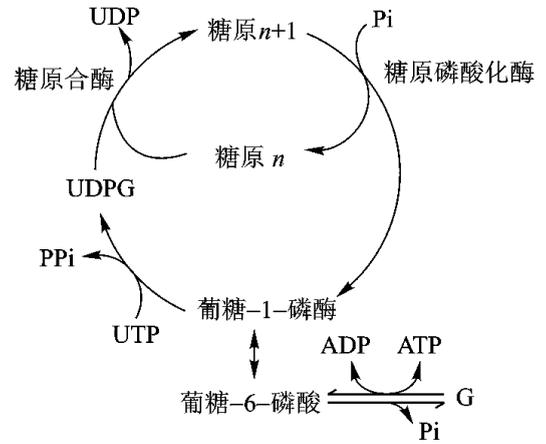


图 6-8 糖原的合成和分解

G, 葡萄糖 n, n 个葡萄糖残基

量结构正常或异常的糖原。此病主要是由于某些催化糖原分解的酶缺陷所致。主要累及肝,其次是心和肌肉。本病可分为多型,最常见的为 I 型。该型由于肝(肾)中缺乏葡糖-6-磷酸酶以致不能动用糖原维持血糖浓度,可引起低血糖、乳酸血症、酮症、高脂血症等。II 型糖原储积病由于溶酶体中缺乏 $\alpha-1,4$ -葡糖苷酶和 $\alpha-1,6$ -葡糖苷酶,使糖原蓄积在各组织的溶酶体内,可引起心力衰竭而死亡。糖原贮积病分型见表 6-2。

表 6-2 糖原贮积病分型

型 别	缺陷的酶	受累的组织器官	糖原结构
I	葡糖-6-磷酸酶	肝、肾	正常
II	α -葡糖苷酶	所有组织	正常
III	脱支酶	肝、肌肉	分支多
IV	分支酶	肝、脾	分支少
V	肌糖原磷酸化酶	肌肉	正常
VI	肝糖原磷酸化酶	肝	正常
VII	磷酸果糖激酶 1	肌肉、红细胞	正常
VIII	磷酸化酶激酶	肝	正常

三、葡糖异生作用

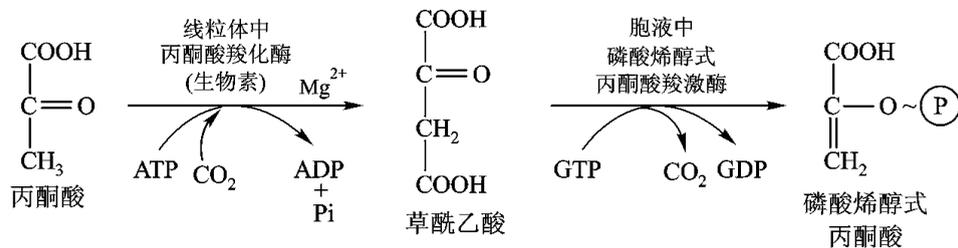
葡糖异生作用(gluconeogenesis)是指非糖物质(乳酸、甘油、生糖氨基酸等)转变为葡萄糖或糖原的过程。肝是葡糖异生的主要器官。肾在正常情况下葡糖异生能力只有肝的 1/10,长期饥饿时肾葡糖异生能力大大增强。

(一) 葡糖异生的基本途径

葡糖异生途径基本上是葡萄糖酵解途径的逆反应。但在糖酵解途径中,由于己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶催化的三步反应不可逆,因此,要完成葡萄糖酵解途径的逆反应,必须使这三步反应能逆向进行。葡糖异生途径中,此工作由另外四个关键酶催化完成,反应过程如下:

1. 丙酮酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸

糖酵解途径中丙酮酸激酶催化磷酸烯醇式丙酮酸转变成丙酮酸。而葡糖异生途径中,丙酮酸转变成磷酸烯醇式丙酮酸由两步反应组成。



催化第一步反应的酶是丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)。其辅酶是生物素。CO₂ 先与生物素结合,需消耗 ATP,然后生物素将 CO₂ 转移给丙酮酸生成草酰乙酸。由于丙酮酸羧化酶仅存在于线粒体内,故胞质中的丙酮酸必须进入线粒体,才能羧化生成草酰乙酸。

参与第二步反应的酶是磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase)。它催化草酰乙酸脱羧生成磷酸烯醇式丙酮酸。反应中消耗一个高能磷酸键。上述两步反应共消耗 2 分子 ATP。

由于磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶主要存在于胞质中(人类此酶胞质/线粒体分布的比值为 67/33),故生成的草酰乙酸可经苹果酸-天冬氨酸穿梭转运出线粒体(见“生物氧化”章)或经线粒体中苹果酸脱氢酶催化还原成苹果酸后出线粒体,再在胞质中苹果酸脱氢酶的催化下转变成草酰乙酸。

2. 果糖-1,6-二磷酸转变为果糖-6-磷酸

此反应是由果糖-1,6-二磷酸酶催化的水解反应,因是放能反应,反应易于进行。

3. 葡糖-6-磷酸水解为葡萄糖

此反应由葡糖-6-磷酸酶催化完成。

以上三对逆向反应中,一种酶催化某一方向反应的产物成为另一种酶催化相反方向反应的底物,这种由不同酶催化底物互变的反应称为底物循环。上述底物循环反应的结果仅是 ATP 分解释放热能。由于细胞内每一对催化逆向反应酶的活性两者不完全相等,同时催化这些底物循环的酶又受许多因素的调节,使代谢反应向一个方向进行,但其中也存在有一定限度的底物循环。若底物循环由于失控而增加,可引起恶性高热。

非糖物质必须首先转变成葡糖异生途径中的中间产物,才能进行糖异生。乳酸可脱氢生成丙酮酸进入葡糖异生途径;甘油先磷酸化为 α-磷酸甘油,再脱氢生成磷酸二羟丙酮,进入葡糖异生途径;其他生糖氨基酸可通过联合脱氨基作用等生成丙酮酸进入葡糖异生途径,或生成三羧酸循环的中间产物,转变成苹果酸后出线粒体进入胞质,在胞质中苹果酸脱氢生成草酰乙酸进入葡糖异生途径转变成葡萄糖。葡糖异生的主要途径归纳如图 6-9。

(二) 葡糖异生的生理意义

1. 保证血糖浓度的相对恒定

空腹或饥饿时,肝糖原分解产生葡萄糖仅能维持正常血糖浓度 8~12 h。此后,机体主要依靠葡糖异生来维持血糖浓度的恒定。正常成人脑主要利用葡萄糖供能,红细胞没有线粒体,完全通过葡萄糖无氧代谢获能。故维持血糖浓度的恒定,可保证脑等重要器官的能量供应。饥饿时,由于葡萄糖供应不足,骨骼肌中糖原耗竭,生成乳酸量较少,葡糖异生的原料主要是生糖氨基酸和甘油。

2. 有利于乳酸的利用

剧烈运动时,骨骼肌葡萄糖分解代谢生成的丙酮酸量超过了三羧酸循环的氧化能力,此时胞质中形成的 NADH + H⁺ 也超过了线粒体呼吸链的氧化能力,加之氧的供应相对不足,丙酮酸与 NADH + H⁺ 在胞质中积累。在乳酸脱氢酶的催化下,丙酮酸转变成乳酸, NADH + H⁺ 转变成 NAD⁺,使葡萄糖分解代谢能继续进行。大量的乳酸通过细胞质膜上的载体转运进入血液,通过血液运输进入肝细胞后转变成丙酮酸进行葡糖异生,生成的葡萄糖补充入血,供骨骼肌利用,其中一部分葡萄糖进行分解代谢再生成乳酸。此过程称之为“乳酸循环”或 Cori 循环。骨骼肌中生成的乳酸也可通过血液运输进入其他细胞(如心肌细胞),转变成丙酮酸后进行有氧氧化。此外,骨骼肌中的丙酮酸也可经转氨基作用生成丙氨酸,通过血液进入肝后经脱氨基作用生成丙酮酸进行葡糖异生。

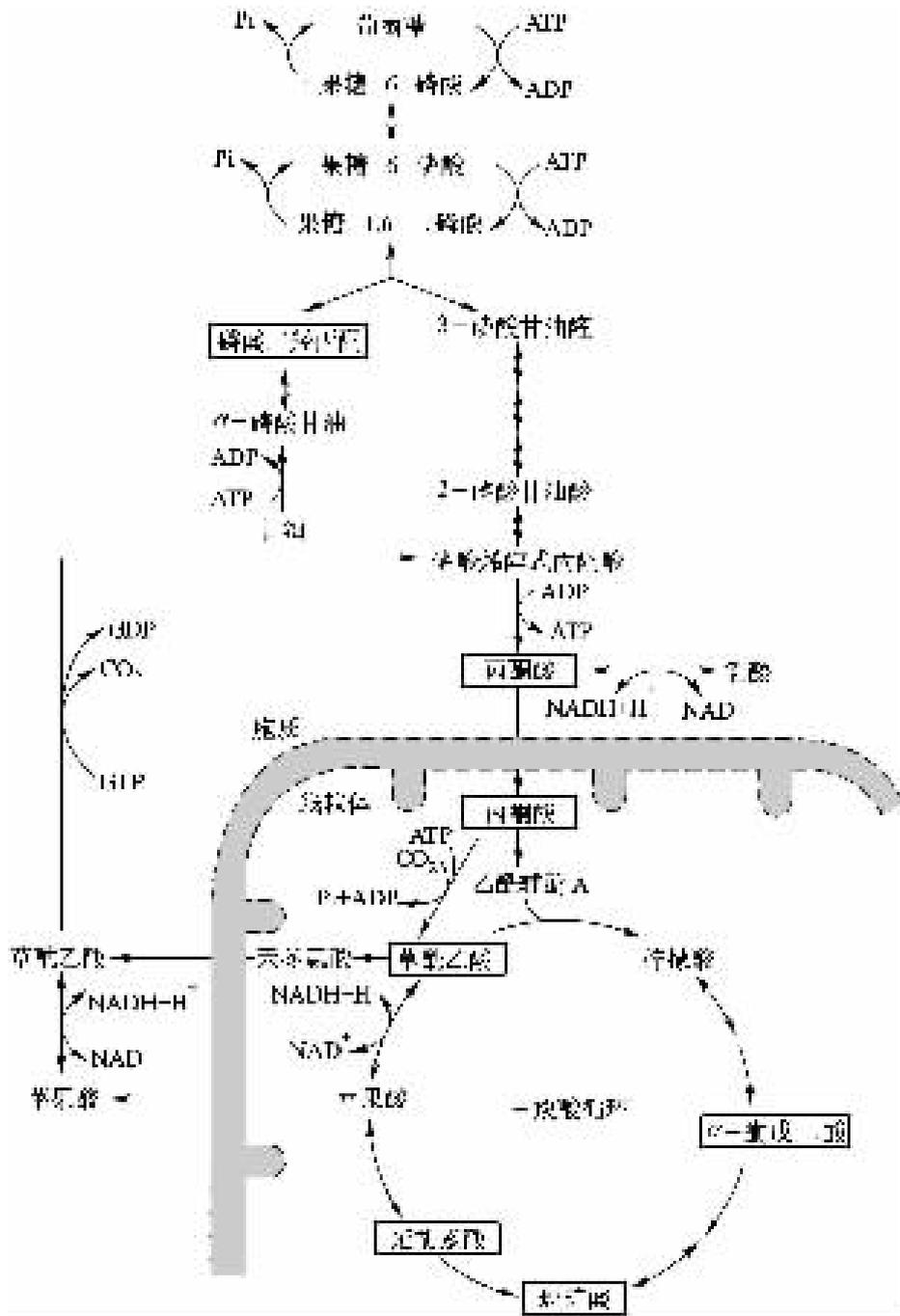


图 6-9 葡糖异生的基本途径

方框内为非糖物质转变成可进行葡糖异生的物质 ;可进行葡糖异生的各种生糖氨基酸未标出

四、糖代谢的调节

下面叙述的有关糖代谢的调节主要是糖代谢在细胞内的调节,即细胞水平的调节,通过激素的作用对糖代谢进行调节主要在本章第五节“血糖及其调节”中叙述。

(一) 葡萄糖分解和葡糖异生的调节

胞质中葡萄糖分解途径中有三步不可逆反应,即己糖激酶(肝中为葡糖激酶)、果糖磷酸激酶 1 和丙酮酸激酶催化的反应。它们控制胞质中葡萄糖的分解过程,是三个调节点。此三步不可逆反应中,果糖磷酸激酶 1 催化效率最低,因此是该途径中的主要调节点。葡糖异生途径实际上是葡萄糖分解途径的逆反应途径,该途径利用丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、果糖-1,6-二磷酸酶和葡糖-6-磷酸酶催化,使葡萄糖分解途径中的三步不可逆反应能逆向进行。此两条途径究竟以哪一条途径为主,主要以上述两条途径中,催化不可逆反应酶的活性而定。

细胞内的一些物质可对上述两组催化不可逆反应的酶进行相反作用的调节,这些调节包括变构调节(allosteric regulation)和通过磷酸化或去磷酸化的化学修饰(chemical modification)调节(详见“代谢调节”章)。

AMP、果糖-2,6-二磷酸、ATP 和柠檬酸都是果糖磷酸激酶 1 的变构效应剂。细胞内 AMP 含量高时(表示能量供应不足),激活果糖磷酸激酶 1,抑制果糖-1,6-二磷酸酶,有利于葡萄糖分解途径;相反,当细胞内 ATP 和柠檬酸含量高时(表示能量供应和中间代谢物充足),抑制果糖磷酸激酶 1,有利于葡糖异生途径。

在肝中,磷酸果糖激酶 2 催化果糖-6-磷酸生成果糖-2,6-二磷酸。果糖-2,6-二磷酸通过变构调节激活果糖磷酸激酶 1,抑制果糖-1,6-二磷酸酶的活性。果糖磷酸激酶 2 同时具有果糖-2,6-二磷酸酶的活性,也能催化果糖-2,6-二磷酸水解生成果糖-6-磷酸,因此它是一种双功能酶。当葡萄糖供应充足时(餐后),果糖-6-磷酸浓度增高,通过变构调节激活果糖磷酸激酶 2 的活性,抑制果糖-2,6-二磷酸酶的活性,果糖-2,6-二磷酸浓度增高,激活果糖磷酸激酶 1,抑制果糖-1,6-二磷酸酶的活性,有利于葡萄糖分解代谢。相反,当葡萄糖缺乏时(饥饿),胰高血糖素(glucagon)通过 cAMP-蛋白激酶 A 途径,使此双功能酶磷酸化,抑制果糖磷酸激酶 2,激活果糖-2,6-二磷酸酶,使果糖-2,6-二磷酸浓度降低,抑制果糖磷酸激酶 1 的活性,激活果糖-1,6-二磷酸酶,有利于葡糖异生作用。

当 ATP 和丙氨酸含量高时抑制丙酮酸激酶,不利于葡萄糖分解途径,有利于葡糖异生途径;乙酰 CoA 激活丙酮酸羧化酶,也有利于葡糖异生途径。ADP 对丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶均起抑制作用,抑制葡糖异生的进行。上述调节主要是变构调节,但肝中丙酮酸激酶还可通过 cAMP-蛋白激酶途径使之磷酸化或去磷酸化,进行化学修饰调节,去磷酸化的丙酮酸激酶有活性。

除了与葡糖异生途径进行相反作用的调节外,葡萄糖分解途径中,丙酮酸脱氢酶复合体主要受磷酸化和去磷酸化共价修饰的调节。当它的丝氨酸残基被磷酸化后,酶活性减弱;去磷酸化后,酶活性增强。该酶的催化产物乙酰 CoA、NADH、ATP 可激活催化丙酮酸脱氢酶复合体磷酸化的激酶,使丙酮酸脱氢酶复合体磷酸化而活性减弱。线粒体内 Ca^{2+} 浓度增高可激活相应的磷酸酶,使丙酮酸脱氢酶复合体去磷酸化而活性增强。

三羧酸循环的主要调节点是异柠檬酸脱氢酶和 α -酮戊二酸脱氢酶复合体。ADP 能激活异柠檬酸脱氢酶,而 ATP 和 NADH 抑制该酶的活性。与丙酮酸脱氢酶复合体相似, α -酮戊二酸脱氢酶复合体也受磷酸化和去磷酸化共价修饰的调节,其催化产物也是通过激活特异性激酶使 α -酮戊二酸脱氢酶复合体磷酸化而活性降低。

现将葡萄糖分解途径和葡糖异生途径中主要调节点以及调节物归纳如图 6-10。

(二) 糖原合成和分解的调节

糖原分解途径中的糖原磷酸化酶和糖原合成途径中的糖原合酶分别是这两条途径的调节酶,其活性高低决定糖原代谢的方向。

1. 糖原磷酸化酶

肝内的糖原磷酸化酶存在两种形式,即磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b。磷酸化酶 a 有活性,磷酸化酶 b 无活性。两者的不同之处是磷酸化酶 a 有一个丝氨酸羟基被磷酸化,磷酸化酶 b 中该丝氨酸羟基不被磷酸化。磷酸化酶激酶 b 催化磷酸化酶 b 磷酸化转变成磷酸化酶 a,磷蛋白磷酸酶催化磷酸化酶 a 去磷酸化转变成磷酸化酶 b。

磷酸化酶 b 激酶也存在两种形成,即磷酸化的磷酸化酶 b 激酶 a(有活性)和去磷酸化的磷酸化酶 b 激酶 b(无活性)。蛋白激酶 A(cAMP 依赖性蛋白激酶)催化磷酸化酶 b 激酶磷酸化,磷蛋白磷酸酶催化去磷酸化。磷酸化酶 b 激酶由 4 种不同亚基($\alpha_4\beta_4\gamma_4\delta_4$)组成,其中 δ 亚基就是钙调蛋白(calmodulin),当 δ 亚基与 Ca^{2+} 结合后磷酸化酶 b 激酶的构象改变,其催化磷酸化酶磷酸化的活性更高。抑制磷蛋白磷酸酶的效果与激活糖原磷酸化酶和磷酸化酶 b 激酶的效果是相同的。磷蛋白磷酸酶抑制物 1 可抑制磷蛋白磷酸酶。蛋白激酶 A 催化磷蛋白磷酸酶抑制物 1 磷酸化使之具有活性。胰高血糖素、肾上腺素等通过激活

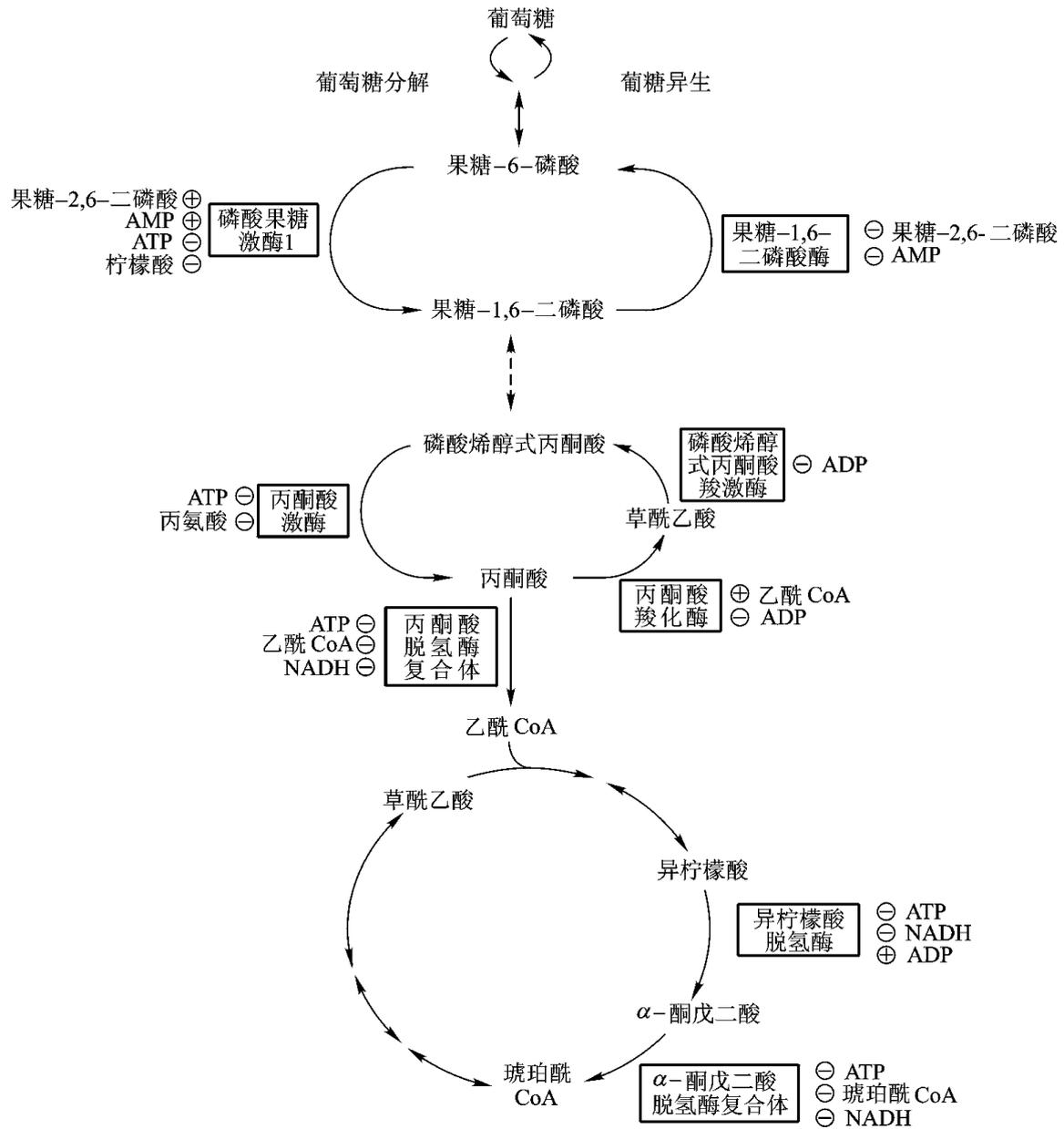


图 6-10 葡萄糖的分解途径和葡糖异生途径的调节

⊕ 激活 ⊖ 抑制

腺苷酸环化酶增加 cAMP 的生成, 从而通过上述机制促进糖原分解, 以升高血糖。

除上述化学修饰调节外, 糖原磷酸化酶还受 AMP、ATP 和葡萄糖的变构调节(图 6-11)。

2. 糖原合酶

糖原合酶是由相同亚基组成的四聚体(α_4), 也存在两种形式, 即糖原合酶 a 和糖原合酶 b。去磷酸化的糖原合酶 a 有活性, 磷酸化的糖原合酶 b 无活性。其磷酸化与活性的关系正好与磷酸化酶相反, 磷酸化的糖原磷酸化酶 a 有活性, 去磷酸化的糖原磷酸化酶 b 无活性。已发现体内有 11 种蛋白激酶可催化糖原合酶中 9 个以上的丝氨酸残基磷酸化, 它们的作用是催化有活性的糖原合酶 a 磷酸化转变成无活性的糖原合酶 b。

cAMP 通过激活蛋白激酶 A, 使糖原磷酸化酶被激活同时使糖原合酶失活。Ca²⁺ 通过激活糖原磷酸化酶 b 激酶也可使糖原磷酸化酶被激活, 同时使糖原合酶失活。Ca²⁺ 还可通过钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (calmodulin-dependent protein kinase) 和 Ca²⁺-磷脂依赖性蛋白激酶(蛋白的激酶 C)使糖原合酶磷酸化。糖原合酶还可被糖原合酶激酶-3、酪蛋白激酶 I、酪蛋白激酶 II 等磷酸化, 但使这些酶激活的信息分子尚不明了。

磷蛋白磷酸酶催化无活性的糖原合酶 b 去磷酸化转变成有活性的糖原合酶 a。cAMP 通过蛋白激酶 A 催化使磷蛋白磷酸酶抑制物 1 磷酸化而具有活性, 抑制磷蛋白磷酸酶, 使无活性的糖原合酶 b 不能去磷

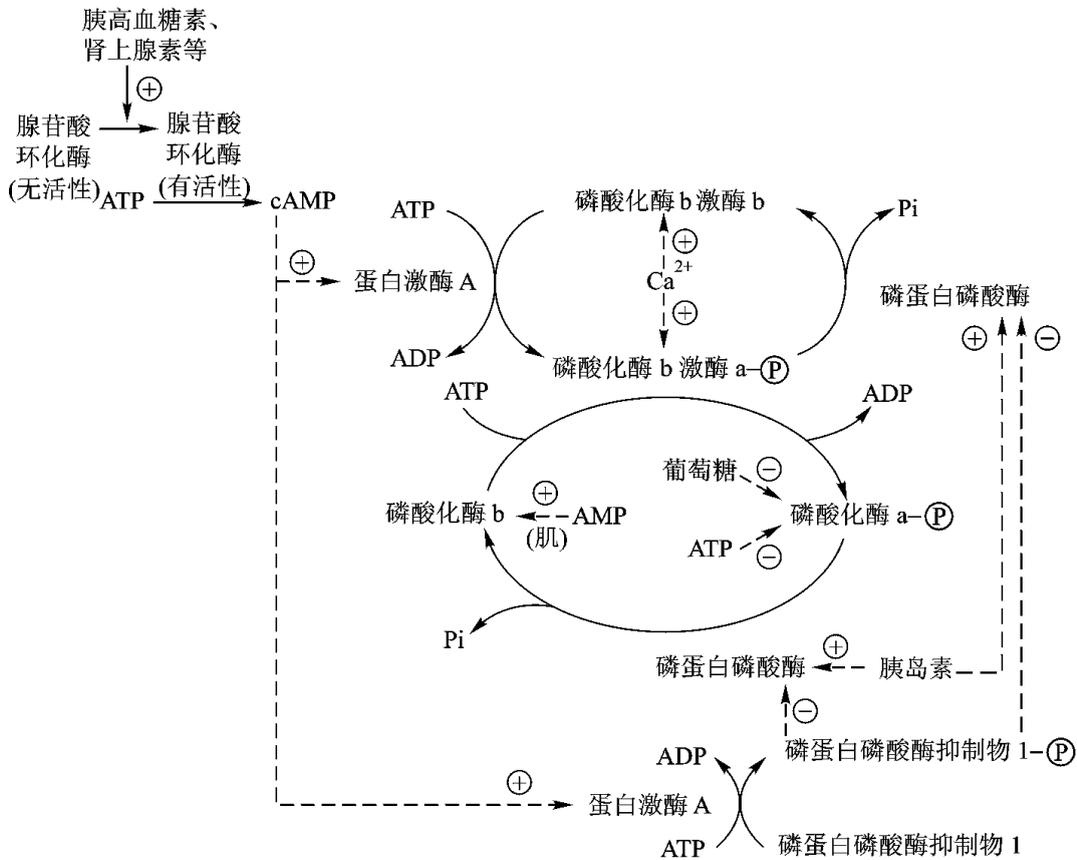


图 6-11 糖原磷酸化酶的调节

⊕ 激活 ; ⊖ 抑制

酸化变成有活性的糖原合酶 a ,抑制糖原合成。胰高血糖素和肾上腺素等即是通过增强腺苷酸环化酶的活性 ,从而促进 cAMP 的生成 ,达到抑制糖原合成的目的。相反 ,胰岛素对磷蛋白磷酸酶有激活作用 ,故可使无活性的糖原合酶 b 去磷酸化变成有活性的糖原合酶 a ,促进糖原合成(图 6-12)。

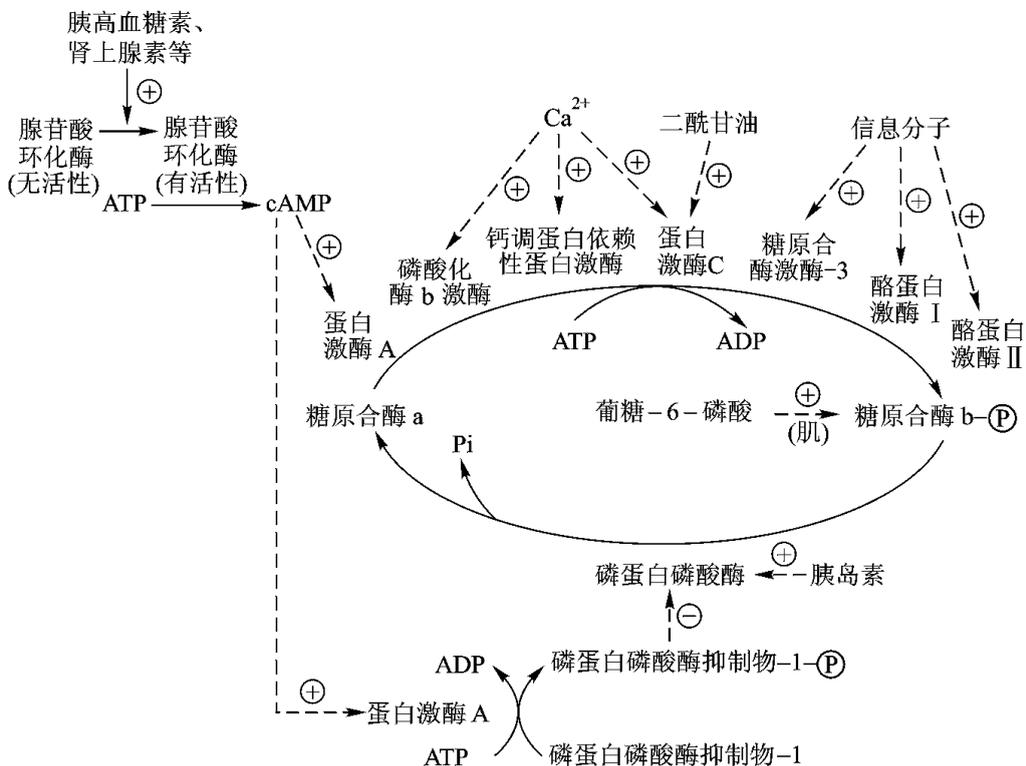


图 6-12 糖原合酶的调节

⊕ 激活 ⊖ 抑制

第三节 磷酸戊糖途径

磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)在细胞质中进行 ,它是葡萄糖氧化分解的又一途径。此途径的主要功能不是供能 ,而主要是为合成反应提供 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 和生成 5 碳糖 ,用于核酸的合成。该途径在肝、脂肪组织、肾上腺皮质、甲状腺、红细胞、睾丸和哺乳期乳腺中活性较强 ,在红细胞中占葡萄糖分解代谢的 5% ~ 10%。

一、反应过程

反应过程可分为两个阶段 :第一阶段是葡糖-6-磷酸经脱氢、脱羧生成磷酸戊糖 ;第二阶段则是一系列基团转移反应。

(一) 磷酸戊糖的生成

葡糖-6-磷酸由葡糖-6-磷酸脱氢酶催化脱氢生成 6-磷酸葡糖酸内酯 ,后者在内酯酶(lactonase)的作用下水解成 6-磷酸葡糖酸 β -磷酸葡糖酸脱氢酶催化 6-磷酸葡糖酸脱氢、脱羧转变成核酮糖-5-磷酸(仅此步不可逆 ,其他步骤均为可逆反应)。其中葡糖-6-磷酸脱氢酶的活性决定葡糖-6-磷酸进入该途径的比例。

这里应该指出的是 ,葡糖-6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡糖酸脱氢酶与糖有氧氧化的脱氢酶不同 ,它们的辅酶不是 NAD^+ ,而是 NADP^+ ,反应生成 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 。

(二) 基团转移反应

核酮糖-5-磷酸经异构反应转变成核糖-5-磷酸或木酮糖-5-磷酸。上述三种不同的磷酸戊糖经转酮酶(转羟乙醛酶)和转醛酶(转二羟丙酮酶)进行基团转移 ,中间生成三碳、七碳、四碳的单糖磷酸酯 ,最后生成果糖-6-磷酸和 3-磷酸甘油醛。

磷酸戊糖途径具体反应过程见图 6-13。

若以 3 分子葡糖-6-磷酸参与此途径代谢 ,每分子葡糖-6-磷酸经二次脱氢 ,一次脱羧 ,共生成 3 分子磷酸戊糖。然后 ,磷酸戊糖经异构、转酮及转醛反应最后生成 2 分子果糖-6-磷酸和 1 分子 3-磷酸甘油醛 ,从而汇入糖酵解途径 ,可继续进行葡萄糖分解代谢(图 6-14)。

二、生理意义

(一) 提供 $\text{NADPH} + \text{H}^+$

与 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 功能不同 , $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 携带的氢主要不是通过呼吸链氧化释放能量 ,而是作为供氢体参与体内多种代谢反应。

1. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 参与脂酸、胆固醇、类固醇激素等的生物合成。
2. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 是加单氧酶的供氢体 ,与药物、毒物和某些激素等的生物转化有关(详见“肝胆生物化学”章)。

3. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 作为谷胱甘肽还原酶的辅酶 ,对维持细胞中还原型谷胱甘肽(GSH)的正常含量起重要作用。G-SH 是体内重要的抗氧化剂 ,它可与过氧化物反应生成氧化型谷胱甘肽(G-S-S-G) ,从而保持体内生物分子的结构和功能的完整性。 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 可使 G-S-S-G 转变成 G-SH。遗传性葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏的病人不能经磷酸戊糖途径得到充足的 $\text{NADPH} + \text{H}^+$,G-S-S-G 转变 GSH 减少 ,GSH 含量减少。当病人接触氧化剂 ,如服用抗疟药伯喹、解热镇痛抗炎药阿司匹林、抗菌药磺胺等 ,或者吃了蚕豆后(蚕豆病) ,增加 GSH 的消耗 ,红细胞膜受氧自由基攻击生成的脂质过氧化物不能及时除去 ,使膜结构完整性受损 ,红细胞易破裂发生溶血。

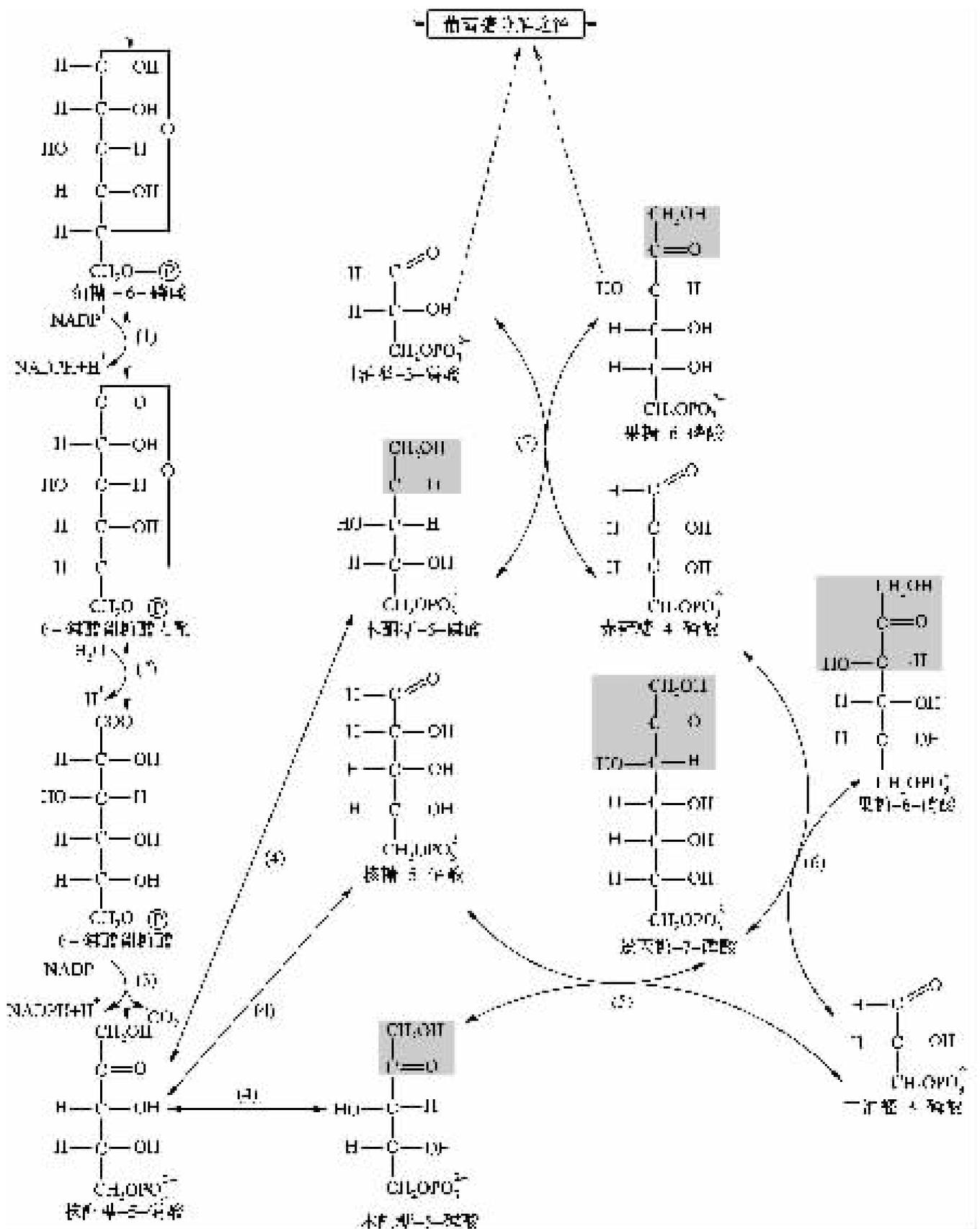


图 6-13 磷酸戊糖途径

(1) 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (2) 内酯酶 (3) 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (4) 异构酶 (5) 及 (7) 转酮酶 (6) 转醛酶

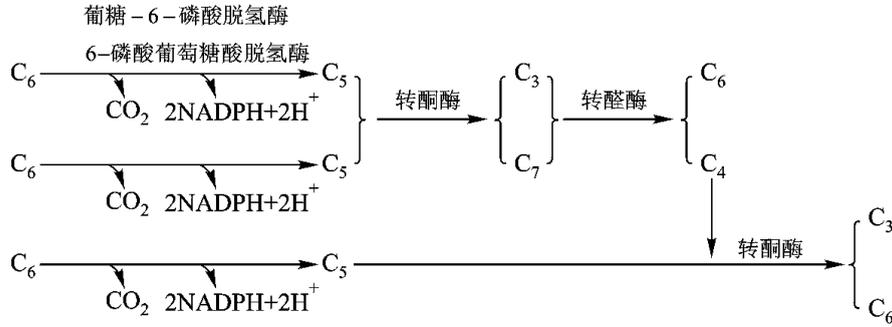


图 6-14 磷酸戊糖途径简图

(二) 生成的核糖-5-磷酸是合成核苷酸和核酸的原料

体内合成核苷酸和核酸中的核糖必须由各组织细胞内自行生成,所以损伤后修复、再生的组织中磷酸戊糖途径比较活跃。骨骼肌中葡糖-6-磷酸脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶含量极低,不能通过磷酸戊糖途径生成足够的核糖-5-磷酸,但可以通过葡萄糖分解途径中间产物3-磷酸甘油醛和果糖-6-磷酸,经磷酸戊糖途径中基团转移反应的逆反应生成核糖-5-磷酸满足其需要。

第四节 果糖和半乳糖的代谢

一、果糖代谢

饮食中的蔗糖在消化道中经蔗糖酶催化,水解生成果糖和葡萄糖;有些饮料中含有较多的果糖。

果糖被吸收后在肝中果糖激酶的催化下,生成果糖-1-磷酸。果糖-1-磷酸在醛缩酶B的催化下裂解为磷酸二羟丙酮和甘油醛,后者经丙糖激酶催化转变成3-磷酸甘油醛。3-磷酸甘油醛和磷酸二羟丙酮可进入葡萄糖分解或葡糖异生途径(图6-15)。

在肝外组织中,己糖激酶也能催化果糖生成果糖-6-磷酸,但催化作用不强。一些肝外组织中,由NADPH + H⁺供氢,在醛糖还原酶的催化下,可将葡萄糖还原成山梨醇,山梨醇在山梨醇脱氢酶的催化下,以NAD⁺为受氢体,被氧化为果糖。糖尿病白内障患者晶状体内果糖和山梨醇含量增加可能与此途径有关。精液中通过上述山梨醇途径生成的果糖是精子运动的能源。

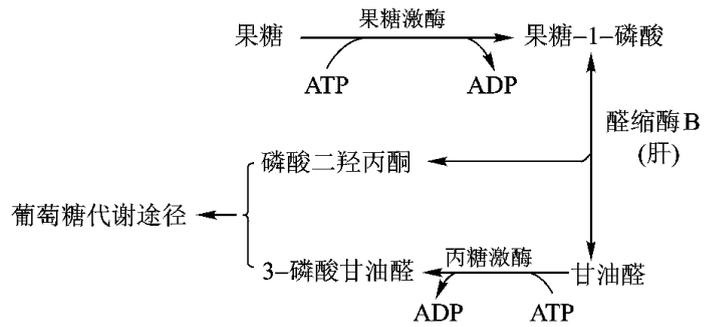


图 6-15 果糖代谢途径



二、半乳糖代谢

乳汁中的乳糖在肠道被水解成葡萄糖和半乳糖,半乳糖在肝中可转变为葡萄糖,具体过程见图6-16。半乳糖在半乳糖激酶的作用下生成半乳糖-1-磷酸,后者在半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶催化下,与UDPG反应生成尿苷二磷酸半乳糖和葡糖-1-磷酸。尿苷二磷酸半乳糖在UDPG-4-差向异构酶催

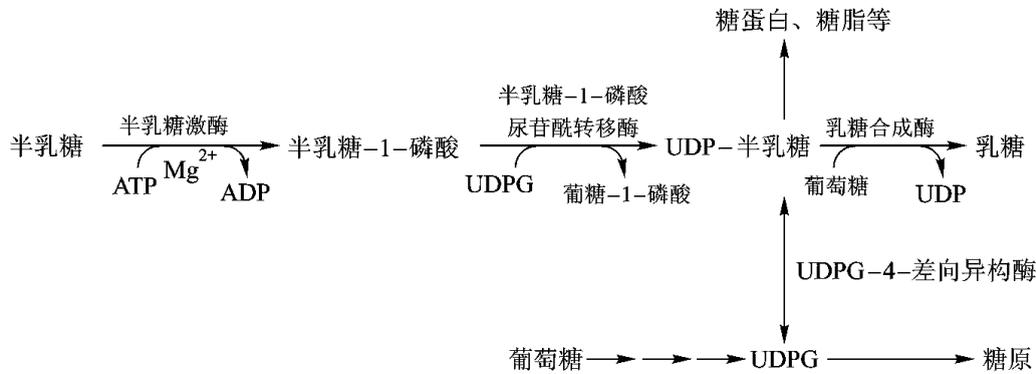


图 6-16 半乳糖代谢途径

化下转变成 UDPG, 由于此反应是可逆的, 因此葡萄糖也可转变成半乳糖。尿苷二磷酸半乳糖是合成乳糖、糖脂(脑苷脂类)、糖蛋白和蛋白聚糖的原料。

第五节 血糖及其调节

血糖指血液中的葡萄糖。正常人空腹血糖浓度为 $3.9 \sim 5.6 \text{ mmol/L}$ (用葡萄糖氧化酶法测定静脉血浆中葡萄糖浓度), 餐后可升高, 禁食时会降低, 但均可保持在一定范围。血糖浓度维持在较为恒定的水平, 对保证人体各组织器官特别是脑利用葡萄糖供能发挥正常功能极为重要。

一、血糖的来源和去路

血糖浓度之所以能维持较为恒定的水平, 主要是因为血液中葡萄糖的来源和去路不断地保持着平衡。餐后从小肠吸收大量葡萄糖后, 由于血糖浓度升高, 使葡萄糖进入肝、肌肉、肾等组织合成糖原或转变成脂肪贮存。空腹时, 由于身体各组织器官仍需利用葡萄糖作为能源, 此时肝糖原分解和非糖物质通过糖异生作用转变成葡萄糖, 维持血糖浓度恒定。总之, 血糖浓度保持恒定实际上是体内各组织器官在葡萄糖分解、葡萄糖异生、糖原分解和糖原合成等各方面代谢协同的结果(图 6-17)。其中肝是调节血糖浓度最主要的器官。

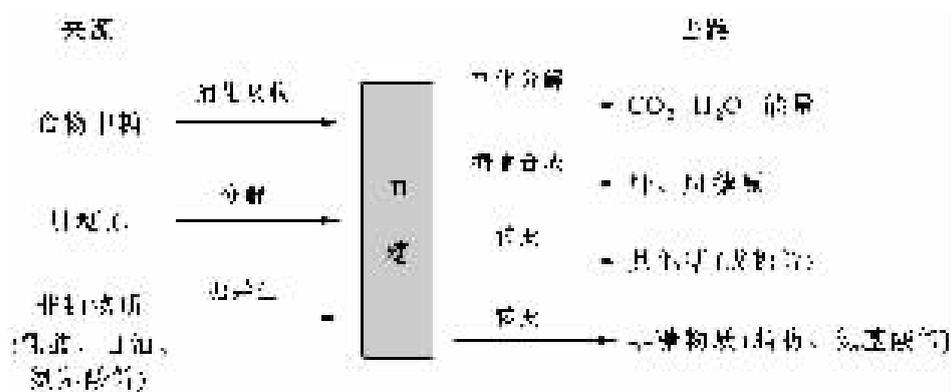


图 6-17 血糖的来源和去路

二、血糖浓度的调节

血糖浓度主要依靠激素进行调节。激素主要通过调节糖代谢各途径的关键酶的活性以维持血糖浓度

的相对恒定。

胰岛素(insulin)是胰岛 B 细胞分泌的激素,也是人体内唯一降低血糖浓度的激素,也是唯一同时促进糖原、脂肪、蛋白质合成的激素。由于葡萄糖能自由通过胰岛 B 细胞膜上的葡萄糖转运蛋白 2(glucose transporter 2, GLUT2) ,因此胰岛 B 细胞能对不同程度的高血糖作出直接反应。胰岛素降低血糖浓度是多方面作用的结果,主要是:① 将肌肉、脂肪组织细胞内的 GLUT4 转移到细胞膜上,增加细胞膜上 GLUT4 含量,加速葡萄糖进入细胞;② 激活磷蛋白磷酸酶,使糖原合酶去磷酸化后活性增强,糖原合成增加,糖原磷酸化酶去磷酸化后活性降低,糖原分解减少;③ 诱导磷酸果糖激酶 1 和丙酮酸激酶的表达,激活丙酮酸脱氢酶复合体,加速葡萄糖分解代谢;④ 抑制磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的活性,降低葡糖异生作用;⑤ 抑制脂肪细胞内激素敏感脂肪酶,减少脂肪动员。

胰高血糖素是胰岛 A 细胞分泌的激素,血糖浓度过低促进其分泌。胰高血糖素升高血糖浓度的机制主要是:① 胰高血糖素与肝细胞膜受体结合后通过 cAMP-蛋白激酶 A 途径激活糖原磷酸化酶引起肝糖原分解,使糖原合酶磷酸化失去活性,糖原合成减少;② 阻遏磷酸果糖激酶 1 和丙酮酸激酶的表达,减少葡萄糖分解代谢;③ 诱导磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和果糖-1,6-二磷酸酶的表达,促进葡糖异生;④ 激活脂肪细胞内激素敏感脂肪酶,增加脂肪动员。

胰岛素和胰高血糖素是调节血糖浓度最主要的两种作用相反的激素。引起胰岛素分泌的信号(如血糖浓度升高)可抑制胰高血糖素分泌;反之,使胰岛素分泌减少的信号(如血糖浓度降低)可促进胰高血糖素分泌。

与胰高血糖素作用相似,肾上腺素也可与肝和肌肉细胞膜受体结合通过 cAMP-蛋白激酶 A 途径激活糖原磷酸化酶,抑制糖原合酶的活性,使糖原分解增加,合成减少,血糖浓度升高。肾上腺素主要在应激状态下发挥作用。

糖皮质激素能促进肌肉蛋白分解,诱导肝中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的表达,增强糖异生;它还可抑制丙酮酸脱氢酶的活性,使肝外组织对血糖利用减少,使血糖浓度升高。

此外生长激素、促肾上腺皮质激素、甲状腺激素等均有升高血糖浓度的作用。

三、血糖浓度异常

(一) 高血糖

成人空腹血糖浓度高于 6.0 mmol/L 时被称之为血糖过高或高血糖(hyperglycemia)。若血糖浓度超过肾糖阈,葡萄糖可从尿中排出,称为糖尿。临床上高血糖和糖尿主要见于糖尿病。随着生活水平的提高、人口老龄化、生活方式的改变,患糖尿病的人数迅速增加。

目前将糖尿病分为 I 型糖尿病、II 型糖尿病、其他特殊类型的糖尿病和妊娠期糖尿病。I 型糖尿病主要是患者胰岛 B 细胞破坏,引起胰岛素缺乏;II 型糖尿病患者存在胰岛素受体或受体后功能缺陷(胰岛素抵抗)和胰岛素分泌缺陷。II 型糖尿病患者的遗传易感性较 I 型强。一些特殊类型糖尿病与胰岛 B 细胞中单基因缺陷有关。糖尿病严重时,机体不能利用葡萄糖供能,此时体内脂肪分解加速,酮体生成大大增加,可引起酮症酸中毒。它是内科常见的急症之一。其他因素如进食大量糖、情绪激动肾上腺素分泌增加等也可引起一过性的高血糖和糖尿。

(二) 低血糖

成人空腹血糖浓度低于 2.8 mmol/L 时被认为低血糖(hypoglycemia),可出现低血糖症,临床表现有交感神经过度兴奋症状如出汗、颤抖、心悸(心率加快)、面色苍白、肢凉等以及神经症状如头晕、视物不清、步态不稳,甚至出现幻觉、精神失常、昏迷、血压下降等。

胰岛素分泌过多或临床上使用胰岛素过量,升高血糖浓度的激素分泌不足,糖摄入不足(饥饿或节食过度),肝糖原分解减少,葡糖异生减少,组织耗能过多等均能导致低血糖症。

新生儿脑重量占体重的比例较大,且脑几乎完全依赖葡萄糖供能。出生前由母体血液中的葡萄糖提

供能量。出生后数小时内,由于肝中磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶含量很低,葡糖异生能力有限,早产儿葡糖异生能力更弱,肝中糖原贮存更少,因此容易出现低血糖,使脑功能受损,需及时补充糖类食物。

Summary

Starch in food, which is the main source of energy in human bodies, is hydrolyzed to glucose catalyzed by enzymes in saliva and in small intestine. After being absorbed into blood, glucose is transported into cells with the help of glucose transporters on the cell membrane.

The main glucose decomposition pathway for energy supply is glucose aerobic decomposition pathway, which consumes O_2 and generates CO_2 , H_2O and ATP (32 or 30 ATP molecules per glucose molecule) for cell utilization. In this pathway, glucose is first decomposed to pyruvate in cytoplasm, which enters mitochondria and is decarboxylated to acetyl-CoA, the substrate of the tricarboxylic acid cycle. Anaerobic decomposition pathway in which pyruvate from glucose degradation is reduced to lactic acid in cytoplasm, supplies ATP (2 ATP molecules per glucose molecule) for lack of oxygen. However anaerobic decomposition pathway is active in some kind of cells like red blood cells even if enough oxygen exists.

Glucogen, which is the storage form of glucose, can be synthesized from glucose in human tissues mainly in muscles and in liver. Liver glycogen could be broken down to glucose (glycogenolysis) to help to maintain a nearly constant blood glucose concentration.

Glucose can be synthesized from noncarbohydrate precursors, such as pyruvate and lactic acid, in the process of gluconeogenesis, which also helps to maintain the constant blood glucose concentration when liver glycogen has been exhausted.

Glycolysis and gluconeogenesis are coordinated so that within a cell one pathway can be relatively inactive while the other is highly active.

The interconversion of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate is stringently controlled. AMP stimulates phosphofructokinase 1, whereas ATP and citrate inhibit it. Fructose-1,6-bisphosphatase, on the other hand, is inhibited by AMP. Fructose-2,6-bisphosphate strongly stimulates phosphofructokinase 1 and inhibits fructose-1,6-bisphosphatase in liver.

Phosphoenolpyruvate and pyruvate is also precisely regulated. High levels of ATP and alanine inhibit pyruvate kinase. Conversely, pyruvate carboxylase is activated by acetyl-CoA and ADP. Likewise, ADP inhibits phosphoenolpyruvate carboxykinase.

Glycogenesis and glycogenolysis are also highly regulated. cAMP activates protein kinase A, the latter further catalyzes the phosphorylation of phosphorylase b kinase to yield an active form. The active phosphorylase b kinase then catalyzes the phosphorylation of glycogen phosphorylase b to generate the active form of phosphorylase a. At the same time, the activated protein kinase phosphorylates glycogen synthase to an inactive state. Other second messengers, such as Ca^{2+} and diacylglycerol, also involve in the regulations. Under the catalysis of phosphoprotein phosphatase, both glycogen phosphorylase and glycogen synthase can be dephosphorylated to operate the opposite effects.

The pentose phosphate pathway is an alternative route for the metabolism of glucose. It does not generate ATP but has two major functions, that is, the generation of NADPH for reductive reactions and the provision of ribose-5-phosphate for nucleotides and nucleic acid biosynthesis.

To maintain a relatively stable concentration of blood glucose (3.9 ~5.6 mmol/L), which is important for normal functions of brain and other tissues, insulin is the only hormone that can reduce

blood glucose concentration and glucagon opposes the actions of insulin mainly by regulation of key enzymes of glucose metabolism. Other hormones that can increase blood glucose concentration are epinephrine ,glucocorticoid ,growth hormone ,ACTH and thyroid hormone.

思 考 题

1. 葡萄糖有氧氧化过程包括哪几个阶段？
2. 简述三羧酸循环的要点及生理意义。
3. 1 分子葡萄糖完全氧化可生成 30 或 32 分子 ATP 供线粒体外利用，请说明之。
4. 为什么说 B 族维生素缺乏将影响葡萄糖的分解代谢？
5. 葡萄糖无氧分解与葡萄糖有氧氧化的区别点。糖酵解的概念及生理意义。
6. 人体对糖原的合成和分解是如何进行调节的？
7. 为什么说糖异生的过程基本上是糖酵解的逆过程？两者有何不同？
8. 磷酸戊糖途径的生物学意义是什么？
9. 简述血糖的来源和去路及其调节。
10. 肝是维持血糖浓度的主要器官，为什么？

(王学敏)

第七章 生物氧化

本章教学要求

- 生物氧化的概念、特点、酶类及二氧化碳的生成
- 氧化呼吸链的组成、各传递体的排列顺序
- 氧化磷酸化的概念、偶联部位、作用机制、调节及影响因素
- ATP 在能量代谢中的核心作用

糖、脂肪、蛋白质等营养物质在活细胞内彻底氧化生成 CO_2 和 H_2O ，释出能量的过程称生物氧化 (biological oxidation)。此过程需耗氧、排 CO_2 ，故又称细胞呼吸 (cellular respiration)。生物氧化主要在线粒体中进行。所释能量用于合成 ATP 和维持体温。线粒体外也进行氧化，但氧化释放的能量主要供非营养物质的生物转化 (详见第二十二章第二节) 使用，不生成 ATP。在线粒体内生成 ATP 的生物氧化过程可大体分为三个阶段：① 营养物质在线粒体外分解为其基本单位 (葡萄糖、脂肪酸、氨基酸等)，释能约为总能量 1% 以下，以热能散发。② 基本单位分解为其相关代谢中间产物，进入线粒体，转变为乙酰辅酶 A，释能约为总能量 1/3，部分合成 ATP。③ 乙酰辅酶 A 经三羧酸循环脱羧产生 CO_2 ，脱氢产生还原型辅酶 (NADH + H^+ 、 FADH_2) 进入氧化呼吸链，再经电子传递和将质子从线粒体基质泵到膜间隙，最终与氧结合成水，释出大量能量合成 ATP 和维持体温。本章主要介绍氧化呼吸链在传递电子、泵出质子的同时合成 ATP 的过程及其机制，以及 CO_2 的生成方式，最后简要介绍非线粒体氧化途径。

第一节 生物氧化的特点及其酶类

一、生物氧化的特点

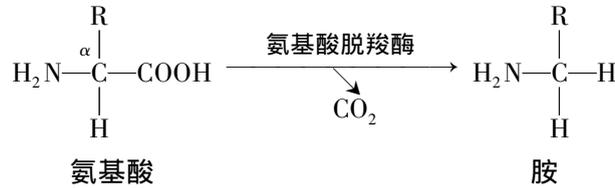
营养物质在体内外氧化的本质是相同的，方式均为加氧、脱氢、脱电子，其耗氧量、终产物 (CO_2 和水) 和释出能量的数值均相同。体外燃烧是有机物中的氢、碳直接与空气中的氧反应生成水及 CO_2 ，能量以光和热的形式骤然大量向环境散发。但生物氧化在体内进行，故有其特点：① 氧化在近中性、 37°C 、有水的温和环境中进行，为酶促反应过程。② CO_2 由脱羧产生，底物脱下的氢经氧化呼吸链逐步传递电子、质子从线粒体基质泵到膜间隙，最后质子与氧结合生成。③ 能量逐步释放，利用率高，其部分以 ATP 形式贮存、转移和利用，部分以热能形式维持体温。④ 氧化速率受生理功能需要、体内外环境变化的调控。

二、生物氧化中 CO_2 的生成

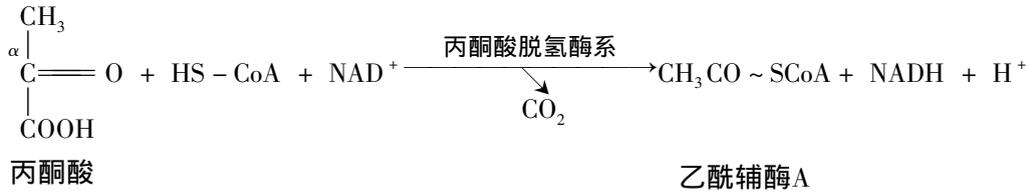
营养物质在生物氧化中产生许多有机酸中间产物，其羧基可脱下生成 CO_2 。按被脱羧基在有机酸中的位置及是否同时伴有脱氢，可将脱羧基作用分为：

(一) α -脱羧

1. α -单纯脱羧

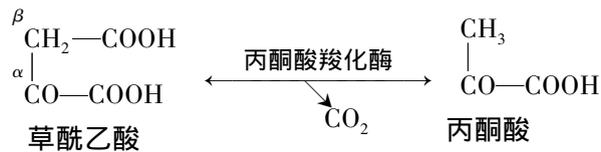


2. α -氧化脱羧

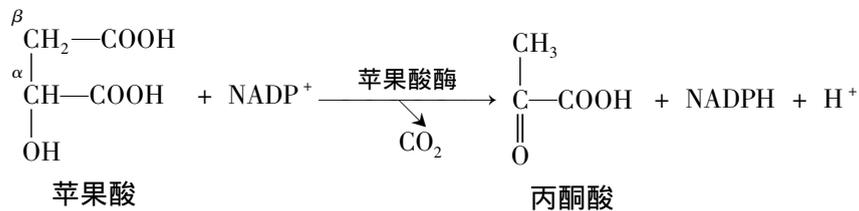


(二) β -脱羧

1. β -单纯脱羧



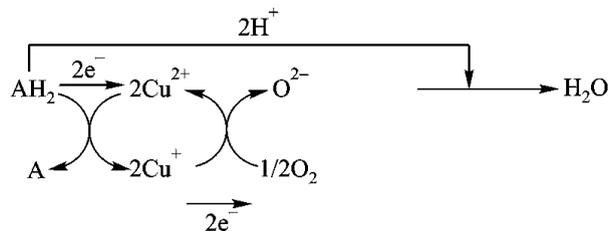
2. β -氧化脱羧



三、生物氧化的酶类

(一) 氧化酶

氧化酶(oxidase)主要存在于线粒体,催化底物脱氢,将其电子经辅基铜离子传递给氧,使之成为氧离子,再与质子结合生成水。如细胞色素氧化酶、抗坏血酸氧化酶等。



(二) 需氧脱氢酶

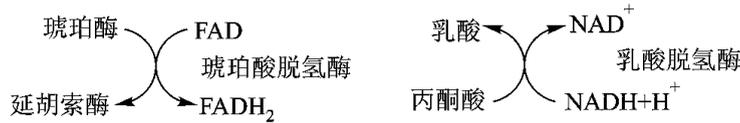
需氧脱氢酶(aerobic dehydrogenase)有时亦称“氧化酶”,主要存在于过氧化酶体,催化底物脱氢经其辅基 FMN 或 FAD 传递给氧分子生成 H_2O_2 ,如黄嘌呤氧化酶、单胺氧化酶等。



(三) 不需氧脱氢酶

不需氧脱氢酶(anaerobic dehydrogenase)是生物氧化最主要的酶类,催化底物脱氢脱电子,并将其交给

其辅酶或辅基 NAD^+ 或 NADP^+ 、 FMN 或 FAD 等,但不以氧作受氢体。此类酶若在线粒体内,则为氧化呼吸链供氢。否则,仅起受氢体作用。如线粒体内三羧酸循环中的各脱氢酶、胞质中乳酸脱氢酶等。

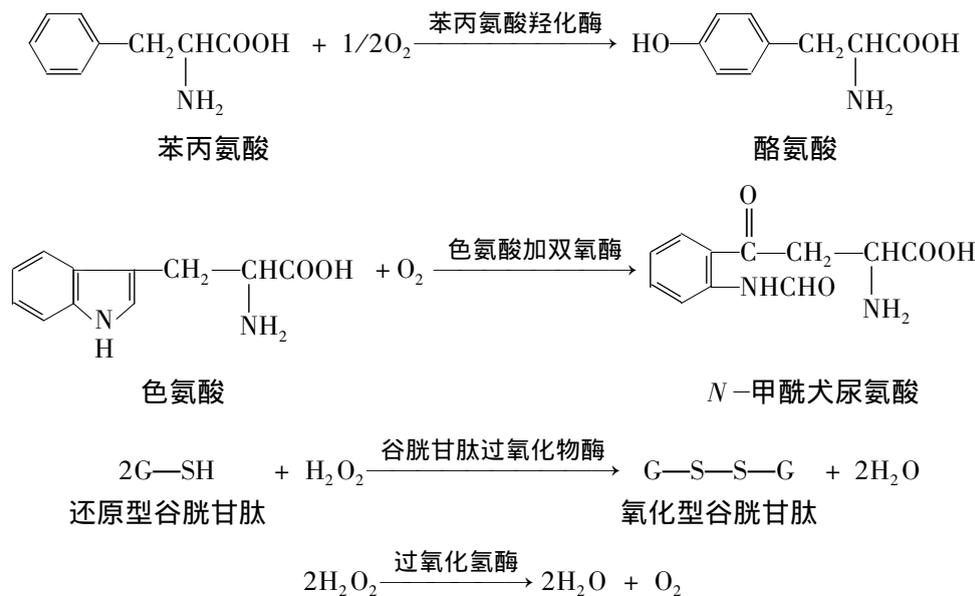


(四) 加氧酶

加氧酶 (oxygenase) 主要存在于微粒体,催化向底物加氧原子或氧分子的酶类,前者称单加氧酶(羟化酶、混合功能氧化酶),后者称为加双氧酶。其辅基均为铁卟啉。此类酶有苯丙氨酸羟化酶、色氨酸加双氧酶等。

(五) 氢过氧化物酶

氢过氧化物酶 (hydroperoxidase) 主要分布于过氧化物酶体,是催化有机过氧化物或过氧化氢还原的酶,前者为过氧化物酶 (peroxidase),后者为过氧化氢酶 (触酶, catalase, CAT)。其辅基均为铁卟啉。此类酶有谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶等。



第二节 生成高能化合物的生物氧化体系

一、线粒体内膜的转运作用

除红细胞外,人体所有细胞均含线粒体 (mitochondrion)。它是生物氧化最主要的场所,生命活动所需能量的 95% 来源于此,被喻为“动力工厂”。耗能多的组织细胞线粒体多、活性高。

线粒体由内、外两层膜构成(图 7-1)。外膜有由孔蛋白 (porin) 形成的膜通道,相对分子质量小于 10 000 的分子(如质子、 Pi 、 ATP 、 ADP)可穿过,通透性大。内外膜之间为膜间隙 (intermembrane space),为质子多的正电性空间。内膜包裹基质(为电子多的负电性空间,含三羧酸循环、脂酸 β -氧化、氨基酸分解及线粒体本身 DNA、RNA 合成等代谢过程的多酶体系)。内膜向基质折叠突起形成嵴,以增加其表面积,膜中含氧化呼吸链和 ATP 合酶。

内膜通透性很低,只允许相对分子质量小于 150 的分子通过,并且有几种特异的转运载体,使其对通过的物质有严格的选择性。如腺苷酸转运蛋白 (adenine nucleotide transporter, $\text{ATP} - \text{ADP}$ 转位酶, $\text{ATP} - \text{ADP}$ translocase) 按 1: 1 比例转运 ADP 入基质、 ATP 出基质(再穿出外膜到胞质供能)。 ATP 释能后变为 ADP ,再经此载体转运入基质。磷酸盐载体 (phosphate carrier) 转运无机磷酸入基质,与 ADP 一起参与

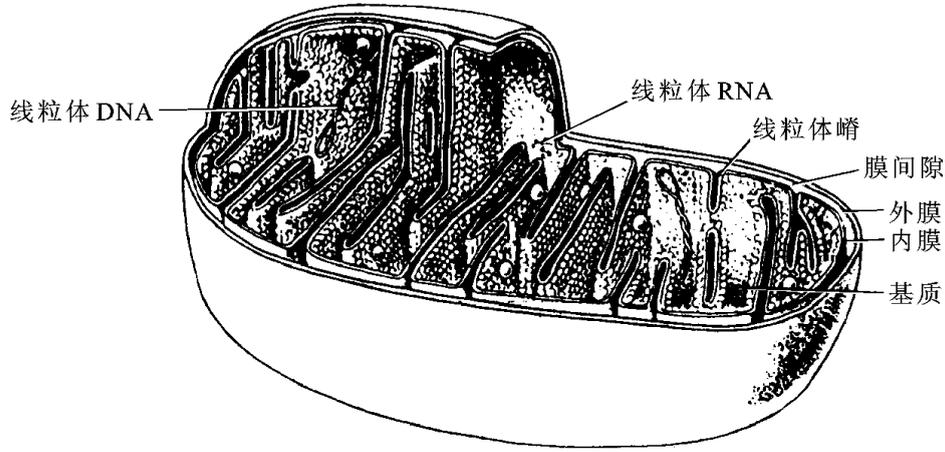


图 7-1 线粒体结构模式图

ATP 合成。此外,丙酮酸载体转运丙酮酸入基质进一步氧化。肉碱脂酰肉碱转位酶转运脂酰基入基质进行 β -氧化。肝细胞线粒体内膜的碱性氨基酸载体转运瓜氨酸出基质、鸟氨酸入基质参与尿素合成。三羧酸载体转运柠檬酸出基质、苹果酸和丙酮酸入基质参与柠檬酸-丙酮酸循环而促进软脂酸合成等。

在肝和心肌等细胞质中产生的 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 经内膜酸性氨基酸载体、 α -酮戊二酸载体协同转运作用(苹果酸-天冬氨酸穿梭作用, malate-aspartate shuttle)穿入基质(图 7-2),才能把氢传递给氧化呼吸链。而在脑、骨骼肌等细胞质中产生的 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 则需经 α -磷酸甘油穿梭(α -glycerophosphate shuttle)才能进入氧化呼吸链(图 7-3)。这两种不同途径进入线粒体基质的产物不同,前者是 $\text{NADH} + \text{H}^+$,而后者是 FADH_2 ,因此它们所携带的氢和电子经呼吸链与氧结合生成水时所产生的 ATP 数目也不相同。

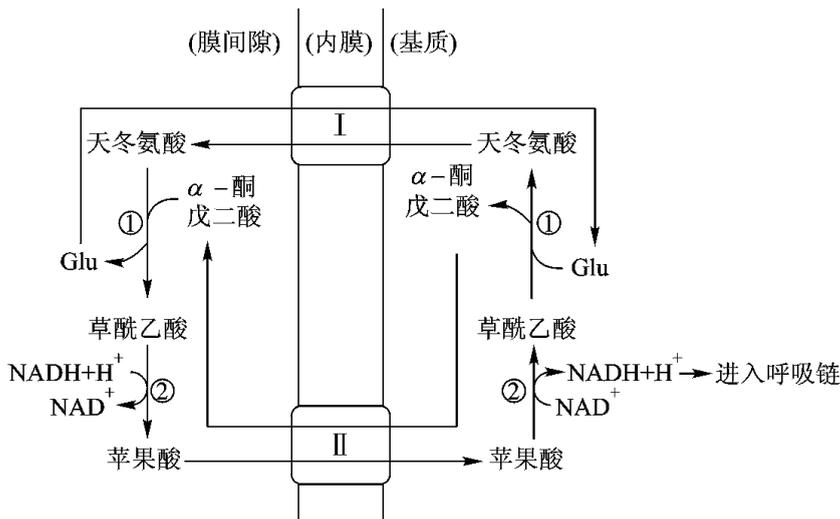
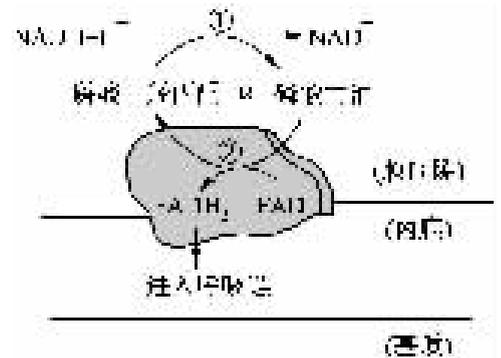


图 7-2 苹果酸-天冬氨酸穿梭作用

I 酸性氨基酸载体 II α -酮戊二酸载体

① 天冬氨酸氨基转移酶 ② 苹果酸脱氢酶 Glu: 谷氨酸

图 7-3 α -磷酸甘油穿梭① 胞质中 α -磷酸甘油脱氢酶② 嵌入内膜中的 α -磷酸甘油脱氢酶

二、氧化呼吸链

氧化呼吸链(oxidative respiratory chain)指在线粒体内膜中由一系列电子传递复合体(氧化还原酶)按一定顺序排列成的链锁性氧化还原体系,又称电子传递链。营养物质在线粒体基质中分解代谢所产生的、或经穿梭作用由胞液进入基质的还原型辅酶($\text{NADH} + \text{H}^+$ 、 FADH_2),皆进入氧化呼吸链传递电子、质子从线粒体基质泵至膜间隙,最终把电子传递给氧使之成为氧离子,后者再与质子结合生成水,在此过程中形成电化学梯度(H^+ 浓度梯度和跨膜电位差),为 ATP 合成提供能量。

(一) 氧化呼吸链的组成

1. 复合体 I

复合体 I (complex I, NADH-泛醌氧化还原酶, NADH-ubiquinone oxidoreductase) 是由 40 条以上肽链组成的跨内膜酶复合体, 相对分子质量 1 000 000, 呈“L”形状: 一个内膜中的卧臂 (horizontal arm) 和一个突入基质的竖臂 (vertical arm) (图 7-4)。竖臂含以黄素单核苷酸 (FMN) 为辅基的 NADH 脱氢酶 (黄素蛋白) 和铁硫簇 (iron-sulfur cluster, 为非血红素铁, 有 3 种, 在此处是 2Fe-2S, 图 7-6) 为辅基的铁硫蛋白 (iron-sulfur protein)。卧臂含以 4Fe-4S 为辅基的铁硫蛋白, 并与内膜中的泛醌/泛醇池 (Ubiquinone/Ubiquinol pool, Q/QH₂ 池) 相连。泛醌/泛醇是一种与蛋白质结合不紧密的脂溶性辅酶, 可在液晶态的内膜局部迅速扩散, 以便能与有关复合物相碰撞而传递电子。

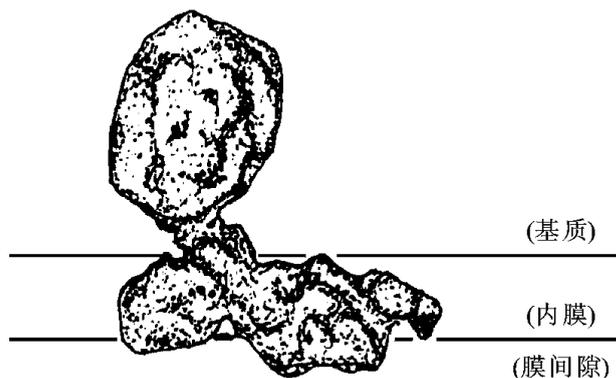


图 7-4 复合体 I 的结构竖臂突入基质, 卧臂含于内膜中

FMN 中的异咯嗪 (黄素) 可接受 1 个电子、1 个质子成半醌型 FMN (FMNH[•]), 再接受 1 个电子、1 个质子成 FMNH₂ (图 7-5)。

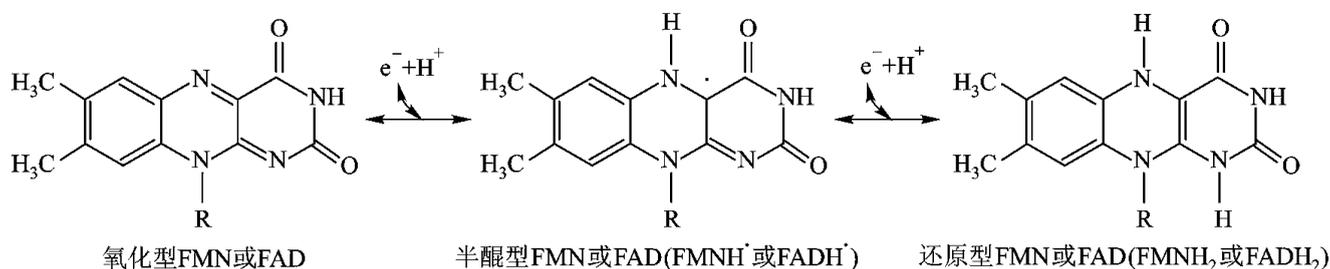


图 7-5 FMN 或 FAD 的氧化还原反应

R: FMN 为核糖醇-磷酸, FAD 为核糖醇-磷酸-磷酸-核糖-腺嘌呤

铁硫簇有 3 种类型: Fe-S, 2Fe-2S, 4Fe-4S, 均只能通过其中 1 个 Fe³⁺ + e⁻ ⇌ Fe²⁺ 的可逆反应传递 1 个电子, 故为单电子传递体。它们均通过半胱氨酸残基与肽链连接成铁硫蛋白 (图 7-6)。

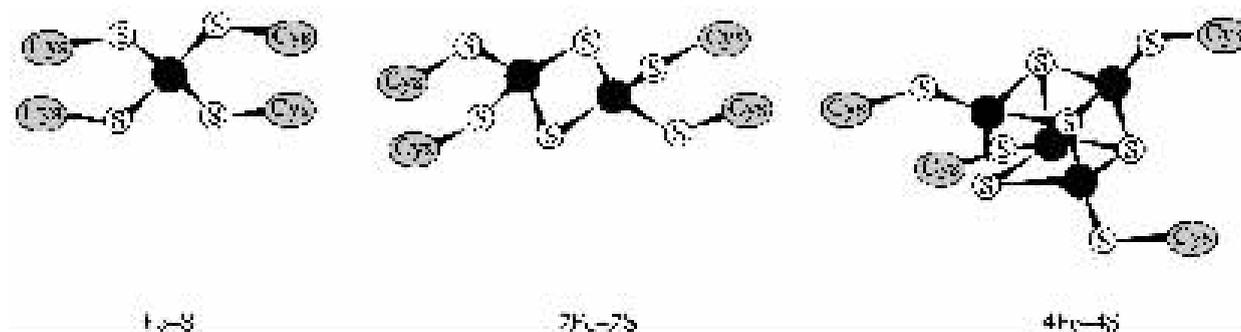


图 7-6 铁硫蛋白的结构示意图

● 铁离子 Cys 肽链中半胱氨酸

复合体 I 传递电子、泵出质子的详细机理还不清楚。推测是竖臂顶部的 NADH 脱氢酶催化 NADH + H⁺ 脱下 2 个氢原子, 被其辅基 FMN 先后接受, 生成 FMNH₂。因为 2Fe-2S 不能传递质子、只接受电子, 故 FMNH₂ 先后把 2 个电子交给 2 分子 2Fe-2S, 并把 2 个质子释入基质, 自身氧化成 FMN。2 分子各带一个电子的 2Fe-2S 在把电子传递给内膜中的 Q/QH₂ 池时, 1 分子 Q 又从基质中摄取 2 个质子, 使其还原成

QH₂。QH₂ 把此 2 个电子传递给卧臂中的 2 分子 4Fe-4S 时,把两个质子释出到膜间隙。此 2 电子在 2 分子 4Fe-4S 的传递中,再把基质中 2 个质子泵出到膜间隙(机制不清),最后把此 2 电子传到与卧臂碰撞连接的 Q/QH₂ 池,Q 经半醌型泛醌阴离子自由基(Q⁻)和半醌型泛醌自由基(QH[•]),先后接受此 2 电子、同时从基质捕获 2 个质子而还原为 QH₂(图 7-7)。

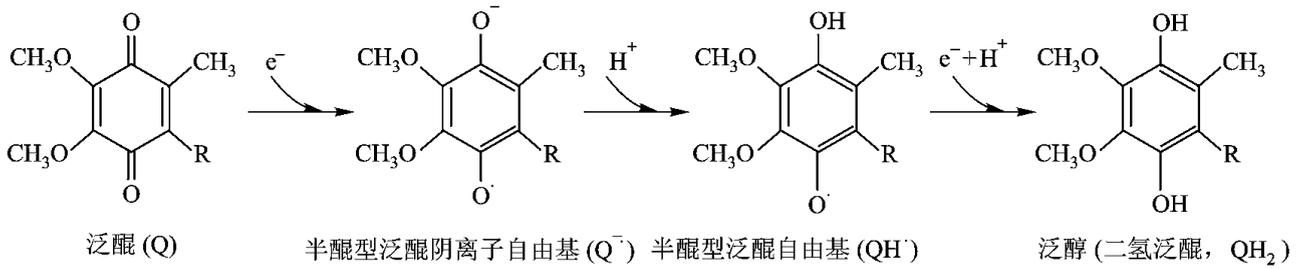


图 7-7 泛醌的氧化还原反应

R 脂溶性多异戊烯侧链,即—(CH₂—CH=C(CH₃)—CH₂)_nH, n 在人体为 10。可促进 Q/QH₂ 在内膜双层脂层中迅速扩散

上述复合体 I 传递电子、泵出质子的推测机制示意于图 7-8。从图 7-8 可以看出,复合体 I 在传递 NADH + H⁺ 的两个电子的过程中作为质子泵,共从基质向膜间隙泵出 4 个质子,并生成 1 分子 QH₂。

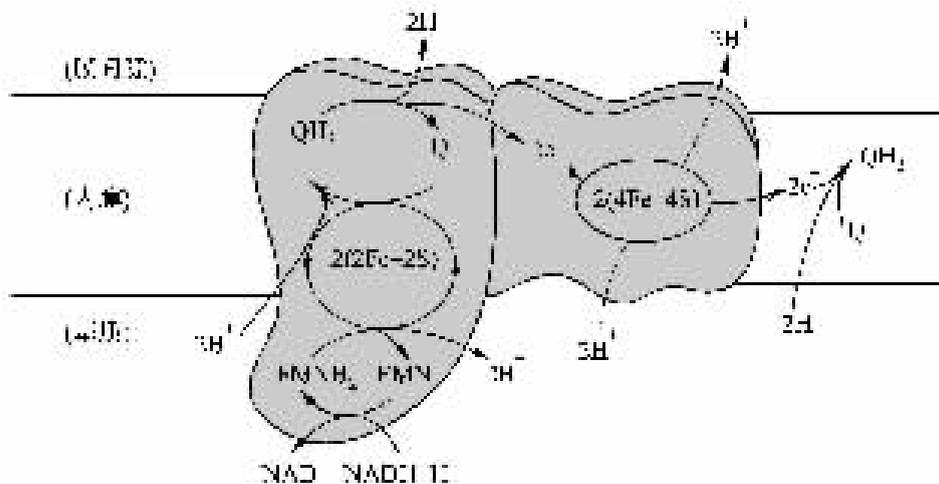


图 7-8 复合体 I 传递电子、泵出质子可能机制示意图

竖臂中的 Q、QH₂ 立体结构中在复合体 I 外的内膜中,平面图中与竖臂重叠。→ 不清楚的机制

2. 复合体 II

复合体 II(complex II)称为琥珀酸-泛醌氧化还原酶(succinate - ubiquinone oxidoreductase),为内膜相嵌蛋白,相对分子质量 140 000,由 4 个亚基组成,其中的疏水蛋白协助复合体 II 从基质面嵌入内膜。辅基为黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)及铁硫蛋白。复合体 II 直接催化琥珀酸脱氢,把 2 个氢先后交给 FAD,生成 FADH₂,后者再经铁硫蛋白传递电子,最后把 2 个质子交给 Q 生成 QH₂。

此外,前述胞质产生的 NADH + H⁺ 经 α-磷酸甘油穿梭转变 FADH₂,也经铁硫蛋白把 2 个氢交给 Q 生成 QH₂。但不同于复合体 II 的是,其催化酶(线粒体 α-磷酸甘油脱氢酶)是由膜间隙面嵌入内膜的。二者皆可进入呼吸链(图 7-9)均因其在传递电子过程中释能少,不能把质子泵出到膜间隙,因而不能成为质子泵。其作用仅为把 FADH₂ 的电子脱下、传递给 Q。

3. 复合体 III

复合体 III(complex III)又称泛醌-细胞色素氧化还原酶(ubiquinone - cytochrome oxidoreductase),是由 11 个亚基组成、相对分子质量为 250 000 的跨膜同二聚体。复合体 III 含三种细胞色素(Cytochrome, Cyt),

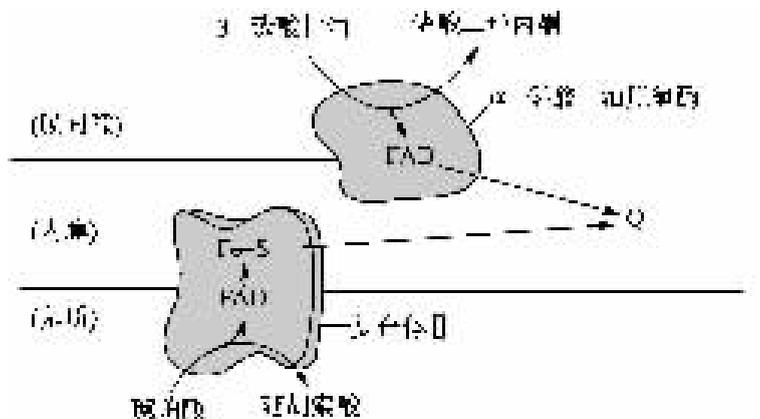
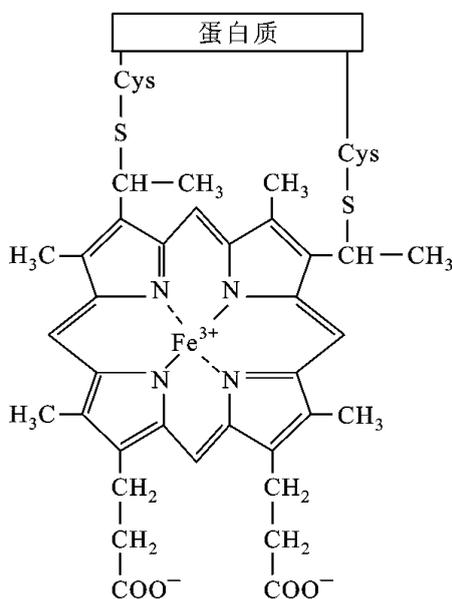
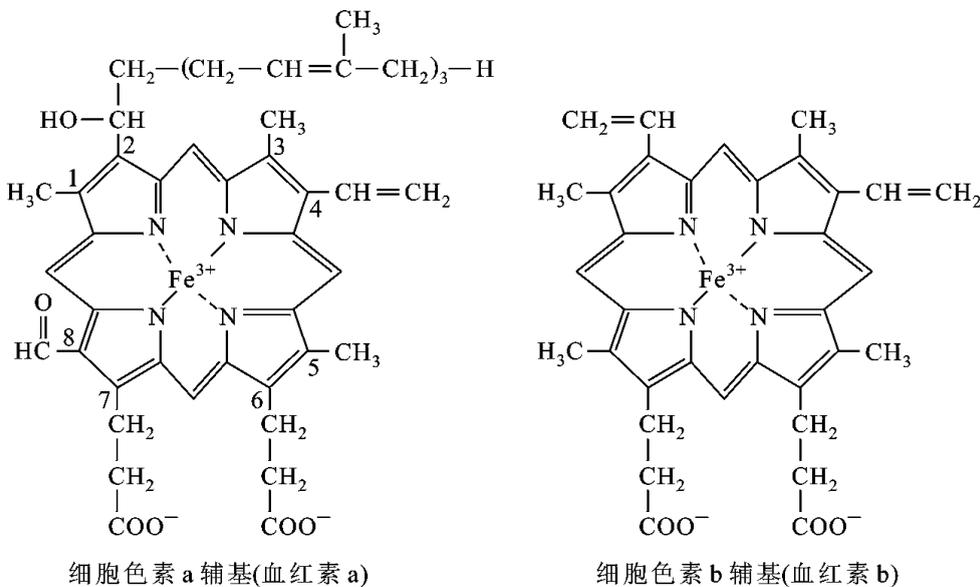


图 7-9 琥珀酸、 α -磷酸甘油脱下的氢经 FAD 进入氧化呼吸链

分别是 Cyt b₅₆₂ 其辅基为高还原电位血红素 b_H (标准还原电位 +0.100 V); Cyt b₅₆₆ 其辅基为低还原电位血红素 b_L (标准还原电位 + 0.050 V); Cyt c₁ 其辅基为血红素 c₁。此外,复合体 III 还含铁硫蛋白 (2Fe-2S) 和 Q、QH₂ 的结合位点。其中 Q₀ 位是 QH₂ 结合位点,在复合体 III 近膜间隙侧; Q₁ 位是 Q 结合位点,在复合体 III 近基质侧(图 7-11)。复合体 III 的作用是把 QH₂ 的 2 个电子传到 Cyt c,并泵出 4 个质子到膜间隙。



细胞色素 c 辅基(血红素 c)及其与蛋白质部分的连接

图 7-10 细胞色素辅基的结构

细胞色素是由 David Keilin 首先发现的含色素蛋白,按吸收光谱可分为 a、b、c 三类。其辅基血红素也相应为 a、b、c 三型(图 7-10)。各型均由分子中 $\text{Fe}^{3+} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ 的可逆反应传递电子。人们常把细胞色素最大吸收波长写于其右下角,如 b_{562} 、 b_{566} ;也可将亚类编号写于其右下角,如 c_1 、 a_3 。

复合体 III 传递电子的过程主要体现为 Q 循环(Q cycle)。Q 循环是 2 分子 QH_2 将 2 个电子传递到 Cyt c,另外 2 个电子传递给 Q,生成 1 分子 QH_2 和 1 分子 Q,并同时泵出 4 个质子到膜间隙的过程。在此过程中,首先结合于 Q_0 位的 QH_2 把 2 个电子传给 $2\text{Fe}-2\text{S}$ 后,其中 1 个电子进而经 Cyt c_1 传到 Cyt c;另 1 个电子则传给 Cyt b_L ,再经 Cyt b_H 传给结合在 Q_1 位的 Q 使之生成半醌型泛醌阴离子自由基(Q^-);同时把 2 个质子泵出到膜间隙。 QH_2 脱氢后离开 Q_0 位进入内膜中 Q/ QH_2 池。其次, Q/ QH_2 池中又一分子 QH_2 再次进入 Q_0 位,再经上述途径把 QH_2 的 2 个电子分别传给 Cyt c 和 Q_1 位的 Q^- ,使 Q^- 负电性增大,因而可从基质摄取 2 个质子形成 QH_2 ,随即脱离 Q_1 位进入内膜 Q/ QH_2 池。此过程又有 2 个质子被泵入膜间隙。这样,在内膜 Q/ QH_2 池和复合体 III 中 QH_2 、Q 形成循环。循环中先后 2 分子 QH_2 进入 Q_0 位被氧化,2 个电子传到 Cyt c,4 个质子泵出到膜间隙,而另外 2 个电子和从基质摄取的 2 个质子使 1 分子 Q 还原为 QH_2 ,故实际只氧化了 1 分子 QH_2 (图 7-11)。

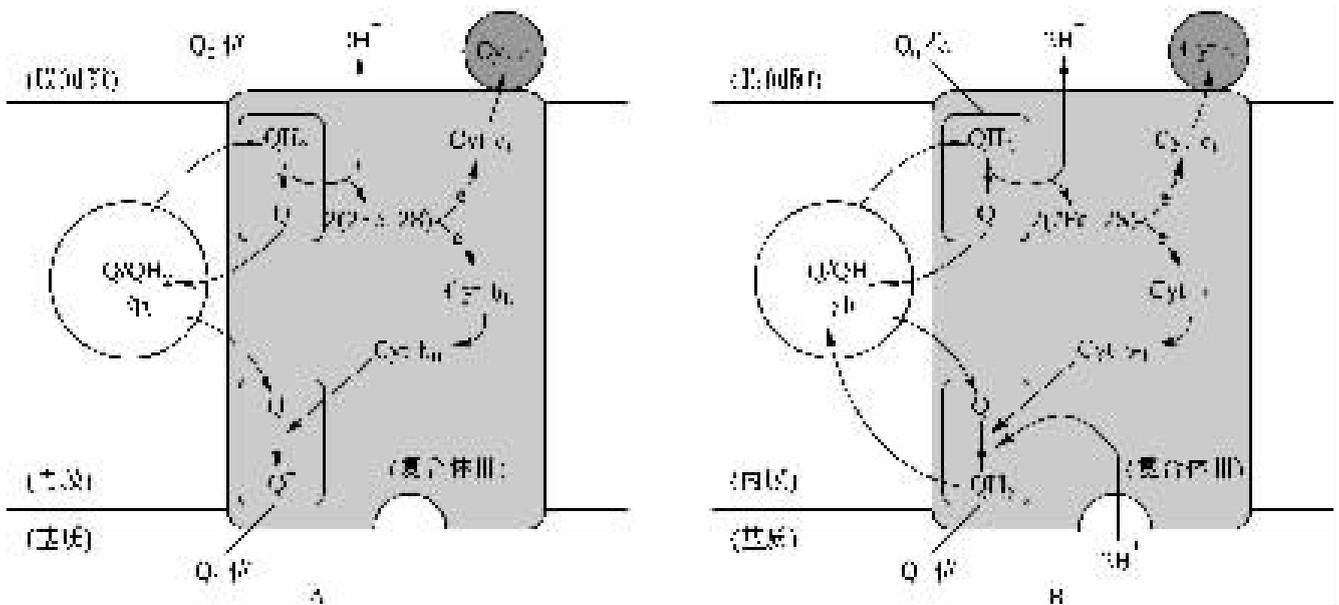


图 7-11 Q 循环过程示意图

A: QH_2 的 2 个质子被泵到膜间隙,1 个电子交给 Cyt c,另一个交给 Q 生成 Q^-

B: 另 1 分子 QH_2 重复 A 过程,但把第 2 个电子交给 Q^- ,使之在基质中摄取 2 个质子还原为 QH_2

Cyt c 是由一条肽链组成、相对分子质量 13 000、辅基为血红素 C 的亲水性球蛋白。为单电子传递体。靠静电引力结合在内膜外表面(膜间隙侧),可沿外表面在复合体 III、IV 间滑动,依其血红素中 $\text{Fe}^{3+} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$ 的可逆反应把电子从复合体 III 传递到复合体 IV。

4. 复合体 IV

复合体 IV (complex IV) 又称细胞色素 C 氧化酶 (Cytochrome c oxidase),是相对分子质量为 200 000 的 13 个亚基组成的跨膜蛋白复合体。其中,仅 3 个亚基对酶的功能是必需的。亚基 I 横跨内膜,含 Cyt a、Cyt a_3 (辅基分别为血红素 a、 a_3)和 Cu_B^{2+} ,后两者共同构成使 O_2 还原为 H_2O 的活性中心。亚基 II 含有 2 个通过 2 个半胱氨酸残基巯基相连接的铜原子(Cu_A^{2+})形成铜中心。亚基 III 的功能尚不清楚。复合体 IV 能把 4 个 Cyt c 传递来的 4 个电子传给 O_2 生成 2 分子水,并把 4 个质子由基质泵出到膜间隙。其基本过程是 4 分子 Cyt c 先后把 4 个电子经 Cu_A^{2+} 构成的铜中心传给 Cyt a,最后传到 Cyt a_3 和 Cu_B^{2+} 构成的活性中心。在此中心,氧被还原,并与从基质摄取的 4 个质子反应生成 2 分子水,同时把另外 4 个质子从基质泵出到膜间隙(图 7-12)。由于每分子 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 或 FMNH_2 经氧化呼吸链只能传来 2 个电子,还原 2

表 7-2 氧化呼吸链各电子传递体的标准氧化还原电位

氧化型	还原型	传递电子数	* $E^{\circ'}/V$
NAD^+	$NADH + H^+$	2	-0.32
FMN	$FMNH_2$	2	-0.30
FAD	$FADH_2$	2	-0.22
Q	QH_2	2	0.10
Cyt b(Fe^{3+})	Cyt b(Fe^{2+})	1	0.07
Cyt c_1 (Fe^{3+})	Cyt c_1 (Fe^{2+})	1	0.22
Cyt c(Fe^{3+})	Cyt c(Fe^{2+})	1	0.25
Cyt a(Fe^{3+})	Cyt a(Fe^{2+})	1	0.29
Cyt a_3 (Fe^{3+})	Cyt a_3 (Fe^{2+})	1	0.55
$1/2O_2 + 2H^+$	H_2O	2	0.82

表 7-2 中 $E^{\circ'}$ 表示在 $pH = 7.0$ 温度为 $25 \sim 30 \text{ }^{\circ}C$, 电子传递体浓度为 1 mol/L 时 , 测得的标准氧化还原电位(伏特, V)。因为电位低者易丢失电子 , 高者易接受电子 , 电子总是由 $E^{\circ'}$ 负电性较高(低 $E^{\circ'}$) 的氧化还原对向正电性较高(高 $E^{\circ'}$) 的氧化还原对进行传递。

从图 7-13 可知 , 氧化呼吸链可分成 2 个途径 : 由 $NADH + H^+$ 开始到 H_2O 生成的氧化呼吸链称 $NADH$ 氧化呼吸链 , 在糖、脂肪及氨基酸代谢中 , 凡脱氢酶的辅酶为 NAD^+ 、或经有关辅酶或辅基将氢传递给 NAD^+ (如丙酮酸、 α -酮戊二酸等脱下的氢经硫辛酸、 FAD 传递给 NAD^+ 等) 而生成 $NADH + H^+$ 者 , 以及胞质的 $NADH + H^+$ 经苹果酸-天冬氨酸穿梭进入线粒体者均进入此呼吸链。此外 , 把底物脱下的氢直接(如琥珀酸、线粒体内 α -磷酸甘油) 或间接交给 FAD 而生成 $FADH_2$, 再经 Q/QH_2 池切入复合体 III , 而最终生成 H_2O 的氧化呼吸链 , 称琥珀酸氧化呼吸链或 $FADH_2$ 氧化呼吸链。

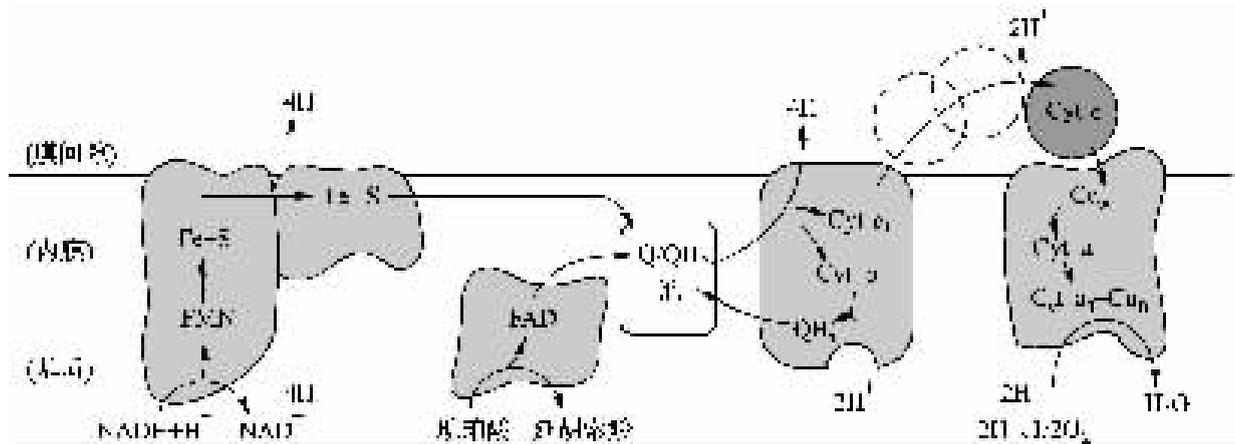


图 7-13 氧化呼吸链成员在呼吸链中的排列顺序

三、氧化磷酸化

营养物质脱氢生成的 $NADH + H^+$ 或 $FADH_2$, 经氧化呼吸链传递电子、泵出质子形成质子梯度(即 H^+ 梯度和跨膜电位差) 而蕴藏的电化学势能 , 被 ADP 利用、磷酸化生成 ATP 的过程称氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)。实质上是将氧化呼吸链氧化释能和 ADP 磷酸化储能偶联进行的过程 , 故也称为偶联磷酸化(coupling phosphorylation)。尽管在细胞内也存在一种可直接将代谢物分子中的能量转移至 ADP (或 GDP) , 生成 ATP (或 GTP) 的底物水平磷酸化(见第六章第二节) , 但体内生成 ATP 的最主要方式是氧化磷

酸化。

(一) 氧化磷酸化的偶联部位

氧化呼吸链中的偶联部位是三个质子泵,即复合体 I、III 和 IV。因其均能将基质中的质子泵出到膜间隙,形成质子梯度和电化学势能,并用此势能合成 ATP。人们传统的用 P/O 比值来测量呼吸链传递 2 个电子到氧生成水时所形成 ATP 的数量。即在氧化呼吸链中,每消耗 1 mol 氧原子时所消耗无机磷的 mol 原子数,并取整数来表示。如将 NADH 氧化呼吸链的 P/O 比值定为 3,将琥珀酸氧化呼吸链的 P/O 比值定为 2,以代表相应的 ATP 生成数。实际上,根据近期的实验和电化学计算,合成 1 个 ATP 分子需要消耗 4 个质子的跨膜势能,即氧化呼吸链平均每泵出 4 个 H^+ 才能提供 1 分子可被生命活动利用的 ATP。NADH 氧化呼吸链每传递 2 个电子给氧生成水,共泵出 10 个质子, P/O 比值应为 2.5,琥珀酸氧化呼吸链共泵出 6 个质子, P/O 比值应为 1.5。也就是说,1 mol NADH 经过 NADH 氧化呼吸链平均可生成 2.5 mol ATP,而 1 mol $FADH_2$ 经琥珀酸氧化呼吸链平均可生成 1.5 mol ATP。

(二) 氧化磷酸化的作用机制

质子梯度蕴藏的电化学势能转换给 ADP 和 P_i 生成 ATP 的机制,与线粒体内膜 ATP 合酶(ATP synthase)的结构、功能密切相关,它是氧化与磷酸化偶联的结构基础。

1. 线粒体氧化磷酸化的结构基础

ATP 合酶也称为复合体 V,包含 2 个结构域 F_0 和 F_1 (F 为 Coupling factor 缩写)。 F_1 由五种亲水性亚基组成(α_3 、 β_3 、 γ 、 δ 、 ϵ),其中 α_3 、 β_3 相间排布成有中央孔隙的六面体头部, δ 与头部 1 个 β 相连, γ 和 ϵ 组成连接头部与 F_0 的颈部。 γ 为细长形 α 螺旋,深入头部的中央孔隙中并可在其中转动, ϵ 连接 γ 与 F_0 。颈部还有相对分子质量为 18 000 的寡霉素敏感蛋白(oligomycin sensitive conferring protein, OSCP),与寡霉素结合后可抑制 F_1 活性。 F_0 又称基底部,具脂溶性,镶嵌于内膜中,由三种疏水性亚基组成($a_b_2c_{9-12}$)。亚基 c 是由 2 个 α 螺旋形成发夹样构象的单肽链亚基,第 2 个螺旋中央第 61 位为天冬氨酸(Asp61) 9~12 个 C 亚基装配成对称的 c 环,跨越内膜,其基质侧连接 F_1 颈部的 ϵ 。a 亚基固定在 c 环外部,具有两个互不相通的半截质子通道:一个开口于基质,称为基质半通道(matrix half-channel);另一个开口于膜间隙,称为胞液半通道(cytosolic half-channel)。两个半通道正好分别与 c 环中相邻的两个 c 亚基相通。两个 b 亚基连接 a 亚基和 F_1 的 δ 亚基,以固定头部与 a 亚基皆不转动(图 7-14)。

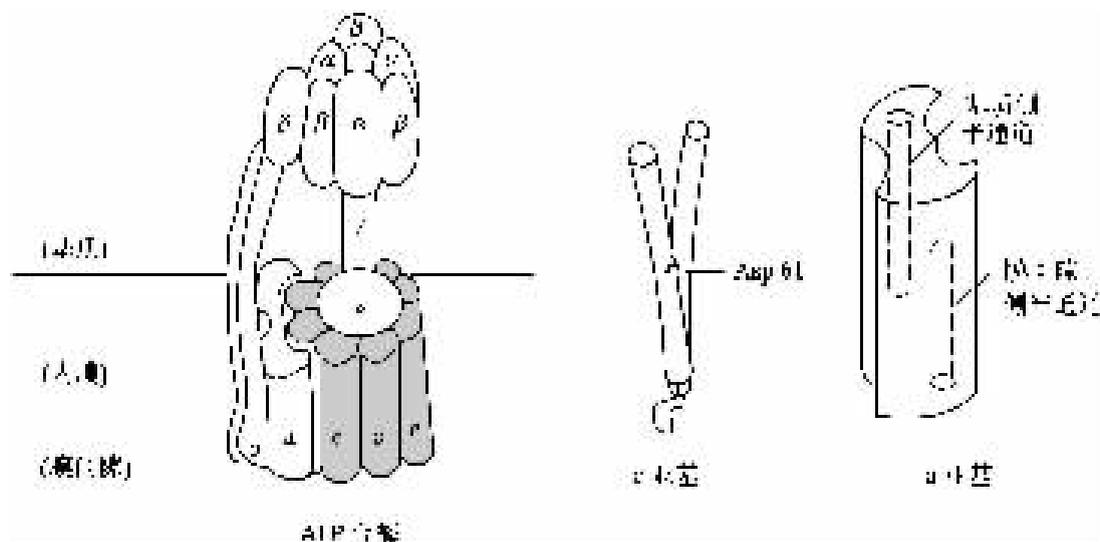


图 7-14 ATP 合酶及 a 亚基、C 亚基的结构

A - Asp61: α -螺旋肽链第 61 位天冬氨酸,用 A 表示

2. 化学渗透学说及结合变构机制

为阐明氧化磷酸化机制,1961 年 Peter Mitchell 提出化学渗透学说(chemiosmotic hypothesis),认为氧

化呼吸链传递电子过程偶联把质子由基质泵入膜间隙,使膜间隙质子浓度升高,成为正电性空间,基质的电子浓度高,成为负电性空间,形成跨膜质子梯度,经电化学计算,跨膜的电化学势能平均约为 $21.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 质子⁻¹,当质子回流到基质时释出能量驱动 ATP 合成。质子回流如何驱动 ATP 合成? 1989 年 Paul Boyer 提出“结合变构机制(binding-change mechanism)”,认为 β 亚基是 ATP 合酶催化部位,通过 β 亚基构象的转变,不断从基质中结合 $\text{ADP} + \text{P}_i$,催化后二者合成 ATP,并把 ATP 释入基质。Paul Boyer 认为,由于 γ 亚基在头部中央孔隙逆时针方向转动,使 β 亚基发生规律性构象变化:松弛(loose)型构象(L)有捕捉 ADP 和 P_i 能力;被转动来的 γ 亚基结合后变构改为紧密(tight)型构象(T),使结合的 $\text{ADP} + \text{P}_i$ 合成 ATP; γ 亚基离开后变构又转变为开放(open)型构象(O)释出 ATP;之后,又自动恢复为 L 型。如此,因 γ 亚基转动引起 β 亚基发生 $\text{L} \rightarrow \text{T} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{L} \dots$ 这样的规律性循环变构,使 ATP 不断合成(图 7-15)。

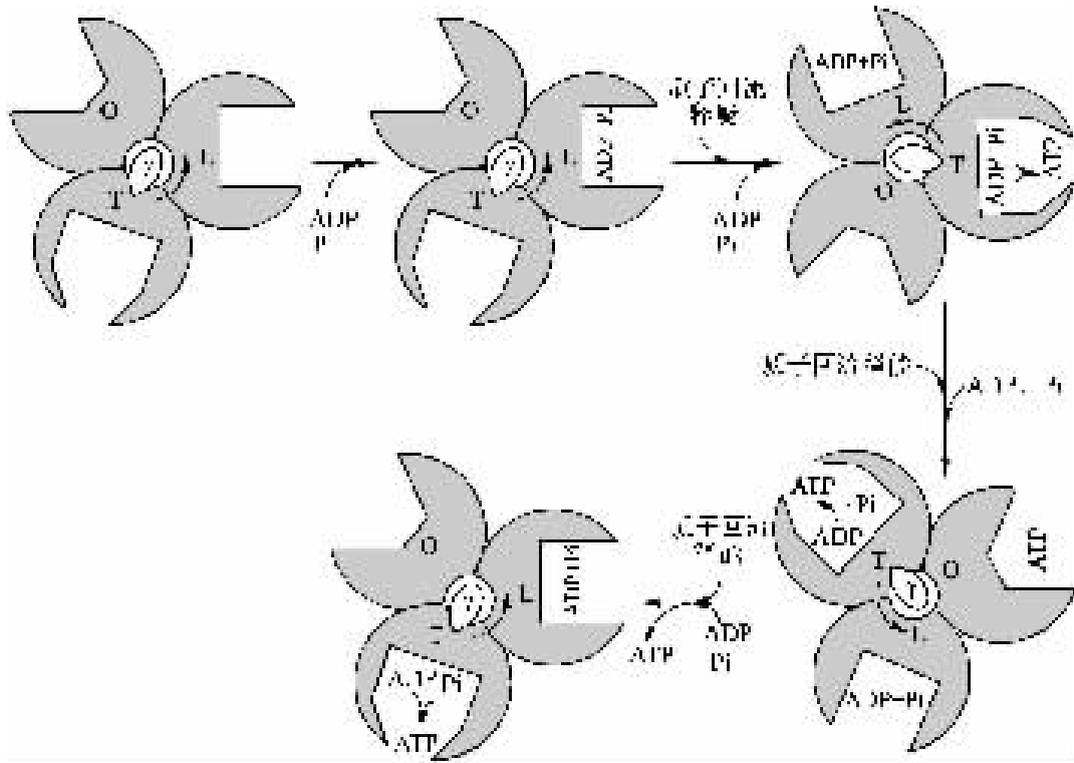


图 7-15 ATP 合成酶经“结合变构”机制合成 ATP 示意图

(为表示 3 个 β 亚基结合变构合成 ATP, α 亚基未绘出)

什么力量驱使 γ -亚基不断逆时针方向转动? Howard Berg 和 George Oster 提出 c 环中的 c 亚基接触内膜时,其中的 Asp61 为质子化的电中性的氨基酸(γ -羧基不解离),以便与双脂层内膜结合。 c 环中两个被 a 亚基包围的 c 亚基不直接与双脂层结合。 a 亚基的两个亲水性半通道分别与这两个相邻的 c 亚基相通。与 a 亚基结合的两个 c 亚基中的 Asp61 处于带负电的解离状态。这时 c 环不转动。由于膜间隙质子浓度比基质高 25 倍,故质子进入 a 亚基的胞液半通道,并与 c 亚基中的 Asp61 相结合,使之质子化成电中性的氨基酸,该 c 亚基也呈电中性,而此时与基质半通道相连的 c 亚基的 Asp61 仍带负电,为负电性亚基。当 c 亚基中 Asp61 被质子化成电中性时, c 环就能逆时针方向移动 1 个 c 亚基位置。这样, Asp61 质子化的 c 亚基离开 a 亚基。下一个 Asp61 带负电的 c 亚基被转动过来,与胞液侧半通道相接通,质子从膜间隙进入此通道,使此 c 亚基质子化为电中性。同时,由于线粒体基质的强大负电性,后续旋转进来并连于基质侧半通道的 c 亚基中电中性的 Asp61 释放质子入基质,并使 c 亚基带负电。这样, c 环再逆时针转动一个 c 亚基的位置(图 7-16)。如此反复进行,质子不断从膜间隙进入基质。又因 2 个 b 亚基通过结合 δ 亚基连接头部和 a 亚基,使之不能移动,因而 c 环的不断逆时针转动仅经 ϵ 亚基带动 γ 亚基在头部中央孔隙中不断逆时针转动,导致头部的 β 亚基不断进行 $\text{L} \rightarrow \text{T} \rightarrow \text{O} \rightarrow \text{L} \dots$ 循环式变构,不断合成 ATP。

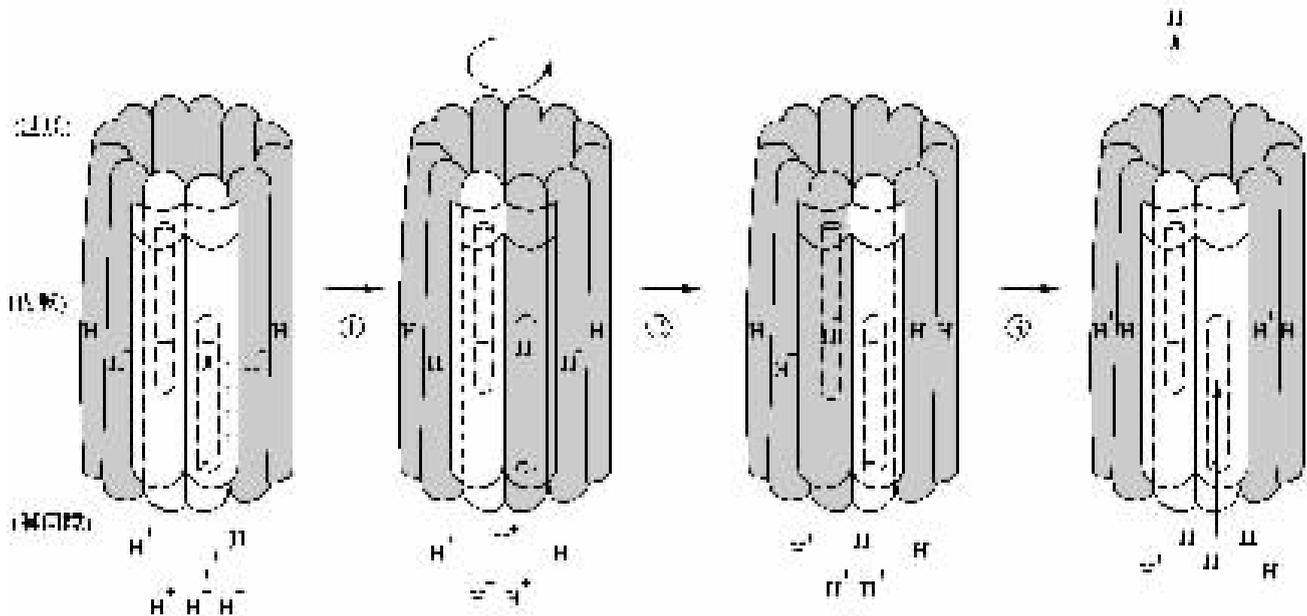


图 7-16 膜间隙质子通过 α 亚基两个半通道回到基质驱动 c 环逆时针方向转动机制示意图

- ① 质子进入胞液侧半通道。② c 亚基 Asp61 质子化, c 环逆时针转动一个 c 亚基的位置。③ 质子化的 c 亚基转动到基质侧半通道位置, 使 H^+ 经此半通道进入基质, Asp61 又去质子化。

四、氧化磷酸化的调节及影响因素

(一) 氧化磷酸化的调节

1. ADP/ATP 的调节作用

当机体耗能增加时, ATP 的利用增加, 即 ATP 转化为 ADP 的速率增加, ADP/ATP 比值增加, 刺激 $NADH + H^+$ 和 $FADH_2$ 经氧化呼吸链递电子、泵质子增快, ATP 合成增快, 氧化磷酸化增快。当然也刺激了营养物质经三羧酸循环氧化增快, $NADH + H^+$ 和 $FADH_2$ 的产生增快。相反, 机体耗能减少时, 产生 ADP 减少, ATP 则相对增多, ADP/ATP 比值下降, 产生与上面完全相反的刺激效应。这种由于 ATP/ADP 比值变化对氧化磷酸化的调节效应称呼吸控制 (respiratory control), 调控的关键物质是 ADP。它是机体调节氧化磷酸化的最主要物质。

2. 激素调节

甲状腺激素刺激 $Na^+, K^+ - ATP$ 酶(钠泵)合成增快, 钠泵运转耗能致 ATP 分解为 $ADP + P_i$ 增多, ADP/ATP 比值上升, 从而刺激氧化磷酸化增快, ATP 合成增加。此激素还诱导解偶联蛋白基因表达, 使营养物质氧化所释能量以热能散发的部分增加, 合成 ATP 相应减少, 故也刺激氧化磷酸化增快。

(二) 线粒体 DNA 突变的影响

线粒体 DNA (mtDNA) 是人和动物细胞中唯一核外 DNA, 为封闭的双链环状结构, 有其独立的复制和基因表达系统。人 mtDNA 约 16 569 bp, 可转录出 2 种 rRNA、22 种 tRNA、表达出 13 种参与构成复合体和 ATP 合酶部分亚基的蛋白质, 但大部分亚基结构蛋白仍为核内 DNA (nDNA) 编码, 复合体 II、基质及外膜蛋白则全由 nDNA 编码, 故 mtDNA 具半自主性。人 mtDNA 为母性遗传(卵子含几十万 mtDNA, 精子仅几百个), 故有家族性。mtDNA 是裸露的, 无损伤修复机制, 易受药物、毒物、射线、微波、缺氧、超氧阴离子自由基等因素破坏, 故突变率比 nDNA 高。突变多为点突变和大片段丢失。一般情况下, 若突变达 40% 以上则引起线粒体病, 但要害部位的单个碱基突变例外。以耗能高的肌肉、脑、神经组织为突变多发性组织器官。如 mtDNA 11 778 位碱基 $G \rightarrow A$ 、3 460 位 $G \rightarrow T$, 使复合体 I 第 4 亚基氨基酸中“精 \rightarrow 组”、“丙 \rightarrow 苏”, 此外, 还发现 4 160、15 257 位碱基也发生点突变。这 4 个位点碱基中的任何一个点突变, 均可导致 Leber 遗传性视神经病, 患者双侧神经萎缩伴其他神经、心血管、肌肉异常。若 mtDNA 出现 2.0 kb ~ 7.0

kb 的大片段丢失,使 tRNA 及 4 个复合体蛋白质合成不同程度缺失等,可引起 Kerans - Sayre 综合征,患者眼肌麻痹,合并色素性视网膜炎。mtDNA 突变还随年龄增长而呈渐进性积累,不断损伤氧化磷酸化而导致老年退行性病变,如帕金森氏病(Parkinson's 病,脑黑质区细胞线粒体复合体 I、tRNA 缺陷)。此种损伤积累也与细胞衰老有关。

(三) 某些化学试剂或药物对氧化磷酸化的影响

1. 呼吸链抑制剂

鱼藤酮(rotenone)、阿米妥(amytal)、粉蝶霉素 A(piericidin A)等结合复合体 I 中铁硫蛋白,阻断其电子向 Q 传递。抗霉素 A(antimycin A)与 Cyt b_H 结合,阻断复合体 III 的 Q 循环。氰化物(cyanide, CN⁻)、叠氮化物(azide, N₃⁻)、CO、H₂S 能抑制细胞色素 C 氧化酶,其中 CN⁻、N₃⁻ 结合血红素 a₃ 的 Fe³⁺,抑制其转变为 Fe²⁺,而 CO 则与其 Fe²⁺ 结合,抑制其转变为 Fe³⁺。这些抑制剂皆可阻断氧化呼吸链的电子传递,引起细胞呼吸窒息。CN⁻ 含在某些工业生产的蒸气或粉末中,苦杏仁、桃仁、白果(银杏)也有一定含量,若不慎进入体内,可引起氰化物中毒。室内的火炉若产生 CO,易致 CO 中毒。

2. 氧化磷酸化解偶联剂

2,4-二硝基酚(2,4-dinitrophenol, DNP)、双香豆素(dicumarol)、氟羰基氰苯腙(fluoro carbonyl cyanide phenylhydrazone, FCCP)、缬氨霉素(valinomycin)等皆为脂溶性、能可逆结合质子的物质。因膜间隙质子浓度 25 倍于基质,故可在膜间隙结合质子后穿过内膜到基质释出质子。哺乳动物和人体棕色脂肪组织细胞线粒体内膜含解偶联蛋白-1(uncoupling protein-1, UCP-1, 也称产热素, thermogenin, 为内膜中一种跨膜可控性质子通道蛋白,可被脂肪水解产生的游离脂肪酸活化),能将膜间隙质子转运回到基质。这些解偶联物质均能破坏质子梯度、降低电化学势能,虽可刺激呼吸链递电子、泵质子,却导致利用该梯度的电化学势能合成 ATP 的能力明显下降,而以热能散发。然而,UCP-1 在维持动物和人的体温中有重要作用。某些早产儿及个别新生儿 UCP-1 未发育成熟,遇冷难以维持正常体温,参与其硬肿症发病。

3. 氧化磷酸化抑制剂

寡霉素(oligomycin)可与 ATP 合酶中 F₁ 的 OSCP 结合而抑制此酶活性,二环己基羰二亚胺(dicyclohexyl Carbodiimide, DCCD)阻止质子经 F₀ 回流,也抑制 ATP 合酶活性。皆进而抑制氧化呼吸链递电子、泵质子功能。也说明氧化与磷酸化是紧密偶联的。

此外,苍术苷(atractyoside)、米酵霉酸(bongkratic acid)均能较强抑制内膜腺苷酸转运蛋白,前者结合于转运蛋白 ADP 结合位点,后者结合于其 ATP 结合位点,阻止 ATP 出、ADP 入线粒体,进而抑制氧化磷酸化。

五、ATP 在能量代谢中的核心作用

体内某些含高能硫酯键的化合物(乙酰辅酶 A、琥珀酰辅酶 A、脂酰辅酶 A 等)及某些含高能磷酸的化合物(1,3-二磷酸甘油酸、磷酸烯醇式丙酮酸等)均非能量直接供给、转运形式。各种三磷酸核苷(NTP)及磷酸肌酸中,ATP 是体内能量储存、转移和直接利用的最主要形式,成为体内能量转换的核心。而 ATP 循环(ATP cycle)则是这种转换的具体运作途径。ATP 循环是指体内 ATP 生成、储存、转移和利用所形成的循环(图 7-17)。尽管其他 NTP 也参与供能(UTP 为糖原合成、CTP 为磷脂合成、GTP 为蛋白质生物合成供能等),但体内能量主要由 ATP 提供。而且,在相关激酶催化下 ATP 可直接把其他 NDP 转变为 NTP。ATP 水解成 ADP + Pi,可释出 30.5 kJ·mol⁻¹(7.3 kcal·mol⁻¹)能量被机体各生命过程利用,为生物大分子合成、葡萄糖、氨基酸、无机离子等主动跨膜转运、肌肉收缩、细胞间信息传递、产生生物电及其他生命活动直接供能。生成的 ADP 再经氧化磷酸化又转变为 ATP。磷酸肌酸(creatine phosphate)仅在肌肉、脑等组织储存高能磷酸,机体需要时,可在肌酸激酶作用下,立即把高能磷酸交给 ADP 生成 ATP。70 kg 体重的人,体内 ATP 总量仅为 100 g,但静息状态下 24 h 需消耗 40 kg 的 ATP,运动或劳动时则消耗更多,故必须主要通过 ATP 循环不断产生 ATP,满足生命过程需要。

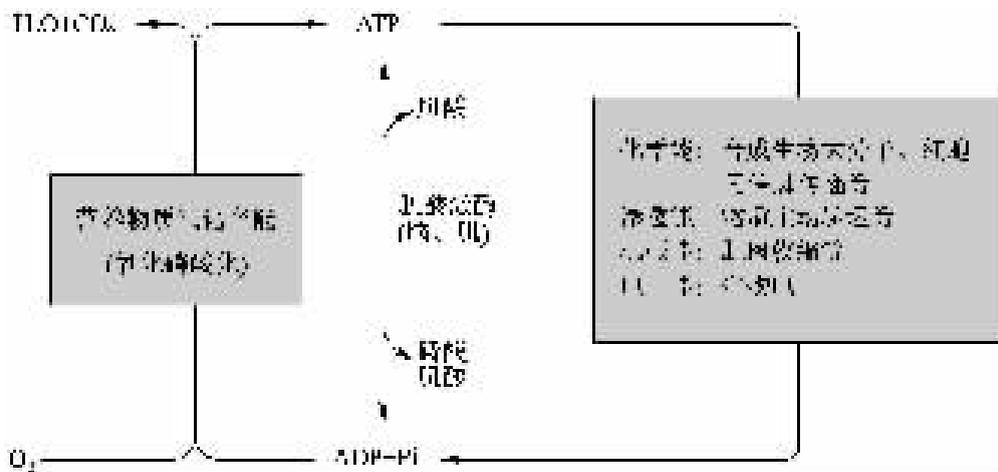


图 7-17 ATP 循环

第三节 非供能氧化途径

一、微粒体单加氧酶系

单加氧酶系(monooxygenases)催化向底物分子加氧分子中的 1 个氧原子而使底物被羟化,故也称羟化酶(hydroxylase)。同时,把另 1 个氧原子与 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 中的氢结合生成水,使 2 个氧原子均分给底物和氢,故又将单加氧酶称为混合功能氧化酶(mixed function oxidase)。单加氧酶催化的反应如下:



此酶系由 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 、 NADPH -细胞色素 P_{450} 还原酶(辅基 FAD 或 FMN)、细胞色素 P_{450} (Cyt P_{450})及铁氧还蛋白(辅基 $2\text{Fe} - 2\text{S}$, 即 Fe_2S_2)组成。 NADPH -细胞色素 P_{450} 还原酶催化 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 向 Cyt P_{450} 传递电子:先传电子给 FAD ,再给铁氧还蛋白,最后给 Cyt P_{450} 。此反应过程又称细胞色素 P_{450} 循环(图 7-18)。

单加氧酶系在肝、肾上腺含量最多,参与类固醇激素、胆汁酸、胆色素合成、维生素 D_3 羟化及生物转化

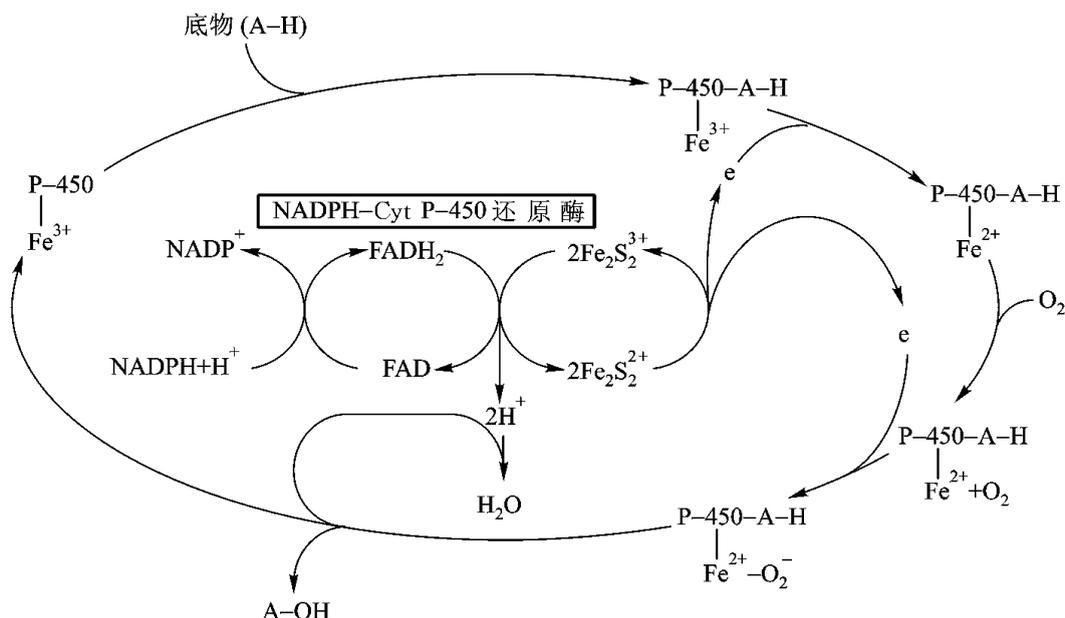


图 7-18 细胞色素 P_{450} 循环

作用等反应过程。

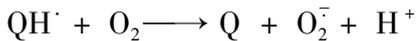
二、超氧阴离子自由基等活性氧的产生与消除

图 7-18 中 O_2^- 是超氧阴离子自由基($^-$ 表示带负电荷, \cdot 表示未成对的电子)。自由基(free radical)是指任何带未成对电子的原子、分子或基团。常见的除了 O_2^- 外,还有羟自由基($HO\cdot$)、烷自由基($RO\cdot$)、氢过氧化物自由基($HO_2\cdot$)、脂质氧自由基($LO\cdot$)、脂质过氧化自由基($LOO\cdot$)、氮氧自由基($NO\cdot$ 、 $NO_2\cdot$)、半醌类自由基等。由于自由基带有独占一个轨道、未与其他电子配对的未成对电子,易被磁场吸引(即顺磁性),从而有高度活性。活性氧(reactive oxygen species, ROS)是指由氧的不完全还原反应所产生的含氧化合物,主要包括 O_2^- 、 $HO\cdot$ 、 $HO_2\cdot$ 、烷烃过氧化物($ROOH$)及其均裂产物($RO\cdot$ 、 $ROO\cdot$)等氧自由基和单线态氧(singlet oxygen 1O_2 , 由基态氧接受了一定能量被激发而成,无不配对电子,不是自由基)、 H_2O_2 等。它们都有高度活性,反应性强,半衰期短,多引起过氧化反应等特点。ROS 中有些是自由基,其不配对电子位于氧者,称氧自由基(oxyradical),但有的(如 1O_2)则不是。因为 O_2^- 是体内 ROS 的主要来源,在 ROS 中所占比例最大,故以 O_2^- 为例介绍 ROS 在体内的产生、消除及其对机体的影响。

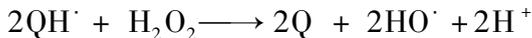
(一) 体内 O_2^- 等的产生

1. 微粒体、线粒体酶系催化 O_2^- 生成

微粒体单加氧酶系催化底物可产生 O_2^- (图 7-18)。线粒体氧化呼吸链产生的 Q^- 、 $FMNH\cdot$ 、 $FADH\cdot$ 皆为自由基。半醌型泛醌自由基($QH\cdot$)和半醌型泛醌阴离子自由基(Q^-)是线粒体内 O_2^- 的主要来源,它们均可通过电子泄漏(electron leakage)把一个电子泄漏给 O_2 ,使之变为 O_2^- 。



生理情况下电子泄漏量不多,但总是存在的。生成的少量 O_2^- 也被线粒体内的酶性消除作用等很快消除(详见后)。在线粒体衰老或疾病时, O_2^- 产生增多,而且 $QH\cdot$ 或 Q^- 还可把电子泄漏给 H_2O_2 而生成 $HO\cdot$ 。



2. 胞质酶系催化 O_2^- 生成

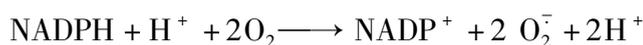
需氧脱氢酶(氨基酸氧化酶、醛氧化酶、黄嘌呤氧化酶等)催化产生 H_2O_2 过程中生成 O_2^- 。这是体内 O_2^- 的重要来源。在局部缺血、酒精中毒致生成大量乙醛等不良代谢情况时,黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶,并可催化下列反应:



黄嘌呤氧化酶广泛存在于肝、肾、小肠等组织细胞,上式反应生成的 O_2^- 可再被超氧化物歧化酶作用转变为 H_2O_2 (详见后)。

3. 细菌感染诱发 O_2^- 生成

炎症时细菌刺激巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞等吞噬细胞的磷酸戊糖途径,产生大量 $NADPH + H^+$,细菌同时活化位于这些细胞的质膜胞质面处于休止状态的 $NADPH$ 氧化酶,催化 $NADPH + H^+$ 与 O_2 生成 O_2^- :



(二) O_2^- 等对机体的影响

O_2^- 参与的羟化反应可促进生物转化,黄嘌呤氧化酶、氨基酸氧化酶等参与有关物质代谢,吞噬细胞中

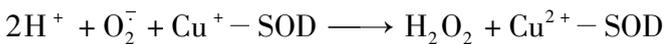
O_2^- 也有杀菌作用。但 O_2^- 大量产生或蓄积时对机体有害：① 膜磷脂中不饱和脂肪酸氧化或过氧化，造成各种生物膜损伤，含 SH 基蛋白和酶结构、功能被破坏。② O_2^- 与 DNA 结合使 DNA 交联、变性、突变，与肿瘤等发生有关。③ 使吞噬细胞衰竭、死亡，加重炎症。④ 氧化载脂蛋白及磷脂，致胆固醇转运障碍，引起动脉粥样硬化。⑤ 膜及胞质中过氧化脂质及其分解产生的丙二醛等低级醛类，与蛋白质、氨基酸、磷脂结合成的多聚体，称为脂褐素，难由细胞排出或降解而在细胞中堆积，使细胞功能下降。若在皮肤则呈老年斑。

(三) 机体对 O_2^- 等的消除

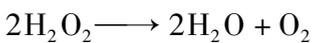
机体对 O_2^- 等能及时消除，以维持其与生成的平衡，能既发挥其有利作用，又防止其有害影响。

1. 酶性消除作用

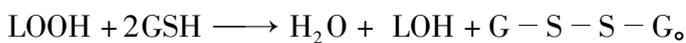
主要由超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶及几种过氧化物酶(Px)催化的反应予以消除。SOD 有 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} -SOD、 Mn^{3+} -SOD、 Fe^{3+} -SOD 三种，动物及人 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} -SOD 主要在胞质， Mn^{3+} -SOD 主要在线粒体。 Fe^{3+} -SOD 主要在微生物。 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} -SOD 催化的反应为：



反应生成的 H_2O_2 再被 CAT 消除。

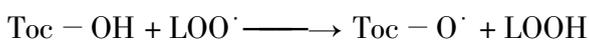
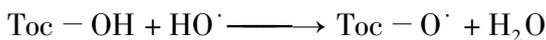


过氧化物酶主要是含硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se - glutathione peroxidase, Se - GSH - Px)，可消除 H_2O_2 和脂质过氧化物(LOOH)：

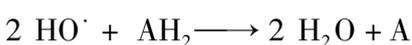


2. 小分子抗氧化物的消除作用

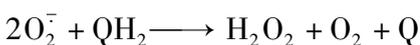
维生素 E(Toc - E)、维生素 C(ASA)和泛醌(Q)等小分子有机化合物也可消除 O_2^- 。Toc - OH 中的 -OH 是其苯骈吡喃环第 6 位碳上易被氧化的羟基，极易脱氢而由酚变为醌型维生素 E 自由基(生育酚自由基, Toc - O \cdot)：



还原型 ASA(AH_2)第 2、3 碳原子上的两个烯醇羟基中的氢很易脱去而成为氧化型(A)，却使 G - S - S - G 还原为 2GSH，也使 $HO\cdot$ 或 Toc - O \cdot 还原为 H_2O 或 Toc - OH。



Q 接受 1 个电子虽生成 Q^- ，但可再接受 H^+ 和氢原子生成 QH_2 (图 7-7)，后者可消除 O_2^- 及 $LOO\cdot$ ：



β -胡萝卜素有 9 个共轭双键，可捕捉自由基形成稳定结合物，故有消除自由基作用，其具体机制仍待探讨。

Summary

Biological oxidation is a process in which the nutrients are completely oxidized to CO_2 and water and release a large amount of energy. The hydrogen and electrons of cytoplasmic NADHs are transported into mitochondria by the glycerol phosphate shuttle in the form of $FADH_2$, or by the malate-aspartate shuttle as the form of NADH. The entry of ADP into the mitochondria matrix is coupled with

the exit of ATP by ATP-ADP translocase. The respiratory chain in the inner membrane is consisted of four complexes. Electrons and hydrogen from NADH are transferred to ubiquinone (Q) by complex I (NADH-Q oxidoreductase), which contains FMN and Fe-S protein with Fe-S cluster as its prosthetic group. The succinate dehydrogenase is a component of complex II (succinate-Q oxidoreductase), which donates electrons and hydrogen from FADH_2 to Q to form QH_2 . This highly mobile hydrophobic carrier transfers its electrons to complex III (Q-cytochrome c oxidoreductase), a complex that contains cytochrome b, c_1 and Fe-S protein. The complex reduces cytochrome c, a water-soluble peripheral membrane protein. Cytochrome c is a mobile carrier of electrons, and then transfers these electrons to complex IV (cytochrome c oxidase). This complex contains cytochrome a, a_3 and three copper ions. A heme iron ion and copper ion in the oxidase convert electrons to O_2 to form H_2O . Therefore, there are two respiratory chains: NADH-linked oxidative respiratory chain and succinate-linked oxidative respiratory chain. The flow of electrons through complex I, III, IV (also known as proton pumps) leads to the transfer of protons from the matrix to the intermembrane space and a membrane potential is formed. The flow of protons back to the matrix through ATP synthase drives the synthesis of ATP. This enzyme is a molecular motor. Proton influx provides the force for the rotation of this enzyme. Oxidative phosphorylation is the process in which ATP is produced as the result of the transfer of electrons from NADH or FADH_2 to O_2 . NADH and FADH_2 are oxidized only if ADP is simultaneously phosphorylated to ATP. In the NADH-linked respiratory chain, there are 2.5 ATP molecules produced on average, and in the succinate-linked respiratory chain, 1.5 ATP molecules are produced on average. Some compounds can influence the oxidation, phosphorylation, or both. Uncouplers such as 2,4-dinitrophenol can disrupt this coupling reaction. Uncoupling protein uncouples electron transport and ATP synthesis for the generation of heat.

Some oxidation can occur out of mitochondria, monooxygenase in microsomes catalyzes one oxygen atom from oxygen molecule to hydroxylate a substrate and another oxygen atom to react with NADPH to form water. This enzyme contains cytochrome P_{450} , NADPH-cytochrome P_{450} reductase, and iron-sulfur protein. Reactive oxygen species (including oxygen free radicals) can be scavenged by some enzymes such as superoxide dismutase, catalase, peroxidase, and some compounds such as vitamin C and vitamin E.

思 考 题

1. 何谓生物氧化？试比较营养物质在体内外氧化的异同。
2. 举例说明体内 CO_2 生成的方式。
3. 胞质产生的 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 怎样进入线粒体以进一步氧化？线粒体产生的 ATP 怎样转运到胞质为生命活动供能？
4. 何谓氧化呼吸链？其组成成员有哪些？试述氧化呼吸链中各传递体在传递电子、泵出质子中的具体作用。
5. 何谓氧化磷酸化？试述体内两种重要氧化呼吸链中各传递体的排列顺序及其中氧化磷酸化的偶联部位。
6. 简述化学渗透学说、ATP 合酶的结构、及此酶通过结合变构机制生成 ATP 的基本过程。
7. 哪些因素可调节或影响氧化磷酸化？简述其具体作用。
8. 简述体内超氧阴离子自由基的产生、消除及其对机体的影响。

第八章 脂质代谢

本章教学要求

- 脂肪动员、脂肪酸 β -氧化及酮体的生成与利用
- 脂肪酸合成的关键酶及其调节
- 磷脂的分子组成及主要功能
- 胆固醇的生物合成、转化及胆固醇的代谢调节
- 血浆脂蛋白的分类、组成及在脂类代谢中的作用

脂质是不溶于水而溶于有机溶剂的一类有机化合物,包括脂肪及类脂两大类。脂肪是三分子脂肪酸和一分子甘油形成的酯,也称三酰甘油或甘油三酯,是机体储存能量的主要形式。类脂主要由磷脂、糖脂、胆固醇及胆固醇酯等组成,是生物膜及脑神经组织的重要组成成分。

脂肪酸包括饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。其中机体自身不能合成的多不饱和脂肪酸必须由食物提供,这些多不饱和脂肪酸被称为营养必需脂肪酸。其中多不饱和花生四烯酸的衍生物前列腺素、血栓烷及白三烯均是人体重要生理活性物质。

磷脂包括甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂是由甘油构成的磷脂,主要有磷脂酰胆碱(卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)等。鞘磷脂是由鞘氨醇生成的磷脂,如神经鞘磷脂。此外,鞘氨醇与糖或寡糖形成的脂为鞘糖脂。鞘磷脂和鞘糖脂不仅是生物膜的重要组分,而且还具有参与细胞识别及信息传递的功能。胆固醇及胆固醇酯虽然不能氧化供能,但能转化成为胆汁酸、类固醇激素以及维生素 D_3 ,在调节机体物质代谢上具有重要作用。

血浆脂质不溶于水,与载脂蛋白结合后以脂蛋白形式存在,起着转运血浆脂质的重要作用。

第一节 脂质的消化、吸收和分布

一、脂质的消化与吸收

食物中脂质物质主要包括三酰甘油、磷脂、胆固醇及胆固醇酯,以三酰甘油为最多。脂质不溶于水,必须乳化后才能被消化吸收。摄食后,在食物脂类刺激下,胆汁及胰液分泌进入十二指肠。胆汁中的胆汁酸盐是较强的乳化剂,可使三酰甘油和胆固醇酯等疏水的脂质充分乳化并分散成细小的微团(micelles),从而增加消化酶与脂质接触的面积,有利于脂类的消化与吸收。胰液中含有辅脂酶(colipase)、胰脂酶(pancreatic lipase)、磷脂酶 A_2 (phospholipase A_2)及胆固醇酯酶(cholesterol esterase)等多种脂质物质水解酶。其中,辅脂酶是胰脂酶水解脂肪不可缺少的辅因子,它最初以酶原的形式,随胰液分泌进入十二指肠。在肠腔,辅脂酶原被胰蛋白酶从N端切下一个五肽分子而激活。虽然辅脂酶本身不具有脂肪酶活性,但分子内具有能与胰脂酶和三酰甘油结合的结构域,可以分别通过氢键及疏水键与它们同时结合。因此,辅脂酶具有将胰脂酶锚定于三酰甘油微团的水油界面上,促进三酰甘油水解生成一酰甘油和脂肪酸的作用。辅脂酶相对分子质量为10 000,1分子辅脂酶可以结合1分子胰脂酶。此外,磷脂酶 A_2 催化磷脂2位上的酯键水解,可以生成脂肪酸及溶血磷脂;胆固醇酯酶催化胆固醇酯水解生成游离胆固醇及脂肪酸。脂类

物质的消化产物主要包括一酰甘油、脂肪酸、胆固醇及溶血磷脂。这些产物经胆汁酸盐进一步乳化生成更小(直径约为 20 nm)的混合微团(mixed micelles)。这种微团极性更大,易于穿过小肠黏膜细胞表面的水屏障而被吸收。

脂质消化产物主要在十二指肠下端及空肠上段吸收。短链脂肪酸(2C~4C)及中链脂肪酸(6C~10C)构成的三酰甘油,在肠腔经胆汁酸盐乳化后,直接被吸收,吸收后在肠黏膜细胞内再被脂肪酶水解,最后直接以中、短链脂肪酸及甘油的形式,经门静脉进入血循环。而长链脂肪酸(12C~26C)及一酰甘油吸收入肠黏膜细胞后,在光面内质网脂酰 CoA 转移酶(acyl CoA transferase)的催化下,由 ATP 供能重新合成三酰甘油。后者再与粗面内质网合成的载脂蛋白(apolipoprotein, apo)B48、C、AI、AIV 等以及磷脂、胆固醇结合形成乳糜微粒,经淋巴进入血循环。

二、脂质在体内的分布

三酰甘油主要储存于脂肪组织,如大网膜、皮下及脏器周围的脂肪细胞内。脂肪约占体重的 14%~19%,女性稍多。脂肪含量受营养状况、机体活动以及遗传因素等的影响,变化很大,肥胖者脂肪可占体重的 30%,过度肥胖者可高达 60% 左右。

类脂(磷脂、胆固醇等)约占体重的 5%,分布于全身各组织,特别以脑神经组织为多。类脂尤其是磷脂和胆固醇是构成生物膜的重要成分,其中磷脂以双分子层形式构成生物膜的基本结构。类脂的含量恒定,不受营养状况和机体活动的影响。

此外,血浆中还有由磷脂、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油和载脂蛋白组成的血浆脂蛋白,以及与血浆清蛋白结合的游离脂肪酸。它们虽然含量很低,却是机体脂质转运的重要形式。

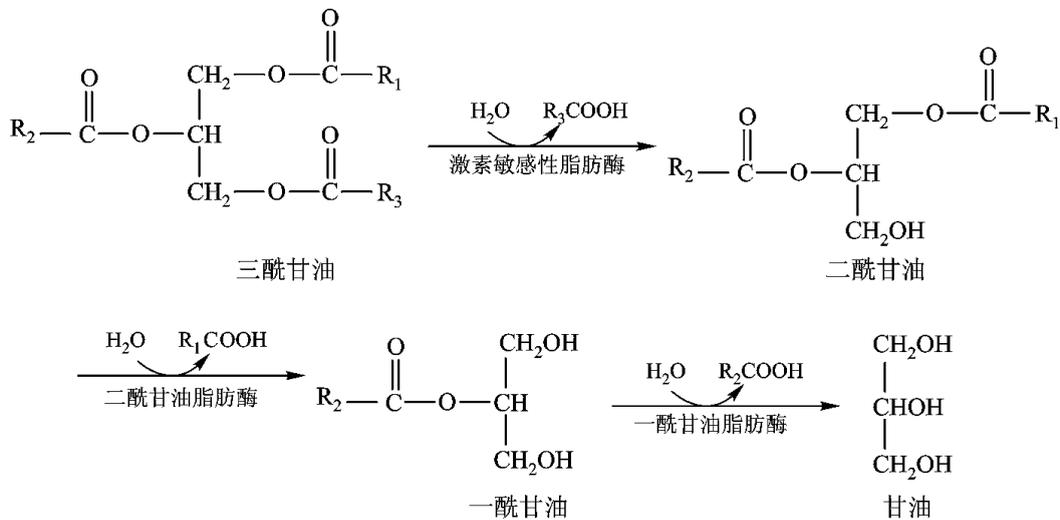
第二节 三酰甘油的代谢

一、三酰甘油的分解代谢

(一) 脂肪动员

贮存在脂肪组织中的脂肪被脂肪酶逐步水解后,以游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)和甘油(glycerol)的形式,通过血液循环运输到其他组织被氧化利用的过程称为脂肪动员(fat mobilization)。

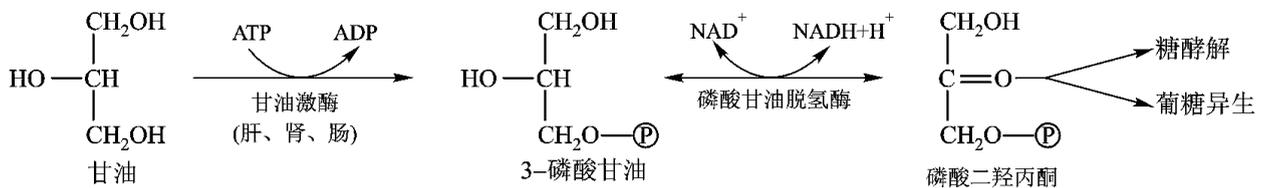
禁食、饥饿、肌肉锻炼耗能过多或交感神经兴奋时,肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素等分泌增加,作用于脂肪细胞膜上相应受体,激活腺苷酸环化酶,促进 cAMP 合成,进而再激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶,从而使脂肪细胞胞液内三酰甘油脂肪酶(triacylglycerol lipase)磷酸化而被活化。三酰甘油脂肪酶是脂肪动员的关键酶,催化三酰甘油水解生成二酰甘油和 1 分子脂肪酸。三酰甘油脂肪酶受多种激素的调控,称为激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)。促进脂肪动员的激素,如肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素以及促甲状腺素等称为脂解激素。与此相反,胰岛素抑制腺苷酸环化酶活化,抑制脂肪动员,称为抗脂解激素。三酰甘油在 HSL 作用下生成的二酰甘油又在二酰甘油脂肪酶和一酰甘油脂肪酶作用下,逐步水解成甘油和 2 分子脂肪酸。



脂解作用生成的甘油溶于水,可以直接由血液运输,而游离脂肪酸不溶于水,必须与血浆清蛋白结合才能运输。血浆清蛋白具有很强的结合游离脂肪酸的能力,每分子清蛋白可以结合 10 分子游离脂肪酸。

(二) 甘油的代谢

脂解作用产生的甘油由血液运输至肝、肾、肠等组织利用。其中肝甘油激酶(glycerokinase)活性很高,可催化甘油转变为 3-磷酸甘油,尔后在磷酸甘油脱氢酶(phosphoglycerol dehydrogenase)的作用下,生成磷酸二羟丙酮,再通过葡糖异生作用转变为糖或循糖酵解途径氧化分解。而脂肪细胞及骨骼肌细胞缺乏甘油激酶,故不能利用甘油。

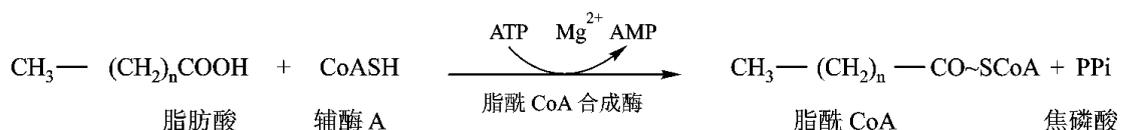


(三) 脂肪酸的分解代谢

游离脂肪酸与血浆清蛋白结合后由血液运送至全身各组织,主要被心、肝、骨骼肌等摄取利用。在 O_2 供给充足的条件下,脂肪酸在体内彻底氧化分解成 CO_2 和 H_2O 并释放大量的能量,以 ATP 形式供机体利用。脂肪酸是人及哺乳动物主要的能源物质,除脑组织外,大多数组织均能氧化脂肪酸,不过以肝及肌肉最活跃。

1. 脂肪酸的活化

与葡萄糖氧化相似,脂肪酸氧化前也必须活化,脂肪酸的活化在线粒体外的胞液中进行。内质网和线粒体外膜上含有的脂酰 CoA 合成酶(acyl-CoA synthetase)在 ATP、CoASH、 Mg^{2+} 存在的条件下,催化脂肪酸活化,生成脂酰 CoA。



脂肪酸活化后含有高能硫酯键,增加了脂肪酸的水溶性和代谢活性。脂肪酸活化反应由 ATP 供能,产生 AMP 和焦磷酸(PPi),故 1 分子脂肪酸活化,实际上消耗了 2 分子高能磷酸键。此外,反应产生的焦磷酸因立即被细胞内焦磷酸酶水解,从而阻止了逆向反应的进行。

2. 脂酰基向线粒体内转移

脂肪酸的活化在胞液中进行,但催化脂肪酸氧化的酶系却存在于线粒体基质内,因此活化的脂酰 CoA 必须进入线粒体内才能氧化分解。实验证明,长链脂酰 CoA 只有其分子中的 CoA 与肉碱(β -羟- γ -三甲氨基丁酸,carnitine)交换,以脂酰肉碱(acyl carnitine)的形式才能透过线粒体内膜(图 8-1)。

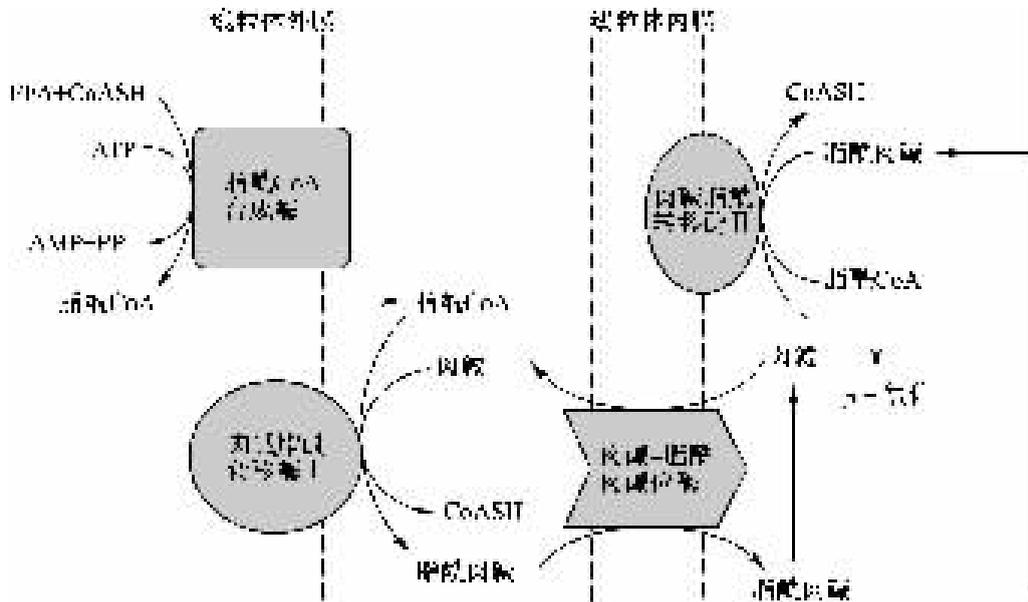


图 8-1 长链脂酰 CoA 进入线粒体的机制

线粒体外膜存在肉碱脂酰转移酶 I (carnitine acyl transferase I), 它能催化长链脂酰 CoA 与肉碱合成脂酰肉碱。后者可在线粒体内膜的肉碱-脂酰肉碱转位酶 (carnitine-acyl carnitine translocase) 的作用下, 通过内膜进入线粒体基质, 然后在位于线粒体内膜内侧面的肉碱脂酰转移酶 II 的催化下与 CoASH 作用, 重新生成脂酰 CoA。脂酰 CoA 即可在线粒体基质中 β -氧化酶系的作用下进行 β -氧化 (图 8-2)。而释出的肉碱又被转位酶转运出线粒体内膜, 反复利用。长链脂酰 CoA 向线粒体内转运的过程中, 肉碱-脂酰肉碱转位酶在转运 1 分子脂酰肉碱进入线粒体基质的同时, 又将 1 分子肉碱转运出线粒体内膜外, 因此它实际上是线粒体内膜上转运肉碱及脂酰肉碱的载体。

脂酰 CoA 进入线粒体是脂肪酸 β -氧化的限速步骤, 肉碱脂酰转移酶 I 是脂肪酸 β -氧化的限速酶。在饥饿、高脂低糖膳食或患糖尿病的状况下, 机体主要靠脂肪酸氧化供能, 肉碱脂酰转移酶 I 活性增加。相反, 高糖低脂膳食时, 肉碱脂酰转移酶 I 活性受抑制, 脂肪酸氧化减少, 合成增加。肉碱脂酰转移酶缺乏的重要特征是运动时肌无力。由于中等长度的脂肪酸 (8C ~ 10C) 进入线粒体无需肉碱的协助, 所以此类病人可以正常氧化中链脂肪酸。

3. 脂肪酸的 β -氧化

1904 年, Franz Knoop 利用 ω -苯基脂肪酸喂饲动物, 在检查尿中的代谢产物时发现: 不论碳链长短, 凡是奇数碳原子的 ω -苯基脂肪酸其尿中产生苯甲酸的衍生物, 而偶数碳原子的脂肪酸其尿中则产生苯乙酸的衍生物。他由此推断, 脂肪酸是在 β -碳原子上发生氧化而被降解。后来采用酶学及同位素示踪等技术, 证实 Knoop 的设想是正确的, 并在上个世纪五十年代阐明了脂肪酸 β -氧化的全部过程。

脂酰 CoA 在线粒体基质中脂肪酸 β -氧化多酶体系的催化下, 从脂酰基的 β -碳原子开始, 进行脱氢、加水、再脱氢及硫解四步连续反应, 脂酰基 α 与 β 碳原子之间的共价键断裂, 生成 1 分子乙酰 CoA 以及 1 分子比原来少 2 个碳原子的脂酰 CoA (图 8-2)。

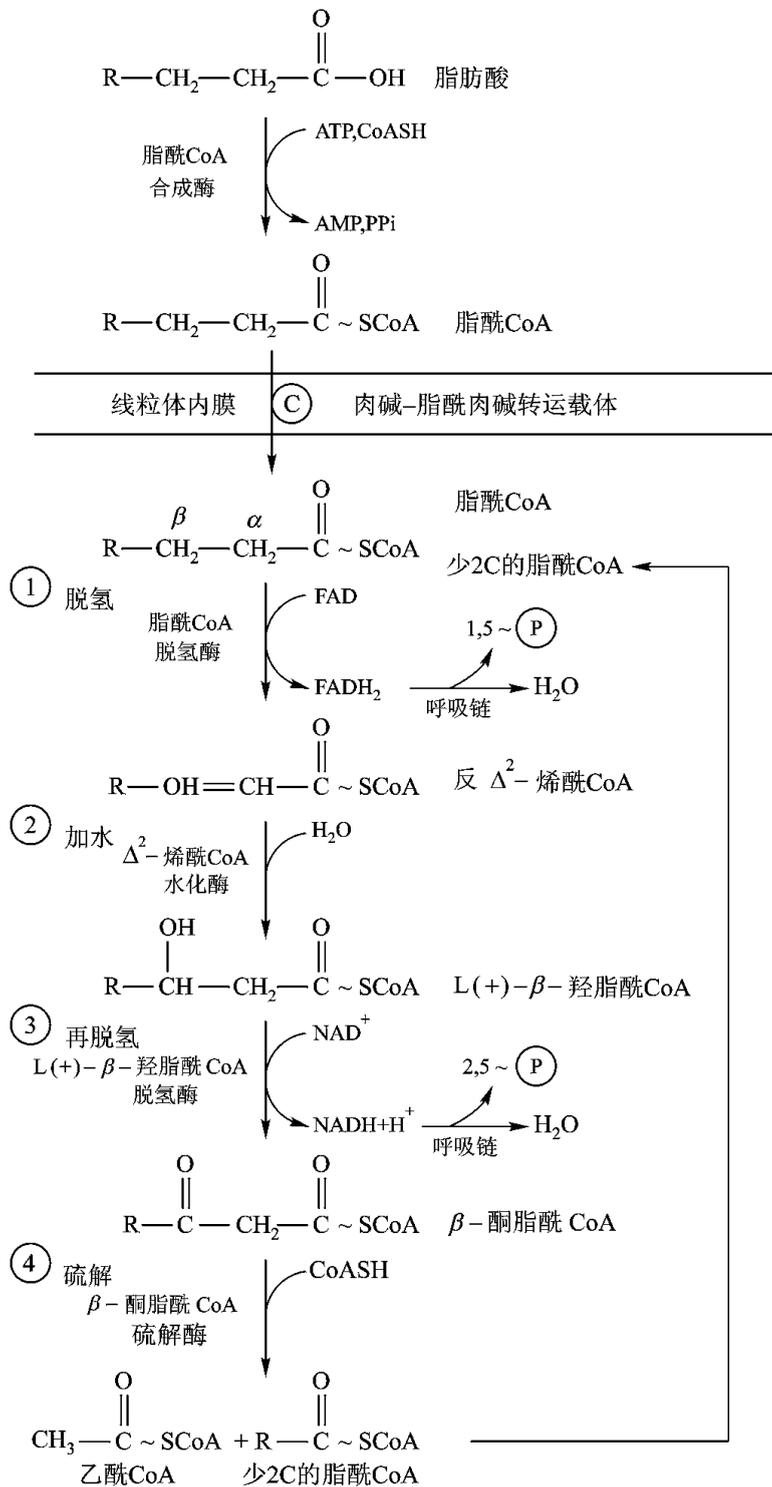
脂肪酸 β -氧化过程如下:

(1) 脱氢: 在脂酰 CoA 脱氢酶的催化下, 脂酰 CoA α 、 β 碳原子各脱下一个氢原子, 生成反 Δ^2 烯酰 CoA, 脱下的 2H 由 FAD 接受生成 FADH_2 。

(2) 加水: 在 Δ^2 烯酰水化酶的催化下, 反 Δ^2 烯酰 CoA 加水生成 L(+)- β -羟脂酰 CoA。

(3) 再脱氢: 在 β -羟脂酰 CoA 脱氢酶的催化下, L(+)- β -羟脂酰 CoA 脱下 2H 生成 β -酮脂酰 CoA, 脱下的 2H 由 NAD^+ 接受, 生成 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 。

(4) 硫解: 在 β -酮脂酰 CoA 硫解酶 (thiolase) 的催化下, β -酮脂酰 CoA 碳链断裂, 生成 1 分子乙酰 CoA 和 1 分子少 2 个碳原子的脂酰 CoA。

图 8-2 脂肪酸 β -氧化过程

以上生成比原来少 2 个碳原子的脂酰 CoA,可反复进行上述反应,直至全部变成乙酰 CoA,即完成脂肪酸的 β -氧化。

4. 脂肪酸氧化产生的能量

脂肪酸氧化是体内能量的主要来源。以 16 碳的软脂酸为例,软脂酸共进行 7 轮 β -氧化,生成 7 分子 FADH_2 、7 分子 $\text{NADH} + \text{H}^+$ 以及 8 分子乙酰 CoA。每分子 FADH_2 和 NADH 通过呼吸链平均分别产生 1.5 分子 ATP 和 2.5 分子 ATP,每分子乙酰 CoA 通过三羧酸循环氧化产生 10 分子 ATP。因此,1 mol 软脂酸彻底氧化共生成 $(7 \times 1.5) + (7 \times 2.5) + (8 \times 10) = 108 \text{ mol ATP}$,减去脂肪酸活化消耗的 2 mol ATP,净生成 106 mol ATP 或 $30.5 \text{ kJ/mol} \times 106 = 3233 \text{ kJ}$ 。平均每摩尔碳释放 202 kJ 用于 ATP 的合成。而 1 mol 葡萄糖彻底氧化产生 32(或 30) mol ATP, $30.5 \text{ kJ/mol} \times 32 \text{ mol} = 986 \text{ kJ}$ (或 $30.5 \text{ kJ/mol} \times 30 \text{ mol} = 915 \text{ kJ}$)。平均每摩尔碳释放 164.3 kJ(或 152.5 kJ)。可见,与葡萄糖比较,脂肪酸是机体释能更多的能源物质。

5. 脂肪酸的其他氧化形式

(1) 不饱和脂肪酸的氧化分解

人体储存的脂肪中大约有一半以上的脂肪酸残基是不饱和脂肪酸,它们同样以 β -氧化方式降解。但是不饱和脂肪酸的双键大多是顺式构型,因此无论不饱和双键在什么位置,经过连续的 β -氧化,必然都会产生顺式 Δ^3 或顺式 Δ^2 的中间产物。顺式 Δ^3 烯酰 CoA,其 C-3 和 C-4 之间的双键妨碍反式 Δ^2 双键的形成,所以需经线粒体 Δ^3 顺 \rightarrow Δ^2 反烯酰 CoA 异构酶(Δ^3 -cis \rightarrow Δ^2 -trans-enoyl-CoA isomerase)催化,转变成 Δ^2 反烯酰 CoA 才能进行 β -氧化;而顺式 Δ^2 烯酰 CoA 虽然可以发生加水反应,但生成的却是 D(-)- β -羟脂酰 CoA,需经线粒体 D(-)- β -羟脂酰 CoA 表构酶(epimerase)催化,将右旋异构体转变成 β -氧化所需的 L(+)- β -羟脂酰 CoA,才能沿 β -氧化途径继续氧化降解。

不饱和脂肪酸与相同碳原子数的饱和脂肪酸比较,由于分子内氢原子数目少,通过氧化呼吸链传递的电子数目少,因而氧化产生的 ATP 数目也相对较少。

(2) 丙酸的代谢

含有偶数碳原子的脂肪酸 β -氧化产物全部为乙酰 CoA,而含有奇数碳原子的脂肪酸,最后一轮 β -氧化除产生 1 分子乙酰 CoA,还生成 1 分子丙酰 CoA。丙酰 CoA 主要在羧化酶及异构酶的作用下,经羧化反应产生琥珀酰 CoA,再经三羧酸循环彻底氧化。

(3) 脂肪酸的 ω 氧化

脂肪酸远离羧基端的 ω 甲基碳原子,可以在与内质网紧密结合的脂肪酸 ω 氧化酶系(羧化酶、脱氢酶、NADPH、NAD⁺、细胞色素 P-450 等)的作用下,经 ω -羟基脂肪酸、 ω -醛基脂肪酸,最后氧化生成 α 、 ω 二羧酸,然后可从任一侧激活并进行 β -氧化。

(四) 酮体的生成和利用

1. 酮体的生成

β -氧化是人体氧化脂肪酸的主要途径。肝外组织(骨骼肌、心肌等)脂肪酸 β -氧化生成的乙酰 CoA,可以直接进入三羧酸循环氧化分解。但是,肝组织脂肪酸氧化生成的乙酰 CoA,除部分进入三羧酸循环,提供肝组织本身需要的能量外,余下的乙酰 CoA 则转变成一类特殊的中间产物——酮体(ketone bodies)。酮体包括乙酰乙酸(acetoacetate)、 β -羟丁酸(β -hydroxybutyrate)和丙酮(acetone)三种成分。

酮体生成分四步进行(图 8-3):

(1) 乙酰乙酰 CoA 的生成 乙酰乙酰 CoA 有两种来源:其一,大量的乙酰乙酰 CoA 是由 β -氧化的产物乙酰 CoA 缩合而成。二分子的乙酰 CoA 在乙酰乙酰 CoA 硫解酶(thiolase)的作用下,脱去一分子 CoASH,生成乙酰乙酰 CoA;其二,脂肪酸经多轮 β -氧化后生成的丁酰 CoA 在下一轮的 β -氧化循环中,若不发生硫解反应,得到的产物就是乙酰乙酰 CoA。

(2) 羟甲基戊二酸单酰 CoA(3-hydroxy-3-methyl-glutar-yl-CoA, HMG-CoA)的生成 乙酰乙酰 CoA 在 HMG-CoA 合酶(HMG-CoA synthase)的作用下,再与一分子乙酰 CoA 缩合生成 HMG-CoA,同时释出一分子 CoASH。

(3) 乙酰乙酸的生成 羟甲基戊二酸单酰 CoA 在 HMG-CoA 裂解酶(HMG-CoA lyase)作用下,裂解生成乙酰乙酸和乙酰 CoA。

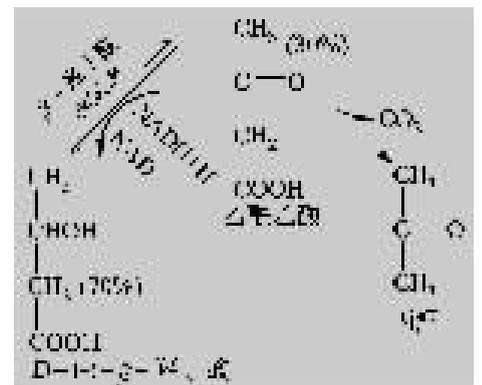
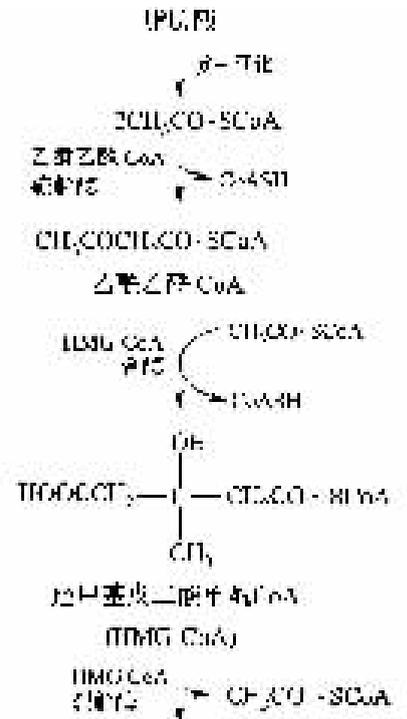


图 8-3 酮体的生成

(4) β -羟丁酸及丙酮的生成 乙酰乙酸在线粒体内膜 β -羟丁酸脱氢酶 (β -hydroxybutyrate dehydrogenase) 作用下, 被还原成 β -羟丁酸。还原所需的氢由 NADH 提供, 还原速率由 NADH/NAD⁺ 的比值决定。少量乙酰乙酸还可自然脱羧生成丙酮。

肝细胞线粒体内含有各种合成酮体的酶类, 尤其是 HMG-CoA 合酶。这些酶活性很高, 可以将脂肪酸 β -氧化产生的乙酰 CoA 迅速转变成酮体。但是肝本身缺乏利用酮体的酶, 酮体必须透过肝细胞膜由血液运输到肝外组织进一步氧化分解。

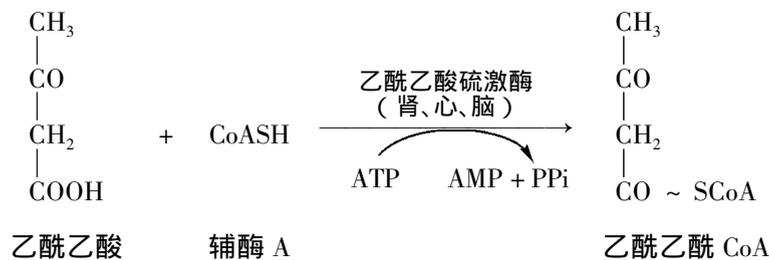
2. 酮体的利用

肝外许多组织具有活性很强的利用酮体的酶类, 可以将酮体重新转化成乙酰 CoA, 再通过三羧酸循环彻底氧化分解。

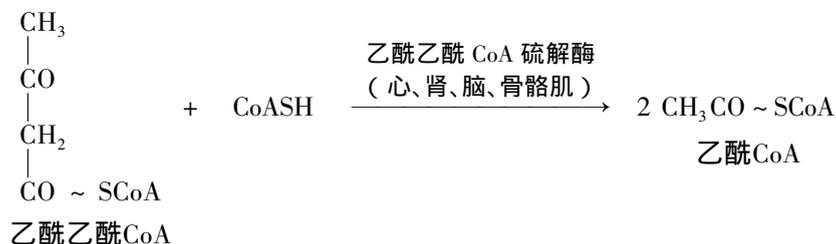
(1) 乙酰乙酸的活化 心、肾、脑及骨骼肌线粒体中含有高活性的琥珀酰 CoA 转硫酶。此酶在琥珀酰 CoA 存在时, 可以使乙酰乙酸活化, 生成乙酰乙酰 CoA。



此外, 肾、心及脑的线粒体内还含有乙酰乙酸硫激酶, 可以直接活化乙酰乙酸, 生成乙酰乙酰 CoA。



(2) 乙酰乙酰 CoA 硫解生成乙酰 CoA 心、肾、脑及骨骼肌线粒体中的乙酰乙酰 CoA 硫解酶, 可以使乙酰乙酰 CoA 硫解, 生成 2 分子乙酰 CoA, 后者即可进入三羧酸循环彻底氧化分解。



β -羟丁酸在 β -羟丁酸脱氢酶的催化下, 脱氢生成乙酰乙酸, 然后再转变成乙酰 CoA 而被氧化。部分丙酮则在一系列酶催化下转变成丙酮酸或乳酸。

3. 酮体生成的生理意义

酮体是脂肪酸在肝内经 β -氧化后产生的正常中间代谢产物, 是肝能源输出的重要形式。酮体分子小, 溶解性高, 易于透过血脑屏障及肌肉毛细血管壁。心肌和肾皮质利用酮体优于利用葡萄糖。脑组织虽然不能直接氧化脂肪酸, 却能利用肝所产生的酮体。正常饮食时, 脑优先利用葡萄糖, 但在糖供应不足或糖利用障碍时, 酮体可以替代葡萄糖, 成为脑组织的主要能源, 甚至 75% 的能源来自酮体。

正常情况下, 血中仅含少量酮体, 为 0.03 ~ 0.5 mmol/L。在饥饿、高脂低糖膳食及患糖尿病的状况下, 脂肪酸大量动员, 致使酮体生成增加, 而且此时因糖氧化分解生成的草酰乙酸减少, 三羧酸循环的速率变慢, 乙酰 CoA 不能迅速氧化分解, 造成酮体堆积, 从而引起血中酮体升高, 严重时还会造成酮症酸中毒。血中酮体升高超过肾阈值, 酮体则随尿排出, 引起酮尿。另外, 酮体中的丙酮为挥发性物质, 也可经呼吸道排出。

二、三酰甘油的合成代谢

三酰甘油除由食物脂肪水解产物重新合成以外,大部分由糖转化而来。尤其当糖摄入量增多时,葡萄糖氧化产生的乙酰 CoA 可大量合成脂肪酸,脂肪酸酯化后即可以三酰甘油的形式储存于脂肪组织内。当糖供应不足时,它便成为机体重要的能量来源。

(一) 软脂酸的合成

肝、肾、脑、肺、乳腺及脂肪组织等均能合成脂肪酸,其中脂肪组织虽然本身可以葡萄糖为原料合成脂肪酸,但主要还是摄取经小肠消化吸收来的脂肪酸以及肝合成的脂肪酸,进而再合成脂肪。一般来说,肝合成脂肪酸的能力较脂肪组织大 8~9 倍,是人体脂肪酸合成的主要场所。脂肪酸合成在细胞液中进行,胞液中存在合成脂肪酸的多酶体系,以葡萄糖氧化产生的乙酰 CoA 为原料,在 ATP、NADPH、 HCO_3^- (CO_2) 及 Mn^{2+} 等多种辅因子参与下,首先合成 16 碳的软脂酸 (palmitate)。

1. 乙酰 CoA 的转运

细胞内乙酰 CoA 全部在线粒体基质里产生,而脂肪酸合酶多酶复合体 (fatty acid synthase multienzyme complex) 存在于细胞液,因此线粒体内的乙酰 CoA 必须进入细胞液才能合成脂肪酸。实验证明:乙酰 CoA 并不能自由通过线粒体内膜,需要柠檬酸-丙酮酸循环 (citrate-pyruvate cycle) 参与。首先丙酮酸氧化产生的乙酰 CoA 与丙酮酸羧化产生的草酰乙酸,在柠檬酸合酶作用下缩合生成柠檬酸,柠檬酸通过线粒体内膜上的载体转运至胞液,然后在胞液中 ATP-柠檬酸裂解酶催化下重新生成乙酰 CoA 和草酰乙酸。此时乙酰 CoA 用于合成脂肪酸,而草酰乙酸在苹果酸脱氢酶催化下,以 NADH 为辅酶,加氢还原成苹果酸,苹果酸接着在苹果酸酶的催化下脱氢生成 NADPH 和丙酮酸。NADPH 可用于脂肪酸的合成。此途径可将线粒体外的 NADH 转变成 NADPH。丙酮酸可再通过线粒体内膜上的载体转运至线粒体内重新生成草酰乙酸,后者再与乙酰 CoA 缩合成柠檬酸。以上过程如此反复循环,乙酰 CoA 便可不断地从线粒体内转运至胞液中 (图 8-4)。

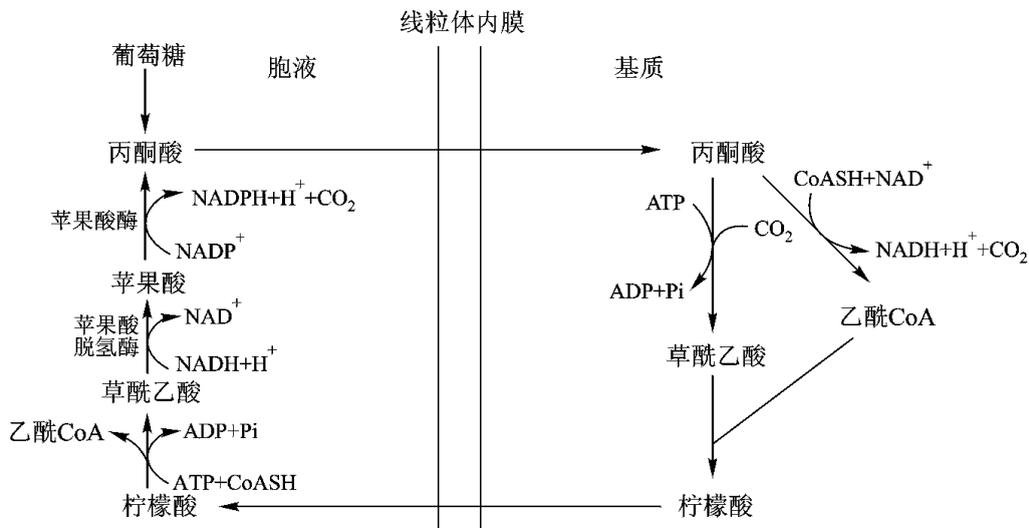
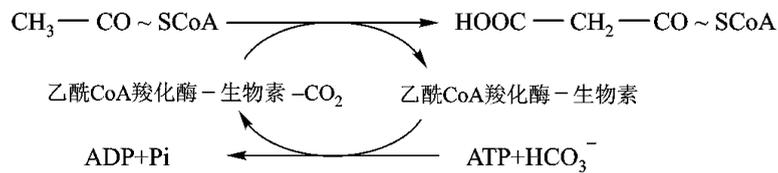


图 8-4 柠檬酸-丙酮酸循环

柠檬酸-丙酮酸循环是个耗能的过程,转运一分子乙酰 CoA 需要消耗 2 分子的 ATP。

2. 丙二酸单酰 CoA 的合成

乙酰 CoA 羧化生成丙二酸单酰 CoA 是脂肪酸合成的第一步反应,催化反应的酶是乙酰 CoA 羧化酶 (acetyl CoA carboxylase),反应不可逆。



乙酰 CoA 羧化酶存在于胞液中,是脂肪酸合成的限速酶,其辅基为生物素, Mn^{2+} 为激活剂。该酶是变构酶,酶单体相对分子质量为 40 000,无催化活性。在柠檬酸、异柠檬酸存在时,10~20 个单体聚合成线状排列的多聚体,催化活性增加 10~20 倍。而软脂酸及其他长链脂酰 CoA 能使多聚体解聚成为单体,抑制酶的活性。最近有实验证明,乙酰 CoA 羧化酶可被一种依赖于 AMP(不是 cAMP)的蛋白激酶磷酸化(79、1 200 及 1 215 位丝氨酸残基磷酸化)而失去活性。胰高血糖素可激活该蛋白激酶,从而抑制乙酰 CoA 羧化酶的活性。而胰岛素则能通过蛋白磷酸酶的作用,使磷酸化的乙酰 CoA 羧化酶脱去磷酸而恢复活性。此外,高糖膳食还能促进乙酰 CoA 羧化酶的合成,进而具有促进乙酰 CoA 的羧化作用。

3. 丙二酸单酰 CoA 生成软脂酸的加成反应

研究发现,胞液中合成脂肪酸的多酶复合体由乙酰转移酶、丙二酸单酰转移酶、 β -酮脂酰合成酶、 β -酮脂酰还原酶、水化酶、烯酰还原酶、硫酯酶,共计 7 种酶和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)组成。哺乳动物的这 7 种酶存在于一条肽链上,相对分子质量为 250 000,属多功能酶。有活性的酶则由两条完全相同的肽链(亚基)首尾相连的二聚体组成。此二聚体解聚,酶活性便丧失。每个亚基均有一个 ACP 结构域,其丝氨酸残基连有辅基 4'-磷酸泛酰氨基乙硫醇(4'-phosphopantetheine, 图 8-5),可以作为脂肪酸合成过程中脂酰基的载体。

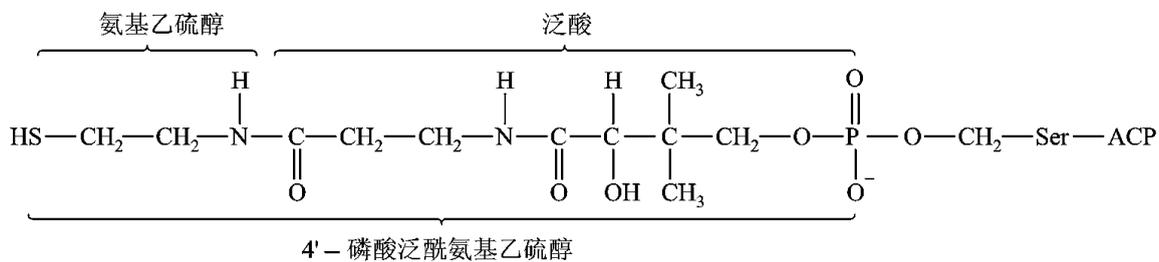


图 8-5 4'-磷酸泛酰氨基乙硫醇

此外,脂肪酸合酶多酶复合体中酮脂酰合成酶的半胱氨酸残基的—SH 基亦很重要,它也能与脂酰基相连,并参与脂肪酸合成的加成反应。

胞液中软脂酸的合成并不是按脂肪酸 β -氧化的逆反应进行,而是以丙二酸单酰 CoA 为乙酰基的供体,通过重复的缩合、加氢、脱水、再加氢多步反应生成。具体步骤如下:

(1) 乙酰 CoA 在乙酰转移酶作用下,将乙酰基转移到脂肪酸合酶多酶复合体的酰基载体蛋白(ACP)的—SH 上,然后再从 ACP 转移到该复合体的 β -酮脂酰合成酶—SH 上。

(2) 丙二酸单酰 CoA 在丙二酸单酰转移酶作用下,脱掉 CoASH,与 ACP 的—SH 连接。

(3) 缩合:脂肪酸合酶多酶复合体中 β -酮脂酰合成酶上连接的乙酰基与 ACP 上的丙二酸单酰缩合,生成 β -酮丁酰 ACP,并释出 CO_2 。

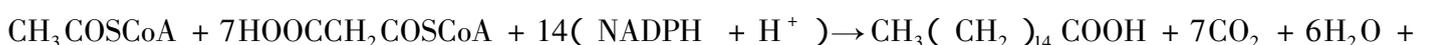
(4) 加氢: β -酮丁酰 ACP 在 β -酮脂酰还原酶作用下,加氢还原生成 D-(—) β -羟丁酰 ACP。

(5) 脱水:D-(—) β -羟丁酰 ACP 在水化酶作用下,脱水生成 Δ^2 反烯丁酰 ACP。

(6) 再加氢: Δ^2 反烯丁酰 ACP 在烯酰还原酶作用下,再加氢还原生成丁酰 ACP。

然后,该复合物再与另一分子丙二酰 CoA 重复上述各步反应,生成增加 2 个碳原子的脂酰—ACP 复合物。如此连续 7 次的加成反应后,最终生成 16 碳的软脂酰—ACP 复合物。此复合物被硫酯酶水解后既可生成软脂酸(图 8-6)。

软脂酸合成的总反应为:



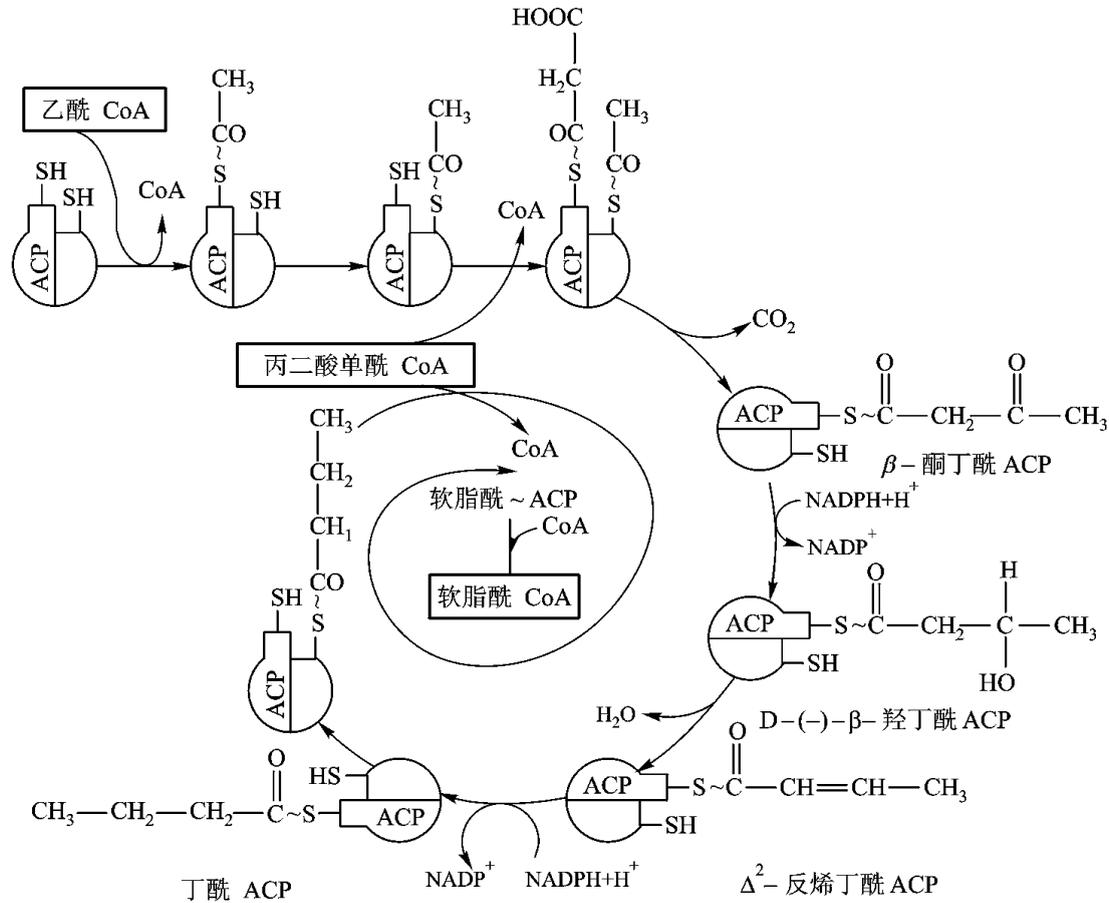


图 8-6 软脂酰的生物合成

$8\text{CoASH} + 14\text{NADP}^+$

软脂酸合成过程所需的 NADPH 中 8 分子来自柠檬酸-丙酮酸循环转运乙酰 CoA 的同时,由苹果酸酶催化生成(见图 8-4)。其余 6 分子主要由葡萄糖氧化分解的磷酸戊糖途径提供。软脂酸的合成是耗能反应,反应物丙二酸单酰 CoA 由乙酰 CoA 羧化反应生成,每生成 1 分子丙二酸单酰 CoA 需要消耗 1 分子 ATP。因此,生成 1 分子软脂酸共计消耗 7 分子 ATP。

(二) 脂肪酸碳链的延长

脂肪酸碳链延长的反应,主要在肝细胞线粒体或内质网中进行,有两种不同的途径。

1. 内质网脂肪酸延长途径

内质网中含有的催化脂肪酸延长酶系,可以丙二酸单酰 CoA 作为二碳单位的供体,NADPH 供氢,通过缩合、加氢、脱水以及再加氢等反应,按照胞液中软脂酸合成相似的过程,使软脂酸碳链逐步延长。但反应中脂酰基不是以 ACP 为载体,而是连接在 CoASH 上,此途径可以合成 24 碳的脂肪酸。不过还是由软脂酸合成 18 碳的硬脂酸为主。

2. 线粒体脂肪酸延长途径

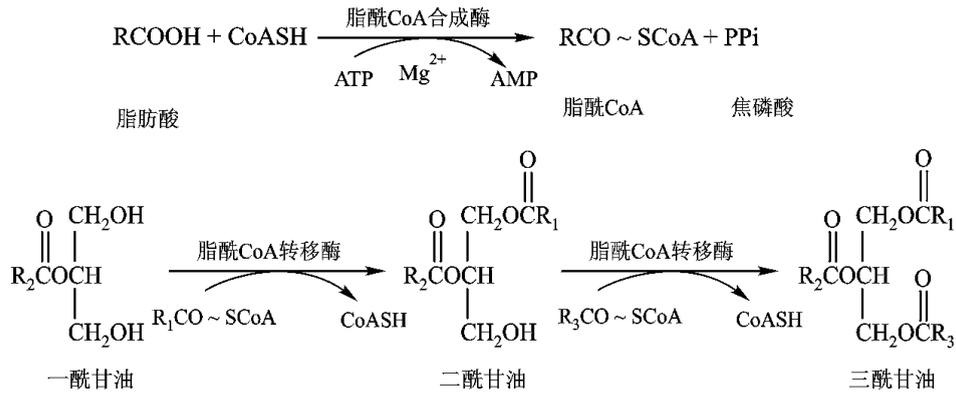
线粒体基质中含有催化脂肪酸延长的酶系,可以按照脂肪酸 β-氧化逆反应基本相似的过程使软脂酸的碳链延长。软脂酰 CoA 与乙酰 CoA 缩合生成 β-酮脂酰 CoA 后,由 NADPH 供氢还原产生 β-羟硬脂酰 CoA;后者脱水可以生成 α,β-硬脂烯酰 CoA,然后经 α,β-烯酰还原酶催化,NADPH 供氢,还原后即可生成硬脂酰 CoA。以此方式,每一轮反应使脂肪酸新增加 2 个碳原子,一般可以延长至 24 或 26 碳的脂肪酸,不过仍以硬脂酸生成最多。

(三) 三酰甘油的合成

1. 一酰甘油途径

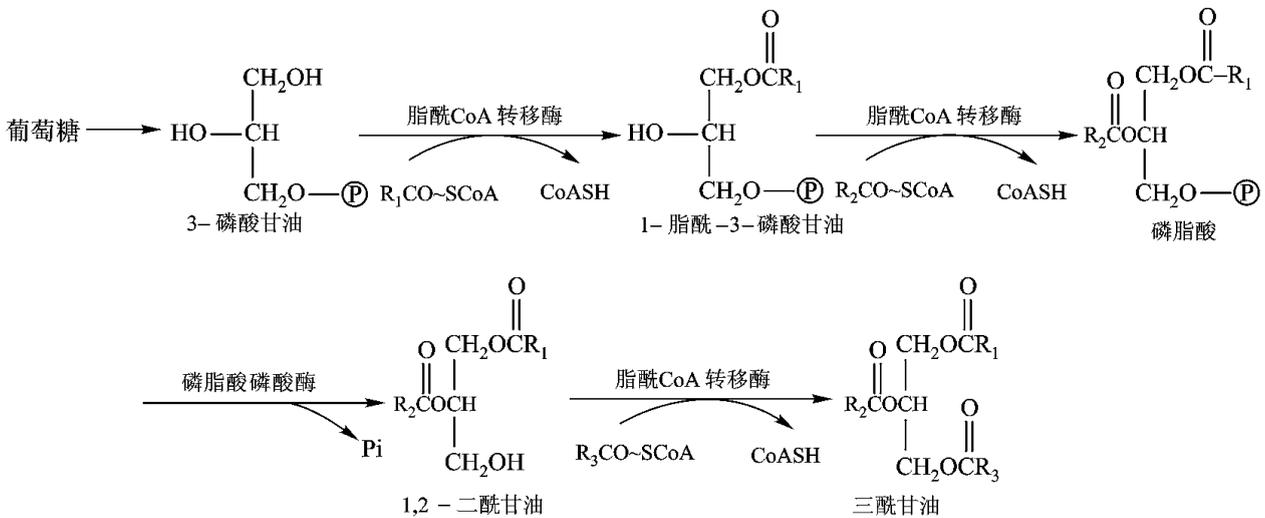
小肠黏膜细胞利用食物脂肪水解产生的一酰甘油和脂肪酸可以合成三酰甘油,此合成途径称为一酰甘油途径。

首先,消化吸收的脂肪酸在 ATP、CoASH、 Mg^{2+} 存在的条件下,被内质网脂酰 CoA 合成酶催化生成脂酰 CoA,然后在内质网脂酰转移酶(acyl CoA transferase)的作用下,脂酰 CoA 与一酰甘油反应,经二酰甘油,最终生成三酰甘油。

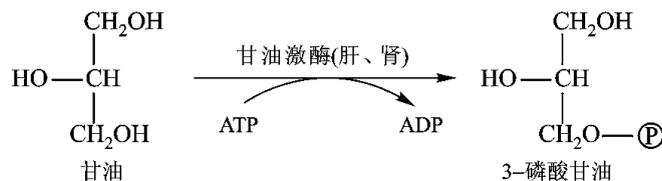


2. 二酰甘油途径

肝细胞及脂肪细胞主要按二酰甘油途径合成三酰甘油。葡萄糖酵解途径生成的磷酸二羟丙酮经还原生成 3-磷酸甘油,后者在脂酰 CoA 转移酶的作用下,依次加上 2 分子脂酰 CoA 生成磷脂酸(phosphatidic acid)。后者在磷脂酸磷酸酶的作用下,水解脱去磷酸生成 1,2-二酰甘油,然后在脂酰 CoA 转移酶催化下,再加上 1 分子脂酰基,即生成三酰甘油。



此外,肝、肾等组织因含有甘油激酶,能使游离甘油磷酸化生成 3-磷酸甘油。而脂肪细胞缺乏甘油激酶,所以不能利用甘油合成三酰甘油。



三、三酰甘油代谢的调节

1. 激素的调节作用

激素对三酰甘油的代谢具有重要调节作用。当禁食、饥饿或肌肉锻炼耗能过多时,肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素、促肾上腺皮质激素、促甲状腺素以及生长素等脂解激素分泌增加,通过 cAMP-蛋白激酶系统,使激素敏感性三酰甘油脂肪酶磷酸化而被激活,脂肪动员及肝摄取的游离脂肪酸增加,脂肪酸

β -氧化加强,酮体生成增多,从而为脑组织和肌肉组织提供必要的能源。此外,胰高血糖素还可增加蛋白激酶 A 的活性,使乙酰 CoA 羧化酶磷酸化而降低活性,从而抑制脂肪酸的合成。肾上腺素、生长素也能抑制乙酰 CoA 羧化酶,减少脂肪酸的合成。

与此相反,胰岛素、前列腺素等抑制腺苷酸环化酶,具有对抗脂解作用。其中,胰岛素不仅可促进糖的利用,加速糖酵解和磷酸戊糖途径,为脂肪合成提供原料,还能诱导乙酰 CoA 羧化酶、脂肪酸合成酶系以及 ATP-柠檬酸裂解酶的合成,从而促进三酰甘油的合成代谢。

2. 代谢物的调节作用

糖、脂代谢的中间产物可以通过激活或抑制代谢关键酶或限速酶,调节三酰甘油的代谢。进食,尤其是高糖膳食时,糖代谢产生的乙酰 CoA 及柠檬酸使乙酰 CoA 羧化酶由无活性的单体聚合成有活性的多聚体,从而使酶变构激活,促进丙二酸单酰 CoA 的合成。后者能竞争性抑制肉碱-脂酰肉碱转移酶 I,阻止脂酰 CoA 进入线粒体进行 β -氧化,致使脂肪分解代谢减弱。同时,由于糖代谢加强,细胞 NADPH、乙酰 CoA 及 ATP 生成增多,不仅为脂肪酸合成提供了原料,而且因 ATP 增多,抑制异柠檬酸脱氢酶,造成异柠檬酸和柠檬酸堆积,当其透出线粒体进入胞液后,异柠檬酸和柠檬酸可变构激活乙酰 CoA 羧化酶,而使脂肪酸合成增多。相反,饥饿或高脂膳食时,机体脂肪酸氧化分解加强,肝细胞内脂酰 CoA 增多,后者通过变构抑制乙酰 CoA 羧化酶,阻止体内脂肪酸和脂肪的合成。所以,糖、脂代谢生成的中间产物可调节三酰甘油的代谢,影响其合成或分解代谢进行的方向。

第三节 多不饱和脂肪酸与类二十碳化合物

一、多不饱和脂肪酸

人体含有的不饱和脂肪酸主要有软油酸(16:1 Δ^9)、油酸(18:1 Δ^9)、亚油酸(18:2 $\Delta^9,12$)、亚麻酸(18:3 $\Delta^9,12,15$)以及花生四烯酸(20:4 $\Delta^5,8,11,14$)。含有两个或两个以上双键的脂肪酸如花生四烯酸称为多不饱和脂肪酸。人和动物含有 $\Delta^4, \Delta^5, \Delta^8, \Delta^9$ 去饱和酶(desaturase),可以通过去饱和及碳链延长交替反应合成软油酸和油酸。但是,人和动物缺乏 Δ^9 以上的去饱和酶,因此不能合成含有 $\Delta^{11}, \Delta^{12}, \Delta^{14}$ 或 Δ^{15} 双键的亚油酸、亚麻酸以及花生四烯酸。这些多不饱和脂肪酸必须从食物中摄取,因此称为营养必需脂肪酸。

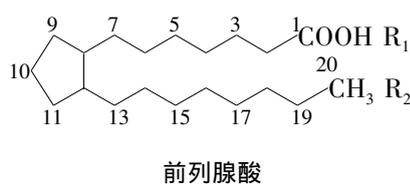
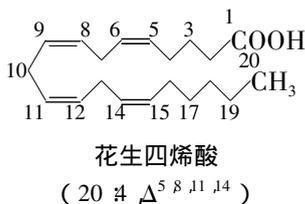
多不饱和脂肪酸,尤其是花生四烯酸,不仅是磷脂、生物膜的主要构成成分,而且还是具有重要生理功能的 20 碳脂肪酸衍生物合成的前体。此外,含有更多双键的 22 碳 6 烯酸,是脑、神经及睾丸组织的重要组成部分;深海鱼油中的 20 碳 5 烯酸,还具有抗血小板聚集,延缓血栓形成,防治心脑血管疾病的作用。

二、前列腺素、血栓素及白三烯

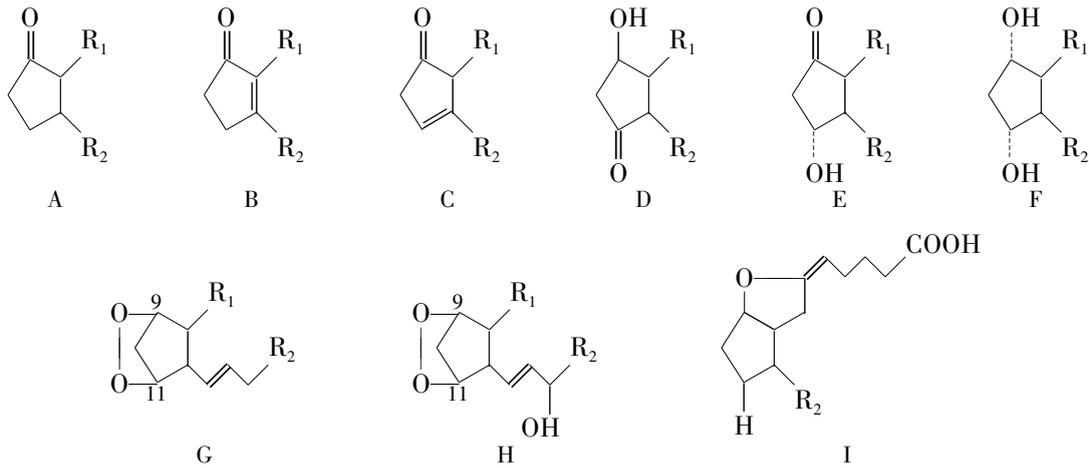
前列腺素(prostaglandin, PG)、血栓素(thromboxane, TX)及白三烯(leukotriene, LT)均是花生四烯酸的衍生物,是调节细胞代谢的重要生理活性物质,与炎症、过敏、免疫反应以及心血管疾病的发生等重要病理过程有关。

(一) 前列腺素、血栓素及白三烯结构特点

前列腺素以前列腺酸(prostanoic acid)为基本骨架,含有一个五碳环及 R₁、R₂ 两条侧链。



前列腺素根据五碳环上取代基团及不饱和双键位置的差异,按英文字母顺序分为:PGA、B、C、D、E、F、G、H及I共9种不同的类型。体内以PGA、PGE₂及PGF_{2α}较多。



PG还可根据侧链取代基团中双键数目的多少,再分为1、2、3类,在英文字母右下角以阿拉伯数字表示。如PGH₂和PGE₂。PGH₂是PG合成过程中的中间产物;PGL₂分子中除五碳环外,还有一个含氧的5元环,又称为前列环素(prostacyclin,图8-7)。此外,PGF第9位碳原子上的羟基有两种立体构型。—OH基位于五碳环平面之下为α-型,用虚线连接;位于平面之上为β-型,用实线连接。天然前列腺素均为α-型,如PGF_{2α},不存在β-型。

血栓烷也有前列腺酸样骨架,但分子中的五碳环被含氧的六元环取代,如TXA₂(见图8-7)。

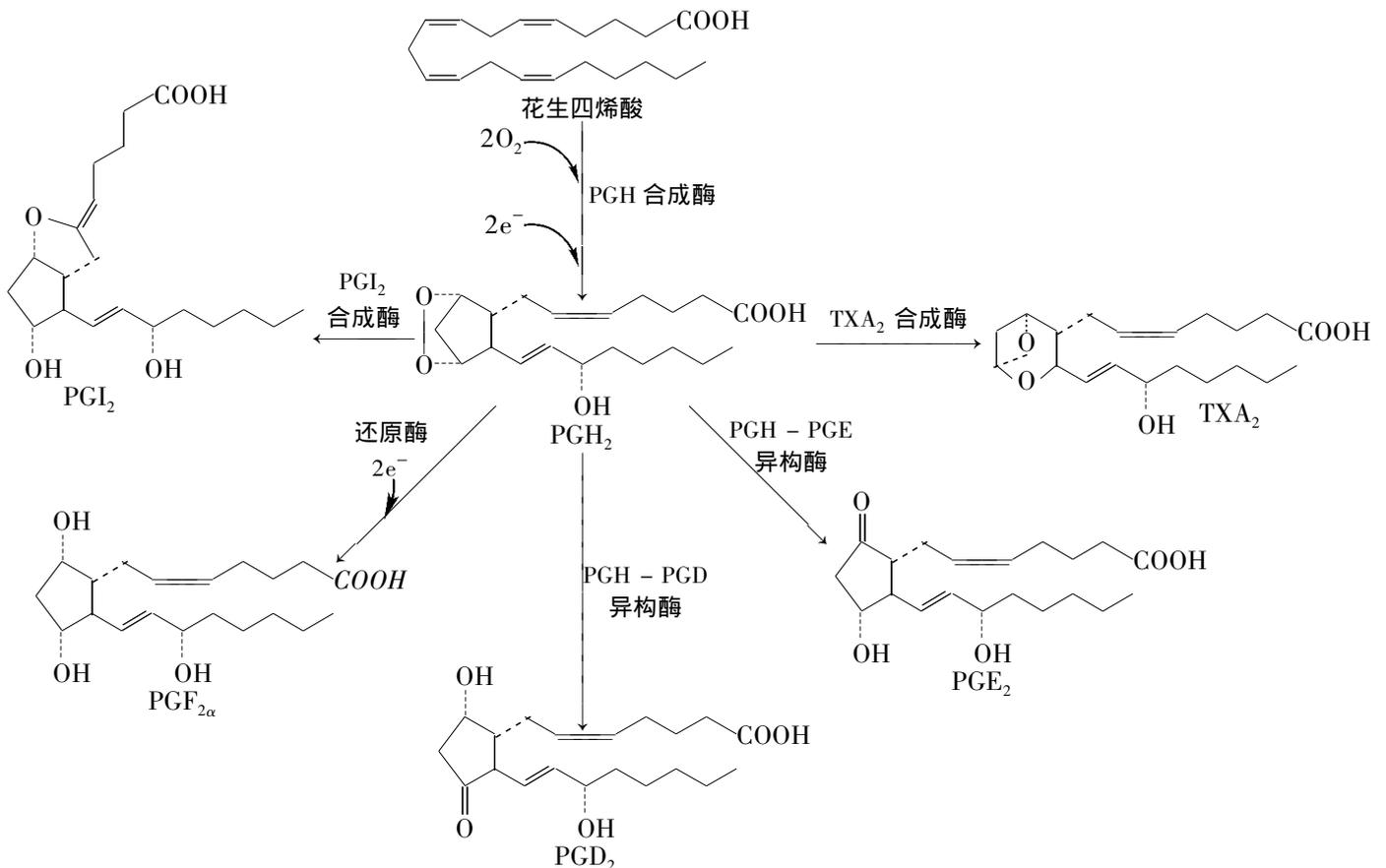


图8-7 前列腺素、血栓烷的合成

白三烯是不含前列腺酸样骨架的20碳多不饱和脂肪酸衍生物。LT有四个双键,以LT₄表示。LTA₄在5,6位上有一氧环。如环氧键断裂并在12位加水引入羟基,则为LTB₄;6位与谷胱甘肽反应则生成LTC₄、LTD₄及LTE₄(见图8-8),这三者的混合物就是过敏反应的慢反应物质(slow reacting substances of

anaphylaxis)。

(二) 前列腺素、血栓 烷及白三烯的合成

1. PG、TX 的合成

除红细胞外,全身各组织均有合成 PG 的酶系,而血小板中含有 TX 合成酶。细胞膜中的磷脂含有丰富的花生四烯酸。当细胞受外界刺激,如在血管紧张素 II(angiotensin II)、缓激肽(bradykinin)、肾上腺素、凝血酶以及某些抗原抗体复合物或病理因子作用下,细胞膜中磷脂酶 A₂ 被激活,使膜磷脂水解释出花生四烯酸,然后在一系列酶催化下合成 PG 及 TX(图 8-7)。

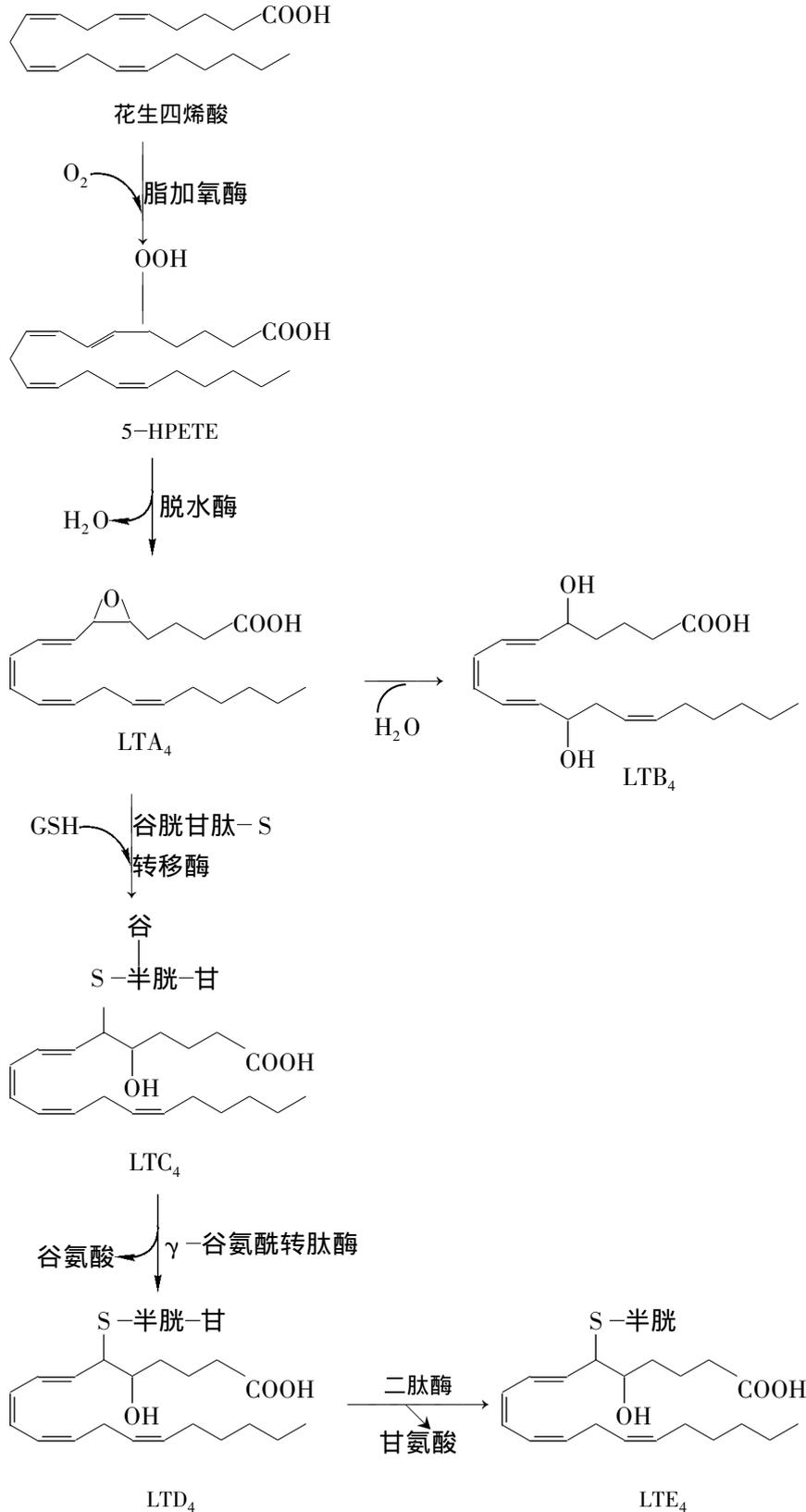


图 8-8 白三烯的合成

2. LT 的合成

花生四烯酸在脂加氧酶(lipoxygenase)作用下生成氢过氧化 20 碳四烯酸(5 - hydroperoxy eicetraenoic acid 5 - HPETE) ,然后在脱水酶作用下生成白三烯(LTA_4)。 LTA_4 又在不同酶的催化下生成 LTB_4 、 LTC_4 、 LTD_4 及 LTE_4 等(图 8 - 8)。

(三) 前列腺素、血栓素及白三烯的基本生理功能

PG、TX 及 LT 在细胞内虽然含量很低 ,但具有很强的生理活性。

1. PG 的生理功能

PGE_2 能促进血管扩张 ,增加毛细血管的通透性 ,引起红、肿、热、痛等炎症反应。 PGE_2 、 PGA_2 使动脉平滑肌舒张 ,有降低血压的作用。 PGE_2 、 PGI_2 抑制胃酸分泌 ,促进胃肠蠕动。此外 ,卵泡的 PGF_2 能使卵巢平滑肌收缩 ,引起排卵 ;子宫的 $PGF_{2\alpha}$ 能使黄体溶解 ,加快子宫收缩 ,促进分娩。

2. TX 的生理功能

血小板产生的 TXA_2 可引起血管收缩 ,血小板聚集 ,促进凝血及血栓形成。血管内皮细胞产生的 PGI_2 其作用与 TXA_2 拮抗。若血管内皮细胞损伤 , PGI_2 合成及分泌减少 ,拮抗作用减弱 ,则会导致血管收缩和血栓形成。因此 , TXA_2 过多 , PGI_2 相对不足可能与冠心病血栓形成有关。

3. LT 生理功能

LTC_4 、 LTD_4 及 LTE_4 的混合物是过敏反应的慢反应物质。它们使支气管平滑肌收缩的作用比组胺及 $PGF_{2\alpha}$ 强 100 ~ 1000 倍 ,作用慢而持久。此外 , LTB_4 能调节白细胞的功能 ,促进其游走与趋化 ,刺激腺苷酸环化酶 ,诱发多形核白细胞脱颗粒 ,使溶酶体释放水解酶 ,加速炎症及过敏反应的发展。

20 碳多不饱和脂肪酸衍生物 PG、TX 及 LT 种类繁多 ,功能各异 ,甚至具有相互协同或拮抗的效应。因此 ,对它们所具有的生理功能 ,必须进行综合分析。

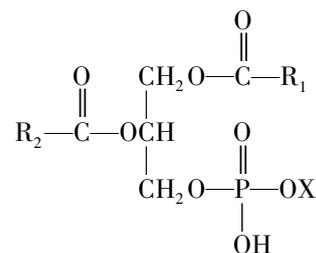
第四节 磷脂的代谢

磷脂是含有磷酸的脂质。磷脂分子中可因与磷酸相连的取代基团的不同而生成结构、功能各异的多 种磷脂。其中由甘油酯化构成的磷脂称甘油磷脂(phosphoglyceride) ,由鞘氨醇(sphingosine)构成的磷脂则称鞘磷脂(sphingophospholipid)。

一、甘油磷脂的代谢

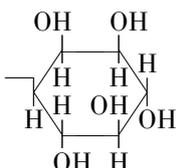
(一) 甘油磷脂的合成

甘油磷脂是体内含量最多的一类磷脂 ,其基本结构为 :



其中 R_1 、 R_2 为脂肪酸的碳链部分 , R_2 多为不饱和脂肪酸的碳链 ,如花生四烯酸的碳链 ;X 为与磷脂相连的取代基团。依据 X 取代基团的不同 ,可以把甘油磷脂分为磷脂酸、磷脂酰胆碱(卵磷脂 ,lecithin)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂 ,cephalin)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine)、磷脂酰甘油(phosphatidylglycerol)、二磷脂酰甘油(diphosphatidyl glycerol ,心磷脂 ,cardiolipin)以及磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol)等不同种类 (表 8 - 1)。

表 8-1 机体重要的甘油磷脂

甘油磷脂的名称	X 取代基团
磷脂酸	—H
磷脂酰胆碱(卵磷脂)	—CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃
磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)	—CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺
磷脂酰丝氨酸	—CH ₂ CHNH ₂ COOH
磷脂酰甘油	—CH ₂ CHOHCH ₂ OH
二磷脂酰甘油(心磷脂)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOR}_1 \\ \\ \text{O} \quad \text{HCOCOR}_2 \\ \quad \\ \text{—CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{O—P—OCH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array} $
磷脂酰肌醇	

甘油磷脂分子中含有两条疏水的脂酰基长链(疏水尾),又含有极性很强的磷酸及取代基团如胆碱、乙醇胺等(极性头),所以可以自动排列成极性头向外,疏水尾朝内的磷脂双分子层,成为生物膜的基本结构。

1. 磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺的合成

这两种磷脂的合成是先激活胆碱和乙醇胺,生成 CDP-胆碱和 CDP-乙醇胺,然后与二酰甘油反应,生成磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。因此,有人将此反应过程又称为二酰甘油途径。

(1) 合成原料及辅因子 人体各组织细胞内质网都有合成磷脂的酶系,均能合成甘油磷脂,以肝、肾及肠组织最活跃。磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺的合成需以二酰甘油、磷酸盐、胆碱或乙醇胺为原料,并在 ATP、CTP 等辅因子的参与下进行。原料中的二酰甘油主要由葡萄糖转化而来,已如前述。乙醇胺在体内可由丝氨酸脱羧生成,胆碱除从食物中获得外,体内亦可由乙醇胺在酶的催化下由 S-腺苷蛋氨酸提供甲基生成。此外,居甘油磷脂分子中第 2 位碳的脂肪酸,多为花生四烯酸,也需要从食物中摄取。

(2) 合成步骤

1) CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱的生成 乙醇胺和胆碱在相应的激酶作用下,由 ATP 提供磷酸基团生成磷酸乙醇胺和磷酸胆碱,然后再与 CTP 作用,即可生成 CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱(图 8-9)。

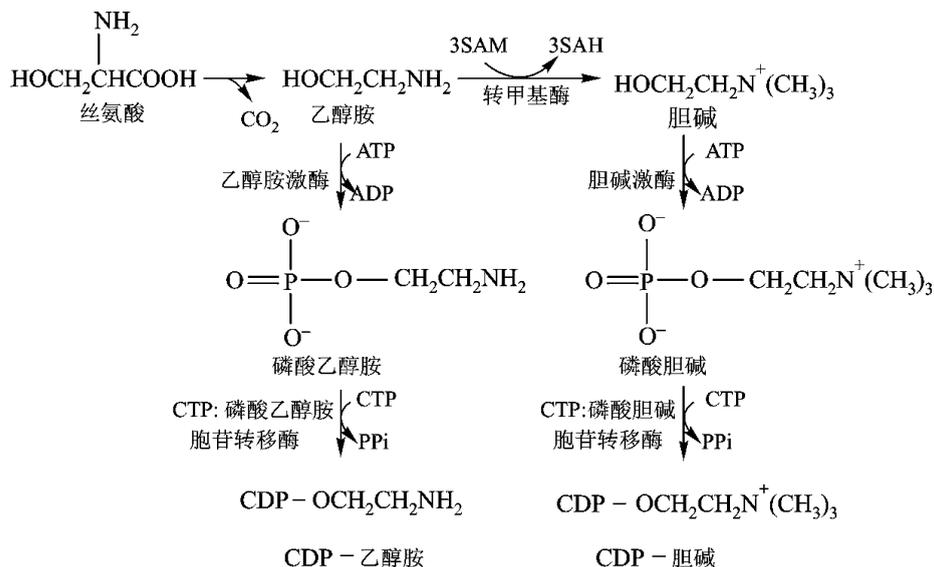


图 8-9 乙醇胺、胆碱、CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱的生成

(SAM S-腺苷蛋氨酸, SAH S-腺苷同型半胱氨酸)

2) 磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的生成 CDP-乙醇胺和 CDP-胆碱在酶的催化下与二酰甘油反应, 即可生成磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺(图 8-10)。

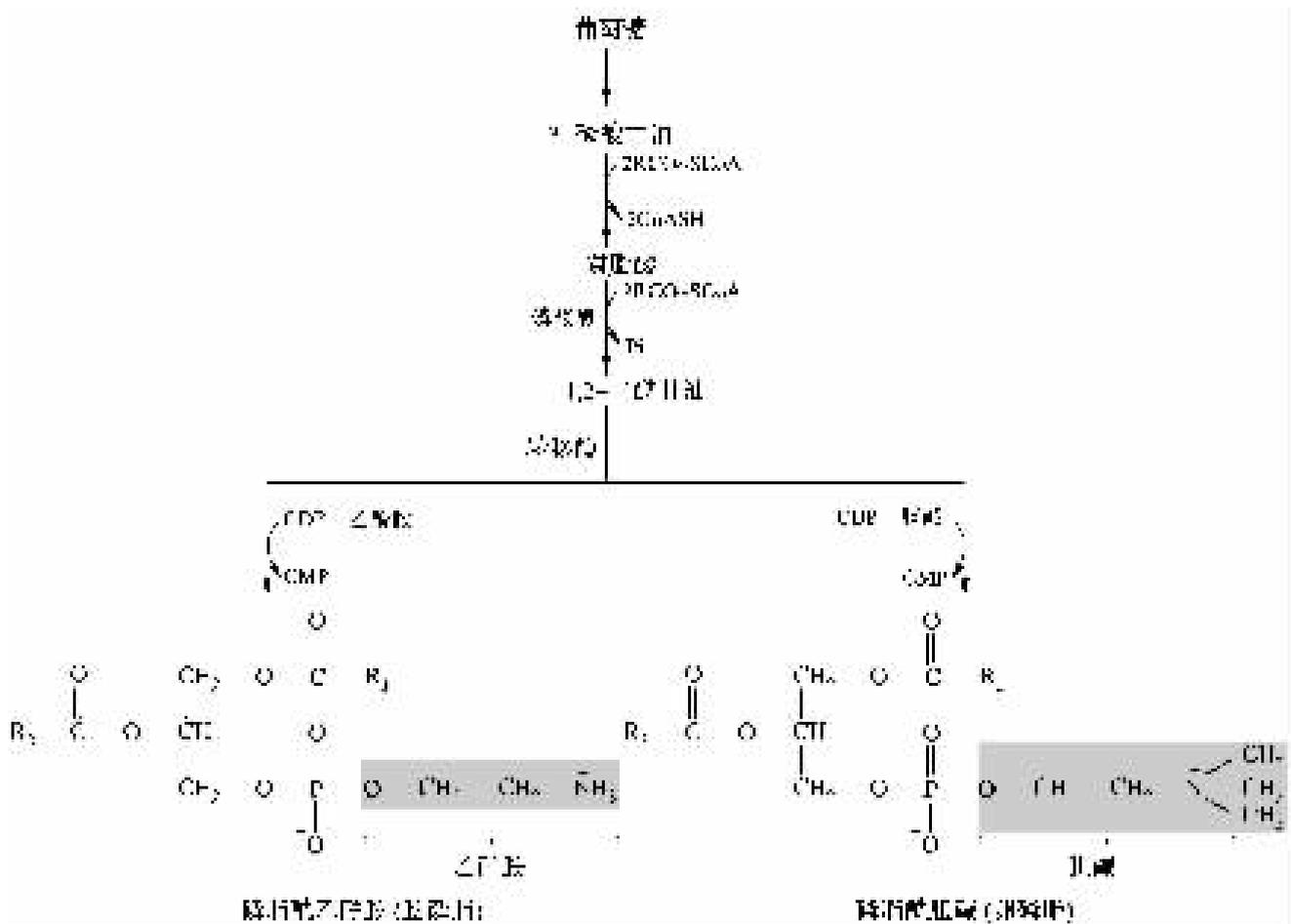


图 8-10 磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱的合成

2. 磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸及心磷脂的合成

心肌、骨骼肌等组织在 CTP 参与下, 二酰甘油转变成 CDP-二酰甘油, 然后与肌醇、丝氨酸及 α -磷脂酰甘油结合, 分别生成磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸及心磷脂(图 8-11)。此途径又称为 CDP-二酰甘油途径。

磷脂酰肌醇在细胞信号转导中起着重要作用, 心磷脂是心肌线粒体内膜的主要磷脂。

(二) 甘油磷脂的分解

生物体中含有多种不同的磷脂酶(phospholipase), 它们能使甘油磷脂分子中不同的酯键水解。根据水解作用的特异性, 磷脂酶可分为磷脂酶 A_1 、 A_2 、B、C 及 D 几种类型(图 8-12)。磷脂酶 A_1 存在于动物细胞溶酶体中(蛇毒和某些微生物亦含有), 能水解磷脂的 1 位酯键, 生成溶血磷脂 2。磷脂酶 A_2 存在于动物组织的细胞膜和线粒体膜上, 以 Ca^{2+} 为激活剂, 特异性地催化甘油磷脂 2 位酯键水解, 生成溶血磷脂 1 和多不饱和脂肪酸(大多为花生四烯酸)。溶血磷脂是较强的表面活性剂, 能破坏细胞膜, 引起溶血或细胞坏死。患急性胰腺炎时, 磷脂酶 A_2 在胰腺内被激活, 可以造成胰腺细胞坏死。溶血磷脂 1 经磷脂酶 B_1 催化, 1 位酯键水解, 脱去另一分子脂肪酸, 生成甘油磷酸乙醇胺或甘油磷酸胆碱, 致使失去溶解细胞膜的作用。后二者若再进一步被磷脂酶 D 水解, 即可生成 3-磷酸甘油、乙醇胺或胆碱。磷脂酶 C 存在于细胞膜和某些细菌中, 能特异水解 3 位磷酸酯键, 生成二酰甘油及磷酸乙醇胺或磷酸胆碱(图 8-12)。

二、鞘脂质的代谢

(一) 鞘脂质的组成与结构

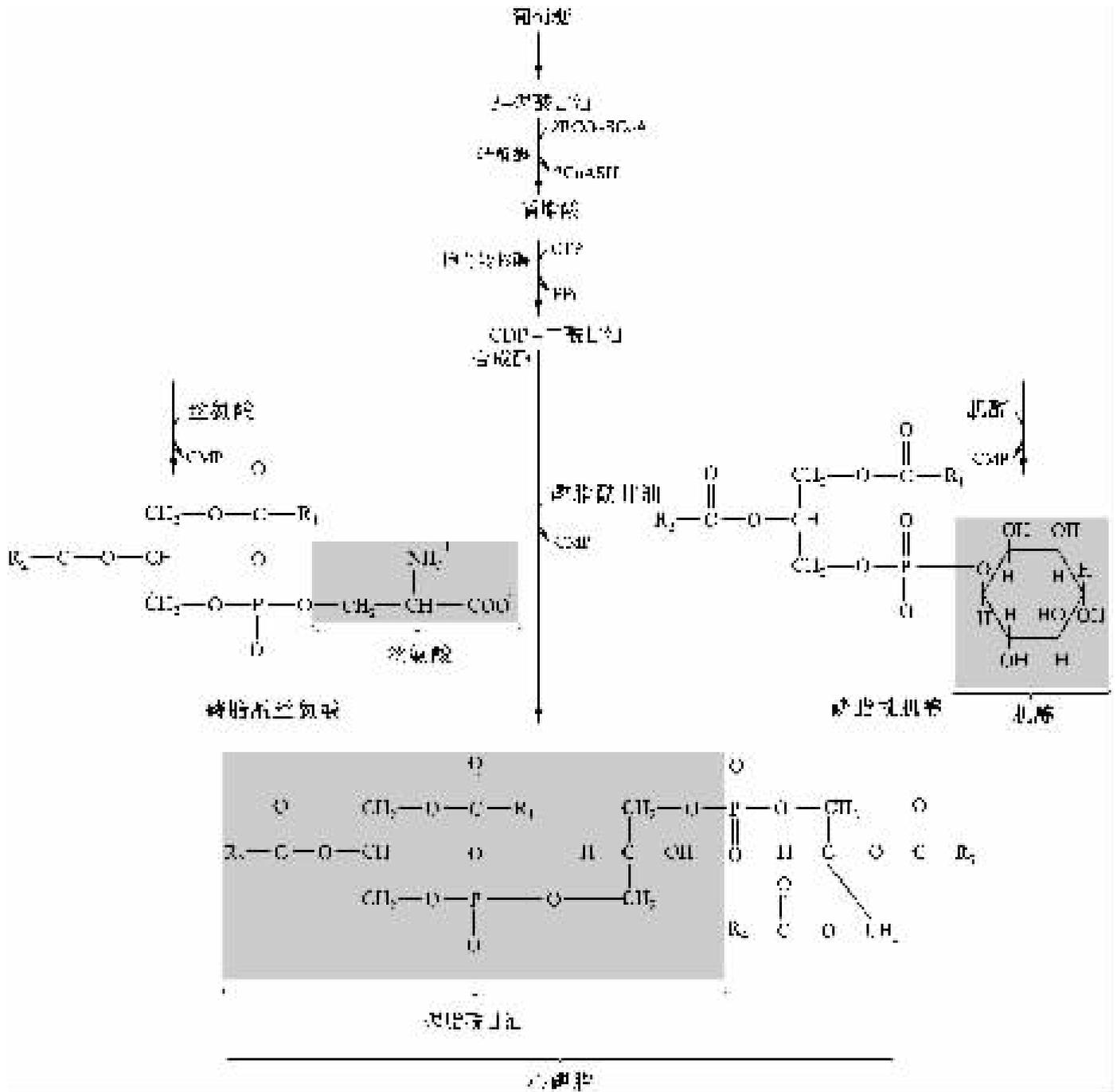


图 8-11 磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸及心磷脂的合成

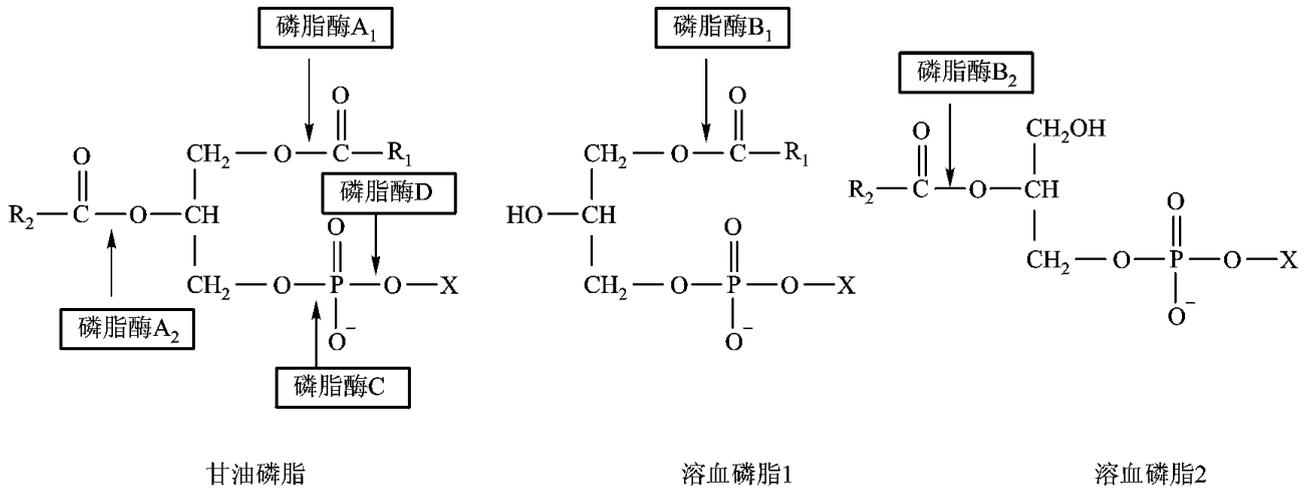
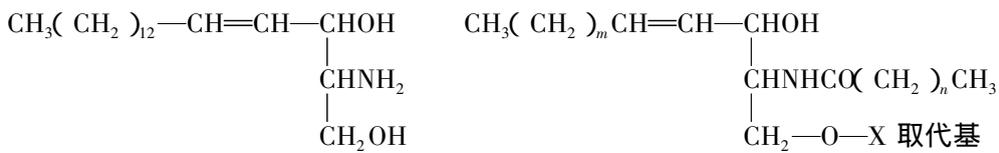


图 8-12 磷脂酶 A₁、A₂、B₁、B₂、C、D 的作用部位

鞘脂是含有鞘氨醇(sphingosine)的脂质。鞘氨醇是脂肪族(16C~20C)氨基二元醇,分子中具有疏水的长链脂肪烃尾和2个羟基及1个氨基的极性头。



鞘氨醇

鞘脂的基本结构

(m 多为 12, n 多在 12~22 之间)

自然界以 18C 鞘氨醇为最多,分子中的双键均为反式构型。鞘氨醇的氨基可与脂肪酸(14C~24C)以酰胺键连接,生成 N-脂酰鞘氨醇(又称神经酰胺,ceramide)。N-脂酰鞘氨醇的末端羟基若与磷酸胆碱以磷酸酯键相连即生成鞘磷脂,若与糖基或寡糖链以糖苷键相连则生成鞘糖脂。机体重要的鞘脂见表 8-2。

表 8-2 机体重要的鞘脂

鞘脂的名称	X 取代基团
鞘磷脂	磷酸胆碱 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ -\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
葡萄糖脑苷脂	葡萄糖
半乳糖脑苷脂	半乳糖
神经节苷脂	唾液酸

神经节苷脂是酸性鞘糖脂,其 X 取代集团是一个或多个唾液酸与其他糖基形成的寡糖链。

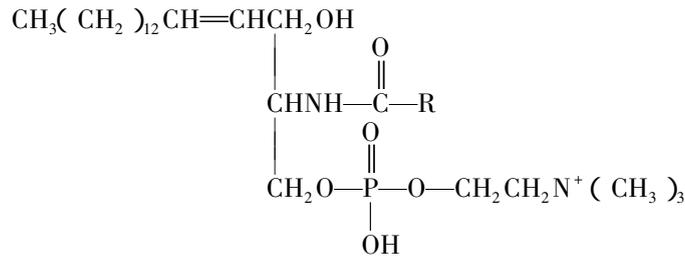
(二) 鞘磷脂的代谢

脑神经组织中的神经鞘磷脂(sphingomyelin)含量很高,神经髓鞘中的神经鞘磷脂占其干重的5%左右。神经鞘磷脂也是生物膜的重要组分,人红细胞中神经鞘磷脂的比例可以占到20%~30%。

1. 鞘磷脂的合成

人体各组织细胞内质网都含有合成鞘磷脂的酶系,因此均能合成鞘磷脂,但以脑组织最活跃。鞘磷脂合成需要以脂肪酸、丝氨酸、胆碱为基本原料,并在磷酸吡哆醛、NADPH、FAD、CoASH、ATP、CTP等辅因子的参与下进行。

首先,软脂酰 CoA 与丝氨酸在内质网 3-酮二氢鞘氨醇合成酶及磷酸吡哆醛的作用下,缩合并脱羧生成 3-酮基二氢鞘氨醇(3-ketodihydrosphingosine),后者由 NADPH 供氢,在还原酶催化下,加氢生成二氢鞘氨醇,然后在脱氢酶的催化下脱氢,脱下的氢由 FAD 接受,即生成鞘氨醇。鞘氨醇在脂酰转移酶的催化下,其氨基与脂酰 CoA 进行酰胺缩合,生成 N-脂酰鞘氨醇,后者再由 CDP-胆碱提供磷酸胆碱即生成神经鞘磷脂。



神经鞘磷脂

(R 为脂肪酸的碳链)

2. 鞘磷脂的降解

脑、肝、脾、肾细胞等的溶酶体含有鞘磷脂酶(sphingomyelinase)。此酶属磷脂酶 C,能水解磷酸酯键,生成磷酸胆碱及 N-脂酰鞘氨醇。如果先天缺乏此酶,鞘磷脂不能降解而在细胞内积存,则会引起肝、脾肿大及痴呆等鞘磷脂沉积病症。

(三) 鞘糖脂的代谢

葡萄糖等单糖或寡糖与 N-脂酰鞘氨醇末端羟基以 β-糖苷键结合生成的脂类物质,称为鞘糖脂。按糖基种类不同,鞘糖脂可以分为葡萄糖脑苷脂、半乳糖脑苷脂以及含 1 个或多个唾液酸寡糖链的多种神经节苷脂(表 8-2)。鞘糖脂普遍存在于各种细胞膜外侧,突触膜及肝细胞膜含量丰富。鞘糖脂不仅可以维持细胞膜的稳定性,而且对血型、免疫及细胞识别等方面具有重要影响,尤其是鞘糖脂可以通过其寡糖链与外源配体相互作用,从而具有配体识别、结合以及调节细胞膜受体活性的功能(见第三章)。

1. 鞘糖脂的合成

在糖基转移酶的作用下,以 CDP-葡萄糖、CDP-半乳糖以及 CMP-唾液酸为糖基供体与 N-脂酰鞘氨醇末端羟基反应,即生成鞘糖脂。至于鞘糖脂中的寡糖链,则是在多种糖基转移酶的催化下,由糖基逐个添加上去。

2. 鞘糖脂的降解

鞘糖脂和机体其他脂质成分一样,需不断更新。正常情况下,它们合成与降解处于动态平衡状态。鞘糖脂的降解便是在多种糖基水解酶的作用下,按糖基逐个除去的方式进行。各种糖基水解酶的特异性都很强,任何一种糖基水解酶缺乏均会影响鞘糖脂的正常降解,导致神经功能障碍。

第五节 胆固醇的代谢

胆固醇(cholesterol)是环戊烷多氢菲的衍生物,在体内主要以游离胆固醇(unesterified cholesterol)和

胆固醇酯(cholesteryl ester)两种形式存在。胆固醇不仅是细胞膜的重要成分,也是类固醇激素、胆汁酸盐以及维生素D₃合成的前体。人体约含140 g胆固醇,分布不均匀。其中,肾上腺、性腺及脑神经组织含量最多,肝、肾、肠、皮肤以及脂肪组织亦含较多的胆固醇,肌肉组织中含量较少。

一、胆固醇的生物合成

人体所需的胆固醇部分来自动物性膳食,如肉类、内脏、蛋黄、奶油等,但主要还是由机体各组织(除脑组织和成熟的红细胞外)自行合成。成人每天可以合成1~1.5 g胆固醇,其中70%~80%在肝内合成,10%左右在小肠合成。

1. 合成原料

乙酰CoA是合成胆固醇的基本原料,在合成过程中,还需要大量的NADPH及ATP,以供给合成反应所需的氢及能量。每合成1分子胆固醇需要18分子乙酰CoA,36分子ATP以及16分子NADPH。乙酰CoA及ATP大多来自线粒体中糖的有氧氧化,而NADPH则主要来自胞液中糖的磷酸戊糖途径。

2. 合成步骤

胆固醇合成酶系存在于胞液和光面内质网膜上,因而胆固醇的合成主要在胞液及内质网中进行。胆固醇合成过程十分复杂,主要包括三个阶段。

(1) 甲羟戊酸的合成 乙酰CoA是葡萄糖、脂肪酸及氨基酸在线粒体内的分解代谢中间产物,但它不能透过线粒体内膜。与脂肪酸合成一样,合成胆固醇的乙酰CoA也必须经“柠檬酸-丙酮酸循环”由线粒体内转运至胞液之中。在胞液里,2分子乙酰CoA在乙酰乙酰CoA硫解酶的催化下,缩合成乙酰乙酰CoA,然后在羟甲基戊二酸单酰CoA合酶(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMG CoA synthase)的催化下再与另1分子乙酰CoA缩合生成羟甲基戊二酸单酰CoA(3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA, HMG CoA)。HMG CoA进一步在内质网HMG CoA还原酶(HMG CoA reductase)的催化下,由NADPH供氢,还原生成甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)。HMG CoA还原酶是胆固醇合成的限速酶,这步反应是胆固醇合成的限速反应。

(2) 鲨烯的合成 甲羟戊酸经磷酸化、脱羧及脱羟基等激活反应生成活性很强的5碳烯烃焦磷酸化合物,再经多次缩合生成30碳多烯烃化合物鲨烯(squalene)。

(3) 胆固醇的生成 鲨烯再经环化、氧化、脱羧及还原等步骤,最终生成含有27个碳原子的胆固醇(图8-13)。

(4) 胆固醇酯的生成 细胞内的游离胆固醇可以在脂酰-胆固醇脂酰转移酶(acyl-CoA-cholesterol acyltransferase, ACAT)的催化下与脂酰CoA反应,生成胆固醇酯(图8-14)。血浆中的游离胆固醇则可在血中卵磷脂-胆固醇脂酰转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT)的催化下,将卵磷脂2-位碳原子上的脂酰基(大多为不饱和脂肪酸)转移到胆固醇的3-位羟基上,生成胆固醇酯和溶血卵磷脂(图8-14)。

胆固醇酯是胆固醇在细胞内贮存或通过血浆转运的主要形式。

二、胆固醇的转化与排泄

胆固醇在体内虽然不能彻底氧化生成CO₂和水,也不能提供能量,但可以转化成多种重要的生理活性物质,起着参与或调节机体物质代谢的作用。

1. 转化为胆汁酸

胆固醇可在肝细胞内氧化生成胆汁酸。正常人每天合成1~1.5 g胆固醇,其中大约40%转化为胆汁酸(见第二十一章)。

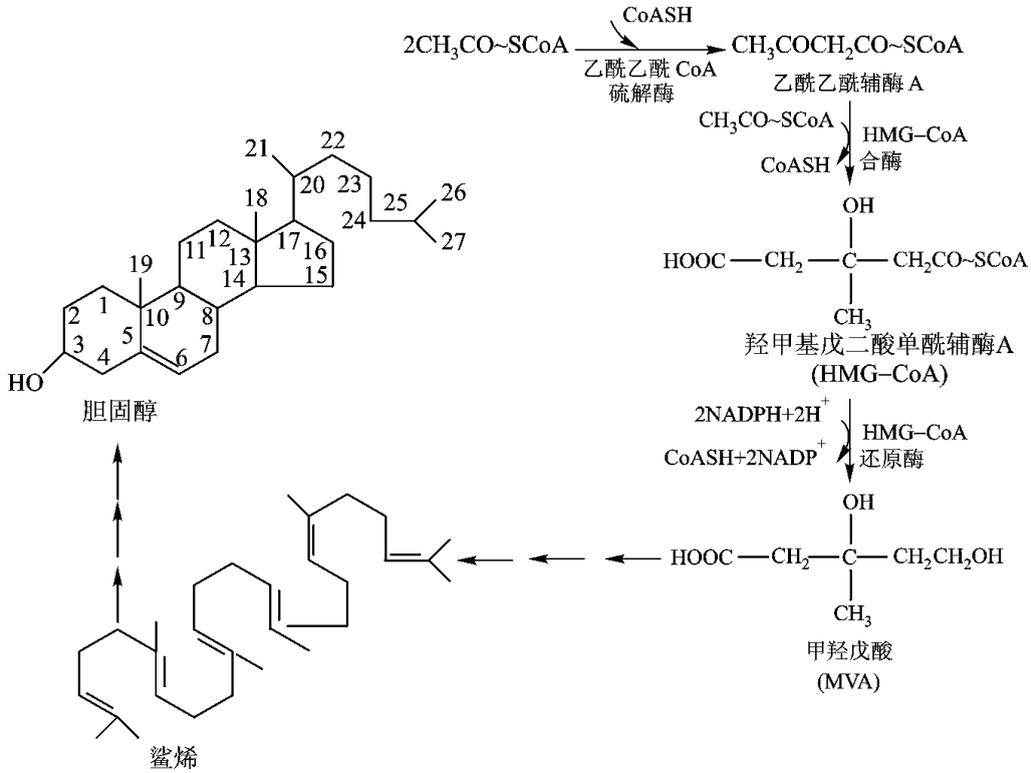


图 8-13 胆固醇的生物合成

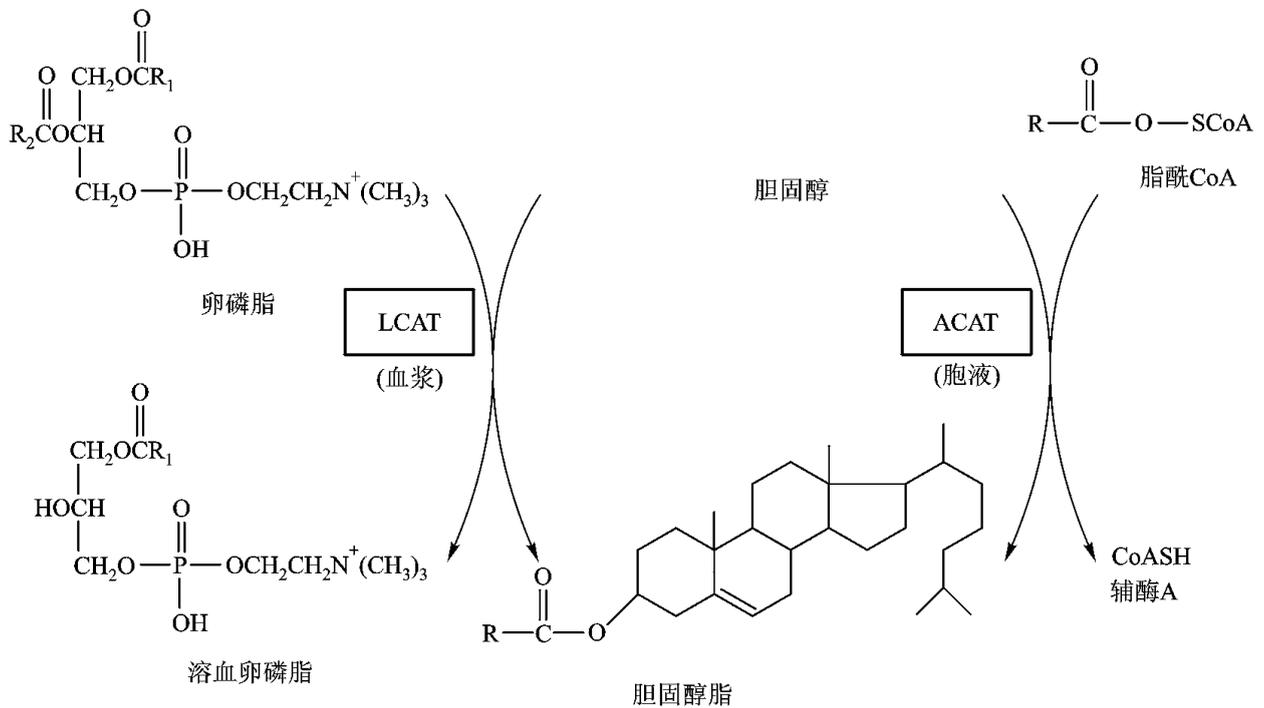


图 8-14 脂酰-胆固醇脂酰转移酶 (ACAT) 及卵磷脂-胆固醇脂酰转移酶 (LCAT) 的作用

2. 转化为类固醇激素

肾上腺、睾丸、卵巢等内分泌腺可以胆固醇为原料合成类固醇激素。肾上腺皮质球状带、束状带及网状带细胞可以分别合成睾丸酮、皮质醇及雄激素。睾丸间质细胞、卵巢的卵泡内膜细胞和黄体也可以利用胆固醇合成睾丸酮、雌二醇和孕酮。

3. 转化为 7-脱氢胆固醇

胆固醇在皮肤可被氧化为 7-脱氢胆固醇,后者经紫外线照射转变为维生素 D₃。

上述激素在发挥其调节作用之后,可在肝通过还原、水解及结合等反应失去自身活性,然后随尿液排出体外。

三、胆固醇生物合成的调节

HMG CoA 还原酶是胆固醇生物合成的限速酶,调节该酶的活性或含量可以维持机体胆固醇代谢平衡。HMG CoA 还原酶存在于肝、肠及其他组织细胞的内质网中,是含 887 个氨基酸残基的糖蛋白,相对分子质量 97 000。其 N 端含有较多的疏水氨基酸,可以穿过内质网膜而固定在膜上;其 C 端含亲水结构,伸向胞液具有催化活性。

1. HMG CoA 还原酶的变构调节

HMG CoA 还原酶具有变构效应,酶活性会受其反应产物甲羟戊酸、胆固醇、 7β -羟胆固醇以及 25-羟胆固醇的反馈抑制。当细胞胆固醇及其氧化产物增多时,HMG CoA 还原酶活性降低,胆固醇合成减少。

2. HMG CoA 还原酶的化学修饰调节

HMG CoA 还原酶的催化活性与酶分子磷酸化或去磷酸有关。在 cAMP 依赖的蛋白激酶催化下,酶分子磷酸化失去活性;而磷蛋白磷酸酶使酶分子脱磷酸,从而又使 HMG CoA 还原酶被激活。

胰高血糖素、糖皮质激素可激活腺苷酸环化酶,促进 HMG CoA 还原酶磷酸化,快速地减少细胞胆固醇的合成。相反,胰岛素可激活磷蛋白磷酸酶,使 HMG CoA 还原酶脱磷酸,从而起着促进细胞胆固醇合成的作用。

3. HMG CoA 还原酶合成的调节

机体组织细胞合成的胆固醇、食物来源的胆固醇以及通过低密度脂蛋白受体途径摄取的胆固醇,反过来均可反馈抑制 HMG CoA 还原酶基因的转录,使酶合成减少,从而抑制胆固醇的合成。

胰岛素、甲状腺素诱导 HMG CoA 还原酶的合成,从而促进胆固醇的合成。其中,甲状腺素除促使 HMG CoA 还原酶的合成外,同时还促进胆固醇在肝转变为胆汁酸,且作用更强,所以甲状腺功能亢进时,患者血清胆固醇含量反而有所下降。

另外,摄食状况也影响 HMG CoA 还原酶的合成。在禁食和饥饿状态下,HMG CoA 还原酶合成减少,活性降低,胆固醇合成受到抑制。同时乙酰 CoA、ATP、NADPH 不足也是胆固醇合成减少的重要原因。反之,高糖、高饱和脂肪膳食会使肝 HMG CoA 还原酶活性增加,胆固醇合成便增多。此外,膳食中外源胆固醇含量也会直接影响机体胆固醇的合成。食物中胆固醇含量低于 0.05% 时,肝、小肠中胆固醇合成增加;而食物胆固醇含量超过 2% 时,胆固醇合成则明显减少。这种机制虽然有利于机体维持胆固醇的代谢平衡。但毕竟影响胆固醇合成的因素很多,因此单纯的高胆固醇膳食并不能完全抑制体内胆固醇的合成。

第六节 血脂与血浆脂蛋白的代谢

一、血脂

血脂是血浆中脂质物质的总称,它包括三酰甘油、磷脂、胆固醇、胆固醇酯以及游离脂肪酸。其中磷脂主要有磷脂酰胆碱(约 70%)、神经磷脂(约 20%)及磷脂酰乙醇胺(约 10%)。血浆中游离脂肪酸含量很低,仅 15 mg/dL。血脂来源有外源性及内源性两种,食物中的脂质消化吸收后进入血液称外源性脂质,肝、脂肪组织合成后释放入血称内源性脂质。血脂含量变化范围很大,远不如血糖含量恒定。年龄、性别、职业、营养状况以及遗传因素等均会影响血脂的含量。正常人空腹 12~14 h 血脂组成及含量见表 8-3。

表 8-3 正常成人空腹血脂的组成及含量

组 成	血 浆 含 量	
	mmol/L	mg/dL

总 脂		400 ~ 700(500)
三酰甘油	0. 11 ~ 1. 69(1. 13)	10 ~ 150(100)
总胆固醇	2. 59 ~ 6. 47(5. 17)	100 ~ 250(200)
胆固醇酯	1. 81 ~ 5. 17(3. 75)	70 ~ 200(145)
游离胆固醇	1. 03 ~ 1. 81(1. 42)	40 ~ 70(55)
总磷脂	48. 44 ~ 80. 73(64. 58)	150 ~ 250(200)
磷脂酰胆碱(卵磷脂)	16. 1 ~ 64. 6(32. 3)	50 ~ 200(100)
神经磷脂	16. 1 ~ 42. 0(22. 6)	50 ~ 130(70)
磷脂酰乙醇胺(脑磷脂)	4. 8 ~ 13. 0(6. 4)	15 ~ 35(20)
游离脂酸		5 ~ 20(15)

(括号内数值为平均值)

二、血浆脂蛋白的分类、组成及结构

脂质不溶于水,血浆中的脂类是与蛋白质结合,以脂蛋白(lipoprotein)的形式存在和运输的。

(一) 血浆脂蛋白的分类

血浆脂蛋白是一类组成、密度、颗粒大小、相对分子质量、表面电荷以及免疫原性等极不均一的结合蛋白质。一般采用电泳法或超速离心法对脂蛋白进行分类。

1. 电泳法

用滤纸、醋酸纤维膜、琼脂糖或聚丙烯酰胺为支持物进行电泳,可将脂蛋白分为 α -、前 β -、 β -脂蛋白以及乳糜微粒(chylomicron, CM)四类。 α -脂蛋白泳动最快,相当于 α_1 -球蛋白的位置; β -脂蛋白相当于 β -球蛋白的位置;前 β -脂蛋白位于 β -脂蛋白之前,相当于 α_2 -球蛋白的位置;乳糜微粒不移动,位于原点(图 8-15)。

2. 超速离心法

血浆脂蛋白质因脂质、蛋白质组成及含量上的差异,其密

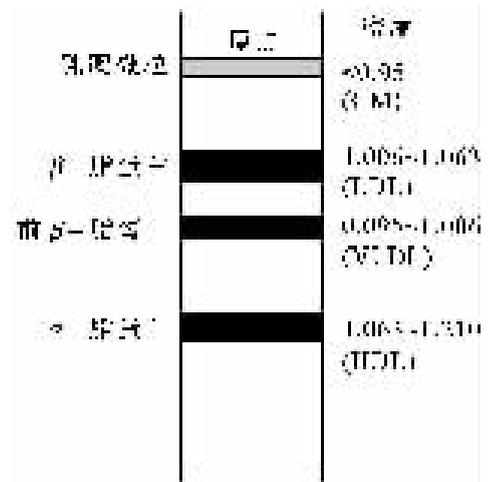


图 8-15 脂蛋白电泳和超速离心结果比较

表 8-4 血浆脂蛋白的种类、组成及一般特性

分 类	密度法 电泳法	乳糜微粒	极低密度脂蛋白 前 β -脂蛋白	低密度脂蛋白 β -脂蛋白	高密度脂蛋白 α -脂蛋白
性质	密度(g/mL)	< 0. 95	0. 95 ~ 1. 006	1. 006 ~ 1. 063	1. 063 ~ 1. 210
	S_f 值	> 400	20 ~ 400	0 ~ 20	沉降
	电泳位置	原点	α_2 -球蛋白	β -球蛋白	α_1 -球蛋白
	颗粒直径(nm)	80 ~ 500	25 ~ 80	20 ~ 25	7. 5 ~ 10
组成/%	蛋白质	0. 5 ~ 2	5 ~ 10	20 ~ 25	50
	脂质	98 ~ 99	90 ~ 95	75 ~ 80	50
	三酰甘油	80 ~ 95	50 ~ 70	10	5
	磷脂	5 ~ 7	15	20	25
	胆固醇	1 ~ 4	15	45 ~ 50	20
	游离胆固醇	1 ~ 2	5 ~ 7	8	5
	酯化胆固醇	3	10 ~ 12	40 ~ 42	15 ~ 17
	apo A I	7	< 1	—	65 ~ 70
apo A II	5	—	—	20 ~ 25	

载脂蛋白 组成/%	apo IV	10	—	—	—
	apo B100	—	20 ~ 60	95	—
	apo B48	9	—	—	—
	apo C I	11	3	—	6
	apo C II	15	6	微量	1
	apo C III	41	40	—	4
	apo E	微量	7 ~ 15	<5	2
	apo D	—	—	—	3
合成部位	小肠黏膜细胞	肝细胞	血浆	肝、肠、血浆	
功能	转运外源性三酰甘油及胆固醇	转运内源性三酰甘油及胆固醇	转运内源性胆固醇	逆向转运胆固醇	

血浆游离脂肪酸与血浆清蛋白结合而运输,不列入血浆脂蛋白之内。

度各不相同。按密度由小至大的顺序,脂蛋白依次分为乳糜微粒、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、以及高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)。

超速离心法分离血浆脂蛋白在一定密度的盐溶液中进行,常采用 Svedberg 漂浮率(S_f)表示脂蛋白漂浮或下沉的特性。26 °C 时,在密度为 $1.063 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$ 的 NaCl 溶液中, $S^{-1} \cdot N^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 离心力的力场下,血浆脂蛋白每上浮 10^{-7} m 为 $1S_f$ 单位,即 $1S_f = 10^{-7} \text{ m} / (S \cdot N \cdot \text{kg})$ 。各种血浆脂蛋白的漂浮率及密度值见表 8-4。

(二) 血浆脂蛋白的组成与结构

血浆脂蛋白的种类、组成及一般特性见表 8-4。

1. 血浆脂蛋白的组成

(1) 脂质 血浆中各类脂蛋白组成的脂质相同,都包括三酰甘油、磷脂、胆固醇及胆固醇酯。但是各种脂质的含量及比例却大不相同,CM 及 VLDL 三酰甘油含量十分丰富,称为富含三酰甘油的脂蛋白(triacylglycerol-rich lipoprotein)。其中 CM 三酰甘油含量高达 80% ~ 95%,其密度最小, <0.95 ,因此,只要静置血浆,CM 即可漂浮至血浆液面的顶层。LDL 含胆固醇及胆固醇酯最多,约 45% ~ 50%。HDL 脂质含量较其他脂蛋白少,仅占一半左右,其中以三酰甘油较少,磷脂、胆固醇及其酯含量相对较多。

(2) 载脂蛋白 血浆脂蛋白中含有的蛋白质称为载脂蛋白(apolipoprotein, apo),现已发现 18 种之多,主要有 apoA、B、C、D 及 E 五类。其中 apoA 又分为 A I、A II、A IV; apoB 又分为 B100、B48; apoC 又分为 C I、C II、C III(表 8-5)。

表 8-5 人血浆载脂蛋白组成及一般特性

载脂蛋白	相对分子质量	氨基酸数	分布	功能	* 血浆含量/mg·dL (mg/dL)
A I	28 300	243	HDL	激活 LCAT, 识别 HDL 受体	123.8 ± 4.7
A II	17 500	77×2	HDL	稳定 HDL 结构, 激活 HL	33 ± 5
A IV	46 000	371	HDL, CM	辅助激活 LPL	$17 \pm 2^\Delta$
B100	512 723	4 536	VLDL, LDL	识别 LDL 受体	87.3 ± 14.3
B48	264 000	2 152	CM	促进 CM 合成	—
C I	6 500	57	CM, VLDL, HDL	激活 LCAT	7.8 ± 2.4
C II	8 800	79	CM, VLDL, HDL	激活 LPL	5.0 ± 1.8
C III	8 900	79	CM, VLDL, HDL	抑制 LPL, 抑制肝 apoE 受体	11.8 ± 3.6
D	22 000	169	HDL	转运胆固醇酯	$10 \pm 4^\Delta$
E	34 000	299	CM, VLDL, HDL	识别 LDL 受体	3.5 ± 1.2

J	70 000	427	HDL	结合转运脂质,补体激活	10 [△]
(a)	500 000	4 529	LP(a)	抑制纤溶酶活性	0~120 [△]

* 华西医科大学生物化学教研室载脂蛋白研究室对 625 例成都地区正常测定结果。

△ 国外报道参考值。

血浆各类脂蛋白中载脂蛋白的种类及含量均有较大的差异。HDL 中蛋白质约占 50% ,主要含 apoA I 及 apoA II ;LDL 中蛋白质约占 20% ~ 25% ,几乎只含有 apoB100 ;VLDL 中蛋白质占 5% ~ 10% ,除含 apoB100 外还含有 C I、C II、C III 及 E ;CM 中蛋白质含量极低 ,仅 0.5% ~ 2% ,但组成复杂 ,除 apoB48 代替 B100 外 ,其他种类的载脂蛋白几乎都含有。

近年研究表明 ,载脂蛋白在稳定脂蛋白结构 ,结合及转运脂质 ,参与识别脂蛋白受体以及调节脂蛋白代谢关键酶的活性等方面都具有十分重要的作用(见表 8-5)。

2. 血浆脂蛋白的结构

电镜观察脂蛋白呈球状颗粒结构。载脂蛋白、磷脂以及游离胆固醇构成的单分子层为脂蛋白的外壳 ,三酰甘油及胆固醇酯为其内核(图 8-16)。磷脂分子中含有磷酸、胆碱或胆胺等基团 ,解离后带正电荷 ,而游离胆固醇含有游离的极性羟基 ,因此分子中都具有亲水的极性头和疏水的非极性碳链尾。在水环境中磷脂、游离胆固醇会自发聚集成极性头朝外 ,疏水非极性尾向内的颗粒结构。此外 ,载脂蛋白 ,如 apoA I、A II、C I、C II、C III 以及 E 等均具有亲水氨基酸残基和疏水氨基酸残基交错排列形成的多个两性 α 螺旋(amphipathic α -helix)。当形成脂蛋白颗粒时 ,带电荷的亲水性氨基酸残基组成的 α 螺旋极性侧朝外 ,不带电荷的非极性氨基酸残基构成的螺旋非极性侧向内 ,与磷脂及游离胆固醇疏水尾一道 ,通过疏水键与脂蛋白内核中的三酰甘油及胆固醇酯相结合。CM 及 VLDL 富含三酰甘油 ,主要以三酰甘油为内核 ;LDL 及 HDL 则主要以胆固醇酯为内核。

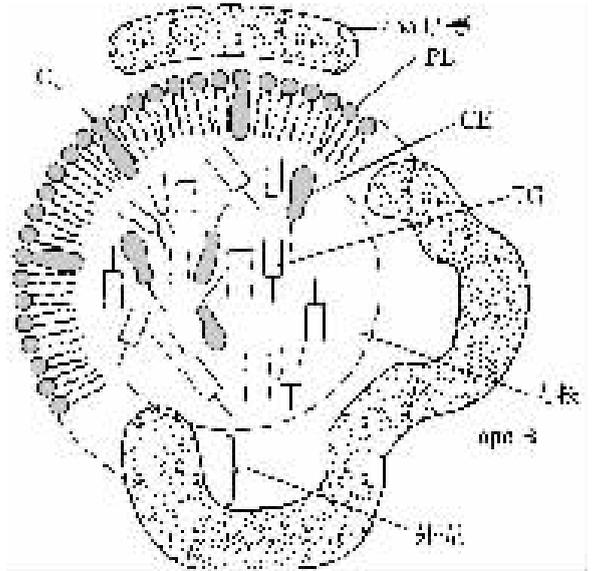


图 8-16 血浆脂蛋白的结构

三、血浆脂蛋白的代谢

(一) 乳糜微粒的代谢

CM 是富含三酰甘油的脂蛋白 ,三酰甘油含量高达 80% ~ 95%。CM 主要转运食物来源的脂质物质 ,具有为肝外组织提供外源性脂肪酸的作用。正常人 CM 代谢十分迅速 ,半衰期仅为 5 ~ 15 min ,因此空腹 12 ~ 14 h 后 ,正常人血浆不含有 CM。

CM 合成及降解过程如下。小肠黏膜细胞将食物脂肪消化吸收后再合成的三酰甘油以及磷脂、胆固醇与 apoB48、A I、A II、A IV 结合生成新生的 CM ,后者经淋巴管进入血循环。血中新生的 CM 从 HDL 分子中获得 apoC 及 E 形成成熟的 CM。CM 中的三酰甘油可被肌肉(骨骼肌、心肌)、脂肪等组织的毛细血管内皮细胞表面脂蛋白脂酶(lipoprotein lipase ,LPL)水解 ,产生的脂肪酸可供肝外组织摄取利用。LPL 是 CM、VLDL 降解的关键酶 ,CM 中的 apoC II 对此酶具有激活作用。在 LPL 反复作用下 ,CM 内核 90% 以上的三酰甘油被水解 ,同时 CM 表面的 apo A I、A II、A IV、C 连同磷脂及游离胆固醇脱落 ,转移到 HDL 颗粒上 ;CM 颗粒逐渐变小 ,最后转变成为富含胆固醇酯、apoB48 及 E 的 CM 残粒(remnant) ,后者与肝细胞膜 apoE 受体结合 ,被肝细胞摄取代谢。

通过上述过程,食物来源的脂质经 CM 转运后最终被机体组织细胞摄取利用(图 8-17)。

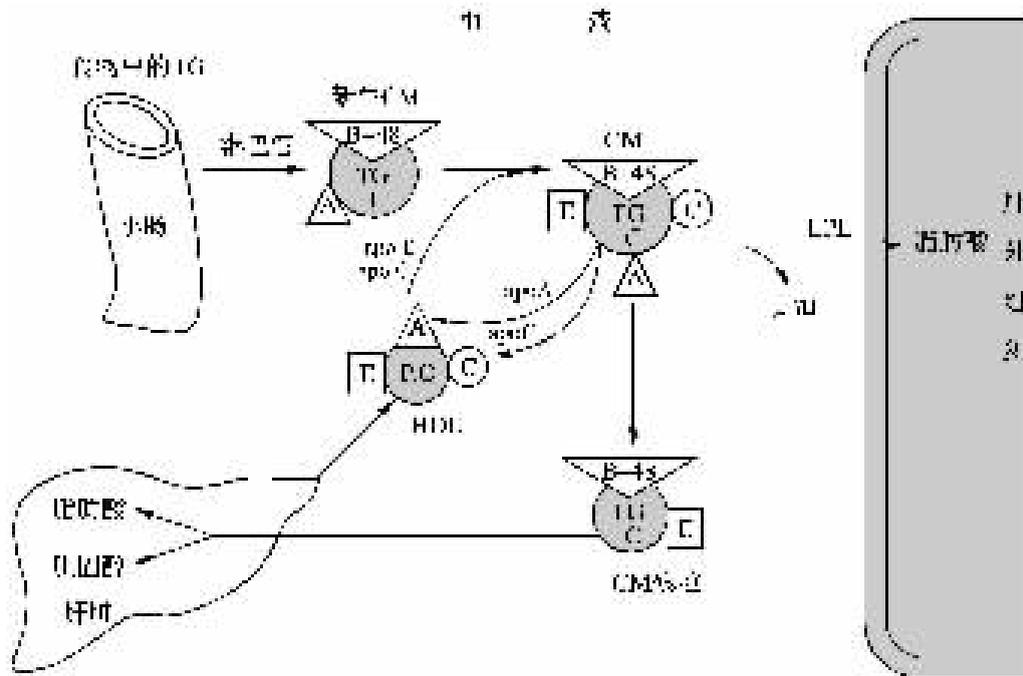


图 8-17 乳糜微粒的代谢

(二) 极低密度脂蛋白的代谢

肝、小肠黏膜细胞合成的三酰甘油、磷脂及胆固醇主要以 VLDL 的形式,经血循环转运至全身其他组织。VLDL 三酰甘油含量也很多,占 50%~70%,因此起着转运内源性三酰甘油的作用。

VLDL 合成及降解过程如下:

肝细胞可以葡萄糖为原料合成三酰甘油,也可利用食物来源的以及脂肪组织动员的脂肪酸合成三酰甘油,然后加上 apoB100、E 以及磷脂、胆固醇等生成 VLDL。此外,小肠黏膜细胞亦可合成少量的 VLDL。VLDL 可直接分泌入血,同新生的 CM 一样,也可从 HDL 获得 apoC,并激活肝外组织毛细血管内皮细胞表面的 LPL。活化的 LPL 使 VLDL 逐步水解,VLDL 颗粒逐渐变小,同时 VLDL 表面的 apoC、磷脂以及游离胆固醇与 HDL 的胆固醇酯发生交换,VLDL 中 apoB100 及 E 相对含量增加,其密度也逐渐增加,从而转变成中间密度脂蛋白(intermediate density lipoprotein, IDL)。IDL 中胆固醇与三酰甘油含量大致相等,载脂蛋白则主要是 apoB100 及 E。IDL 可与肝细胞膜 apoE 受体结合,因此部分 IDL 为肝细胞摄取代谢。未被肝细胞摄取的 IDL(人约为 50%,大鼠约为 10%)则进一步被 LPL 水解,同时其表面的 apoE 转移到 HDL,只剩下 apoB100,IDL 即转变成 LDL(图 8-18)。VLDL 在血中的半衰期为 6~12 h。

(三) 低密度脂蛋白的代谢

LDL 是由 VLDL 转变而来的一类脂蛋白,它起着转运内源性胆固醇的作用。1974 年,Michael Brown 及 Joseph Goldstein 首先在成纤维细胞膜表面发现能够特异结合 LDL 的 LDL 受体(LDL receptor)。以后发现全身各种组织,特别是肝、肾上腺皮质、卵巢、睾丸等组织均含有丰富的 LDL 受体,血浆 LDL 可以通过 LDL 受体途径被全身组织细胞摄取、利用。

LDL 受体是由 839 个氨基酸残基构成的糖蛋白,相对分子质量 160 000。LDL 受体广泛分布于全身各组织的细胞膜表面,它能特异结合含有 apoE 或 B100 的 IDL 及 LDL,故又称 apoB、E 受体。

LDL 受体途径的基本过程如下:

血浆 LDL 与细胞膜表面 LDL 受体结合后,受体 LDL 复合物聚集成簇,内吞入细胞并与溶酶体融合。在溶酶体中蛋白水解酶、胆固醇酯酶的作用下,apoB100 水解为氨基酸,胆固醇酯水解为游离胆固醇及脂肪酸。游离胆固醇不仅可以作为构成细胞膜的重要成分,也可以被肝、肾上腺、卵巢、睾丸细胞用于合成胆汁酸或类固醇激素。此外,细胞游离胆固醇含量升高还有反馈调节细胞胆固醇代谢平衡的作用。当细胞游离胆固醇升高时:①内质网 HMG CoA 还原酶受抑制,使细胞本身合成的胆固醇减少;② LDL 受体蛋白

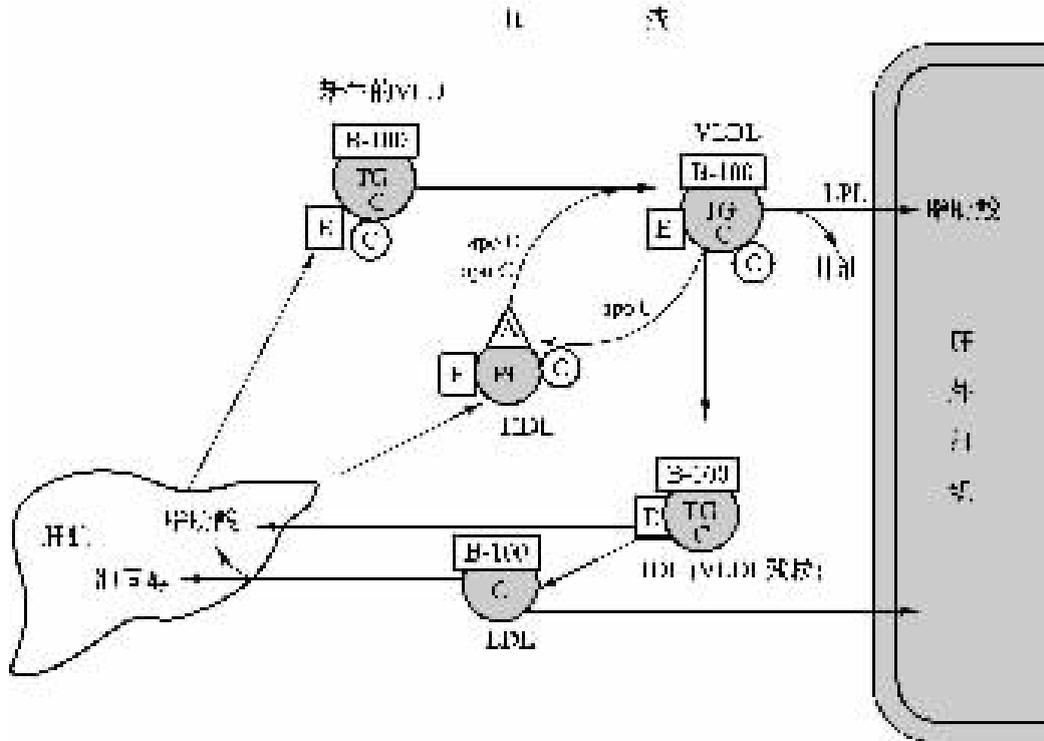


图 8-18 极低密度脂蛋白的代谢

的合成受抑制,细胞对血浆 LDL 的进一步摄取减少;③ 内质网脂酰 CoA 胆固醇脂酰转移酶(ACAT)被激活,使游离胆固醇酯化成胆固醇酯储存在胞液中(图 8-19)。由此达到细胞胆固醇的代谢平衡。

除 LDL 受体途径外,血浆中的 LDL 亦可被单核吞噬细胞系统中的巨噬细胞清除。正常人血浆 LDL 每日约有 45% 被降解清除,其中 2/3 由 LDL 受体途径降解,1/3 由巨噬细胞清除。LDL 在血浆中的半衰期为 2 d~4 d。

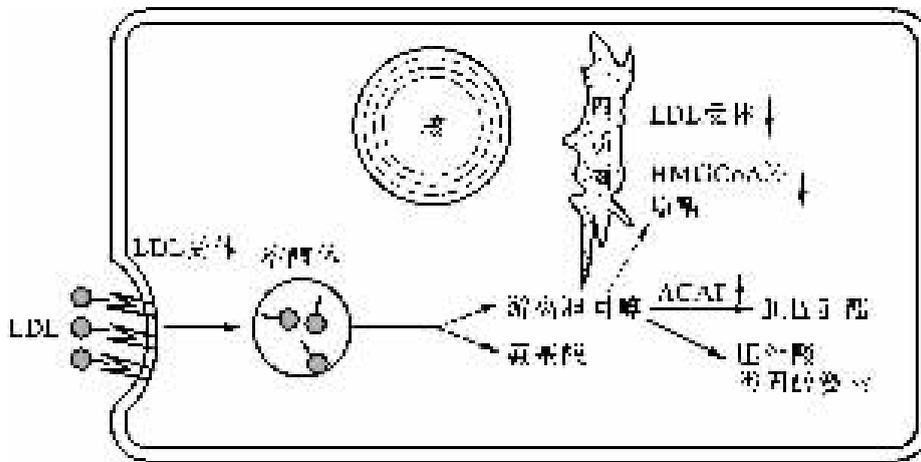


图 8-19 低密度脂蛋白受体代谢途径

(四) 高密度脂蛋白的代谢

HDL 按密度差异可以分为 HDL₁(1.019~1.063 g/cm³), HDL₂(1.063~1.125 g/cm³)及 HDL₃(1.125~1.210 g/cm³)。HDL₁ 又称为 HDL_c, 仅在摄取高胆固醇膳食时才在血中出现。此外,血浆 CM 及 VLDL 中三酰甘油被 LPL 反复水解后,其表面的 apo A I 及少量的磷脂、游离胆固醇脱落,生成前 β-HDL(>1.210 g/cm³)。正常人的血浆主要含 HDL₂ 及 HDL₃, 仅含少量的前 β-HDL。

HDL 合成与分解过程如下:

血浆 HDL 主要由肝合成, 小肠亦可合成。肝、小肠生成并分泌入血的新生 HDL 为磷脂双层圆盘状结构。圆盘状 HDL 分子中的 apoA I 具有激活血浆卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(LCAT)的作用, LCAT 活化后, 可使 HDL 分子表面卵磷脂 2 位脂酰基转移到游离胆固醇 3 位羟基生成溶血卵磷脂和胆固醇酯, 而生成的胆固醇酯再转移到 HDL 双层内部, 形成内核。由于上述过程消耗的卵磷脂及游离胆固醇可以不断从外周组织细胞的细胞膜以及血浆 CM, VLDL 中得到补充, 因此在 LCAT 反复作用下, 酯化胆固醇进入 HDL 内核逐渐增多, 双层盘状 HDL 膨胀, 逐步变成单层球状的 HDL₃。随着分子中酯化胆固醇含量的进一步增加, 再加上获得 CM 及 VLDL 水解释放出的磷脂、apoA I、A II 等, HDL₃ 最终转变成颗粒状相对较大的 HDL₂, HDL 在血中的半衰期为 3~5 d (图 8-20)。此外, 在 HDL 成熟的过程中, 成熟球状 HDL 表面的 apoC II、E 可以转移到新生的 CM 及 VLDL 上, 为 CM 及 VLDL 提供激活 LPL 所需的 apoC II。反过来 CM 及 VLDL 在所含的三酰甘油水解完后, apoC 又重新转运回到 HDL, 因此, HDL 起着 apoC 贮存库的作用。

HDL 主要在肝降解, 成熟的 HDL 可能通过与肝细胞膜上的 HDL 受体结合, 然后被肝细胞摄取。肝细胞中胆固醇酯水解生成的游离胆固醇可以合成胆汁酸, 部分游离胆固醇也可以随胆汁直接排到肠腔。除此以外, HDL 内核的胆固醇酯, 还可在血浆胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)的作用下, 转移至 VLDL 及 LDL, 再通过 IDL 及 LDL 被肝最后清除。

由此可见, HDL 在 LCAT、CETP 等的作用下将外周组织的胆固醇直接或间接转运到肝进行代谢。这个过程与 LDL 将肝合成的胆固醇转运到外周组织, 供外周组织利用的过程正好相反, 故称为胆固醇逆向转运(reverse cholesterol transport, RCT)。

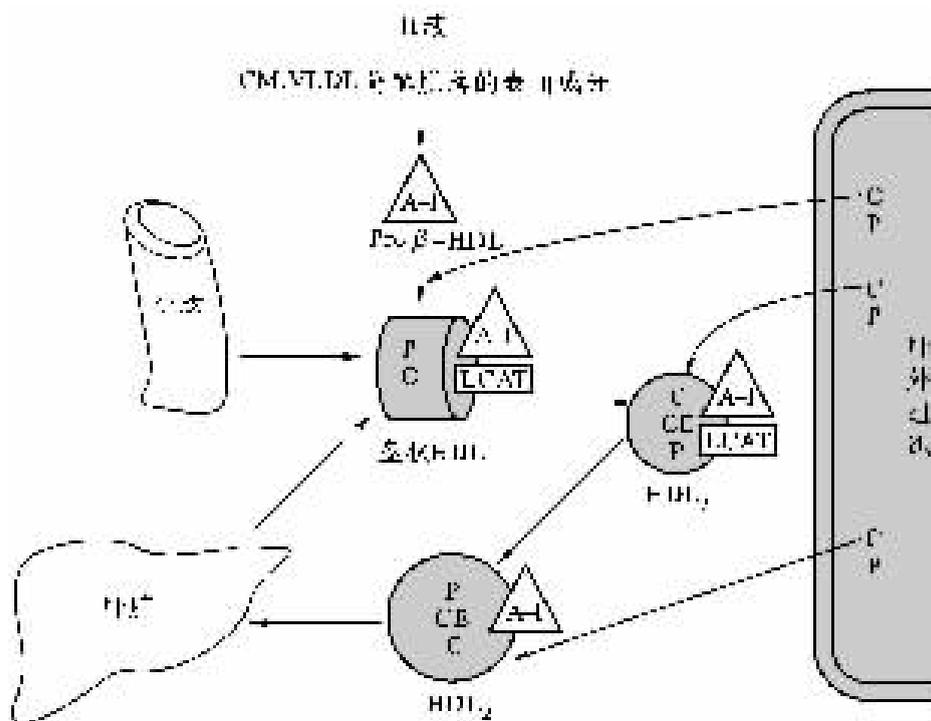


图 8-20 高密度脂蛋白的代谢

(五) 血浆脂蛋白代谢异常

血浆脂质及脂蛋白含量受年龄、性别、劳动状况、膳食组成以及遗传因素等的影响。变化较大, 如含量超过正常人血脂水平的上限即为高脂血症。由于血脂以脂蛋白的形式运输, 高脂血症实际上也是高脂蛋白血症(hyperlipoproteinemia)。血脂含量正常参考值因种族、地区以及测量方法不同而有差异。一般成人以空腹 12~14 h, 血清三酰甘油 $\geq 2.26 \text{ mmol/L}$ (200 mg/dL), 胆固醇 $\geq 6.21 \text{ mmol/L}$ (240 mg/dL), 儿童胆固醇 $\geq 4.14 \text{ mmol/L}$ (160 mg/dL) 为判断高脂血症的标准。

高脂血症可按脂蛋白电泳图谱进行分型。1970 年世界卫生组织(WHO)建议将高脂血症分为六型,

其血脂、脂蛋白的含量变化见表 8-6。

表 8-6 高脂血症分型

分 型	血 脂 变 化	脂蛋白变化
I	三酰甘油 ↑ ↑ ↑ 胆固醇 ↑	乳糜微粒增高
II a	胆固醇 ↑ ↑	低密度脂蛋白增高
II b	胆固醇 ↑ ↑ 三酰甘油 ↑ ↑	低密度及极低密度脂蛋白同时增加
III	胆固醇 ↑ ↑ 三酰甘油 ↑ ↑	中间密度脂蛋白增加(电泳出现宽β带)
IV	三酰甘油 ↑ ↑	极低密度脂蛋白增加
V	三酰甘油 ↑ ↑ ↑ 胆固醇 ↑	极低密度脂蛋白及乳糜微粒同时增加

高脂血症亦可按血脂变化特征分为高胆固醇血症、高三酰甘油血症以及复合性高脂血症。

此外,高脂血症可以分为原发性和继发性两大类。继发性高脂血症是继发于其他疾病,如糖尿病、甲状腺功能减退、肾病综合征、胆石症等。原发性高脂血症是指原因不明或遗传缺陷所造成的高脂血症。例如,LPL 基因缺陷造成 CM 清除障碍的 I 型高脂蛋白血症;LDL 受体缺陷造成的家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH);载脂蛋白 C II、B、A I、C III 及 E 基因缺陷也会引起血浆脂质代谢的异常与紊乱。

高脂血症是动脉粥样硬化、冠心病发生发展的重要危险因素,因而阐明高脂血症发生的分子机理十分重要。Michael Brown 及 Joseph Goldstein 在 LDL 受体研究上已取得重大突破。他们不仅阐明了 LDL 受体的结构和功能,而且证实 LDL 受体遗传缺陷是引起家族性高胆固醇血症的根本原因。LDL 受体缺陷是常染色体显性遗传,纯合子细胞膜上 LDL 受体完全缺乏,杂合子受体数目减少一半,血中 LDL 不能通过 LDL 受体途径被细胞摄取利用。纯合子及杂合子血浆胆固醇分别高达 15.4 ~ 30.7 mmol/L 及 7.8 ~ 10.3 mmol/L。纯合子患者在童年期,杂合子患者 30 ~ 40 岁,极有可能患冠心病。

Summary

The lipids are a chemically diverse group of compounds with the common and defining feature of being relatively insoluble in water but soluble in nonpolar solvents. Biological lipids consist of triacylglycerol (fat), phospholipids, glycolipids, cholesterol and its esters, etc. The biological functions of the lipids are also diverse. Triacylglycerols are the principal storage forms of energy in animals, phospholipids and sterols make up the major structural constituents of biomembranes, other lipids and their derivatives play crucial roles as emulsifying agents, hormones and other physiologically active compounds.

Triacylglycerol is the main storage lipids in adipose tissue. The liberation of its hydrolytic products as the forms of free fatty acids and glycerol under the catalysis of hormone-sensitive lipase and other lipases is termed fat mobilization. Free fatty acids are bound to serum albumins for the transportation to the tissue, where they are used as an important fuel source. The oxidation of fatty acids takes place in mitochondrial matrix by the process of β -oxidation. Carnitine is an important compound for transferring long chain fatty acyl CoA across the inner mitochondrial membrane. β -oxidation contains four recurring steps: dehydrogenation, hydration, rehydrogenation and thiolytic cleavage, and two-carbon units are successively removed from the carboxyl end of the fatty acid to produce acetyl CoA. The ketone bodies (acetoacetate, β -hydroxybutyrate and acetone) are formed from acetyl-CoA in hepatic mitochondria. Liver can produce ketones but can't utilize them. Ketones must be transported to extrahepatic tissues for utilization. Ketones are important fuels in muscles and brain tissues especially

when starving. Fatty acid biosynthesis occurs in the cytosol, and is catalyzed by an ordered multienzyme complex including 7 enzyme activities and an acyl carrier protein. The requirements for the synthesis of palmitic acid are acetyl-CoA, reduced NADP, ATP, HCO_3^- . Acetyl CoA carboxylase, which catalyzes the formation of malonyl CoA from acetyl CoA, is a key enzyme for controlling fatty acid synthesis.

Polyunsaturated fatty acids including linoleic acids, linolenic acids, and arachidonic acids, are essential fatty acids. Eicosanoids are formed by 20-carbon polyunsaturated fatty acids and make up an important group of compounds known as prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes.

There are two types of phospholipids: phosphoglycerides and sphingomyelins. CTP involves the activation of some components, such as CDP-choline, CDP-ethanolamine, CDP-DG.

Cholesterol is the precursor of all other steroids in the body such as corticosteroids, sex hormones, bile acids and vitamin D_3 . Cholesterol can be synthesized in the body entirely from acetyl-CoA. HMG-CoA reductase is a very important enzyme for regulating the biosynthesis of cholesterol through allosteric regulation, chemical modification, induction and repression of this enzyme. Hormones and dietary cholesterol are also critical in controlling the level of cholesterol in vivo.

Plasma lipoproteins are the transportation forms of plasma lipids, and are classified according to their densities by ultracentrifugation or rates of electrophoretic migration. Chylomicrons transport dietary triacylglycerol and cholesteryl esters from the intestine to the tissues. VLDLs transport endogenous triacylglycerols to extrahepatic tissues. As VLDLs travel through blood vessels, they are converted to LDLs. LDLs are engulfed by cells after binding to LDL receptors on the plasma membranes. HDL, also produced in the liver, scavenges cholesterol from cell membranes and other lipoproteins, and plays the role of transporting cholesterol from extrahepatic tissues to liver. Apolipoproteins constitute the protein moiety of lipoproteins. They act as activators of enzymes (eg. apoC II and apoA I) or as ligands cell receptors (e. g. apoB₁₀₀, apoE and apoA I).

思 考 题

1. 脂质消化吸收有何特点？与糖类的消化吸收有什么不同？
2. 什么是脂肪动员？影响脂肪动员的因素有哪些？
3. 什么是脂肪酸的 β -氧化？基本过程和特点是什么？
4. 酮体是怎样生成和利用的？主要生理功能是什么？
5. 脂肪酸合成与脂肪酸氧化分解反应的差异和特点是什么？
6. 20碳多不饱和脂肪酸衍生物主要有哪些？
7. 主要的甘油磷脂有哪些？合成与降解的特点是什么？
8. 鞘磷脂与鞘糖脂在组成、结构及功能上有何主要差异？
9. 胆固醇合成与转化有何特点？维持机体胆固醇平衡的主要因素有哪些？
10. 各种血浆脂蛋白的组成、结构、功能以及代谢的特征是什么？

(付明德)

第九章 蛋白质的分解代谢

本章教学要求

- 蛋白质的营养价值与氮平衡
- 外源蛋白质的消化、吸收与腐败
- 氨基酸的分解、氨基酸脱氨基的方式
- α -酮酸的代谢去路
- 血氨的运输、代谢去路
- 尿素的生成过程
- 一碳单位、蛋氨酸循环
- 蛋氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸的特殊代谢衍生物

蛋白质的代谢包括合成代谢和分解代谢,本章仅讨论蛋白质的分解代谢。由于蛋白质的基本组成单位是氨基酸,因此蛋白质的分解代谢除简要介绍蛋白质降解为氨基酸的途径之外,主要讨论氨基酸的分解代谢。在体内,氨基酸的分解、组织蛋白质的更新都需要食物蛋白质来维持,故在讨论氨基酸分解代谢之前,首先介绍蛋白质的营养作用。

第一节 蛋白质的营养作用

蛋白质是生物体最基本的有机成分,又是物质代谢及生命活动过程中起重要作用的物质。蛋白质在塑造细胞、组织和器官以及催化、运输、运动、兴奋性的表达、生长、分化和调控等方面都有极重要的功能。同时,蛋白质在体内氧化分解过程中也释放出能量(16.7 kJ/g 蛋白质)供机体应用(这一功能可由糖或脂肪来代替),因此,必须经常从食物中摄入足够质和量的蛋白质,才能维持正常代谢和保证各种生命活动的顺利进行。

一、人体氮平衡及对蛋白质的需要量

(一) 氮平衡

人体必须经常补充足够质和量的蛋白质才能维持正常的生理活动。常用于确定人体蛋白质需要量的方法为氮平衡法(nitrogen balance method),因蛋白质的元素组成特点是其含氮量较为恒定,多种混合蛋白质的含氮平均值约为16%。食物中的含氮物质绝大部分是蛋白质,非蛋白质含氮物的含量较少,可以忽略不计。蛋白质经分解代谢所产生的含氮物质主要由尿、粪排出。所以,测定每天蛋白质中氮的摄入量与尿及粪中排氮量,即可得出机体的氮平衡状况。氮平衡有以下几种类型:

1. 氮的总平衡

摄入氮 = 排出氮,即摄入蛋白质的量等于排出量称为氮的总平衡(nitrogen balance)。反映正常成人的蛋白质代谢状态。

2. 氮的正平衡

摄入氮 > 排出氮,称为氮的正平衡(positive nitrogen balance)。摄入的部分蛋白质用于合成体内的蛋

白质。此种氮平衡情况常见于婴幼儿、青少年、孕妇、乳母以及病后恢复期患者。

3. 氮的负平衡

摄入氮 < 排出氮,称为氮的负平衡(negative nitrogen balance)。常见于膳食中蛋白质的质欠佳或量不足,或体内蛋白质长期大量耗损,如饥饿、营养不良、消耗性疾病、大面积烧伤及大量失血等情况。

(二) 蛋白质的生理需要量

体内蛋白质要不断更新,如果进食不含蛋白质的食物,尿中仍不断排出含氮的代谢产物。8~10 d后,其排氮量逐渐恒定,每天排氮量约为53 mg/kg体重,以60 kg体重计算,每日蛋白质最低分解量约为20 g。但每天进食20 g蛋白质却不能维持氮的总平衡,主要原因是食物蛋白质与人体蛋白质有着质的差异,其利用率不可能达到百分之百。1985年世界卫生组织专家委员会确定并推荐成年男性蛋白质需要量为每日每千克体重需0.75 g优质蛋白质(肉、鱼、乳、蛋等)。成年女性则应根据其特殊生理需要(如妊娠或哺乳等情况)适当补充优质蛋白质。中国营养学会根据我国人民膳食习惯与膳食构成以植物性食物为主的特点,按动、植物蛋白之比为30:70混合膳食计算,推荐从事中等体力劳动、体重65 kg的成年男子,每日蛋白质的安全摄入量约为80 g。对于孕妇、乳母、脑力劳动或强体力劳动者,蛋白质的需要量必须相应增加。但机体不能贮存蛋白质,食入的过量蛋白质将转变为糖、脂及氧化供能。

二、蛋白质的营养价值

(一) 必需氨基酸与非必需氨基酸

体内蛋白质种类繁多,而它们的基本结构单位氨基酸只有20种。根据这20种氨基酸分别对动物的营养缺乏实验及对人体短期氮平衡实验,可将其分为必需氨基酸和非必需氨基酸两大类。

必需氨基酸(essential amino acid)为机体所需要,但又不能在体内合成,必须由食物供应的氨基酸。这类氨基酸有8种:缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸和色氨酸。如缺少其中任何一种都会引起氮的负平衡。此外,组氨酸在体内合成量不多,精氨酸合成后迅速分解,生长发育迅速的儿童易缺乏这两种氨基酸,因此,有人将组氨酸和精氨酸也列为营养必需氨基酸。

非必需氨基酸(nonessential amino acid)是指除必需氨基酸以外的其他氨基酸。这类氨基酸在营养和代谢上与必需氨基酸同样重要,只是它们可在体内合成,不一定必须由食物蛋白质供给。其中有的氨基酸在体内虽可自行合成,但要以必需氨基酸为原料,如酪氨酸与半胱氨酸,分别来自苯丙氨酸及蛋氨酸。食物中补充这类氨基酸可减少对必需氨基酸的需要量,故有人将它们称为半必需氨基酸。

(二) 蛋白质的营养价值

蛋白质的营养价值不仅要注意食入蛋白质的量,而且要注意蛋白质的质。必需氨基酸种类齐全、数量充足的蛋白质营养价值高,否则营养价值低。一般来说,动物蛋白质所含必需氨基酸的种类和数量与人体需要相近,才易为人体利用。

植物蛋白质中往往一种或几种必需氨基酸含量较低或缺乏,故单独食用则营养价值较低,如混合食用几种营养价值较低的蛋白质,则必需氨基酸可以互相补充,从而提高蛋白质的营养价值,称为食物蛋白质的互补作用(complementary effect)。例如,谷类蛋白质中赖氨酸较少而色氨酸较多,而大豆蛋白质则与之相反,如将谷类与大豆蛋白质混合食用,可使必需氨基酸互相补充,提高营养价值。故提倡食物多样化,并注意合理搭配。

用同位素¹⁵N标记氨基酸进行示踪实验表明,60 kg体重的成人每天更新蛋白质约140 g~300 g。其中,更新量的大约1/3需由食物蛋白质补充,其余2/3则来自氨基酸代谢库。

第二节 外源蛋白质的消化、吸收与腐败

一、蛋白质的消化

蛋白质未经消化不易吸收,如异物蛋白质直接进入人体,则会引起过敏现象,产生毒性反应。口腔不能消化蛋白质,蛋白质的消化是指蛋白质在胃及肠道内经多种蛋白酶及肽酶协同作用水解为氨基酸及小肽后再被吸收。

(一) 胃内消化

胃黏膜主细胞所分泌的胃蛋白酶原(pepsinogen)在胃内经盐酸或胃蛋白酶本身激活(自身催化作用, autocatalysis)而生成胃蛋白酶。胃蛋白酶的最适pH为1.5~2.5, pH 6时失活。胃蛋白酶对肽键作用的特异性较差,主要水解由芳香族氨基酸的羧基所形成的肽键,由于食物在胃中停留时间短,对蛋白质消化不完全,产物主要为多肽及少量氨基酸。胃中酸性环境可使蛋白质变性而有利于水解。此外,胃蛋白酶还具有凝乳作用,使乳中酪蛋白转化并与Ca²⁺凝集成凝块,使乳汁在胃中停留时间延长,有利于乳汁中蛋白质的消化,这对婴幼儿较重要。

(二) 小肠内消化

小肠是蛋白质消化的主要场所。在小肠内,胰腺和肠黏膜细胞分泌的多种蛋白水解酶和肽酶的作用下蛋白质被消化。

1. 胰液中的蛋白酶

小肠中蛋白质的消化主要由多种胰蛋白酶与肽酶完成。胰液中的蛋白酶可分为两类:

(1) 内肽酶 内肽酶(endopeptidase)催化肽链内部肽键的水解,包括胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶(又称糜蛋白酶)及弹性蛋白酶。这些蛋白酶以酶原的形式从胰腺细胞分泌出来,进入十二指肠后才被激活。胰蛋白酶主要水解由碱性氨基酸羧基构成的肽键,胰凝乳蛋白酶主要水解由芳香族氨基酸羧基构成的肽键,弹性蛋白酶主要水解由脂肪族氨基酸羧基构成的肽键。产物主要为寡肽及少量氨基酸。

(2) 外肽酶 外肽酶(exopeptidase)特异地水解蛋白质或多肽末端的肽键。它包括羧基肽酶A及B两种。前者主要水解除脯、精、赖等氨基酸以外的多种氨基酸残基组成的C-端肽键。羧基肽酶B主要水解由碱性氨基酸组成的C-端肽键。每次水解脱去C-端一个氨基酸。

2. 肠液中肠激酶的作用

分布在肠黏膜细胞表面的肠激酶(enterokinase)被胆汁酸激活后,能使胰蛋白酶原激活为胰蛋白酶。然后胰蛋白酶又激活胰凝乳蛋白酶原、弹性蛋白酶原及羧基肽酶原。胰蛋白酶还具有自身催化作用,可激活胰蛋白酶原,但体内这种自身催化作用较弱。

在胰腺中胰蛋白酶除以无活性的酶原形式存在外,胰液中还有胰蛋白酶抑制剂(小分子肽)可中和未分泌出的胰蛋白酶的活性,这对于保护胰腺组织免受蛋白酶的自身消化作用具有重要的生理意义。

3. 小肠黏膜细胞的消化作用

蛋白质经胃液和胰液中蛋白酶的陆续水解,最后的产物大部分是寡肽(二肽~十肽),只有小部分是氨基酸。小肠黏膜细胞及胞液中存在两种寡肽酶(oligopeptidase):氨基肽酶(aminopeptidase)及二肽酶(dipeptidase)。氨基肽酶从氨基末端逐步水解寡肽,最后生成二肽。二肽再经二肽酶的水解,最终产生氨基酸。因此,寡肽的水解主要是在小肠黏膜细胞内进行的。

二、氨基酸的吸收和转运

在胃及肠中一般食物蛋白质在各种蛋白水解酶催化下95%可以被水解。蛋白质的消化产物主要是

氨基酸及一些小肽。氨基酸、二肽和三肽可直接在小肠内被吸收。

遗传学、转运实验和分子克隆研究证明,由于氨基酸侧链结构的差异,主动转运氨基酸的转运蛋白也不相同。在小肠黏膜的刷状缘至少有七种转运系统负责 L-氨基酸和小肽的吸收。它们都是载体介导的转运(carrier-mediated transport)。这七种转运蛋白(transporter)分别参与不同氨基酸的吸收,它们是:中性氨基酸转运蛋白(分为极性与疏水性两种)、碱性氨基酸转运蛋白、酸性氨基酸转运蛋白、亚氨基酸转运蛋白、 β -氨基酸转运蛋白及二肽与三肽转运蛋白。其中,有与葡萄糖吸收相似的需 Na^+ 耗能的主动转运过程。在这种吸收过程中,首先氨基酸与 Na^+ 和转运蛋白结合,结合后转运蛋白质构象发生改变,从而使氨基酸与 Na^+ 转入肠黏膜上皮细胞内。为了维持细胞 Na^+ 的低浓度,再由钠泵将 Na^+ 泵出细胞,此过程需分解 ATP 以供应能量。氨基酸的这种吸收方式与葡萄糖的吸收方式相似。氨基酸在跨膜运输过程中不伴有化学修饰。

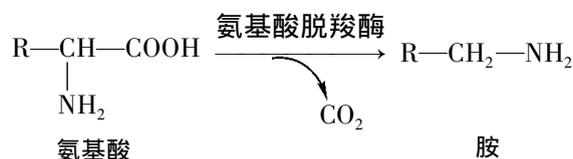
上述氨基酸的主动转运过程不仅存在于小肠黏膜细胞,类似的作用也存在于肾小管细胞及肌肉细胞的细胞膜。这对于细胞浓集和利用氨基酸可能具有普遍意义。

三、肠内腐败作用

肠道中各种细菌占粪便重量的 $1/3 \sim 2/5$ 。肠道细菌的腐败作用(putrefaction)是指食物中未被消化的蛋白质(约占食物蛋白质的 5%)及未被吸收的氨基酸,在肠道细菌(主要是大肠杆菌)的作用下产生一系列产物的过程。腐败作用是细菌本身对氨基酸及蛋白质的代谢作用。腐败作用的产物中有些有一定营养价值,如维生素 K、泛酸、生物素、叶酸及维生素 B_{12} 等。其他大多数腐败产物对人体有害,如胺类、酚类、吲哚、硫化氢、氨等。

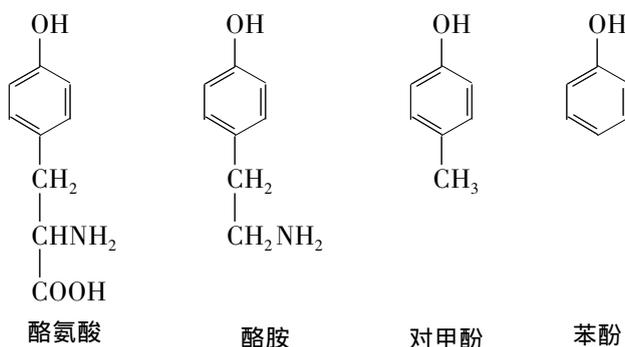
(一) 胺的生成

肠道细菌的蛋白酶对未被消化的蛋白质、失活的酶及脱落上皮细胞等进行水解,产生氨基酸。氨基酸再经脱去羧基即产生胺类(amines)。如组氨酸脱羧产生组胺,赖氨酸脱羧生成尸胺,酪氨酸脱羧生成酪胺,色氨酸脱羧产生色胺等。组胺与尸胺有降压作用,酪胺及色胺有升压作用。胺类物质被吸收后,主要在肝内进行分解转化而解毒。当肝功能不好时,胺类将进入脑内,抑制大脑功能,这可能与肝昏迷时出现的神经症状有关。



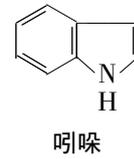
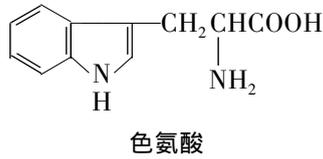
(二) 酚类的生成

酪氨酸经脱羧基、脱氨基及氧化等作用,最后生成苯酚及对甲酚等有害物质。



(三) 吲哚及甲基吲哚的生成

由色氨酸分解产生吲哚及甲基吲哚,二者是粪便臭味的主要来源。

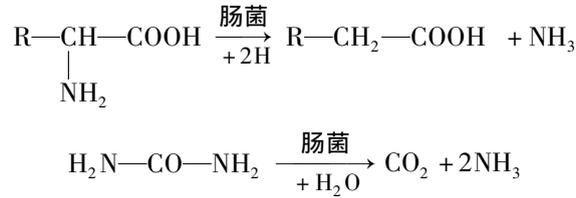


(四) 硫化氢的产生

半胱氨酸在肠菌作用下,可分解成硫醇、硫化氢及甲烷等。

(五) 氨的生成

肠道细菌对氨基酸的还原性脱氨基作用可产生氨(ammonia)。此外,由血液扩散入肠腔的尿素及未被吸收的精氨酸经细菌作用产生的尿素,都可经肠菌尿素酶的分解而产氨。



肠道内产生的氨主要在结肠吸收入血,是血氨的主要来源之一。由肠道吸收的氨运输至肝所合成的尿素相当于正常人每天排出尿素总量的1/4。严重肝功能障碍的病人,因不能及时处理吸收入体内的氨及其他毒性腐败产物,常发生肝昏迷。故对这类患者应采取措施,如控制蛋白质摄入量,抑制肠菌生长以减少肠道氨的产生和吸收。

第三节 体内蛋白质的降解

人体内的蛋白质处于分解与合成的动态平衡之中,正常成人每日约更新整体总蛋白质量的1%~2%。其中,主要为肌肉蛋白质的分解,其降解释放的氨基酸约有75%~80%再被用于合成新的蛋白质。体内各种组织蛋白的更新速率很不一致,它们的半衰期相差很悬殊,更新速率快的蛋白质的半衰期仅为数秒钟或几小时(如肝细胞中的某些酶,尤其关键酶);中等速率更新的蛋白质的半衰期约为10d(如肝细胞中的大部分蛋白质、血浆中的多种蛋白质等);也有一些组织蛋白质的更新速率较慢,其半衰期常超过数月(如结缔组织中的胶原蛋白、核内的组蛋白等)。各种蛋白质更新率的调节机制目前尚不清楚。有研究发现,富含脯、谷、丝及苏氨酸序列(称PEST顺序)模体的蛋白质,其半衰期都较短,这可能与其更新调控机制有关。

催化组织细胞内蛋白质降解的酶为细胞内蛋白酶类和肽酶类。真核细胞组织蛋白降解的途径根据降解部位的不同,可分为溶酶体途径和胞液途径两种。

一、组织蛋白降解的溶酶体途径

组织蛋白降解的溶酶体途径无需ATP的参与,故又称之为非ATP依赖性蛋白质降解途径。通过这一途径降解的蛋白质主要是一些膜结合蛋白、胞内长半衰期蛋白质及细胞外的蛋白质。溶酶体内含多种酸性水解酶,溶酶体内的酸性环境与其膜上存在的质子泵有关。酸性水解酶包含有多种蛋白酶,称为组织蛋白酶类(cathepsins)。细胞内的蛋白质降解时,溶酶体先将有关蛋白质包裹入其中,进而体积扩大形成自体吞噬空泡(autophagic vacuole),被包入的蛋白质即可在酶类的催化下水解,最终降解成游离氨基酸。细胞外的蛋白质(如血液中的LDL、胰岛素等)需与有关的质膜受体结合后,转入细胞内,再与溶酶体融合成次级溶酶体,进而在溶酶体内降解。血液循环中的一些糖蛋白需先在唾液酸酶的作用下,使其糖链末端的唾液酸基水解脱下后,才被肝细胞质膜上有关受体识别、结合,并融入细胞溶酶体内,在酶促下降解。

二、组织蛋白降解的胞液途径

胞液中也有多种蛋白水解酶存在,一些蛋白质也能在胞液中经酶促降解成氨基酸。组织蛋白降解的胞液途径有下列明显的特征:催化蛋白质水解需有 ATP 参与,故此途径又被称为 ATP 依赖性蛋白质降解途径。这一途径中的蛋白水解酶类的最适 pH 为 7.8,称碱性蛋白酶类、通过此途径降解的蛋白质为异常蛋白质(如氨基酸序列异常的蛋白质)及损伤(如被氧化)的蛋白质和细胞内短半衰期的蛋白质、蛋白质泛素化是易被降解的标志。

泛素或称泛肽(ubiquitin)是一种广泛存在于真核细胞中的耐热小分子肽(76 肽,相对分子质量 8 500),蛋白质与泛素结合称为泛素化(ubiquitination):有 ATP 存在时,在有关的三种酶(酶 1 为泛素活化酶,酶 2 为泛素结合酶,酶 3 为泛素-蛋白质连接酶)催化下,泛素 C-端的甘氨酸可被活化,与多个泛素及底物蛋白质分子中赖氨酸残基的 ϵ -NH₂ 以酰胺键结合,即泛素化。易于泛素化的蛋白质则易被碱性蛋白酶水解。不同蛋白质泛素化的速率不同,蛋白质泛素化的难易取决于该蛋白质 N-端氨基酸残基的特点:N-端为亮氨酸、苯丙氨酸、精氨酸等残基的蛋白质易泛素化;N-端为蛋氨酸、丝氨酸等残基的蛋白质泛素化慢。泛素化使蛋白质与多个泛素结合成一大分子。然后蛋白质在蛋白酶复合体(称蛋白酶体,proteasome)内被降解,释出氨基酸及泛素。(图 9-1)

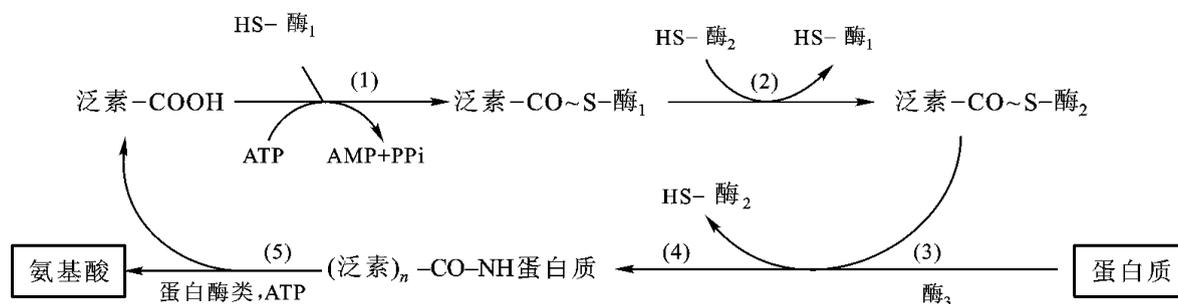


图 9-1 蛋白质降解的胞液途径

- (1) HS-酶₁ 使泛素活化;(2) 泛素与 HS-酶₂ 结合;(3) 底物蛋白质的初步活化;
(4) 蛋白质泛素化;(5) 泛素化蛋白质在蛋白酶催化下水解

第四节 氨基酸的一般代谢

膳食中的蛋白质经消化、吸收后,以氨基酸的形式经血液循环进入全身各组织,用以合成组织蛋白质。组织中原有的蛋白质又经常降解为氨基酸,体内还可合成一部分非必需氨基酸。这两种不同来源的氨基酸(外源性的和内源性的)混合,存在于细胞内液和细胞外液等各种体液中,称为氨基酸的代谢库(metabolic pool)。氨基酸的主要功用是合成蛋白质和肽类,以及转变成某些含氮物质。此外,一部分氨基酸可转变为糖、脂肪和彻底分解氧化供能。氨基酸有共同的代谢方式,即本节所述氨基酸的一般代谢。但因氨基酸结构的差异,也有个别的代谢方式。

氨基酸的来源与去路如图 9-2。

一、氨基酸的脱氨基作用

氨基酸分解代谢最首要的反应是脱氨基作用(deamination)。氨基酸可以通过氧化脱氨基、转氨基、联合脱氨基及其他脱氨基方式脱去氨基而生成 α -酮酸,然后进一步代谢。其中以联合脱氨基作用最重要。

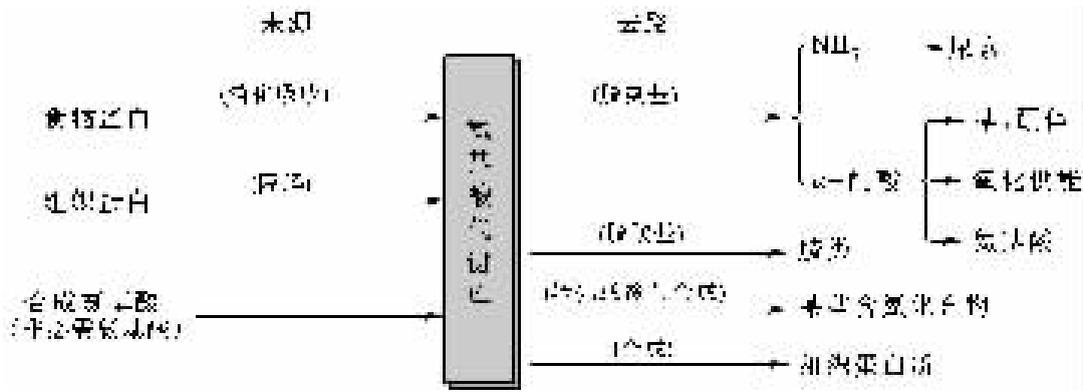
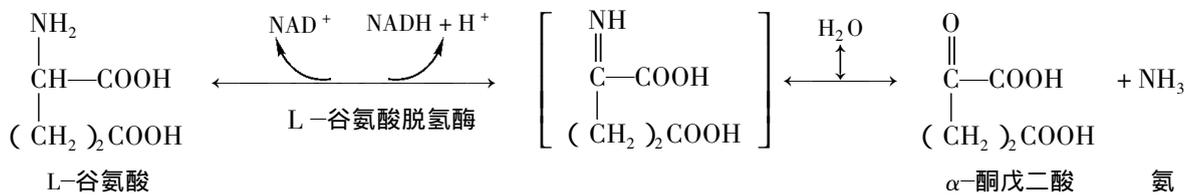


图9-2 氨基酸的来源与去路

(一) 氧化脱氨基作用

氨基酸先经脱氢生成不稳定的亚氨基酸,然后水解产生 α -酮酸和氨,此反应称为氧化脱氨基作用(oxidative deamination)。催化氧化脱氨基作用的酶有氨基酸氧化酶和谷氨酸脱氢酶,其中以谷氨酸脱氢酶最为重要。

谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase)是以 NAD^+ (或 NADP^+)为辅酶的不需氧脱氢酶。在体内分布广泛,活性强,它催化谷氨酸脱氢生成 α -酮戊二酸及氨,反应过程如下式:



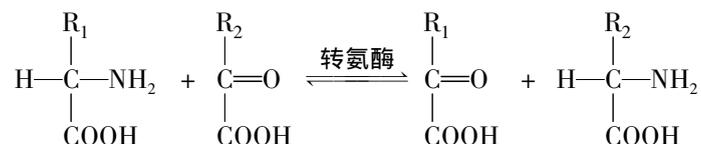
L-谷氨酸脱氢酶催化的反应是可逆反应,由于分布广泛,活性强(肌肉除外),再加上它与转氨酶的协同作用,几乎可催化所有氨基酸的脱氨基作用。其逆反应的产物谷氨酸的氨基又可转移到一些 α -酮酸上,生成相应的氨基酸。因此,谷氨酸脱氢酶对体内非必需氨基酸的合成也起重要作用。

谷氨酸脱氢酶是一种变构酶,它含有六个相同的亚基。其活性可受变构调节,已知GTP和ATP是此酶的变构抑制剂,而GDP和ADP则是变构激活剂。因此当体内GTP和ATP不足时,即能促进谷氨酸加速氧化。这对于氨基酸氧化供能起重要的调节作用。

(二) 转氨基作用

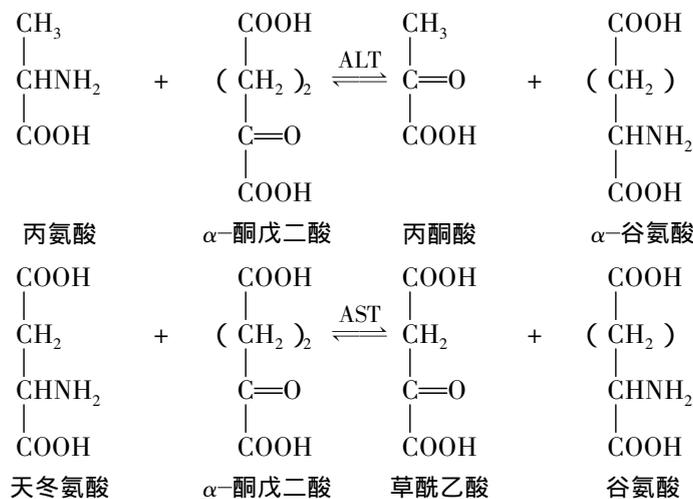
1. 转氨酶及转氨基反应

体内各组织都有氨基转移酶(aminotransferase)或称转氨酶(transaminase)。此酶催化氨基酸的 α -氨基转移至另一 α -酮酸上,此反应称为转氨基作用(transamination):



转氨酶所催化的反应是可逆的。不仅可促使氨基酸转移出氨基,而且 α -酮酸可通过此酶的作用接受氨基酸转来的氨基而合成相应的氨基酸,这是体内合成氨基酸的重要途径。

用 ^{15}N 标记的氨基酸进行示踪实验证明,体内大多数氨基酸都可进行转氨基反应(赖、苏脯氨酸除外),并各有其特异的转氨酶,但是各种转氨酶活性不同,其中以多种氨基酸与 α -酮戊二酸之间的转氨酶最为重要。如丙氨酸 α -酮戊二酸氨基转移酶(简称丙氨酸转氨酶,alanine transaminase,ALT)或谷丙转氨酶(GPT)和天冬氨酸 α -酮戊二酸氨基转移酶(简称天冬氨酸转氨酶,aspartate transaminase,AST)或谷草转氨酶(GOT)就是两种重要的转氨酶。它们所催化的反应分别为:



ALT 与 AST 在体内各组织中广泛存在。其分布情况如表 9-1。

表 9-1 ALT 和 AST 在某些组织的含量

组 织	AST 单位/g 湿组织	ALT 单位/g 湿组织
心	156 000	7 100
肝	142 000	44 000
骨骼肌	99 000	4 800
肾	91 000	19 000
胰腺	28 000	2 000
脾	14 000	1 200
肺	10 000	700
血清	20	16

转氨酶只分布在细胞内，正常血清中含量甚少。当因某种原因使细胞膜的通透性增高或组织坏死、细胞破裂时，有大量转氨酶释放入血，造成血清中转氨酶活性明显升高。例如，在急性肝炎病人的血清中，ALT 活性显著升高。在心肌梗死时血清中 AST 明显上升。因此在临床上测定血清中的 ALT 或 AST 既有助于诊断，也可作为观察疗效和预后的指标之一。

2. 转氨基反应的机制

转氨酶的辅酶是磷酸吡哆醛及磷酸吡哆胺（维生素 B₆ 的磷酸酯）。辅酶在转氨酶催化的反应中作为氨基传递体发挥作用。在转氨酶催化下，其辅酶磷酸吡哆醛从氨基酸接受 α-氨基变成磷酸吡哆胺，氨基酸则变成相应的 α-酮酸。进而在酶的作用下，磷酸吡哆胺以相同方式将氨基转移给另一个 α-酮酸，使后者接受氨基形成另一种氨基酸。磷酸吡哆胺因转出氨基后又转变为磷酸吡哆醛（图 9-3）。

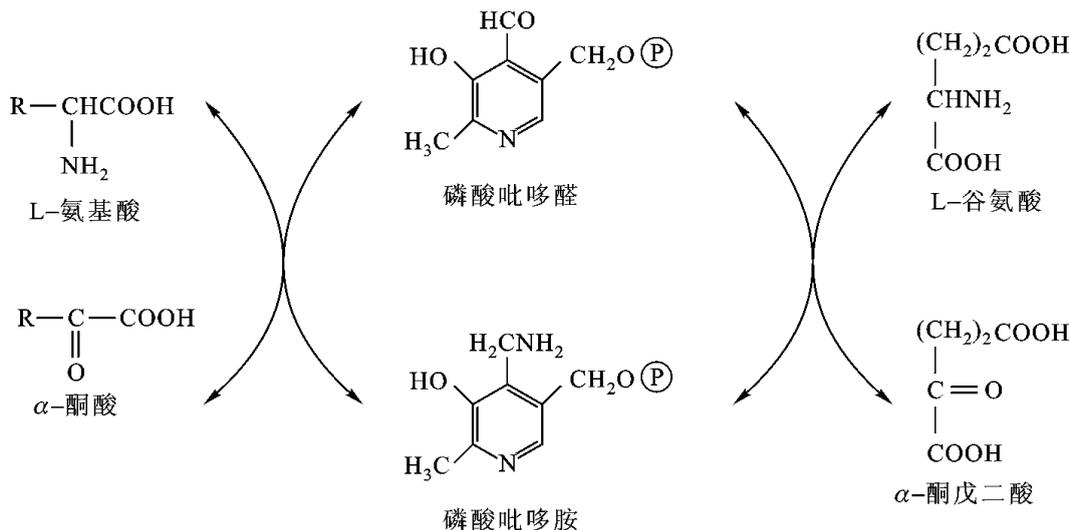


图 9-3 转氨基作用机制

由于转氨基反应是可逆反应,因而它是氨基酸分解、合成及转变过程中的重要反应。

(三) 联合脱氨基作用

转氨基反应中只有氨基的转移,而没有真正脱氨。体内氨基酸的脱氨基作用主要是通过联合脱氨基作用(转氨基作用偶联脱氨基作用)来完成的。

1. 转氨酶与谷氨酸脱氢酶的联合脱氨基作用

首先,氨基酸与 α -酮戊二酸在转氨酶催化下,生成相应的 α -酮酸和谷氨酸,然后谷氨酸又在L-谷氨酸脱氢酶作用下,脱去氨基又转变为 α -酮戊二酸,并释放出 NH_3 (图9-4)。

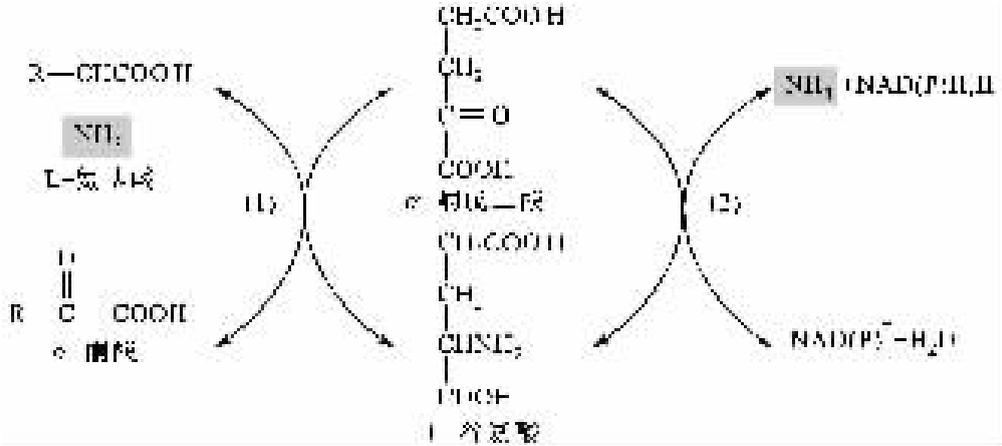


图9-4 联合脱氨基作用
(1) 转氨酶 ;(2) 谷氨酸脱氢酶

这种联合脱氨基作用是可逆的过程,因此,这一过程又是体内合成氨基酸的主要途径。但因必需氨基酸相应的 α -酮酸在体内不能合成,故失去合成必需氨基酸的能力。

2. 嘌呤核苷酸循环

上述联合脱氨基作用虽然重要,但是在骨骼肌和心肌中L-谷氨酸脱氢酶的活性低。这些组织的氨基酸难于借上述方式脱氨基,而是通过嘌呤核苷酸循环(purine nucleotide cycle)脱氨基。其具体步骤是在肌肉等组织中氨基酸通过转氨基作用,使草酰乙酸生成的天冬氨酸。天冬氨酸与次黄嘌呤核苷酸(IMP)反应生成腺苷酸代琥珀酸,后者裂解出延胡索酸而生成腺嘌呤核苷酸(AMP)。AMP又在腺苷酸脱氨酶催化下脱去氨基再生成IMP,最终完成了氨基酸的脱氨基。IMP再参加下一轮循环。嘌呤核苷酸循环可能在骨骼肌中是一种主要的脱氨方式(图9-5)。

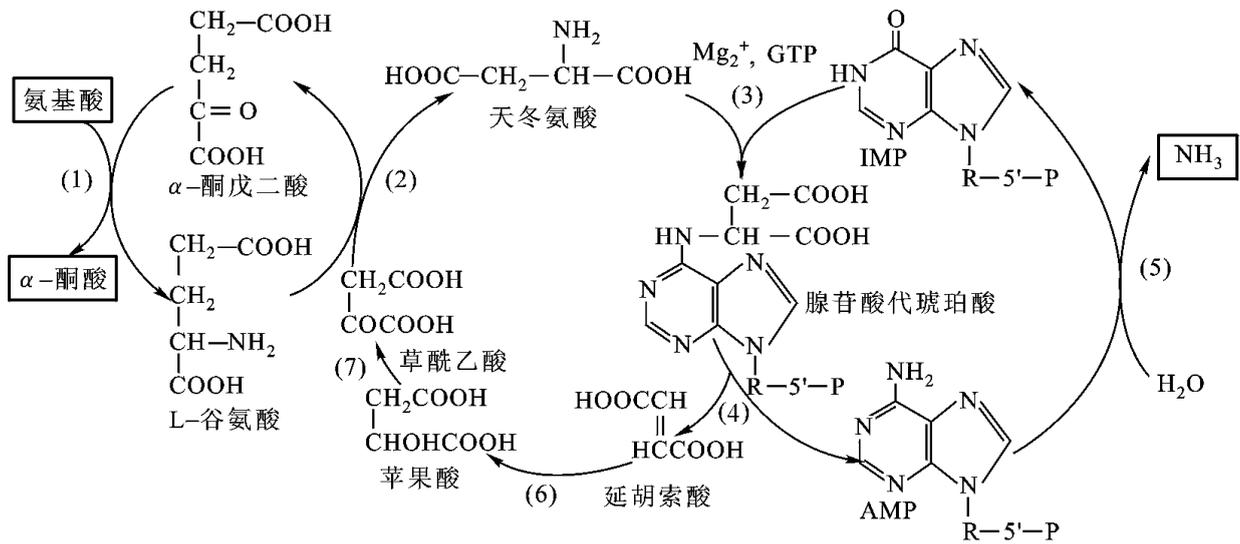
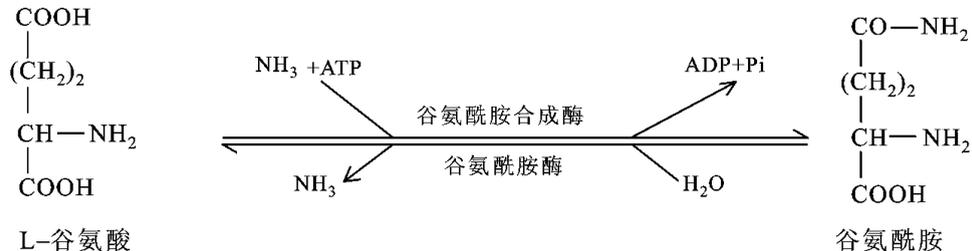
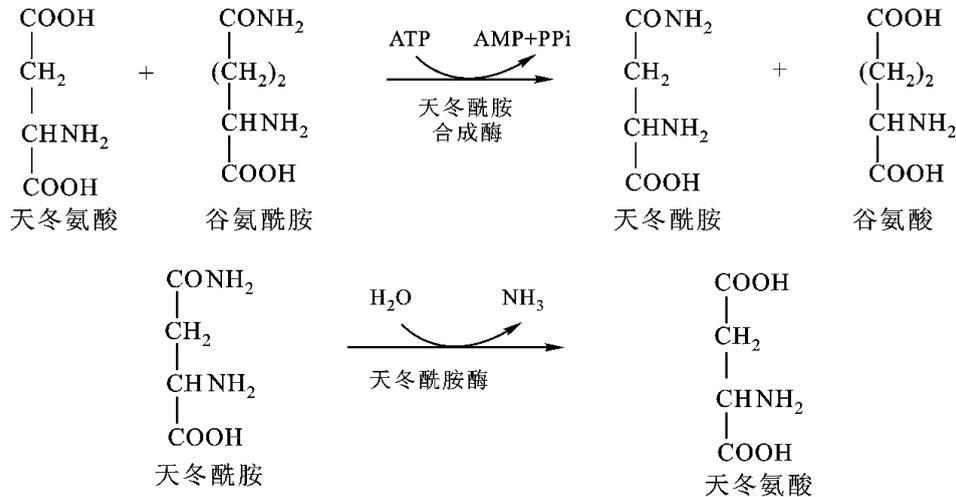


图9-5 嘌呤核苷酸循环
(1) 转氨酶 ;(2) AST ;(3) 腺苷酸代琥珀酸合成酶 ;(4) 腺苷酸代琥珀酸裂解酶 ;
(5) 腺苷酸脱氨酶 ;(6) 延胡索酸酶 ;(7) 苹果酸脱氢酶



体内在天冬酰胺合成酶(asparagine synthetase)催化下由谷氨酰胺提供酰氨基使天冬氨酸转变为天冬酰胺,故天冬酰胺为非必需氨基酸。但在分裂异常的白血病细胞合成不足,需外源供应才能适应需求。故临床上应用天冬酰胺酶(asparaginase)催化天冬酰胺分解以抑制白细胞恶性生长。



2. 丙氨酸-葡萄糖循环

丙氨酸-葡萄糖循环(alanine - glucose cycle)为丙氨酸在体内的运氨作用,主要发生在肌肉组织。肌肉蛋白质在分解代谢过程中,特别在饥饿等蛋白质分解代谢加强的情况下,氨基酸经脱氨基而产氨增加。氨可通过与 α -酮戊二酸结合生成谷氨酸,再经转氨基作用将氨基转给丙酮酸生成丙氨酸。丙酮酸主要来自葡萄糖的酵解途径。丙氨酸在肌肉组织生成后经过血液运送至肝,在肝内丙氨酸经联合脱氨基作用脱去氨基生成丙酮酸。丙酮酸再经葡糖异生途径而生成葡萄糖。葡萄糖再经血液进入肌肉。因而形成丙氨酸-葡萄糖循环(图9-6)。通过这一过程使肌肉将氨基酸脱氨基产生的氨运到肝生成尿素,同时也为肝提供糖异生的原料。这一循环对防止血氨升高有重要意义。

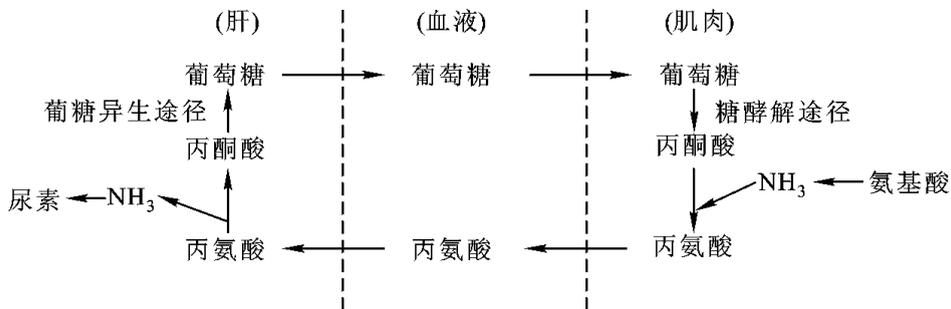
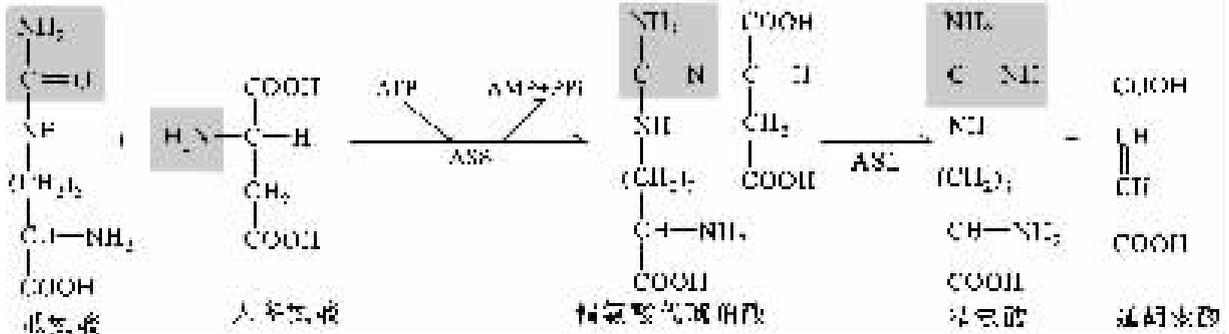


图9-6 丙氨酸-葡萄糖循环

(三) 尿素的生成

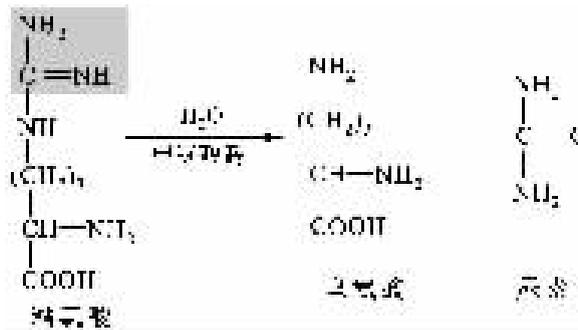
各组织产生的氨以谷氨酰胺或丙氨酸等形式运至肝后,与肠道吸收入肝的氨一起被合成尿素(urea)而解毒。合成尿素是氨的主要去路。正常人体内80%~90%的氨以尿素形式排出。肝是合成尿素的重要器官。根据实验,将犬切除肝后,可观察到血及尿中尿素含量显著降低。这种动物如给予氨基酸,会加快血氨升高而中毒死亡。临床上急性肝坏死病人血及尿中几乎没有尿素而氨及氨基酸量增多。实验及临床观察都证明尿素主要在肝合成。其他器官,如肾及脑,由于含有少量精氨酸酶,故也有少量尿素生成。

1. 鸟氨酸循环的发现



在上述反应过程中天冬氨酸起供氨基的作用。天冬氨酸又可由草酰乙酸与谷氨酸经转氨基作用生成,而谷氨酸的氨基又可来自体内多种氨基酸的转氨基作用。由此可见,多种氨基酸的氨基可通过天冬氨酸的形式参加尿素合成。

(4) 精氨酸水解生成尿素 在胞液中形成的精氨酸受精氨酸酶(arginase)的水解作用而生成尿素和鸟氨酸。鸟氨酸再进入线粒体参加瓜氨酸的合成,瓜氨酸又经上述变化最后生成尿素及鸟氨酸,如此周而复始地循环促进尿素的生成。



上述尿素生成的四步反应简要综合如下：



由此可见,尿素分子中的两个氮原子,其来自氨,另一来自天冬氨酸的氨基,而天冬氨酸又可从草酰乙酸与其他氨基酸经转氨基作用生成。因此尿素分子中的两个氮都是直接或间接来自多种氨基酸。在合成尿素过程中消耗4分子高能磷酸键。反应中所需的CO₂可由HCO₃⁻提供。

现将有关尿素合成的中间步骤结合细胞定位总结于图9-8。

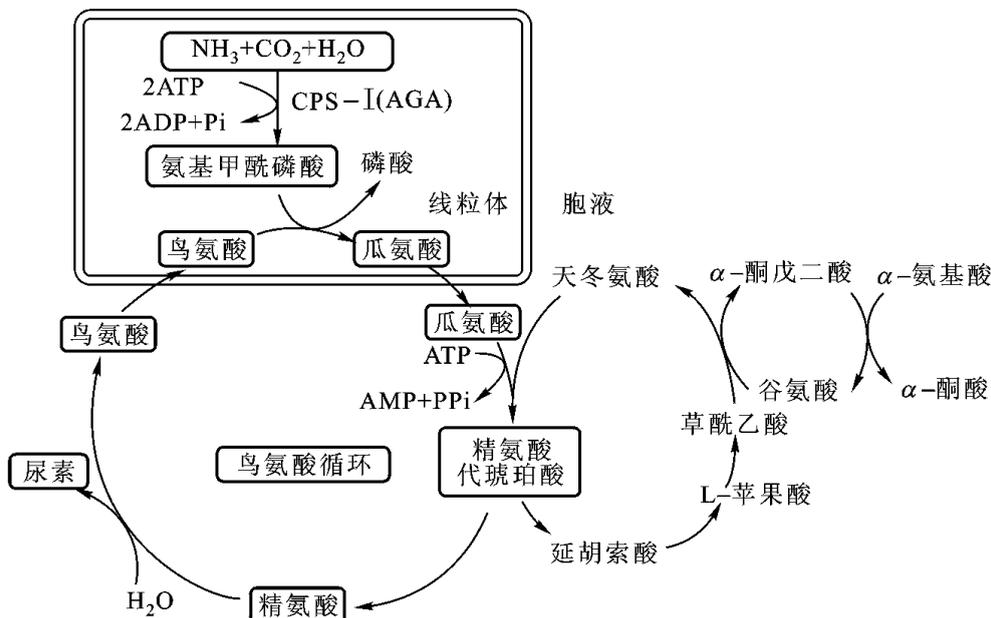
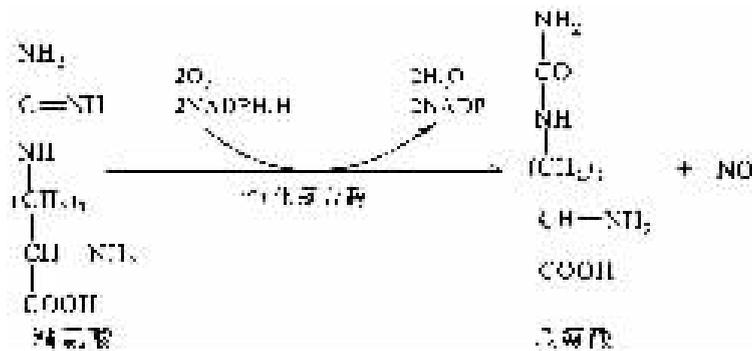


图9-8 尿素生成的步骤和细胞定位

此外,精氨酸是合成一氧化氮的前体,鸟氨酸循环的一氧化氮合酶支路,即少许精氨酸经一氧化氮合

酶(nitric oxide synthase ,NOS)的催化 ,由 NADPH 及 O_2 等参加 ,可产生瓜氨酸及一氧化氮(nitric oxide ,NO)。一氧化氮是重要的信号转导物质 ,可作为细胞毒并具有使平滑肌松弛等作用。NOS 广泛分布于神经系统及巨噬细胞。



3. 尿素合成的调节

尿素的合成受以下几种因素的调节：

(1) 膳食蛋白质 高蛋白膳食时合成尿素速率加快 ,排泄的含氮物中尿素占 80% ~ 90% ;而低蛋白膳食则相反 ,尿素排泄量可低于含氮排泄物量的 60%。对大鼠提高蛋白质饲养量时 ,观察到鸟氨酸循环中的酶的活性受膳食蛋白质量的影响。

(2) N-乙酰谷氨酸 N-乙酰谷氨酸是氨甲酰磷酸合成酶 I 必需的变构激活剂 ,如无 AGA 存在 ,CPS - I 几乎无活性。精氨酸可促进 AGA 的合成 ,因而加强氨甲酰磷酸的合成 ,使尿素合成增加 ,以适应机体生理需要。

(3) 鸟氨酸循环中的酶系 参与尿素合成的酶系中各种酶的活性相差很大 ,其中以精氨酸代琥珀酸合成酶的活性最低 ,是尿素合成的限速酶 ,可调节尿素的合成速率。

(四) 氨的其他代谢去路

1. 铵盐的生成与排泄

氨的主要去路是合成尿素 ,也有一部分氨以谷氨酰胺的形式运至肾脏 ,其水解释放的氨与 H^+ 结合 ,以铵盐形式随尿排出。肾脏排出 NH_4^+ ,有调节体内酸碱平衡的作用。在酸中毒时排出铵盐增加 ,而碱中毒时相反。

2. 合成新的氨基酸

氨可通过联合脱氨基的逆过程及转氨基作用合成非必需氨基酸。

3. 参与核酸中嘧啶碱的合成

一部分氨在胞液中氨甲酰磷酸合成酶 II(CPS - II)的催化下 ,生成氨甲酰磷酸 ,参与核酸中嘧啶环的合成(见第十章)。两种氨甲酰磷酸合成酶(CPS - I 以及 CPS - II)催化的反应以及合成的产物虽然相同 ,但由于它们在细胞定位及反应中氮源等的不同(CPS - II 在胞液由谷氨酰胺提供氮源 ,并不受 AGA 调节) ,合成的产物进一步参加的反应也不一样 ,因而它们的生理意义也不相同。CPS - I 参加尿素的合成 ,这是正常肝细胞的一种重要功能 ,是细胞高度分化的结果 ,因而 CPS - I 的活性可作为肝细胞分化程度的指标之一 ;CPS - II 参加嘧啶核苷酸的从头合成 ,与增殖细胞中核酸的合成有关 ,因而它的活性常被作为细胞增殖程度的指标之一。

三、 α -酮酸的代谢

氨基酸经脱氨基后生成的 α -酮酸在体内的代谢途径主要有以下三条：

(一) 重新生成氨基酸

α -酮酸(α -ketoacid)可经脱氨基作用的逆过程氨基化 ,生成相应的 α -氨基酸。体内不能合成必需

氨基酸是因其相应的 α -酮酸不能合成。

(二) 转变为糖或脂肪

组成人体蛋白质的 20 种氨基酸脱去氨基后生成的 α -酮酸经转变, 形成七种主要代谢中间物质: 丙酮酸、乙酰 CoA、乙酰乙酰 CoA、及三羧酸循环中的 α -酮戊二酸、琥珀酰 CoA、延胡索酸和草酰乙酸。其中, 能转变为三羧酸循环的中间产物和丙酮酸的氨基酸, 可经糖异生途径转变为糖, 称为生糖氨基酸 (glucogenic amino acids)。生糖氨基酸共有 14 种。降解只能生成乙酰 CoA 或乙酰乙酰 CoA 的氨基酸能生成酮体和脂肪酸, 称为生酮氨基酸 (ketogenic amino acids)。生酮氨基酸只有亮氨酸和赖氨酸两种。另外四种氨基酸, 异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸即能生酮又能生糖, 称为生糖兼生酮氨基酸 (glucogenic and ketogenic amino acids)。

(三) 氧化供能

α -酮酸在体内可以通过三羧酸循环彻底氧化成 CO_2 及水, 同时释放出能量供机体的需要。

综上所述, 氨基代谢与糖和脂肪的代谢是密切联系的。氨基酸既可转变成糖也能转变成脂肪, 糖可以转变成脂肪及多数非必需氨基酸的碳架部分; 脂肪酸既不能转变成糖, 也不能转变为氨基酸。氨基酸和糖、脂肪的代谢关系是通过三羧酸循环中间代谢物互相联系并完全氧化的(图 9-9)。

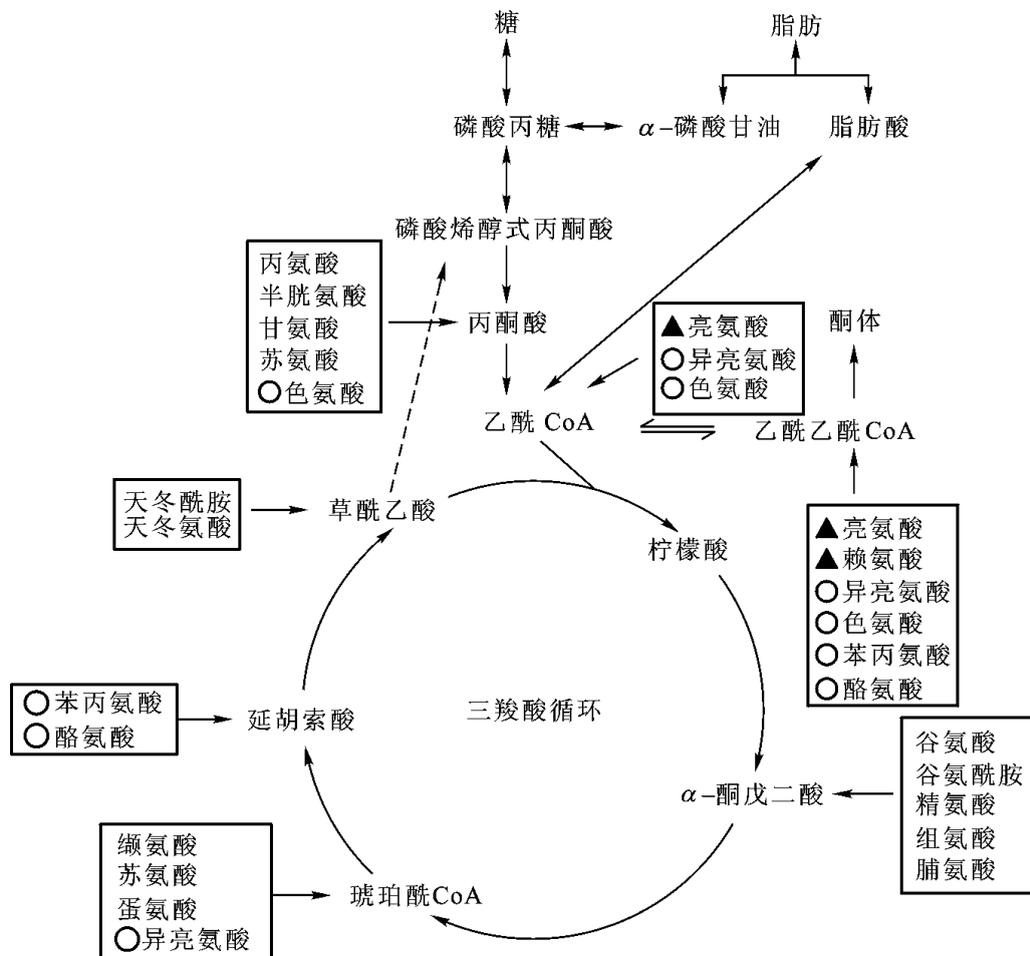


图 9-9 氨基酸、糖及脂肪代谢的联系

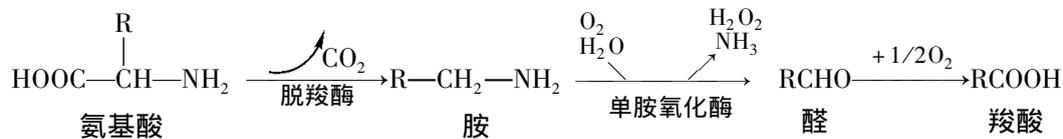
▲ 生酮氨基酸 ○ 生糖兼生酮氨基酸 未标记的为生糖氨基酸

第五节 一些氨基酸的特殊代谢

各种氨基酸具有不同的 R 基团, 除具有一般共有分解代谢途径之外, 还有其自身特殊的代谢模式。本章仅对几种重要的氨基酸代谢进行描述。

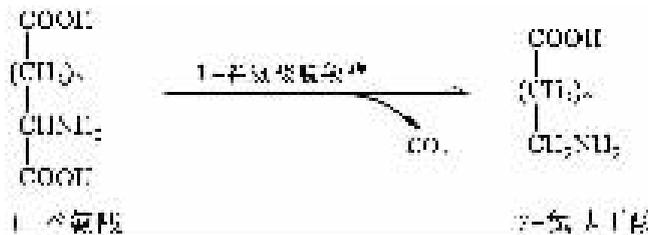
一、氨基酸的脱羧基作用

有些氨基酸还可以通过脱羧基作用(decarboxylation)生成相应的胺类。催化脱羧基反应的酶称为脱羧酶(decarboxylase),氨基酸脱羧酶的辅酶是磷酸吡哆醛。同时,体内还广泛存在胺氧化酶(amine oxidase)可催化这些胺类氧化。此酶属于黄素蛋白酶,能催化胺类氧化生成相应的醛、氨和 H_2O_2 ,醛类还可继续氧化成羧酸,羧酸再氧化成 CO_2 和水或随尿排出,从而避免胺类的蓄积。



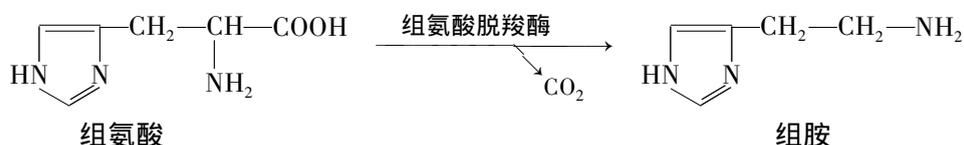
(一) γ -氨基丁酸

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)由谷氨酸脱羧生成。催化此反应的酶为谷氨酸脱羧酶,此酶在脑及肾组织中活性强,因而 γ -氨基丁酸在脑中的浓度较高。其作用是抑制突触传导。 γ -氨基丁酸可与 α -酮戊二酸进行转氨基作用,生成琥珀酸半醛,后者再氧化成琥珀酸进入三羧酸循环而被代谢。



(二) 组胺

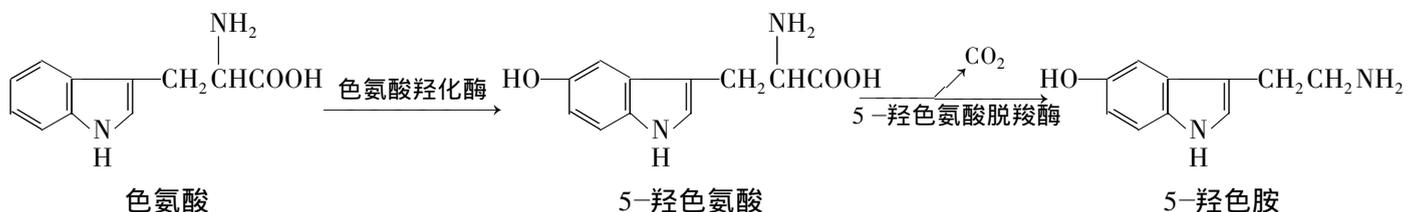
组胺(histamine)由组氨酸经组氨酸脱羧酶催化脱羧生成。体内许多组织的肥大细胞及嗜碱性细胞在过敏反应、创伤等情况下产生组胺。组胺是一种强血管扩张剂,可引起血管扩张,毛细血管通透性增加,造成血压下降,甚至休克。组胺可使平滑肌收缩,引起支气管痉挛而发生哮喘。组胺还能促进胃黏膜细胞分泌胃蛋白酶及胃酸,故可用于研究胃分泌功能。组胺可经氧化或甲基化而灭活。



(三) 5-羟色胺

色氨酸在脑组织中经色氨酸羟化酶催化生成 5-羟色氨酸,然后再受 5-羟色氨酸脱羧酶的作用生成 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT 或称血清素, serotonin)。

5-羟色胺在脑的视丘下部,大脑皮层以及神经细胞的突触小泡内含量很高,它是一种神经递质,直接影响神经传导。5-羟色胺也存在于小肠、血小板、乳腺细胞中,具有强烈的血管收缩作用。5-羟色胺经单胺氧化酶的催化作用,生成 5-羟色醛以及 5-羟吲哚乙酸等产物,并随尿排泄。



(四) 多胺

有些氨基酸在体内经脱羧作用尚可产生多胺(polyamine),例如,精氨酸水解生成的鸟氨酸经脱羧作

别为嘌呤合成提供 C_2 与 C_8 。 N^5, N^{10} - CH_2 - FH_4 为胸腺嘧啶核苷酸合成提供甲基。故一碳单位在核酸生物合成中有重要作用。此外 N^5 -甲基 FH_4 所带甲基通过 S -腺苷蛋氨酸向许多化合物提供甲基,参与体内许多重要化合物的合成和修饰(如儿茶酚胺类、胆碱、核酸等)。

一碳单位代谢障碍或 FH_4 不足,可引起巨幼红细胞性贫血等疾病。也可利用磺胺类药物干扰细菌 FH_4 的合成而抑菌。应用叶酸类似物如甲氨蝶呤等可抑制 FH_4 生成,从而抑制核酸生成,达到抗癌作用。

三、含硫氨基酸的代谢

含硫氨基酸包括蛋氨酸、半胱氨酸和胱氨酸三种。

(一) 蛋氨酸的代谢

1. 蛋氨酸的转甲基作用与蛋氨酸循环

蛋氨酸分子中含有 S -甲基,此甲基为生成许多种含甲基的重要生理活性物质所必需。但在转甲基反应前,蛋氨酸必需活化,生成活性甲基。首先蛋氨酸与 ATP 在转腺苷酶(adenosyl transferase)的催化下生成 S -腺苷蛋氨酸(S -adenosyl methionine, SAM)这种与有机四价硫化物结合的甲基是高度活化的,常称为活性甲基, SAM 是体内甲基最重要的直接供体。

许多种含甲基的生理活性物质,如胆碱、肌酸、肉碱以及肾上腺素等都是在甲基转移酶(methyl transferase)催化下直接从 SAM 接受甲基而被甲基化(methylation)的。SAM 去甲基后生成 S -腺苷同型半胱氨酸。后者再脱去腺苷后生成同型半胱氨酸(homocysteine)。

同型半胱氨酸再接受 N^5 - CH_3 - FH_4 上的甲基,又重新生成蛋氨酸。这一循环称为蛋氨酸循环(methionine cycle)(图 9-11)。此循环的生理意义是通过 SAM 提供甲基以进行体内甲基化反应和 N^5 - CH_3 - FH_4 提供甲基再生成蛋氨酸。在蛋氨酸循环反应中,虽然同型半胱氨酸接受甲基后可生成蛋氨酸,但体内不能合成同型半胱氨酸,它只能由蛋氨酸转变生成,故蛋氨酸不能在体内合成,必须由食物供给。

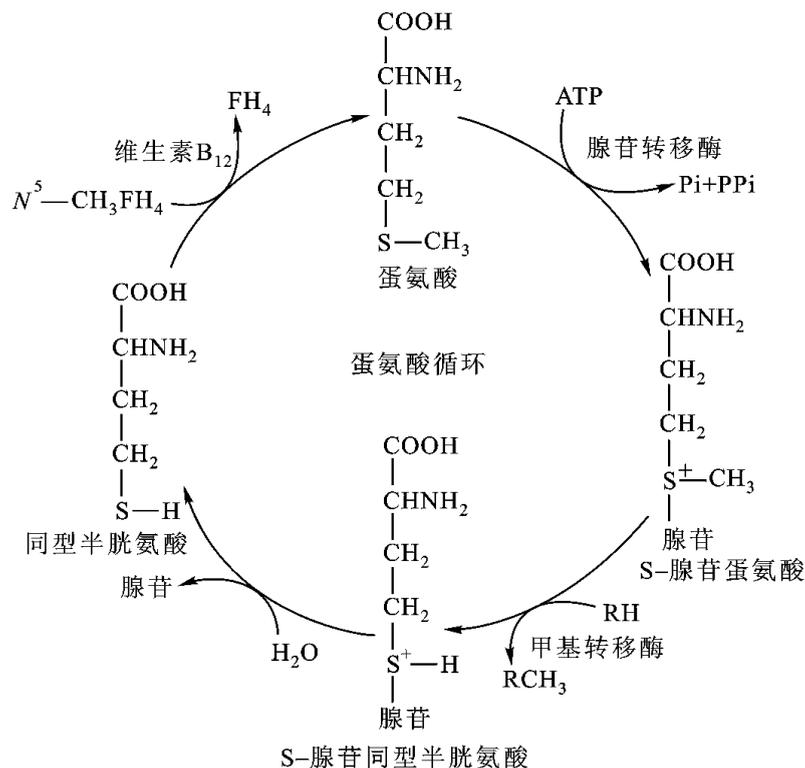


图 9-11 蛋氨酸循环

在蛋氨酸循环中,维生素 B_{12} 是合成蛋氨酸的 N^5 - CH_3 - FH_4 转甲基酶即蛋氨酸合成酶的辅酶。维生

素 B₁₂ 缺乏时, N⁵-CH₃-FH₄ 上的甲基不能转移给同型半胱氨酸。这不仅影响蛋氨酸的合成,同时也妨碍叶酸的再利用,影响 DNA 的合成,从而影响到细胞的分裂。病人出现巨幼红细胞性贫血。同时同型半胱氨酸在血中浓度升高,可能是导致动脉粥样硬化和冠心病的独立危险因素。

2. 肌酸与磷酸肌酸

肌酸(creatine)与磷酸肌酸(creatine phosphate)是关系到能量利用与贮存的重要物质。肌酸是由甘氨酸接受精氨酸供给的脒基和 S-腺苷蛋氨酸提供的甲基合成的。肝是主要合成器官。肌酸在肌酸激酶(creatine kinase, CK)催化下,接受由 ATP 转来的高能磷酸基形成磷酸肌酸,后者可贮存能量。当肌肉活动时,首先消耗 ATP,然后磷酸肌酸又在 CK 的催化下,将高能磷酸基转给 ADP,以补充 ATP 的不足。肌酸与磷酸肌酸的代谢终产物是肌酸酐(creatinine)。肌酸酐主要来自磷酸肌酸的非酶促分解。肌酸、磷酸肌酸与肌酸酐的代谢见图 9-12。肌酸酐随尿排出,正常人排出量较恒定。当肾功能障碍时,肌酸酐排出受阻,血中的浓度升高。血中肌酸酐的测定有助于肾功能不全的诊断。

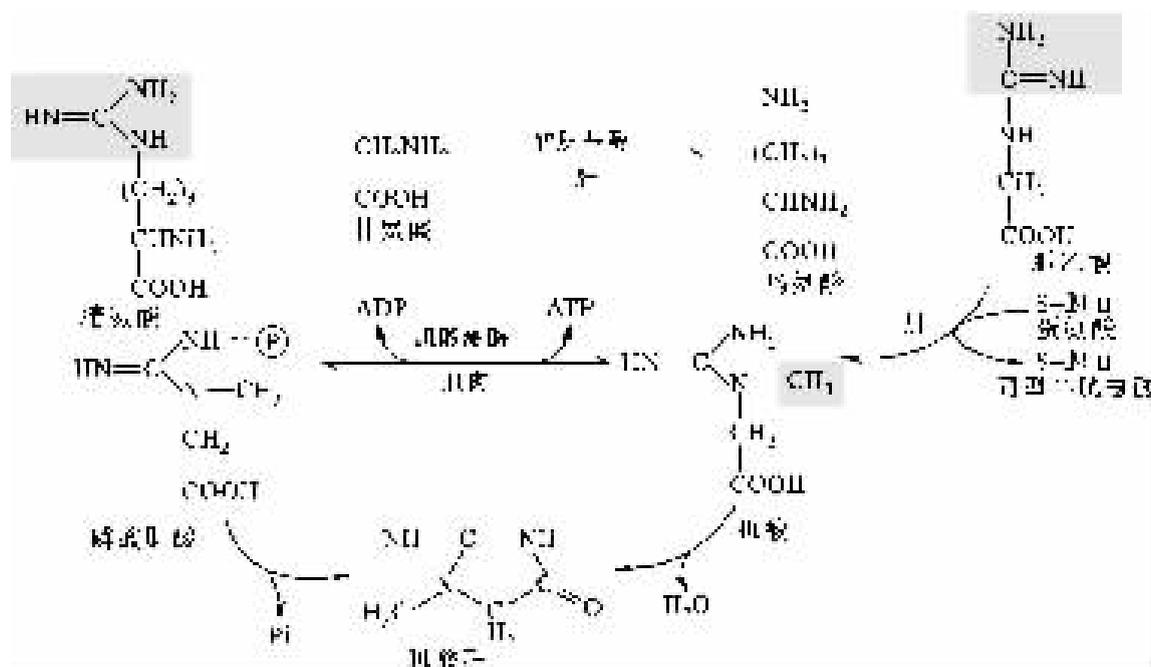
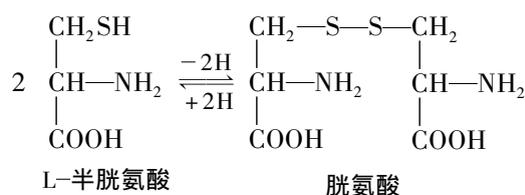


图 9-12 肌酸代谢

(二) 半胱氨酸与胱氨酸的代谢

1. 半胱氨酸与胱氨酸的互变

两分子半胱氨酸可氧化成胱氨酸,胱氨酸亦可还原成半胱氨酸。

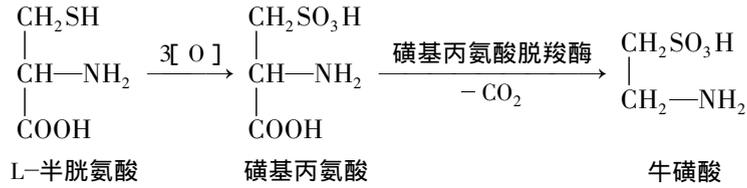


半胱氨酸和胱氨酸都属于非必需氨基酸,它们存在于许多蛋白质中。两个半胱氨酸残基间所形成的二硫键对于保持蛋白质空间构象的稳定性有很重要的作用。如胰岛素的 A、B 链就是以二硫键连接的,如二硫键断裂,胰岛素即失去其生物活性。体内许多重要的酶,如琥珀酸脱氢酶、乳酸脱氢酶等的活性都离不开其分子中半胱氨酸残基上的巯基,故有巯基酶之称。许多毒物,如芥子气及重金属盐等,能与酶的巯基结合而抑制酶的活性,从而发挥其毒性作用。

2. 牛磺酸的生成

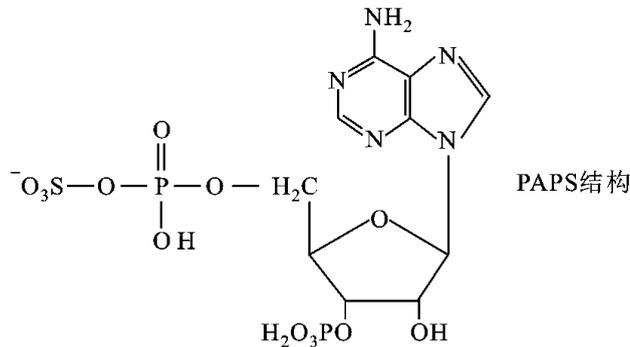
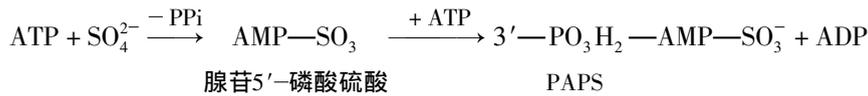
牛磺酸(taurine)是由半胱氨酸转变而成的。首先,半胱氨酸氧化成磺基丙氨酸,再经磺基丙氨酸脱羧

酶催化脱羧而成牛磺酸。后者是结合胆汁酸的组成成分之一。脑组织中也含有较多牛磺酸,其生理作用尚不清楚,可能与脑的发育有关。



3. 活性硫酸根的生成

含硫氨基酸经氧化分解后可以产生硫酸根。体内硫酸根的主要来源是半胱氨酸。半胱氨酸在体内进行分解代谢时可以直接脱去巯基和氨基,产生丙酮酸、氨和 H_2S 。 H_2S 迅速被氧化成硫酸根。在体内生成的硫酸根,一部分可以无机盐的形式随尿排出体外,一部分经活化变成活性硫酸根,即 3'-磷酸腺苷 5'-磷酸硫酸(3'-phospho-adenosine 5'-phosphosulfate, PAPS)。PAPS 的生成需要 ATP 参与:



PAPS 的化学性质活泼,可以提供硫酸根使某些物质生成硫酸酯。在肝生物转化中有重要作用。此外 PAPS 参与硫酸角质素及硫酸软骨素等化合物中硫酸化氨基糖的合成。

4. 谷胱甘肽的生成

半胱氨酸与谷氨酸及甘氨酸在体内合成谷胱甘肽。还原型谷胱甘肽(GSH)有保护酶分子上巯基及抗氧化作用。如红细胞中含高浓度 GSH,可保护运氧过程中亚铁血红蛋白不被氧化为高铁血红蛋白,确保其发挥运氧功能。

四、芳香族氨基酸的代谢

芳香族氨基酸(aromatic amino acid)包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。酪氨酸可由苯丙氨酸羟化生成。苯丙氨酸与色氨酸为必需氨基酸。

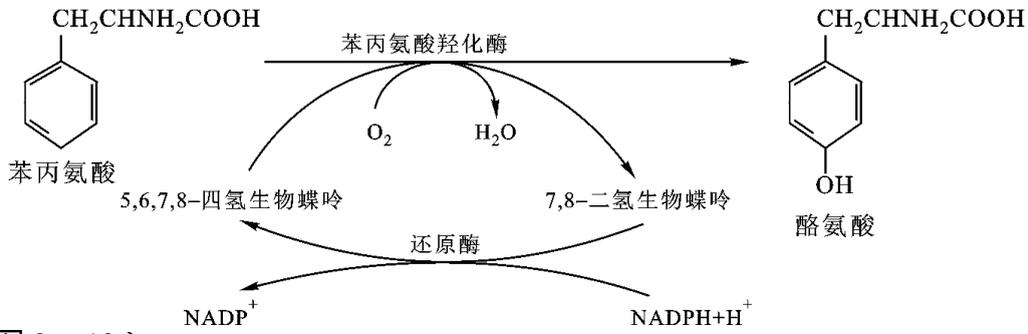
(一) 苯丙氨酸与酪氨酸代谢

1. 苯丙氨酸转变为酪氨酸

苯丙氨酸在体内可通过苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase)的催化作用转变为酪氨酸。

苯丙氨酸羟化酶主要存在于肝等组织中,其辅酶是四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin),催化的反应不可逆,因而酪氨酸不能转变为苯丙氨酸。但在膳食中如果酪氨酸含量充足时可以减少苯丙氨酸向酪氨酸的转变。

苯丙氨酸除上述转变为酪氨酸的主要代谢途径外,少量可经转氨基作用生成苯丙酮酸。有先天性苯丙氨酸羟化酶缺陷患者,不能正常地将苯丙氨酸羟化成酪氨酸,造成苯丙氨酸堆积,并经转氨基作用大量



生成苯丙酮酸(图9-13)。

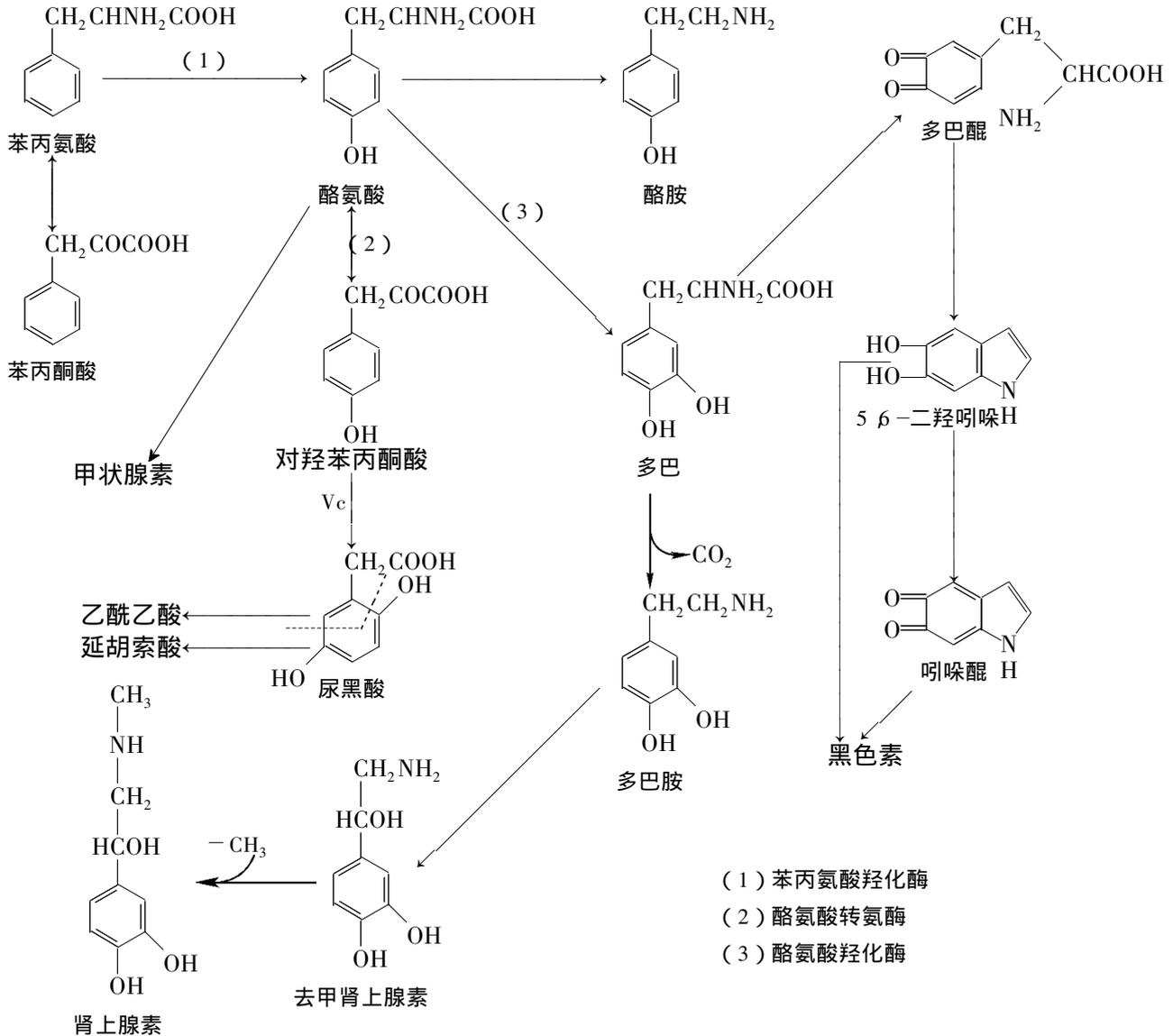


图9-13 苯丙氨酸与酪氨酸的代谢及其重要衍生物

大量苯丙酮酸及其部分代谢产物(苯乳酸及苯乙酸等)由尿中排出,称为苯丙酮酸尿症(phenyl ketonuria, PKU)。苯丙酮酸堆积造成脑发育障碍,故患者智力低下。PKU在氨基酸代谢障碍中最为常见,治疗原则是早期发现,供给低苯丙氨酸膳食。

2. 酪氨酸的分解代谢

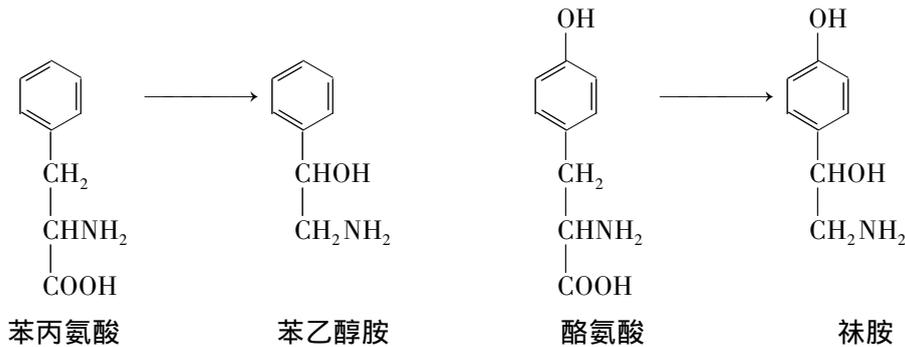
(1) 酪氨酸的分解 酪氨酸在酪氨酸转氨酶催化下,经转氨基而生成对羟苯丙酮酸。对羟苯丙酮酸经过尿黑酸等代谢反应而产生乙酰乙酸和延胡索酸。二者分别沿糖和脂肪酸代谢途径变化。因此,酪氨酸与苯丙氨酸是生糖兼生酮氨基酸。当有先天性酶缺陷时,尿黑酸的氧化受阻,可出现尿黑酸尿症。

(2) 儿茶酚胺与黑色素生成 酪氨酸在肾上腺髓质及神经组织的酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase)催化下经羟化,生成3,4-二羟苯丙氨酸(3,4-dihydroxyphenylalanine, DOPA)简称多巴。多巴经脱

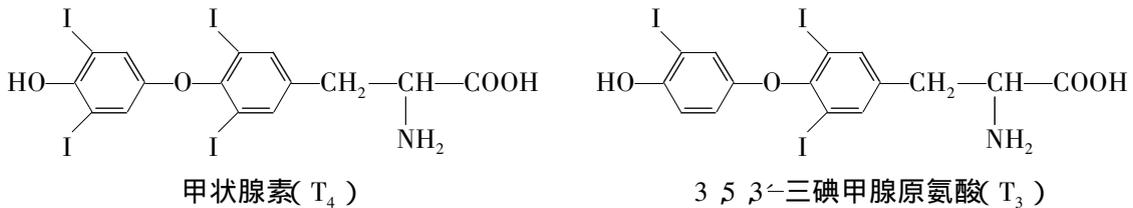
羧转变成多巴胺(dopamine)。多巴胺是一种神经递质。帕金森病(Parkinson disease)患者多巴胺生成减少。在肾上腺髓质,多巴胺的侧链再经 β -羟化生成去甲肾上腺素(norepinephrine),最后甲基化生成肾上腺素(epinephrine)。多巴胺、去甲肾上腺素及肾上腺素统称儿茶酚胺(catecholamine)。酪氨酸羟化酶是其合成的限速酶。此酶也需四氢生物喋呤为辅酶。

酪氨酸另一代谢途径是生成黑色素,在黑色素细胞中酪氨酸经酪氨酸酶(tyrosinase)的催化,羟化生成多巴,多巴经氧化变成多巴醌,再经脱羧环化等反应,最后聚合为黑色素(melanin)。先天性酪氨酸酶缺乏的人,因不能合成黑色素而患的疾病称为白化病(albinism)。患者皮肤、毛发色浅或者是白色,对阳光敏感,易患皮肤癌。

(3) 苯丙氨酸和酪氨酸在脑内可脱羧羟化产生假性神经递质——苯乙醇胺及 β -羟酪胺(赭胺)。前者由苯丙氨酸产生,后者由酪氨酸产生。二者结构与儿茶酚胺相似,故称假性神经递质,当其量增多时,可取代儿茶酚胺的作用,阻碍神经传导,抑制大脑,可能与肝昏迷的发生有关。



(4) 甲状腺激素的生成 甲状腺激素是酪氨酸的碘化衍生物。它是由甲状腺球蛋白(thyroglobulin)分子中的酪氨酸残基经碘化后生成的。甲状腺激素有两种,即3,5,3'-三碘甲腺原氨酸(triiodothyronine, T_3)和3,5,3',5'-四碘甲腺原氨酸(甲状腺素,thyroxine, T_4),它们在物质代谢的调控中起重要作用。



(二) 色氨酸的代谢

色氨酸除产生5-羟色胺及提供一碳单位外,其主要降解部位在肝。首先由色氨酸加氧酶(tryptophan oxygenatase)又称色氨酸吡咯酶(pyrralase)催化,开环转变为多种作用不明的酸性中间代谢物,少量直接由尿中排出,大部分最后生成乙酰乙酰CoA及丙酮酸,故色氨酸为生糖兼生酮氨基酸(图9-14)。少部分色氨酸转变为尼克酸,但其合成量少,不能满足机体的需要。据报道,60 mg的色氨酸在体内只能转变为1 mg的尼克酸。在色氨酸代谢过程中,有多种维生素参与(维生素 B_1 、 B_2 、 B_6 等),这些维生素缺乏时,可引起色氨酸代谢障碍。

五、支链氨基酸的代谢

支链氨基酸(branched-chain amino acids)包括缬氨酸、亮氨酸及异亮氨酸三种,都是体内不能合成的必需氨基酸。三种氨基酸的分解代谢相似,都可分为三个阶段(图9-15)。

1. 经转氨基作用将氨基转给 α -酮戊二酸,使之生成谷氨酸。而三种氨基酸则分别转变为相应的 α -酮酸。此阶段的分解反应符合氨基酸的代谢的一般规律。

2. α -酮酸经氧化脱羧基作用,有CoA参加,生成各自相应的脂酰CoA,此过程与糖代谢中丙酮酸及

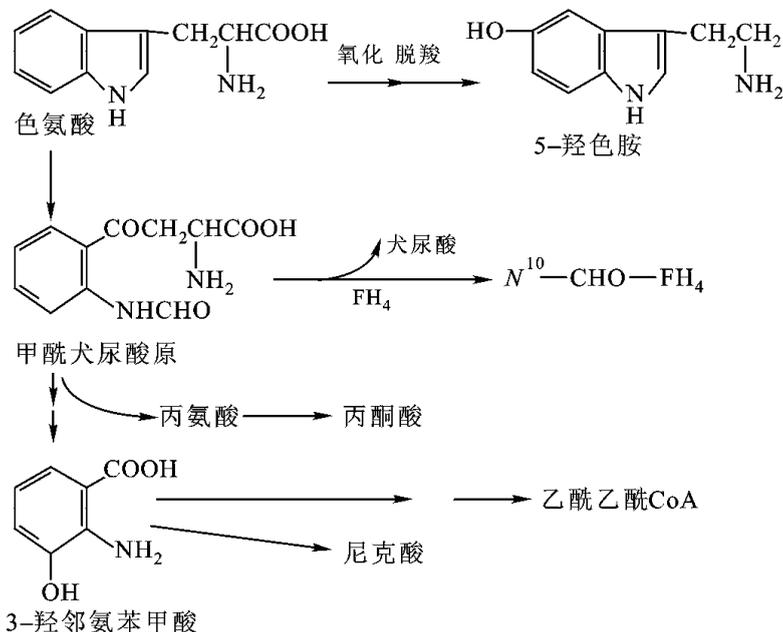


图 9-14 色氨酸的分解代谢

α -酮戊二酸氧化过程相似。



图 9-15 支链氨基酸代谢

3. 三种脂酰 CoA 经脂肪酸 β -氧化过程代谢,最终以不同中间产物参加三羧酸循环氧化。缬氨酸代谢产生琥珀酰 CoA,所以是生糖氨基酸。亮氨酸产生乙酰乙酸和乙酰 CoA,故为生酮氨基酸。异亮氨酸产生乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA,是生糖兼生酮氨基酸。支链氨基酸代谢主要在骨骼肌中进行。

氨基酸的特殊代谢说明,氨基酸除了主要参与蛋白质合成外,还可以转变为神经递质、核苷酸、激素及其他多种含氮生理活性物质,具有重要生理功能(表 9-2)。

表 9-2 氨基酸衍生的重要含氮化合物

氨基酸	衍生的化合物	生理功用
天冬氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸	嘌呤碱	含氮碱基、核酸成分
天冬氨酸	嘧啶碱	含氮碱基、核酸成分
甘氨酸	卟啉化合物	血红素、细胞色素
甘氨酸、精氨酸、蛋氨酸	肌酸、磷酸肌酸	能量贮存
色氨酸	5-羟色胺、尼克酸	神经递质、维生素
苯丙氨酸、酪氨酸	儿茶酚胺、甲状腺素	神经递质、激素
酪氨酸	黑色素	皮肤色素
谷氨酸	γ -氨基丁酸	神经递质
蛋氨酸、鸟氨酸	精胺、亚精胺	细胞增殖促进剂

Summary

Dietary proteins are hydrolyzed by endopeptidases and exopeptidases in stomach and intestine. The end products amino acids are absorbed via several transporters. Nitrogen balance relates to intake and excretion of nitrogen from proteins. In addition to the number of proteins in food essential amino acids must be supplied in diet to maintain nitrogen balance.

Protein turnover is a physiologic process in life. There are two major pathways in which intracellular proteins are degraded: ATP-independent process in lysosome and ATP, ubiquitin-dependent pathway in cytosol.

The beginning of amino acid degradation is the removal of α -amino group. The amino group of most amino acids is transferred to α -ketoglutarate to form α -ketoacid and glutamate by transaminase, which contains pyridoxal phosphate as cofactor. Glutamate dehydrogenase catalyzes the oxidative deamination of glutamate into ammonium and α -ketoglutarate. The transamination reactions are reversible and can be used to synthesize amino acids from α -ketoacids. The major deamination in muscle is purine nucleotide cycle.

Highly toxic ammonia are transported to liver by two forms, alanine and glutamine. Urea is the major end product of ammonia in human. Urea is synthesized in liver and cleared by kidney. Some ammonium ions are transported by glutamine to kidney for excretion. The biosynthesis process of urea is called ornithine cycle (urea cycle). Condensation of CO_2 , NH_4^+ and ATP occurs to form carbamoyl phosphate first. The carbamoyl phosphate reacts with ornithine to form citrulline in mitochondrial matrix. In cytosol, citrulline links aspartate to form arginosuccinate. Cleavage of arginosuccinate produces arginine and fumarate. Arginine is hydrolyzed to release urea and ornithine to complete the cycle. To synthesize 1 mol urea requires 3 mol ATP, 1 mol CO_2 and 2 mol NH_4^+ .

α -ketoacids, the carbon skeletons of amino acids, can be converted to amino acids or catabolize into metabolic intermediates to produce carbohydrate (glycogenic amino acids), fat (ketogenic amino acids) or both (glycogenic and ketogenic). Oxidation of α -ketoacid can serve as a source of energy.

Decarboxylation of amino acids produces amines, such as γ -aminobutyric acid from glutamic acid, histamine from histidine, 5-hydroxytryptamine from tryptophan and polyamines from ornithine and arginine.

One-carbon units ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $=\text{CH}-$, $-\text{CHO}$, $-\text{CH}=\text{NH}$) are produced by metabolism of glycine, serine, histidine and tryptophan. Tetrahydrofolate is the carrier of one-carbon unit and plays an important role in the metabolism of amino acids. The major function of one-carbon units is to participate in biosynthesis of nucleic acids. The adenylation of methionine forms S-adenosylmethionine, key methyl group donor, which is produced by methionine cycle and contributed to synthesize some important compounds such as creatine, choline and epinephrine. Storage of "high energy" phosphate from ATP forms creatine phosphate. The amount of creatinine in urine is constant in normal individuals.

Tyrosine is produced by hydroxylation of phenylalanine. Catecholamines, melanin and thyroid hormone are derivatives of tyrosine. Metabolism of cysteine produces sulfate, which can be used in the formation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS). PAPS is the source of sulfate group in biosynthesis. Taurine is derivative of cysteine, which conjugates with bile acids for excretion.

思 考 题

1. 氮平衡、必需氨基酸及蛋白质互补作用的概念。
2. 试述蛋白质的消化与吸收过程。
3. 蛋白质的腐败作用及重要的腐败产物有哪些？
4. 简述体内蛋白质降解的途径。
5. 体内氨基酸脱氨基有哪些方式？各有何特点？
6. 试述血氨的来源、运输形式和去路。
7. 试述尿素生成的过程、部位及调节。
8. 丙氨酸-葡萄糖循环的过程和有何生理意义？
9. 一碳单位的概念？来自哪些氨基酸？有何生理功能？
10. 蛋氨酸循环的过程及其生理意义。
11. 苯丙氨酸、酪氨酸及半胱氨酸代谢可生成哪些有重要生理活性的物质。
12. 简述 α -酮酸的代谢去路。

(杨翰仪)

第十章 核苷酸的代谢

本章教学要求

- 核苷酸的功能
- 核苷酸在体内从头合成与补救合成所需的原料与基本过程
- 核苷酸分解代谢的主要产物
- 核苷酸生物合成的调节机制
- 核苷酸的代谢障碍和抗代谢物

第一节 核苷酸的功能

核苷酸是细胞内一类十分重要的化合物。核苷酸及其衍生物在细胞的代谢中发挥着多种多样的生物学作用,其主要的代谢功能如下:

1. 核酸的构成单位

核酸是由核苷酸以磷酸二酯键连成的长链。因此,核苷酸是核酸合成的基本原料和构成单位。DNA和RNA聚合酶催化核酸的合成。

2. 能量代谢作用

核苷三磷酸,尤其是ATP,是体内最基本的贮能和供能化合物。ATP在细胞内主要由氧化磷酸化生成,其次由底物水平磷酸化产生。它参与肌肉收缩,促进物质转运,维持离子梯度,并且可作为磷酸供体合成另外的三磷酸核苷化合物。

3. 生理调节介质

核苷和核苷酸对许多生理功能都具有调节作用。它们主要以介质的形式发挥生理调节作用。腺苷调节冠状动脉的血流量;ADP调节血小板聚集;cAMP和cGMP作为第二信使物质在细胞内的信号转导中发挥作用;GTP则通过与GTP结合蛋白的结合进行信号转导。

4. 辅酶的组成成分

NAD⁺,NADP⁺,FAD等辅酶和它们的还原形式以及辅酶A等均含有AMP,它是这些辅酶结构中的一部分。

5. 辅因子合成的前体物

GTP是辅因子四氢生物喋呤合成的前体物。同时GTP也为mRNA的帽子结构提供合成原料。

6. 酶的变构调节剂和为酶的共价修饰提供磷酸基

在代谢途径中,许多的调节步骤都由细胞内的核苷酸浓度所调节。核苷酸常常作为变构调节剂对一些酶进行变构调节。许多酶通过磷酸化和去磷酸化进行共价修饰,ATP为其提供磷酸基。酶通过变构调节和共价修饰调节机体代谢的速率和节奏。

7. 形成代谢的活化中间体

核苷酸在许多代谢中都发挥着形成活化中间体的作用。UDP-葡萄糖是合成糖原和糖蛋白的关键性活化中间体。GDP-甘露糖、GDP-岩藻糖、UDP-半乳糖和CMP-唾液酸是糖蛋白合成中糖基部分的活

化中间体。CTP 用于合成 CDP-胆碱, CDP-乙醇胺和 CDP-二酰甘油, 这些活化中间体参与磷脂的合成代谢。S-腺苷蛋氨酸(SAM)是蛋氨酸代谢的活性中间体。它为许多生化反应提供甲基, 不仅参与糖和碱基的甲基化, 而且它也参与从磷脂酰乙醇胺合成磷脂酰胆碱, 以及从赖氨酸到肉碱的合成。S-腺苷蛋氨酸也是从鸟氨酸合成精胺的丙胺基的供体。UDP-葡萄糖醛酸是糖蛋白和蛋白聚糖中寡聚糖合成中的糖基供体的活化中间体, 也可与胆红素结合, 以利胆红素排泄。3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)是半胱氨酸的活化代谢物。它是硫化蛋白聚糖的活性硫酸供体。UDP-葡萄糖醛酸和 PAPS 还是肝生物转化结合反应中葡萄糖醛酸和硫酸基的供体, 在解毒中发挥重要作用。

第二节 核苷酸的合成与分解

细胞内的核酸主要以核蛋白的形式存在。因此, 食物中的核酸也主要为核蛋白。核蛋白在胃中受胃酸作用降解为核酸和蛋白质。核酸随后进入小肠。在胰液和肠液中的核酸水解酶的作用下降解为核苷酸。核苷酸可进一步降解为核苷和磷酸, 最后核苷分解为碱基和戊糖, 其降解过程见图 10-1。核酸的降解产物核苷酸及其进一步降解生成的核苷、碱基、戊糖均可被肠黏膜细胞吸收利用。核苷酸还可在肠黏膜细胞内被进一步水解。

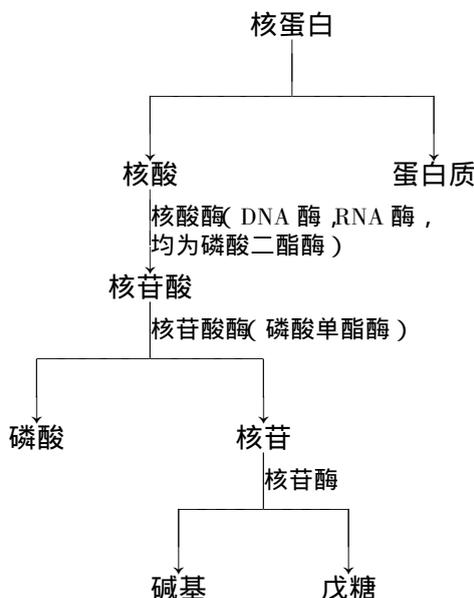


图 10-1 核苷酸的降解过程

核苷酸分为嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸两类, 它们有不同的代谢方式。

一、嘌呤核苷酸的代谢

(一) 嘌呤核苷酸的合成代谢

嘌呤核苷酸的合成包括从头合成(*de novo synthesis*)和补救合成(*salvage pathway*)两种方式。

1. 嘌呤核苷酸的从头合成

用同位素标记化合物进行的研究证明, 生物体内能利用谷氨酰胺、天冬氨酸、甘氨酸、一碳单位和 CO_2 为元素来源合成嘌呤碱基(图 10-2)。

嘌呤核苷酸的从头合成途径有四个主要特点: ① 参与从头合成途径的酶均在胞液中。② 以糖代谢的磷酸戊糖途径中合成的 5'-磷

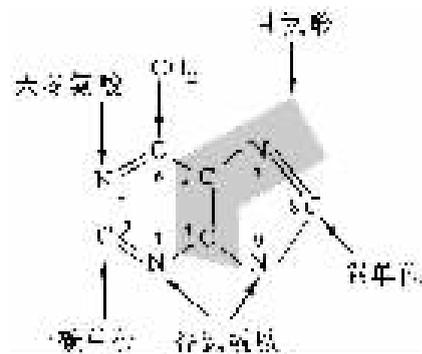


图 10-2 嘌呤碱基的元素来源

酸核糖(5'-PR)为原料,经11步反应生成次黄嘌呤核苷酸(inosine 5'-monophosphate, IMP)。③在合成IMP的过程中,由氨基酸、CO₂、一碳单位逐步提供元素或基团,在5'-磷酸核糖分子上完成嘌呤碱基的合成。④从IMP出发再合成AMP和GMP。

(1) IMP的合成途径 合成IMP需经11步反应(见图10-3),可分为三个阶段。第一阶段是合成激活阶段,此阶段仅包含第①步反应,即5'-磷酸核糖在磷酸核糖焦磷酸激酶(5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate kinase, PRPPK 或称 PRPP合成酶)的催化下合成出磷酸核糖焦磷酸(PRPP)的反应。第二个阶段是从第②步到第⑥步的反应阶段,即从PRPP出发合成出咪唑环的阶段。其反应为:第②步是以PRPP

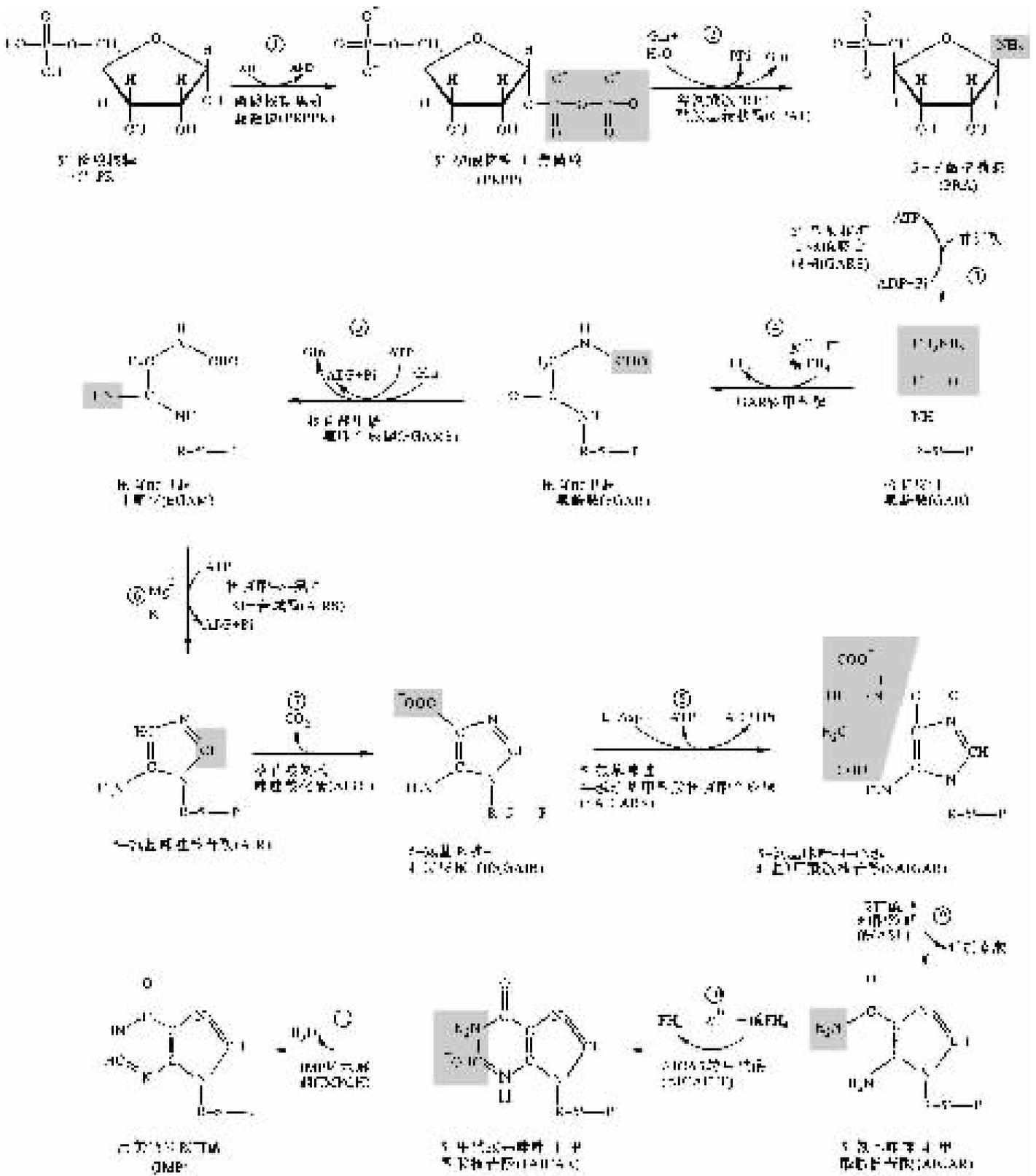


图 10-3 嘌呤核苷酸的从头合成途径

为原料经谷氨酰胺 PRPP 酰胺基转移酶催化,从谷氨酰胺获得酰胺基生成 5'-磷酸核糖胺 (5'-phosphoribosylamine, PRA)。第③步是 PRA 经 5'-磷酸核糖甘氨酸酰胺合成酶的催化,与甘氨酸缩合生成甘氨酸酰胺核苷酸 (glycinamide ribonucleotide, GAR)。第④步是 GAR 经 GAR 转甲酰酶催化,从 N^{10} 甲酰 FH_4 接受一碳单位,生成甲酰甘氨酸酰胺核苷酸 (formylglycinamide ribonucleotide, FGAR)。第⑤步是 FGAR 在甲酰甘氨酸酰胺核苷酸合成酶催化下,再从谷氨酰胺获得氨基,生成甲酰甘氨酸脒核苷酸 (formylglycinamide ribonucleotide, FGAM)。第⑥步是 FGAM 经氨基咪唑核苷酸合成酶催化,闭环生成氨基咪唑核苷酸 (5-aminoimidazole ribonucleotide, AIR)。第三个阶段是从第⑦步到第⑪步的反应阶段,即从 AIR 开始合成 IMP 的阶段。其反应是:第⑦步以 AIR 为原料,经氨基咪唑核苷酸羧化酶催化,与 CO_2 反应生成 5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸 (carboxyaminoimidazole ribonucleotide, CAIR)。第⑧步是 CAIR 经 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀酸)甲酰胺核苷酸合成酶催化,与天冬氨酸反应生成 5-氨基咪唑-4-(N-琥珀酸酰甲酰胺)核苷酸 (5-aminoimidazole-4-[succinylcarboxamide]ribonucleotide, SAICAR)。第⑨步是 SAICAR 由腺苷酰琥珀酸裂解酶催化,脱去延胡索酸,生成 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸 (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, AICAR)。第⑩步是 AICAR 经 AICAR 转甲酰酶催化,再从甲酰 FH_4 接受一碳单位,合成 5-甲酰胺基咪唑-4-甲酰胺核苷酸 (5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide, FAICAR)。第⑪步是 FAICAR 经 IMP 环水解酶催化,脱水生成次黄嘌呤核苷一磷酸 (肌苷酸, inosinate, IMP)。

(2) AMP 和 GMP 的合成 IMP 是 AMP 和 GMP 合成的共同前体物。从 IMP 合成 AMP 和 GMP 均需要两步反应(图 10-4)。但二者的酶促反应不同,因此最终产物不同。AMP 合成的第一步反应是由腺苷酸代琥珀酸合成酶 (adenylosuccinate synthetase, ASS) 催化,IMP 与天冬氨酸反应生成腺苷酸代琥珀酸。第二步反应是由腺苷酸代琥珀酸裂解酶催化裂解生成 AMP。GMP 合成的第一步反应是以 IMP 为原料,由 IMP 脱氢酶 (IMP dehydrogenase, IMPD) 催化脱氢生成黄嘌呤核苷酸 (xanthosine 5'-monophosphate, XMP)。第二步反应是 XMP 经 GMP 合成酶催化,从谷氨酰胺获得氨基,生成 GMP。

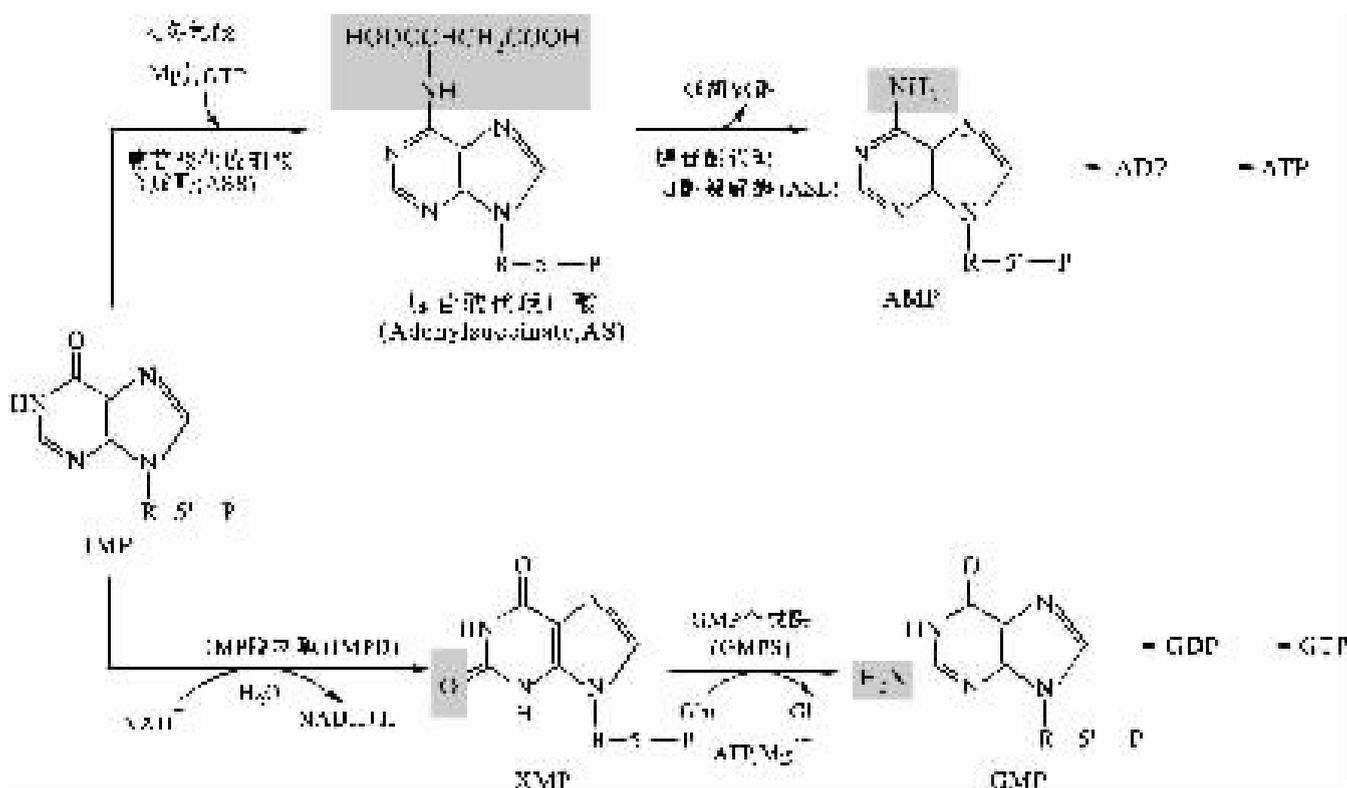


图 10-4 由 IMP 合成 AMP 和 GMP

(3) 嘌呤核苷酸从头合成的调节

细胞和机体能够对嘌呤核苷酸的从头合成进行调节,以保持细胞和机体内相对稳定的嘌呤核苷酸供

应。嘌呤核苷酸从头合成的调节包括促进和抑制嘌呤核苷酸从头合成两个方面。

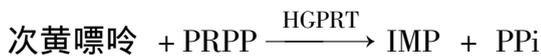
1) 嘌呤核苷酸合成的底物和产物的激活作用 对嘌呤核苷酸从头合成的激活调节包括对合成途径前端的前向激活调节和对合成途径后端的正反馈调节两个方面。前向激活调节是酶的底物对酶本身的激活作用。前端的前向激活调节主要是指合成途径头两步反应的两个关键酶的活性受其底物的激活作用。这两个关键酶是 PRPPK 和谷氨酰胺 PRPP 酰胺基转移酶 (GPAT), 激活其活性的底物分别是 ATP、5'-磷酸核糖和 PRPP。结果是增加 IMP 的合成。

对合成途径后端的激活调节是正反馈调节, 主要是产物 ATP 和 GTP 分别对 GMP 合成酶和腺苷酸代琥珀酸合成酶的激活作用, 进而增加 GTP 和 ATP 的合成。

2) 嘌呤核苷酸合成产物的反馈抑制调节 对嘌呤核苷酸从头合成途径的反馈抑制调节主要包含 6 个长反馈和 2 个短反馈调节。六个长反馈调节是指 AMP、GMP 和 IMP 对 PRPPK 和 GPAT 这两个关键酶活性的反馈抑制作用。两个短反馈调节是指 AMP 对 ASS、GMP 对 IMPD 活性的反馈抑制作用, 进而抑制嘌呤核苷酸的从头合成 (见图 10-5)。

2. 嘌呤核苷酸的补救合成

嘌呤核苷酸的补救合成是指在酶的催化下, 由 PRPP 的磷酸核糖部分与嘌呤碱基结合形成核苷酸或由核苷经激酶催化形成核苷酸的一步合成反应。催化这些反应的酶分别是腺嘌呤磷酸核糖转移酶 (adenine phosphoribosyl transferase, APRT)、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT) 和腺苷激酶 (adenosine kinase)。某些组织及器官, 如脑、骨髓等主要通过补救合成方式合成嘌呤核苷酸。其合成反应如下:



HGPRT 缺陷的患儿表现为智力发育受阻、共济失调、具有攻击性和敌对性。患儿还有咬自己的口唇、手指和脚趾等自毁容貌的表现, 称为自毁容貌症或 Lesh-Nyhan 综合征。

(二) 嘌呤核苷酸的分解代谢

嘌呤核苷酸的分解代谢包括 3 个基本过程 (1) 在核苷酸酶的作用下水解为核苷 (2) 核苷在核苷磷酸化酶作用下分解为嘌呤碱基和 1-磷酸核糖, 1-磷酸核糖在磷酸核糖变位酶作用下转变为 5'-磷酸核糖, 5'-磷酸核糖进入磷酸戊糖途径进行代谢 (3) 嘌呤碱基进一步代谢, 一方面可以参加核苷酸的补救合成, 另一方面可进入分解代谢, 最终形成尿酸, 随尿液排出体外 (见图 10-6)。

尿酸是嘌呤代谢的终产物, 水溶性差, 肾是其排泄器官。正常成人血浆尿酸含量约为 0.12 mmol/L ~ 0.36 mmol/L, 男性稍高于女性。多种遗传缺陷都可以导致尿酸过量产生。当血中尿酸浓度超过 8 mg/dL 时, 尿酸盐结晶即可沉积于关节、软组织、软骨及肾脏处, 导致关节炎、尿路结石、肾疾病, 尤其是常常引起痛风症 (Gout)。

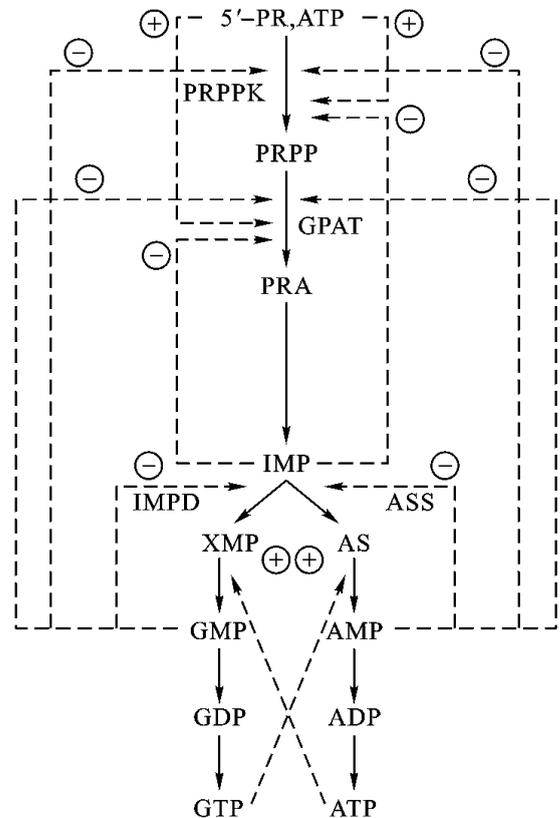


图 10-5 嘌呤核苷酸从头合成的调节

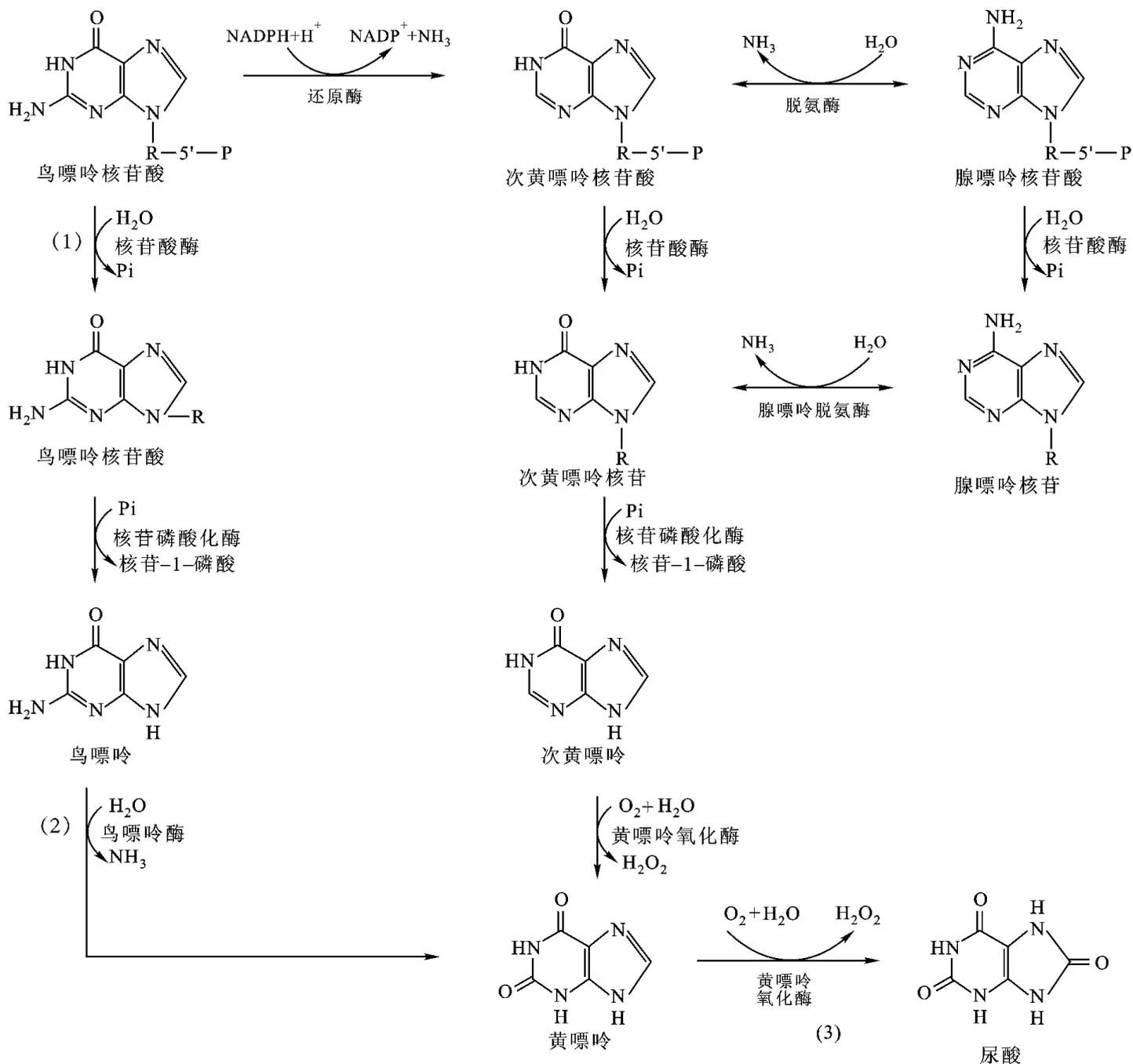


图 10-6 嘌呤核苷酸的分解代谢

二、嘧啶核苷酸的代谢

嘧啶核苷酸的代谢同样包括合成代谢和分解代谢两条途径。

(一) 嘧啶核苷酸的合成代谢

1. 嘧啶核苷酸的从头合成

用同位素标记实验证明 CO₂、谷氨酰胺和天冬氨酸是嘧啶碱基的元素来源(见图 10-7)。

(1) 从头合成途径的特点 嘧啶核苷酸从头合成途径不同于嘌呤核苷酸的合成。其特点是：① 合成所需要的酶系大多在胞液内，但个别酶，如二氢乳清酸脱氢酶，则位于线粒体内。② 合成从 CO₂ 和谷氨酰胺开始，经 6 步反应先合成嘧啶环，再与 PRPP 反应生成尿嘧啶核苷酸(UMP)。③ 由 UMP 出发再合成其他的嘧啶核苷酸。

(2) UMP 的合成途径 嘧啶核苷酸从头合成途径需经 6 步反应合成出 UMP(见图 10-7)。而 UMP 是所有其他嘧啶核苷酸的共同前体。UMP 的从头合成分三个阶段。第一个阶段是氨基甲酰磷

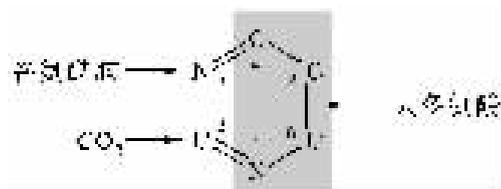


图 10-7 嘧啶的元素来源

酸的合成,此阶段仅包括反应①。CO₂、ATP 和谷氨酰胺在氨基甲酰磷酸合成酶 II(CPS II)催化下合成氨基甲酰磷酸(carbamoyl phosphate ,CP)。第二阶段是氨基甲酰天冬氨酸的合成,此阶段也仅包括反应②。氨基甲酰磷酸在天冬氨酸甲酰转移酶催化下与天冬氨酸结合生成氨基甲酰天冬氨酸(carbamoyl aspartate ,CA)。第三阶段是嘧啶环的合成,包括反应③到反应⑥。反应③:氨基甲酰天冬氨酸由二氢乳清酸酶催化水解生成二氢乳清酸(dihydroorotic acid ,DHOA)。反应④:DHOA 经二氢乳清酸脱氢酶催化生成乳清酸(orotate ,OA)。反应⑤:乳清酸在乳清酸磷酸核糖转移酶催化下,与 1 分子 PRPP 反应,生成乳清酸核苷酸(orotidine 5'-monophosphate ,OMP)。反应⑥:OMP 由 OMP 脱羧酶催化生成 UMP。

(3) CTP 的合成 CTP 的合成是在核苷三磷酸水平上进行的转换,从 UMP 出发经三步反应合成出 CTP(图 10-8)。反应过程是先由尿苷酸激酶催化合成出 UDP。然后由二磷酸核苷激酶催化生成 UTP。最后由 CTP 合酶催化转换成 CTP。

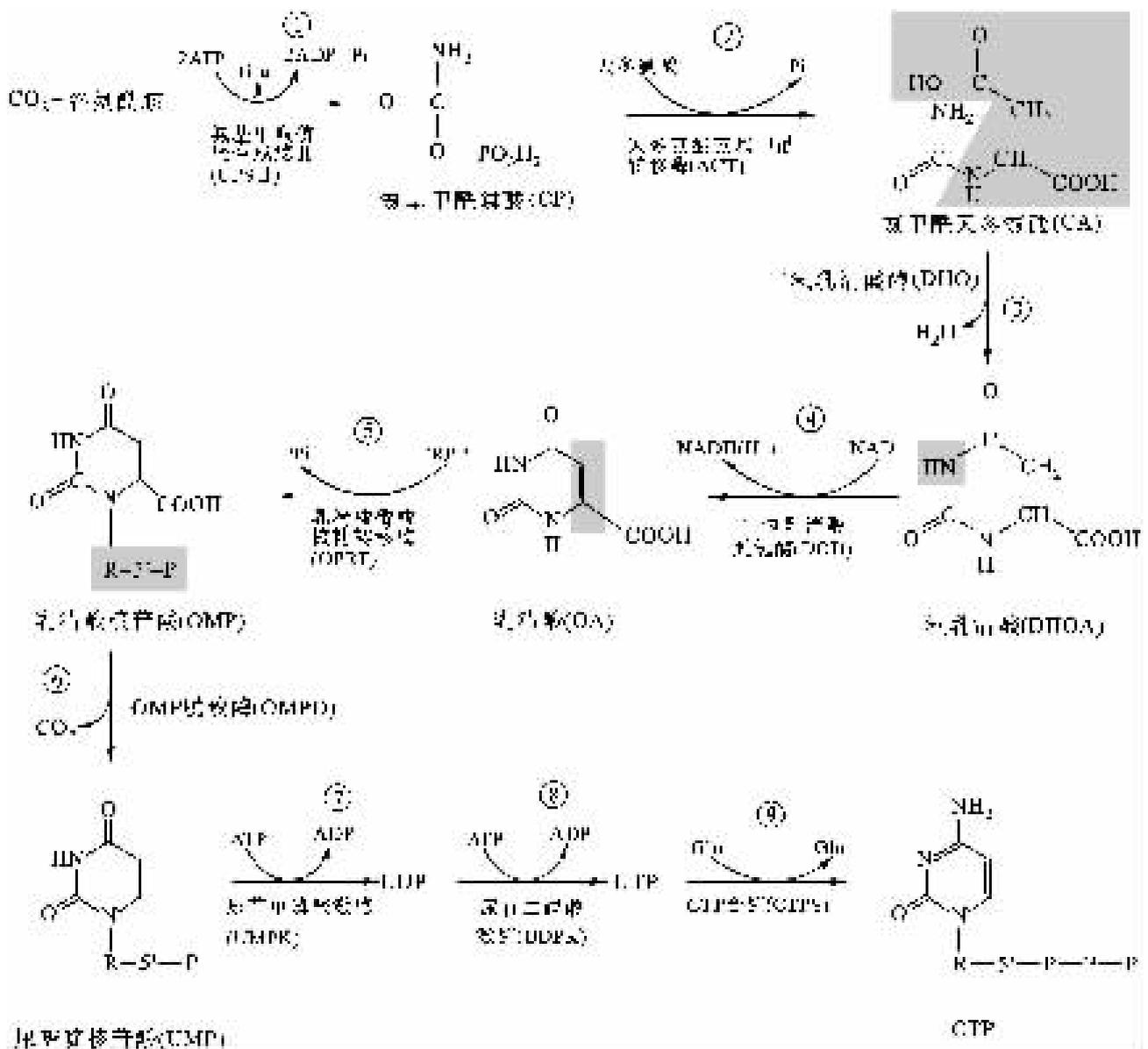


图 10-8 嘧啶核苷酸的从头合成途径

(4) TMP 的合成 TMP 的合成是在核苷一磷酸水平上进行的转换。也从 UMP 开始,先合成 UDP,尔后分成两条途径合成 TMP(图 10-9)。一条途径是 UDP 在还原酶催化下合成出 dUDP,进而生成 dUMP。dUMP 在 TMP 合酶作用下甲基化生成 TMP。另一条途径是 UDP 在激酶作用下先生成 UTP,尔后生成 CTP。CTP 经酶催化形成 dCMP。dCMP 脱氨基生成 dUMP,然后 dUMP 在 TMP 合酶催化下合成 TMP。

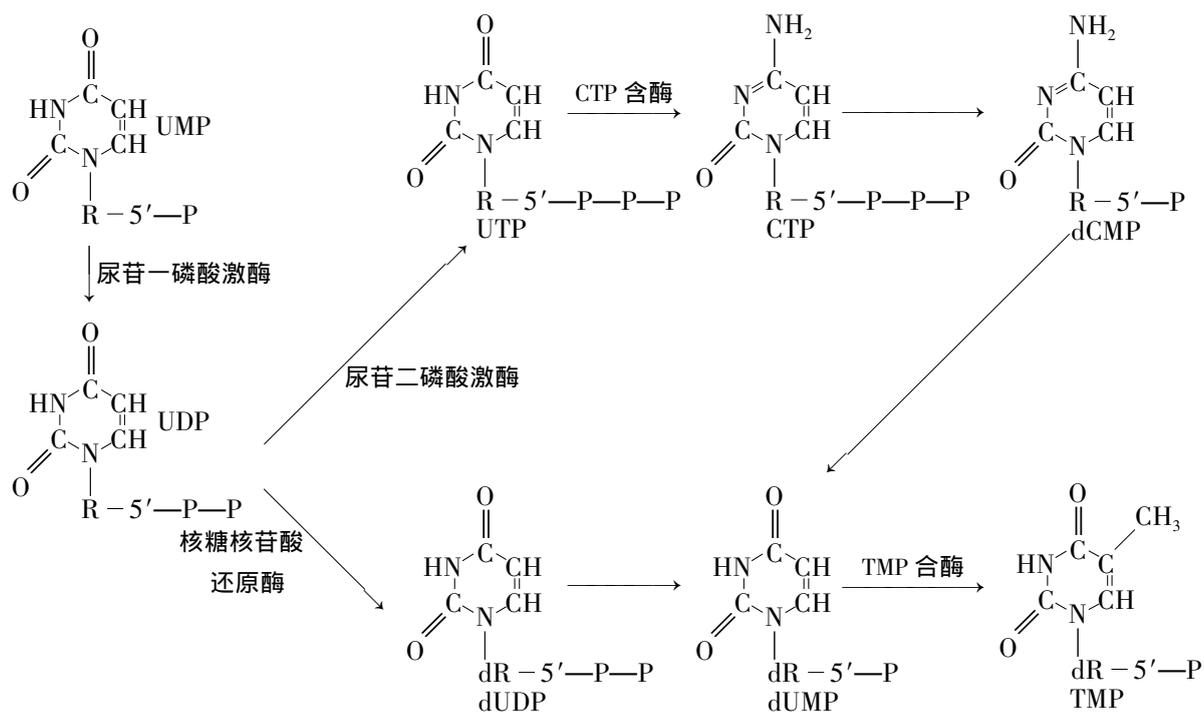


图 10-9 TMP 的合成

(5) 嘧啶核苷酸从头合成的调节 嘧啶核苷酸从头合成的调节也包括激活和抑制两种调节方式。

ATP 对磷酸核糖焦磷酸激酶具有前向激活作用,已如前述。PRPP 对乳清酸磷酸核糖转移酶也具有前向激活作用。它们均可促进嘧啶核苷酸的合成。值得注意的是,ATP 和 PRPP 同时表现在对嘌呤核苷酸从头合成途径和对嘧啶核苷酸从头合成途径的调节上,这样就能保证嘌呤和嘧啶核苷酸合成速率的同步化,以便合成出等量的嘌呤和嘧啶核苷酸。

对嘧啶核苷酸合成的反馈抑制调节,主要集中在产物对 4 个关键酶的反馈抑制上(见图 10-10)。第一个关键酶是氨基甲酰磷酸合成酶 II(CPS II),由 UMP 反馈抑制。第二个关键酶是天冬氨酸转氨基甲酰酶(CAT),由 UMP 和 CTP 反馈抑制。第三个关键酶是磷酸核糖焦磷酸激酶(OPRT),由 ADP 和 GDP 反馈抑制。第四个关键酶是 CTP 合酶(CTPS),由 CTP 反馈抑制。CTP 对天冬氨酸转氨基甲酰酶的反馈调节为变构调节,该酶有 6 个催化亚基和 6 个调节亚基。当 CTP 浓度升高时,CTP 就与调节亚基结合,使调节亚基和催化亚基逐步变构,从而使酶由活性状态逐步转变为无活性状态,实现其反馈抑制作用。

2. 嘧啶核苷酸的补救合成

生物体内嘧啶核苷酸的补救合成主要有两种方式。

(1) 一步合成方式

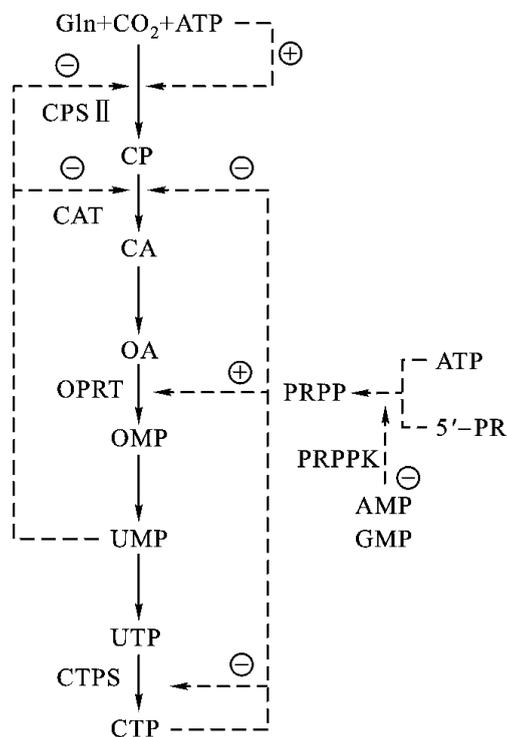
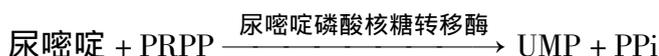
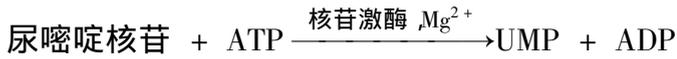
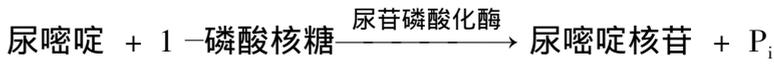


图 10-10 嘧啶核苷酸从头合成的调节

(2) 二步合成方式



(二) 嘧啶核苷酸的分解代谢

嘧啶核苷酸的分解代谢首先是降解为游离嘧啶和磷酸核糖。碱基进一步分解包括两个方面 (1) 胞嘧啶脱氨基转化为尿嘧啶。尿嘧啶还原成二氢尿嘧啶, 进而水解开环, 最终水解生成 NH_3 , CO_2 和 β -丙氨酸 (2) 胸腺嘧啶还原为二氢胸腺嘧啶, 进而水解开环生成 NH_3 , CO_2 和 β -氨基异丁酸。 β -氨基异丁酸可进一步代谢或直接随尿排出体外(图10-11)。癌症病人 β -氨基异丁酸的排出量增加。

三、脱氧核苷酸的合成

脱氧核苷酸(包括嘌呤脱氧核苷酸和嘧啶脱氧核苷酸)是由相应的核苷二磷酸(NDP)通过还原其核糖上2位羟基生成的。催化从四种核苷酸脱氧生成相应的四种脱氧核苷酸的酶均是一种酶,称为核糖核

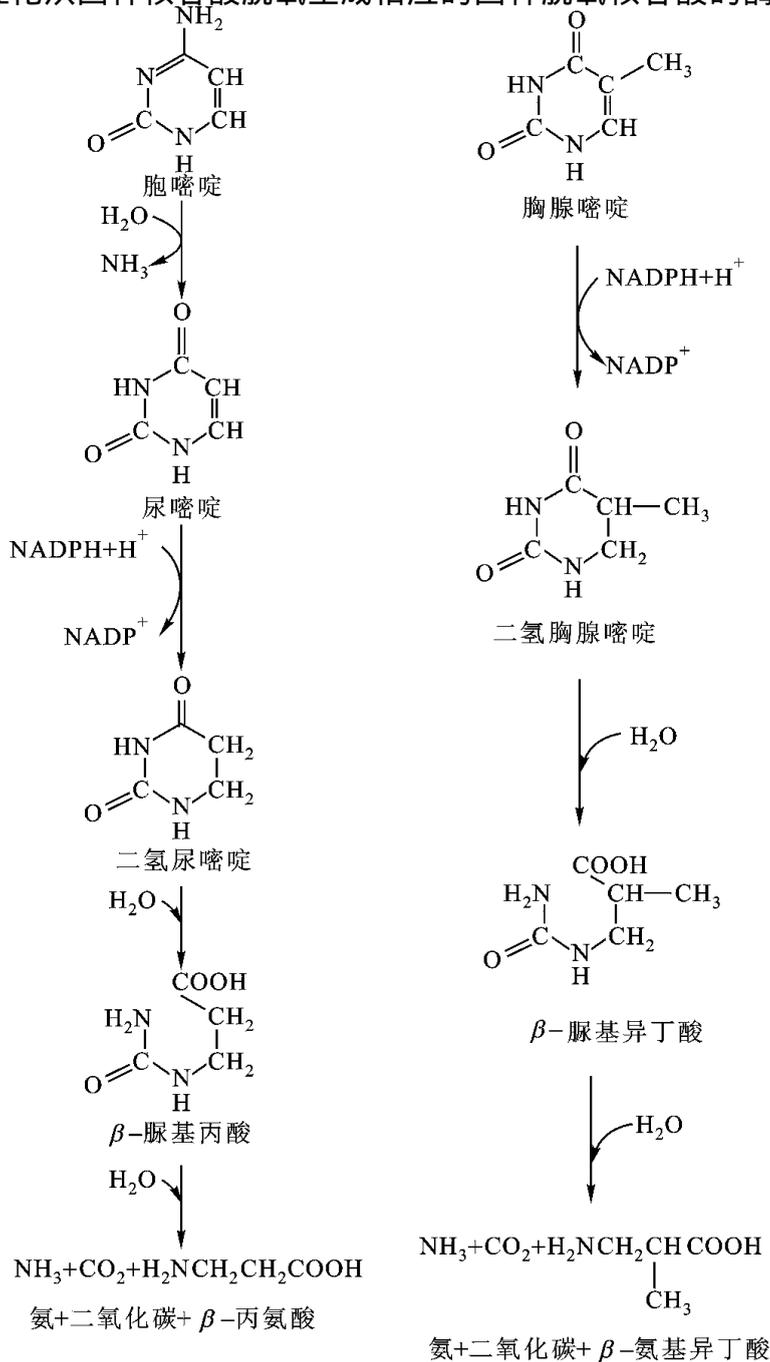


图 10-11 嘧啶碱的分解代谢

核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase)。此酶有以下几个特点 (1) 此酶是由两种亚基(R1 和 R2)组成的四聚体酶。其中 ,R1 的活性中心含 1 个谷氨酸残基和 3 个半胱氨酸残基 ,是核苷酸还原的供氢体。(2) R2 含有 1 个稳定的酪氨酸残基自由基 ,可接受来自 R1 半胱氨酸的电子 ,使 R1 的 1 个半胱氨酸残基生成硫自由基而活化。(3) 结合在 R1 亚基上的核苷酸 C2'脱氧 ,与来自另 2 个半胱氨酸残基的氢生成水 ,同时这 2 个半胱氨酸残基氧化形成二硫键。R2 亚基再将电子转移到 R1 ,生成游离的脱氧核苷酸。(4) 由于上述反应在 R1 亚基上形成的二硫键可被一种特殊的蛋白质 ,硫氧还蛋白所还原。这样 ,酶又恢复到初始的状态。(5) 被氧化的硫氧还蛋白在硫氧还蛋白还原酶的催化下 ,以 NADPH 为辅酶 ,得以还原 (图 10 - 12)。

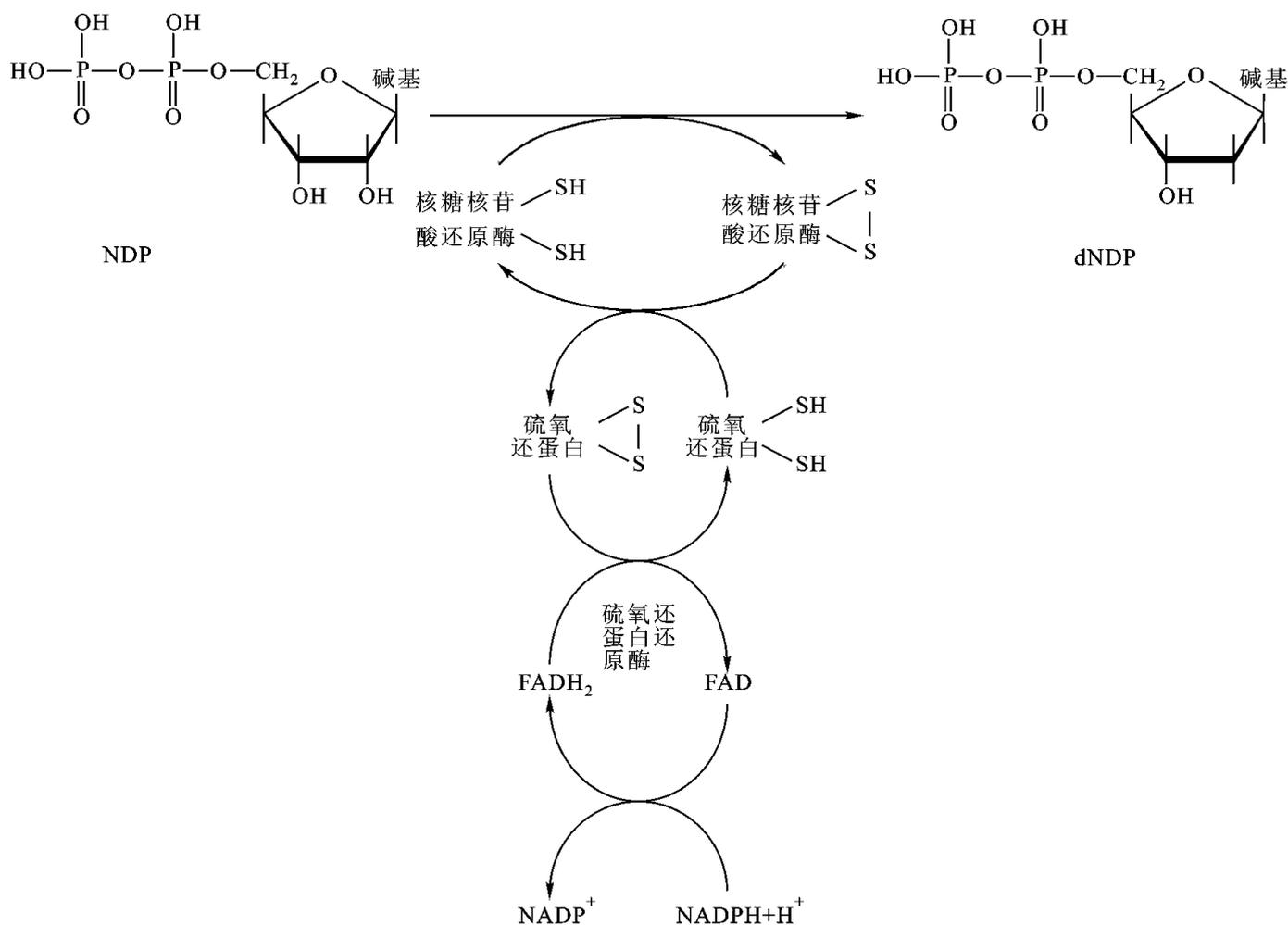
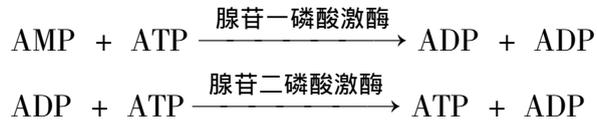


图 10 - 12 脱氧核苷酸的合成

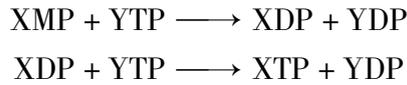
脱氧胸腺嘧啶核苷酸(dTMP)可以 dUMP 为原料 ,在胸腺嘧啶核苷酸合酶催化下经甲基化而生成。另外 ,dTMP 也可由脱氧胸苷经胸苷激酶催化生成。在正常肝组织中此酶活性很低。肿瘤细胞的恶性增殖需要 DNA 的快速合成。因此需要丰富的 dTMP 的供应。在肝癌中 ,胸苷激酶活性明显升高并与其恶性程度相关。

四、核苷二磷酸、核苷三磷酸的合成

核苷二磷酸(NDP)及核苷三磷酸(NTP)可由核苷一磷酸合成 ,合成过程需要特异的核苷酸激酶催化 ,例如 ,ADP 和 ATP 的合成。



其他的核苷二磷酸及核苷三磷酸也由特异的核苷酸激酶催化合成。合成过程与 ADP 和 ATP 的合成相同。其共同的反应为：



第三节 核苷酸的代谢障碍和抗代谢物

一、核苷酸的代谢障碍

参与核苷酸代谢的某些酶的缺失或调节失常,都会引起核苷酸代谢障碍和疾病。目前已经发现的由核苷酸代谢引起的疾病大多为嘌呤核苷酸代谢障碍引起的疾病。其根本原因是由于遗传缺陷和调节失常。核苷酸代谢障碍引起的部分疾病列于表 10-1 中。

表 10-1 核苷酸代谢障碍引起的部分疾病

临床疾病	缺陷的酶	原因	临床特点	遗传类型
1. 嘌呤核苷酸代谢障碍				
痛风	① PRPP 合成酶 ② 次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)部分缺陷	调节失常	嘌呤和尿酸产生和排泄过多、高尿酸血症	X 染色体连锁,隐性遗传
Lesch-Nyhan 综合征	HGPRT 完全缺陷	遗传缺陷	嘌呤和尿酸产生排泄多、脑性瘫痪、自毁容貌症	X 染色体连锁,隐性遗传
免疫缺陷症	① 腺苷脱氨酶(ADA) ② 嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)	遗传缺陷	T、B 细胞免疫缺陷,脱氧腺苷尿症、骨骼发育异常 T 细胞缺乏、肌苷尿、低尿酸血症	常染色体隐性遗传
肾结石	腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)	遗传缺陷	2,8-二羟基腺嘌呤肾结石、尿痛、尿血等	常染色体隐性遗传
黄嘌呤尿	黄嘌呤氧化酶	遗传缺陷	黄嘌呤肾结石、低尿酸血症、或无症状	常染色体隐性遗传
2. 嘧啶核苷酸代谢障碍				
先天性乳清酸尿症	乳清酸磷酸核糖转移酶 乳清酸核苷酸脱羧酶	遗传缺陷 遗传缺陷	乳清酸排泄多、红细胞性贫血 乳清苷酸和乳清酸排泄较多、恶性贫血	常染色体隐性遗传 常染色体隐性遗传

二、抗代谢物

依据核苷酸代谢中间体的结构特征,已经人工合成了许多核苷酸代谢中间体的类似物。这些核苷酸代谢类似物是核苷酸代谢的抗代谢物。它们可以干扰、抑制或阻断核苷酸代谢途径中的某些步骤或整个代谢途径,从而抑制核苷酸的代谢水平。这些核苷酸代谢类似物不仅是进行生化代谢途径研究的工具,也是治疗某些疾病的有效药物。许多核苷酸代谢类似物作为抗代谢药物已经在临床上广泛使用。

1. 核苷酸代谢类似物的种类

人工合成的核苷酸代谢类似物主要有 6 类。(1) 嘌呤核苷酸代谢类似物主要包括 6-巯基鸟嘌呤(6-thioguanine β -TG)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)、8-氮杂鸟嘌呤(8-azaguanine, 8-AG)、氮杂硫嘌呤(azathiopurine, AZTP)、别嘌呤醇(allopurinol, APO)等(图 10-13)。(2) 嘧啶核苷酸代谢类似物主要有 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)、5-碘-2-脱氧尿嘧啶(5-iodo-2'-deoxyuridine, 5-IDU)、6-氮杂尿嘧啶(6-azauridine β -AU)等(图 10-14)。(3) 氨基酸类似物主要有氮杂丝氨酸(azaserine, AS)、6-重氮-5-氧正亮氨酸(diazonorleucine, DAL)、磷乙天冬氨酸(N-phosphoacetyl-L-aspartate, PALA)等。(4) 叶酸类似物主要有氨蝶呤(aminopterin, AP)、甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)等。(5) 核苷类似物主要有阿糖胞苷(arabinosyl cytosine, ara-c)、环胞苷(cyclo-cytidine, cyclo-c)等(图 10-15)。(6) 作用于核糖核苷酸还原酶的代谢类似物主要有羟基脲(hydroxyurea, HU)、羟基胍(hydroxyguanidine, HG)、胍唑(guanazole, GZ)等(图 10-16)。

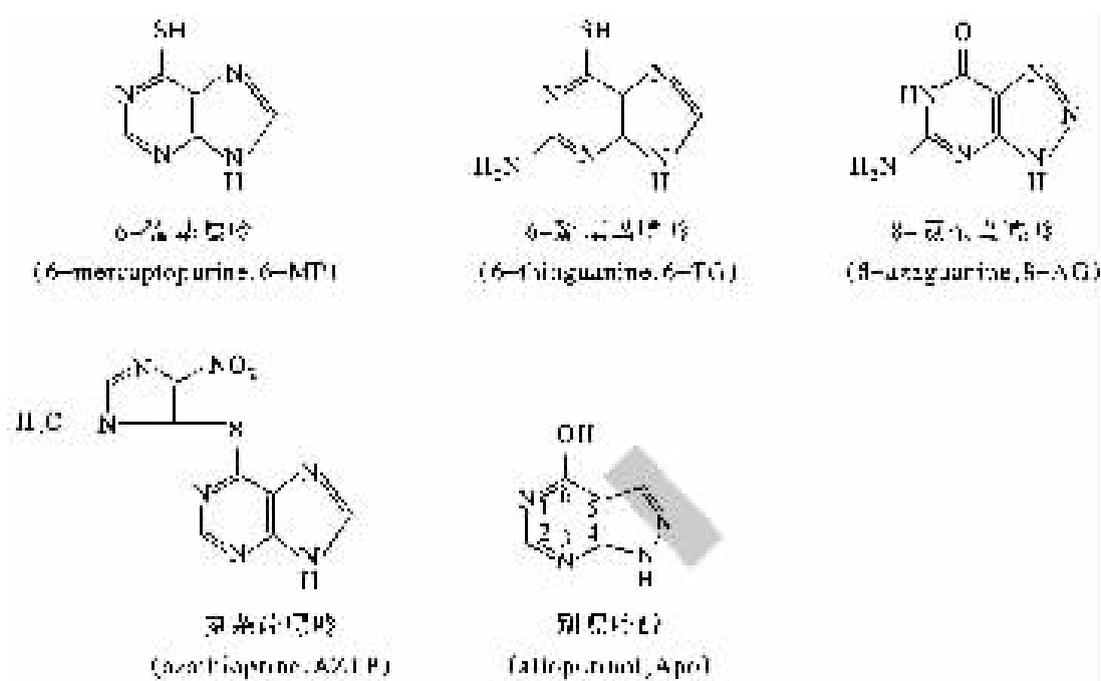


图 10-13 嘌呤核苷酸代谢类似物

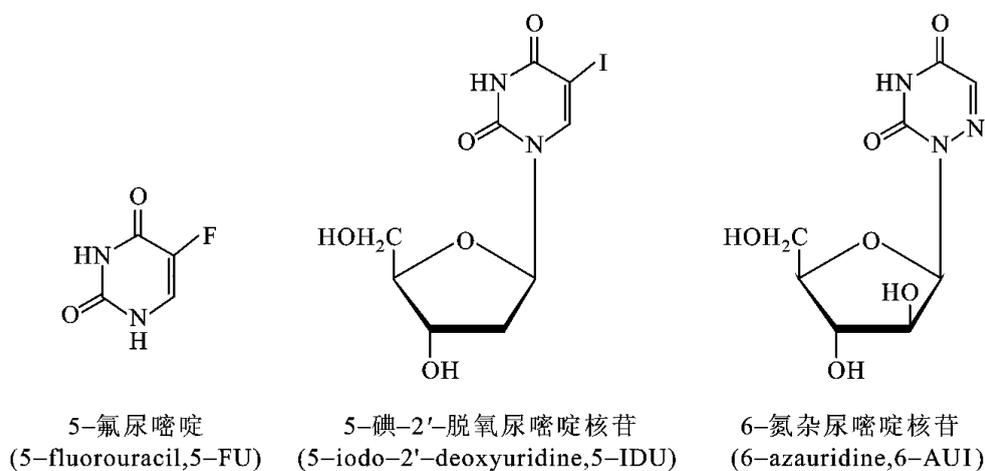


图 10-14 嘧啶核苷酸代谢类似物

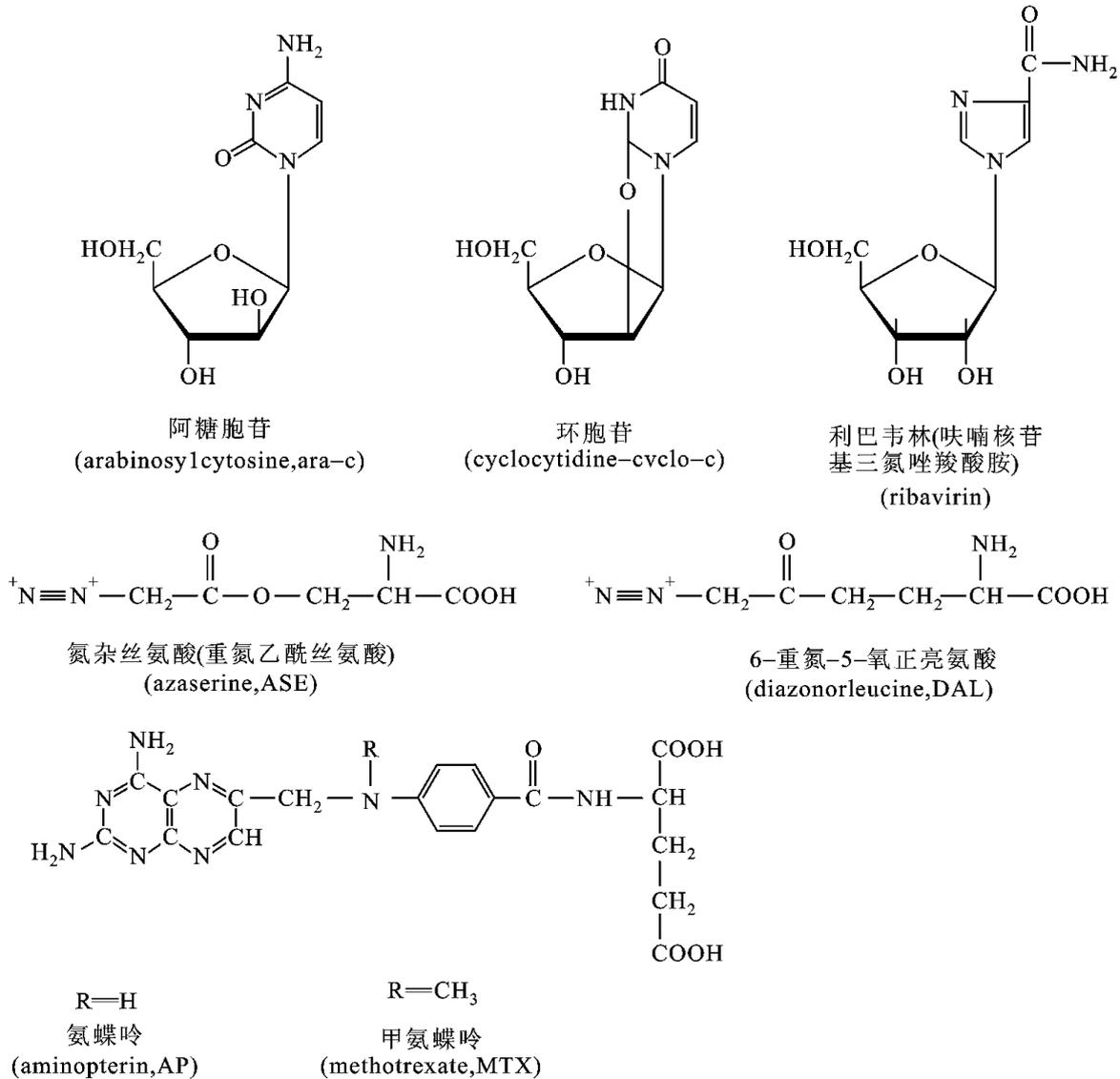


图 10-15 核糖、氨基酸和叶酸的代谢类似物

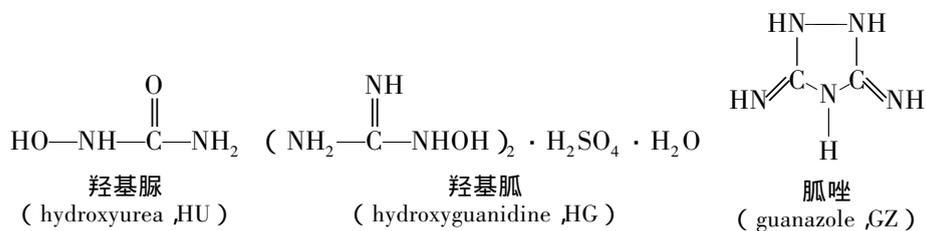


图 10-16 核糖核苷酸还原酶的代谢类似物

2. 核苷酸代谢类似物的临床应用

1947年, Sidney Farber 首次报告应用叶酸类似物氨蝶呤治疗 16 例儿童急性白血病, 其中 10 例获得明显疗效。1949年, Seeger 等人合成了甲氨蝶呤, 并广泛应用于急性白血病的治疗。从此, 核苷酸代谢类似物作为一类重要的抗肿瘤药物受到了广泛的关注。1951年前后, Elion 和 Hitchings 合成并试验了一百多种嘌呤类似物。先后证明了 6-巯基嘌呤具有治疗肿瘤的作用, 别嘌呤醇具有治疗痛风的作用。为此, Hitchings 和 Elion 于 1988 年获得诺贝尔奖。之后嘧啶类似物, 氨基酸类似物, 核苷类似物, 核糖核苷酸还原酶的代谢类似物等核苷酸代谢类似物先后被发现和人工合成, 成为人类治疗各种癌症和抗病毒感染的有力武器。部分核苷酸类似物的临床应用列于表 10-2。

表 10-2 部分核苷酸代谢类似物的临床应用

药物名称	正常代谢物	治疗的疾病	主要作用的酶	作用的代谢途径
6-巯基嘌呤 (6-MP)	嘌呤核苷酸	① 白血病 ;② 自身免疫性疾病 ;③ 妊娠滋养细胞肿瘤等	① IMP 脱氢酶 ;② 腺苷酸代琥珀酸合成酶	嘌呤核苷酸合成
别嘌呤醇 (APO)	黄嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤	痛风	黄嘌呤氧化酶	嘌呤核苷酸分解
利巴韦林(病毒唑)	5-氨基咪唑-4-羧酸核苷酸	广谱抗病毒药① 呼吸道合胞病毒 ;② 流感病毒 ;③ 甲肝病毒 ;④ 腺病毒等	不详	嘧啶核苷酸合成
5-氟尿嘧啶 (5-FU)	尿嘧啶	① 胃癌 ;② 大肠癌 ;③ 食管癌 ;④ 肝癌 ;⑤ 乳腺癌 ;⑥ 皮肤癌等	胸苷酸合成酶	嘧啶核苷酸合成
重氮脱氧胸苷 (AZT)	胸嘧啶核苷	艾滋病	不详	嘧啶核苷酸合成
氮杂丝氨酸和 6-重氮-5-氧正亮氨酸	谷氨酰胺	多种肿瘤	① 谷氨酰胺 PRPP 氨基转移酶 ② 甲酰甘氨酸核苷酸合成酶 ③ GMP 合成酶④ 二磷酸核苷激酶	嘌呤核苷酸合成 嘧啶核苷酸合成
氨蝶呤和甲氨蝶呤	叶酸	① 急性白血病② 头颈部肿瘤③ 妊娠滋养细胞瘤④ 骨肉瘤⑤ 淋巴癌⑥ 肝癌⑦ 乳腺癌⑧ 卵巢癌等	① 二氢叶酸还原酶② GAR 转甲酰酶③ AICR 转甲酰酶	嘌呤核苷酸合成
羟基脲和羟基基胍	脱氧核苷	① 慢性粒细胞白血病② 恶性淋巴瘤③ 其他骨髓增生性疾病	核苷酸还原酶	脱氧核苷酸的合成
阿糖胞苷	形成 Ara-CTP	① 急性淋巴细胞性白血病 ② 病毒感染性疾病,如单纯疱疹病毒、牛痘病毒、带状疱疹病毒等	DNA 聚合酶	DNA 合成
磷乙天冬氨酸	天冬氨酸	① 乳腺癌② 胰腺癌③ 软组织肉瘤等	ACT 酶	嘧啶核苷酸合成

Summary

Nucleotides, with different metabolic functions, are some important compounds in cells because they are the original materials for the synthesis of nucleic acids. Nucleotides play critical and diverse roles in many life processes. They participate in almost all biochemical metabolisms as various forms of derivatives. They have many important metabolic functions such as constructive units of nucleic acids; energetic materials in metabolism; regulation mediators of physiological functions; constructive components of coenzymes; precursors of some cofactors; allosteric regulators of enzymes and phosphate donors for covalent modifications of enzymes; components of some activated intermediates of substance metabolism.

In mammalian cells, the pathways for the biosynthesis of nucleotides have two classes: de novo pathways and salvage pathways. In the de novo pathway, purine nucleotides are synthesized from the original materials, such as aspartate, glycine, glutamine, CO_2 and one-carbon units, and the framework for a purine base is assembled piece by piece directly into a ribose-based structure. The de novo pathway for purine nucleotides synthesis leading to inosine 5-monophosphate (IMP) consists of eleven metabolic steps. Afterwards, AMP and GMP are synthesized from IMP. In salvage pathway, pre-

formed bases are connected to PRPP. The end product of degradation of purine nucleotides is uric acid, which is excreted into urine.

In the de novo pathway for biosynthesis of pyrimidine nucleotides, the framework of pyrimidine base is assembled first from simpler compounds, such as aspartate, glutamine and CO_2 , then attached to PRPP. There is a 6-step reaction in this pathway for the biosynthesis of pyrimidine nucleotides and uridine monophosphate (UMP) is first synthesized. Then, from the beginning of UMP, CTP and TMP are formed. The salvage synthesis of pyrimidine nucleotides has two types: utilising pyrimidine and PRPP and synthesizing first by the reaction of pyrimidine and 5-PR, then by the reaction of pyrimidine nucleosides and ATP. The degradation of pyrimidine nucleotides produces first pyrimidine and phosphate ribose. After that, the pyrimidine ring is opened. Last step is to form NH_3 , CO_2 , β -alanine or β -aminoisobutyrate.

The disorders of nucleotides synthesis and degradation can induce many kinds of diseases, such as gout, Lesch-Nyhan syndrome, immunodeficiency disease and so on.

At normal conditions, nucleotide metabolism can be regulated very well by itself. The regulation usually includes two types, activation and inhibition.

Many nucleotide metabolic analogues, such as 6-mercaptopurine (6-MP), 5-fluorouracil (5-FU), methotrexate (MTX), etc., have been synthesized by artificial methods. They can interfere with, inhibit and block the biosynthesis of nucleotides and further nucleic acids. They are known as antimetabolic substances, which are being applied to the treatments of tumor, virus and other diseases.

思 考 题

1. 核苷酸有哪些代谢功能？有何生物学意义？
2. 核苷酸有哪些种类？它们有哪些合成和分解方式？
3. 核苷酸合成有哪些调节类型和调节机制？
4. 核苷酸代谢类似物对核苷酸代谢调节的作用机理和意义是什么？

(安玉会)

第十一章 物质代谢的调节

本章教学要求

- 细胞水平的代谢调节、酶活性的快速调节、酶含量的调节
- 激素对物质代谢的调节
- 整体水平的代谢调节
- 代谢障碍与疾病

生物体的物质代谢是由许多连续和相关的代谢途径所组成,每一条代谢途径又包含一系列酶促化学反应,各条途径相互联系、相互作用、相互制约又相互协调,是一个完整统一的过程。在正常情况下,为适应不断变化的内、外环境,使物质代谢有条不紊地进行,生物体对其代谢具有精细的调节机制,不断调节各种物质代谢的强度、方向和速率,即为代谢调节。代谢调节普遍存在于生物界,是生命的重要特征。生物体内的代谢调节机制十分复杂,是生物在长期进化过程中逐步形成的一种适应能力。随着生物神经系统不断发展,神经调节也不断发展。比神经调节原始的代谢调节是激素调节,而最原始也是最基础的代谢调节则是细胞内的调节。因此,生物体内的代谢调节在三个不同水平上进行,即(1)整体水平调节(神经调节)(2)激素水平调节(3)细胞水平或分子水平调节。

本章将着重介绍细胞水平的调节,在介绍激素受体及其调节机理的同时简单阐述激素水平的调节,其具体内容已分散在代谢各章中叙述,最后以应激、饥饿和糖尿病为例,探讨整体水平调节。

第一节 细胞水平的代谢调节

一、细胞内代谢调节的基本方式

(一) 代谢酶与代谢途径的整合与定位分布

1. 酶在细胞内的区域化分布

生物体结构与功能的基本单位是细胞。生命活动过程中各种生物化学反应绝大部分是在细胞内进行的。原核细胞无细胞核,其完成代谢所需要的各种酶类,如参与糖酵解、氧化磷酸化的酶,磷脂及脂肪酸生物合成的酶都连接在细胞的质膜上。真核细胞中酶的分布与原核细胞不同,因具有多种内膜系统,可形成不同胞内区域,从而导致真核细胞中酶的分布的区域化(compartmentation),即酶有一定的布局 and 定位。各种代谢途径的酶都集中并分布于具有一定结构的亚细胞或存在于胞质的可溶部分(表 11-1)。这样不仅避免各种代谢途径的酶互相干扰,而且有利于它们协调地发挥作用。

不同的代谢途径存在于细胞的不同部位,对于代谢途径的调控具有重要的作用。如脂肪酸 β 氧化酶系和合成酶系分别分布于线粒体和胞液,可避免乙酰辅酶 A 的生成与利用进入无意义循环。而脂肪酸合成所需的乙酰辅酶 A 则主要来源于在线粒体中进行的糖的分解代谢,因此脂肪酸合成速率取决于乙酰辅酶 A 通过线粒体膜进入胞液的速率。所以,酶在细胞内隔离和集中分布是代谢调节的一种重要方式。

表 11-1 真核细胞主要代谢途径与酶的区域分布

代谢途径(酶或酶系)	细胞内分布	代谢途径(酶或酶系)	细胞内分布
糖酵解	胞液	糖原合成与分解	胞液
三羧酸循环	线粒体	脂肪酸 β 氧化	线粒体
磷酸戊糖途径	胞液	脂肪酸合成	胞液
糖异生	胞液	呼吸链	线粒体
胆固醇合成	内质网、胞液	mRNA 合成	细胞核
磷脂合成	内质网	tRNA 合成	核质
氧化磷酸化(呼吸链)	线粒体	rRNA 合成	核仁
尿素合成	胞液、线粒体	血红素合成	胞液、线粒体
蛋白质合成	内质网、胞液	胆红素生成	微粒体、胞液
DNA 合成	细胞核	多种水解酶	溶酶体

2. 多酶体系与多功能酶

为使代谢快速而有效的进行,一些代谢途径的酶往往出现集中分布。第五章已经提及,只具有三级结构的酶称为单体酶;由多个相同或不同亚基以非共价键连接组成的酶称为寡聚酶;由几种不同功能的酶彼此聚合形成的多酶复合物称为多酶体系。如丙酮酸脱氢酶复合体由 3 个酶、96 个亚基组成。另外,一些酶系在进化过程中由于基因的融合,形成具有多种不同功能却只含一条多肽链的酶称为多功能酶或串联酶。如脂肪酸合酶体系中,一条多肽链包括 7 种催化活性和 1 种酰基载体蛋白(ACP)。多酶体系和多功能酶的出现,不但有助于代谢的顺利进行,还便于调控。

3. 同工酶

催化相同化学反应的酶,其分布既有同一细胞内不同亚细胞区域化,还具有同一生物体不同组织细胞的分布差异,并表现为许多理化性质和催化性能的差异,以同工酶为代表(详见第五章酶)。同工酶的多肽链由不同基因或等位基因编码,或由同一基因的不同转录产物翻译生成的蛋白质。由于分子结构的差异,虽然催化同一化学反应,但其底物专一性与亲和力以及动力学都有所不同,在代谢过程中所催化的反应方向有所不同。所以,同工酶在不同的组织、或不同的细胞类型、或同一细胞的不同细胞器中具有不同的质和量、不同的活性,在代谢途径中发挥不同的作用,调节代谢进行的不同方向。

(二) 代谢调节的基本方式

物质代谢途径由一系列的酶促反应所组成,代谢速率的改变并不是由于代谢途径中全部酶活性的改变,而常常只取决于某些甚至某一个关键酶活性的变化。此酶通常是整条代谢通路中催化反应速率最慢、催化单向反应,其活性受底物、产物和多种代谢物或效应剂的调节,故又称调节酶(regulatory enzyme)、关键酶(key enzyme)或限速酶(rate-limiting enzyme)(表 11-2)。由此酶催化的反应称为限速反应。限速

表 11-2 一些重要代谢途径的限速酶

代谢途径	限速酶
糖酵解	己糖激酶、磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶
磷酸戊糖途径	葡糖-6-磷酸脱氢酶
糖异生	丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、果糖-1,6-二磷酸酶、葡糖-6-磷酸酶
三羧酸循环	柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶复合体
糖原合成	糖原合酶
糖原分解	磷酸化酶
脂肪分解	三酰甘油脂肪酶
脂酸合成	乙酰辅酶 A 羧化酶
胆固醇合成	HMG 辅酶 A 还原酶
尿素合成	精氨酸代琥珀酸合成酶
血红素合成	ALA 合成酶

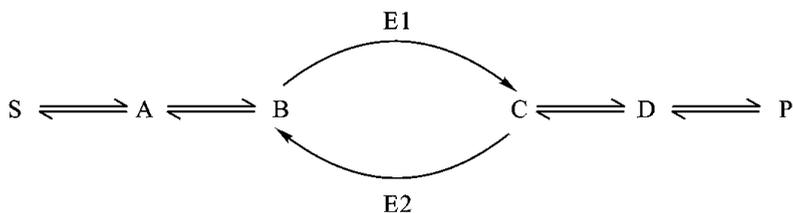
酶活性改变不但可以影响整个酶体系催化反应的总速度,甚至还可以改变代谢反应的方向。例如,细胞中 ATP/ADP 的比值增加,可以抑制磷酸果糖激酶-1(和丙酮酸激酶)的活性,不但减慢糖酵解的速率,同时还可通过激活果糖-1,6-二磷酸酶而促进葡糖异生。可见,通过调节限速酶的活性而改变代谢通路的速率与方向是体内代谢快速调节的一种重要方式。

1. 反馈调节

代谢途径的底物或终产物常影响催化该途径起始反应的酶活性,此调节方式称为反馈调节,它存在于所有的生物体中,是调节酶活性最精巧的方式之一。反馈调节具有两种情况,一是终产物的积累抑制初始步骤的酶活性,使得反应减慢或停止,此种反馈称为负反馈或反馈抑制。负反馈既可使代谢产物的生成不至于过多,又可使能量得以有效利用,不至于浪费。如葡糖-6-磷酸抑制糖原磷酸化酶以阻断糖酵解及糖的氧化,使 ATP 不至于产生过多,同时葡糖-6-磷酸又激活糖原合酶,使多余的磷酸葡糖合成糖原,能量得以有效贮存。又如,ATP 可变构抑制磷酸果糖激酶-1、丙酮酸激酶及柠檬酸合酶,阻断糖酵解、有氧氧化及三羧酸循环,使 ATP 的生成不致过多,避免浪费。还避免了产物过量生成对肌体造成危害。另一种反馈是代谢过程中某些中间产物可使本途径的前行酶活化,加速反应的进行,这种反馈称为正反馈或反馈激活。如果糖-1,6-二磷酸是磷酸果糖激酶-1 的反应产物,同时又是磷酸果糖激酶-1 的激活剂,果糖-1,6-二磷酸浓度的增加有利于糖的分解代谢。

2. 底物循环

代谢途径中某些可逆反应的正反方向是由不同酶催化的,即不同酶催化单向反应使得两个作用物互变,由此构成的循环为底物循环(substrate cycle)。可由下式表示:



式中 E1 和 E2 分别代表催化 B、C 两种代谢中间物之间的单向不可逆反应的酶,它们的活性受多种因素的调节。

作为上述模式的典型代表是糖代谢的果糖-6-磷酸与果糖-1,6-二磷酸之间的底物循环。磷酸果糖激酶-1 催化果糖-6-磷酸磷酸化生成果糖-1,6-二磷酸,同时果糖-1,6-二磷酸酶-1 催化果糖-1,6-二磷酸去磷酸而生成果糖-6-磷酸,磷酸化与去磷酸化之间构成了一个底物循环(图 11-1),且受代谢底物、产物以及激素的调控(详见第六章)。维持底物循环虽然要损失一些 ATP,但却使代谢调节更为灵敏、精细。

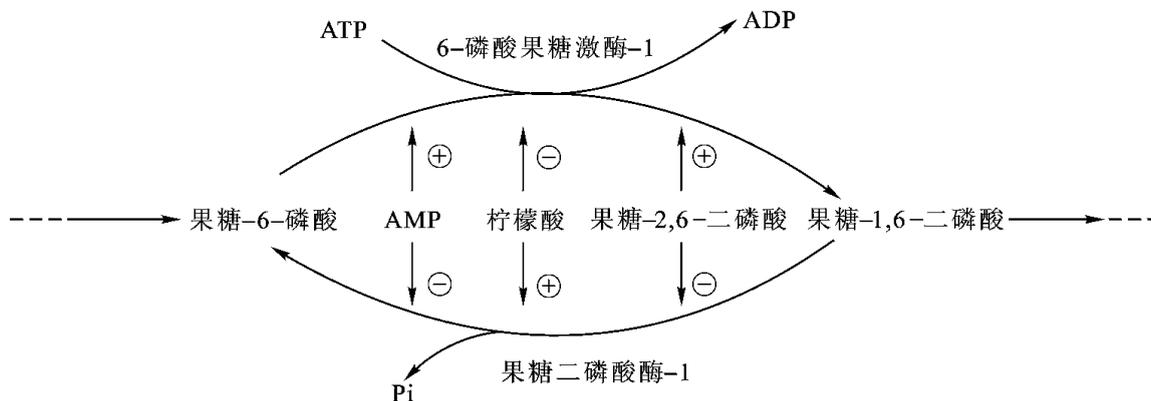


图 11-1 磷酸果糖激酶和二磷酸果糖酶所催化的底物循环

3. 级联反应

在一个连锁反应中,当一个酶被激活后,其他酶依次被激活,引起原始信号的放大,这种连锁反应系统被称为级联系统,所催化的反应被称为级联反应。如肝糖原的合成与分解的关键酶分别是糖原合酶和糖原磷酸化酶。磷酸化酶与糖原合酶均具有磷酸化和脱磷酸化两种形式,并可在不同酶的催化下相互转变,而催化其转变的酶本身也可磷酸化和脱磷酸化,其相互转变也受酶的催化。这样就构成了级联反应。共价修饰方式使原来没有活性或活性很低的酶转变为活性的酶(或活性的酶转变为无活性的酶),而且又是由酶来催化其发生转变,所以反应快、效率高,属于快速调节方式。级联反应的主要作用是放大效应以及使级联中各级都可得到调节。假如1分子胰高血糖素可诱导生成10分子活性腺苷酸环化酶;1分子腺苷酸环化酶可催化生成10分子cAMP;1分子cAMP诱导活化10分子蛋白激酶,以此类推,1分子胰高血糖素通过此级联放大作用,可诱导糖原分解生成 10^6 分子葡萄糖。

二、细胞内酶活性的调节

(一) 变构调节

某些小分子化合物能与酶分子上的活性中心之外的部位特异地、非共价可逆结合,引起酶蛋白的分子构象发生改变,从而改变酶的活性,这种现象称为酶的变构调节。受变构调节的酶称为变构酶,使酶发生变构效应的物质称为变构效应剂;变构后引起酶活性的增强,则此效应剂称为变构激活剂;反之则称为变构抑制剂。变构调节在生物界普遍存在,它是人体内快速调节酶活性的一种重要方式。表11-3列举出某些变构酶的变构效应剂。

表11-3 糖和脂肪代谢酶系中某些变构酶及其变构效应剂

代谢途径	变构酶	变构剂	
		激 活	抑 制
糖酵解	己糖激酶	AMP、ADP、FDP、Pi	G-6-P
	磷酸果糖激酶-1	FDP	柠檬酸
	丙酮酸激酶	FDP	ATP、乙酸 CoA
三羧酸循环	柠檬酸合酶	AMP	ATP、长链脂酰 CoA
	异柠檬酸脱氢酶	AMP、ADP	ATP
糖异生	丙酮酸羧化酶	乙酰 CoA、ATP	AMP
	果糖-1,6-二磷酸酶	5'-AMP	AMP
糖原分解	磷酸化酶 b	AMP、G-1-P、Pi	ATP、G-6-P
糖原合成	糖原合酶	G-6-P	
脂肪酸合成	乙酰 CoA 羧化酶	柠檬酸、异柠檬酸	长链脂酰 CoA
胆固醇合成	HMG-CoA 还原酶		胆固醇
氨基酸代谢	谷氨酸脱氢酶	ADP、亮氨酸、甲硫氨酸	ATP、GTP、NADH
嘌呤合成	PRPP 酰胺转移酶	PRPP	AMP、ADP、GMP、GDP
嘧啶合成	天冬氨酸氨基甲酰转移酶		CTP
血红素合成	ALA 合成酶		血红素

变构酶的特点及其作用机制:

1. 变构酶是多亚基酶。目前已知,能受变构调节的酶,常常是由两个以上亚基组成的聚合物。有些变构酶的活性中心和变构效应剂的结合部位位于不同的亚基,前者称为催化亚基,后者称为调节亚基;有

些酶在同一亚基上既存在催化部位又存在调节部位。

2. 变构效应剂可以是酶的底物,也可以是酶系的终产物,以及与它们结构不同的其他化合物,一般说,都是小分子物质。一种酶可有多种变构效应剂存在。变构效应剂与调节亚基(或部位)以非共价键结合,改变酶的构象,从而使酶活性被抑制或激活,酶与变构效应剂分离后能恢复原有的酶学性质。

3. 变构酶的酶促反应动力学不符合米曼氏方程式。酶促反应速率对作用物浓度作图的曲线不呈矩形双曲线,而常常呈S形(正协同效应)或比矩形双曲线更陡峭的曲线(负协同效应)。

4. 变构效应在对限速酶的快速调节中占有特别重要的地位。代谢速率的改变,常常是由于影响了整条代谢途径中某个限速酶的活性而引起的。

5. 变构酶往往受到一些代谢产物的抑制或激活,这些抑制或激活作用大多是通过变构效应来实现的。因而,这些酶的活力可以极灵敏地受到代谢产物浓度的调节,这对机体的自身代谢调控具有重要的意义。

6. 变构调节过程不需要能量。

已知果糖-1,6-二磷酸酶由四个相同的亚基所组成,每个亚基的相对分子质量约为310 000,既含催化部位又有调节部位。催化部位能结合一分子FDP,调节部位处可结合一分子变构剂。结构分析表明,此酶存在高活性的紧密型(T型)与低活性的松弛型(R型)两种构象。当酶处于T型时,其调节部位在聚合体内部而难以与其变构抑制剂AMP结合而表现出较高的活性。当第一个AMP分子与调节部位结合后,构象发生变化,从T型转变成R型,引起其他亚基构象相继发生改变,调节部位依次暴露,与AMP的亲和力逐步增加,酶的活性逐渐减弱,这就是果糖-1,6-二磷酸酶由紧密型变成松弛型的变构过程。这一变构过程是可逆的。抑制变构剂促进高活性型向低活性型的转变,而变构激活变构剂则促进低活性型向高活性型的转变。即当酶处于低活性的R型时,其结构相对松散,调节部位暴露在聚合体的表面,易与其变构激活剂3-磷酸甘油醛结合而导致酶蛋白空间构象的改变转变成高活性的T型(图11-2)。

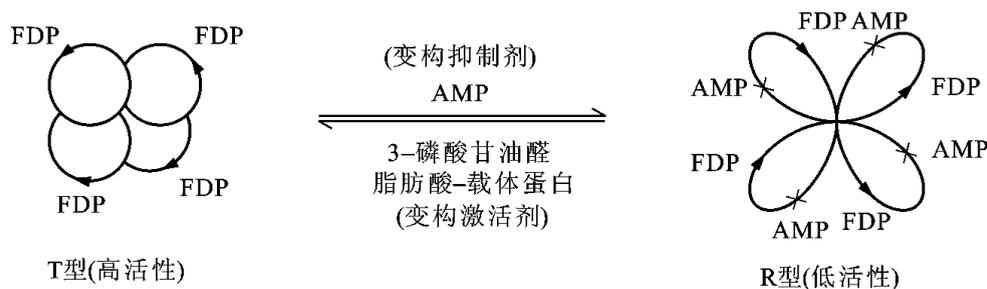


图 11-2 果糖-1,6-二磷酸酶的变构效应

▲ 酶亚基上的催化部位 X 酶亚基上的调节部位 FDP:果糖-1,6-二磷酸

有些酶的变构作用还表现为酶分子的聚合或解聚,如脂肪酸合成过程中的关键酶——乙酰 CoA 羧化酶。乙酰 CoA 羧化酶有原聚体(protomer)和多聚体之分。只有当原聚体聚合成多聚体时酶才有催化活性。柠檬酸可促进原聚体的聚合。长链脂酰 CoA 可拮抗柠檬酸的促聚合作用。因此,柠檬酸是该酶的变构激活剂,而 ATP、 Mg^{2+} 和长链脂酰 CoA 都是该酶的变构抑制剂。

(二) 化学修饰调节

第五章已经提到,有些酶分子肽链上的某些氨基酸残基可在其他酶的催化下发生可逆的共价修饰,或通过可逆地氧化还原互变使酶分子的局部结构或构象产生改变,从而引起酶活性的改变。这个过程称为酶的酶促化学修饰(chemical modification)。如磷酸化和脱磷酸、乙酰化和去乙酰化、腺苷化和去腺苷化、甲基化和去甲基化以及—SH 基和—S—S—基互变等,其中磷酸化和脱磷酸作用在物质代谢调节中最为常见(表 11-4)。

表 11-4 某些酶的酶促化学修饰调节

酶 类	反应类型	效 应
磷酸果糖激酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
丙酮酸脱氢酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
丙酮酸脱羧酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
糖原磷酸化酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
磷酸化酶 b 激酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
磷酸化酶磷酸酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
糖原合酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
三酰甘油脂肪酶(脂肪细胞)	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
HMG - CoA 还原酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
HMG - CoA 还原酶激酶	磷酸化/脱磷酸	激活/抑制
乙酰 CoA 羧化酶	磷酸化/脱磷酸	抑制/激活
谷氨酰胺合成酶(大肠杆菌)	腺苷化/脱腺苷	抑制/激活
黄嘌呤氧化(脱氢)酶	—SH/—S—S—	脱氢/氧化

细胞内存在着多种蛋白激酶,通过磷酸化和脱磷酸化反应修饰其底物蛋白,在调节物质代谢和信号转导中均起着十分重要的作用。如催化丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化的酶(统称为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶)和催化酪氨酸残基磷酸化的酶(统称为酪氨酸蛋白激酶)可分别将 ATP 分子中的 γ -磷酸基团转移至特定的蛋白分子底物丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸残基的羟基上,使其磷酸化而改变该蛋白的活性。与此相对应的,细胞内亦存在着多种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(serine/threonine protein phosphatase)和蛋白酪氨酸磷酸酶(tyrosine protein phosphatase),它们可将相应的磷酸基团移去(见第十九章 细胞信号转导)。酶的化学修饰如变构调节一样,也是机体物质代谢的快速调节的一种重要方式。

肌糖原磷酸化酶有两种形式,即无活性的磷酸化酶 b 和有活性的磷酸化酶 a。磷酸化酶 b 是二聚体,相对分子质量约为 85 000。它在磷酸化酶 b 激酶的催化下,每个亚基从 ATP 接受一个分子的 γ -磷酸基团而转变为磷酸化酶 a,后者具有高活性。两分子磷酸化酶 a 二聚体可再聚合成活性较低的(低于高活性的二聚体)磷酸化酶 a 四聚体(图 11-3)。

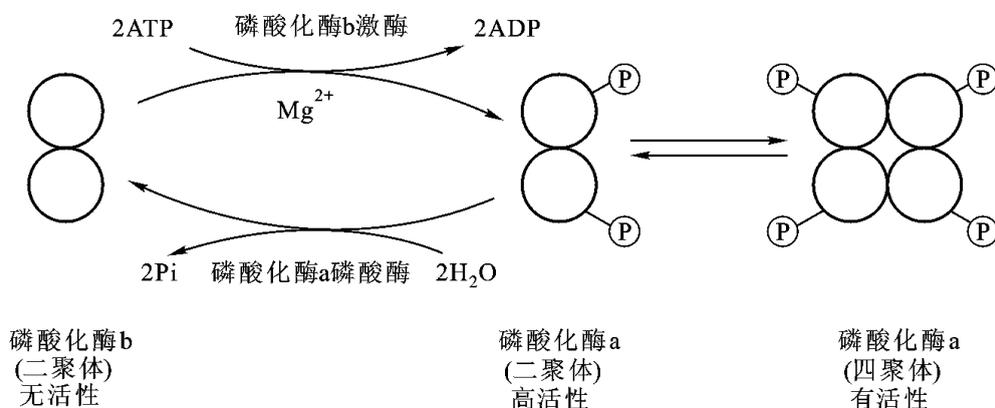


图 11-3 肌肉磷酸化酶的酶促化学修饰作用

酶促化学修饰的特点:

1. 共价修饰 绝大多数酶促化学修饰的酶都具有无活性(或低活性)与有活性(或高活性)两种形式。它们之间的正逆两向互变反应由不同的酶催化,均发生共价变化,而催化这互变反应的酶又受机体其他调节物质(包括激素等)的调控,酶促化学修饰往往是在激素的作用下进行的。

2. 级联放大效应 由于化学修饰是酶促反应,故有瀑布式逐级放大效应。少量的调节因素就可使大量的酶分子发生化学修饰。因此,这类反应的催化效率常较变构调节高。

3. 耗能少 磷酸化与脱磷酸是常见的酶促化学修饰反应。一分子亚基发生磷酸化常需消耗一分子 ATP,这与合成酶蛋白所消耗的 ATP 相比,显然少得多;同时酶促化学修饰又有放大效应,因此,这种调节方式更为经济有效。

4. 按需调节 此种调节同变构调节一样,均按生理需要来进行。如前述的肌糖原磷酸化酶的化学修饰过程中,在餐后,因血糖浓度增高,肝细胞无需通过糖原的分解来调节血糖浓度,则磷酸化酶 a 在磷酸化酶 a 磷酸酶的催化下即水解脱去磷酸基而转变成无活性的磷酸化酶 b,从而减弱或停止糖原的分解。

综上所述,酶促化学修饰与变构调节是体内调节代谢速率和方向的两种方式。对某一种酶来说,它可以同时接受这两种方式的调节。如二聚体糖原磷酸化酶存在磷酸化位点,且每个亚基都有催化部位和调节部位,因此,在受化学修饰的同时也可由 AMP 变构激活,并受 ATP 变构抑制。细胞中同一种酶受化学修饰和变构双重调节的意义可能在于:变构调节是细胞的一种基本调节机制,它对于维持代谢物和能量平衡具有重要作用,但当效应剂浓度过低,不足以与全部酶分子的调节部位结合时,就不能动员所有的酶发挥作用,难以发挥应激效应。当在应激状态下,随着肾上腺素的释放,通过 cAMP,启动一系列的级联酶促化学修饰反应,就可以迅速有效地满足机体的急需。

三、细胞内酶含量的调节

生物体除通过改变酶分子的结构来调节细胞内原有酶的活性快速适应需要外,还可通过改变酶的合成或降解速率以控制酶的绝对含量来调节代谢。从最简单到最复杂的各种有机体都可根据对酶需要的情况开启或关闭合成酶蛋白的基因,同时控制酶降解的速率。此过程耗能,所需时间较长,因此酶含量的调节属迟缓调节。

(一) 酶蛋白合成的诱导与阻遏

酶的化学本质是蛋白质,酶的合成也就是蛋白质的合成。有关影响蛋白质合成的因素详见第十四章。本节主要介绍酶蛋白的诱导与阻遏调节。酶的底物或产物、药物以及激素等都可以影响酶蛋白的合成。一般将增加酶蛋白合成的化合物称为诱导剂(inducer),减少酶蛋白合成的化合物称为阻遏剂(repressor)。诱导剂和阻遏剂影响酶蛋白合成可发生在转录水平或翻译水平,以转录水平较常见。这种调节作用需通过蛋白质生物合成的各个环节,故需一定时间才出现相应效应。但一旦酶蛋白被诱导合成,即使除去诱导剂,酶仍能保持活性,直至酶蛋白被完全降解。因此,这种调节效应出现迟缓但持续时间较长。

1. 底物对酶合成的诱导作用

生物界普遍存在着酶的底物可诱导该酶合成的现象。例如,食物消化吸收后,血中多种氨基酸浓度的增加,可诱导氨基酸分解酶体系中关键酶(如苏氨酸脱水酶和酪氨酸转氨酶)的合成而降解和转化氨基酸。又如,若鼠的饲料中酪蛋白含量从 8% 增至 70%,则鼠肝中的精氨酸酶的活性可增加 2~3 倍。这种诱导作用对于维持体内代谢的平衡具有一定的生理意义(详见第十五章 基因表达的调控)。高等动物体内,因存在激素的调节作用,底物诱导作用不如微生物体内重要。

2. 产物对酶合成的阻遏作用

在肝和骨髓中,作为中间产物的 7β -羟胆固醇可强烈抑制胆固醇合成途径的关键酶 HMG-CoA 还原酶的活性。而其终产物胆固醇则主要抑制 HMG-CoA 还原酶的生物合成。这表明一条代谢通路的产物不但可通过变构调节直接抑制酶系中的关键酶,有时还可阻遏这些酶的合成。

3. 激素对酶合成的诱导作用

胰岛素除可增强肝 HMG-CoA 还原酶的活性外,还可诱导肝 HMG-CoA 还原酶的合成而促进肝合成胆固醇;胰高血糖素和糖皮质激素降低 HMG-CoA 还原酶活性以减少胆固醇合成。这表明激素是高等动物体内影响酶合成的最重要的调节因素。

4. 药物对酶合成的诱导作用

肝细胞微粒体中单加氧酶等药物代谢酶是催化许多药物和毒物在肝内进行生物转化的酶,可被其底

物诱导合成,从而促进药物本身或其他药物的氧化失活,这对防止药物或毒物的中毒和累积有着重要的意义。

(二) 酶蛋白降解的调控

改变酶蛋白的降解速率也能调节胞内酶(endoenzyme)的含量,从而达到调节酶活性的作用。溶酶体的蛋白水解酶可催化酶蛋白的降解。因此,凡能改变蛋白水解酶活性或蛋白水解酶在溶酶体内分布的因素,都可间接地影响酶蛋白的降解速率。除溶酶体外,细胞内还存在蛋白酶体,由多种蛋白水解酶组成,当待降解的酶蛋白与泛素结合而被泛素化即可使该酶蛋白迅速降解。目前认为,通过酶蛋白的降解来调节酶含量远不如酶蛋白合成的诱导和阻遏重要。

第二节 激素对物质代谢的调节

激素是一类由特定的细胞合成并分泌的化学物质,它随血液循环至全身,作用于特定的靶组织或靶细胞(target cell),引起细胞物质代谢沿着一定的方向进行而产生特定生物学效应。不同激素作用于不同的组织或细胞,产生不同的生物学效应,也可产生部分相同的生物学效应。同一激素可以使某些代谢反应加强,而使另一些代谢反应减弱,从而适应整体的需要。对于每一个细胞来说,激素是外源性调控信号,而对于机体整体而言,它仍然属于内环境的一部分。通过激素来控制物质代谢是高等动物体内代谢调节的一种重要方式。

激素能对特定的组织或细胞发挥作用,是由于该组织或细胞具有能特异识别和结合相应激素的受体(receptor)。按激素受体在细胞的部位不同,可将激素分为膜受体和细胞内受体激素。有关激素对细胞的信号转导作用见第十九章 细胞信号转导。

第三节 整体水平的代谢调节

人类生活在变化的环境中,必须具有适应能力。为了适应外界环境的变化,机体可通过神经-体液途径对其物质代谢进行调节,及时满足能量的需要并维持内环境的恒定。现以应激、饥饿和糖尿病为例简要说明整体物质代谢的调节。

一、应激状态下的代谢调节

应激(stress)是人体受到一些诸如创伤、剧痛、冻伤、缺氧、中毒、感染,以及剧烈情绪激动等异乎寻常的刺激所作出的一系列反应的“紧张状态”。应激伴有一系列神经-体液的改变,包括交感神经兴奋、肾上腺髓质和皮质激素分泌增加,血浆胰高血糖素和生长激素水平升高、胰岛素水平降低等。引起糖、脂肪和蛋白质等物质代谢发生相应变化,总的特点是分解增加,合成减少(图11-4)。

(一) 糖代谢的变化

应激时,糖代谢变化的主要表现为高血糖。空腹血糖常为 $6.72 \sim 7.84 \text{ mmol/L}$ ($120 \sim 140 \text{ mg/dL}$),应激时由于儿茶酚胺、胰高血糖素、生长激素、肾上腺糖皮质激素分泌增加和胰岛素的相对不足导致糖原分解和糖异生增强,使得血糖浓度升高,甚至可超过葡萄糖的肾阈 8.96 mmol/L (160 mg/dL)而出现糖尿,这种现象被称为应激性高血糖或应激性糖尿。肝糖原和肌糖原在应激的开始阶段有短暂的减少,随后由于糖的异生作用加强而得到补充。组织对葡萄糖的利用减少(但脑组织不受影响)。这些变化与应激的强度相平行,在严重创伤和烧伤时,这些变化可持续数周。血糖升高有利于保证脑和红细胞的能源供应。

(二) 脂肪代谢的变化

应激时,脂肪代谢变化的主要表现为脂肪动员增加。由于肾上腺素、去甲肾上腺素、胰高血糖素等脂解激素增多,脂肪的动员和分解加强,因此血中游离脂肪酸和酮体有不同程度的增加。同时组织对脂肪酸

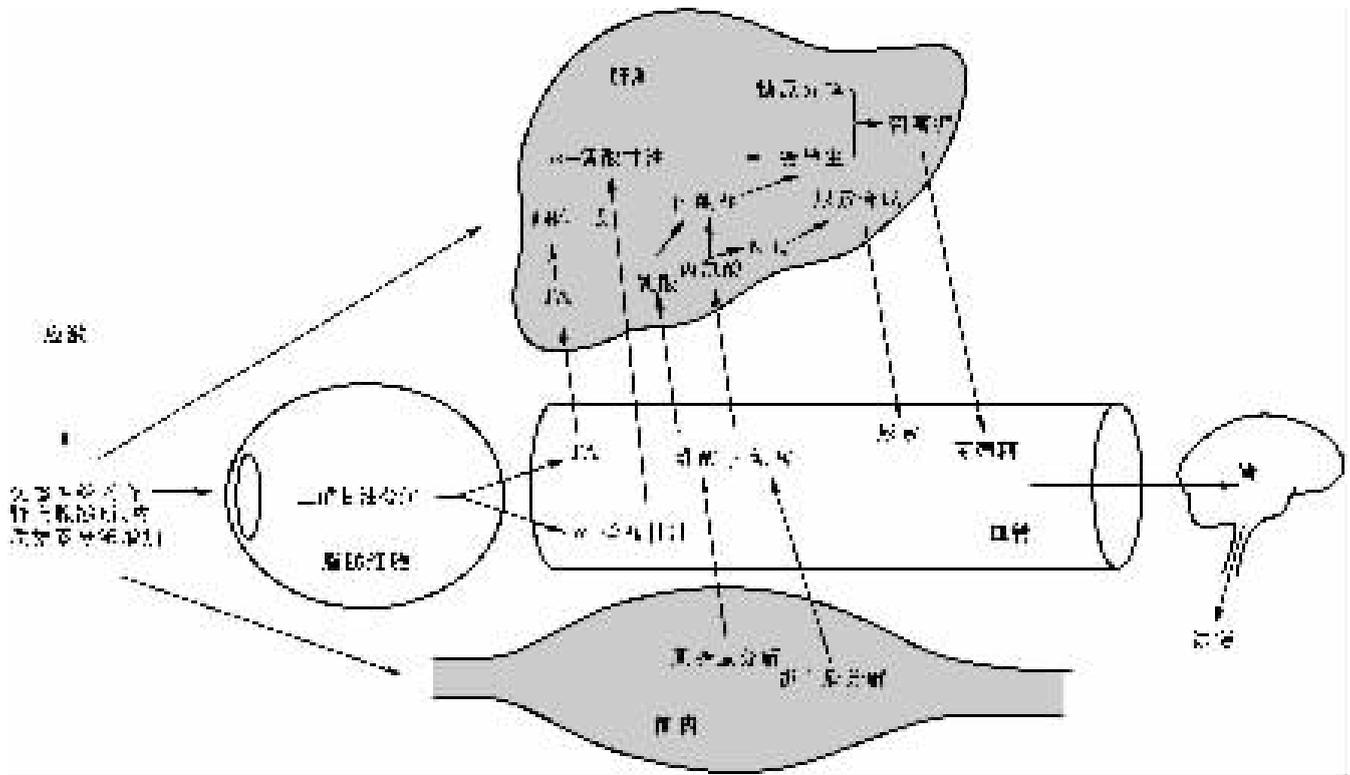


图 11-4 应激情况下机体主要组织间代谢关系

的利用增加。如严重创伤后,机体所消耗的能量有 75% ~ 95% 来自脂肪的氧化。

(三) 蛋白质代谢的变化

应激时,蛋白质代谢的主要表现是蛋白质分解加强。由于肌肉组织蛋白质分解,丙氨酸等氨基酸的释放增加,为肝细胞糖异生提供原料,同时尿素合成增加,出现负氮平衡。应激病人的蛋白质代谢既有破坏和分解的加强,也有合成的减弱。直至恢复期才逐渐恢复氮平衡。

上述这些代谢变化的防御意义在于为机体应付“紧急情况”提供足够的能量。但若应激状态持续时间长,则病人可因消耗过多而致消瘦和体重减轻。因此,在严重创伤或大手术后,给予患者输入一定比例的胰岛素-葡萄糖-氯化钾溶液,可减少体内蛋白质的分解,防止负氮平衡。

二、饥饿时的代谢调节

在某些生理(如食物短缺、绝食等)和病理(食道、幽门梗阻和昏迷等)情况下,未进食或不能进食时,若不能及时补充葡萄糖和得到应有的治疗,则体内在神经-体液系统的影响下会发生一系列的代谢变化。

(一) 短期饥饿

在不能进食 1 d ~ 3 d 后,肝糖原显著减少,血糖降低,便引起胰岛素分泌减少和胰高血糖素分泌增加,同时也引起糖皮质激素分泌增加,这些激素的增减可引起一系列的代谢变化,主要表现为:

1. 肌肉释放氨基酸加速 激素之间的平衡改变致使骨骼肌的蛋白质分解加速,分解出的氨基酸大部分转变为丙氨酸和谷氨酰胺,释放入血,成为饥饿时肌肉释放的主要氨基酸。

2. 糖异生作用增强 饥饿 2 d 后,肝糖异生明显增强。饥饿初期糖异生的主要场所是肝(约占 80%),小部分在肾皮质(20%)中进行。此时肝糖异生速率约为 150 g 葡萄糖/d,其中 30% 来自乳酸,10% 来自甘油,40% 来自氨基酸。

3. 脂肪动员加强,酮体生成增多 脂肪组织动员和分解加速,血浆甘油和游离脂肪酸含量升高,分解出的脂肪酸约 25% 在肝中生成酮体。此时脂肪酸和酮体成为心肌、骨骼肌和肾皮质的重要能源,一部分酮体可被大脑利用。

4. 组织对葡萄糖的利用降低 饥饿时脑对葡萄糖的利用亦有所减少,但饥饿初期大脑仍以葡萄糖为主

要能源。由于心、骨骼肌、肾皮质摄取和氧化脂肪酸及酮体增加,因而这些组织对葡萄糖的摄取及利用减少。

总之,饥饿时能量来源主要是贮存的蛋白质和脂肪,其中脂肪约占能量来源的85%以上。此时若输入葡萄糖,不但可减少酮体的生成,降低酸中毒的发生率,还防止体内蛋白质的消耗(每输入100g葡萄糖可减少约50g蛋白质的消耗)。

(二) 长期饥饿

如特殊原因长期不能进食,体内的能量代谢将发生进一步变化,此时代谢的变化与短期饥饿不同之处在于:

1. 脂肪动员进一步加速,酮体在肝细胞中大量生成,脑组织利用酮体的比例增多,甚至超过葡萄糖,可占总耗氧的60%,这对减少糖的利用、维持血糖以及减少氨基酸的糖异生作用,从而减少体内蛋白质的分解有一定意义。

2. 肌肉优先利用脂肪酸作为能源,以保证脑组织的酮体供应。

3. 血中酮体增高直接作用于肌肉,减少肌肉蛋白质的分解,此时肌肉释放氨基酸减少,而乳酸和丙酮酸成为肝中糖异生的主要物质。

4. 肾糖异生的作用明显增强,生成约40g葡萄糖/d,占饥饿晚期糖异生总量一半,几乎和肝糖异生作用相等。

5. 肌肉蛋白质分解减少,负氮平衡有所改善,此时尿中排出尿素减少而尿氨增加。其原因在于谷氨酰胺脱下的酰胺氮和氨基氮能以氨的形式排入管腔,有利于促进体内 H^+ 的排出,从而改善酮症引起的酸中毒。短期和长期饥饿时,体内燃料代谢情况见表11-5。

表 11-5 饥饿时的燃料代谢

燃料的交换与消耗	24 h 燃料的生成与消耗的质量(g)	
	饥饿 3 d	饥饿 40 d
大脑对燃料的应用		
葡萄糖	100	40
酮体	50	100
其他组织器官	50	40
燃料的动员		
脂肪组织脂解作用	180	180
肌肉蛋白质分解	75	20
肝燃料的输出		
葡萄糖	150	80
酮体	150	150

三、糖尿病患者体内代谢调节

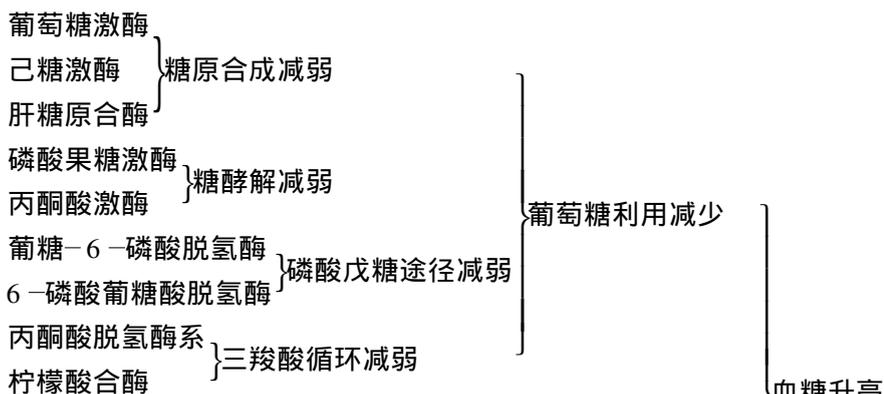
糖尿病(diabetes mellitus)是由多种病因引起的、以慢性高血糖为特征的代谢紊乱。其确切病因尚不清楚,目前公认与遗传、自身免疫和环境因素等有关。临床医学将其分为I糖尿病(胰岛素绝对不足)和II糖尿病(胰岛素相对不足)。胰岛素绝对或相对不足可引起机体多种酶活性的变化或诱导、阻遏某些酶蛋白的生物合成,导致糖、脂、蛋白质等代谢异常。

(一) 糖代谢紊乱

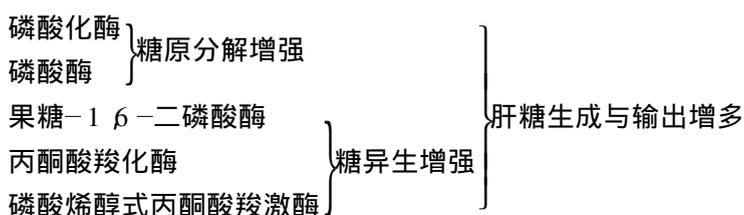
肠道中单糖被吸收后约2/3-3/4入肝,其余被肝外组织利用。此时,血糖浓度的上升,以及肠道中胃泌素(gastrin)、胰泌素(secretin)、肠升糖素(enteroglucagon)等刺激胰岛素分泌增多。胰岛素通过对代谢的调节作用,使血糖保持在正常水平(见第六章糖代谢)。当胰岛素不足时,参与糖代谢的相关酶类活性发生变化,表现为葡萄糖的利用减少,肝糖生成和输出增多。最终形成血糖升高,当超过肾糖域时,肾小管

不能将通过肾小球滤过的原尿中的葡萄糖全部吸收而出现糖尿。糖尿病所引起的糖代谢相关酶活性的变化归纳如下。

糖尿病时胰岛素分泌不足,下列酶活性受到抑制:



糖尿病时胰岛素分泌不足,下列酶活性被激活:



(二) 脂肪代谢紊乱

糖尿病严重者未经适当控制时常有下列脂代谢紊乱 (1) 由于磷酸戊糖途径减弱,还原型辅酶 II (NADPH)减少,脂肪合成常减少,患者多消瘦,但早期轻症 II 糖尿病患者则由于多食而肥胖。(2) 由于肝糖原合成及贮存减少,在垂体及肾上腺等激素调节下,脂肪入肝沉积、肝细胞变性、肝肿大为脂肪肝。(3) 重症时,脂肪动员增加,大量脂肪酸入肝,在肉毒碱脂酰转移酶催化入线粒体氧化生成乙酰 CoA,又因糖酵解减弱草酰乙酸减少,乙酰 CoA 不能完全被氧化而转化生成大量酮体。酮体的不断积累最终发展为酮血症(ketonemia)和酮尿(ketonuria)。临床上出现酮症、酮症酸中毒,严重时发生糖尿病性昏迷。另外,严重糖尿病患者还出现脂蛋白代谢紊乱,出现 VLDL、LDL 升高,形成高脂血症和高脂蛋白血症,为动脉粥样硬化的发生提供重要的物质基础。

(三) 蛋白质代谢紊乱

未控制的糖尿病患者,特别在酮症时,肌肉和肝中蛋白质合成减少而分解增多,呈负氮平衡。胰岛素不足时糖异生旺盛,血浆中生糖氨基酸被肝细胞摄取后经糖异生转化为葡萄糖,使血糖进一步升高;生酮氨基酸升高,在肝细胞中被转化为酮体,使血酮升高。由于蛋白质呈负氮平衡,患者消瘦、乏力、抵抗力差、易感染、伤口不宜愈合,小儿生长发育受阻。

综上所述,血糖升高后,因渗透性利尿引起多尿,并刺激晶体渗透压感受器引起口渴而多饮水;患者体内葡萄糖不能被利用,脂肪分解增多,蛋白质代谢呈负氮平衡,肌肉渐见消瘦而致体重减轻;为补偿损失的糖分、维持机体的正常活动,患者易感饥饿而多食,这就是常常提及的糖尿病“三多一少”的临床表现,即多尿、多饮、多食和体重减轻。

Summary

The chemical reactions in living cells are organized into a series of biochemical pathways. The pathways are controlled primarily by adjusting concentrations and activities of enzymes through compartmentation, allosteric and covalent regulation, and genetic control, and through hormone and nerve-body fluid control.

In eukaryotic cells ,the biochemical pathways are segregated into different organelles. One purpose for this physical separation is that opposing processes are easier to control if they occur in different compartmentation. Cells use allosteric regulation to respond effectively to changes of enzymic conformation at intracellular concentrations . Some enzymes are regulated by the reversible interconversion between their active and inactive forms. Several covalent modifications of enzyme structures cause these changes in function. Many such enzymes have specific residues that may be phosphorylated and dephosphorylated. Hormones are molecular ,which usually initiate their effects in a target cell by binding to a specific receptor that alters the activities of several enzymes and/or transportation mechanisms. Second messenger molecules ,such as cAMP ,often mediate a hormone 's message. To ensure proper control of metabolism ,the synthesis and secretion of many mammalian hormones are regulated by a complex cascade mechanism ,which is ultimately controlled by the central nervous system.

思 考 题

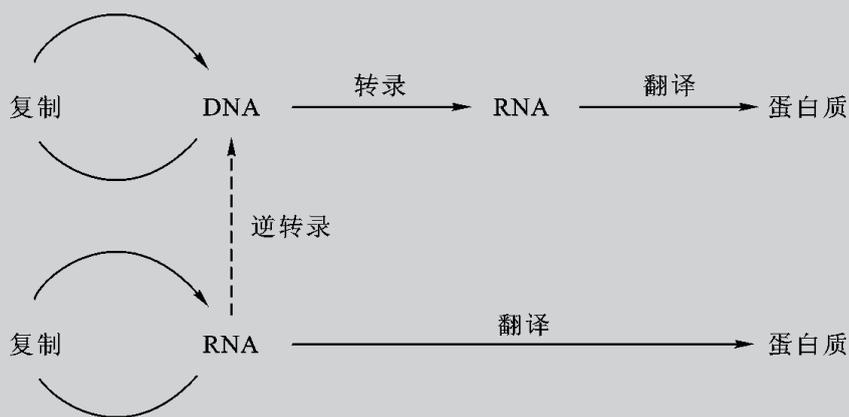
1. 简述细胞水平调节的主要方式。
2. 比较别构调节与化学修饰的异同。
3. 机体如何对酶蛋白含量进行调节？
4. 应激和饥饿状态时 机体如何进行代谢调节来适应变化？
5. 糖尿病患者为何出现“三多一少”症状？试从代谢调节的角度加以阐明。

(汪 渊)

第三篇

遗传信息的传递

生物体子代在形态结构与生理机能特点上和亲代相似,这种现象称为遗传(heredity)。遗传的物质基础是位于细胞染色体中的DNA。基因是DNA分子中编码生物活性产物的DNA片段。这些生物活性产物主要是蛋白质和各种RNA。1958年Francis Crick提出分子生物学的中心法则(central dogma of molecular biology)。中心法则认为,DNA贮存控制所有细胞过程的遗传信息,DNA通过转录(transcription)将其所携带的遗传信息传递给RNA,RNA再将这些遗传信息通过翻译(translation)转化成特定蛋白质的氨基酸序列。DNA还通过以自身为模板的复制(replication),将其遗传信息传递给子代。



Howard Temin 于 1962 年提出 RNA 病毒中存在逆转录现象,并于 1970 年与 David Baltimore 分别发现逆转录酶,以及后来发现的核酶均证实少数 RNA 也是遗传信息的携带者,可以作为模板指导 DNA 的合成。这是对中心法则的有益补充。

本篇按中心法则指出的路线,分章介绍复制、转录和翻译的基本元件和基本过程,以及基因表达的调控原理。由于有关遗传信息传递的知识多来自对原核生物的研究成果,本篇在主要介绍真核生物遗传信息传递的基础上,也讨论原核生物遗传信息传递和调控的特点。癌基因、抑癌基因是与细胞增殖、分化和肿瘤发生密切相关的基因,连同与之相关的生长因子一并在本篇中讨论。以基因工程为代表的基因技术是 20 世纪 70 年代以来迅速崛起,并对生命科学的发展具有划时代意义的领域。基因相关的各种技术已经广泛地应用于生命科学研究与应用的各个领域。医学学生有必要掌握其基本原理与方法,以便为后续课程的学习奠定基础。因此,本篇对基因技术的几个主要方面以及它们在基因诊断和基因治疗中的应用进行了描述。

第十二章 DNA 的生物合成

本章教学要求

- 遗传信息的中心法则
- 真核生物 DNA 复制所需要的酶及因子
- 真核生物 DNA 复制的过程
- 原核生物 DNA 复制的过程
- DNA 的逆转录过程
- DNA 损伤与修复

第一节 DNA 复制的概况

James Watson 和 Francis Crick 在提出 DNA 双螺旋结构时即推测,在 DNA 复制过程中,两条螺旋的多核苷酸链之间的氢键断裂,然后以每条链各作为模板合成新的互补链。这样新形成的两个子代 DNA 分子与原来 DNA 分子的碱基顺序完全一样。在此过程中,每个子代分子的一条链来自亲代 DNA。另一条链则是新合成的,这种复制方式称为半保留复制(semi-conservative replication)。

一、DNA 的半保留复制

1958 年 Matthew Meselson 和 Franklin Stahl 实验证实了 Watson 和 Crick 的 DNA 半保留复制假说。他们将大肠杆菌放在含 $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 的培养基中培养若干代后,再迅速地转移到只含 $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$ 的培养基中继续保温培养。此后在不同时间取样,应用密度梯度平衡沉降技术进行分析。因为 ^{15}N -DNA 较普通的 ^{14}N -DNA 重一些,因此在沉降时可以分开。结果第一代只出现一条 DNA 带,这个带的密度位置在 ^{14}N -DNA 与 ^{15}N -DNA 中间,而不出现纯的 ^{15}N -DNA 带,表明在复制中亲代 DNA 并不作为一个完整的单位保存下来,同样也不出现纯 ^{14}N -DNA 带,说明子代 DNA 含有来自亲代 DNA 的 ^{15}N 。比例是新旧各半,因为杂交的 DNA 带的密度正好在 ^{14}N -DNA 与 ^{15}N -DNA 正中间。两代以后,出现两种 DNA 带,其一是 ^{14}N -DNA 与 ^{15}N -DNA 杂交分子,其二是纯的 ^{14}N -DNA。于是 Meselson 和 Stahl 认为:“一个 DNA 分子的氮在其复制的两个子代分子里是等分的,即在复制后,子代分子各得亲代 DNA 分子的一半”(图 12-1)。

二、DNA 复制的一般特点

DNA 复制的一般特点如下:

1. DNA 的两条链均作为模板合成子代 DNA,为此,DNA 的双螺旋的两条链在局部需要解开,以利于复制。
2. DNA 的局部解旋引起周围区域过度缠绕,拓扑异构酶使超螺旋张力释放,有利于解旋及解链。
3. DNA 聚合酶的作用是以 5'到 3'方向进行合成。由于 DNA 的两条链方向相反,因此,一条链的合成是连续的,而另一条链的合成则是不连续的。不连续链每个片段的合成都是独立进行的,然后各片段再连接起来。

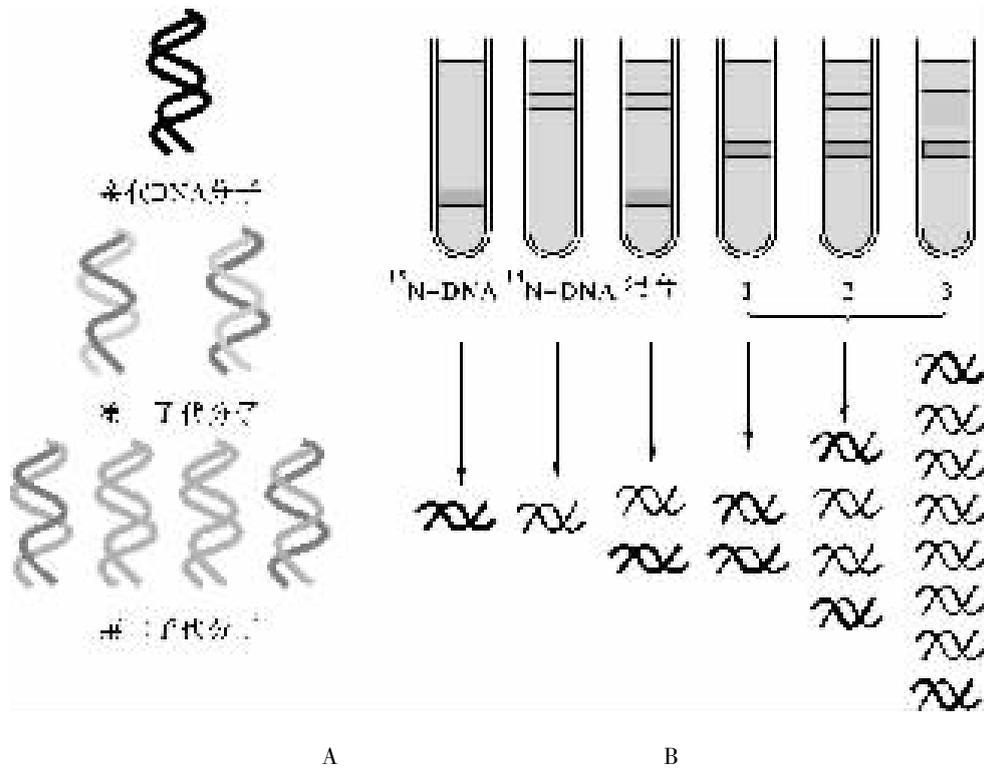


图 12-1 DNA 的半保留复制及实验依据

A. DNA 的半保留复制。第一子代分子含有一条亲代的链(用黑色表示)与另一条新合成的链(用浅色表示)配对。在以后的连续复制过程中,原来亲代的两条链分散在两个子代分子中。B. Meselson - Stahl 实验示意图。密度梯度离心后的 DNA 带位置。管 1、2、3 分别表示第一、第二、第三代。左边三管为对照

4. DNA 复制必须高度准确, DNA 复制错误率大约是 $1/10^{10}$ 校正机制保证新合成的 DNA 的正确性。
5. DNA 的合成必须非常迅速,其合成速率与基因组的大小及细胞分裂速率有关。有许多酶及蛋白因子参与复制过程。
6. 复制器本身不能复制线性 DNA 的末端,一种特殊的端粒酶参与端粒的复制。

三、DNA 半保留复制的有关酶类及蛋白因子

DNA 的复制过程极为复杂,需要以 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP)为原料,以 DNA 为模板,在许多酶及蛋白因子的作用下完成。

参与真核生物 DNA 的复制的许多酶和蛋白因子见表 12-1。

表 12-1 真核生物 DNA 复制的两种主要聚合酶及有关因子

蛋白质(英文代号)	功能
DNA 聚合酶 α /引发酶(DNA pol α /primase)	引发及后随链的部分合成
DNA 聚合酶 δ (DNA pol δ)	DNA 复制主要酶
增殖细胞核抗原(PCNA)	滑动夹子,与合成连续性有关
拓扑异构酶(Topo I, Topo II)	母链 DNA 拓扑异构化
解(螺)旋酶(Helicase)	能解开 DNA 双螺旋
单链 DNA 结合蛋白(SSB) 及复制蛋白 A(RPA)	单链 DNA 结合作用
复制因子 α (RFC)	参与滑动夹子的装配
DNA 连接酶	连接冈崎片段及参与修复
核酸酶 H(RNaseH)	去除 RNA 引物
侧翼核酸内切酶 I(FEN1)	去除 RNA 引物

(一) DNA 聚合酶

DNA 聚合酶(DNA polymerase)以 dNTP 为底物,以 DNA 为模板催化脱氧多核苷酸链在 3'-OH 端与另一个脱氧核苷三磷酸的 5'- α -磷酸生成磷酸二酯键,从而延长多核苷酸链。因此,该酶又称为 DNA 指导的 DNA 聚合酶(DNA-directed DNA polymerase,DDDP)。此聚合反应需要二价阳离子(Mg^{2+}),延长的方向为 5'→3'。



式中 $(dNMP)_n$ 代表含有 n 个脱氧核苷酸的 DNA 片段,dNTP 代表任何一种脱氧核苷三磷酸。

真核生物中有多种 DNA 聚合酶,按其发现的先后顺序分别命名为 DNA 聚合酶 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ξ 、 η 和 ι 。它们的分类及功能见表 12-2。主要几种聚合酶的基本性质可归纳于表 12-3。

表 12-2 真核细胞 DNA 聚合酶的分类及功能

酶的名称	功能
Pol α	引物合成及后随链部分合成
Pol β	碱基切除修复
Pol γ	线粒体 DNA 复制
Pol δ	主要复制酶
Pol ϵ	不清楚,复制或修复
Pol ξ	损伤旁路修复
Pol η	损伤旁路修复
Pol ι	损伤旁路修复

表 12-3 真核细胞几种主要 DNA 聚合酶的性质

DNA 聚合酶	α	β	γ	δ	ϵ
蛋白质相对分子质量	$> 250 \times 10^3$	$(36 \sim 38) \times 10^3$	$(160 \sim 300) \times 10^3$	170×10^3	256×10^3
细胞定位	核	核	线粒体	核	核
相关连酶的活性					
3' → 5' 外切酶	无	无	有	有	有
引发酶	有	无	无	无	无

DNA 聚合酶 α 和 δ 是 DNA 复制的主要酶,前者参与 RNA 引发及后随链的起始合成,后者是主要的复制酶,它参与冈崎片段的延伸及前导链的合成。DNA 聚合酶 β 主要参与 DNA 损伤的修复。DNA 聚合酶 γ 参与线粒体 DNA 的复制。

(二) 引发酶

引发酶(primase)又称引物酶。在 DNA 复制过程中,需要合成一小段 RNA 引物(primer)。此 RNA 引物的碱基与 DNA 模板是互补的,并为 DNA 的合成提供游离的 3'-OH 末端。催化此引物合成的酶称引发酶,它以核苷三磷酸(NTP)为底物。在真核生物中,引发酶与 DNA 聚合酶 α 形成一个复合物,这个复合物合成大约 10 个核苷酸长的 RNA 引物,然后由引发酶活性转化为 DNA 聚合酶活性,以 dNTP 为底物合成大约 15 ~ 30 个脱氧核苷酸以延长引物。

(三) 拓扑异构酶

在复制过程中,DNA 的超螺旋结构必须解开,拓扑异构酶(topoisomerase)能松弛超螺旋,使其有利于复制。此酶能切断 DNA 双链,使 DNA 解旋、解链,变成松弛状态。并在适当时间又能连接磷酸二酯键,将

切口封闭。人类有两种拓扑异构酶,分别为 I 型和 II 型。人类的 I 型拓扑异构酶又称为缺口-关闭酶 (nicking - closing enzyme),此酶能切断 DNA 双链中的一股,在 DNA 复制及转录过程中能解开正超螺旋及负超螺旋。II 型拓扑异构酶能切断 DNA 的两条链,并需要水解 ATP。人的 II 型拓扑异构酶不是一种旋转酶 (gyrase),为此,它不能诱导负超螺旋生成。但是,它在终止阶段和染色体的分离中起关键作用。它参与 DNA 与核基质的特殊部位的附着。

(四) 解(螺)旋酶

在 DNA 复制中以单链 DNA 为模板,合成子代 DNA。解旋酶 (helicase) 能解开 DNA 的双螺旋,其作用是在复制叉前解开一小段 DNA。

(五) 单链 DNA 结合蛋白

单链 DNA 结合蛋白 (single - strand DNA binding protein, SSB) 对单链 DNA 有高亲和力,能特异地结合到分开的单链 DNA 上。对 DNA 复制区形成的单链 DNA 有稳定作用。哺乳动物细胞的单链 DNA 结合蛋白在 DNA 的修复和重组中也起作用。

在真核生物中,一种单链 DNA 结合蛋白称之复制蛋白 A (replication protein A, RPA) 结合到暴露的单链上。

(六) DNA 连接酶

DNA 连接酶 (ligase) 催化两个 DNA 片段通过 3' 5'-磷酸二酯键连接在一起,形成更大的 DNA 片段。这一反应需要 ATP 供能 (图 12-2)。DNA 连接酶不但在 DNA 复制中起作用,而且在 DNA 损伤的修复和重组 DNA 中也不可缺少。

(七) 增殖细胞核抗原

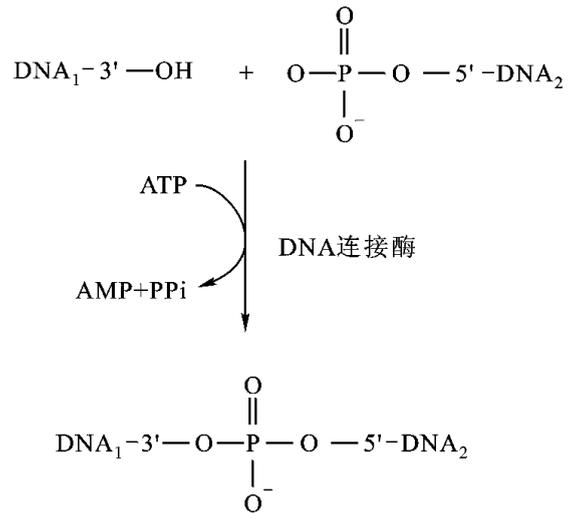


图 12-2 DNA 连接酶催化的反应

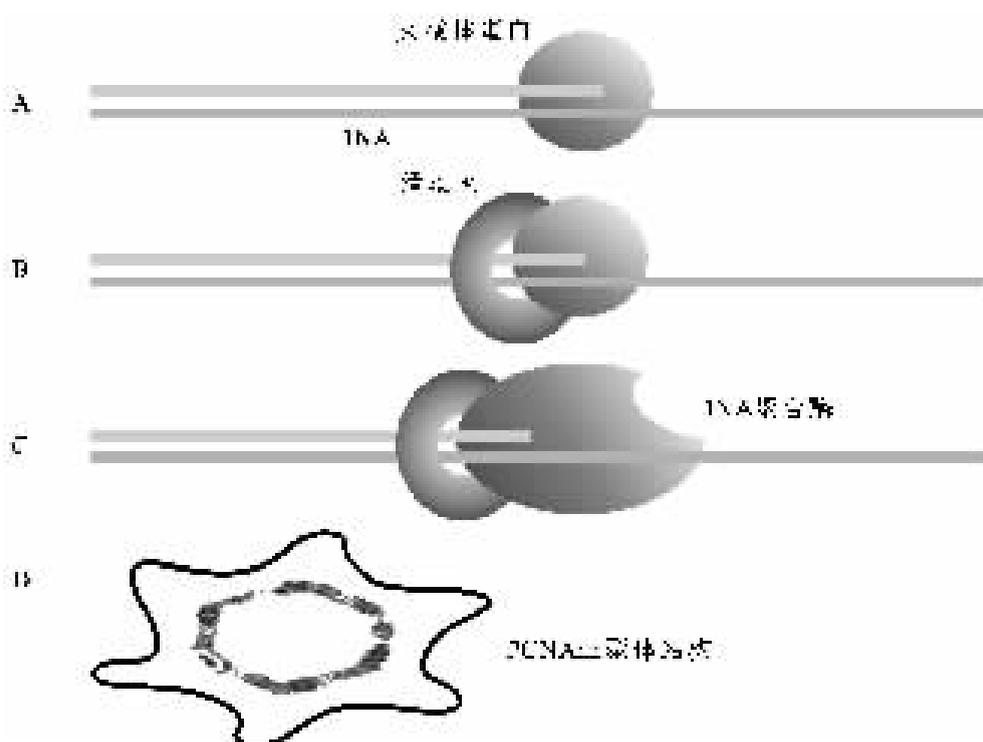


图 12-3 滑动夹子

A. 夹子载体蛋白如 RFC 与 DNA 结合; B. 夹子载体蛋白与 PCNA 装配成滑动夹子; C. DNA 聚合酶与滑动夹子相结合,开始沿模板前进; D. PCNA 的结构,PCNA 的三个亚基形成一个环,DNA 从大孔中间自由通过

增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen ,PCNA)是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白质 ,包含在引物的识别复合物中。为迅速合成 DNA , PCNA 的三个亚基绕着 DNA 形成一个环状的滑动夹子(sliding clamp) ,DNA 聚合酶 δ 附着于滑动夹子上。这样 DNA 聚合酶 δ 就可以沿着 DNA 模板链不断前进。为此 ,催化 DNA 合成反应的连续性是由 PCNA 来承担的(图 12-3)。PCNA 是在复制的细胞中发现的第一个核抗原 ,并因此命名。此因子也存在于全身性红斑狼疮病人血清中。

(八) 复制因子 C

复制因子 C(replication factor C ,RFC)是滑动夹装载因子(clamp - loading factor)。RFC 帮助这个环的装配(图 12-3)。此因子作为 DNA 聚合酶 α 和 δ 之间的联系物或纽带 ,有助于前导链和后随链的同时合成。

(九) 核酸酶 H 和侧翼内切核酸酶

核酸酶 H(RNaseH)和侧翼内切核酸酶(flap endonuclease 1 ,FEN1)参与去除 RNA 引物的作用。核酸酶 H 降解 RNA 引物 ,留下一个核苷酸连在冈崎片段的末端 ,由 FEN1 完成去除最后一个核苷酸。

上述有关 DNA 复制的酶及蛋白因子的作用如图 12-4 所示。

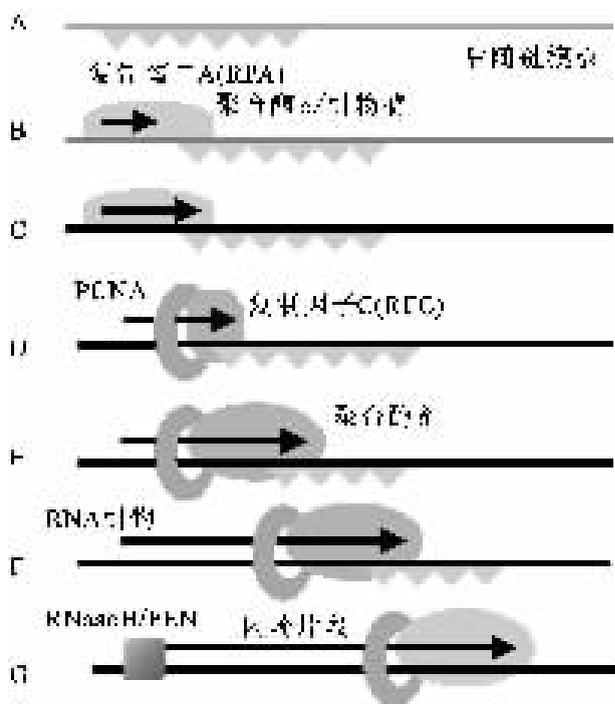


图 12-4 参与真核 DNA 复制后随链的酶及因子

A :RPA ,一种单链 DNA 结合蛋白 ,结合到单链模板上 ,使连续的复制叉解开双链 ;B :在聚合酶 α /引发酶复合物作用下开始合成 RNA 引物 ;C :引物合成达到 8 ~ 10 个核苷酸后 ,复合物的聚合酶 α 活性起作用 ,合成 15 ~ 30 个脱氧核苷酸以延长引物。然后 ,聚合酶 α /引发酶复合物从模板上解离 ;D :RFC 结合到这个部分的冈崎片段的末端 ,催化装配由 PCNA 构成的滑动夹子 ;E :聚合酶 δ 复合物结合到滑动夹子上 ,并延长冈崎片段 ;F :当复制复合物达到 RNA 引物时 ,引物被 RNaseH 和 FEN1 共同作用下水解 ;G :留下的间隙由连续延长的冈崎片段所填补 ,存在的缺口由 DNA 连接酶封闭

第二节 真核生物 DNA 的复制过程

真核生物 DNA 是在细胞 S 期开始复制。DNA 的复制过程大体上可分成以下几个阶段。

一、DNA 复制的起始

真核生物染色体 DNA 的复制从许多点同时进行。每个复制单位称为复制子(replicon)。DNA 在复制时经解旋和解链作用 ,先解开一段双螺旋 ,形成复制点。由于每个复制点的形状像一个叉子 ,故称为复制叉(replication fork)(图 12-5)。

在 DNA 复制中 ,两条母链分开形成复制叉。子链的合成都是 5' 到 3' 方向。

(一) DNA 复制起始过程

复制是在特殊的位置上开始的 ,此位置称复制起始点(origins of replication ,ori)。真核生物有多个复制起始点。复制起始点有特殊的序列。一个称起点辨认复合物(origin recognition complex ,ORC)的大的蛋白复合物组装在起始部位上 ,形成复制叉。ORC 在起始点上的组装还不

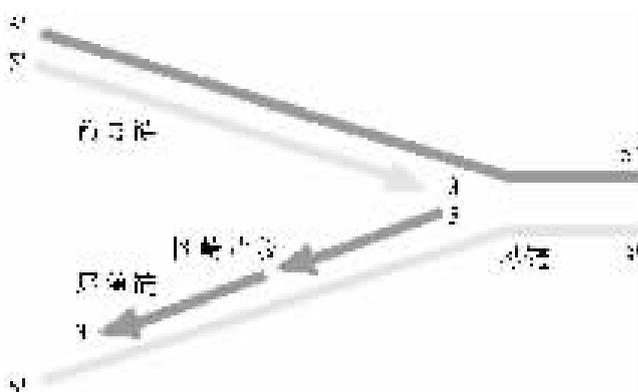


图 12-5 复制叉

足以开始启动,必须有另一种称为小染色体维系蛋白(mini chromosome maintenance protein, MCM)的复合物参与。MCM 有较弱的解旋酶的活性。这一激活过程是由细胞周期素和细胞周期依赖蛋白激酶调节的。

一旦 ORC/MCM 复合物在复制起始点被激活,它催化 DNA 母链分开形成小的复制泡(replication bubble)。单链 DNA 结合蛋白结合到拆开的单链上,并固定单链。解旋酶也组装到复制泡上,使复制叉不再重新形成螺旋,便于 DNA 的合成(图 12-6)。对于这个阶段,后随链与前导链合成的过程相同。

(二) RNA 引物的合成

引发酶与 DNA 聚合酶 α 形成一个复合物,能识别起始位点,并且以核糖核苷三磷酸为底物(NTP),以解开的一段 DNA 为模板,合成一个短链 RNA(8~10 个核苷酸)引物。然后从引发酶的活性转变为 DNA 聚合酶 α 的活性, RNA 引物的 3'-OH 末端为合成新的 DNA 单链的起点,以 dNTP 为原料,延长引物大约 15~30 个脱氧核苷酸。这种双反应使短的 DNA 连接到引物上。DNA 聚合酶需要引物。前导链在复制的开始只需一个引物,而后随链中每个冈崎片段则需有各自的引物。

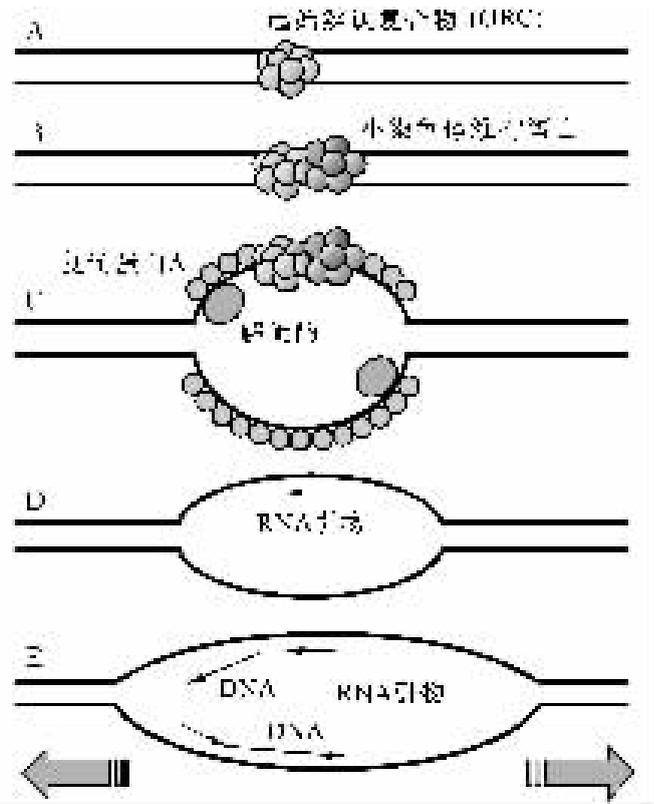


图 12-6 真核生物 DNA 复制的起始

A. 起始辨认复合物(ORC)结合到起始位点上;B. 小核染色体维系蛋白(MCM)结合到上面;C. 在细胞周期的调节信号作用下,起始复合物被激活,解旋酶的活性打开亲代双链,形成一个复制小泡。RPA 结合到暴露的单链上。解旋酶附着于 DNA 上,小泡被扩大;D. DNA 聚合酶 α 和引发酶被聚合酶 α 延长,脱氧核苷酸

二、DNA 链的延伸

(一) DNA 片段的生成

在真核细胞内, DNA 的两条链都作为模板同时合成两条新的 DNA 链。由于 DNA 分子的两条链是反向平行的,从一个方向看去,一条链是从 5'→3' 走向,另一条链则是 3'→5'。DNA 复制时,不管以哪条链作模板,新链的合成始终是按 5'→3' 方向进行的。随着双链的打开,由起始点形成复制叉后,新合成的两条方向相反的链中,一条链的合成方向与复制叉前进方向是一致的,合成就能顺利地连续进行;另一条链的合成方向则与复制叉前进方向相反,这条链是如何合成的呢?为了解释这个矛盾,1968 年,日本生化学者冈崎(Reiji Okazaki)等人用 ^3H -胸腺嘧啶核苷酸培养大肠杆菌,然后用密度梯度离心法分离标记的 DNA 产物,发现短时间内首先合成的是较短的 DNA 片段,接着再出现较大的分子。这说明这条新链是一段一段地不连续合成的。这些 DNA 片段称冈崎片段(Okazaki fragment)。冈崎片段的形成是从 RNA 引物的 3'-OH 末端开始的, DNA 聚合酶 α 催化这一反应,它以脱氧核苷三磷酸为底物,依据碱基互补原则,以分开的一条 DNA 链为模板,合成新的互补链。合成的方向仍然为 5'→3'。一旦冈崎片段达到一定长度(15~30 个核苷酸),引发酶与 DNA 聚合酶 α 形成的复合物便从 DNA 上解离下来。RFC 结合到这一延长的引物上,负责组装 PCNA 滑动夹子,然后 DNA 聚合酶 δ (pol δ) 结合到 PCNA 组成的滑动夹子上,并完成冈崎片段的最终长度 130~200 个核苷酸。当它遇到原先已形成的冈崎片段 5' 末端时, pol δ /PCNA 复合物从 DNA 上释放下来,见图

(12-4)。

DNA 复制时,以母链为模板合成的子链中,其延长方向与复制叉方向一致,称前导链(leading strand),它是连续合成的;而其延长方向与复制叉方向相反的链称后随链(lagging strand),是不连续合成的。DNA 这一复制过程又称半不连续复制(semidiscontinuous replication),见图 12-7。

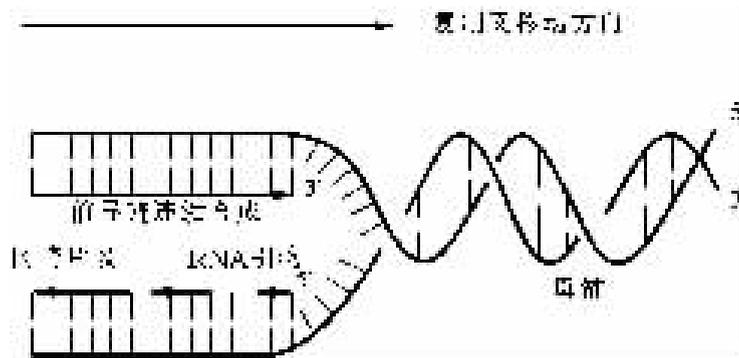


图 12-7 DNA 片段的合成及半不连续复制

两条链均按 5' 到 3' 方向合成,前导链 3' 末端的方向朝着复制叉前进的方向,可连续合成。后随链 5' 末端朝着复制叉,合成是不连续的,形成冈崎片段

(二) RNA 引物的水解

一定长度的 DNA 片段形成后,在核酸酶的作用下,水解除去 RNA 引物。出现的缺口由 DNA 聚合酶 δ 催化 DNA 片段继续延长加以填补。

引物的去除通过两个步骤,首先由 RNase H 降解 RNA 引物,留下单个核糖核苷酸连接在冈崎片段上。然后,由侧翼内切核酸酶(FEN1)除去最后一个核苷酸。FEN1 也能除去由于 DNA 聚合酶 δ 产生的某些错误的碱基。

(三) DNA 大分子的形成

DNA 连接酶将后随链相邻的两个 DNA 片段连接起来,形成大分子 DNA 链。由于 DNA 聚合酶 δ 具有校读功能(校读,proofreading),即通过它的核酶外切酶的功能,能及时切除错配的碱基,使 DNA 复制具有高度的保真性,保证遗传信息的稳定性。

三、端粒 DNA 的合成

端粒(telomere)是染色体末端的结构,它是由许多富含鸟嘌呤脱氧核苷酸的特殊重复顺序 DNA 及相关蛋白质组成的复合体。人的端粒包含数百个六核苷酸(TTAGGG)重复顺序,位于染色体 DNA 的 3' 末端。端粒参与维持染色体结构的稳定,避免 DNA 分子重组并且与衰老有关。人及其他真核细胞一般都是线性染色体。线性染色体的末端在复制时出现特殊的困难。在 DNA 复制过程中,子代 DNA 5' 末端的 RNA 引物被去除后,就会留下短的空缺,无法填补。每复制一次,其子代 DNA 便缩短一些,经过数代后,最终因丢失必需的基因而导致细胞死亡。近年来,由于端粒酶的发现人们对 DNA 末端复制的难题有了明确的认识。

端粒酶(telomerase)是催化端粒合成的酶。端粒酶由蛋白质及 RNA 组成,具有逆转录酶的活性,它能以自身携带的 RNA 为模板,逆转录合成端粒 DNA(图 12-8 图 12-9)。端粒酶使端粒的 3' 末端延长,防止其子代 DNA 端粒的缩短。端粒酶的活性与细胞的生长、繁殖、衰老及肿瘤有密切关系。如胚原细胞的端粒酶活性较高,端粒长度也未减少。而体细胞几乎没有端粒酶的活性。随着细胞的多次分裂,端粒长度逐渐缩短。在某些肿瘤细胞中,端粒酶的活性较高,能维持端粒结构的稳定,使细胞具有永生性。

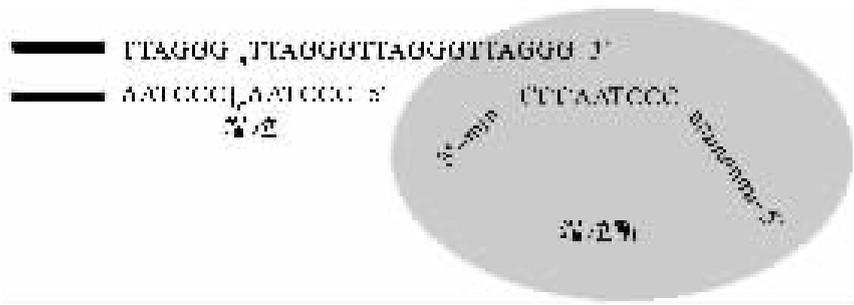


图 12-8 端粒与端粒酶

端粒 DNA :DNA 的 3' 末端存在的重复顺序 (TTAGGG)_n 端粒酶 :酶本身含有与端粒 DNA 序列互补的 RNA 片段 ,催化端粒 DNA 3' 末端的延长

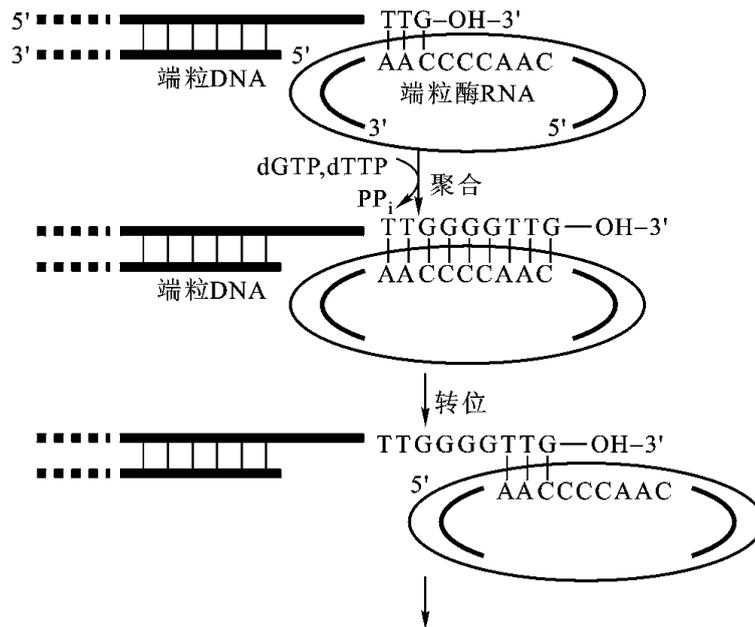


图 12-9 四膜虫端粒酶催化端粒合成的可能机理

四膜虫端粒是由 TTGGGG 重复序列组成的

四、线粒体 DNA 的复制

一些简单的低等生物的染色体外 DNA ,如线粒体 DNA 为环形 DNA。当线粒体 DNA 复制时 ,两条链的复制不是同时进行的。前导链的合成先于后随链。因此 ,前导链合成过程中排除后随链的模板而使之形成一个 D 形襻 (D-loop) ,故线粒体 DNA 的复制称 D 襻形式的复制。哺乳动物线粒体是约 16 kbp 的环形 DNA。在复制过程中 D 襻不断延伸 ,当它达到线粒体大约 2/3 时 ,后随链的起始部位暴露出来。后随链以 D-襻为模板 ,沿着与前导链合成相反的方向进行合成。因此 ,当前导链合成终止时 ,后随链仅合成 1/3。最后合成两个环形双链(图 12-10)。这里应该指出的是 ,后随链的合成也是连续的 ,没有冈崎片段生成。

第三节 原核生物 DNA 的复制过程

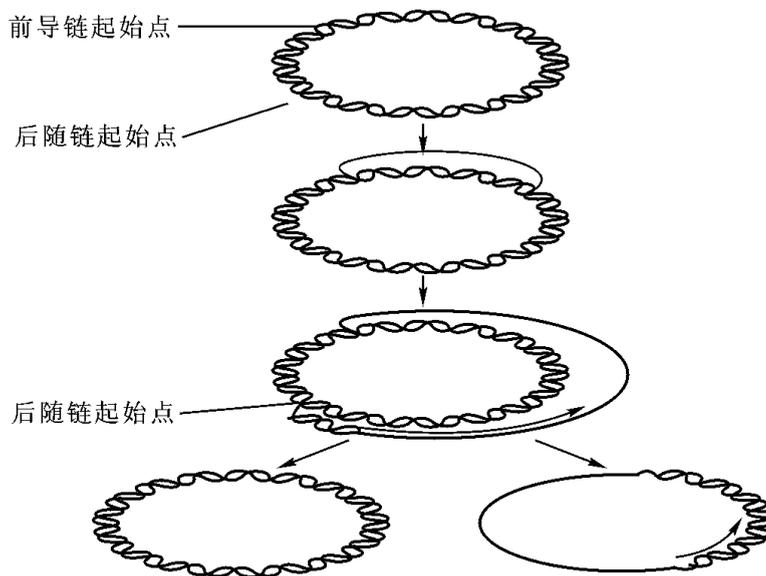


图 12-10 线粒体 DNA 的复制(D-袢型)

前导链及后随链分别有不同的复制起始点,两条链不是同时合成的。前导链合成至全长的 2/3 时,后随链开始合成,故后随链的模板在前导链合成时被排斥出来,形成 D-袢。两条链合成的方向相反。最后,前导链复制完成,后随链复制尚未完成

一、参与原核生物 DNA 复制的酶类及蛋白因子

参与原核生物 DNA 合成的主要酶类与真核生物相似,有 DNA 聚合酶、拓扑异构酶、解旋酶、单链 DNA 结合蛋白、引发酶及连接酶等。细菌与真核生物参与复制的组分比较见表 12-4。

表 12-4 细菌与真核生物复制具有相似功能组分的比较

功 能	细 菌	真 核 细 胞
合成的主要酶	Pol III 核心酶	Pol δ
拓扑异构	Omega (ω) 蛋白 gyrase (旋转酶)	Topo I
解旋酶	Dna B	解(螺)旋酶
解链酶	Dna C	解(螺)旋酶
维持单链	DNA 单链结合蛋白(SSB)	RPA
引物合成	DnaG	Pol α /引发酶
滑动夹	Pol III 的 β 亚基	PCNA
夹子装载	Pol III 的 γ 亚基复合物	RFC
连接反应	连接酶	连接酶 I
RNA 引物去除	Pol I	RNaseH, FEN1

1955 年,Arthur Kornberg 等人首先从大肠杆菌提取液中发现 DNA 聚合酶 I (DNA polymerase I),为 DNA 的复制研究打下了基础。现在已发现大肠杆菌有五种 DNA 聚合酶,其中 DNA 聚合酶 III (Pol III) 是主要的复制酶(见表 12-5)。此酶参与前导链及后随链的合成。

表 12-5 细菌 DNA 聚合酶

分 类	主要功能
Pol I	合成冈崎片段,及 DNA 修复
Pol II	DNA 损伤的修复

Pol III	主要复制酶
Pol IV	损伤旁路修复(damage bypass)
Pol V	损伤旁路修复

Pol III是由7~10个亚基组成的不对称二聚体。核心酶含有 α 、 ϵ 、 θ 三个亚基。 α 亚基催化磷酸二酯键的形成。 ϵ 亚基具有3'到5'核酸外切酶的作用,是起校对功能的外切核酸酶(proofreading exonuclease)。 θ 亚基为装配所必需。滑动夹子由两个 β 亚基组成。它通过 γ 复合物夹子载体组装到DNA上,此步骤需要ATP。两个 β 亚基围绕双螺旋形成一个环,以利于聚合酶沿着模板滑动。Pol III复合物及滑动夹子蛋白是高度分工的,它们有效的合成DNA,直到它们滑出模板。两个Pol III可以通过 τ 亚基组合在一起,在这样一个大的复合物上同时合成先导链及后随链。在后随链上,当遇到已经合成的冈崎片段时,此化合物便从模板上解离下来(图12-11)。

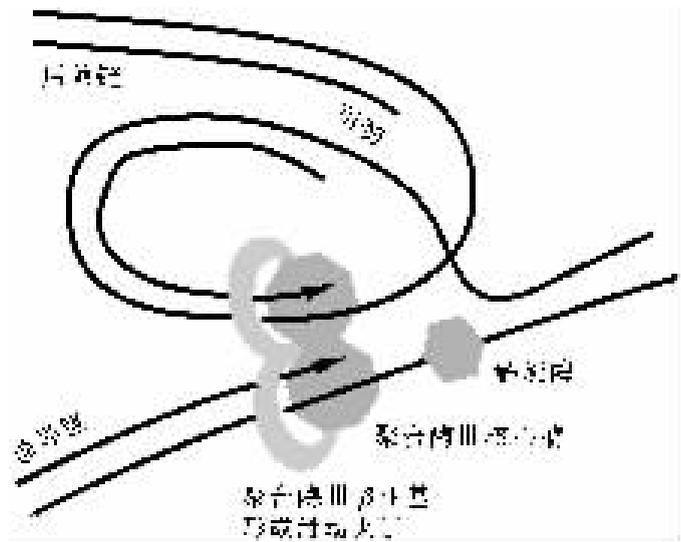


图12-11 大肠杆菌聚合酶 III同时催化DNA两条链的复制。两个聚合酶 III结合在一起,后随链形成环,才能穿过复合物。两条链在一个位置上合成。DNA进入复合物时旋转,大的复合物不围绕DNA旋转。

二、原核生物DNA的复制过程

原核DNA的复制也是半不连续复制,既先导链的合成是连续的,而后随链的合成是不连续的。原核生物DNA的复制包括以下几个过程。

(一) 复制的起始

大肠杆菌染色体有一个复制起始点(origin of chromosome replication, ρ ori C)。复制区大约245 bp,此区域有特殊的序列,蛋白质Dna A能识别该序列并与其相结合,然后蛋白质Dna C与其结合。Dna C作为匹配媒体(matchmaker),允许解螺旋酶Dna B结合,将母链DNA分开,造成一个复制叉。在起始点形成复制泡,从起始点向两个方向移动,这种复制是双向性的。参与细菌复制起始的蛋白质见表12-6。

表12-6 参与细菌复制起始的各种蛋白质及其功能

蛋白质名称	功能
Dna A	识别起始位点
Dna B	解螺旋酶活性,解开DNA双链
Dna C	协助解螺旋酶的活性
Dna G	引发酶活性,催化RNA引物合成
SSB	单链DNA结合蛋白,稳定解开的单链
Omega (ω)	拓扑异构
gyrase (旋转酶)	拓扑异构

(二) 引物的形成及冈崎片段的合成

在后随链上,DNA引发酶(Dna G)与解螺旋酶(Dna B)结合形成一个复合体。Dna B使复合体沿着模板链移动,促使母链分开。这种移动需要ATP水解供应能量。单链DNA结合蛋白(SSB)与单链DNA相结合,防止母链的退火,也防止发夹结构和其他二级结构的形成。由Dna G引发酶合成

短的 RNA 引物。DNA 聚合酶 III 从引物 3'-OH 起,延伸冈崎片段大约 1 000 ~ 2 000 bp。当着聚合酶复合物遇到已经合成的冈崎片段的 RNA 引物时,延长反应则停止。DNA 聚合酶 III 从 DNA 模板上解离下来。

(三) RNA 引物的去除及冈崎片段的连接

大肠杆菌 RNA 引物的去除和空隙的填补均由 DNA 聚合酶 I 催化。DNA 聚合酶 I 是单链分子,它有多种功能,包括 5'→3' 外切核酸酶的活性,从已有的冈崎片段 5' 端切除 RNA 引物,类似 RNaseH 的作用;也包括 DNA 聚合酶的活性,催化 dNTP 加到 3'-末端,直到 RNA 引物被除去而留下的空隙填补完为止。DNA 聚合酶固有的 3'→5' 外切核酸酶的活性起着校读作用,提高了空隙填补的准确性。当只有缺口存在时,DNA 连接酶与缺口结合,催化形成磷酸二酯键封闭冈崎片段,最后连接成一条长链(图 12-12)。

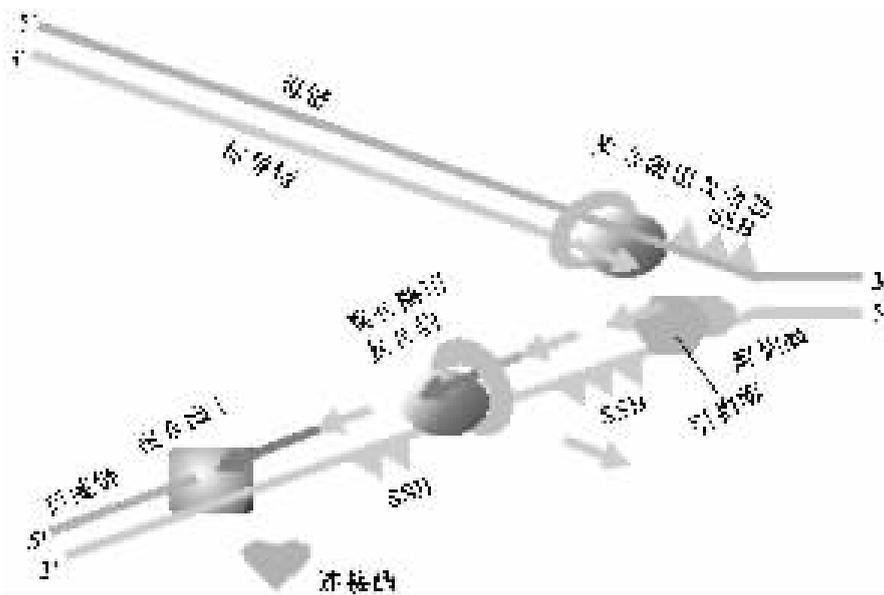


图 12-12 原核生物 DNA 复制

前导链在聚合酶 III 与滑动夹子结合下连续合成。为合成后随链,解旋酶(Dna B)和引物酶(Dna G)沿着模板移动。每 1 000 ~ 2 000 bp 合成一个引物。聚合酶 III 延伸引物,一直达到前一个冈崎片段为止。聚合酶 I 去除 RNA 引物,并填补留下的空隙。最后缺口由连接酶封闭

(四) DNA 复制的终止

大肠杆菌含有特殊的终止顺序,复制叉不能通过此区域。

第四节 逆转录过程

某些病毒的基因组是 RNA,如 RNA 肿瘤病毒及 AIDS 病毒。它们分别造成人类肿瘤和免疫缺欠。逆转录酶(reverse transcriptase)可催化以 RNA 为模板合成 DNA 的反应。因此它又被称为 RNA 指导的 DNA 聚合酶(RNA-directed DNA polymerase, RDDP)。

逆转录酶具有双重功能。它既可利用病毒 RNA 作模板,合成一条与模板互补的 DNA 单链,二者形成 RNA-DNA 杂交分子。逆转录酶同时又具有核糖核酸酶 H 的活性,专一地水解 RNA-DNA 杂交分子中的 RNA。留下来的单链 DNA 做模板,在 DNA 指导的 DNA 聚合酶作用下,合成另一条互补 DNA 链,形成双链 DNA 分子(图 12-13)。

逆转录酶存在于所有致癌 RNA 病毒中,其功能可能与病毒的恶性转化有关。病毒的 RNA 通过逆转录先形成 DNA(前病毒),然后整合到宿主细胞染色体 DNA 中去,使细胞内除合成自身原有的蛋白质外,又能合成病毒特异的某些蛋白质。

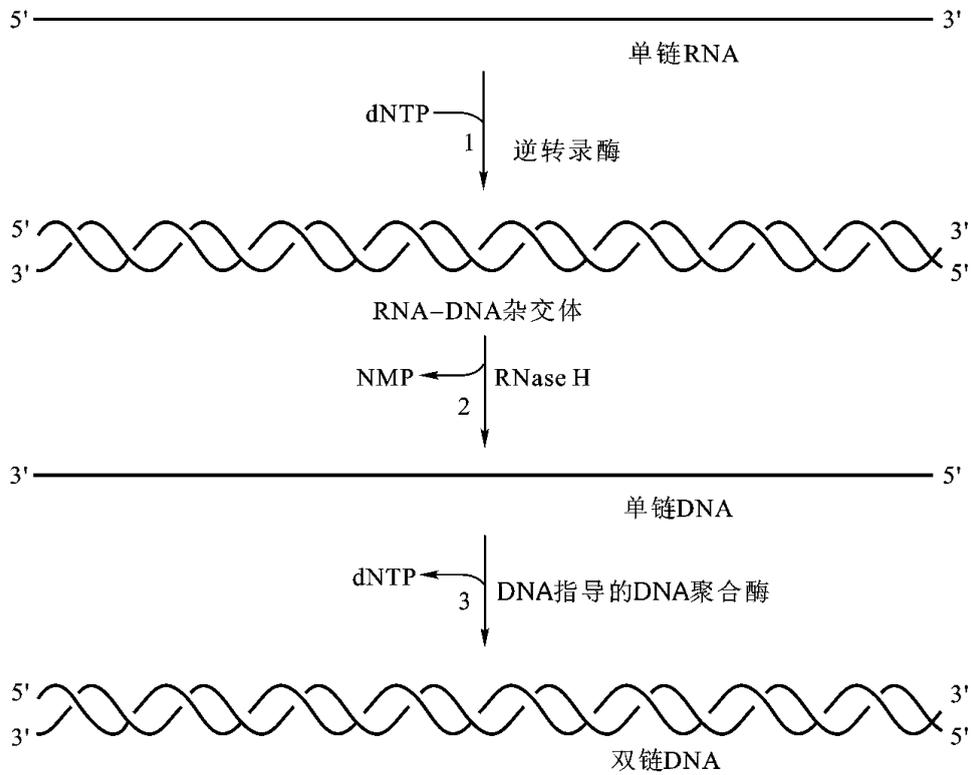


图 12-13 逆转录过程

逆转录酶也分布于正常细胞,如蛙卵、正在分裂的淋巴细胞、胚胎细胞(鸡胚及鼠胚)等。推测这类酶在细胞分化和胚胎发生中可能起某种作用。在重组 DNA 中,可利用逆转录酶合成某些 mRNA 相应的 DNA 称互补 DNA(complementary DNA, cDNA)。

第五节 DNA 的重组、损伤与修复

一、DNA 的重组

DNA 重组(recombination)是遗传信息的交换。有两种基本类型的重组,即同源重组及非同源重组。同源重组是发生在相同的或近似相同顺序之间的重组。例如,染色体并不是原原本本地从一代传给下一代。在进入下一代之前,一对父亲和母亲染色体之间发生重组。基因重组可产生遗传的多样性。重组事件发生的两位点之间与它们的物理距离粗略地成正比。两基因之间重组频率为 1% 的距离定义为 1 厘摩(centimorgan, cM)。厘摩是遗传学的量度,它是遗传图的基础。在人类,1cM 在染色体上大约是 1 000 000 bp。重组对于 DNA 的复制及修复也是重要的。

DNA 转座(transposition)属于非同源重组。转座是一段特殊 DNA 在基因组中的移动,这段 DNA 片段称转座子(transposons)。转座子可以在同一染色体上从一个位置移动到另一位置上,也可以整合到另一条染色体上。转座酶催化转座子从基因组的一个部位剪切和插入到基因组另外一个地点。人类的某些疾病是由于转座子插入引起基因突变造成的。

二、基因突变

(一) 基因突变的类型

可传递给子代细胞 DNA 碱基顺序的变化叫做基因突变。各种因素(包括理化因素、病毒感染等)引起的 DNA 损伤,若不能进行修复则可以通过遗传的永久性改变而导致基因突变。基因突变有以下几种类

型：

(1) 点突变 DNA 分子中的一个碱基被另一种碱基所取代称点突变。在这些突变中,一个嘌呤碱基被另一种嘌呤碱基所取代,或一个嘧啶碱基被另一种嘧啶碱基所取代,称为转换(transition);嘌呤和嘧啶碱基之间的互换称为颠换(transversion)。若由于单一碱基的改变而产生新的密码子,编码不同的氨基酸所造成的突变称错义突变(missense mutation);若由于一个碱基改变形成终止密码子导致转录终止,这种突变称无义突变(nonsense mutation)。无义突变所造成的影响比错义突变更为严重。

(2) 分子中有一个或多个碱基缺失。

(3) 分子中发生一个或多个碱基的插入 某些突变来自转座子的插入,引起较大范围的改变。由于碱基的插入或丢失引起移码突变(frame shifts) 移码突变不仅改变氨基酸的种类和顺序,同时也引起编码多肽链提前终止或更罕见的延长。

某些化学物质,包括吡啶,二氢吡啶插入相邻碱基之间,通常引起单一碱基的插入或丢失。

(4) 近来发现另一种类型的突变,称三联体扩增(triplet expansion)。重复三联体数目大量增加。这种三联体是简单重复多态性的一种(也称微卫星 DNA)。在正常个体,重复数目有一定的范围,当重复数目超出正常时,它们可以形成前突变(pre-mutation),此时没有出现症状(无表型出现)。但当重复频率进一步增加,下一代则大量地扩增,这样便合成一个长的由其编码的相同氨基酸残基插入到编码多肽链中,从而造成疾病,如亨廷敦病(huntington's disease)。人类亨廷敦基因含有 5'-CAG-3' 串联重复序列,编码多聚谷氨酰胺。如此串联重复序列大量扩增,则造成编码的蛋白质的结构改变。

(二) 引起基因突变的因素

基因突变可分为自发性及环境因素引起的突变。

1. 自发性突变

自发性突变可能有以下几种原因引起的。(1) DNA 复制的错误。DNA 聚合酶受到某些因素的影响,错误的碱基没有及时去除。(2) DNA 修复合成出现的错误。DNA 损伤后,参与 DNA 损伤的 DNA 聚合酶不同于 DNA 复制的酶,它催化的 DNA 修复合成同样可能发生碱基配对错误,造成 DNA 突变。(3) 碱基自发改变。碱基上的氨基($-\text{NH}_2$)可以互变异构成亚氨基($=\text{NH}$)。同样,酮基($\text{C}=\text{O}$)也可以互变异构生成烯醇基($-\text{C}-\text{OH}$)。这种暂时的互变异构体可能形成双螺旋中的异常碱基配对(图 12-14)。如果异常部分未加以修正,就将引起转换突变。这就是 Watson 与 Crick 提出的自发性转换突变的机制。

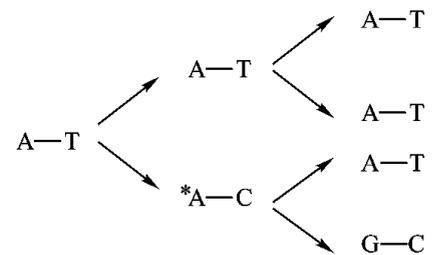


图 12-14 自发性转换突变的发生机制

*腺嘌呤的亚氨基型同分异构体与胞嘧啶配对(A-C),在下次复制时,由于胞嘧啶与鸟嘌呤配对,在子代 DNA 分子中,原来 A-T 变成 G-C。

2. 环境因素

某些化学突变剂,例如,碱基的类似物 5-溴尿嘧啶和 2-氨基嘌呤可掺入到 DNA 中,并引起特异的碱基转换突变。5-溴尿嘧啶是胸腺嘧啶的类似物,通常与腺嘌呤配对。由于 5-溴尿嘧啶比胸腺嘧啶更容易以烯醇型异构体存在,因而鸟嘌呤更易与它配对,故可使正常的 A-T 变成 G-C。同理,2-氨基嘌呤也是腺嘌呤的类似物,可与胞嘧啶形成氢键,使 A-T 突变为 G-C。

由于密码是没有标点符号的,所以单个或少数碱基的缺失或插入所引起的突变常常能使基因的阅读框发生改变。这种突变又被称为移码突变。经移码突变的基因,其转录的 mRNA 翻译产物的结构和功能都会发生明显的改变。

从进化角度看,基因突变使物种得以改变,生物界变得多姿多彩。但生命个体基因的突变常常打破机体原有的协调与适应关系。从医学角度来讲,突变危及人类的生命与健康。一切致病基因都因突变而产生。生殖细胞的突变能导致后代发生分子病(即各种遗传病)。体细胞突变能导致肿瘤发生。诱变剂与

致癌物质在癌症的发生上有极大的相关性。如环境污染、工业废气与汽车尾气,以及日常用品(药物、化妆品、佐料等)中含有多种致癌成分,避免与它们接触具有一定的保健作用。

三、DNA 的损伤及修复

某些理化因素,如电离辐射、紫外线和化学诱变剂等,都能造成 DNA 的损伤。DNA 的损伤包括碱基的更替、丢失,骨架中磷酸酯键的断裂,两条链之间形成交联等。这些损伤可导致生物突变,甚至死亡。然而在一定条件下,生物体能使其 DNA 的损伤得到修复。这种修复作用是生物在长期进化过程中获得的一种保护功能。

在紫外线的照射下, DNA 分子中同一链上相邻的嘧啶碱基之间可共价连接,形成二聚体。两个相邻的胸腺嘧啶之间形成二聚体(T⁺T) (图 12-15)。其他嘧啶碱基之间也能形成二聚体(C⁺T、C⁺C),但数量较少。嘧啶二聚体的形成影响 DNA 的双螺旋结构,阻碍其复制及转录的功能。

细胞内具有一系列起修复作用的酶系统,可以去除 DNA 分子上的损伤,恢复 DNA 的正常双螺旋结构。修复的方式主要有以下几种。

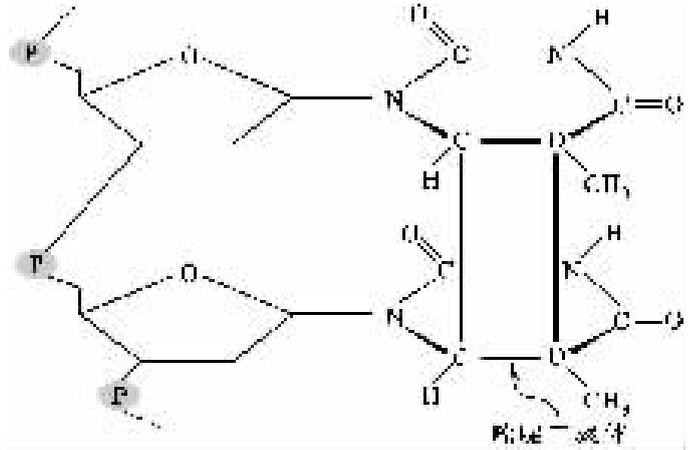


图 12-15 DNA 损伤造成嘧啶二聚体形成

(一) 酶学光复活

光复活是一种修复过程。几乎所有的生物细胞中都含有一种光复活酶(photoreactivating enzyme)或称光裂解酶(photolyase)。此酶在可见光的作用下被激活后与 DNA 分子上的嘧啶二聚体结合,并在两个辅助因子(FADH₂, 蝶呤)的协同下打开二聚体,使损伤的 DNA 恢复正常结构。

(二) 切除修复

切除修复是在一系列酶的作用下,将 DNA 分子中损伤部分切除,并以完整的另一条链为模板,修补切除的部分,使 DNA 恢复正常结构。切除修复可分为碱基切除修复及核苷酸切除修复。

1. 碱基切除修复

碱基切除修复包括甲基化的、脱氨基的(C 的脱氨基生成的 U)、氧化的碱基的切除修复以及无碱基(abasic AP)位点的修复。一类 DNA 糖基化酶(glycosylase)从 DNA 骨架上切除损伤的碱基,此类酶切断糖-碱基之间的糖苷键,留下一个无碱基的脱氧核糖。这个糖由一种无碱基核酸内切酶(AP endonuclease)从 5'端断裂磷酸二酯键。另一种 AP 裂解酶(AP lyase)在 3'端切断,产生的单一核苷酸空隙由 DNA 聚合酶及连接酶封闭(图 12-16)。

2. 核苷酸切除修复

核苷酸切除修复在各种损失中起作用,特别包括大的加成或 DNA 双螺旋结构的畸变(distortion)。如致癌剂黄曲霉素或化疗药顺铂(cisplatin)以及碱基的错配和 DNA 的小环(loop)均可通过此途径除去。

人类切除修复 DNA 大约需要 16 种蛋白因子参加。切除修复可分以下几个步骤:

- 1) 通过特异的核酸内切酶识别损伤部位。
- 2) 由酶的复合物在损伤的两边切除几个核苷酸。
- 3) 以另一条完整的 DNA 链为模板,在 DNA 聚合酶 β 或其他的 DNA 聚合酶作用下,按 5'→3'方向进行修复合成。

4) DNA 连接酶将所合成的 DNA 链与原来的链接上(图 12-17)。

(三) 复制后重组修复(子链间隙的修复)

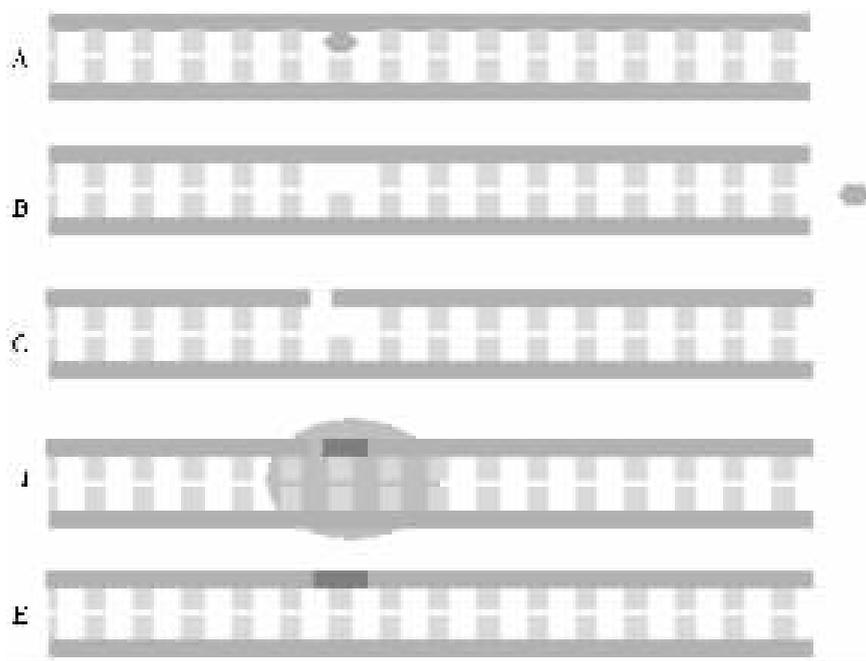


图 12-16 DNA 碱基切除修复

- A. 圆圈表示错误的碱基 ;B. 一种 DNA 糖基化酶切除错误的碱基 ;C. AP 内切核酸酶及 AP 裂解酶切除磷酸二酯键及糖基 ;D. DNA 聚合酶填补单一核苷酸 ;E. DNA 连接酶封闭

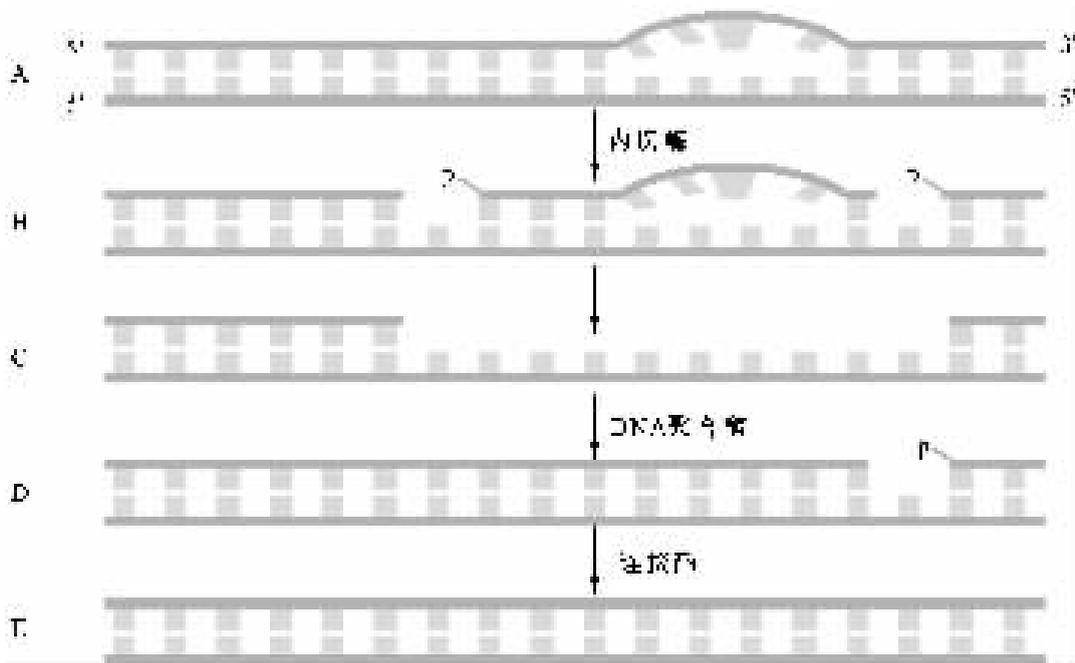


图 12-17 核苷酸切除修复

- A. DNA 一条链损伤 ;B、C. 核酸内切酶识别损伤部位并在损伤部位的两端切除一段 DNA ;
D. DNA 聚合酶以另一条完好的 DNA 链为模板合成一段新的 DNA ;E. 缺口处由 DNA 连接酶封闭

许多损伤可以阻断复制。如果复制越过损伤部位重新开始复制,或当损伤的 DNA 片段较长时,损伤不能完全修复。DNA 复制后,子代 DNA 在损伤的对应部位出现空隙,通过分子间的重组,从完整的母链上将相应的碱基顺序片段移至子链的空隙处。即从与子链方向相同的母链上切下一段移植到子链上。母链留下的空隙再以另一条完好的母链做模板,在 DNA 聚合酶的作用下合成的多核苷酸链补上母链的空隙。最后由 DNA 连接酶封闭缺口(图 12-18)。这种复制后重组(postreplication recombination)修复尽管损伤依然存在,但子代 DNA 损伤的空隙被补上了。

(四) 旁路合成修复

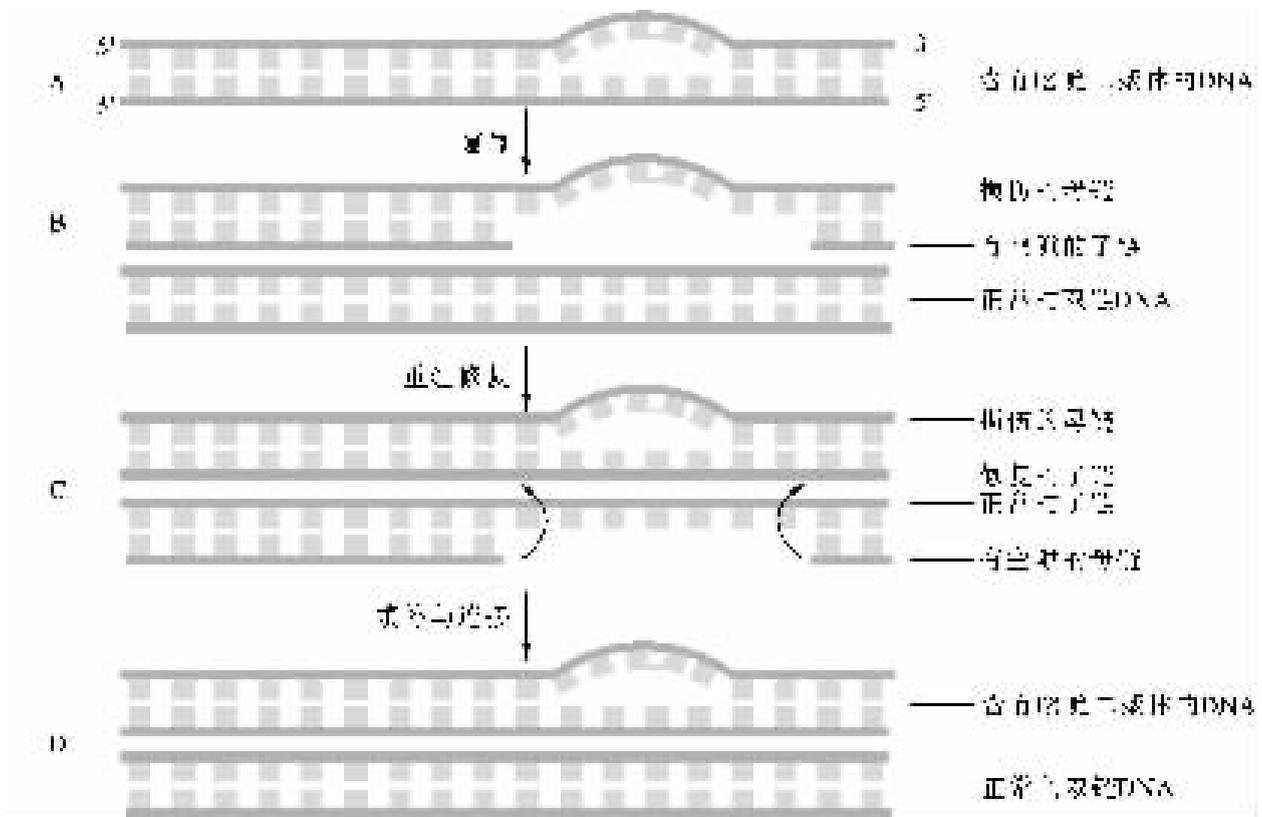


图 12-18 DNA 的重组修复

- A. DNA 一条链损伤(如含有嘧啶二聚体); B. DNA 复制后, 其中一个子代是正常的, 而另一个子代的一条链出现空隙; C. 正常子代中来自母链的一段 DNA 序列通过重组, 将缺损部分修复; D. 最后, 再以子代中完整的链为模板, 修补缺失的互补序列

当损伤发生在模板链时, 有一些保真性不高的旁路 DNA 聚合酶通过损伤的间隙继续合成, 这个过程称旁路合成 (bypass synthesis)。校读非常准确的聚合酶不能进行这种合成。聚合酶准确性的下降会增加错误核苷酸的掺入率。但这种伤害的后果要比长时间(或暂时)阻断复制小得多(图 12-19)。

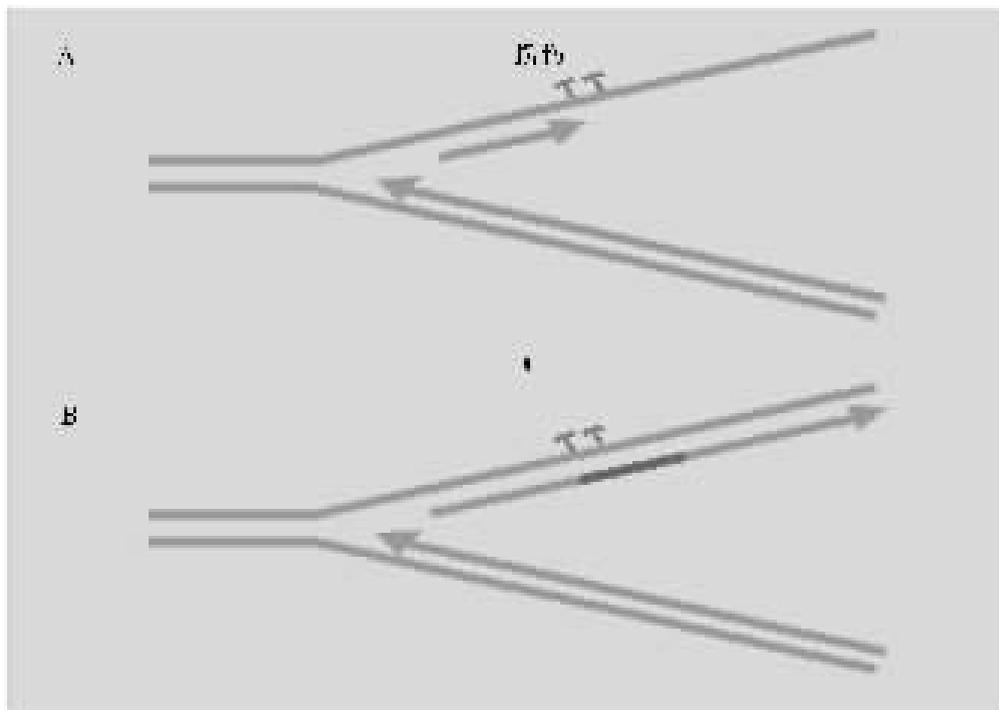


图 12-19 DNA 损伤的旁路合成修复

(TT)表示模板的损伤的部位。一些特殊的 DNA 聚合酶可以修补损伤部位

真核生物有一些旁路聚合酶(见表 12-2)。DNA 聚合酶 η 主要掺入被紫外线损伤的 T 二聚体的修复。DNA 聚合酶 η 的错误掺入率大约每 20~400 核苷酸有 1 个。DNA 聚合酶 ι 掺入的核苷酸对应的是高度突变的损伤或无碱基部位,此部位不能作为模板。DNA 聚合酶 ξ 本身不能加入核苷酸,但可以延长由其他旁路聚合酶形成的结构,直到正常的聚合酶接替为止。这类酶可能引起突变的区域是小的,有限度的。

大肠杆菌 DNA 聚合酶 IV 和 V 也是旁路合成的聚合酶。

(五) SOS 调节子

SOS 是国际海难呼救信号。大肠杆菌 DNA 的损伤促发 SOS 应答。这是一类应急性的修复方式。由于 DNA 损伤广泛以至于难以进行复制,会诱发一系列复杂的反应。SOS 应答是大量基因的协同诱导,它们的转录至少部分地被共同阻遏物 *LexA* 所调节。这些基因包括 *uvrA*、*uvrB*、*uvrC*、*recA* 及 *LexA* 本身。被共同阻遏物控制的一组操纵子(operon)称为调节子(regulon)。*LexA* 的自动调节是基于简单的反馈调节。在正常细胞里存在低水平的 *RecA* 蛋白质。当 DNA 损伤时,*RecA* 是有活性的,并能结合 *LexA*,使后者裂解生成无活性片段。因此,正常被 *LexA* 抑制的基因被开放。当 DNA 损伤被修复后,活化的 *RecA* 减少,*LexA* 的分解也减少。细胞中 *LexA* 水平提高,逐渐关闭了 SOS 应答。这种调节是有效的,迅速的,但也是瞬间的对 DNA 损伤的应答。

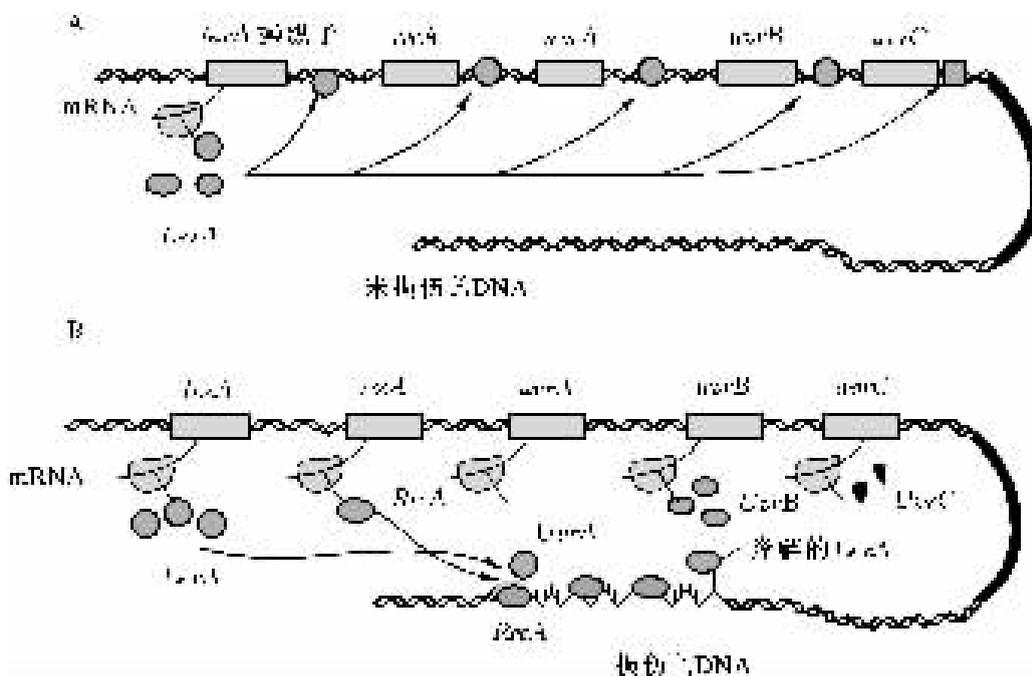


图 12-20 SOS 调节子

A. DNA 未损伤时 *LexA* 极大的抑制 *RecA*、*UvrA*、*UvrB*、*UvrC* 及 *LexA* 自身和其他参与 SOS 应答蛋白质的合成; B. 当 DNA 受到严重损伤时 *RecA* 被激活,结合到单链 DNA 上,并导致 *LexA* 的自身的降解,使 SOS 应答蛋白质合成,由此 DNA 损伤得到修复

修复作用是一种普遍的功能。细胞的修复系统十分复杂。细胞的这种功能对保护遗传物质 DNA,使它不轻易被改变是有重要意义的。修复系统的异常与肿瘤的发生有一定关系。“着色性干皮病”是一种先天性遗传性疾病,病人对日光和紫外线特别敏感,容易发生皮肤癌。经分析表明,患者皮肤细胞中缺乏紫外线特异性核酸内切酶,因此对紫外线引起的 DNA 损伤不能修复。

某些化学试剂,如烷化剂既可造成 DNA 的损伤引起突变及癌变,又能作为药物治疗癌症。烷化剂是一类带有一个或多个活性烷基的化合物,能使 DNA 烷基化。烷基化位置主要发生在鸟嘌呤碱基的 N_7 位上。腺嘌呤 N_1 、 N_3 、 N_7 以及胞嘧啶 N_1 也可少量烷基化。鸟嘌呤烷基化后不稳定,易被水解脱落下来,留

下空隙可能干扰 DNA 复制或引起错误碱基的参入。带有两个活性烷基的烷化剂能同时与两条 DNA 链作用,使双链间发生交联,从而抑制其模板功能。

自力霉素、丝裂霉素及环磷酰胺等是治疗肿瘤的常用药物,起类似烷化剂的作用。它们能与 DNA 碱基(主要是鸟嘌呤)结合,妨碍双链的拆开,抑制 DNA 的复制。

放线菌素有抗菌和抗癌的作用。它能插入双链 DNA 中相邻两个 G - C 碱基之间,因而抑制 DNA 的模板功能。

Summary

The central dogma of molecular biology states that “ DNA makes RNA ,RNA makes protein ” (although RNA can also make DNA).

In eukaryotes ,DNA is synthesized during the S phase of cell cycle. In animal cells ,chromosomal DNA is bidirectionally replicated by DNA polymerase α and δ from multiple origins ,which probably synthesize the lagging and leading strands ,respectively. DNA is replicated in the 5' to 3' direction by the assembly of dNTP on complementary DNA templates. Replication is initiated by the generation of short RNA primers. The DNA is then extended from the 3' end of the primers through the action of DNA polymerase. The leading strand at a replication fork is synthesized essentially continuously ,whereas the lagging strand is synthesized discontinuously by the formation of Okazaki fragments.

RNA primers on newly synthesized DNA are excised and replaced by DNA polymerase. The single-strand nicks are then sealed by DNA ligase. DNA synthesis requires the participation of many auxiliary proteins ,including PCNA(proliferating cell nuclear antigen) ,helicase ,topoisomerase ,SSB (single-strand binding protein). The great complexity of the DNA replication process apparently ensures the enormous fidelity which is necessary for the maintenance of genome integrity.

Telomeric DNA is synthesized by the RNA - containing enzyme telomerase ,which is active in germ cells ,but not in somatic cells ,a phenomenon that may ,in part ,be responsible for cellular senescence and aging.

Mitochondrial DNA is replicated in the D-loop mode by DNA polymerase γ . Retroviruses produce DNA on RNA templates in a reaction sequence catalyzed by reverse transcriptase.

Genetic information may be exchanged between homologous DNA sequences through general recombination. DNA may also be rearranged through the action of transposons. These DNA segments carry the genes coding for the proteins that mediate the transposition process as well as other genes.

Cells have a great variety of DNA repair mechanisms. DNA damage may be directly revised such as in photoreactivation of UV-induced pyrimidine dimers or in the repair of O⁶-methylguanine lesions. Pyrimidine dimers as well as many other types of lesions ,may also be removed by excision repair. DNA glycosylases specifically remove the corresponding chemically altered bases ,including uracil ,to form AP sites that are eliminated by nucleotide excision repair. A lesion in a DNA strand resulting from its synthesis on a damaged template may be corrected through recombination repair. Large numbers of DNA damages induce the SOS response ,which involves an error-prone DNA repair system.

思 考 题

1. 何为生物遗传的中心法则?请写出信息传递方向式。

2. 参与真核生物 DNA 复制的主要酶类及蛋白因子有哪些？各有何主要生理功用？
3. 试说明真核生物 DNA 复制的过程。
4. 试比较原核及真核生物 DNA 复制的异同点。
5. 何为逆转录？写出主要反应过程。
6. 试说明核苷酸切除修复的主要过程。
7. 试说明基因突变的主要类型。
8. 为什么说 DNA 复制是一个耗能反应？

(崔秀云)

第十三章 RNA 的生物合成

本章教学要求

- 转录的特点
- 真核生物 RNA 聚合酶及转录因子
- 转录的过程: 起始(启动子)、延长、终止
- 转录后的加工: 剪切、添加及修饰
- 原核生物的转录特点

细胞中的各类 RNA(包括 mRNA、rRNA 和 tRNA)都是以 DNA 为模板,在 RNA 聚合酶的催化下合成的。这一过程叫转录(transcription)。转录是遗传信息表达的第一步。经转录生成的各种 RNA 通常还需要经过剪接、修饰等加工过程,才能成为成熟的 RNA。

第一节 参加 RNA 合成的酶类与因子

一、DNA 指导的 RNA 聚合酶

DNA 指导的 RNA 聚合酶(DNA directed RNA polymerase,DDRP)是 RNA 合成中最主要的酶类。RNA 聚合酶在合成 RNA 时需要以下条件:

1. 双链 DNA 中的一条链作为 RNA 合成的模板。
2. 四种核糖核苷三磷酸(即 ATP、GTP、CTP 和 UTP)是该酶的底物。
3. 需要二价金属离子,如 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 。

催化的转录反应如下:



真核生物有多种 RNA 聚合酶,它们通常由多个亚基组成,各亚基在聚合反应中执行多种功能。现将几种主要的 RNA 聚合酶的细胞内定位及功能作一比较(表 13-1)。

表 13-1 真核生物 RNA 聚合酶的种类和性质

种 类	I 型(或 A)	II 型(或 B)	III 型(或 C)	线粒体 RNA(Mt 型)
相对分子质量	5.5×10^5	6×10^5	6×10^5	$(6.4 \sim 6.8) \times 10^4$
分布	核仁	核质	核质	线粒体
转录产物	5.8 S、18 S、28 S rRNA 前体	mRNA 前体	tRNA 前体 5 S rRNA	线粒体 RNA
对利福平敏感性	不敏感	不敏感	不敏感	敏感
对鹅膏蕈碱的敏感性	不敏感	非常敏感	敏感	不敏感

真核生物的 RNA 聚合酶对利福平不敏感,而原核生物 RNA 聚合酶可被利福平及利福霉素所抑制。故利福平可作为抗结核病药物,抑制细菌 RNA 聚合酶的活性。

二、转录因子

真核生物转录过程还需要一些蛋白因子参与,这些因子能结合到 DNA 的特殊序列并且与 RNA 聚合酶结合,促进转录。能够促进 RNA 聚合酶 I 转录的一类转录因子称 I 型转录因子(transcription factors I, TF I);促进 RNA 聚合酶 II 转录的一类转录因子称 II 型转录因子(TF II);促进 RNA 聚合酶 III 转录的一类因子称 III 型转录因子(TF III)。每型转录因子又可分几种不同的类型,如 TF II 包括 TF II A, B, D, E, F, H 等。

三、终止蛋白

终止蛋白能与 RNA 聚合酶结合,阻止 RNA 聚合酶越过终止信号而使转录终止。

第二节 真核生物的转录过程

一、转录的特点

RNA 的合成与 DNA 的合成有相似之处,其合成的方向均为 $5' \rightarrow 3'$;聚合反应均是通过核苷酸之间形成的 $3' \text{--} 5'$ 磷酸二酯键,使核苷酸链延长,同时释放出焦磷酸(图 13-1)。

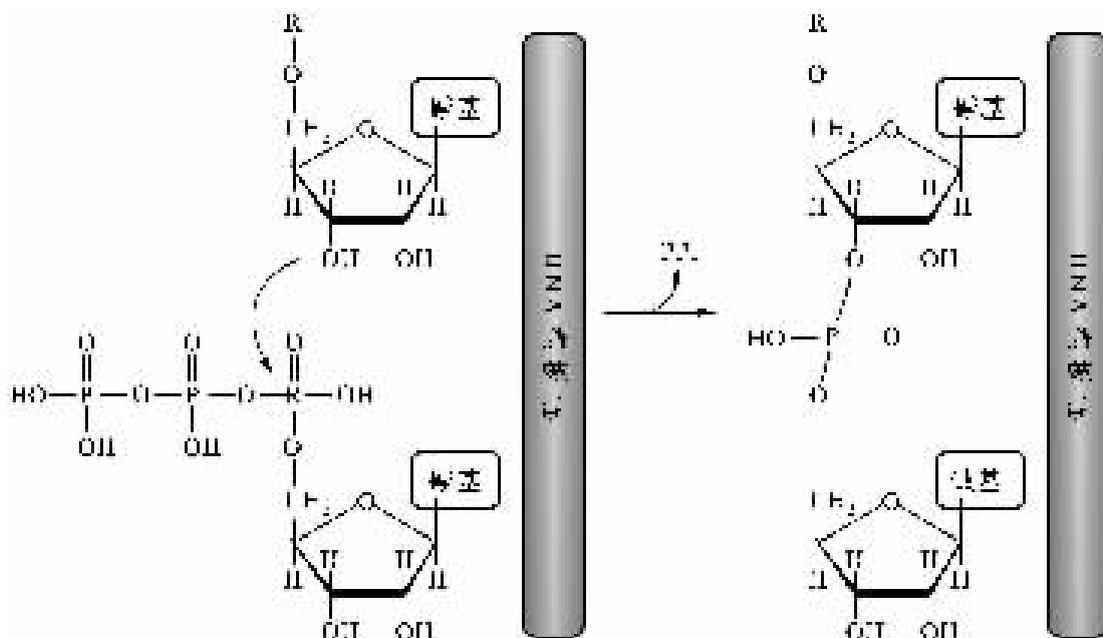


图 13-1 RNA 链中 $3' \text{--} 5'$ 磷酸二酯键的形成

RNA 合成不同于 DNA 合成之处主要有:

1. RNA 聚合酶不需要引物。
2. RNA 聚合酶没有核酸酶的活性,在 RNA 合成过程不起校读作用。
3. 转录是不对称的,即仅用 DNA 双链中某一条链作为模板链进行转录。有时是这条链的某区段,有

时是另一条链的某区域具有模板作用。通常将模板链称为反(意)义链(antisense strand),将其互补的另一条链称为有(意)义链(sense strand)或编码链(coding strand),这是因为其核苷酸序列(除 T 改成 U 外)与方向和转录生成的 RNA 相同。

4. 转录后 DNA 模板成分无改变。

5. 对于一个基因组来讲,转录只发生在一部分基因中,而且每一个基因的转录都受到相对独立的控制。

二、转录过程

(一) 转录的基本过程

转录过程可分为三个阶段:起始、延长和终止。

1. 起始阶段(initiation)

转录开始时, RNA 聚合酶结合于 DNA 模板的特定部位,此部位称启动子区。启动子(promoter)是 DNA 上的特殊的序列,它包括一些保守顺序,其中最重要的顺序称 TATA (box)盒子,核苷酸序列为 TATA (A/T)(A/T)A,括号内的核苷酸可以是 A 或者是 T。TATA 盒子位于转录起始点上游 -25 bp 处, RNA 聚合酶 II 结合到这一区域(图 13-2)。此外,在转录起始点的上游 -40 和 -110 碱基对之间,某些启动子还含有 CAAT 盒和 GC 盒(图 13-3)。这些结构也与转录的起始有关,某些转录因子可以与其相结合,从而刺激转录。这种机制称募集(recruitment),募集在狭义上是指原核及大多数真核生物基因的活化。



图 13-2 某些真核启动子区 TATA 保守序列

真核生物一些启动子顺序,同源顺序用阴影表示

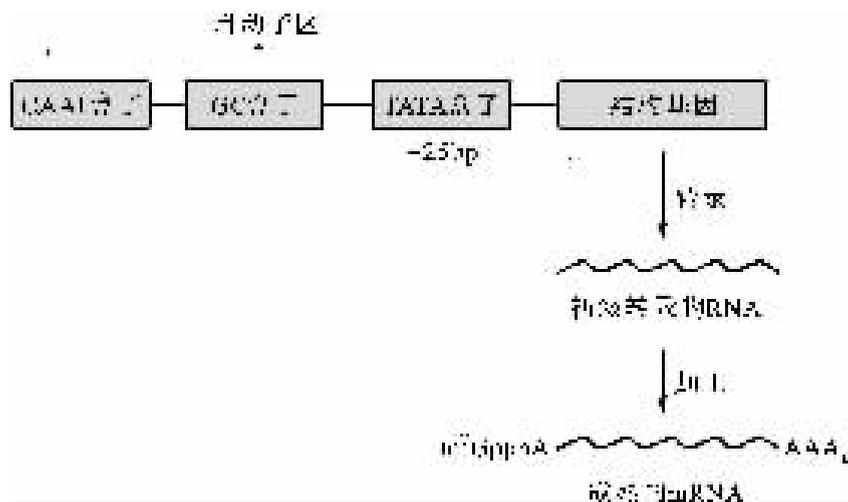


图 13-3 真核生物 RNA 聚合酶 II 启动子区示意图

转录起始点以“+1”表示,在其上游的核苷酸序列以“-”表示;

启动子区框内表示与转录有关的保守顺序

在起始阶段, RNA 聚合酶在转录因子的协助下结合到 DNA 模板的启动子区域。在此附近 DNA 双链被 RNA 聚合酶解开约 17 个碱基对, 形成一个转录泡。根据 DNA 模板链上核苷酸的序列, 以 NTP 为原料, 按碱基互补原则在 RNA 聚合酶催化下, 形成第一个 3', 5'-磷酸二酯键。头一个核苷酸多为嘌呤核苷酸 A 或 G。

2. RNA 链的延长

随着 RNA 链的延长(elongation), RNA 聚合酶沿着 DNA 模板向 RNA 链的 3' 方向移动并不断的解开 DNA 双链。同时与 DNA 模板链序列相互补的核苷酸逐一地进入反应体系, 在 RNA 聚合酶的作用下, 不断延伸 RNA 链。合成的方向为 5'→3'。如此, 合成的 RNA 逐渐延伸(图 13-4)。DNA 双螺旋的解旋及重新恢复双螺旋是在 DNA 拓扑异构酶的作用下进行的。DNA 拓扑异构酶也是转录复合物组分之一。

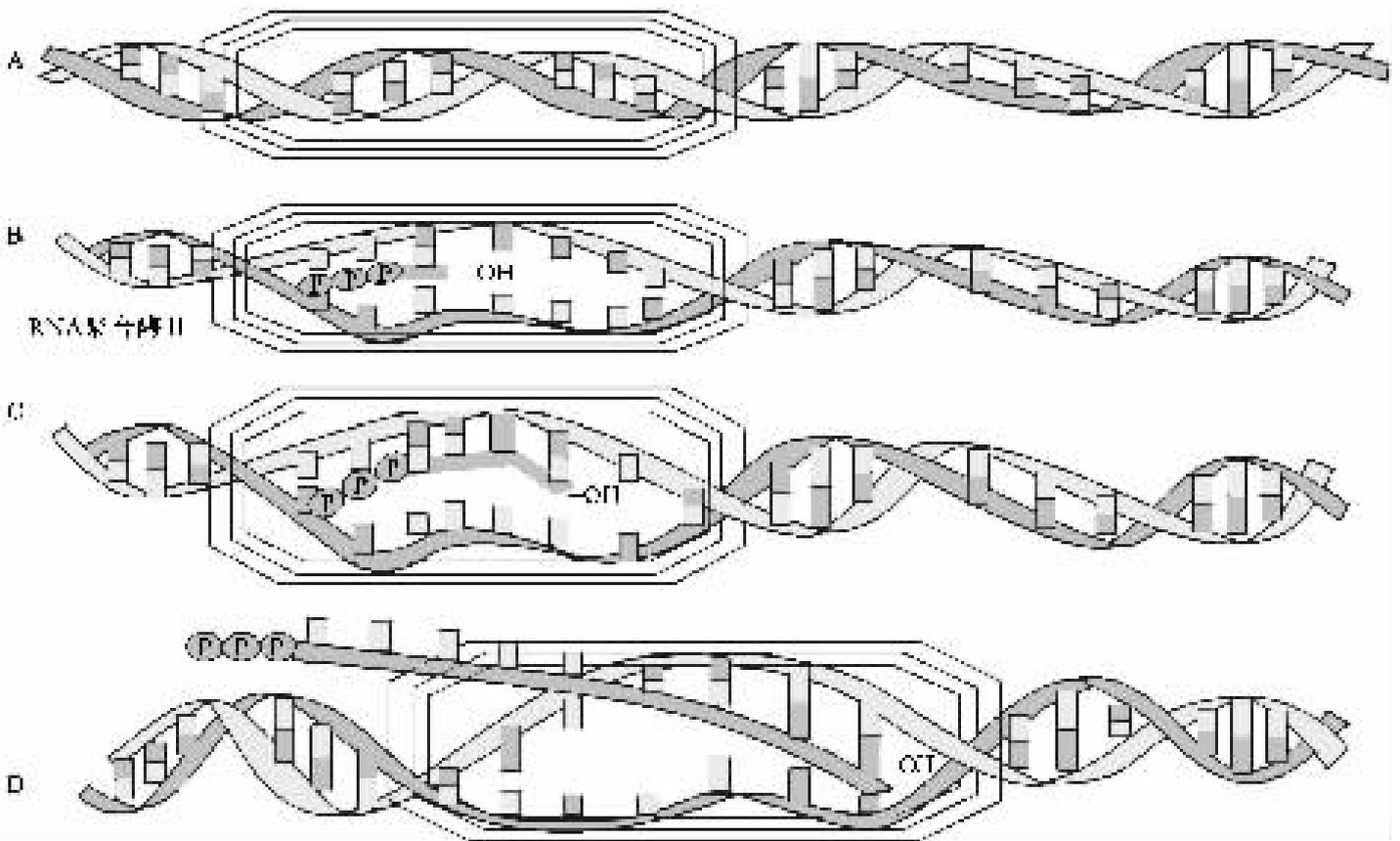


图 13-4 RNA 链的延伸

A. RNA 聚合酶复合物识别 DNA 模板上的启动子序列, 并与其结合; B. RNA 聚合酶在转录因子的辅助下, 将双链 DNA 解开一段, 形成转录泡。在聚合酶的作用下以 NTP 为底物, 与模板链的碱基互补开始合成 RNA; C. RNA 聚合酶继续合成 RNA, 以 U 替代 T, A-U、C-G 配对; D. 随着 RNA 链的延长, RNA 聚合酶沿着模板链不断滑动, 直到遇到终止信号合成停止。DNA 双螺旋重新形成

3. RNA 合成的终止(termination)

RNA 生成后, 暂时与 DNA 模板链形成 DNA-RNA 杂交体(长度约 12 个碱基对) 此杂交体结合不紧密, RNA 很容易从模板 DNA 上脱落。于是, DNA 模板链与编码链又重新形成双链。

当 RNA 聚合酶行进到 DNA 模板的特殊部位, 遇到 DNA 的特殊顺序时, RNA 聚合酶便不能前进。在终止因子的作用下, RNA 聚合酶脱离 DNA 模板, 于是 RNA 合成反应停止。DNA 模板上的终止信号是由于 DNA 特殊的结构而起作用, 此处 DNA 多存在着反向重复顺序(见第一章 图 1-21)。此区域容易形成发夹结构, 有助于转录的终止。

(二) 几种 RNA 的合成特点

1. mRNA 的合成

mRNA 的合成是在核内由 RNA 聚合酶 II 催化的, 有一系列转录因子 II(TF II) 参加组成转录前起始

复合物 (pre-initiation complex, PIC) (图 13-5)。转录因子与 RNA 聚合酶 II 及 DNA 模板相结合,同时,它们之间也相互结合。不同的 TF II 参与转录的不同阶段。其中 TF II D 是与 DNA 启动子 TATA 盒相结合,从而使 RNA 聚合酶 II 结合到启动子区。各种 TF II 的功能列于表 13-2,它们的结合先后次序是 TF II D、TF II A、TF II B、TF II F、RNA 聚合酶 II 和 TF II E、TF II H。RNA 聚合酶 II 参与整个转录过程,直到基因出现多聚腺苷酸化信号为止。这个信号顺序的保守序列是 AAUAAA。再下游还有丰富的 GU 序列。它是原始 RNA 前身约 20 个核苷酸或更下游的核苷酸断裂的信号。这些序列称为转录终止的修饰点。

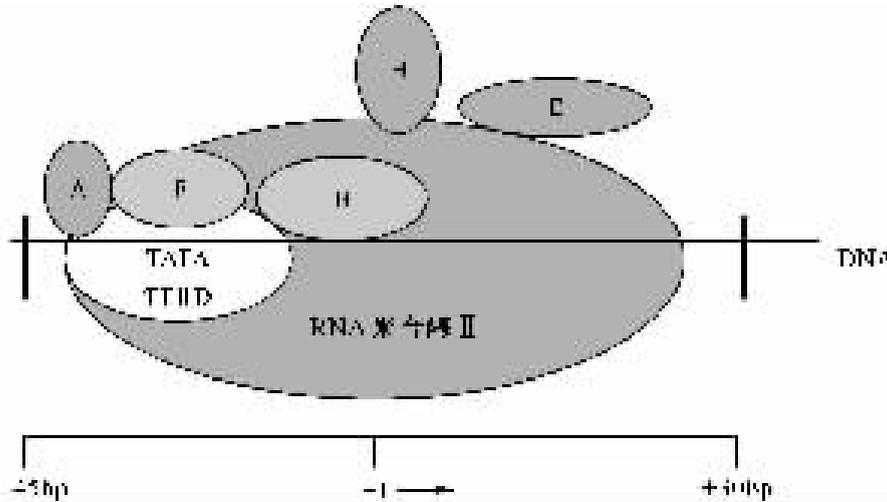


图 13-5 mRNA 转录前起始复合物

RNA 聚合酶 II 与其转录因子组成转录前起始复合物。深色的大圆表示 RNA 聚合酶 II 与 DNA 模板相结合,其他小圆表示转录因子。按其组成的结合顺序排列为: D→A→B→F→Pol→E→H (Pol 代表 RNA 聚合酶 II)。覆盖 DNA 模板大约 70 bp

表 13-2 几种 TF II 的作用

转录因子	主要作用
TF II A	对 TF II D 的结合起稳定作用
TF II B	促进 RNA 聚合酶的结合
TF II D	辨认 TATA 盒子
TF II E	ATP 酶
TF II F	解旋酶

2. rRNA 的合成

rRNA 的合成是在 RNA 聚合酶 I 的催化下进行的。rRNA 位于核内, rRNA 的合成是在特异的核仁 (nucleolus) 上进行的。rRNA 基因位于染色体的特殊区域,称核仁组织者 (nucleolar organizer)。每一个转录单位包括 28 S、5.8 S 及 18 S rRNA 的基因各 1 个。几百个转录单位串联排列在染色体上。转录单位被间隔顺序分开,间隔顺序包括 RNA 聚合酶 I 特殊结合的序列,以及转录因子 I (TF I) 结合的序列。TF I 能促进 RNA 聚合酶 I 的活性。每个重复单位都作为一个转录单位,产生一个初级转录物,该转录物包括 28 S、5.8 S 和 18 S 各一个拷贝,这样就保证了三种 RNA 等量合成。

RNA 聚合酶 I 识别位于非转录间隔区上的启动子,其序列大约位于 -40 到 +10 和 -150 到 -110。TF I 首先结合到启动子上,进而导致 RNA 聚合酶 I 识别启动子。当 RNA 聚合酶 I 达到下一个转录单位的启动子时,转录便在非转录间隔区终止。

核糖体的合成是细胞生长的限速因素。rRNA 的转录可以非常迅速, RNA 聚合酶 I 的磷酸化可以特别激活 rRNA 迅速的转录,例如,在胚胎生长及肝的再生过程中。当生长不太迅速时,仅有一些 rDNA 重复序列被用于转录。核糖体的合成减少。

3. 5 S RNA 和 tRNA 的合成

RNA 聚合酶 III 催化 5 S RNA 和 tRNA 的合成。转录因子 III(TF III)与 DNA 结合 ,导致 RNA 聚合酶 III 的激活。在转录 5 S RNA 时 ,RNA 聚合酶 III 作用的特点是与 TF III 结合的 DNA 顺序是为 5 S RNA 编码的 DNA 序列。一般认为启动子区的 DNA 没有特殊的顺序 ,并且可以被其他的顺序所替换 ,而不影响转录功能。对于 tRNA 的转录 ,转录因子结合序列的位置更倾向于基因的 5'区(图 13 - 6)。

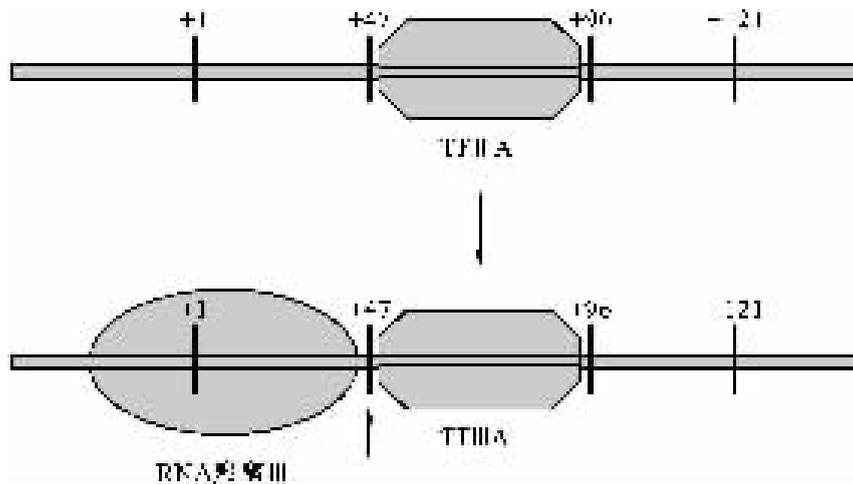


图 13 - 6 RNA 聚合酶 III 与其转录因子

转录因子 III A(TF III A)首先与 DNA 模板的特定部位相结合。然后 RNA 聚合酶 III 与因子结合 ,并启动转录。图上的数字为聚合酶及转录因子与 DNA 模板结合的核苷酸的位置

第三节 转录后核糖核酸的加工

几乎所有真核生物 RNA 转录的初级产物都需经过一系列变化后才能生成具有生物活性的 RNA 分子。这一系列变化过程称为转录后的 RNA 加工(RNA processing)。加工过程包括核苷酸部分水解、连接反应、末端核苷酸“戴帽”、“接尾” ,以及核苷的修饰。

一、信使 RNA 的加工

真核生物 mRNA 的前体是不均一核 RNA(hnRNA) ,其核苷酸顺序中约有 50% ~ 75% 不出现在成熟的 mRNA 中。此部分在转录产物的加工过程中被切除。被切除的部分称为内含子(intron)。内含子是 mRNA 前体中不编码蛋白质的核苷酸序列。未被切除的部分称外显子(exon) ,外显子是 mRNA 前体中编码蛋白质的部分。由于内含子是插入外显子之间的 ,故内含子又称插入序列(intervening sequences)。真核生物内含子的碱基序列的共同特点是开始于 GU ,结束于 AG。切除内含子的酶称剪接酶(splicing enzyme) ,一些小核核蛋白(small nuclear ribonucleoprotein ,snRNP)可能在剪接过程中起作用。剪切后的几个外显子片段拼接起来形成一个完整的 mRNA(图 13 - 7)。

真核生物 mRNA 边合成边加工 ,5'-末端加帽反应在转录开始之后在核内即进行(图 13 - 8) ,加帽是一个多步过程。转录仍在进行时 ,剪接和编辑就开始了。3'-端的多聚腺苷酸是转录后加上去的。所谓修饰包括 mRNA 分子核糖上 2'-羟基的甲基化反应和嘌呤碱的甲基化反应。修饰过程可在胞质和核内进行。近来发现 ,某些 mRNA 前体的核苷酸序列除剪接外 ,尚需加以编辑(editing) ,所谓编辑是指在转录后对 mRNA 序列中的碱基进行变换的过程(见第十五章 第三节)。mRNA 的加工过程汇集图 13 - 9。

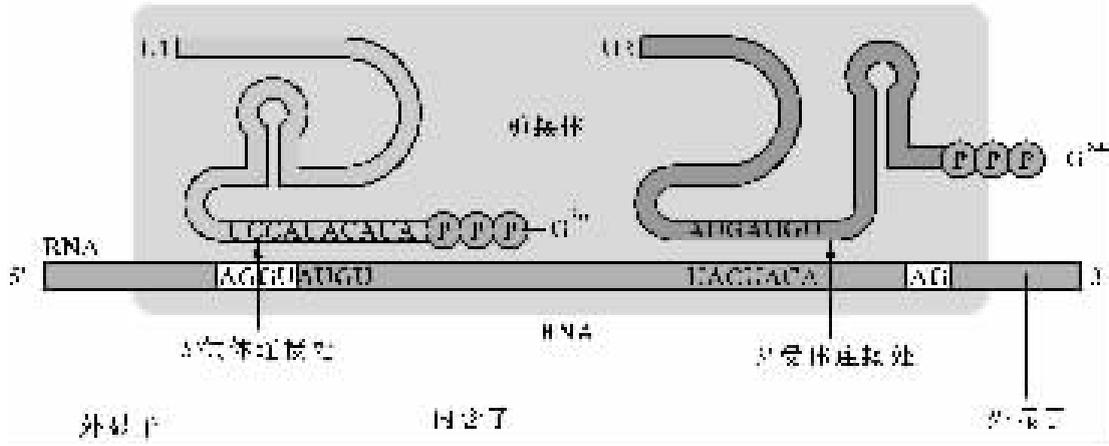


图 13-7 mRNA 的剪接机制

一些小核核蛋白 (snRNP) 与 RNA 前体形成剪接体 (spliceosome)。U1 RNA 和 U2 RNA 分别为 snRNP 的组分。U1 RNA 的核苷酸序列与 mRNA 前体内含子中的 GU 顺序 (称连接供体位点) 相对, U2 RNA 识别内含子 3' 端连接受体位点。剪接体利用 ATP 供能, 除去内含子

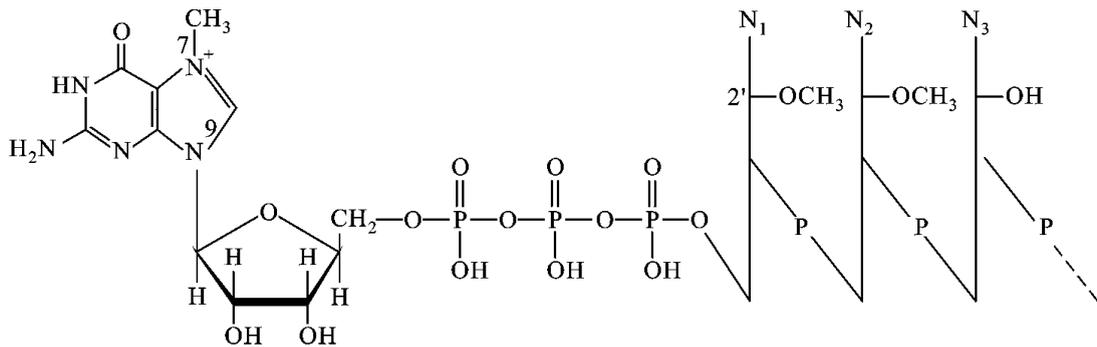


图 13-8 mRNA 帽端结构

5' 端第一个核苷酸是 7-甲基鸟嘌呤核苷三磷酸, 第二个和第三个核苷酸的核糖 2' 羟基甲基化

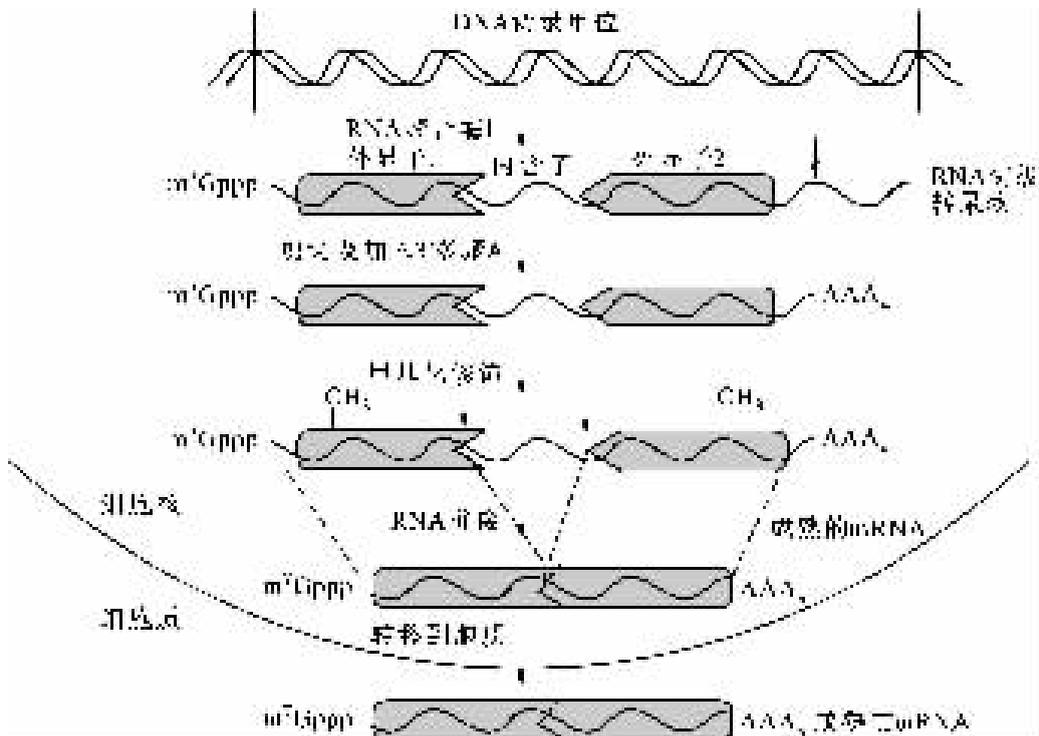


图 13-9 mRNA 的加工过程

二、核糖体 RNA 的加工

在哺乳动物细胞的核仁内,三种 rRNA 的合成过程均先形成 45 S 的共同前体。然后,该前体再断裂成相应的 rRNA。它们的关系如图 13-10。

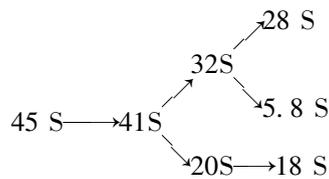


图 13-10 rRNA 前体的转换

rRNA 前体的加工是由多亚基的核蛋白复合物来完成的(图 13-11)。真核细胞的 5 S RNA 基因与其他 rRNA 基因相分开。转录后经过适当的加工,28 S、5.8 S 与相关的蛋白质一起组成核糖体的大亚基。18 S 则是小亚基的成分。rRNA 的成熟过程中也包括碱基的甲基化修饰和部分核糖的 2'-OH 甲基化反应。甲基的供体是 S-腺苷蛋氨酸。

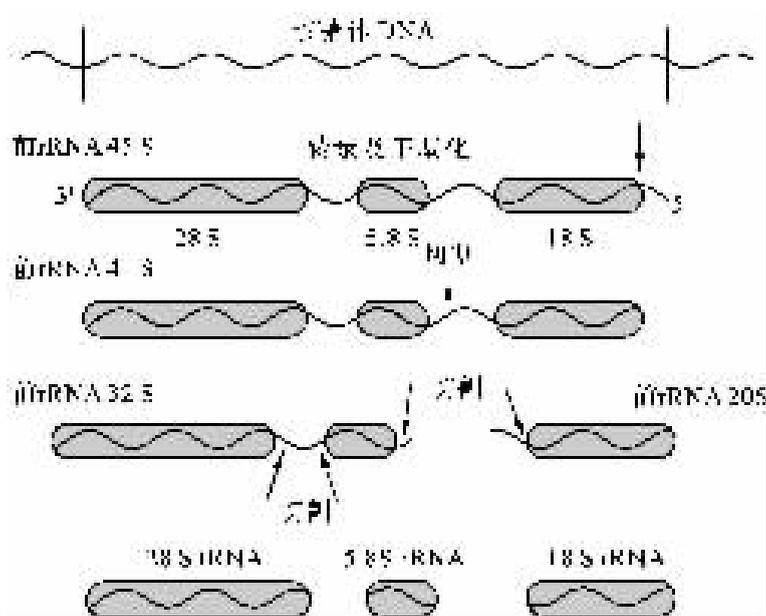


图 13-11 rRNA 的加工过程

rRNA 的初级转录物是 45 S 前 rRNA,经过一系列剪接、修饰,最后成为三种 rRNA

三、转移 RNA 的加工

tRNA 前身物通常包括一个以上 tRNA,通过核酸水解加工过程将它们分开。成熟的 tRNA 比初级转录产物核苷酸数目少。加工过程包括插入顺序的去除和相当于外显子转录产物的拼接。某些 tRNA 3'-末端的 CCA 顺序也是转录后加上去的。一些稀有碱基的修饰也在核内进行。tRNA 的加工主要包括核苷酸的剪切,加入及碱基的修饰过程(图 13-12)。

(一) 剪切

tRNA 基因的初级转录物 5' 及 3' 末端均含有多余的核苷酸。在某些情况下,这些初级转录物在 tRNA 的反密码环上也存在内含子。加工反应首先是初级转录物在非特异情况下被剪切成具有较短的 5' 和 3' 延伸的前身物。然后,核酸酶 P(一种核酶)通过内切水解去除 5' 延伸物。3' 末端被外切核酸酶水解,

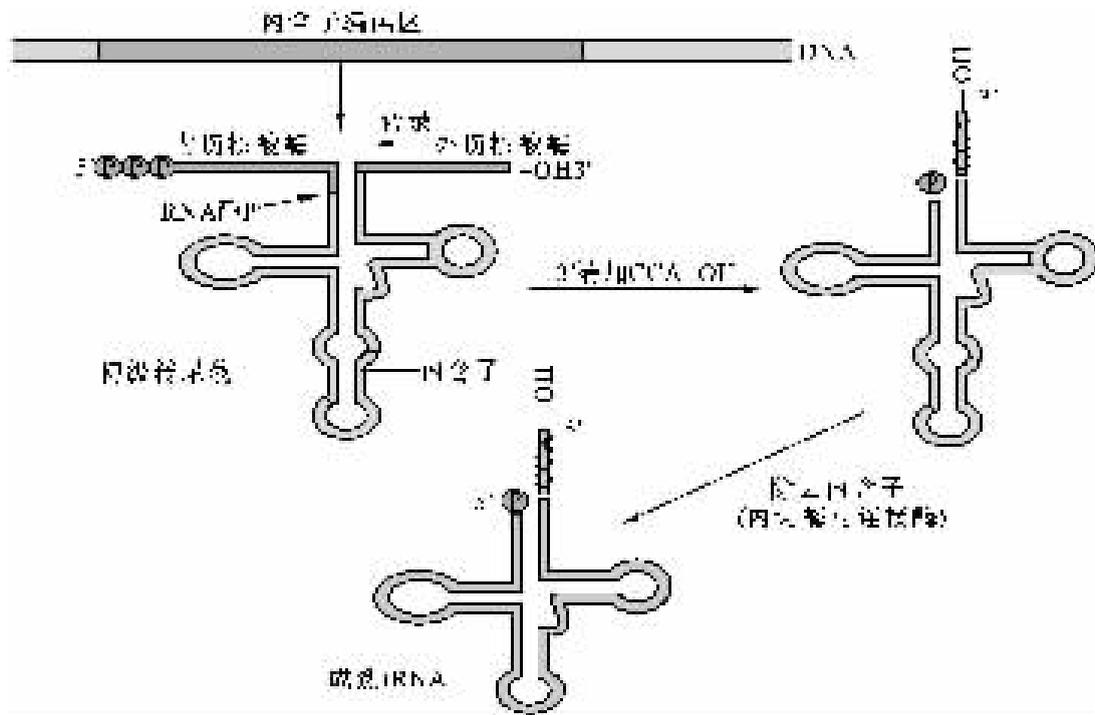


图 13-12 tRNA 的加工过程

随后 CCA 末端被合成。修饰核苷酸的合成可发生在核酸剪切的任何时候。内含子的除去受前体二级结构的指令,有两个可溶性的酶复合物参与,一个酶除去内含子,另一个酶封闭核苷酸链。

(二) 填补

每一个有功能的 tRNA 的末端都具有 CCA 顺序。此顺序对于 tRNA 接受氨基酸是必须的。在大多数情况下,此顺序是由 tRNA 核苷酸转移酶催化加上的。核苷酸转移酶利用 ATP 和 CTP 作底物,以 2C/1A 的比例掺入到 tRNA 上。在胞质及线粒体 tRNA 中都发现有 CCA 末端。

(三) 核苷酸的修饰

所有核酸中, tRNA 分子是高度甲基化的。大约有 60 多种碱基及核糖被修饰,需要 100 多种不同的酶促反应。许多反应是简单的一步甲基化反应,另一些是多步反应,如假尿嘧啶的修饰。大多数修饰酶是位点或核苷酸顺序特异性的,并在 tRNA 前身物裂解为成熟的 tRNA 之前完成。

第四节 原核生物的转录

一、原核生物 RNA 聚合酶

原核生物 RNA 聚合酶也是大的多亚基酶。从大肠杆菌提取的 RNA 聚合酶有五个亚基组成,相对分子质量为 500 000。两个 α 亚基、一个 β 亚基 和一个 β' 亚基组成核心酶(core enzyme),核心酶($\alpha_2\beta\beta'$)能进行转录,但是没有 RNA 合成的特异性。第 5 个蛋白质亚基称 σ 因子,这五种亚基构成全酶(holoenzyme),在体内及体外只有全酶($\alpha_2\beta\beta'\sigma$)才能特异的合成 RNA。 σ 因子参与识别特异的启动子。原核生物 RNA 聚合酶能被利福平(rifampicin)所抑制。利福平与 β 亚基相结合,从而抑制酶的活性。

二、原核生物的转录过程

原核生物的转录是以 RNA 聚合酶结合到基因的启动子上开始的。原核生物启动子区包括两个高度保守的序列。一个序列位于转录起始点的上游约 10 bp,保守序列(或称一致性序列, consensus

sequence) 为 T* A* TAAT* ,此保守序列有时称-10 序列或-10 区。此区由 D. Pribnow 首先发现 ,所以也称 Pribnow 盒(Pribnow box)。第二个序列是位于-10 上游的-35 序列,为 T* T* G* ACA。这两个序列中右上角有“*”的核苷酸是最保守的。在-35 区到-10 区之间的 17 个核苷酸也是高度保守的(图 13-13 ,图 13-14)。TATAAT 和 TTGACA 顺序是不对称的,即它们没有互补顺序被阅读,为此启动子顺序本身决定了转录仅仅向一个方向进行。原核生物的转录过程同真核生物类似,也包括三个阶段。

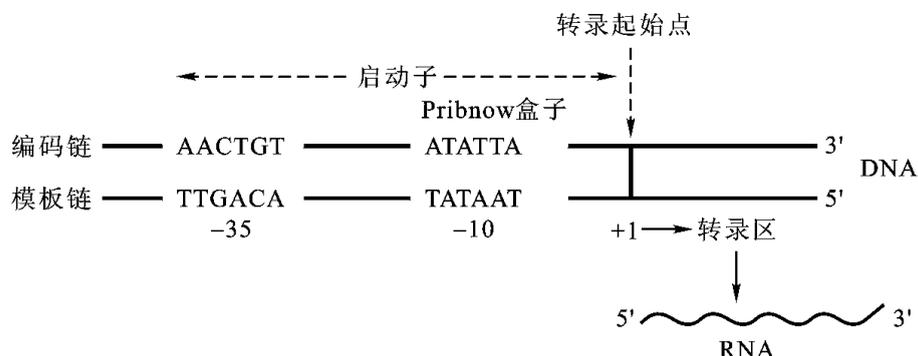


图 13-13 细菌转录的启动子

操纵子	序列	-35区 (Pribnow 盒)	-10区 (-10)	起始点 (+1)
<i>lac</i>	ACCCGAGCCTTTACAATTTAATGGTTCCGCCTCCTATGTTCTCTGGAAATGTT	ACCCGAGCCTTTACAAT	TTAATGGTTCCGCCTCCTATGTT	CTCTGGAAATGTT
<i>lac</i>	CCATCCAAATGGGTGTAATAACCTTTTCGCGGATGCGAATGATAGCGCTCCGAAAC	CCATCCAAATGGGTGTAATA	ACCTTTTCGCGGATGCGAATGATAGCGCTCCGAAAC	CGCGCTCCGAAAC
<i>galP</i>	ATTTATTCGCAATGTCACACCTTTTCGGCATCTTTGTTATGCTATCGTTATTTCA	ATTTATTCGCAATGTCACAC	CTTTGTTATGCTATCGTTATTTCA	CGTTATTTCA
<i>araB</i>	GGATCCTACCCTGAAGCTTTTTATCAGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCC	GGATCCTACCCTGAAGCT	TTTTATCAGCAACTCTCTACTGTT	TCTCCATACCC
<i>groA</i>	GCCGTAATTATAAGTACTTTTGTACGGCTTTTCTTTCATGGCTTGTGTCC	GCCGTAATTATAAGTACT	TTTTGTACGGCTTTTCTTTCATGGCTTGTGTCC	GTGTCC
<i>trp</i>	AAATCAGCTGTGTGAGAAATTAATCATCGAAGTACTTAAGTAGTACGGCAAGTT	AAATCAGCTGTGTGAGAA	ATTAATCATCGAAGTACTTAAGTAGTACGGCAAGTT	CGGCAAGTT
<i>hcr</i>	TTCGAAAACGTTTCTTTGTTGTTAACTCGTTTGAAGCTTGTAAACCTAAA	TTCGAAAACGTTTCTTTGTTGTTAA	ACTCGTTTGAAGCTTGTAAACCTAAA	AAACCTAAA
<i>hcr</i>	CATATTCGACTTGTAAAACCAATTTGAAAAGATTTAGGTTTACAACTCTACA	CATATTCGACTTGTAAAACCAAT	TTGAAAAGATTTAGGTTTACAACTCTACA	CACTCTACA
<i>rRNA^T</i>	CAACCTAACACTTTACAAGCCGCGCCATCATTTGATATGATGCCCCCGCTTC	CAACCTAACACTTTACAAGCCGCGCC	ATCATTTGATATGATGCCCCCGCTTC	CGCTTC
<i>trpE</i>	CAAAAAAATACCTTTGGCAAAAAAATTTGGATTCCTTATAATGCCCTCCCTTC	CAAAAAAATACCTTTGGCAAAAAA	ATTTGGATTCCTTATAATGCCCTCCCTTC	CTCCCTTC
<i>trpE</i>	CAATTTTTCTATTCGCGCCCTGGGGACAACCTCGCTATTAATGCCCTCCCTTC	CAATTTTTCTATTCGCGCCCTGGGGACAAC	CTCGCTATTAATGCCCTCCCTTC	CTCCCTTC
<i>trpE</i>	AAAAATAAATGCTTCACTCTCTAGCCGGGAAAGCCCTATTATGCACACCCCGCG	AAAAATAAATGCTTCACTCTCTAGCCGGGAAAGCC	CTATTATGCACACCCCGCG	CGCG

-35区	-10区
T T G A C A	T A T A A T
69 79 61 55 54 54	77 76 69 61 56 52

图 13-14 原核生物启动子区同源序列

(一) 合成的开始

RNA 的转录通常以嘌呤核苷三磷酸开始,即开始于 pppG 或 pppA。转录起始的位置随启动子的不同而有些区别,但一般是在从 Pribnow 盒子 T 下游 5~8bp 开始的。RNA 转录的起始合成需要两个步骤。第一步, RNA 聚合酶全酶相对弱地结合到 DNA 启动子上,形成一个闭合的复合物。第二步,全酶形成更紧密的开环复合物,其特征是 DNA 双螺旋局部解开大约 10 bp。因为 Pribnow 盒子是富含 AT 的,它有利于这种局部的解旋。解链的 DNA 与起始的三磷酸嘌呤核苷酸及 RNA 聚合酶结合,然后形成第一个磷酸二酯键。此酶移动到另一个位置并继续合成。一旦起始的核苷酸链形成一小段后,σ 因子便从全酶释放出来,核心酶进入延长阶段继续发挥其催化作用。另外一个 RNA 聚合酶分子可以识别并结合到启动子上,开始新一轮转录。这样,一个基因可以被同时转录许多次(图 13-15)。

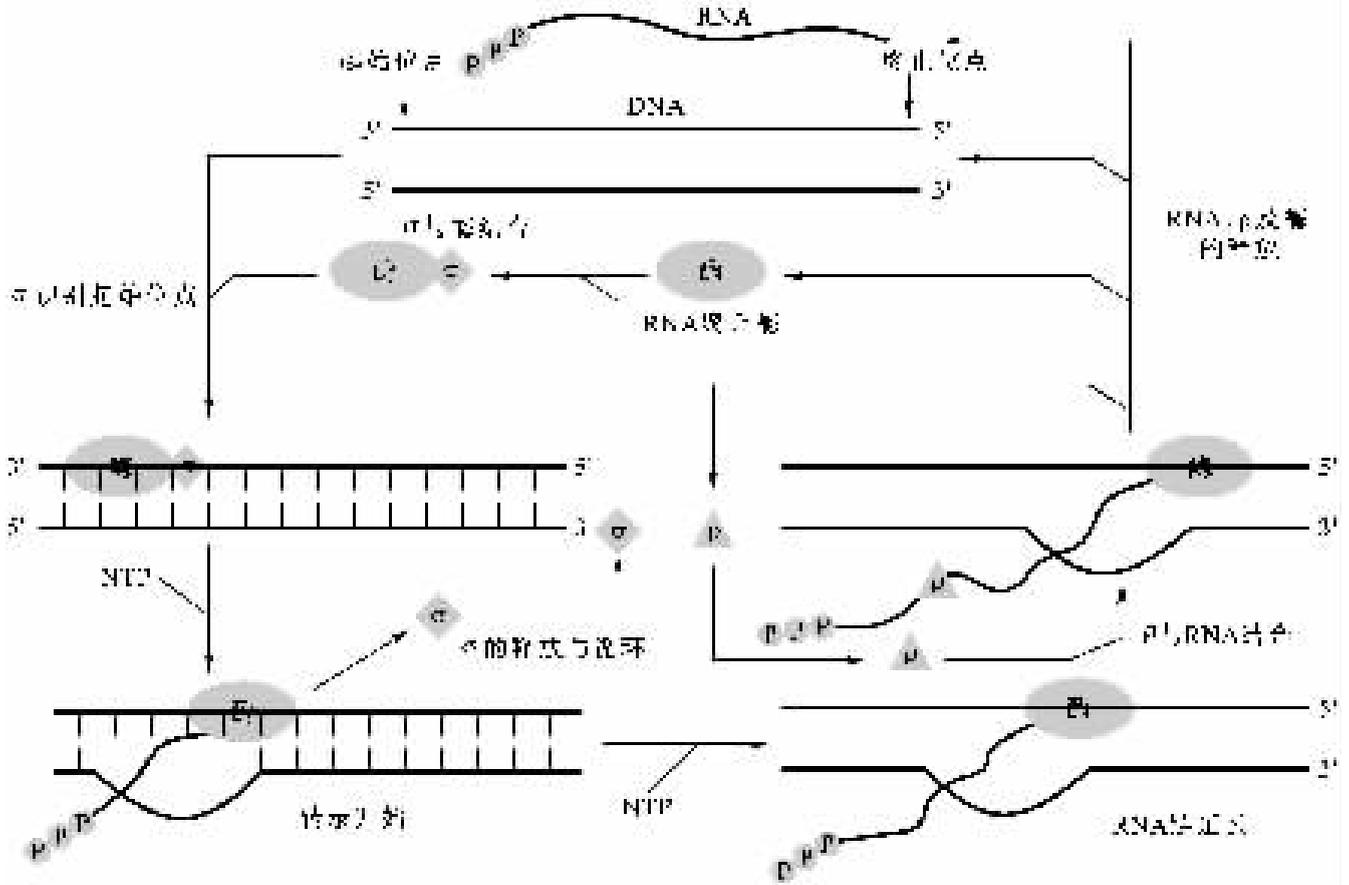


图 13-15 原核 RNA 的转录过程

圆圈表示 RNA 聚合酶的核心酶部分 ($\alpha_2\beta\beta'$)。 σ 因子参与识别特异的启动子,它与核心酶一起结合到 DNA 模板的起始位置上。以 NTP 为原料,全酶催化 RNA 合成。当 RNA 链延长到大约 10 核苷酸时, σ 因子从全酶上脱离,参与另外一次循环。核心酶沿着 DNA 模板移动,继续延长 RNA 链。当 RNA 聚合酶遇到了终止信号不能再继续前进,便在 ρ 因子作用下与模板链脱离, RNA 合成终止。核心酶参与另外一次循环

(二) 合成的延长阶段

RNA 聚合酶连续的合成新的磷酸二酯键,平均每秒钟合成 40 个核苷酸。RNA 聚合酶沿着 DNA 前进,它不断地分开 DNA 模板双链。在这一过程中, DNA 的模板的碱基与正在延长的 RNA 链碱基配对。解旋过程及 DNA 双螺旋的恢复借助于拓扑异构酶的作用,它们是转录复合物的成分。

(三) 合成的终止

根据是否依赖于 ρ (rho) 蛋白因子,转录的终止方法有两种模式,即终止分为 ρ 因子依赖性及 ρ 因子不依赖性两类。 ρ 因子不依赖性终止的特征是有一个保守序列, G-C 丰富的发夹序列参与,并在 RNA 链的最后有 6~7U 残基序列。这样,在多聚 U 之前形成一个茎-环结构,这种茎和环的二级结构对终止是关键。G-C 丰富区对稳定终止子结构是有效的(图 13-16)。 ρ 因子是 6 聚体的蛋白质,有 RNA-依赖的 ATP 酶的活性。 ρ 因子依赖性终止点顺序特征是在转录的相关的非结构部分有规律的 C 残基间隔。初级转录物围绕着 ρ 因子,经 ATP 酶水解使转录物从模板上释放下来(图 13-17)

(四) 转录后的加工

原核生物转录与翻译过程是偶联的。即 mRNA 在转录过程中即进行翻译。原核生物 mRNA 初级转录物没有内含子,故没有剪接过程。核糖体 RNA 转录时即刻被剪切成 23 S 及 16 S rRNA(图 13-18)。tRNA 也进行一些剪接及修饰。

三、RNA 的复制

有些病毒或噬菌体的基因组是由 RNA 而不是由 DNA 组成的。病毒进入宿主细胞后,还可以进行复

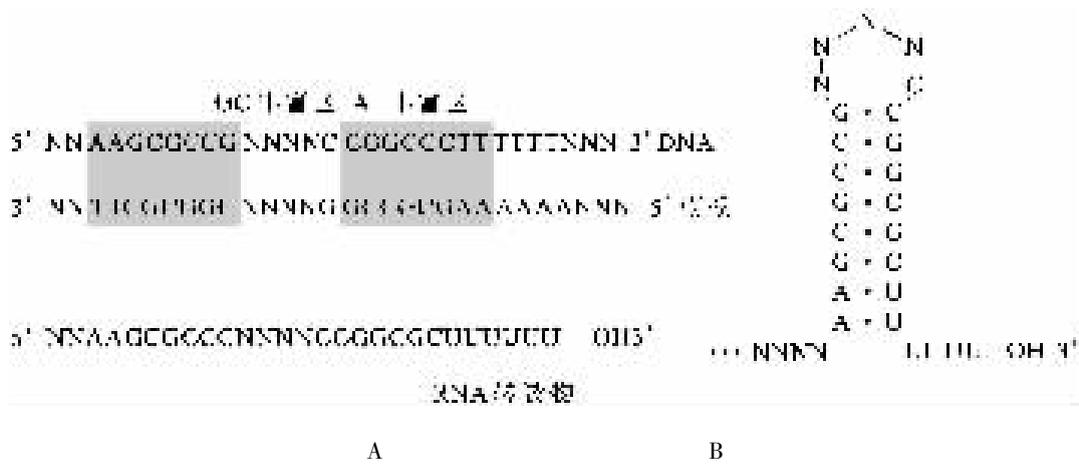


图 13-16 RNA 转录的终止(不依赖于 ρ 因子)

- A. DNA 模板有特殊的序列,富含 GC 和 AT 区,反转重复顺序(阴影所示);
- B. A 图的 RNA 转录物可形成茎-环结构

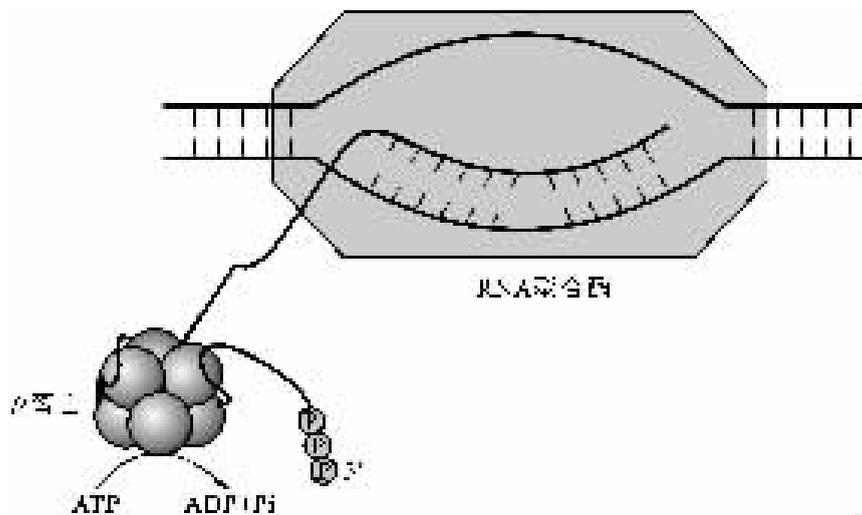


图 13-17 转录终止 ρ 因子的作用

ρ 因子是由 6 个亚基组成的蛋白质,它具有 ATP 酶的活性,能将 RNA-DNA 杂交双链解开,使 RNA 脱离模板,从而终止 RNA 转录

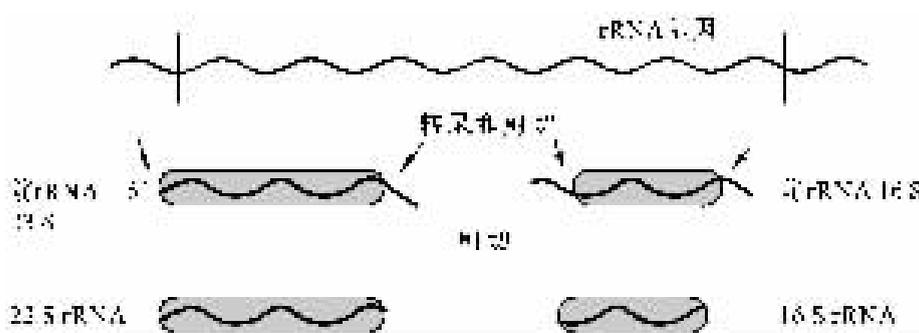


图 13-18 原核生物 rRNA 的加工过程

制生成 RNA。催化此种 RNA 复制的酶为 RNA 复制酶,是一种 RNA 指导的 RNA 聚合酶(RNA directed RNA polymerase)。

RNA 复制酶催化的合成反应是以 RNA 为模板,由 5'→3'方向进行 RNA 链的合成。反应机制与 DNA 作模板合成 RNA 反应相似。RNA 复制酶仅对特异的病毒 RNA 起作用,对宿主细胞的 RNA 一般不进行复制。因此,当病毒侵入宿主细胞后,病毒的 RNA 能大量复制。

Summary

In the nuclei of eukaryotic cells, RNA polymerase I, II, and III synthesize rRNA precursors, hnRNA, tRNA and 5S RNA respectively. Many RNA polymerase II promoters contain a conserved TATAATA sequence, the TATA box, located around position -25bp. RNA polymerase III promoters are located within the transcribed regions of their genes between positions of +40 and +80.

Eukaryotic mRNA have an enzymatically appended 5' cap and, in most cases, an enzymatically generated poly(A) tail. Moreover, the introns of eukaryotic mRNA primary transcripts (hnRNA) are precisely excised and their flanking exons are spliced together to form mature mRNA in an snRNP mediated process that takes place in splicosomes. Certain mRNAs are subject to RNA editing.

The eukaryotic 18S, 5.8S and 28S rRNA are similarly transcribed as a 45S precursor which is excised and modified to form the mature rRNAs.

Eukaryotic tRNA transcripts also require the excision of a short intron and enzymatic addition of a 3'-terminal -CCA to form the mature tRNA.

The holoenzyme of *E. coli* RNA polymerase has the subunit structure $\alpha_2\beta\beta'$ and σ . It initiates transcription on the antisense strand of a gene at a position designated by its promoter. The most conserved region of the promoter is centered at about the -10 position and has the consensus sequence TATAAT. The -35 region is also conserved in efficient promoters. The holoenzyme form an "open" initiation complex with the promoter. After the initiation of RNA synthesis, the σ subunit dissociates from the core enzyme, which then autonomously catalyzes chain elongation in the 5'-3' direction. RNA synthesis is terminated by a segment of the transcript which forms a G+C-rich hairpin followed by an oligo(U) tail that spontaneously dissociates from the DNA. Termination sites lacking these sequences require the assistance of rho factor for proper chain termination.

Prokaryotic mRNA transcripts require no additional processing. The primary transcript of *E. Coli* rRNA contains all three rRNAs together with some tRNAs. These are excised and trimmed by specific endonucleases and exonucleases. The rRNAs are also modified by the methylation of specific nucleosides. Prokaryotic tRNA are excised from their primary transcripts and trimmed in much the same manner as rRNAs.

思考题

1. 什么是转录？转录与复制有何异同？
2. 真核生物 RNA 聚合酶有几种？各起什么作用？
3. 试述真核 mRNA 的合成过程。
4. 何为启动子？在转录中有何作用？
5. 何为转录因子？真核有几种转录因子？它们各起什么作用？
6. 何为内含子及外显子？
7. 何为 RNA 的加工？RNA 的加工大体有几种方式？
8. 大肠杆菌 RNA 聚合酶的组成包括哪些部分？

第十四章 蛋白质的生物合成

本章教学要求

- 生物合成蛋白质的物质,遗传密码的特点
- 起始复合物的形成,核糖体循环的概念、过程,肽链合成的终止
- 翻译后加工的概念,一级结构的修饰、糖链的添加和高级结构的形成,蛋白质的靶向转运的两条支路
- 蛋白质的生物合成与医学的关系

贮存在 DNA 的结构基因中的遗传信息经转录生成 mRNA,它是蛋白质合成的模板。在蛋白质的生物合成过程中,将 mRNA 的 A、G、C、U 四种符号组成的遗传信息转换成蛋白质分子中的 20 种氨基酸的排列顺序。由于在 mRNA 中的核苷酸排列顺序和蛋白质中的氨基酸排列顺序是两种不同的分子语言,所以将蛋白质的生物合成称为翻译(translation)。

第一节 蛋白质生物合成的基本条件

合成蛋白质的原料是氨基酸。在蛋白质的合成过程中,rRNA 和蛋白质组成的核糖体是生产蛋白质的工厂。与粗面内质网结合的核糖体称为膜结合核糖体,胞质内的核糖体称为游离核糖体。胞质内、线粒体内、核内和过氧化物体内的蛋白质是在游离核糖体合成的;质膜、内质网膜、高尔基体膜、溶酶体的蛋白质和分泌蛋白在膜结合核糖体合成。

mRNA 本身对氨基酸并没有亲和性,因此在蛋白质的生物合成过程中,需要一种转换器分子(adaptor molecule),它既能识别特异核苷酸序列又能识别特异氨基酸。tRNA 作为转换器分子能帮助将 mRNA 上的核酸语言翻译成蛋白质语言。

蛋白质的生物合成可分为三个阶段:起始阶段、延长阶段和终止阶段。每个阶段都有一些蛋白因子参加。蛋白质合成遵循氨基端向羧基端的方向进行反应的原则。

一、mRNA 是蛋白质合成的模板

mRNA 含有从 DNA 转录出来的遗传信息,是蛋白质合成的模板。mRNA 种类多,大小不一、半衰期短,在细胞中占有所有 RNA 的 1% ~ 2%,是生命活动中活跃的大分子。在原核生物中,基因、从基因转录的 mRNA 和产物蛋白质之间存在线性关系,一段 mRNA 往往编码几种功能相关的蛋白质(见十六章 基因表达调控),称为多顺反子(polycistron)。在真核生物中,基因转录产物经加工生成 mRNA,一个 mRNA 往往只编码一个蛋白质(单顺反子,monocistron)。

mRNA 包括 5'-非翻译区(5'-untranslated region,5'-UTR)、开放阅读框架区(open reading frame,ORF)和 3'-非翻译区(3'-untranslated region,3'-UTR)。真核生物 mRNA 的 5'端有一帽子结构,3'端有一段长短不一的 polyA 尾(见第一章 核酸)。在阅读框架内,每 3 个核苷酸组成三联体遗传密码来解读蛋白质中 20 种氨基酸(表 14-1),三联体遗传密码也称为遗传密码子(genetic codon)。由于 mRNA 上有 4 种核苷酸,密码子含 3 个核苷酸,4 种核苷酸则可构建 $64(4^3)$ 个密码子。三联体遗传密码如果不能编码某一

特定的氨基酸,则称为无意义密码子(nonsense codon)。细胞中有三个无意义密码子被用作终止密码,其余 61 个密码子编码 20 种氨基酸。

表 14-1 遗传密码表

第一碱基 (5'末端)	第二碱基				第三碱基 (3'末端)
	U	C	A	G	
U	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	U
	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
	亮氨酸	丝氨酸	终止	* 终止	A
	亮氨酸	丝氨酸	终止	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	U
	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	U
	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	A
	* 蛋氨酸	苏氨酸	赖氨酸	精氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	U
	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

* AUG 如位于起始部位还代表起始密码子,UGA 除代表终止信号外还代表硒代半胱氨酸

遗传密码具有以下特点:

(1) 通用性(universality) 从原核生物、真核生物到人类都使用同一套遗传密码。但近期的研究发现,动物的线粒体和植物的叶绿体的 DNA 有自己的复制和密码系统,与通用密码子有相当的差别。如在线粒体内,除 AUG 外,AUA 和 AUU 也可作起始密码子(initiation codon),其中 AUA 还可被译读为 Met(在通用密码中为 Ile)。UGA 被译读为 Trp。此外,在线粒体中 AGA 和 AGG 被译读为终止密码子而不译为 Arg。尽管如此,直到现在遗传密码仍被认为具有通用性。

(2) 方向性(directionality) mRNA 密码子的排列具有方向性,即起始密码子总是位于开放阅读框架的 5'末端,终止密码子位于 3'末端,每个密码子的三个核苷酸也是 5'→3'方向阅读。这种方向性决定了翻译过程从 5'→3'方向译读密码。

(3) 连续性(commaleness) 三联体密码是连续的,中间无标点。mRNA 上插入或缺失一个或两个碱基可引起移码(frame shift)变异,使下游翻译出的氨基酸顺序完全改变。

(4) 简并性(degeneracy) 已知 61 个密码子编码 20 种氨基酸,在遗传密码中一定存在简并性,即有多个密码子特异地破译同一个氨基酸。因此,某一特异的密码子仅有一种特异的氨基酸掺入,但一氨基酸可能有一个以上密码子可与之对应。遗传密码虽有简并性,但是每一氨基酸密码的使用频率,在种族间和同一个体的不同组织间有明显的差别。

(5) 摆动性(wobble) 翻译过程中,氨基酸的正确加入,要靠 mRNA 上的密码子与 tRNA 上的反密码子相互辨认。密码子与反密码子配对,有时会出现不遵从碱基配对规律的情况,这一现象称为遗传密码的摆动,常见于密码子的第三位碱基对反密码子的第一位碱基,二者虽不严格互补,也能相互辨认。tRNA 分子组成的特点是有较多的稀有碱基,其中次黄嘌呤(inosine, I)常出现于反密码子的第一位,也是常见的

摆动现象。摆动使密码子-反密码子的相互识别具有灵活性。

mRNA 的 5'帽区和 3' poly A 尾参与翻译起始复合物的形成(见后)。

二、氨基酸与 tRNA

转换器分子 tRNA 是蛋白质生物合成过程中氨基酸的转运工具。在细菌中有 30 或 40 种不同的 tRNA 分子,而在真核生物中有 50 种 tRNA,但 mRNA 上却有 61 种编码氨基酸的密码子,这种结构特点也决定了密码子与反密码子的摆动现象。tRNA 分子 3'末端的 CCA 序列是氨基酸结合部位。每一种特异的 tRNA 只能转载特异的氨基酸。由于核酸对氨基酸没有识别能力,必须通过能识别二者的蛋白质——氨基酰-tRNA 合成酶,才能使 tRNA 和氨基酸相互识别。第一章已介绍了 tRNA 的空间结构。tRNA 中的 T ψ C 臂参与将氨基酰-tRNA 结合至蛋白质合成部位——核糖体的表面,D 臂是特异的氨基酰-tRNA 合成酶识别相应 tRNA 的重要部位之一。

三、核糖体 RNA

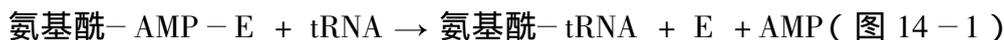
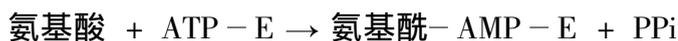
核糖核蛋白体 RNA(ribosomal RNA, rRNA)简称核糖体 RNA 或核蛋白体 RNA,是细胞内含量最多的 RNA,约占 RNA 总量的 80% 以上。rRNA 与核糖体蛋白共同形成核糖体。每个核糖体均由大、小两个亚基组成。原核生物大亚基的沉降系数为 50 S,它包括 23 S rRNA、5 S rRNA 和 34 种核糖体蛋白;小亚基的沉降系数为 30 S,它包括 16 S rRNA 和 21 种核糖体蛋白。真核生物大亚基的沉降系数为 60 S,它包括 28 S rRNA、5.8 S rRNA、5 S rRNA 和 50 种核糖体蛋白;小亚基的沉降系数为 40 S,它包括 18 S rRNA 和 33 种核糖体蛋白。

在 rRNA 分子中,碱基配对形成一个核糖体内部的脚手架,蛋白质可附着在上面。核糖体在蛋白质合成中有两个主要作用:①核糖体通过将 mRNA、氨基酰-tRNA 和相关的蛋白因子放置在正确的位置来调节蛋白质的合成;②核糖体的成分可催化翻译过程的一部分化学反应。

四、参与蛋白质合成的酶类

(一) 氨基酰-tRNA 合成酶

氨基酰-tRNA 合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase)催化 tRNA 的 3'-末端 CCA-OH 与氨基酸形成酯键生成氨基酰-tRNA。酶对氨基酸和 tRNA 都具高度特异性。反应需要 Mg^{2+} ,并分两步进行:



细胞内的 tRNA 的种类多于 20 种,故一种氨基酸可由几种 tRNA 装载。装载同一氨基酸的所有 tRNA 被称为同工接受体(isoacceptor)。与同义密码子结合的所有同工接受体均被相同的氨基酰-tRNA 合成酶所活化。因此只需 20 种氨基酰-tRNA 合成酶就能催化氨基酸以酯键连接到各自特异的 tRNA 分子上。由于氨基酰-tRNA 合成酶还有编辑活性(editing activity),即酯酶的活性。它能把错配的氨基酸水解下来,换上与反密码子相对应的氨基酸。综上所述原因,rRNA 和氨基酸装载反应的误差小于 10^{-4} 。

(二) 肽酰转移酶

在原核生物中,肽酰转移酶(peptidyl transferase)是大亚基的 23 S rRNA 的成分;在真核生物中,该酶是大亚基 28 S rRNA 的成分。它们均是核酶。

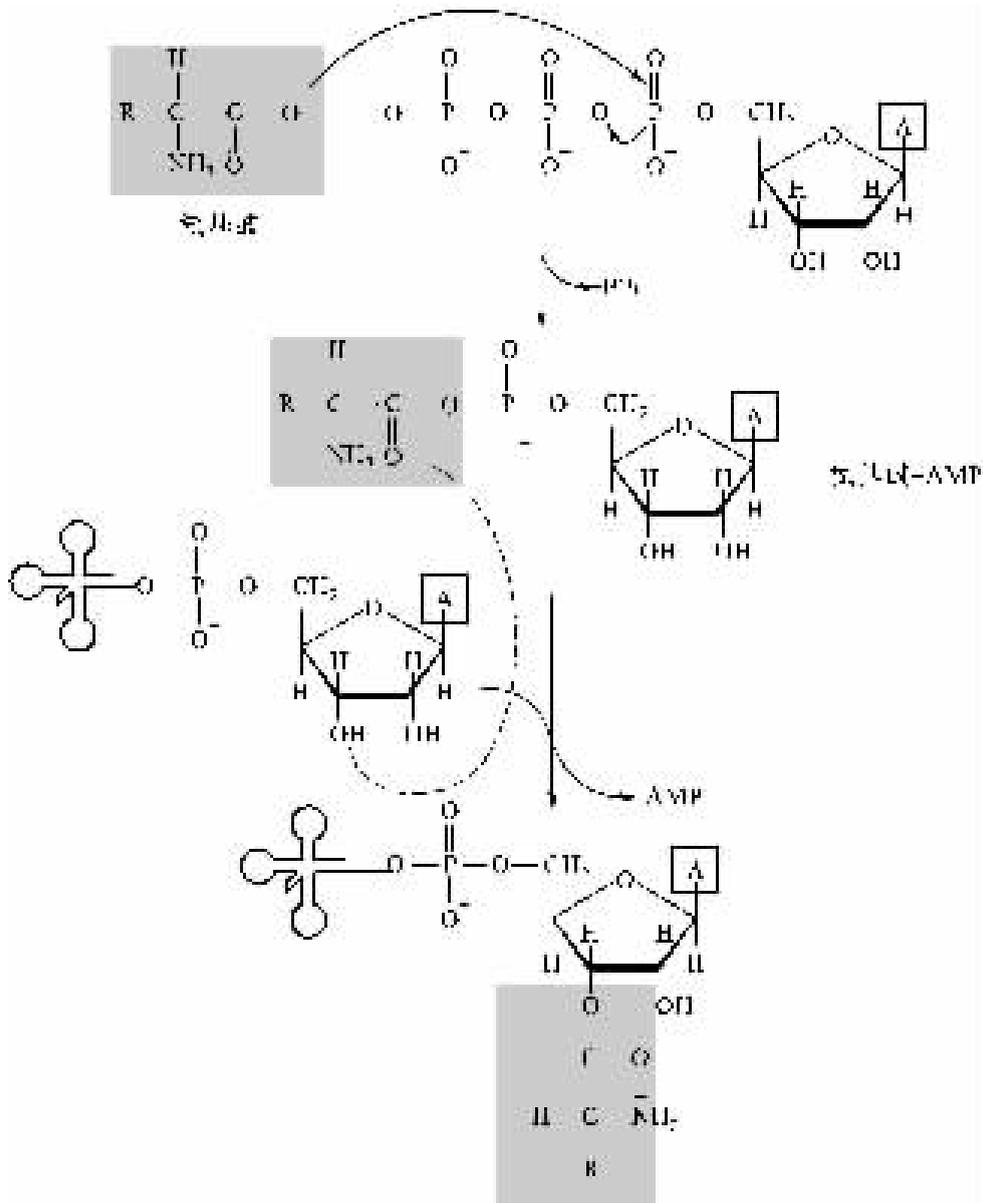


图 14-1 氨基酰-tRNA 的合成

第二节 蛋白质生物合成的过程

在翻译过程中,核糖体从开放阅读框的 5'-AUG 向 3' 阅读 mRNA 上的三联体遗传密码,而蛋白质是从 N 端向 C 端合成,直至终止密码。原核生物的起始 tRNA 是结合甲酰蛋氨酸的 tRNA ($tRNA_f^{met}$),而真核生物的起始 tRNA 是结合蛋氨酸的 tRNA ($tRNA^{Met}$)。真核生物 mRNA 的 5' 端可能有多个 AUG 三联体密码,但真正的翻译起始密码位于一段短的通用序列 CCRCCAUGG 中,R 是嘌呤碱(A 或 G),该序列称为 Kozak 共有序列(Kozak consensus sequences)。翻译过程和转录一样,也可分为起始(initiation)、延长(elongation)和终止(termination)三个阶段。伴随着起始和延长,不断地进行着氨基酰-tRNA 的合成。

一、翻译的起始阶段

在翻译起始阶段,甚至在翻译起始前,必须完成两项工作:1. 合成氨基酰-tRNA 2. 将核糖体解离成大、小两个亚基。当核糖体解聚后,在小亚基上形成包括 mRNA、氨基酰-tRNA 和起始因子所组成的起始复合物。

(一) 起始因子

起始因子(initiation factor ,IF)参与起始复合物的形成。

原核生物中有三种起始因子(IF) :IF - 1 ,IF - 2 和 IF - 3。为了区别原核生物的翻译起始因子 ,真核生物的起始因子被称作 eIF(eukaryotic initiation factor) ,eIF 多于原核生物的起始因子。起始复合物的形成涉及多个步骤 ,在同一步骤起作用的因子用同一个数字编号。真核生物的起始因子包括 eIF - 1 , - 2 , - 3 , - 4 , - 5 和 - 6。原核生物及真核生物的起始因子及其功能见表 14 - 2。

表 14 - 2 翻译的起始因子

原核起始因子	功能
IF - 1	防止 tRNA 过早地结合到 A 位
IF - 2	促进 fMet - tRNA ^{Met} 结合到 30 S 小亚基
IF - 3	结合 30 S 小亚基 防止它过早地与 50 S 大亚基结合 ,并提高 P 位对 fMet - tRNA ^{Met} 的特异性
真核起始因子	功能
eIF - 1	多功能因子 ,参与多个翻译步骤
eIF - 2	促进起始 Met - tRNA ^{Met} 与核糖体 40 S 小亚基结合
eIF - 2B	又称鸟苷酸交换因子 将 eIF - 2 上的 GDP 交换成 GTP
eIF - 3	首先与 40 S 小亚基结合的因子 ,并能加速后续步骤
eIF - 4A	具有 RNA 解旋酶的活性 ,能解除 mRNA 5' 端的发夹结构 ,使其与 40 S 小亚基结合。是 eIF4F 的组成成分
eIF - 4B	与 mRNA 结合 ,对 mRNA 进行扫描并定位第一个 AUG
eIF - 4E	结合 mRNA 的帽子结构 ,是 eIF4F 的组成成分
eIF - 4G	一种接头蛋白 ,能与 eIF4E、eIF - 3 和 poly A 结合蛋白(Pab - 1p)结合将 40 S 的小亚基富集至 mRNA ,进而刺激翻译。是 eIF4F 的组成成分
eIF - 5	促进上述起始因子从 40 S 小亚基脱落 ,以便 40 S 小亚基与 60 S 大亚基结合形成 80 S 起始复合物
eIF - 6	促进无活性的 80 S 核糖体解聚生成 40 S 小亚基和 60 S 大亚基

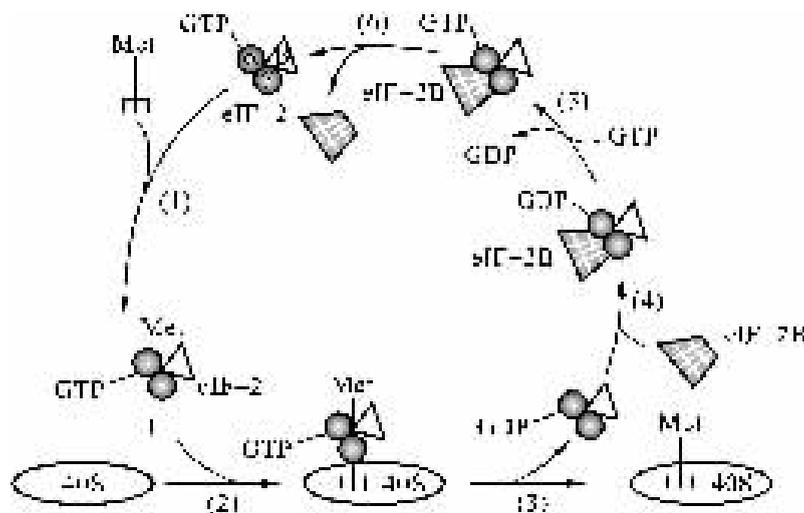


图 14 - 2 转换因子 eIF - 2B 的功能

(二) 翻译的起始过程

翻译的起始过程是形成翻译起始复合物的阶段 ,即在起始因子的作用下 ,将起始 - tRNA 和 mRNA 结合到核糖体上的步骤。

1. 原核生物的翻译起始过程

原核生物的翻译起始过程是在一系列起始因子的参与下完成的(图 14 - 3):

(1) 核糖体亚基的分离 翻译过程是在核糖体上进行的 ,在翻译延长过程中 ,核糖体的大、小亚基是聚合的 ,翻译终止实际上是下一轮翻译的开始。此时 ,在 IF - 1 的作用下 70 S 的核糖体解聚生成 50 S 和

30 S 的大、小亚基。

(2) mRNA 在核糖体小亚基上就位

J. Shine和 L. Dalgarno 发现 :在原核生物的 mRNA 翻译起始密码子的上游大约 8 个 ~ 13 个核苷酸处 ,几乎都有 AGGAGGU 序列(SD 序列) ,它与原核生物 16 S rRNA 的 3'-末端的序列 3'-HO-AUCCUCCAC5'互补。因此 ,mRNA 的 SD 序列又称核糖体结合位点(ribosomal binding site ,RBS)。紧接 AGGA 的小段又可以被核糖体小亚基蛋白辨认结合。原核生物就是靠这种核酸-核酸、核酸-蛋白质的相互辨认把 mRNA 结合到核糖体的小亚基上 ,此过程需要 IF-3 的帮助。与此同时在 IF-2 的帮助下 ,fMet-tRNA 与 mRNA 的起始密码子结合。此时 30 S 的起始复合物已合成完毕。

(3) IF-2 从复合物解离的同时发生 GTP 的水解和大亚基的结合 ,反应产物是 70 S 起始复合物。该复合物为延长作好了准备。

2. 真核生物的翻译起始过程

绝大多数真核 mRNA 内部没有核糖体结合位点。在一般情况下 ,翻译前起始复合物首先结合在 mRNA 的 5'-末端 ,然后沿着序列进行扫描 ,直到找到起始密码子 ,最后与核糖体的大亚基结合形成起始复合物。起始复合物的形成可分为三个步骤。

(1) 前起始复合物的形成 前起始复合物包括 eIF-3、eIF-2、一分子 GTP、40 S 小亚基和 Met-tRNA^{Met}。首先 eIF-3 与 40 S 小亚基结合 ,然后在结合了 GTP 的 eIF-2 的帮助下 ,Met-tRNA^{Met} 结合到该小亚基上形成 43 S 的前起始复合物。

(2) 48 S 复合物的形成 前起始复合物结合于 mRNA 的 5'-末端 ,这一步需要 eIF-4F 复合物(又称帽子结合复合物)的帮助(图 14-4)。其中 ,eIF-4E 结合于帽子化的 mRNA ,eIF-4G 作为接头蛋白连接 eIF-4E 和 eIF-3。mRNA 的 poly A 尾巴与 Pab1p 结合 ,Pab1p 也结合于 eIF-4G 上 ,形成 48 S 的复合物。帽子结构和 poly A 尾巴能协同刺激翻译。在 eIF-4B 的帮助下 ,Met-tRNA^{Met} 能沿着 mRNA 分子扫描寻找合适的起始密码子。真核生物 mRNA 的引导区可达数十或数百个核苷酸 ,并且常含发夹结构和其他的碱基配对结构。具解旋酶活性的 eIF-4A 能打开引导区的碱基对。

(3) 起始复合物的形成 一旦 48 S 复合物定位于起始密码子 ,eIF-5 帮助 60 S 大亚基就与其结合形成翻译的起始复合物。而且 eIF-5 水解与 eIF-2 结合的 GTP ,这一反应导致已结合在 48 S 复合物上的起始因子的释放(图 14-5)。

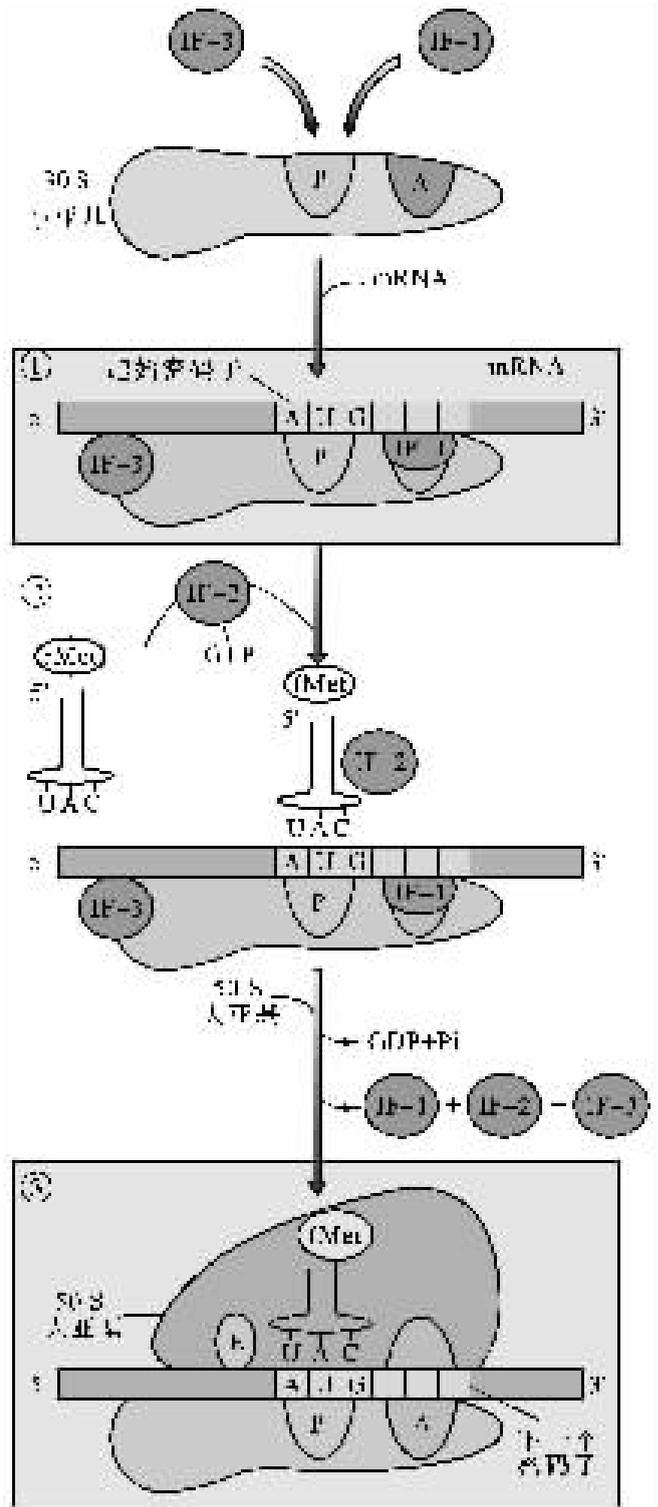


图 14-3 原核生物的翻译起始过程

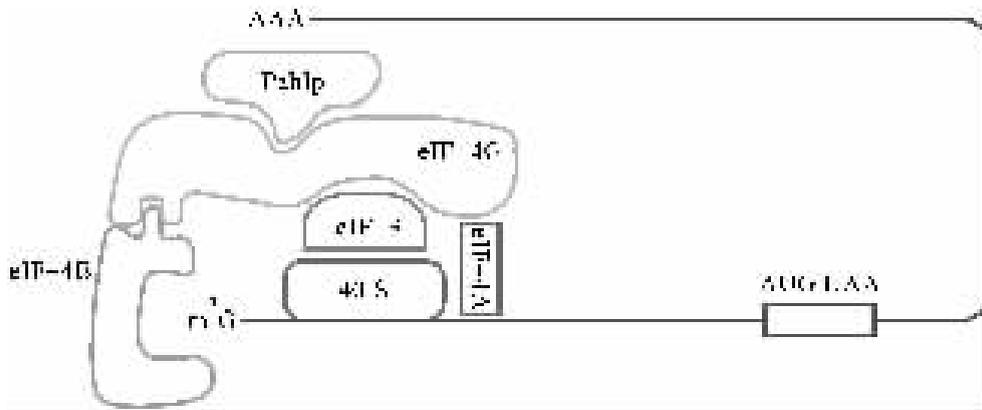


图 14-4 真核生物的翻译起始复合物

二、肽链的延长

翻译过程的肽链延长也称作核糖体循环(ribosomal cycle)。广义的核糖体循环指翻译全过程。因为它们是在核糖体上连续地、循环地进行。真核生物的肽链延长过程与原核生物非常相似。原核生物延长过程所需的蛋白因子称为延长因子(elongation factor, EF);真核生物的延长因子称为 eEF(eukaryotic elongation factor)。

大亚基与 48 S 复合物的结合导致在大亚基产生两个氨基酰-tRNA 结合位点。其中一个为 P 位或肽位(peptidyl site)在起始复合物形成过程中,它已被 Met-tRNA 占据,与起始密码子配对。另一个位点为 A 位或受位(acceptor site)覆盖开放阅读框架的第二个密码子。密码子-反密码子的相互作用与小亚基有关, tRNA-氨基酸的氨基端与大亚基相连接。

核糖体循环可分三个阶段:进位(entrance)或称注册(registration),成肽(peptide bond formation)和转位(translocation)。循环一次,肽链延长一个氨基酸残基,直至肽链合成终止。

(一) 进位

起始复合物形成时, P 位已被起始-tRNA 占据,而 A 位是留空的。在原核生物中,延长因子 EF-T 由 2 个亚基:EF-Tu 和 EF-Ts 组成。EF-Tu 是一种 GTPase,当它与 GTP 结合后,释放出 EF-Ts。EF-Tu·GTP 复合物能与适当的氨基酰-tRNA 结合并将其携带进入 A 位,使密码子与反密码子配对。同时,EF-Tu 的 GTPase 发挥作用并释放 EF-Tu-GDP 和磷酸盐。EF-Ts 与 EF-Tu 结合将 GDP 置换出去。GTP 又可取代 EF-Tu·EF-Ts 二聚体中的 EF-Ts。由此可见,EF-Ts 实际上是 GTP 交换蛋白,它可将 EF-Tu 上的 GDP 交换成 GTP,使 EF-Tu 进入新一轮循环(图 14-6)。在真核生物中,与 EF-Tu 相应的因子是 eEF-1,它是由 α 、 β 、 γ 和 δ 亚基组成的四聚体。尚未发现真核生物有 EF-Ts 的对应物,可能是 eEF-1 的某一个亚基有这种再生能力。

(二) 成肽

氨基酰-tRNA 进入 A 位后,在肽基转移酶的催化下,两个氨基酸之间形成肽键(图 14-7)。在原核生物中,肽基转移酶活性位于大亚基的 23 S rRNA;在真核生物中,该酶的活性位于大亚基的 28 S rRNA 中,肽基转移酶是一种核酶。以前并没有认识核酶能直接参与蛋白质的合成,这一例子再次证明核酶的重要性。由于氨基酰-tRNA 中的氨基酸已被活化,因此成肽反应无须能量供应。

(三) 转位

现在对应于阅读框密码子的二肽已连到 A 位的 tRNA 上,下一步发生转位。在原核生物,转位依赖 GTP 和 GTP-依赖蛋白——EF-G;在真核生物,则依赖 GTP 和 EF-G 的相应蛋白——eEF-2、EF-G 和 eEF-2 都具 GTPase 活性。转位时下述三个事件同时发生(图 14-8)。

1. 核糖体移动三个核苷酸距离,二肽-tRNA 从 A 位移至 P 位。
2. 下一个密码子进入 A 位。

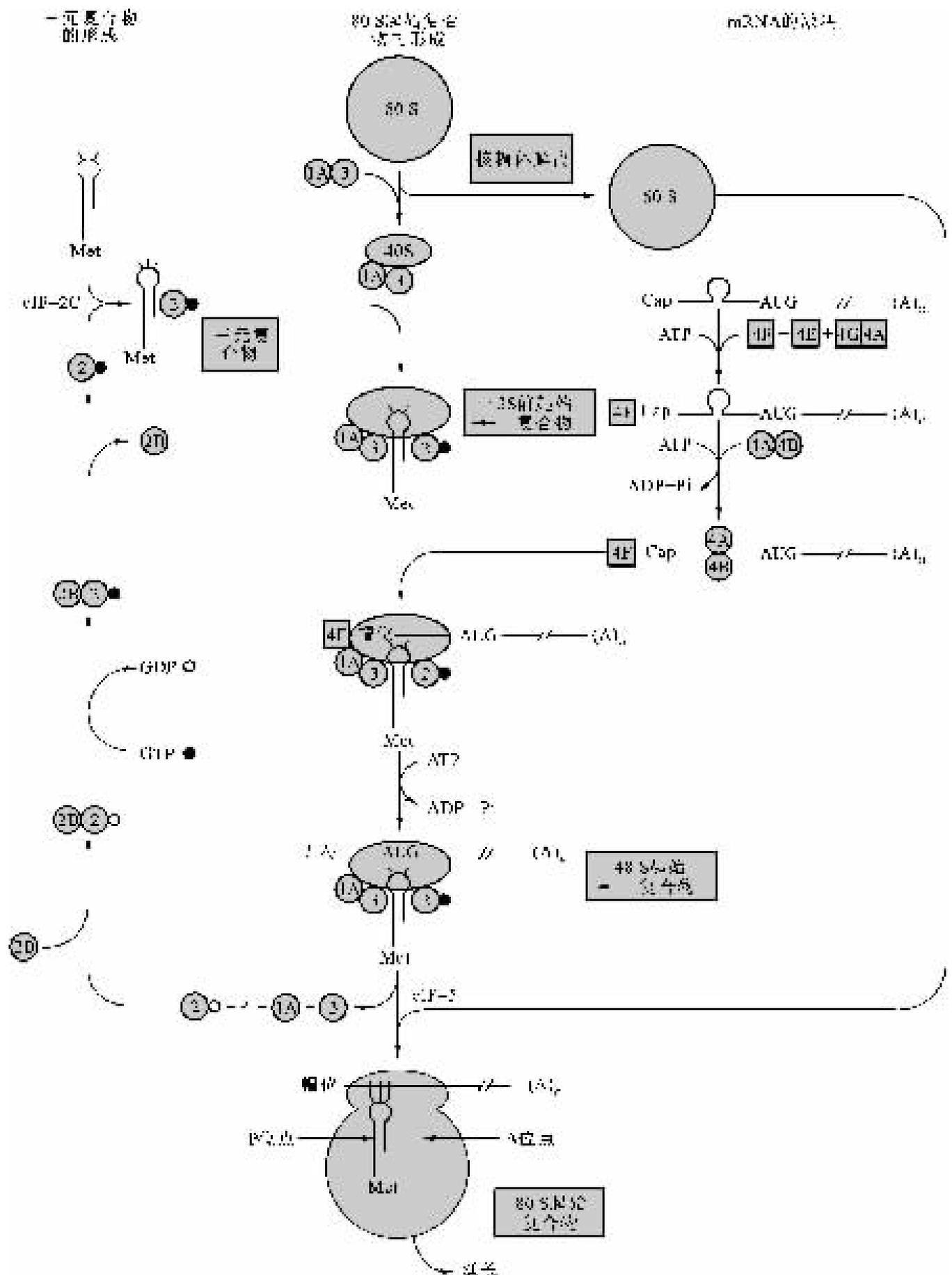


图 14-5 真核生物的翻译起始过程

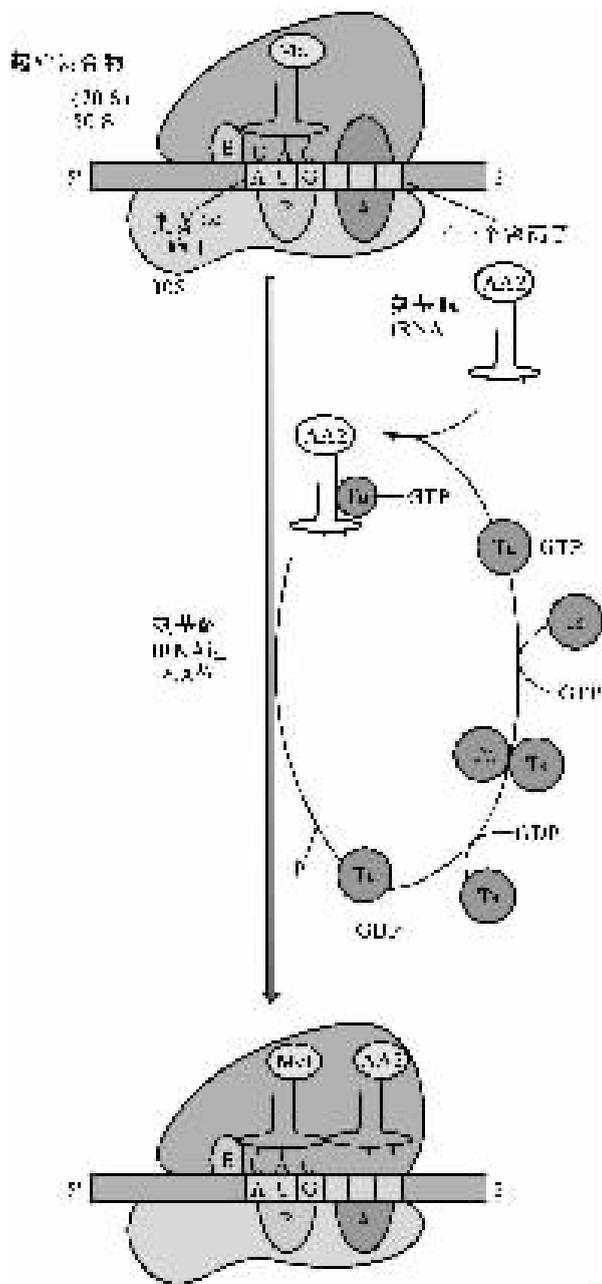


图 14-6 翻译的进位过程

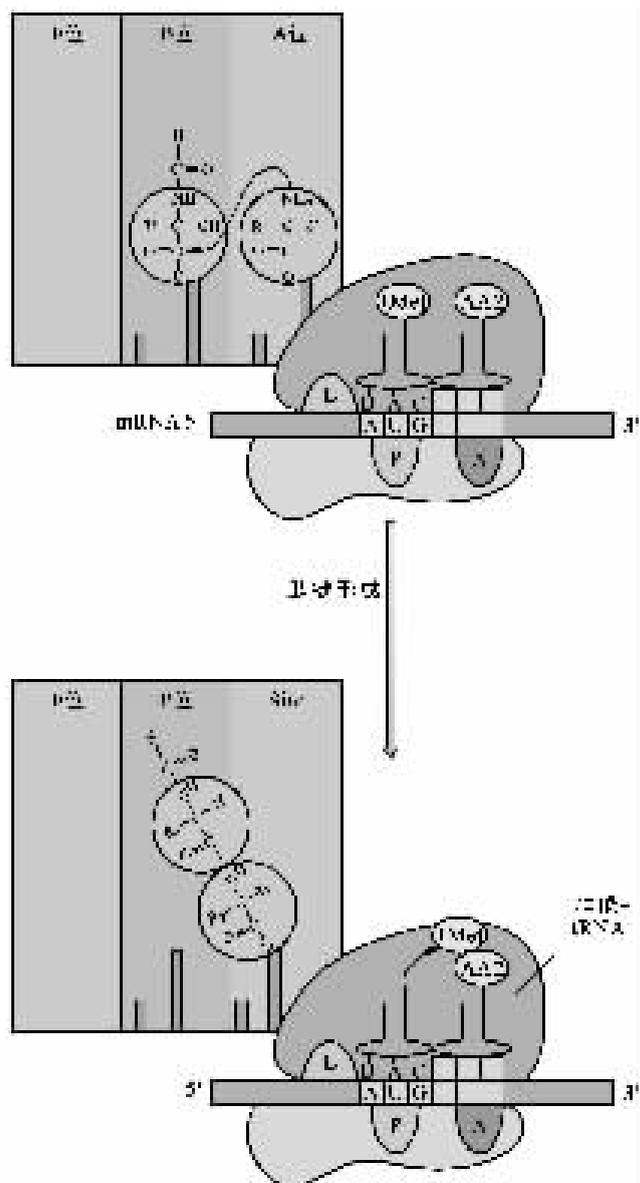


图 14-7 翻译的成肽过程

3. 在原核生物中, P 位的去氨基酰的 tRNA 进入 E 位(exit site ,或称出口位点);在真核生物中, tRNA 直接从核糖体释放。

三、肽链合成的终止

肽链合成的终止包括终止密码的识别、从肽酰-tRNA 水解出肽链、从核糖体分离出 mRNA 和大、小亚基拆开。终止过程也需要蛋白因子,它们被称作释放因子(release factor, RF)。

原核生物有三种 RF:RF-1、RF-2 和 RF-3。RF-1 能识别终止密码子 UAA 和 UAG;RF-2 能识别终止密码子 UAA 和 UGA。RF-3 是依赖核糖体的 GTPase,能促进 RF-1 和 RF-2 与核糖体结合,当翻译至 mRNA 的 A 位出现终止密码时,RF-3 能帮助 RF-1 或 RF-2 进入 A 位,并帮助完成合成的多肽从 P 位点的 tRNA 释放出来(图 14-9)。

在真核生物中只发现一种释放因子 eRF。它能识别所有的终止密码子,由于它没有与 GTP 结合的位点,它不能帮助完成合成的多肽从 P 位点的 tRNA 释放,在真核细胞内可能还存在能与 eRF 合作帮助多肽从核糖体释放的蛋白质。

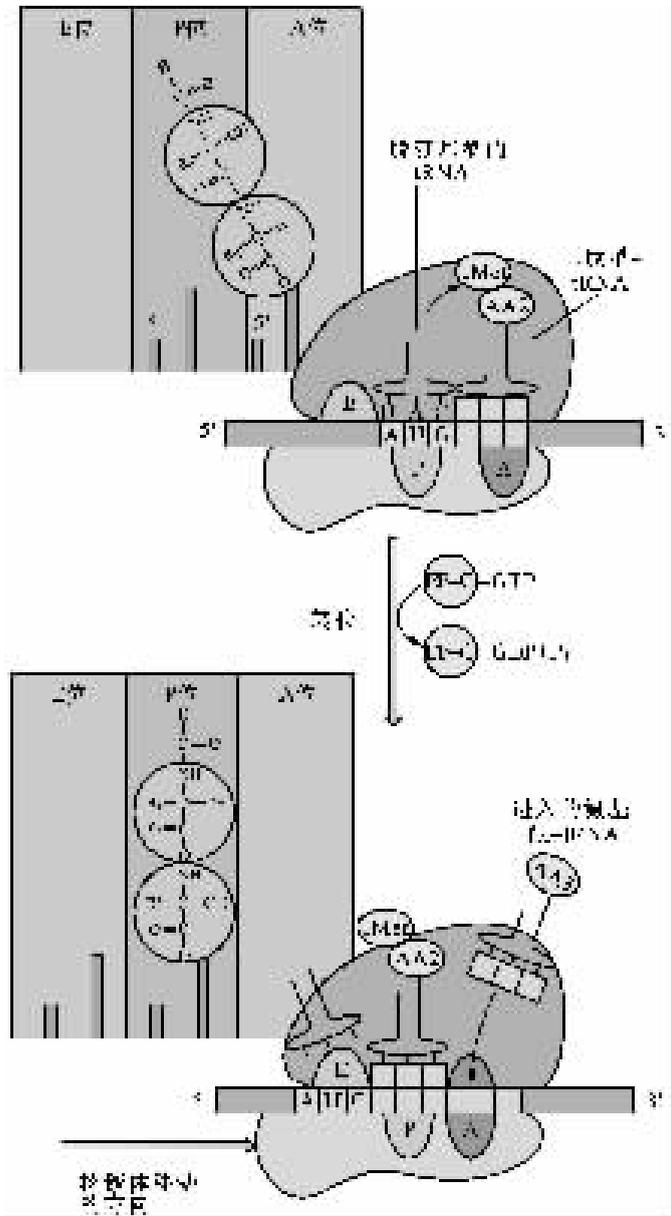


图 14-8 翻译的转位过程

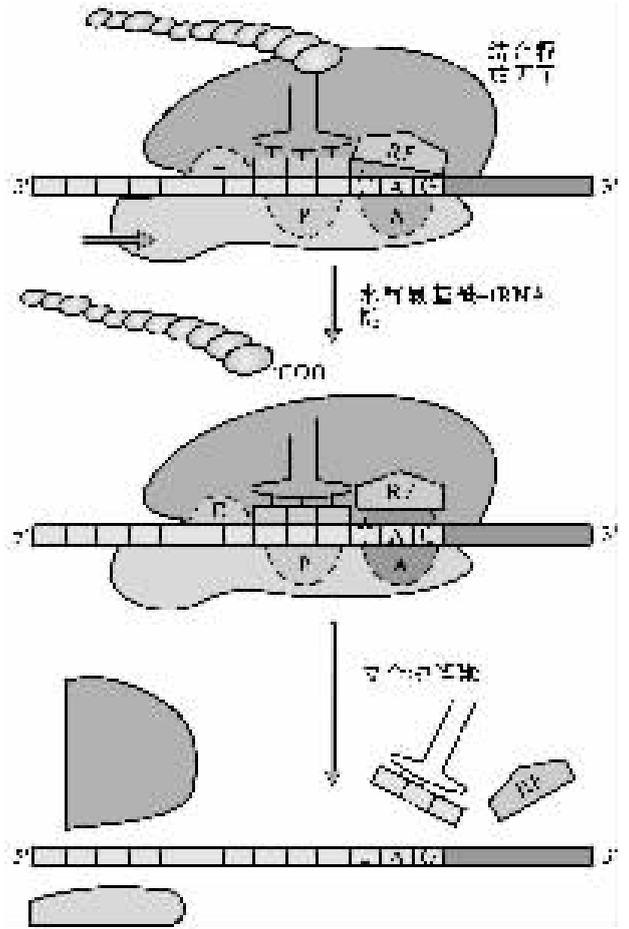


图 14-9 肽链合成的终止过程

第三节 翻译后的加工修饰

从核糖体释放的多肽链不一定是具备生物活性的成熟蛋白质,在细胞内新生肽链只有经过各种修饰处理才能成为有活性的成熟蛋白,该过程称为翻译后加工(post-translational processing)。本章从一级结构的修饰、糖链的添加和高级结构的形成等三个方面描述翻译后的加工。

一、翻译后修饰

(一) 一级结构的修饰

1. 去除 N-甲酰基或 N-蛋氨酸

翻译过程中,原核生物的 N 末端的第一个氨基酸总是甲酰蛋氨酸;真核生物的是蛋氨酸。但大多数天然蛋白质不以上述氨基酸为 N 末端的第一位氨基酸。细胞内的脱甲酰基酶或氨基肽酶可以去除 N 甲酰基、N 末端蛋氨酸或 N 末端的一段肽链。这个过程可在肽链合成过程中发生。

2. 蛋白质的水解加工

蛋白质的水解加工包括多蛋白的水解加工和内含肽的剪接。

(1) 多蛋白的水解加工 一些蛋白质在合成之初是含有一系列头尾相连的蛋白质的长多肽链。多肽

链的水解将裂解释放出各种蛋白质,释放出的蛋白质可能具有完全不同的功能,这些蛋白质称为多蛋白。如垂体合成的阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC),它包含至少10种不同的肽类激素。阿黑皮素原的水解可释放这些激素(图14-10)。由于这些肽类激素之间的序列有重叠,所以并非所有的激素都同时产生,不同的细胞有不同的切割模式,从而产生不同的激素。

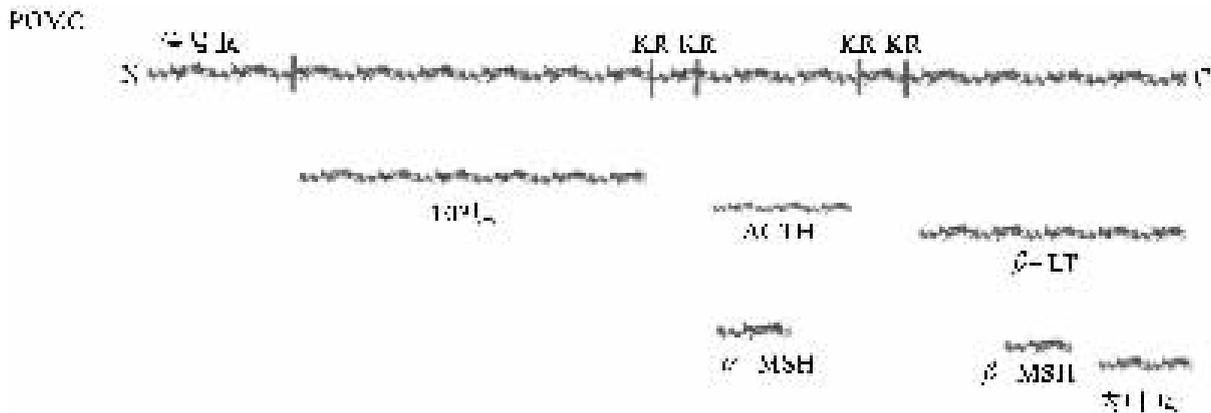


图14-10 阿黑皮素原的水解加工

KR: 赖氨酸和精氨酸残基; MSH, 促黑激素; β -LT β -脂酸释放激素(lipotropin)

(2) 内含肽的切除 内含肽的切除相应于hnRNA中内含子的剪切。内含肽是蛋白质的内部片段,翻译后很快被剪切,两个外显肽连接到一起。内含肽的长度一般在300个~600个氨基酸之间。内含肽的剪接位点的序列非常相似,第一个氨基酸通常是半胱氨酸,有时为丝氨酸,最后两个氨基酸的序列一般总是组氨酸和天冬氨酸。下游外显肽的第一个氨基酸是半胱氨酸、丝氨酸或苏氨酸。剪接是由内含肽自我催化的,具体机制不详。

3. 化学修饰 基因组可编码20种氨基酸,但由于蛋白质可发生翻译后的修饰,使一些氨基酸残基的功能基团添加一个化学基团,显著增加了多肽的氨基酸种类,蛋白质中有150多种修饰性氨基酸。

组蛋白的精氨酸可进行甲基化和乙酰化修饰,从而影响染色质的精细结构并进一步影响基因表达。胶原中的脯氨酸和赖氨酸可被羟化生成羟脯氨酸和羟赖氨酸。细胞内信号分子的丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸残基的磷酸化参与细胞信息转导。一些蛋白质的丝氨酸、苏氨酸及半胱氨酸的脂酰化有利于它们定位于膜结构。

(二) 糖链的添加

蛋白质添加糖链又称糖基化(glycosylation),是一种更为复杂的化学修饰。第四章已介绍糖链与多肽的连接方式为O-连接和N-连接。

由于大多数糖蛋白为膜结合型或分泌型,它们通常在膜结合多核糖体上进行翻译。O-连接的糖蛋白的形成是通过核苷酸结合糖,如UDP-GalNAc、UDP-Gal和CMP-NeuAc分步供给糖分子而完成的。催化这一反应的酶是膜附着糖蛋白糖基转移酶,它们定位于高尔基体。N-连接的糖蛋白的合成方式与O-连接的糖蛋白不同,连接于多核苷酸焦磷酸的寡糖链作为一个整体,经寡聚糖蛋白转移酶催化转移到内质网膜腔面受体蛋白的一个或多个天冬酰胺残基,形成N-糖苷键(图14-11)。新合成的糖蛋白链进入高尔基体,在多种酶的催化下对糖链进行加工,形成成熟的糖蛋白。

(三) 高级结构的形成

蛋白质翻译过程中,核糖体大亚基多肽链的出口的长度大约为10nm,相当于30个伸展的氨基酸的长度或65个残基所组成的 α 螺旋的长度。这个通道的平均宽度为1.5nm,因此在核糖体内多肽只能形成 α 螺旋。所以只有当蛋白质全部序列离开核糖体之后才能形成它的三级结构。

虽然蛋白质的一级结构本身的信息就足以指导蛋白质的正确折叠,但是蛋白质在体外自发折叠需要数小时,远长于体内折叠所需要的时间,而且蛋白质在体外发生折叠时,要求体系内蛋白浓度低。细胞是

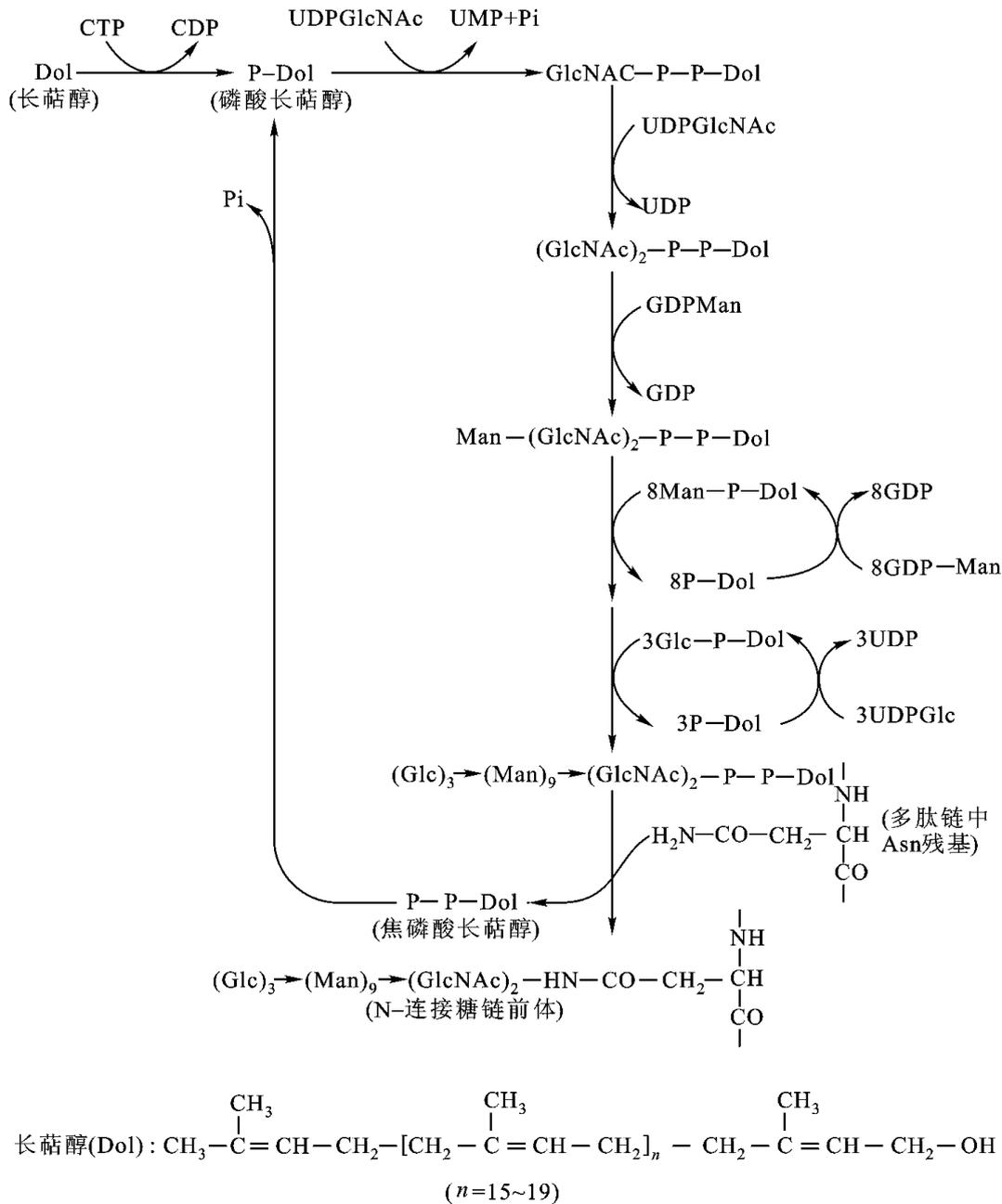


图 14-11 N-糖蛋白的合成

一个拥挤的空间,新合成的蛋白质在一个几乎没有游离水的环境中,周围存在高浓度的其他蛋白质、代谢物、膜性结构、骨架蛋白和其他化合物。在大肠杆菌中,蛋白质和其他大分子的浓度达 300 g/L ~ 400 g/L。由此可以推论,细胞内存在一些辅助蛋白,可以帮助蛋白质的折叠。它们可以加速折叠过程并指导其按特有的途径进行正确的折叠。这些辅助性蛋白质主要是分子伴侣蛋白(molecular chaperone)和一些酶类。

细胞内分子伴侣主要是创建一个隔离的微环境,封闭待折叠蛋白暴露的疏水区段,并提供折叠所需的其他条件(如相关的能量供应等),使蛋白质可互不干扰地折叠。实际上,可将需折叠的蛋白看作是分子伴侣的底物。

细胞内的分子伴侣可分为下列两大类。热休克蛋白 70(heat shock protein, Hsp70)家族和热休克蛋白 60(Hsp60)家族。在大肠杆菌中, Hsp70 是由基因 *dna K* 编码的,故又称 Dna K。Hsp70 参与蛋白质的折叠并具有较强的 ATP 酶(ATPase)活性。Hsp70 可在蛋白质合成进行过程中的多肽链结合,保护其疏水表面不至于暴露于溶液中。保证在多肽链合成完毕前不发生凝集。许多蛋白质在分子伴侣(chaperone) Hsp70 存在时不能完成其折叠过程,还要进一步借助于转移到 Hsp60 家族来完成其三级结构的折叠过程。

许多 Hsp60 分子伴侣并非是热诱导的,故被命名为分子伴侣素(chaperonin)。它在大肠杆菌中的主要形式为分子伴侣素 GroEL 和 GroES。GroEL 是由 14 个相同亚基组成。每 7 个亚基组成的一个环,两个环堆

叠在一起组成一个长筒形的四级结构,每个环的中央有一个空腔,每个空腔能结合1个蛋白质底物。每个亚基都含有一个ATP或ADP的结合位点。GroES是由7个亚基组成的圆顶状的蛋白质,每个亚基有一个与GroEL功能密切相关的环状区域,它从圆顶部突出,可将GroES锚定在GroEL上,形成GroEL-GroES复合物。

多肽链三维结构的形成是通过GroEL-GroES的循环过程完成的(图14-12)。(1)未折叠蛋白进入未结合GroES的GroEL的空腔;(2)7个ATP与7个不与GroES结合的GroEL结合;(3)ATP水解,使14个ADP、7个无机磷酸和GroES释放;(4)7个ATP和1个GroES与空腔内已有未折叠蛋白的GroEL结合;(5)ATP水解成ADP和Pi。ADP仍留在GroEL上,Pi释放。同时另7个ATP与无折叠蛋白的GroEL结合;(6)蛋白质在密闭的GroEL内折叠,此时GroEL的顶部结构域进行大幅度的转动和向上移动,导致空腔扩大并使表面从疏水转变成亲水,有利于蛋白质折叠;(7)折叠过程大约进行10s,如蛋白质已折叠成天然蛋白质则释放;(8)如未完成折叠,它们可再进入新一轮循环。

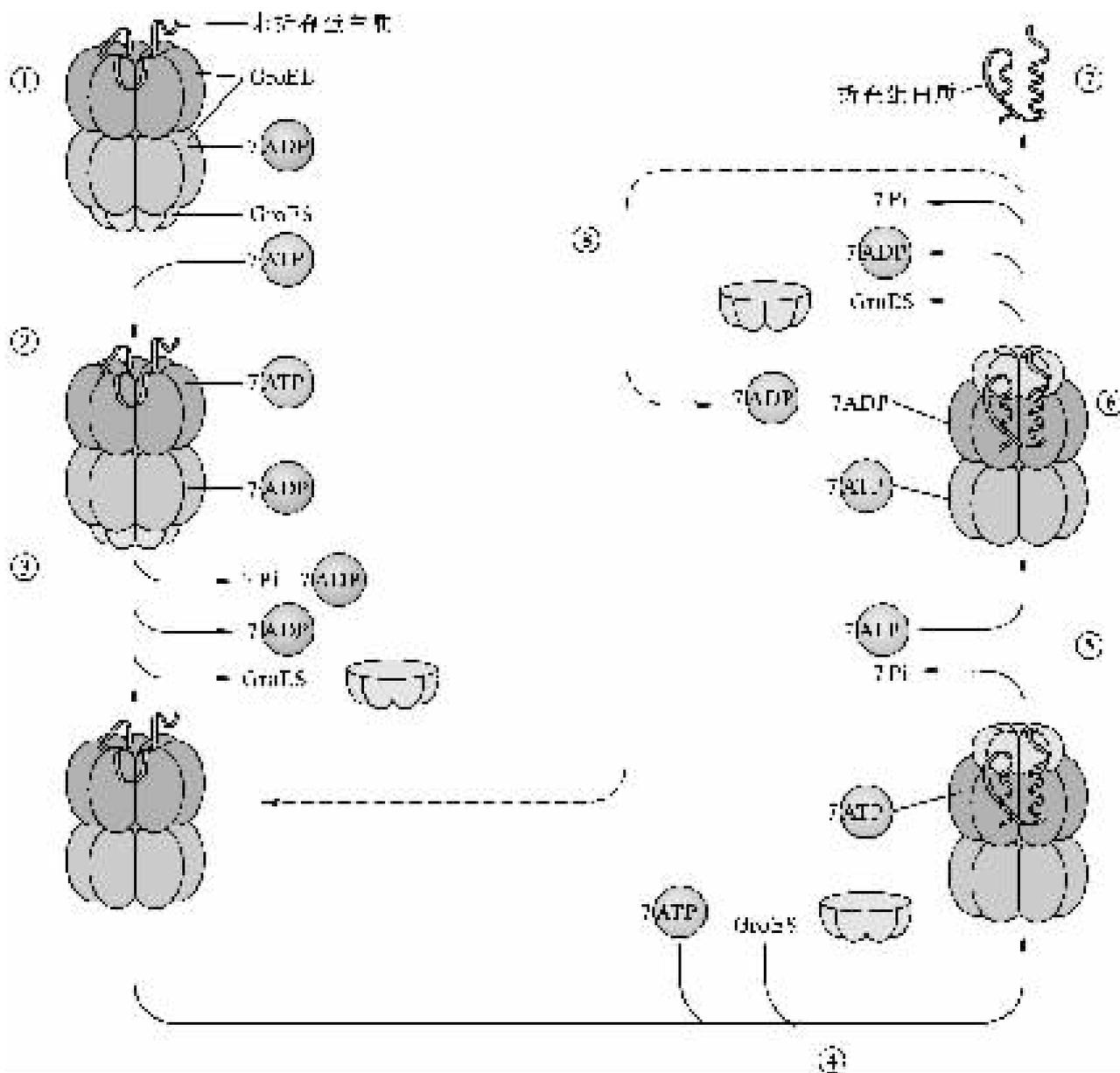


图14-12 GroEL(Hsp 60)折叠蛋白质的过程

许多多肽链形成三级结构后,还需要进一步聚合形成四级结构,以及辅助因子的连接。如辅基或辅酶的结合,上述的糖基化等。到目前为止,对蛋白质高级结构的形成、结构与功能的关系以及功能的调节仍有许多未知领域,随着后基因时代的到来,相信这些问题将会逐步地阐明。

二、蛋白质的靶向转运

细胞内蛋白质的合成过程可认为是一个庞大的分拣系统。许多蛋白质携带有信号(通常不全是特异的氨基酸序列),可以确保蛋白靶向转运(protein targeting)定位于正确的细胞膜或细胞区域。这些信号是分拣系统的基本组成成分。

当特异蛋白质在与膜结合或游离的多聚核糖体上进行合成的早期,主要的分拣决定就已发生了。目前所知有两条分拣支路,分别称作胞质支路和粗面内质网支路。膜结合核糖体上合成的蛋白质带有信号肽(signal peptide),能够介导它们连接到内质网膜。由于游离核糖体上合成的蛋白质缺乏信号肽而运送到胞质。在那里,通过特殊的信号到达线粒体、细胞核和过氧化酶体,如果缺乏特殊信号,则留在胞质内。

(一) 胞质支路的分拣

游离多聚核糖体合成的蛋白质输入到不同的细胞器,尽管它们各有特点,但它们也有一些共同的特征,现将它们总结于表 14-3。

表 14-3 胞质支路分拣的共同特征

蛋白质输入细胞器通常包括三个阶段:识别、易位和成熟
蛋白质上的靶序列被细胞质或细胞器表面识别
蛋白质易位是指这些蛋白质通过细胞器膜进入细胞器内部的过程,它是以未折叠的状态进行,细胞质中的伴侣蛋白帮助维持这种状态
蛋白质穿过膜需要能量和膜的另外一面存在分子伴侣
蛋白质和分子伴侣的结合与解离的不断反复,结果可拉动多肽链跨膜
细胞器内的其他蛋白催化蛋白质折叠,这些蛋白通常伴随协同因子或寡糖组装成活性单体或寡聚体

(二) 粗面内质网支路的分拣

在膜结合核糖体上合成的蛋白的氨基端含有一段信号肽,通过它合成的蛋白可与内质网的膜结合。信号肽具以下性质(1)通常(并不总是)位于氨基端,约由 12~35 个氨基酸组成(2)氨基末端常为蛋氨酸,而近氨基末端处至少含有一个带正电荷的氨基酸,其中央段含有疏水氨基酸簇(3)通常信号肽酶的切割位点位于丙氨酸羧基端,即信号肽的羧基末端多为丙氨酸。例如,人前胰岛素原的信号肽序列是: MALWRLPLLALLALWGPDPAAA。

编码蛋白的相对应的 mRNA 同时编码其氨基端的信号肽。信号假说认为当 mRNA 在多聚核糖体翻译的同时,蛋白质就插入到内质网膜,也即所谓的共翻译插入(cotranslational insertion)。当信号肽从核糖体大亚基露出来时,它被一个信号识别颗粒(signal recognition particle, SRP)识别,70 个氨基酸被翻译后(其中 40 个氨基酸隐藏在核糖体大亚基的内部,30 个氨基酸暴露于核糖体外),SRP 暂时阻断翻译的进一步进行,这个阻断过程称之为延伸停止(elongation arrest)。SRP 的阻断作用一直到 SRP-信号肽-多核糖体复合物结合到内质网膜上的 SRP 受体(SRP-R)时才终止。SRP 引导信号肽到达内质网膜上 SRP-R 的作用可防止蛋白质成熟前的折叠(premature folding)和正在合成的蛋白质进入细胞质(图 14-13)。当 SRP 与 SRP-R 结合时,核糖体也与内质网上的核糖体受体结合。

一些膜蛋白组成的转位子(translocon)形成内质网上的蛋白传导通道,新合成的蛋白质可能通过这个通道越过内质网膜。通道似乎只有在信号肽存在时才会开启,关闭时则保留跨膜的电导。

信号肽插入到导电的通道中,而主体蛋白(相对于信号肽来说)的另外一端仍然连接在核糖体上,蛋白质剩余部分的进一步延伸很可能有助于新合成的蛋白质跨过脂质双分子层。蛋白质在进入导电的通道之前,保持未折叠状态非常重要,否则就难以通过导电通道。

核糖体在合成含有信号肽的蛋白质时,一直与内质网相连;可是,一旦合成过程结束,即被释放出来,并分解成两个亚基。位于内质网内腔侧面上的信号肽酶将信号肽降解。但是,信号肽的精确去向尚未阐

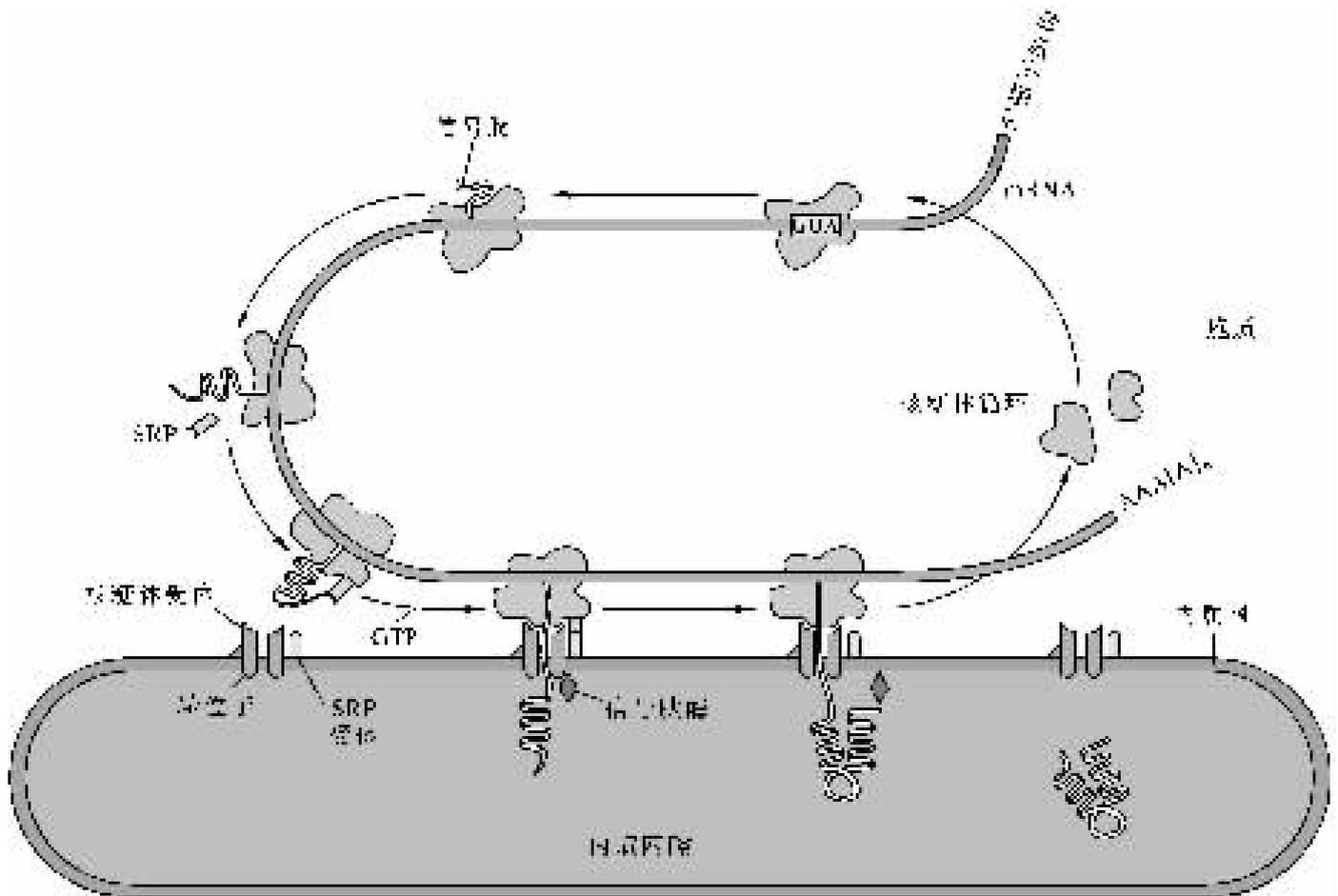


图 14-13 分泌蛋白质转运进入内质网的过程

明,很可能通过蛋白酶快速降解。

定位于内质网膜或内腔的蛋白质随主要的细胞内运输路线被运送到高尔基体。在那里,有些蛋白质通过信号介导的分拣过程被运送到溶酶体、高尔基体膜和其他位置。一般认为定位于细胞膜的蛋白质不携带有特异分拣信号靶向序列。它们以原始状态到达其目的地。

第四节 蛋白质生物合成与医学的关系

蛋白质的合成机器能对环境的威胁作出应答反应。如铁蛋白(ferritin)是一铁结合蛋白,能阻止细胞内的 Fe^{2+} 达到中毒水平。铁元素刺激铁蛋白合成的机制是由于它使结合在铁蛋白mRNA的5'-非翻译区的胞质蛋白质的释放。这种蛋白质从mRNA的释放可激活铁蛋白mRNA,增加铁蛋白的合成。这一机制提供了蛋白质合成的快速调控,以减少 Fe^{2+} 过量的毒性作用。

一、许多病毒利用宿主蛋白质合成机器

病毒可利用宿主的细胞过程进行复制,也包括那些参与蛋白质合成的过程。某些病毒(例如,Mengo病毒和大脑心肌炎病毒)的翻译比宿主有效得多。此外,如呼吸道、肠道病毒和疱疹性口炎病毒等都可大量复制,对有限的翻译因子而言,它们的mRNA比宿主细胞mRNA具有更强的竞争优势;某些病毒还可阻止mRNA与40S核糖体结合,从而抑制宿主细胞的蛋白质合成。

脊髓灰质炎病毒(poliovirus)和其他微小核糖核酸病毒(picornaviruses)能破坏eIF-4F复合物的功能而获得选择优势。这些病毒的mRNA没有帽子结构,而存在一个内部核糖体入口位点(internal ribosomal entry site, IRES)。所以,病毒mRNA与40S核糖体亚基的结合只需eIF-4G,而无需eIF-4E。此外,这两种病

毒还存在一种蛋白酶,可以水解去掉 eIF-4G 氨基末端的 eIF-4E 结合位点,使其不能形成 4E+4G 复合物(eIF-4F)。这样,宿主 mRNA 因无法形成 4E+4G 复合物而不能进行翻译。eIF-4G 单独仍能指导 40S 核糖体亚基结合至病毒 mRNAs 的 IRES 处,所以病毒 mRNA 的翻译很有效(参考图 14-4)。

二、抗生素对蛋白质生物合成的影响

抗生素(antibiotics)是一类能杀灭或抑制细菌的药物,从 20 世纪问世以来,发展非常迅速。虽然抗菌素的药效各异,但它们要么干扰、抑制代谢过程,要么破坏基因信息传递过程。但它们必须只作用于微生物而对人体的副作用不大。由于细菌核糖体较小,并具有不同的和较简单的互补 RNA 和蛋白质,有些抗生素能特异地作用于原核生物的核糖体蛋白质和 RNA,因而可以抑制细菌蛋白质的合成并导致细菌生长的抑制甚至死亡。

四环素族能抑制氨基酰-tRNA 与原核生物的核糖体结合,抑制细菌的蛋白质合成。氯霉素能与原核生物的核糖体大亚基结合,抑制转肽酶的活性,阻断翻译的延长过程。高浓度时,氯霉素对真核生物的蛋白质合成也有阻断作用。链霉素能与原核生物核糖体小亚基结合,改变其构象,引起读码错误,使细菌的蛋白质发生变异,从而起到抑菌的作用。

嘌呤霉素是酪氨酰-tRNA 的类似物。嘌呤霉素通过核糖体 A 位掺入至肽链的羧基末端位置,致使多肽在成熟前就释放。它可有效地抑制原核和真核生物的蛋白质合成,故不宜作为抗菌药物,仅作为抗肿瘤药物使用。放线菌酮(cycloheximide)可抑制真核生物核糖体大亚基的转肽酶,因此只能作为实验室的试剂使用。嘌呤霉素和放线菌酮虽然不能作为临床应用的药物,但在阐明代谢过程的调控,特别是阐明激素对酶诱导过程中对蛋白质合成的作用具有重要的意义。

三、一些活性物质对蛋白质生物合成的干扰作用

白喉毒素(diphtheria toxin)是由白喉杆菌产生的一种外毒素,对真核细胞有剧毒作用。它是一种化学修饰酶,能催化哺乳动物的延长因子(EF-2)与 NAD^+ 反应,生成 EF-2 的腺苷二磷酸核糖衍生物,使 EF-2 失活,从而抑制哺乳动物蛋白质的合成(图 14-14)。

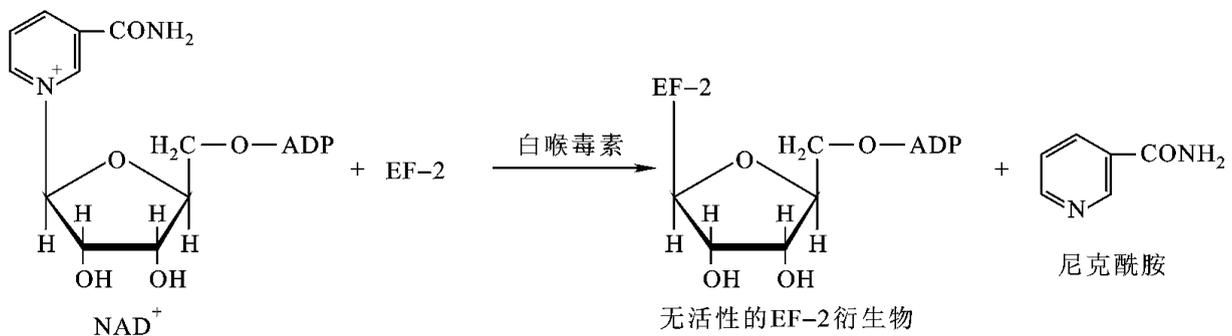


图 14-14 白喉毒素抑制蛋白质合成的机制

真核生物细胞感染病毒后能分泌干扰素(interferon, IFN)抑制病毒蛋白的合成而起到抗病毒的作用。干扰素能诱导 2'-5'-寡腺苷酸合成酶和血红素调控抑制物 Heme controlled inhibitor(HCI)的合成。HCI 是一种蛋白激酶,它能催化 eIF-2 磷酸化,磷酸化的 eIF-2 与 eIF-2B 结合形成死端复合物(dead-end complex),将蛋白质的合成阻抑在起始阶段(图 14-15)。血红素能抑制 HCI 的活性。

2'-5'-寡腺苷酸合成酶能催化 ATP 生成 2'-5'-寡腺苷酸,它能活化核酸内切酶——RNase L。RNase L 能降解病毒的 mRNA(图 14-15)。

除了抑制病毒蛋白质的合成外,干扰素几乎对病毒感染的所有过程均有抑制作用,如吸附、穿入、脱

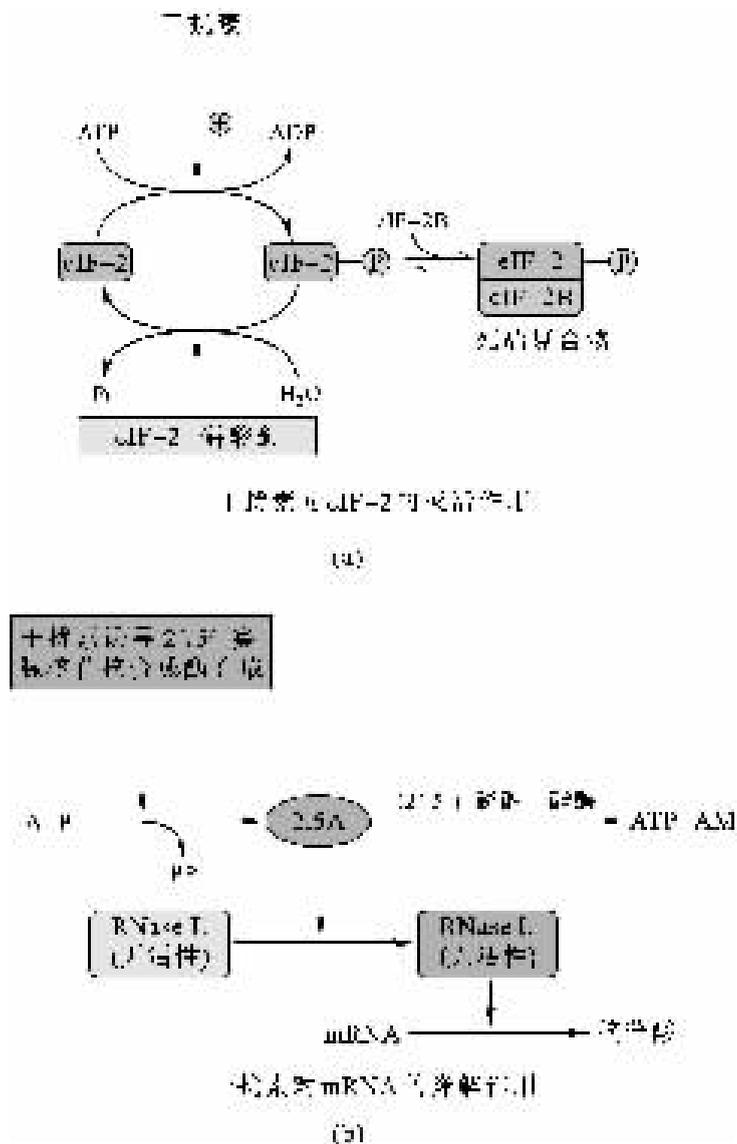


图 14-15 干扰素抑制蛋白质合成的机制

(a) 干扰素对 eIF-2 的灭活作用；

(b) 干扰素对 mRNA 的降解作用

壳、复制、表达、颗粒装配、包装和释放等。此外,干扰素还能调节细胞生长分化、激活免疫系统,所以干扰素在临床上使用十分广泛。

Summary

Protein biosynthesis, usually termed translation, is the process of polypeptide synthesis directed by RNA. This process requires various amino acids, which act as raw materials. It also demands the mutual cooperation of all three classes of RNAs, enzymes and protein factors. The mRNA works as the template which determines the composition and sequence of amino acids in polypeptide chain through the genetic codes (triplets). The processes leading to form a peptide bond are exceedingly complex. The individual amino acids must combine with the corresponding tRNA to form the aminoacyl-tRNA, then they are located in polypeptide chain. In the process of protein biosynthesis, the important effects of ribosome reflect two aspects: ①It can regulate protein biosynthesis, since it makes mRNA, aminoacyl-tRNA, and the relative protein factors to be correctly located. ②Some of its components catalyze parts of reactions in the process of protein biosynthesis.

Prokaryotic initiation factors (IF) include three types: IF-1, IF-2 and IF-3. Eukaryotes have more

than 10 initiation factors(eIF). The process of polypeptide synthesis(translation) are artificially divided into three steps. Initiation of this process is defined as the formation of the translational initiation complexes ,which enable initiated-tRNA and mRNA to combine with the ribosome under the effects of the initiation factors. After initiation ,the peptidyl site (or P-site) of the ribosome is occupied by methionyl-tRNA^{Met} ,and the aminoacyl site(or A-site) of the ribosome lies empty(idle) so that the next aminoacyl-tRNA complex can bind to the site. Elongation of translation process is also termed the ribosomal cycle ,which is divided into three steps —— entrance(or registration) ,peptide bond formation and translocation. Termination includes a series of steps such as the recognition of termination codon ,the hydrolysis of peptidyl-tRNA ,the separation of mRNA from the ribosome and the dissociation of big and small subunits. Prokaryotes have three kinds of release factors(RF) ,RF-1 ,RF-2 and RF-3. Only one release factor(eRF) is discovered in eukaryote. The release factor ,RF or eRF ,can distinguish the termination codon of mRNA ,which leads to cleavage of the last tRNA lying to the P-site of ribosome from the polypeptide chain.

Post-translational processing is the process in which the inactive form of the polypeptide chain can be transformed into the active one. There are lots of processing shapes :1) Modification of the primary structure ,2) Addition of carbohydrate chain ,3) Formation of the advanced structure. There are many supplementary proteins ,which help other proteins to fold in cells. Hsp70 and Hsp60 in cells enable proteins to fold normally according to its primary structure. The correct location of proteins in cells is ensured by protein targeting. The proteins produced in the ribosome combined with plasma membrane have a signal peptide at one end of the molecule to direct their combination with the endoplasmic reticulum membrane.

Protein biosynthesis can be interfered by virus and many bioactive materials ,such as diphtheria toxin ,interferon and antibiotics.

思 考 题

1. 遗传密码的特点是什么？
2. 翻译包括哪几个阶段？
3. 简述真核生物与原核生物翻译起始因子和起始过程的异同。
4. 蛋白质翻译后的修饰包括哪些内容？
5. 简述蛋白质折叠的 GroEL – GroES 反应循环过程。

(宋惠萍)

第十五章 基因表达的调控

本章教学要求

- 基因表达与调控的概念,基因表达调控的分类
- 乳糖操纵子和色氨酸操纵子的结构、转录的调控机制
- 真核生物基因表达调控的分子结构基础及基因表达调控的特点
- 顺式作用元件和反式作用因子的概念、分类
- 启动子和增强子的概念、组成和特点
- 转录因子 DNA 结合结构域和转录活化结构域的类型
- 转录后的调控、翻译水平的调控、翻译后的调控

20 世纪 50 年代,James Watson 和 Francis Crick 揭示了遗传信息传递的规律——中心法则。虽然存在于多细胞生物体内的每个体细胞的遗传信息是相同的,但在个体发育和分化期,细胞内的不同基因对内、外环境刺激的应答并不相同。细胞首先感知外界的信息,并将此信息从细胞膜传至细胞核。在特定信号的刺激下,有些基因的表达呈开放或增强,有些则成关闭或下降。最后完成从 DNA→RNA→蛋白质的基因表达。究竟是什么机制控制基因表达的规律?这是生物化学与分子生物学关注的问题。

第一节 概 述

随着人类基因组计划的完成,功能基因组学的研究日现其重要性。基因的功能取决于其结构和表达调控状态。基因表达调控是一个十分复杂而有序的过程。在生物体内,各种代谢能有条不紊地进行是由于在一定机制控制下,功能相关的一组基因协调表达的结果。显而易见,对基因表达调控的研究将会进一步阐明重要的生命现象,解释细胞行为和疾病的发生机理。

一、基因表达与调控的概念

基因表达是指生物基因组中结构基因所携带的遗传信息经过转录、翻译等一系列生化反应过程,合成特定的蛋白质,进而发挥其特定的生物学功能和生物学效应的全过程。但并非所有的基因表达过程均产生蛋白质,编码 rRNA 和 tRNA 的基因转录生成 RNA 的过程也叫基因表达。

同一机体的不同细胞虽然存在相同的遗传信息,即相同的结构基因,但它们在不同组织的开、关状态及表达量可以不同,它们是根据不同的组织细胞及不同的功能状态,根据机体生长、发育及繁殖的需要,随着环境的变化,有规律的选择性地、程序性地适度表达。机体通过改变基因表达来适应环境的变化。在机体和细胞的发育、分化阶段,基因表达必须受到遗传信息的调控。此外,机体为了适应环境、节约能量,遗传信息的表达还必须接受外部信号的提示。精确的基因表达调控可确保机体能在复杂的环境中生存。动物细胞具有的遗传信息约为细菌的 1 000 倍。所增添的遗传信息中,许多参与细胞分化和基因表达的调控,从而保证了机体能应付复杂的环境挑战。

基因表达存在多水平的调节环节,包括:转录前水平的调控、转录水平的调控、转录后水平的调控、翻译水平的调控和翻译后水平的调控。其中转录水平的调控是最主要和重要的调控步骤。转录水平的调控

通常涉及特异的蛋白质与转录起始位点 5' 上游邻近 DNA 的相互作用,对转录产生正调控或负调控。

二、基因表达调控的分类

在同一基因组内,不同的基因对内、外环境信号刺激的反应不同。某些基因在一个生物体的几乎所有细胞中以适当恒定的速率进行表达,较少受环境因素影响,常将它们称为持家基因(housekeeping gene)。与持家基因不同,有一类基因的表达极易受环境因素的影响。如用调控的效果作为检测的标准,基因表达调控可分为正调控和负调控,如用调控的方式作为检测的标准,基因表达调控可分为诱导调控和阻遏调控。

(一) 正调控和负调控

就基因表达的效果而言,只有正调节和负调节两种后果。由于一种特异的调控元件的存在,遗传信息的表达呈定量增加,这种调节称为正调节(positive regulation)。

根据对诱导信号做出的基因表达速率的应答方式可分为三种类型。1 型应答的特点是信号存在时,基因表达的速率增快,一旦诱导信号被移除,基因表达的速率便降至基础水平。如诱导信号重现,基因表达速率又可重复上升。这一类型的应答常见于原核生物对细胞内某一营养物浓度的改变所作出的反应。高等生物经激素、营养物和生长因子等诱导后也可出现这类应答。2 型应答的特点是即使调节信号持续存在,基因表达速率的增高的也呈瞬时性。整个反应过程呈“ 应答—脱敏—恢复 ”。只有整个体系恢复后,才能对新的刺激做出新的反应。3 型应答模式显示:对刺激信号呈现持续的应答反应,即使刺激信号终止后,基因表达的速率仍居高不下(图 15-1)。在此模式中,信号起着促发器的作用。在细菌中,一旦基因表达启动,就不能终止,甚至在子代细胞中也是如此。

因一种特异性调控元件的存在,遗传信息的表达减少,则称为负调节(negative regulation)。若一个效应基因能抑制负调节器的功能,可出现正调控的后果,这种调控方式又称为双负调控。正、负调控可通过多水平、多层次的调节而实现。

(二) 诱导和阻遏

在特定环境信号刺激下,使基因开放或表达增强的调节方式称为诱导表达(induced expression)。相反,使基因关闭或表达下降的调节方式称为阻遏表达(repressed expression)。一般而言,可诱导基因的基础表达量较低,而具有高基础表达量的基因常受阻遏调节。诱导和阻遏是同一事物的两种表现形式,在生物界普遍存在,也是生物适应环境的基本途径。

(三) 顺式作用和反式作用

从 DNA 的转录已知:调节蛋白与特异的 DNA 序列结合可调节 RNA 聚合酶的活性。在基因旁侧序列中可影响基因表达的特定 DNA 序列称为顺式作用元件(cis-acting element),包括启动子、增强子、负调控序列和可诱导元件等。而调节蛋白则是反式作用因子(trans-acting factor),它们一般具有 DNA 结合域和蛋白-蛋白相互作用结构域,从而可作用于靶基因的顺式作用元件,调节基因的转录。一个特异基因的顺式调控元件对该基因转录活性的调节就是顺式调节作用;反式作用因子对基因转录活性的调节称反式调节作用。反式作用因子必须通过顺式作用元件才能调节基因的表达。

三、基因表达调控的一般特征

无论是病毒、细菌、哺乳动物还是人类,基因表达都表现为严格的时间和空间特异性。物种越高级,基因表达规律越复杂。生物体正是依赖基因表达的时空性,才能正常地分化、发育、繁殖与代谢。基因表达的异常或失控往往导致疾病的发生与发展。

(一) 时间特异性

基因表达的时间特异性即阶段特异性。在细胞的生长、发育过程中,相应的基因按一定的时间顺序开

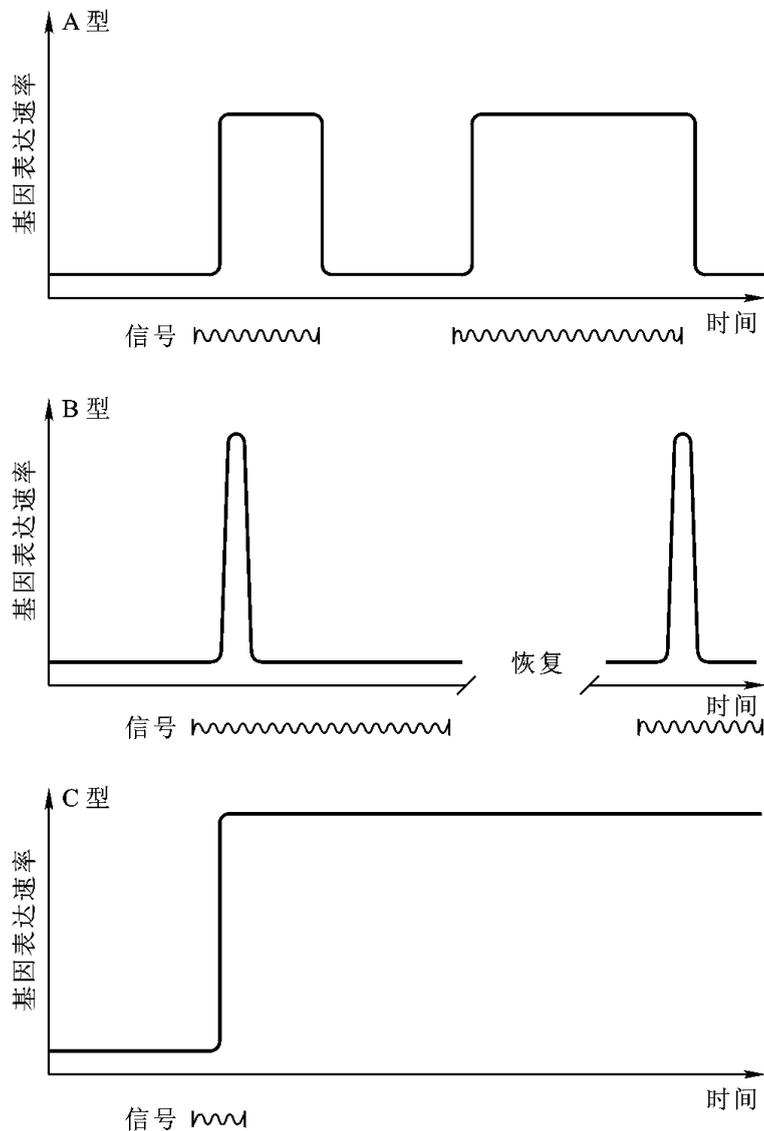


图 15-1 调控对基因表达速率影响的类型

启或关闭,决定细胞向特定的方向分化和发育。如人类血红蛋白的珠蛋白基因分为 α 类和 β 类两大基因簇,分别编码 α 类和 β 类珠蛋白。 α 类珠蛋白基因簇位于第16号染色体,包括4个功能基因—— ζ 、 α_2 、 α_1 和 θ 及两个假基因 $\psi\zeta$ 和 $\psi\alpha$,它们的排列顺序为 $5' \zeta - \psi\zeta - \psi\alpha - \alpha_2 - \alpha_1 - \theta 3'$ 。其中 ζ 是胚胎期的功能基因, α_1 、 α_2 和 θ 是成年期的功能基因。 β 类珠蛋白基因簇位于第11号染色体,包括5个功能基因和1个假基因,它们的排列顺序为 $5' \varepsilon - G\gamma - A\gamma - \psi\beta - \delta - \beta 3'$ 。 ε 为胚胎期功能基因, $G\gamma$ 和 $A\gamma$ 为胎儿期功能基因, δ 和 β 为成年期功能基因。每个大类的珠蛋白基因可在个体发育的不同阶段,分别从各自基因簇的5'端开始向3'端依次表达,即随着发育,在5'基因关闭的同时相邻的3'基因开放。这样表达时差的结果,致使不同发育期表现为不同类型的血红蛋白分子。即胚胎发育早期有3种Hb,即 $\zeta_2\varepsilon_2$ (占42%)、 $\alpha_2\varepsilon_2$ (24%)和 $\zeta_2\gamma_2$ (21%),妊娠8周后,这3种Hb迅速减少,胎儿Hb(HbF) $\alpha_2\gamma_2$ 迅速增多,出生后又很快被成人型HbA₁($\alpha_2\beta_2$)所取代,成人尚含微量(约占3%)HbA₂($\alpha_2\delta_2$)。

(二) 空间特异性

基因表达的空间特异性即组织特异性。对多细胞生物而言,除了少数细胞外,每一个体细胞所含有的遗传信息是相同的。但同一基因产物在不同的组织器官中的分布却不同,某些基因在一种组织中暂不表达或永不表达。而另外一些基因是相反的情况。如红细胞能大量表达血红蛋白,肌细胞则不能表达血红蛋白而大量表达肌红蛋白。同工酶(如乳酸脱氢酶)不同亚基的编码基因在不同组织器官表达程度的不同,使不同组织出现不同的同工酶谱(见第五章 表5-6)。

第二节 原核生物基因表达的调控

原核生物的基因组仅含一条染色体,与基因表达相关的元件主要包括启动子、转录终止序列和核糖体结合位点。

在原核生物中,涉及物质代谢通路的相关基因通常以线性阵列排列,称为操纵子,如乳糖操纵子(*lac operon*)。操纵子可受单个启动子或调控区的调控。顺反子是基因表达的最小单位,单个 mRNA 分子由于编码多于一个独立翻译的蛋白质,故被称为多顺反子(*polycistronic mRNA*)。操纵子和多顺反子仅见于原核生物,不存在于真核生物。

一、乳糖操纵子

F. Jacob 和 J. Monod 基于对大肠杆菌乳糖代谢的观察,在 1961 年提出了乳糖操纵子模型。乳糖是由一分子葡萄糖和一分子半乳糖组成的二糖,将乳糖水解成它的组成单位是乳糖代谢的第一步。当细菌培养的环境中同时存在葡萄糖和乳糖时,它首先利用葡萄糖而不合成代谢乳糖的酶,直到葡萄糖消耗完毕,代谢乳糖的酶才被诱导产生。乳糖代谢酶的表达调控机制是目前了解得最清楚的基因表达调控的例子。

(一) 乳糖操纵子的结构

乳糖操纵子包括(1)3个相邻的结构基因 *z*、*y*、*a*,分别编码 β -半乳糖苷酶、透酶和 β -半乳糖苷乙酰基转移酶,这些相连的基因呈多顺反子转录。有诱导物存在时,这三个结构基因依次被转录,直到乙酰基转移酶基因后的终止子。所以,这三个结构基因或同步转录,或全部不转录。(2)操纵基因(*operator* *o*)是阻遏蛋白的结合位点。当阻遏蛋白与操纵基因结合时,*lac* 的转录受阻。(3)调节基因(*i*)编码与操纵基因结合的调节蛋白。(4)启动基因(*p*)位于 *i* 和 *o* 之间(图 15-2)。

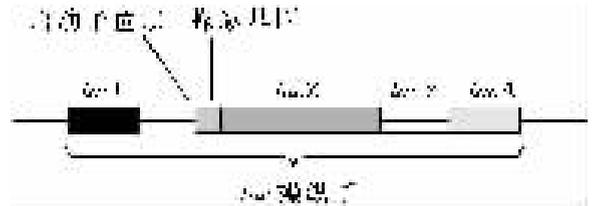


图 15-2 乳糖操纵子的结构

(二) 乳糖操纵子表达的调节

乳糖操纵子表达的调节可分为负性调节和正性调节。

1. 阻遏蛋白的负调节

当培养基中存在葡萄糖时,乳糖操纵子处于阻遏状态。此时 *i* 基因编码的阻遏蛋白结合在操纵基因的大沟内,并不破坏 DNA 的碱基配对及双螺旋结构。但阻遏蛋白既可阻断操纵基因的转录又可阻断远端结构基因——*lacZ*、*lacY* 和 *lacA* 的转录。然而,即使在阻遏状态,*lac* 也存在极低水平的基础表达,有少量的酶生成。当乳糖成为培养基的主要碳源时,在少量透酶(5~6个透酶分子/*E. coli* 细胞)的作用下,少数乳糖分子进入细胞,又在少量 β -半乳糖苷酶分子的作用下转变成异乳糖(*allolactose*, 半乳糖与葡萄糖以 α -1,6 糖苷键相连),异乳糖才是真正的 *lac* 操纵子的诱导物。异乳糖与阻遏物结合后,阻遏物从操纵基因上脱落,结构基因开始转录。大量的 mRNA 翻译出大量的 β -半乳糖苷酶和透酶,使 *lac* 操纵子更大限度地去阻遏,产生大量的可分解乳糖的酶。这样,细菌便可以大量地利用乳糖。

2. CAP 的正调节

当大肠杆菌处于葡萄糖和乳糖均可作为碳源的环境中时,大肠杆菌首先代谢葡萄糖,然后暂停生长直至 *lac* 操纵子基因被诱导。此现象最初被认为是 *lac* 操纵子被葡萄糖的分解产物所阻遏,因此称它为分解代谢物阻遏。现在已明确所谓的“分解代谢物”实际上是称之为“分解代谢物基因激活蛋白(*catabolite gene activator protein*, CAP)”的蛋白质。CAP 是一个同二聚体,具有与 DNA 和 cAMP 结合的结构域。CAP 与 DNA 结合的部位含有螺旋—转角—螺旋模体。细胞核内 cAMP 的浓度受葡萄糖代谢的调节,当缺乏葡萄糖时, cAMP 浓度增高, cAMP 与 CAP 形成的 cAMP-CAP 复合物可结合到 *lac* 启动基因上游的 CAP 位

点(图 15-3) 激活 RNA 聚合酶,使转录增强约 50 倍。

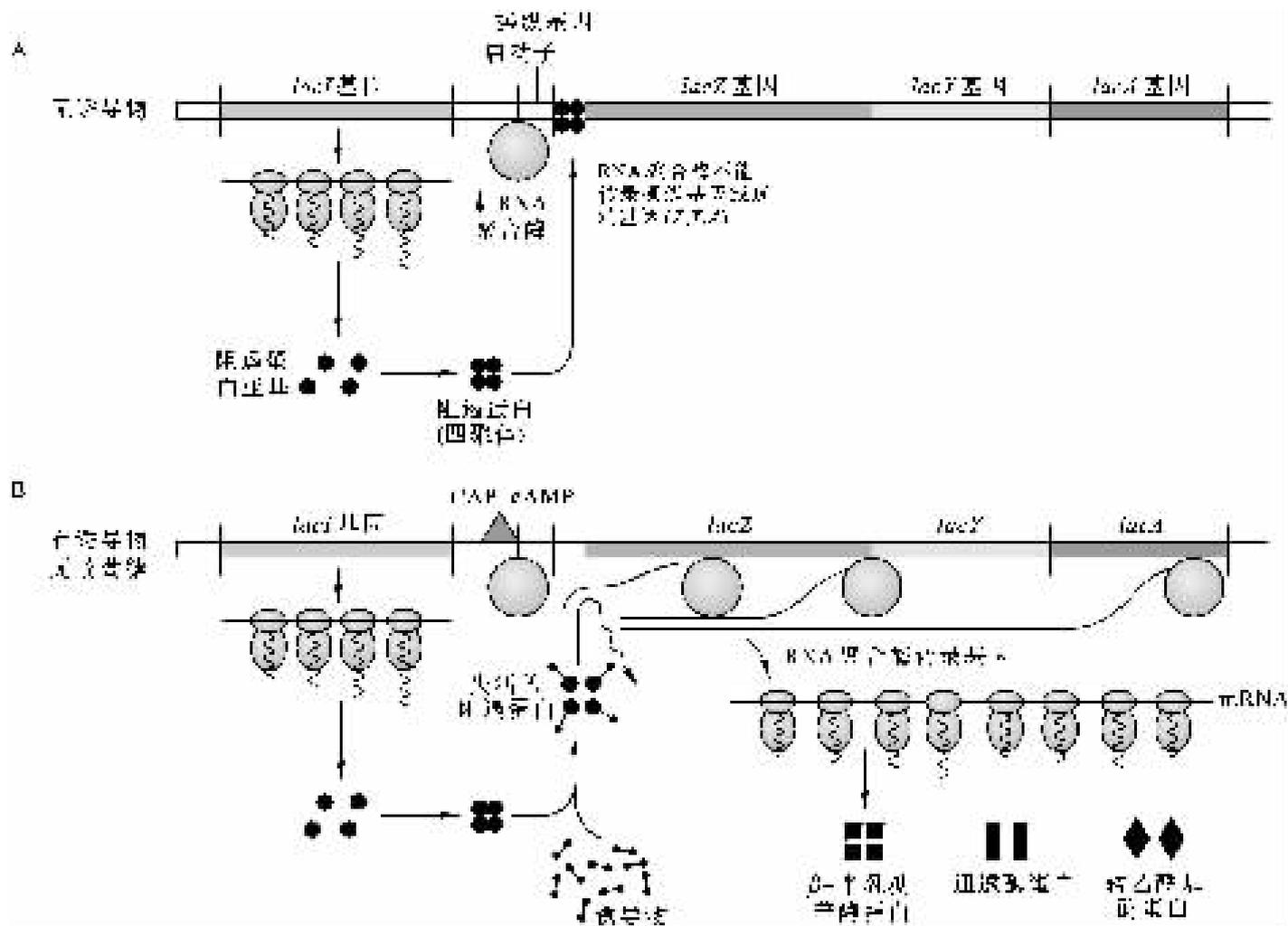


图 15-3 乳糖操纵子对基因表达的调节

二、色氨酸操纵子

在细菌中,合成氨基酸的酶也是以操纵子的形式存在的。当细菌缺乏某种氨基酸时,相应的操纵子被诱导转录,而当某种氨基酸供应充足时,相应的操纵子就被关闭。色氨酸操纵子(*trp* operon)负责大肠杆菌色氨酸的合成,是一种阻遏型操纵子。当培养基中富含色氨酸时,色氨酸操纵子被阻遏关闭;而相反时,色氨酸操纵子被诱导开放。基因开放受转录衰减作用的调节。

(一) 色氨酸操纵子的结构

色氨酸操纵子包括调控区和结构基因区。结构基因区包括 *trpE*、*trpD*、*trpC*、*trpB* 和 *trpA* 五个基因。*TrpE* 和 *trpD* 分别编码邻氨基苯甲酸合成酶复合物的两个亚基;*trpC* 编码吲哚甘油-3-磷酸合成酶;*trpB* 和 *trpA* 分别编码色氨酸合成酶的 β 和 α 亚基。上游调控区包括调节基因(*R*)、启动子(*P*)、操纵基因(*O*)和衰减子(attenuator *a*)。P 基因和 O 基因有部分重叠(图 15-4),R 基因编码 *trp* 阻遏蛋白,衰减子为长度为 162 bp 的 DNA 序列。

(二) 色氨酸操纵子转录的调控机制

trp 阻遏蛋白是同二聚体。当色氨酸丰富时,色氨酸与色氨酸阻遏蛋白结合,引起阻遏蛋白的构象发生改变,并使之与操纵基因 O 结合,阻碍 RNA 聚合酶与启动子的结合而抑制转录。阻遏机制决定转录是否启动,是 *trp* 操纵子的粗调开关。一旦转录开始,转录速率就受转录衰减子的精细调节。

只要培养基中含有一定量的色氨酸,操纵基因就会转录生成含 140 个碱基的 mRNA。经序列分析表明,该 mRNA 的 4 个区段(标为 1、2、3 和 4)可以不同的方式进行碱基配对(图 15-5)。有时以 1-2 和

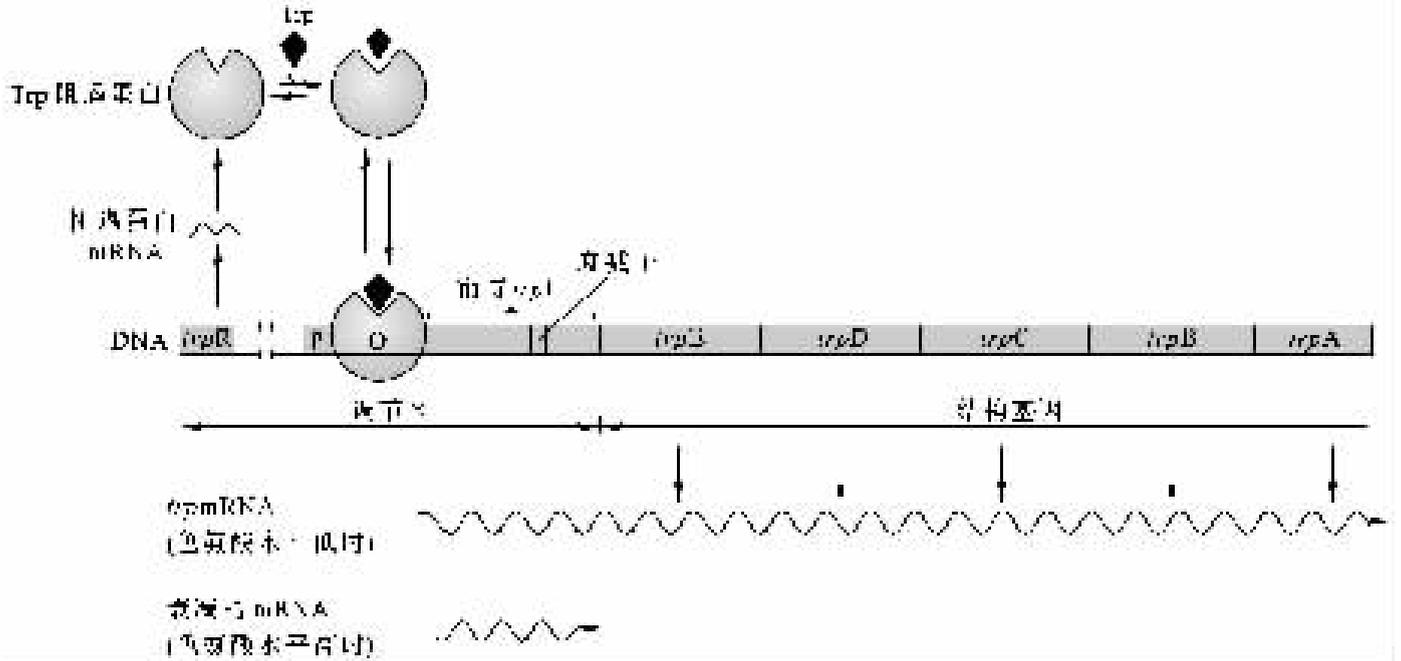


图 15-4 色氨酸操纵子的结构

3-4形式配对,有时只以2-3形式配对。3-4配对的茎环结构之后紧跟着多聚U,是不依赖 ρ 因子的转录终止子。此外,该mRNA中还含有翻译起始密码子AUG和终止密码子UAG。该mRNA的1区可翻译出由14个氨基酸残基组成的前导肽(leader peptide),此前导肽的第10位和第11位均为色氨酸残基。前导肽中这两个色氨酸与转录衰减作用密切相关。由于在原核生物中,转录与翻译同步进行。核糖体在mRNA上占据一定的位置。当菌体中色氨酸过量时,因有足量的色氨酸用于合成前导肽,于是核糖体便顺利合成前导肽,并继续向前与2区结合。核糖体与1、2区的结合,使3、4区自由地形成使转录终止的3-4环茎结构,这一信号使RNA聚合酶终止转录。

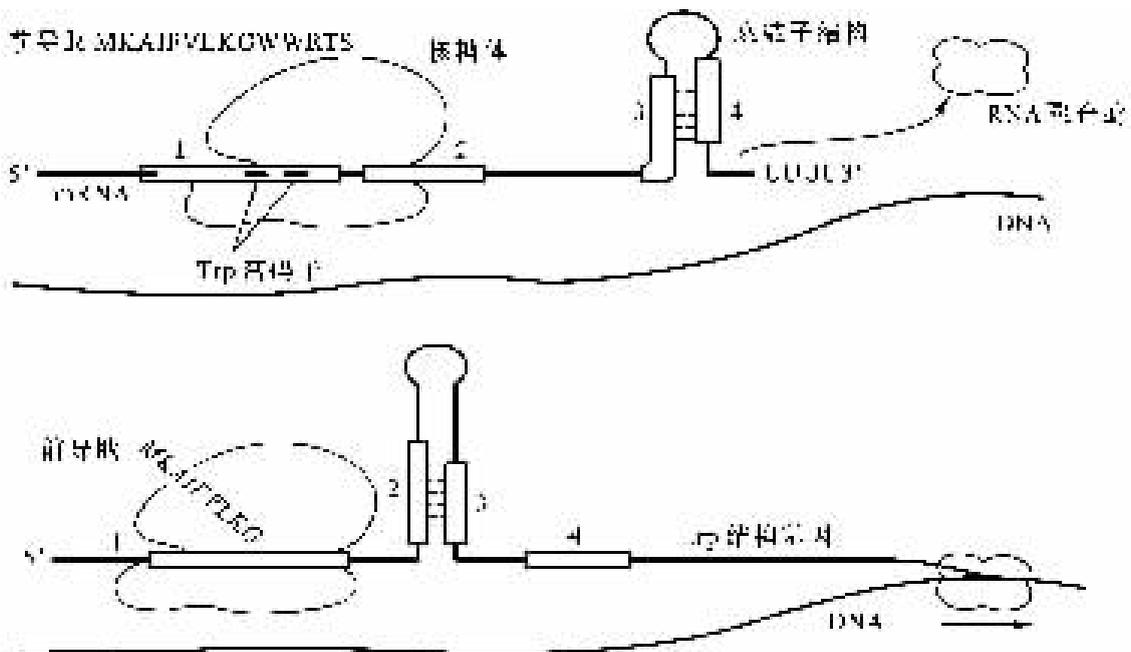


图 15-5 色氨酸操纵子对转录的调控机制

当培养基中色氨酸的浓度降低时,色氨酸-tRNA^{Trp}也减少。当翻译经过前导肽的这两个色氨酸部位时就会出现暂停。这时核糖体正好占据1区,由于2-3配对比3-4配对更稳定,所以2-3配对形成茎环结构,而不形成3-4配对的终止结构,RNA聚合酶继续进行转录进入5个结构基因,使其得以转录。

色氨酸操纵子的转录衰减作用是通过操纵子前导区内存在的类似终止子结构的一段 DNA 序列实现的,这段 DNA 序列称为衰减子。衰减子转录的 mRNA 片段通过构象改变,形成终止转录的茎环结构,使 RNA 聚合酶无法对色氨酸操纵子的结构基因进行转录。而此终止转录的茎环结构的形成又有赖于核糖体在前导序列进行的翻译。核糖体如何进行翻译又有赖于环境色氨酸的供应如何。可见衰减作用的精细调节是通过转录和翻译的偶联实现的。

第三节 真核生物基因表达的调控

在原核生物中,大多数 DNA 被组织成基因,而在真核生物中,只有较少部分的 DNA 组成基因及有关的调控区。其余冗长的 DNA 功能尚不清楚。而且真核生物的 DNA 与蛋白质结合形成具有高级结构的染色质。因此,真核生物基因表达调控有其自身的特点。

一、真核生物基因表达调控的分子结构基础及基因表达调控的特点

与原核生物相似,转录的调控也是真核生物基因表达的主要控制点。但真核生物的核小体是染色质的基本单位。结构的不同使真核基因表达调控与原核生物也有区别。真核基因转录特点为:

(一) 基因被激活时使转录区染色质结构发生变化

激活基因的染色质最主要的结构变化是:

1. 对 DNase I 的敏感性增高

用 DNase I 处理脊椎动物的细胞核时,10% 的基因组有选择地被酶降解。超敏感点常位于正在转录或具有潜在转录活性的基因。敏感区的核小体包装较为疏松,主要为已经起始或即将起始转录的基因的 5'侧翼区,也可出现于它们的 3'侧翼区甚至于转录区内。

2. 核小体结构的变化

核小体由两组 H_2A 、 H_2B 、 H_3 和 H_4 组成的八聚体及其包绕八聚体二圈的 DNA 组成。当启动子、增强子结合蛋白在启动子区活性转录起始复合物中与基础转录因子相互作用, RNA 聚合酶进入核小体的第一圈 DNA 时,促进与第一圈 DNA 接触的 H_2A-H_2B 二聚体与 H_3-H_4 四聚体分离,使 RNA 聚合酶有可能向前移动(图 15-6),完成第一圈 DNA 转录后, H_2A-H_2B 二聚体又与 H_3-H_4 四聚体结合。当

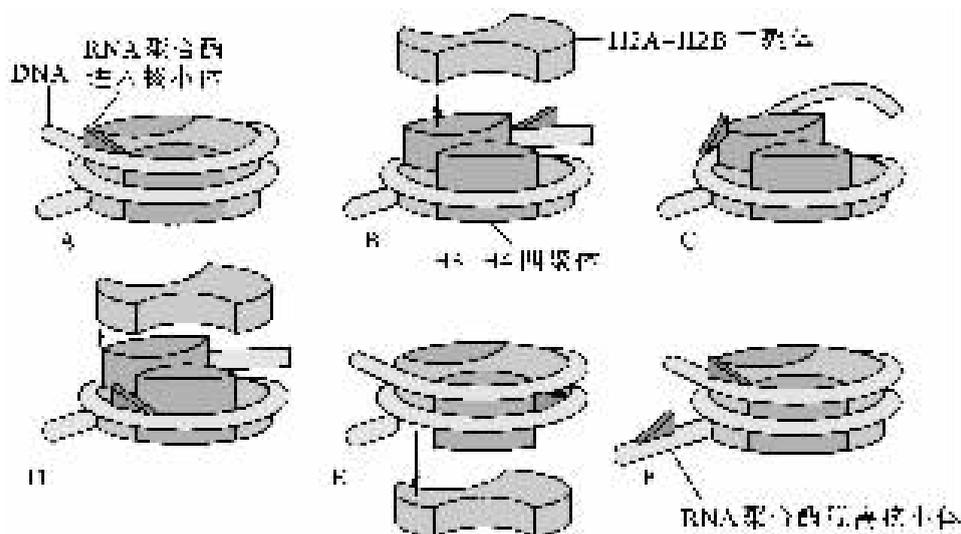


图 15-6 核小体核心结构与 RNA 聚合酶 II 的转录

RNA 聚合酶进入核小体的第二圈 DNA 时,促进与第二圈 DNA 接触的 H_2A-H_2B 二聚体与 H_3-H_4 四聚体分离,使转录不断进行。当该核小体完成转录后,核小体恢复原有结构。

3. DNA 碱基的化学修饰

在真核生物中,5%的胞嘧啶环的5位甲基化,并与其3'的鸟嘌呤形成 CpG 结构。发生在基因5'侧翼区的 CpG 结构又称 CpG 岛。甲基化范围与基因转录呈反比关系,处于转录活化状态的基因的 CpG 序列呈低甲基化状态。

4. 组蛋白的磷酸化和乙酰化

H3 和 H4 是组蛋白修饰酶的主要底物。其氨基端的磷酸化和乙酰化可影响核小体的稳定性。H3 和 H4 的氨基末端的赖氨酸被乙酰化后,核小体间的 DNA 产生过多的负超螺旋而使核小体脱落,有利于转录调控因子的结合。

(二) 正调节占主导地位

尽管正、负调控在真核细胞的基因表达中均可见,但正调控机制占主导地位。

(三) 时空差别使真核基因的表达调控更为复杂、有序

在原核生物中,基因转录的同时就进行翻译。在真核生物中,转录发生于核内,而翻译发生于胞质中。这种时空差别使真核基因的表达调控更为复杂、有序。

二、转录水平的调控

真核生物的转录调控是通过 DNA 上的碱基序列(顺式作用元件)和与其结合的蛋白质(反式作用因子)来完成的。反式作用因子通过与顺式作用元件的结合,改变 DNA 的构象,影响基因的转录。

(一) 顺式作用元件

按功能特性,顺式作用元件可分为启动子(promoter)、增强子(enhancer)和沉默子(silencer)。

1. 启动子

启动子与原核生物操纵子启动子具相似的功能。真核基因启动子是指 RNA 聚合酶的结合位点及其周围的转录调控序列。启动子包括至少一个转录起始位点以及一个以上的功能组件。每个功能组件含 7 ~ 20 bp 的 DNA 序列。这些组件有 -25 ~ -35 位的 TATA 盒(TATA box),一致保守序列为 TATA-AAA; -70 ~ -80 的区域内有 CCAAT 序列(CAAT box); -80 ~ -110 含有 GCCACACCC 或 GGC CGG 序列(GC box)。TATA 盒是基本转录因子 TF II D 的结合位点,它能控制转录的准确性及频率。典型的启动子由 TATA 盒及上游的 CAAT 和 GC 盒序列组成。这种启动子通常有一个转录起始位点和较高的转录活性。但是还有许多启动子并不含有 TATA 盒,这些基因可分为两类,一类的启动子区富含 GC 序列,这一类启动子常见于持家基因。它一般含有数个分离的转录起始位点。另一类启动子既不含 TATA 盒又没有 GC 富含区。这些启动子可有一个或多个转录起始点,大多数转录活性很低或根本没有转录活性,而是在胚胎发育、组织分化或再生过程中受调节。

2. 增强子

增强子是远离转录起始位点(1 ~ 30 kb),通过启动子来增强基因表达的调控元件。最初在猿猴病毒 40(SV40)的基因组中发现增强子,它存在于启动子5'上游约200 bp 的 DNA 片段,将其接在其他基因的旁侧,可促使这些基因的转录效率提高100倍。增强子的一般跨度为100 ~ 200 bp,其基本的核心组件常由8 ~ 12 bp 组成,可以有完整的或部分的回文结构,并以单拷贝或多拷贝的形式存在,它决定基因表达的时、空性。增强子有以下特点:①可提高同一条链的靶基因的转录效率;②对细胞和组织有很强的特异性。但对所作用的基因无专一性,提示增强子的作用需要专一性的转录因子;③增强子的效应与位置和方向无关。增强子可在基因的5'上游、基因内或3'下游序列中;④增强子的活性与其在 DNA 双螺旋结构中的空间方向性有关。

3. 沉默子

在 DNA 中,有些调控序列对转录有抑制作用,当这些位点被阻遏物占据,可使其附近的启动子失活,基因便不能表达,这种调控序列就称为沉默子。

(二) 反式作用因子

反式作用因子又称转录因子,是能直接或间接地识别或结合在各顺式作用元件 8 ~ 12 bp 核心序列上,参与调控靶基因表达效率的蛋白质。按其功能特性将转录因子分为三类:基本转录因子、转录激活因子和转录抑制因子。

1. 基本转录因子

基本转录因子是帮助 RNA 聚合酶 II 与启动子结合所必需的一组蛋白质,它们能帮助识别 TATA 盒和帮助起始转录。所有的结构基因的转录均需要基本转录因子,它们包括 TF II A、TF II B、TF II D、TF II E、TF II F 和 TF II H。

2. 转录激活因子

凡是通过蛋白质-DNA、蛋白质-蛋白质相互作用对转录起正性调节作用的蛋白质因子均称做转录激活因子。

3. 转录抑制因子

转录抑制因子与基因的调控序列结合可以抑制转录。

转录因子至少包括两种不同的结构域:DNA 结合结构域和转录活化或抑制结构域。

(1) DNA 结合结构域 DNA 结合结构域通常由 60 ~ 100 个氨基酸残基组成,通过其分子表面上所包含的能直接或间接地与各顺式作用元件的 8 ~ 12 bp 核心元件相结合的模体,发挥调节作用。模体主要包括以下几种类型。

① 螺旋-转角-螺旋模体。蛋白质分子中的两个 α 螺旋通过一段短肽形成的“转角”连接(见第二章图 2-12)。HTH 结构通常以二聚体的形式结合于 DNA 相邻的两个大沟中。

② 锌指模体。锌指模体由氨基端的 2 个反向平行的 β 折叠和羧基端 1 个 α 螺旋组成。在锌指结构的 N-端有两个相近的半胱氨酸,在 C-端有一对相邻的组氨酸(或半胱氨酸),它们在空间上形成一个能容纳 Zn^{2+} 的洞穴,而且洞穴内的 Zn^{2+} 能与这 4 个氨基酸残基配位连接而形成手指样的形状(见第二章图 2-13)。 α 螺旋上的碱性氨基酸与 DNA 大沟结合,由于重复出现的 α 螺旋几乎连成一线,使含锌指结构域的蛋白质与 DNA 的结合非常牢固(图 15-7)。由于锌指结构的氨基酸组成不同,尽管它们有相同的形状但不同的锌指结合于各自特异的 DNA 序列。

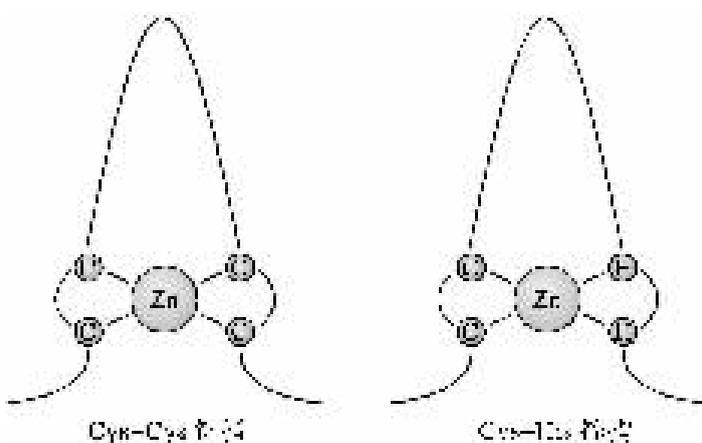


图 15-7 锌指结构

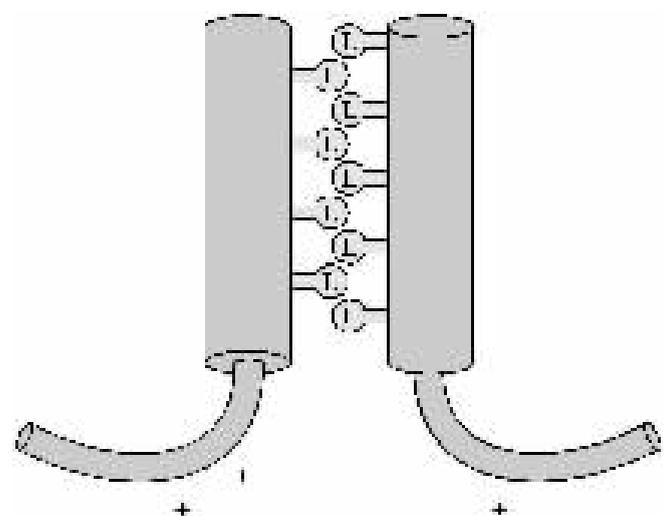


图 15-8 亮氨酸拉链

③ 碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)模体。碱性亮氨酸拉链可形成结合 DNA 的二聚体结构域。每个单体构成半个拉链,它具有形成 α 螺旋的特点,其中每隔 6 个氨基酸就有 1 个亮氨酸或疏水氨基酸,导致第 7 个亮氨酸或疏水氨基酸残基都在 α 螺旋的同一侧出现。另一个单体可通过疏水键与它形成二聚体,由于两分子 α 螺旋的亮氨酸一侧形成二聚体的基础形同拉链而因此得名(图 15-8)。然而拉

链并非直接结合 DNA,而是蛋白质的氨基端富含能与 DNA 结合的碱性氨基酸。若蛋白质不形成二聚体则碱性区对 DNA 的亲合力明显降低。由此可见,碱性区和亮氨酸拉链是作为一个整体与 DNA 结合的。

(2) 转录活化结构域 在真核生物中,由于蛋白质-蛋白质的相互作用,使反式作用因子的调节变得十分精密、复杂。完整的转录调节通常以复合物的方式来完成,这就意味着并非每个转录因子都需要与 DNA 直接接触,但转录活化结构域成为反式作用因子中唯一必须具备的结构。这表明调节蛋白质的 DNA 结合结构域和转录活化结构域是独立的和非相互作用的。转录活化结构域有以下几种类型:① 带负电荷的 α 螺旋结构域。它能与 TF II D 复合物中某些通用因子或 RNA 聚合酶 II 结合,并有稳定转录起始复合物的作用。② 富含谷氨酰胺的结构域。与启动子 GC 盒结合的蛋白 SP1 除了有锌指结构外,还有 4 个参与转录活化的区域。这些转录活化区均富含谷氨酰胺,占该区域氨基酸总数的 25% 左右。③ 富含脯氨酸的结构域。由于脯氨酸的含量可高达 20% ~ 30%,该结构域很难形成 α 螺旋。④ 不规则的含有双性 α 螺旋和酸性氨基酸的结构域。

三、转录后的调控

由于真核细胞有胞质和胞核之分,基因的转录和翻译有了时空的差异,而且真核基因有外显子和内含子之分,因此基因转录后的加工等的调节也是基因表达调控的一个重要方面。转录后的调控包括对转录本的剪切、加尾及编辑等方面。

(一) 初级转录本加工

由于基因长度和性质的差异,初级转录本很不均一,因此被称为不均一核 RNA(hnRNA)。从基因转录出的初级转录本平均长度为 7 000 个核苷酸,有些甚至大于 20 000 个核苷酸。

1. 初级转录本的 5'加帽、3'加尾和剪接(见第十三章)。

2. RNA 的编辑

RNA 编辑(RNA editing)是 RNA 分子出现的一种修饰现象,DNA 在转录成 hnRNA 后,通过插入、删除或碱基替换而改变 DNA 模板原来的某些遗传信息。RNA 编辑是通过个别碱基的更换使一个基因表达出多个氨基酸序列不同的蛋白质。其结果是既扩大了遗传信息又使生物能更好地适应生存环境。常见的替换有 C→U 替换和 A→I 替换。

RNA 替换最典型的例子是 Apo B 的 RNA 的编辑。VLDL 内的 Apo B 是 Apo B 100,乳糜微粒内的 Apo B 是 Apo B 48,后者只保留了前者 N 端的 48%。其原因是在编辑酶的催化下,初级转录本第 6 666 位碱基脱氨基由 C 转变成 U,使编码谷氨酰胺的 CAA 转换成终止密码 UAA,从而产生了编码 Apo B 48 的 mRNA。

(二) mRNA 的稳定性

mRNA 的稳定性实际上就是 mRNA 的寿命。与原核细胞的 mRNA 相比,真核细胞的 mRNA 有相对较长的半衰期。大量稳定的 mRNA 的累积,能增加蛋白质的表达。

mRNA 以核糖体蛋白颗粒存在于胞质内,蛋白即能保护某些 mRNA 不被核酸酶消化,又能促进另一些 mRNA 被核酸酶消化。这可能是由于蛋白质与不同序列和结构的 RNA 相互作用使其稳定或去稳定。似乎 mRNA 分子的末端参与 mRNA 稳定性的调节。真核生物 mRNA 5'帽结构阻止 5'核酸外切酶的攻击。Poly A 尾巴阻止 3'核酸外切酶的攻击。若 mRNA 3'非翻译区出现 AUUUA 序列,则具有很短的半衰期。

第四节 翻译和翻译后水平的调控

一、翻译水平的调控

翻译水平的调控是真核生物基因表达多级调控的重要环节之一。翻译水平的调控主要表现在对 mRNA 的识别、蛋白质合成的起始和延长的调控。

在蛋白质合成的过程中,特别是起始反应中,mRNA 的帽子结构和二级结构、与核糖体 RNA 的互补性、起始密码子附近的核苷酸序列等都是蛋白质翻译的信号系统。细胞内的帽子结合蛋白(cap binding protein)能专一识别帽子结构,从而提高翻译效率。蛋白质的生物合成的调控就是通过 mRNA 本身所固有的信号与一些可溶性的蛋白因子和核糖体之间的相互作用来实现的。

二、翻译后水平的调控

基因经转录与翻译最终合成了蛋白质,一般来讲,这些新合成的蛋白质还需要进行一系列的加工才能成为有活性的蛋白质。加工成熟包括蛋白质的切割、蛋白质化学修饰、蛋白质的剪切、蛋白质的折叠和蛋白质的定位(见第十四章)。蛋白质翻译后的加工也是基因表达调控的一种手段。

Summary

Transcription and translation is called gene expression. The process in which the gene encoding rRNA and tRNA produces RNA is also called gene expression. There are many regulation levels in the process of gene expression, including pre-transcription, transcription, post-transcription, translation and post-translation, and above all the transcription regulation is the most important. The regulation of gene expression is divided into the positive regulation and the negative regulation, or the inducible and the repressible regulation. The regulation of the cis-acting elements of a special gene for the transcription activity of the gene is the cis-acting regulation, while that of the trans-acting elements is the trans-acting regulation. The trans-acting elements control the gene expression only through the cis-acting elements. The gene expression shows the strict temporal and spatial specificity, the former is called stage specificity, the latter is called cell or tissue specificity.

The elements related to gene expression in prokaryotes mainly include the promoter, the sequence of transcriptional termination and the binding site of ribosome. The great majority of prokaryotic genes are controlled by the operon model. The *lac* operon have three structure genes (*z*, *y*, *a*), one operator gene(*o*), one regulator gene(*i*) and one promoter gene(*p*). The control of *lac* operon is divided into the positive and the negative. Once the repressor, which is coded by the regulator gene is bound to the operator gene, DNA-dependent RNA-polymerase can not initiate the process of transcription of the operator gene and the structure genes. There is a binding site of the catabolite gene activation protein(CAP) in the upstream of the promoter gene. When short of glucose, the concentration of cAMP in the cell goes up. cAMP-CAP compounds bind to the CAP site in the upstream of *lac* promoter gene, thus conducting the positive regulation. The *trp* operon is repressible, and is repressed or closed when tryptophan accumulates in the cell and the media. Conversely, the decrease of tryptophan can induce the expression of the *trp* operon. In addition, there are other control mechanisms for

gene expression such as the transcriptional attenuation. Similar to prokaryote ,the main control sites in eukaryote are also at the transcriptional level. Because of the different structures ,there are the differences in the control mechanisms of gene expression between prokaryotes and eukaryotes. In eukaryotes ,the activation of gene alters the chromatin structure of transcriptional region. Although there are two kinds of mechanisms ,the positive and the negative ,the former predominates over the latter in the control of eukaryotic gene. The eukaryotic transcription occurs in the nucleus ,and the translation in the cytoplasm. The gene expression in eukaryotes is controlled by the common effects of the cis-acting elements and the trans-acting elements combined with them. These trans-acting elements can alter the DNA conformation and affect the transcription. According to their function ,the cis-acting elements are divided into the promoter ,the enhancer and the silencer. The eukaryotic promoter is the binding site of RNA-polymerase and its control sequence nearby. The enhancer is the control elements which is separated from the transcriptional initiation site by 1 ~30 kb and can advance the expression through promoter. The trans-acting factor is also called the transcriptional factor. According to their function feature ,the transcriptional factors are divided into three kinds ,the general transcriptional factor ,transcriptional activator and transcriptional inhibitor. The transcriptional factor has at least two different kinds of domains ,the DNA binding domain and the activation domain or the inhibition domain. The DNA binding domain primarily includes the helix-turn-helix ,the zinc finger ,the basic leucine zipper motif. The control of post-transcription has splicing ,tailing ,editing and others. The translational control is primarily associated with the recognition of mRNA ,the initiation and elongation of protein biosynthesis. The post-transcriptional modification of protein also provides a control matters for gene expression.

思 考 题

1. 基因表达调控有哪些类型？
2. 基因表达调控的特点是什么？
3. 以乳糖操纵子和色氨酸操纵子为例说明原核生物基因表达的特点。
4. 真核基因表达调控的特点是什么？
5. 何谓顺式作用元件和反式作用因子？

(宋惠萍)

第十六章 癌基因、抑癌基因与生长因子

本章教学要求

- 细胞癌基因、抑癌基因、生长因子的基本概念
- 癌基因活化机制
- 抑癌基因失活机制

正常情况下,机体细胞的生长(growth)、增殖(proliferation)和分化(differentiation)在多种因素的调控下有条不紊地进行。细胞的正常生长与增殖主要受具有正、负调节信号的两大类基因表达产物的调控。正调节信号促进细胞生长和增殖,并阻止其发生终末分化;负调节信号抑制细胞增殖、促进分化、成熟和衰老,最后凋亡(apoptosis)。负调节信号以抑癌基因(tumor suppressor gene)及其编码的蛋白质为代表,正调节信号以癌基因(oncogene 或 cancer gene)及其表达产物为代表。一些癌基因编码的类生长因子多肽及其受体分子可通过细胞内信号转导系统刺激细胞增殖和分化。当体细胞因调控失衡获得自主生长能力时,细胞便持续地分裂与增殖,导致恶变(canceration)而成为肿瘤细胞。然而,恶性肿瘤的发生机制至今尚未完全明了,目前比较一致的看法是:它的发生是多因素、多阶段、多基因参与和长期发展结果的积累,与癌基因激活、抑癌基因的失活和多种生长因子的参与密切相关。从名称上来看,抑癌基因似乎总是与癌基因的功能相拮抗,但事实上,这两种基因的功能在癌症的发生中是相互协调的。当这两类基因中任何一种或它们共同发生变化,即有可能引起细胞生长和增殖失控而导致肿瘤的发生。

目前,癌基因已成为细胞生物学、分子生物学、分子遗传学和肿瘤发生学等学科的研究热点,也构筑了这一多学科协同研究的交叉研究领域,并且越来越多的实验研究和临床资料表明,抑癌基因、癌基因和生长因子等在肿瘤发生、发展、转移及转归的过程中起着重要的作用。

第一节 癌 基 因

一、病毒癌基因和细胞癌基因

(一) 概念

病毒(Virus)是一类体积微小、能透过滤菌器,只能在活细胞内生长、增殖的非细胞形态微生物,其化学本质是某种类型的核酸(RNA 或 DNA)。无论是DNA病毒还是RNA病毒感染细胞后,其遗传物质均有可能整合于染色体,改变细胞原有蛋白质的表达谱或影响宿主细胞某些基因的表达,引起细胞调控的紊乱而诱导肿瘤的发生。1910年Peyton Rous等从鸡肉瘤滤液中发现了第一个逆转录病毒(retrovirus),即Rous肉瘤病毒(Rous sarcoma virus, RSV),并证明该鸡肉瘤滤液可诱发新的肿瘤,推测RSV是诱发鸡肉瘤的原因。当时,Rous虽对RSV如何引起肿瘤并不清楚,但因开创了病毒与肿瘤发生关系的研究而获得了1966年诺贝尔医学与生理学奖。随后,这个推测通过Steven Martin的温度敏感突变株tsRSV的转化实验、Peter Vogt的转化缺陷株tdRSV基因缺失研究而得到证实。将RSV中一段能诱导肿瘤发生及细胞转化的有关核苷酸序列命名为病毒肉瘤基因(V-src),大大激发了科学家对癌基因的研究热情。

癌基因就是具有增加癌源性或转化潜能,在一定条件下导致其编码区或调节区域遗传性状发生改变

的基因。癌基因可分为两大类：一类是致癌病毒中能在体内诱发肿瘤并在体外引起细胞转化的基因，即病毒癌基因(viral oncogene, *V - onc*)；另一类是存在于细胞基因组中、正常情况下处于静止或低水平(限制性)表达状态，对维持细胞正常功能具有重要作用，当受到致癌因素作用被活化而导致细胞恶变的基因，即原癌基因(protooncogene, *pro - onc*)或称细胞癌基因(cellular oncogene, *C - onc*)。

癌基因的名称一般由 3 个小写字母(斜体字)表示，这通常源于它们的首次发现，有时这 3 个编码字母后面跟一个字母或数字。如 *erb* 癌基因源于它首次发现于成红细胞增多症(erythroblastosis)病毒，现已分为 *erbA* 和 *erbB* 两类。*erbA* 是甲状腺激素受体的病毒类似物，*erbB* 是表皮生长因子受体的同源类似物。

(二) 病毒癌基因和对应原癌基因的比较

用标记的病毒癌基因为探针，可在人、哺乳类等脊椎动物基因组中检测到与病毒癌基因同源的序列，即原癌基因。这些原癌基因的限制性表达产物具有促进细胞生长、增殖、分化和发育等生理功能，属于正常的调节基因。细胞原癌基因外显子序列在进化上极为保守，被称为持家基因，说明这类基因的表达产物在生命活动中是必需的。当其受到某些化学、物理或生物性等因素刺激，原癌基因结构、数量等改变而被激活后才能使细胞发生恶性转化。

病毒癌基因和与其相对应的原癌基因比较，有序列的同源性和相似表达产物，但病毒癌基因经过病毒自身改变修饰，和对应的原癌基因比较，主要存在以下一些差别：

1. 病毒癌基因无内含子，而原癌基因通常有内含子或插入序列。
2. 病毒癌基因较原癌基因有较强的转化细胞功能，其原因在于病毒癌基因与同源的原癌基因在外显子序列中存在着微小的差别。
3. 病毒癌基因常会出现碱基取代或碱基缺失等突变，而原癌基因则较少发现这类突变。
4. 病毒癌基因通常丢失了原癌基因两端的某些调控序列，而在病毒高效启动子作用下有较高的转录活性。

(三) 癌基因的分类

目前已发现的原癌基因有百余种，普遍存在于生物细胞中，依据其基因结构与功能特点可将大部分原癌基因归于以下几个家族。

1. *src* 家族：包括 *src*、*abl*、*fes*、*fgr*、*fps*、*fym*、*kck*、*lck*、*lyn*、*ros*、*tkl* 和 *yes* 等基因，*src* 是最早被发现的癌基因。其表达产物的氨基酸序列具有较高同源性和酪氨酸蛋白激酶活性以及同细胞膜结合的性质，定位于胞膜内侧或跨膜分布。

2. *ras* 家族：包括 3 类密切相关的成员，即 *H - ras*、*K - ras* 及 *N - ras*。虽其核苷酸序列的同源性较少，但编码蛋白质的相对分子质量均为 21 000，即 p21。其表达产物多属传递信号的小 G 蛋白，能结合 GTP，有 GTP 酶活性，并参与细胞内 cAMP 水平的调节(见第十九章 细胞信号转导)。

3. *myc* 家族：包括 *c - myc*、*L - myc*、*N - myc*、*fos*、*myb*、*ski* 等基因，其表达产物定位于细胞核内，为 DNA 结合蛋白类，或为转录调控中的反式作用因子，有直接的调节其他基因转录的作用。

4. *sis* 家族：目前认为 *sis* 基因仅有一个成员。其表达产物与血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)结构相似，可促进间叶组织的细胞增殖。

5. *erb* 家族：包括 *erb - A*、*erb - B*、*fms*、*mas*、*trk* 等基因，其表达产物是生长因子和蛋白激酶类。

6. *myb* 家族：包括 *myb* 和 *myb - ets* 复合物等基因，其表达产物为核内转录调节因子，能与 DNA 结合。

根据表达产物的功能和定位可将原癌基因分为以下几类：

1. 蛋白激酶类

(1) 跨膜生长因子受体，包括 *erbB*、*fms*、*kit*、*neu*(*erb - 2*、*HER - 2*)、*ret*、*sea* 等基因。

(2) 膜结合的酪氨酸蛋白激酶，包括 *src*、*abl*、*fes*、*fgr*、*fps*、*fym*、*kck*、*lck*、*lyn*、*ros*、*tkl* 和 *yes* 等基因。

(3) 可溶性酪氨酸蛋白激酶，包括 *met*、*trk* 等基因。

(4) 胞质丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，包括 *raf*(*mil*、*mht*)、*mos*、*cot*、*pl - 1* 等基因。

(5) 非蛋白激酶受体，包括 *mas*、*erb* 等基因。

2. 信息转导蛋白类

(1) 与膜结合的 GTP 结合蛋白,包括 *H-ras*、*K-ras*、*N-ras* 等基因。

(2) 生长因子类,包括 *sis*、*int-2* 等基因。

(3) 核内转录因子,包括 *c-myc*、*N-myc*、*L-myc*、*fos*、*jun* 等基因。

二、癌基因产物的功能

原癌基因表达产物的主要生理功能是调节细胞的生长、增殖、分化,并在细胞内信息转导过程中起十分重要的作用。这些功能均与正常细胞的增殖密切相关。细胞增殖需胞外信号的刺激,当刺激信号(如生长因子)与细胞膜受体结合后,引起细胞内一系列蛋白因子的活化,刺激信号经转导途径传入细胞内,通过反式作用因子的作用使多种与细胞增殖有关的基因表达,最终导致细胞进行有丝分裂。原癌基因编码产物多种多样,如生长因子、生长因子受体、信号转导途径中的各种蛋白、各种反式作用因子等,可作用于细胞增殖的各个环节,主要包括以下一些类型。

(一) 生长因子及其类似物

已知细胞可自分泌(autocrine)生长因子(growth factor,GF),该生长因子又可促进细胞自身的增殖作用而发生转化。Harry Antoniades 等人在研究已报道的 PDGF 氨基酸序列时,发现其序列与 *sis* 基因的编码蛋白序列同源性较高,*c-sis* 基因的编码蛋白与 PDGF β 链的同源性达 87%,因而可与细胞膜表面 PDGF 的受体结合,对细胞的生长、分裂和分化有重要的调节作用。当 *sis* 基因在含 PDGF 受体的细胞中过度表达,自分泌并引起细胞 PDGF 类似效应增高,导致细胞发生转化。至此,人们从分子水平上证实了癌基因的表达产物可通过促进细胞的增殖而诱发癌变,同时也证实了某些癌基因表达产物的自分泌可不断刺激细胞,造成大量生长信号的持续输入,使细胞增殖失控而导致细胞转化。属于生长因子类癌基因的还有成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)家族成员的 *int-2*、*hst* 和 *fgf-5*;表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)与转化生长因子(transformation growth factor- α ,TGF- α)家族成员的 *erbB*;wnt 家族 *int-1* 和 *int-3*;类胰岛素生长因子 I(insulin-like growth factor I,IGF I)等。并发现某些造血生长因子也具有使细胞转化的潜能,如白介素-2(interleukin-2,IL-2)、白介素-3(IL-3)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor,M-CSF)等,它们均在逆转录病毒整合试验中被发现。

(二) 生长因子受体类

某些原癌基因的表达产物为跨膜受体,主要有两类:一为酪氨酸蛋白激酶类受体,另一类为非酪氨酸蛋白激酶受体。酪氨酸蛋白激酶类受体在接受胞外生长刺激信号后,发生变构,并激活其胞内区的酪氨酸蛋白激酶活性,加速生长信号在胞内的传递而促进细胞的转化。非酪氨酸蛋白激酶受体在接受胞外信号刺激后,可与胞内的非受体型酪氨酸蛋白激酶结合,从而发挥其促进细胞转化的作用。编码具有酪氨酸蛋白激酶活性的跨膜生长因子受体的原癌基因有 *erbB*(编码 EGF 受体)、*K-sam*(编码 FGF 受体)、*fms*(编码 PDGF 受体)、*trk*(编码 NGF 受体)、*met*(编码 HGF 受体类似物);编码非蛋白激酶受体的原癌基因有 *mpl*(编码血小板生成素受体)和 *mas*(编码血管紧张素受体)等。

(三) 胞内信号转导蛋白类

当胞外生长因子与膜受体结合后,通过胞内一系列转导体(transducer)将生长信号传递到胞质内、核内,引起一系列相关基因的表达而促进细胞增殖。某些癌基因编码参与信号转导激酶级联反应过程的信号传递蛋白,如 *ras*(*H-ras*、*K-ras*、*N-ras* 等)基因表达产物是小 G 蛋白,参与细胞增殖信号在细胞内转导过程;另一些原癌基因表达与细胞增殖信号转导相关的胞内蛋白激酶,如 *mos*、*ros* 及 *raf* 等编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、*abl*、*src* 编码非受体性酪氨酸蛋白激酶、*crk* 则编码磷脂酶等。

(四) 核内转录因子

当胞外生长信号传入胞内,最终将导致一系列有关基因的表达,这些基因的表达将由信号转导过程中

所活化的转录因子决定,而部分转录因子亦可被活化为癌蛋白。某些癌基因编码与基因调控序列结合,并调节转录的反式作用因子,其表达产物定位于细胞核,在生长因子调控细胞增殖的过程中起重要的作用。这些癌基因主要包括 *fos* 家族(*c-fos*、*fs-B*、*fa-1*、*fra-2*)、*jun* 家族(*c-jun*、*jun-B*、*Jun-C*)、*myc* 家族(*c-myc*、*N-myc*、*L-myc*)、*myb*、*NF-κB* 家族(*rel*、*lyt-10*、*bcl-3*)等,在细胞受到生长因子刺激时,这些蛋白质可迅速表达,参与调节细胞生长、增殖、分化的过程。

三、原癌基因激活的机制

正常细胞含有百余种原癌基因,正常情况下,大部分细胞原癌基因处于相对静止状态,表达水平较低或无表达,其表达水平或表达产物及其活性在细胞内受到严格的控制,不但无致癌作用,还在正常细胞的分裂、增殖、成熟、分化等过程中,特别在个体发育早期具有重要作用。大量的研究资料表明,原癌基因结构与有活性的癌基因及相应的病毒癌基因均非常相似。当这些原癌基因在受到物理(如射线)、化学(如致癌剂)和/或生物(如DNA整合、病毒感染)等因素的作用后,可部分或全部被活化,表达异常使生长信号的转导偏离正常而引起细胞转化或肿瘤发生,此过程被称为原癌基因的激活。其激活可通过以下途径。

(一) 原癌基因点突变

在射线或化学诱变剂的作用下,某些原癌基因的单个碱基发生变异,导致DNA复制过程中错配(碱基替换),即点突变(point mutation)。碱基替换,尤其是密码子第一、二位碱基,往往会导致氨基酸的替换,蛋白质肽链中重要氨基酸的替换会严重影响其空间结构的形成。原癌基因的表达产物多具有促进细胞增殖的功能,当点突变发生后(1)该蛋白质的活性可能大大增强,对细胞增殖的刺激作用也增强(2)可能使该蛋白质的稳定性增加,导致其在胞内的浓度增加,对增殖刺激的时间和强度也随之增加(3)可能会引起RNA的错误剪接而改变蛋白质的结构和功能。原癌基因*ras*的活化就是一个典型的例子。*H-ras*基因由356个碱基组成,其第35位碱基(位于第一个外显子中第12个密码子)在正常细胞中为G,而在肿瘤细胞中突变为T,其编码的p21蛋白的第12位氨基酸由正常细胞的甘氨酸残基突变为肿瘤细胞的缬氨酸残基(如图16-1)。另外*ras*基因的点突变还可以发生在密码子13、59~69。突变引起其编码的蛋白质之间微小结构改变能造成功能上极大的差别,导致GTP酶活性的下降,使p21失去结合、水解GTP的作用。一些化学致癌剂如亚硝酸盐,可能引起鸟嘌呤6位上发生甲基化。在复制时该甲基化鸟嘌呤将与胸腺嘧啶配对,最终由GGC变为GAC,结果其p21蛋白的列序中甘氨酸残基被天门冬氨酸残基取代。

正常细胞 <i>H-ras</i> 基因碱基序列	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GCC	GCC	GCC	GGT	GTG
肿瘤 <i>H-ras</i> 碱基序列	ATG	ACG	GAA	TAT	AAG	CTG	GTG	GTG	GTG	GCC	GCC	GTC	GGT	GTG
正常细胞 p21 蛋白的氨基酸序列	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Val
肿瘤 <i>H-ras</i> 编码 p21 蛋白氨基酸序列	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	Ala	Val

图 16-1 *H-ras* 基因的点突变

(二) 原癌基因获得启动子与增强子

在多种人源性肿瘤的细胞株中可见 *c-myb* 和 *c-myc* 基因所转录出的 mRNA 显著增多,而在人骨肉瘤 u-20 S 细胞中可检测到多种形式的 *c-sis* 转录产物以及各种 PDGF 样多肽。造成上述原癌基因转录及表达水平增加的原因之一可能是这些基因获得了强的启动子(promoter)。某些不含 *V-onc* 的弱转化逆转录病毒,其前病毒含有强启动子和增强子的长末端重复序列(long terminal repeated sequence, LTR),若插入(insertion)到细胞癌基因邻近位置,便会使该细胞癌基因过度表达,导致肿瘤的发生。如禽类白细胞增生病毒(avian leukocytosis virus, ALV)并不含 *V-onc*,但 ALV 前病毒整合到宿主正常细胞的 *c-myc* 基因的上游,而 ALV 两侧的 LTR 同时整合,其 5'-端的 LTR 所含的强启动子致使 *c-myc* 癌基因活化而转录出 *c-myc* mRNA,使 *c-myc* 的表达比正常时增高几十甚至上百倍。有资料表明 *c-myc* 基因还会因获得上游远端的增强子被激活。此外 *c-erbB*、*H-ras*、*c-fos* 和 *c-nou* 都可因此类启动子或增强子(enhan-

cer)的插入而激活。

(三) 原癌基因甲基化程度降低

原癌基因 DNA 分子中的甲基化(methylation)对于保持其双螺旋结构的稳定、阻抑基因的转录具有重要作用。某些原癌基因(*H-ras*、*c-myc*)低甲基化和抑癌基因的高甲基化是细胞癌变的重要特征。有科学家发现在结肠腺癌和小细胞肺癌细胞中 *c-ras* 基因比其邻近的正常细胞的 *c-ras* 甲基化水平明显偏低,提示某些原癌基因因甲基化程度降低而激活。

(四) 原癌基因的扩增

原癌基因通过某些机制在原染色体上复制出多个拷贝,导致表达产物异常增多而加速细胞增殖。在人类恶性肿瘤中,癌基因扩增(amplification)现象比较常见。如在人类急性粒细胞白血病的 HL60 细胞株、结肠癌、乳腺癌及小细胞肺癌等多种肿瘤细胞中均证实有 *c-myc* 基因扩增;神经母细胞瘤中有 *N-myc* 扩增等。在某些肿瘤中相应癌基因表达蛋白量增加几十倍到上千倍。这些现象在临床肿瘤病例或实验性动物肿瘤中都能发现,说明原癌基因扩增是其激活的方式之一。

(五) 原癌基因的易位或重排

癌基因从所在染色体的正常位置上易位(translocation)至另一染色体的某一位置上,使其调控环境发生改变,从相对静止状态转为激活状态。在很多肿瘤中均可见异常染色体的存在。通过基因分部定位(gene walking)的研究,已证明在这些异常的染色体中某些部位发生了基因的易位或重排(rearrangement)。如早幼粒细胞白血病患者有(15:17)染色体的易位,而慢性粒细胞白血病患者费城(Philadelphia)染色体为 9:22 染色体易位形成的。目前受到普遍承认的是人 Burkitt 淋巴瘤细胞中,位于 8 号染色体上的 *c-myc* 易位到 14 号染色体上免疫球蛋白重链基因(Immunoglobulin heavy chain gene)的调节区附近,与该区的活性很高的启动子连接而受到激活。此外,慢性髓细胞性白血病细胞的 *c-abl* 基因可从 9 号染色体易位到 22 号染色体上的 *bcr* 基因旁,组成一个含 *bcr* 基因调节区和 *abl* 基因酪氨酸激酶活性区的融合基因(fusion gene)表达的融合蛋白质为结构功能改变的蛋白激酶(protein kinase)。此酶具有较高的酪氨酸蛋白激酶活性,很可能与 *abl* 基因所具有的转化活性有关。目前检测染色体的形态异常已成为某些肿瘤的临床辅助诊断指标。

不同的癌基因有不同的激活方式,一种癌基因可有几种激活方式。如 *ras* 基因的激活方式主要为突变,而 *c-myc* 的激活方式有基因扩增和基因重排两种,*c-myc* 的突变少见。也就是说,一种肿瘤可能有多种癌基因的表达增强,这一推论被 DJ Slamon 等人所证实。1983 年,他们以 15 种 V-onc 基因为探针,用斑点印迹(dot blotting)和 Northern blotting 等方法分析细胞癌基因在人恶性肿瘤中表达时发现,在被检的 20 种 54 例恶性肿瘤中均有两种或两种以上细胞癌基因表达的明显增加。

第二节 抑癌基因

一、抑癌基因的概念

抑癌基因,又称肿瘤抑制基因,大多编码与细胞周期调控有关的抑制蛋白,可调控正常细胞的生长。当抑癌基因发生缺失或突变时,细胞不能表达或表达无活性的抑制蛋白,细胞增殖失控而导致肿瘤的发生。与癌基因相比,它们的数量有限,说明比多样化的癌基因具有更普遍的作用,在人类癌症发生过程中具有至关重要的作用。

抑癌基因通常用 2 或 3 个字母来表示,有时也介入蛋白质产物的大小。如 *Rb* 是指视网膜母细胞瘤(retinoblastoma);*Bcl2* 指该基因首先在 B 淋巴细胞瘤(B-cell lymphoma)中被鉴定出,加入 2 用以区别同一种肿瘤型的另一个基因;*p53* 基因的命名是因其编码序列所翻译的蛋白的相对分子质量约为 53 000。基因的蛋白质产物可用其相对分子质量大小来表示,前面加 p 或与基因相同的代码。如 *p53* 基因产生

p53 蛋白 *ras* 基因产生 Ras 蛋白或 p21 蛋白。目前已被公认的抑癌基因有 10 余种, 详见表 16-1。

表 16-1 常见抑癌基因的一些生物学特性

基 因	染 色 体	基因产物及作用	主要相关肿瘤
APC	5q21	可能编码 G 蛋白	结肠癌
BRCA1	17q21	含锌指蛋白的转录因子	乳腺癌、卵巢癌
DCC	18q21	p192 细胞黏附分子	结肠癌
erb A	17q21	T3 受体, 含锌指结构的转录因子	急性非淋巴细胞白血病
NF-1	17p12	GTP 酶激活剂	神经纤维瘤、嗜铬细胞瘤、雪旺氏细胞瘤、神经纤维肉瘤
p16	9p21	p16 蛋白(CDK4,6 抑制剂)	黑色素瘤等多种肿瘤
P15	9q21	p16 蛋白(CDK4,6 抑制剂)	胶质母细胞瘤
p21	6q21	p21 蛋白(CDK4,6 抑制剂)	前列腺癌
p53	17p13	p53(转录因子)	星状细胞瘤、胶质母细胞瘤、结肠癌、小细胞肺癌、胃癌
PTEN	10q23	细胞骨架蛋白和磷酸酯酶	胶质母细胞瘤
Rb	13q14	p105(转录因子)	视网膜母细胞瘤、成骨肉瘤、胃癌、小细胞肺癌、乳癌、结肠癌
WT-1	11p13	含锌指蛋白的转录因子	WT、横纹肌肉瘤、肺癌、膀胱癌、乳癌肾母细胞瘤

抑癌基因根据其对细胞生长的作用, 是否可逆性抑制细胞增殖、分化和诱导凋亡等功能, 可分为以下两类(表 16-2)。

表 16-2 抑癌基因的功能分类

抑 癌 基 因	细胞生长的负调节作用
抑癌基因产物与癌基因产物直接作用核内(如 p53、Rb), 细胞质(如 NF1)	不可逆性抑制细胞增殖, 使细胞生长、分化终止, 促进细胞凋亡
抑癌基因对癌基因表达的负调节作用, 包括转录或转录后的调节(如 WT1)	可逆性抑制细胞增殖、生长

二、重要的抑癌基因及其功能

(一) Rb 基因

人类 *Rb* 基因位于人 13 号染色体 q14, 全部序列约 200 kb, 含 27 个外显子, 是第一个可被分离到的抑癌基因。该基因可转录出 4.7 kb 的 mRNA, 该 mRNA 编码相对分子质量介于 109 ~ 113 000 被称之为 p105 的蛋白质, 因首先在儿童视网膜母膜细胞瘤中发现, 故 p105 又称为 p105-RB。p105-RB 是一种核内蛋白质, 有磷酸化与非磷酸化两种形式。非磷酸化形式为活性型, 能促进细胞分化, 抑制细胞增殖。p105-RB 的磷酸化作用随着细胞周期发生改变, 在 G₀/G₁ 期为脱磷酸化形式, 磷酸化程度最低, 可与 E2F 形成复合物, 使 E2F 失活, 阻断细胞进入 S 期; 细胞内周期蛋白依赖的蛋白激酶(cyclin dependence protein kinase, CDK)激活后, 可使 Rb 蛋白磷酸化程度增加, 转变为无活性状态, 而 E2F 与 Rb 蛋白分离并发挥转录因子活性, 细胞立即进入 S 期和增殖状态, 即在 S 期时 Rb 蛋白的磷酸化程度最强, 失去对细胞分裂的抑制; M 期后又开始脱磷酸化。*c-myc* 和 *c-fos* 原癌基因的表达产物对细胞由 G₀ 期进入 G₁ 期是必需的, 而 *c-myc* 表达产物还是维持细胞继续生长、分化的关键因素。p105-RB 则可通过抑制 *c-myc* 和 *c-fos* 等多种原癌基因的表达而抑制细胞增殖。

Rb 蛋白可与某些 DNA 病毒癌基因表达蛋白结合形成复合物, 使 Rb 蛋白丧失抑制细胞增殖的生物活性。如腺病毒的 E1A 蛋白, SV40 的 T 抗原和人类乳头瘤病毒 16(HPV16)的 E7 蛋白可与 Rb 蛋白结合, 使其失活, 而表现出癌蛋白转化细胞的能力, 导致细胞异常增殖。已发现视网膜母细胞瘤、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、骨肉瘤和小细胞肺癌等许多肿瘤均表现出 Rb 基因缺失或失活。将野生型 Rb 基因导入体外培养的上述肿瘤细胞, 可使这些恶性细胞的生长受到抑制, 从而证实了 Rb 的抑癌基因作用。

(二) p53 基因

人类 p53 基因位于 17 号染色体短臂上,全长约 20 kb,含 11 个外显子,转录出 2.5 kb 的 mRNA,该 mRNA 编码一个由 393 个氨基酸残基组成的相对分子质量约 53 000 的核蛋白,故此抑癌基因称为 p53 基因。在已被检测的脊椎动物中均发现有 p53 基因的存在,有些高度保守区的序列同源性接近 100%。这些区域被命名为 I、II、III、IV 和 V,它们对应的氨基酸序列分别为 13~19、120~143、172~182、238~259 和 271~291。进一步研究发现,p53 蛋白的一级结构含有 3 个结构功能区:第 1 至第 75 个氨基酸残基是有类似转录因子作用的酸性氨基末端区,有转录激活作用;第 102 至第 290 位氨基酸残基组成疏水核心区,有结合 DNA 的特异序列,该区在进化上高度保守,在功能上非常重要;而位于 C 端的第 319 至 393 位氨基酸残基为富含脯氨酸的碱性区,与其定位、结合 DNA 及形成四聚体等作用有关,该区有单独转化细胞的作用,有多种蛋白激酶的磷酸化位点(图 16-2)。在多种恶性肿瘤中均可发现有 p53 基因的缺失或变异而失去其抑癌功能。

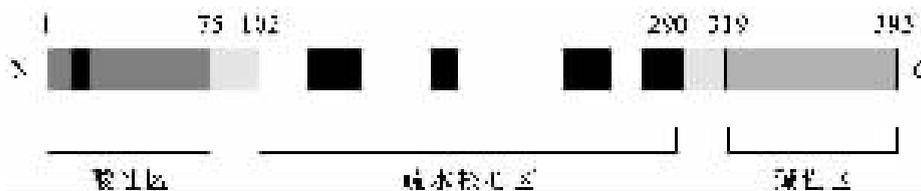


图 16-2 p53 蛋白的结构

涂黑处为高度保守区,从 N 端始,被命名为 I、II、III、IV 和 V

正常细胞中均含低水平的 p53 蛋白,其半衰期很短,仅 10 min 左右。正常即野生型(wild type)p53 蛋白的生物学功能主要有:

1. 抑制细胞周期 p53 蛋白可与 p21 基因特定序列结合促进 p21 基因的表达,而 p21 蛋白是细胞周期促进因子 CKD 的抑制剂,该蛋白可通过与 CDK 的结合而抑制 CDK 的激酶活性,从而使细胞周期停止在 G1 期。因此,p53 蛋白在细胞内通过促进 p21 基因的表达而抑制细胞周期。上述功能受其细胞内含量及是否磷酸化的影响。在细胞有丝分裂后,p53 蛋白的表达水平很低,到 G1 期时才开始升高,而到 S 期时由 CDK 激酶和酪氨酸激酶 II 催化 p53 蛋白不同的部位发生磷酸化反应而转变为磷酸化型。p53 磷酸化以后,其抑制 DNA 复制的作用增强。

2. 抑制某些癌基因对细胞的转化作用 实验表明野生型 p53 蛋白可有效抑制各种癌基因,如 *c-myc*、*ras* 基因或腺病毒 E1A 对细胞的转化作用。

3. 监测细胞 DNA 损伤 正常细胞在 DNA 损伤后,p53 蛋白表达急剧上调,使细胞分裂停止于 G1 期,与复制因子 A 相互作用参与 DNA 复制,启动细胞 DNA 修复系统。因此,在正常细胞中,p53 蛋白通过监测 DNA 损伤而保证细胞中遗传物质的忠实性和稳定性,防止细胞的恶性转化。

4. 诱发细胞凋亡 如细胞 DNA 修复失败,p53 蛋白可启动细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)或称细胞凋亡的过程,诱导癌变细胞或有癌变倾向的 DNA 损伤细胞的死亡。

当 p53 基因发生突变等改变时,其表达产物可失去正常结构和功能,可能会失去上述某一方面的作用,并在其他因素的共同作用下,最终失去抑制肿瘤发生的作用。p53 基因缺陷的形式有点突变、缺失[包括纯合性(homozygous deletion)和杂合性(loss of heterozygosity, LOH)]、移码和基因重排、甲基化等多种。其中,点突变是一种重要突变形式。在人类肿瘤中,约 50% 可检测到有义点突变,约 68% 集中在 II、III、IV 和 V 区密码子 175、248、249、273 和 282,大部分位于第 5~8 外显子突变热点区。突变后的 p53 基因所表达的产物不但失去抑癌作用,反而具有癌蛋白的功能,如野生型 p53 可与突变型 p53 蛋白结合而失活,不能结合 DNA,使得一些癌基因转录失控导致肿瘤的发生。也就是说,突变型 p53 基因可被认为是癌基因。

(三) 肾母细胞瘤基因(WT1 基因)

人类 WT1 基因位于 11 号染色体 p13 上,已克隆的 WT1 是从遗传性 Wilms 瘤中分离到的一种抑癌基

因,其功能与肾细胞分化有关。WT1 基因全长约 50 kb,其 mRNA 长约 3 kb,编码含 345 个氨基酸残基的蛋白质。WT1 基因的表达具有组织特异性,在胚胎肾上皮、胎儿睾丸和卵巢及一些造血细胞中表达,在成人肾中不表达。WT1 基因表达的蛋白产物与早期生长应答因子(early growth response factor 1, EGR-1)有相似的 DNA 结合结构域,并识别、结合同一 DNA 序列(5'-CGCCCCGC-3')。但 EGR-1 可激活下游基因转录,而 WT1 蛋白则作为转录抑制因子,阻抑细胞分裂增殖相关的基因转录,抑制细胞增殖。Wilms 瘤细胞中,因 WT1 基因突变,变异的 WT1 基因编码的蛋白质失去了其阻抑转录的作用而引起细胞恶变。

三、癌基因、抑癌基因与肿瘤的发生

现普遍认为肿瘤的发生是一个多因素、多阶段、多步骤、累积渐进的过程。细胞癌变的多个基因协同假说被广泛接受。该假说认为细胞癌变是多步骤、多重异常变化的复杂过程,在肿瘤的发生发展的各阶段,至少需要两个或更多个不同的癌相关基因的异常激活和(或)抑癌基因的失活,才有可能引起细胞的癌变。因细胞的增殖受多种因素的控制,需要有多种癌相关基因的协同作用才能脱离这些调控。许多实验证明,与肿瘤发生、发展密切相关的基因,如细胞周期调控基因、凋亡相关基因、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和受体的基因、端粒酶等,确实存在着协同作用。

如前所述,在某些因素作用下原癌基因被激活、抑癌基因功能失活,分别通过过表达(overexpression)、不表达或表达无活性蛋白干扰正常的细胞信号转导(signal transduction)过程造成细胞异常分化和增殖。当激素、生长因子等在促进细胞增殖时,可首先激活 *fos*、*jun*、*erb* 等基因,快速而短暂表达与初级应答相关的转录因子。*Jun* 和 *Fos* 两种蛋白质形成同源异二聚体,作为信号分子转入核内,作用于次级应答靶基因调控区,导致细胞增殖过程必需的多种蛋白质基因的表达。某些原癌基因参与细胞分化的调节,它们的表达呈现严格的组织特异性和时间特异性,在细胞分化过程的分支点上发挥正性或负性调节作用。如 *src*、*fos* 基因与神经细胞及造血细胞分化有关。另外,癌基因还参与细胞凋亡调节,而抑癌基因在调节细胞生长、维持基因稳定性等方面有重要作用,能抑制细胞增殖。如在多种肿瘤中已发现抑癌基因 Rb、p53 及 p16 等基因缺失、突变或甲基化。

癌基因之间的协同效应并非是两种癌基因之间的随机组合,而是符合一定的规律。核内癌基因产物最易与胞质癌基因产物发生协同作用,并在致癌过程中作用互补。核内转录调控蛋白 *myc* 不改变细胞的形态以及细胞对生长因子和贴壁的要求,但可以使细胞永生(immortalization)。而胞质癌蛋白,如 *Ras* 蛋白则正好相反,只可使细胞迅速增殖、形态功能改变,但不能使细胞永生化。*Myc* 极易与 *Ras* 发生协同作用而致细胞转化。编码核内蛋白质的癌基因主要有 *myc*、*N-myc*、*L-myc*、*jun*、*fos* 等,而编码胞质蛋白的癌基因有 *fps*、*src*、*erb*、*H-ras*、*K-ras* 等。

抑癌基因的失活常见的几种途径:① 基因缺失或自身突变,不表达或表达产物失去活性;② 表达蛋白质的磷酸化状态;③ 抑癌蛋白与癌蛋白相互作用,使活性相互抑制。抑癌蛋白与癌蛋白是一对互相拮抗的力量,且在肿瘤的发生、发展过程中癌基因激活和抑癌基因的失活须协同作用。

现代肿瘤学研究认为肿瘤是细胞中多种基因突变累积的结果,而这些基因突变主要发生于三类基因,即癌基因、抑癌基因和 DNA 修复基因。因此,对细胞增殖有正调控作用的原癌基因活性异常增加,同时抑制细胞增殖的抑癌基因缺失或失活,最终可引起细胞转化和癌变。

1990 年,ER Fearon 和 B Vogelstein 博士提出结直肠癌发生发展过程中的基因改变模式图(图 16-3),证实了上述多个基因在肿瘤发生过程中协同作用的假说。

第三节 生长因子

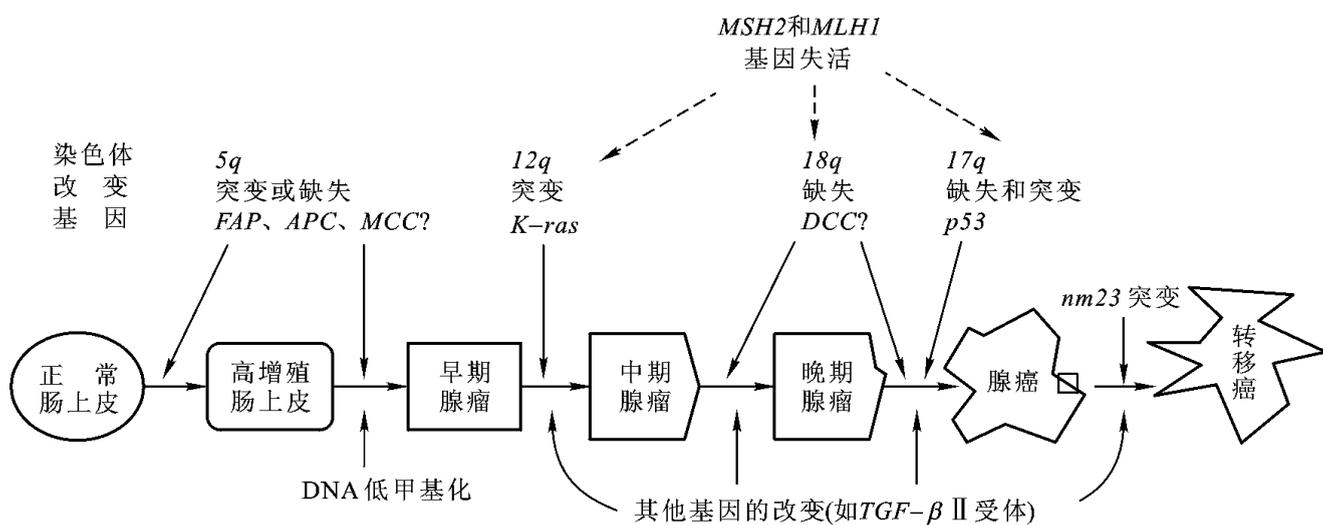


图 16-3 结直肠癌的基因改变模式图

一、概述

一类由细胞分泌、具有调节细胞生长与分化作用,类似于激素的信号分子称为细胞因子(cytokine)。其化学本质是小分子蛋白质或肽类,在细胞之间发挥传递信号的作用。生长因子(growth factor)属细胞因子,它通过质膜上的特异性受体,将信号传递至细胞内,作用于与细胞增殖有关的基因,以影响细胞的生长或分化。

生长因子及其受体与细胞的生长、分化,免疫调节(immunoregulation),肿瘤细胞的生长、消亡,创伤的愈合等多种生理过程、病理状态密切相关,因此受到广泛关注和研究。Stanley Cohen 和 R. Levi Montolcin 因对神经生长因子(nerve growth factor, NGF)和 EGF 的杰出研究工作而获得 1986 年诺贝尔医学与生理学奖。

生长因子主要以内分泌(endocrine)、旁分泌(paracrine)或自分泌三种形式发挥作用。一小部分生长因子分泌后,通过血液运送至其他组织而发挥作用。但大多数生长因子不必由特定腺体或细胞分泌,不一定作用于远处的靶细胞。它常常通过旁分泌作用于邻近细胞、自分泌作用于自身,甚至不分泌到细胞外就作用于自身(intracrine)。

目前已发现的生长因子已达数十种,其中以肽类为主(表 16-3)。不同的生长因子的来源不同,同一生长因子对不同细胞的作用有所不同,而同种细胞可受不同的生长因子的调控。细胞在体外培养时需要多种生长因子才能正常生长。在细胞培养时加入血清,是因血清中含有多种生长因子。概括生长因子的生物学作用,主要有(1)促进细胞生长和分化作用。如 PDGF 能促进停滞于 G_0 期的成纤维细胞、神经胶质瘤细胞、平滑肌细胞等转为 G_1 期,继而进入 S 期。(2)双重调节与负调节作用。如 $TGF\beta$ 具有双重性,兼有生长正调节作用和负调节作用。它对成纤维细胞具有促生长作用,但对多数细胞却有抑制生长作用。(3)多功能性。多数生长因子除具有调节靶细胞的生长外,还有其他功能。如 HGF 除促进肝细胞生长外,还可促进上皮细胞的扩散和迁移,因此又被称为扩散因子(scatter factor)。此外,各种生长因子的生物学作用常有重叠,相互间存在协同与拮抗。

表 16-3 人体内常见的某些生长因子

生长因子	主要来源	主要功能
表皮生长因子(EGF)	颌下腺、肾脏、十二指肠腺等	刺激多种细胞 DNA 合成,促进表皮和上皮细胞的生长
红细胞生长素(EPO)	肾、肝等	调节成熟红细胞的发育
肝细胞生长因子(HGF)	胎盘、再生肝等	促进细胞 DNA 合成
干扰素- γ (IFN- γ)	T 细胞、NK 细胞	抑制病毒 RNA 和蛋白质合成、抗细胞增殖和免疫调节作用
类胰岛素生长因子(IGF)	胎盘、胎肝、血浆等	促进硫酸盐参入到软骨组织、软骨细胞的分裂,对多种组织细胞起胰岛素样作用
神经生长因子(NGF)	神经元、颌下腺等	营养交感及某些感觉神经元
血小板衍生生长因子(PDGF)	巨噬细胞、血小板、平滑肌等	促进间质和胶质细胞的生长
转化生长因子 α (TGF α)	肿瘤细胞、转化细胞、胎盘等	类似于 EGF
转化生长因子 β (TGF β)	血小板、肾、胎盘等	对某些细胞呈促进和抑制双向作用
血管内皮细胞生长因子(VEGF)	平滑肌、肿瘤等	促进血管内皮细胞生长

二、生长因子的作用机制

多数肽类生长因子以大分子的蛋白质前体形式合成,经过蛋白酶剪切,产生成熟的单体,聚集或不聚集分泌后,与靶细胞膜表面或细胞内受体结合,通过信号转导途径将其信号传至核内或直接作用于染色体,引发基因转录而达到调节细胞生长与分化的作用。

生长因子跨膜信号的传递是生长因子作用的主要方式,因生长因子的不同,可通过不同途径进行传递。生长因子跨膜传递途径主要有三条:(1)酪氨酸蛋白激酶(TPK)途径;(2)G 蛋白-磷脂酶 C 途径(PKC 途径);(3)G 蛋白-腺苷酸环化酶途径(PKA 途径)。这三条途径将在本书第十九章作详细介绍。生长因子的信号通过上述三条途径的传递,通过磷酸化级联反应(cascade reaction)导致核内转录因子的活化而引起基因转录。另外,肽类生长因子还可能有一条细胞核直接作用途径。研究发现 EGF 与受体结合后,可使细胞膜局部内陷成受体小体(receptosome)。受体小体与溶酶体融合,大部分 EGF 与受体解离后即被分解,但亦有较少部分 EGF 未被降解而进入细胞核,作用于相对分子质量为 $(2 \sim 2.2) \times 10^3$ 的单链蛋白质,而促进转录。如 EGF 可促进纯化的小鼠成纤维细胞核的转录。而 EGF 主要与其受体结合后,其受体酪氨酸蛋白激酶(TPK)被活化,可使转录因子 STAT-1(p91)磷酸化,使 STAT-1 由无活性形式转变为有活性的转录因子而促使 *c-fos* 基因转录。

原癌基因表达产物有的是生长因子或生长因子受体,有的是胞内信号传递体或核内转录因子(表 16-4)。在正常情况下,他们在维持细胞的生长与分化过程中起着十分重要的作用。当原癌基因被激活后,可产生突变的表达产物或过量表达而导致细胞生长、分化、增殖失控,引起癌变。

表 16-4 某些原癌基因表达产物的定位和作用

癌 基 因	表 达 产 物	
	定 位	功 能
<i>abl</i>	细胞核	DNA 结合蛋白
<i>erbB</i>	质膜	生长因子受体
<i>fms</i>	质膜	生长因子受体
<i>fos</i>	细胞核	转录因子

续表

癌 基 因	表 达 产 物	
	定 位	功 能
<i>jun</i>	细胞核	转录因子
<i>myc</i>	细胞核	转录因子
<i>raf</i>	胞液	酪氨酸蛋白激酶
<i>ras</i>	胞液	GTP 结合蛋白
<i>sis</i>	由细胞分泌	生长因子
<i>src</i>	胞液	酪氨酸蛋白激酶
<i>trk</i>	质膜	生长因子受体

三、生长因子与临床

随着对生长因子生物学功能研究的深入,发现很多疾病的起因与生长因子在体内表达调控失衡密切相关。也就是说,许多基因(如癌基因)通过其表达产物(生长因子及其受体)参与某些疾病(如肿瘤、某些心血管疾病)的发生发展过程。因此,基础研究成果不但可揭示某些疾病的发病机理,还为合理利用生长因子治疗这些疾病提供理论依据。

(一) 细胞凋亡

细胞凋亡不同于细胞坏死(necrosis),是在某些生理或病理条件下,机体通过特异信号转导途径,使细胞按一定程序缓慢死亡的过程。细胞凋亡参与体内细胞数量的调节,并清除体内无功能、对机体有害、突变及受到损伤不能修复的活细胞,在机体发育和稳态调节中发挥着重要作用,对调控细胞增殖、分化和阻止细胞恶性转化和生长有着十分重要的意义。

能诱导细胞凋亡的因素很多,虽其诱导途径尚未完全明了,但就癌基因、抑癌基因和生长因子而言,既有诱发细胞凋亡者,如抑癌基因 p53 表达的 p53 蛋白可诱发髓型白血病等肿瘤细胞的凋亡;又有抑制细胞凋亡者,如某些癌基因表达产物(如原癌基因蛋白 *Bcl 2*、突变型 p53 蛋白)和某些生长因子(如 NGF)等可抑制多种刺激剂诱导的细胞凋亡。细胞凋亡过度或减弱是许多疾病发病的病理生理基础。细胞凋亡受到抑制时,会导致肿瘤和自身免疫性疾病,而如其不恰当的激活,则会发生退行性病变或早衰。

(二) 原发性高血压和心肌肥厚

常见的心血管疾病包括原发性高血压、动脉粥样硬化、心肌肥厚、心肌梗死和心力衰竭等,严重影响人们的健康。随着研究的深入,发现多种心血管疾病(如原发性高血压、心肌肥厚、动脉粥样硬化等)的发生与某些原癌基因的过表达、抑癌基因表达减少和生长因子相关。

原发性高血压血管改变主要为平滑肌细胞的增殖和肥大以及结缔组织含量增加。若长期患原发性高血压,由于血管阻力持续增加,左心压力负荷过重,使左心肌细胞增殖、肥大,基质胶原合成亦增加而导致心肌肥厚。引起心肌负荷增加的原因很多,其中促增殖信号的产生增多是重要的原因。实验表明,原发性高血压大鼠平滑肌细胞中原癌基因 *c-myc* 的表达增加 50% ~ 100%,也有 *c-fos* 表达增加的报道,而 *c-fos* 对平滑肌增生的调控发生在转录水平,而 *c-myc* 可能发生在转录后水平。提示 *c-fos* 和 *c-myc* 的激活是平滑肌细胞增生的启动因素之一,与高血压的发生有关。离体心脏灌注实验发现心肌组织中 *c-fos* 和 *c-myc* 表达增加,将血管紧张素 II 加入心肌细胞培养液中可增加 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达,而高血压时左心室局部血管紧张素 II 表达增加。血管紧张素 II 的增加和导致 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达增加可能是早期心肌肥厚的重要因素。另外,原发性高血压大鼠野生型 p53 表达减少,并检测出突变型 p53 蛋白,表明在心血管疾病发生发展过程中有众多与细胞调控有关的基因和蛋白质参与,其机制还有待进一步探讨。

综上所述,促增殖信号还能刺激全身或局部分泌血管活性物质、生长因子和其他细胞因子,以及某些癌基因、抑癌基因的表达变化等,通过信号转导通路等调控细胞的代谢和增殖,其间相互引发、相互作用,

共同参与高血压、心肌肥厚的发生、发展。

Summary

The viral oncogenes (v - onc) are now recognized as sequences similar to normal cellular genes that have been picked up accidentally from a previous host cell. To distinguish v - onc from their cellular counterparts , they are referred to as v - onc and cellular oncogene (c - onc) or proto-oncogene (pro - onc). The pro - oncs code for a variety of growth factors , growth factor receptors , enzymes , or transcription factors that have been shown to play a pivotal role in cell cycle regulation , metabolism , proliferation , differentiation , and cell adhesion. Mutated versions or overexpression of pro - onc that promote abnormal cell proliferation are called oncogenes. Activation of these genes can occur by several genetic mechanisms such as DNA amplification , translocation , and point mutations.

Tumor suppressor genes (TSG) may code proteins that slow down or inhibit progression and normally inhibit cyclin - dependent protein kinase (CDK) through a specific stage of the cell cycle ; checkpoint - control proteins that arrest the cell cycle if DNA is damaged or chromosomes are abnormal ; receptors for secreted hormones that function to inhibit cell growth , proliferation and differentiation ; proteins that promote apoptosis ; and DNA that repairs enzymes. Loss of TGS function can occur by deletions (homozygous deletion or loss of heterozygosity , LOH) , mutations , or splicing abnormalities.

In mammals and other vertebrates , soluble peptide growth factors play essential roles in intercellular communication. They exert their effects by signaling through surface membrane receptors that interact with diverse types of intracellular second - messenger systems. The normal cells also have the capacity to produce growth factors under conditions that can transiently activate autostimulatory pathways. Many growth factors have been found to subservise a wide variety of functions , such as cell proliferation and differentiation , by acting on many cell types at different stages of development or in adult life. The pathogenic expression of critical genes in growth factor signaling pathways can also contribute to altered cell growth associated with malignancy.

思 考 题

1. 什么是癌基因、原癌基因和抑癌基因？
2. 什么是原癌基因的激活？举例说明原癌基因激活的几种方式。
3. 简述癌基因表达产物及其作用。
4. 简述肿瘤的发生与癌基因和抑癌基因之间的关系。
5. 什么是生长因子？其主要作用方式有哪些？

(汪 渊)

第十七章 基因技术

本章教学要求

- 基因工程所需的酶类、载体和操作过程
- 分子杂交的概念、探针、分子杂交的种类和应用
- PCR 的原理、操作过程和应用
- DNA 序列分析的原理
- 转基因动物、克隆动物、基因剔除的概念
- 基因诊断和基因治疗的基本概念、方法和意义

本章所谓的“基因技术”是指与基因有关的操作技术,包括基因工程、分子杂交、聚合酶链反应、DNA 序列测定、转基因动物、克隆动物、基因剔除技术、基因诊断和基因治疗等。

第一节 基因工程

重组 DNA 技术(recombinant DNA technology)是指在体外按人们的意愿将不同的 DNA 分子重组的技术。基因工程(genetic engineering)是指利用重组 DNA 技术将目的基因和载体重组,再导入受体细胞内进行扩增和表达的过程。克隆(clone)是指通过无性繁殖过程所产生的与亲代完全相同的子代群体。基因工程相当于目的基因的无性繁殖过程,也称其为基因克隆(gene cloning)。由于这是在分子水平上进行的操作,因此还称为分子克隆(molecular cloning)。

一、基因工程操作中常用的工具

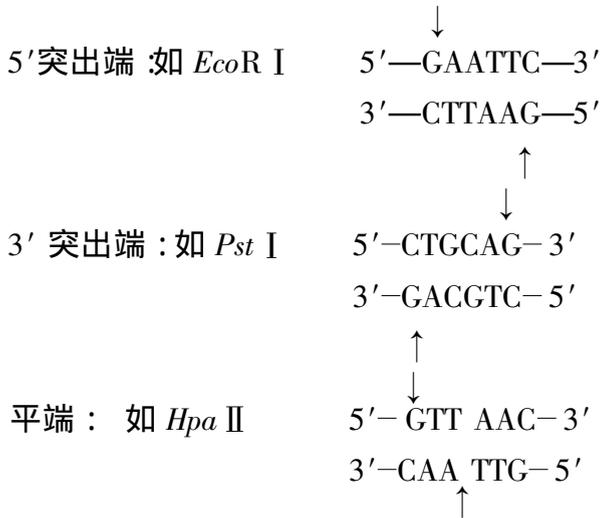
(一) 工具酶

1. 限制性内切酶

限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)简称限制性内切酶或限制酶,是一类能识别和切割双链 DNA 分子中特定碱基序列的核酸水解酶。限制性内切酶都是在细菌中发现的。限制酶与其相应的甲基化酶组成了细菌的限制-修饰系统。限制酶能识别外来 DNA 的特定序列并把 DNA 切断,防止外来 DNA 的侵入。相应的甲基化酶将细菌自身 DNA 中限制酶识别的序列甲基化,使限制酶不再识别这段序列,对自身的 DNA 加以保护。限制酶共有三种类型。I 型限制酶是复合酶,具有限制和修饰的双重功能和 ATP 酶、解旋酶活性。III 型限制酶和 I 型限制酶性质相似,但缺少 ATP 酶和解旋酶的活性。这两种限制酶在基因工程中的用途都不大。II 型限制酶能识别双链 DNA 的特异序列并在该序列内将 DNA 切断。基因工程操作中使用的限制酶主要是指 II 型限制性内切酶。

限制性内切酶一般识别双链 DNA 的 4~8 个核苷酸顺序,以识别 6 个核苷酸顺序的限制性内切酶最为多见。如果 DNA 的核苷酸顺序随机排列,对于识别 4 个核苷酸的酶来说大约每 256 个核苷酸就有一个切点。识别 6 个核苷酸的酶每 4 096 个核苷酸就有一个切点。

限制酶切割 DNA 后,在断端的 5'端带有磷酸基,3'端带有羟基,切口断端有两种类型:黏性末端(5'突出端和 3'突出端)和平端。



用同一种限制酶切割的异源 DNA 片段产生相同的黏性末端,称为同源黏性末端。有些限制酶识别序列虽然不同,但酶切后可以产生相同的黏性末端,称为同尾酶(isocaudarner),如 *Bam*H I (G ↓ GATCC) 和 *Bgl* II (A ↓ GATCT)。

限制酶的命名方法是第一个字母大写代表细菌的属名(genus),第二、三个字母小写代表细菌的种名(species),若细菌有变异株或不同品系,则再用一个大写字母表示株或型(strain)。如果同一菌株中有几种限制酶则根据发现的先后用大写的罗马数字表示。如 *Eco*R I 是从 *Escherichia Coli* RY13 株中分离的第一种限制酶。

2. T₄ DNA 连接酶

T₄ DNA 连接酶(T₄ DNA ligase)是从 T₄ 噬菌体感染的大肠杆菌中分离的一种单链酶,相对分子质量 68 000,能催化 DNA 中邻近的 3'端羟基和 5'端磷酸基间形成磷酸二酯键。在基因工程中用于互补黏性末端和平端 DNA 分子之间的连接。反应体系中需要 ATP 和 Mg 离子。

3. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 是从大肠杆菌中分离的单链蛋白质,相对分子质量 109 000,此酶具有 5'→3'的聚合作用,5'→3'外切作用和 3'→5'的外切作用。此酶经枯草杆菌蛋白酶消化产生一大一小两个片段,大片段也叫 Klenow 片段,失去了 5'→3'的外切功能。

4. 逆转录酶

逆转录酶又叫依赖 RNA 的 DNA 聚合酶。目前已从多种肿瘤病毒中分离到这种酶。在基因工程中的主要用途是以 mRNA 为模板合成互补 DNA 即 cDNA,用于组建 cDNA 基因文库。逆转录酶能催化以 RNA 为模板的 DNA 聚合作用;它的 3'→5'外切活性能特异的降解 RNA-DNA 杂交分子中的 RNA 部分;它还具有 DNA 指导的 DNA 聚合酶活性。

5. T₄ 多核苷酸激酶

T₄ 多核苷酸激酶(T₄ polynucleotide kinase)是从 T₄ 噬菌体感染的大肠杆菌中提取的。它能催化 ATP 的 γ-磷酸转移到 DNA 或 RNA 的 5'端羟基上。此酶主要有两种用途,一是用放射性磷标记 DNA 链的 5'端;二是使缺少 5'磷酸的 DNA 磷酸化,用于连接反应。

6. 碱性磷酸酶

从细菌中分离的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase)简称 ALP,从小牛肠中提取的碱性磷酸酶简称 CAP。此酶能特异的切除 DNA 或 RNA 5'端的磷酸基产生 5'端羟基以防止载体的自身连接。

7. 末端脱氧核苷酸转移酶

末端脱氧核苷酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase)简称末端转移酶,从小牛胸腺中分离,能催化单核苷酸转移到 DNA 的 3'端的羟基上,末端转移酶的模板是带有 3'端羟基的单链 DNA(ssDNA)或有延伸 3'羟基末端的双链 DNA(dsDNA)。

(二) 载体

载体(vector)是携带目的 DNA 片段进入受体细胞进行扩增和表达的工具。常用的载体有经过改造的细菌质粒、噬菌体、黏粒和病毒。

1. 质粒

质粒(plasmid)是细菌染色体外的双链环状的能自我复制的小分子 DNA(图 17 - 1)。质粒对细菌本身的生长繁殖不是必需的,但可以赋予细菌一定的表型,如抗药性等。质粒的性质中与载体作用关系密切的包括:

(1) 质粒的复制型 质粒的复制分为松弛型复制和严谨型复制两类。严谨型复制质粒相对分子质量较大,质粒的复制需要蛋白质合成和 DNA 聚合酶 III,与细菌的复制密切相关,拷贝数只有 1 ~ 5 个。松弛型复制质粒相对分子质量较小,复制过程需要 DNA 聚合酶 I,与细菌蛋白质的合成无关,拷贝数 10 ~ 200 个。用氯霉素抑制细菌蛋白质合成,细菌内质粒拷贝数可扩增至 1 000 个以上。

(2) 质粒的不相容性 同一类群的不同质粒不能共存于同一个菌株内的性质称为质粒的不相容性。质粒的不相容性决定于质粒的复制子,复制子相同或相似的质粒不相容。现在基因工程中使用的质粒都是经过人工改造过的,大多都带有一个来自于 PMB1 质粒的复制子或与之亲缘关系十分接近的 ColE1 复制子。因此作为载体的质粒一般是不相容的。

(3) 质粒的接合性 有些质粒在自然界内可以从一个细菌传递到另一个细菌,如某些抗药性质粒。这些质粒称为接合性质粒或传递性质粒。接合性质粒上都有接合基因,接合基因的相对分子质量大约为 2×10^7 ,因此接合性质粒的相对分子质量都很大。缺少接合基因不能在自然界自由传递的质粒则叫作非接合性质粒。用作载体的质粒都是非接合性质粒。

(4) 多克隆位点 即多种限制性内切酶的单一识别序列,作为外源基因的插入位点。

(5) 筛选标记 常用的筛选标记有双抗生素抗性插入失活筛选标记和蓝白菌落筛选标记。pBR322

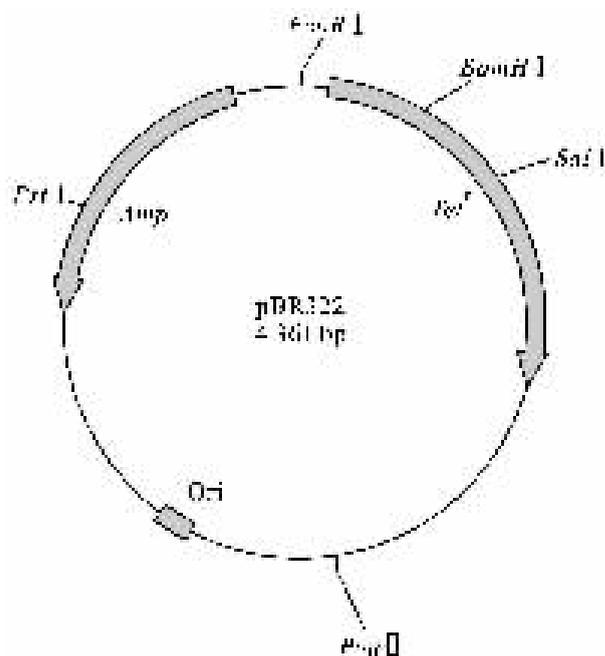


图 17 - 2 pBR322 质粒

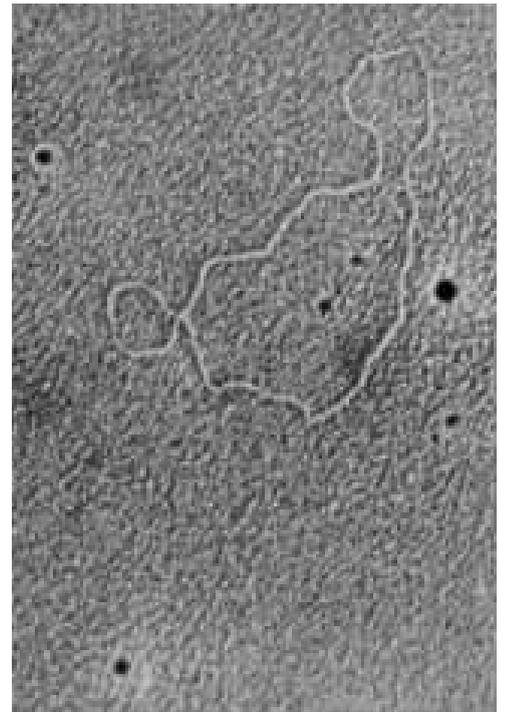


图 17 - 1 质粒电镜图

是常用的载体质粒,它有抗四环素基因和抗氨苄青霉素基因。抗四环素基因中有 *BamH I* 和 *Sal I* 酶的单一识别位点,在这些位点中插入外源基因的细菌抗氨苄青霉素而对四环素敏感;抗氨苄青霉素基因内有 *Pst I* 酶切位点,此点插入外源基因的细菌抗四环素而对氨苄青霉素敏感(图 17 - 2)。pUC 系列等质粒上有氨苄青霉素抗性基因和 *LacZ* 基因片段。*LacZ* 基因片段编码 β -半乳糖苷酶的氨基端片段。此片段能与宿主细胞所编码的缺陷型 β -半乳糖苷酶基因内互补,形成完整的 β -半乳糖苷酶。此酶分解 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 半乳糖苷(X-gal),产生蓝色菌落。*LacZ* 基因片段内有多克隆位点,插入外源基因后不能合成完整的 β -半乳糖苷酶来分解 X-gal,产生白色菌落。

2. λ 噬菌体

λ 噬菌体(bacteriophage, phage)是线性双链 DNA,全长 48 kb,两端各有 12 个碱基的单链突出端,是天然的黏性末端,称为 *cos* 区。此 *cos* 区在感染细菌后借黏性末端连接而使噬菌体 DNA 环化,在细菌内大量繁殖。噬菌体 DNA 的中间部分约占全基因组的 30%,与溶源性生长方式有关。此区域的缺乏或被取代,对噬菌体裂解型生长方式都没有严重的影响,可作为外源 DNA 片段的

克隆部位。噬菌体外壳蛋白包装 DNA 时,要求重组 DNA 分子的大小是野生型基因组全长的 75% ~ 105%。这意味着噬菌体在包装时对重组的外源 DNA 长度进行了一次筛选,分子过大或过小的外源 DNA 都不能被包装入噬菌体。

3. 黏粒

黏粒(cosmid)是由 λ 噬菌体的 cos 区与 pBR322 组合的杂种载体。pBR322 提供复制起始点,酶切位点,抗生素抗性基因,而 cos 区提供黏粒重组外源 DNA 大片段后的包装基础。黏粒可克隆 29 kb ~ 45 kb 的大片段,常用作建立真核基因组文库的载体。

4. 病毒

病毒载体更多用于真核表达系统,如腺病毒、腺病毒相关病毒、痘病毒、逆转录病毒、猴空泡病毒等。

二、基因工程的操作过程

基因工程操作过程概括起来包括:目的基因的获得,目的基因与载体的连接,重组 DNA 分子导入受体细胞,基因工程菌的筛选与鉴定,目的基因的表达和表达产物的纯化(图 17-3)。

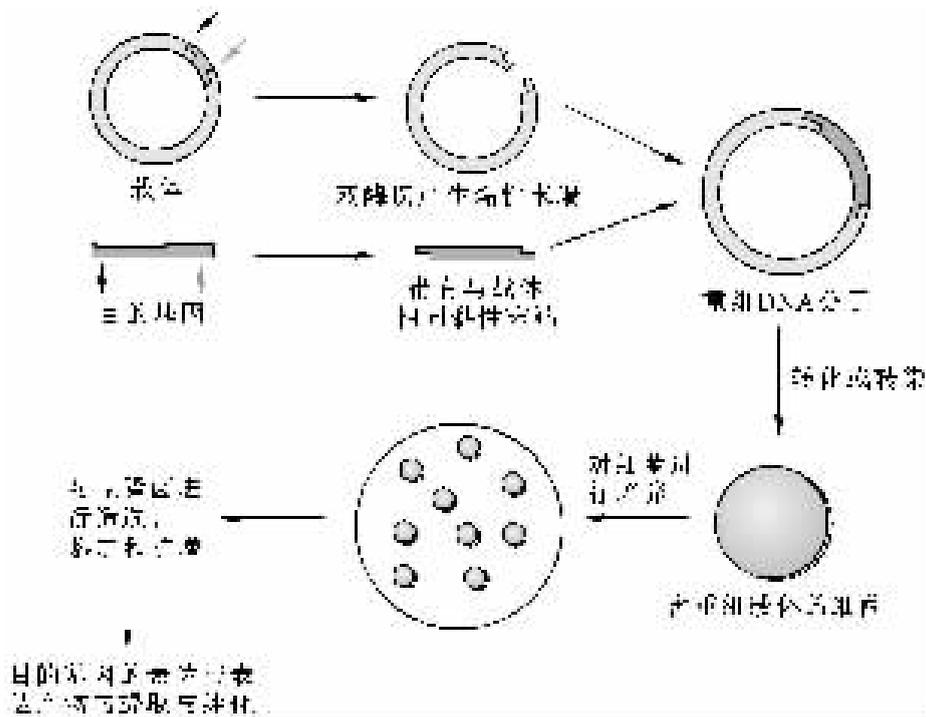


图 17-3 基因工程的流程图

(一) 目的基因的获得

对基因组中的基因进行研究和应用必须先获得该基因。这种供研究和应用的基因称作目的基因。基因工程操作中获得目的基因的方法大体有如下几种:

1. 从生物细胞中直接提取

低等动物的基因组相对比较简单,大多数基因已经定位,基因间没有间隔序列,因此适合用从细胞内直接提取的方法获得目的 DNA。

从生物体内直接提取 DNA 可先用探针将目的基因钓出再重组,也可以先将 DNA 酶切重组后再在重组菌中筛选有目的基因的基因工程菌。

基因组文库(genomic library)将某种生物的基因组 DNA 切割成一定大小的片段,分别与适合的载体重组后导入宿主细胞,这些重组分子中插入片段的总和可代表该生物全部基因组序列。这种通过重组、克隆方法保存在宿主细胞中的各种 DNA 重组分子的集合体叫作基因组文库。

2. 合成 cDNA

真核生物基因比较复杂,一般都有间隔顺序即内含子,需要进行转录后的加工。原核细胞缺少转录后加工系统,真核基因转录的 hnRNA 不能在原核细胞内剪接成成熟的 mRNA。欲将真核基因送入大肠杆菌中去表达,一般都采用 cDNA 的方法获得目的基因。即先提取 mRNA,用逆转录酶将其逆转录成 cDNA,以去除内含子序列,再进行 cDNA 的克隆和表达。

cDNA 文库(cDNA library):从真核细胞中分离纯化出所有的 mRNA,再以这些 mRNA 为模板合成其相应的 cDNA,与适当的载体重组转入宿主细胞。这样建立起的 cDNA 重组分子的集合体叫作 cDNA 文库。cDNA 文库中插入片段的总和可代表某一种生物全部的 mRNA 序列。

3. 人工合成

编码某些活性多肽的基因只有十几或几十个核苷酸,只要知道这些多肽的氨基酸顺序或其基因的核苷酸顺序,人工合成这些基因不仅在理论上是行得通的,在实际操作上也十分方便。

对于较大的基因直接合成比较困难,可将 DNA 的两条链分成几个片段分别合成,再按碱基互补形成有切口的双链,用 DNA 连接酶连接成完整的双链。

4. 聚合酶链反应扩增基因

有些基因在细胞内的数量很少,提取困难。只要知道基因两端的部分核苷酸顺序,即可按着碱基互补的原则,合成引物,用聚合酶链反应扩增基因。

(二) 目的基因与载体的连接

目的基因与载体的连接是基因工程操作中的重要环节,选择什么样的连接方式连接目的基因和载体,要根据限制酶切割目的基因和载体后的断端确定。

1. 同源黏性末端连接和平端连接

目的基因和载体上有相同酶或同尾酶的酶切位点,酶切后产生同源黏性末端,可用同源黏性末端连接。若目的基因和载体都能被某些产生平端的限制酶切割,可用平端连接目的基因和载体。

2. 定向连接

定向连接是将目的基因定向插入载体。通常是用两个不同的限制酶同时切割目的基因和载体,在目的基因和载体上产生两种不同的黏性末端,或者一个黏端,一个平端,从而限制目的基因的插入方向(见图 17-4)。

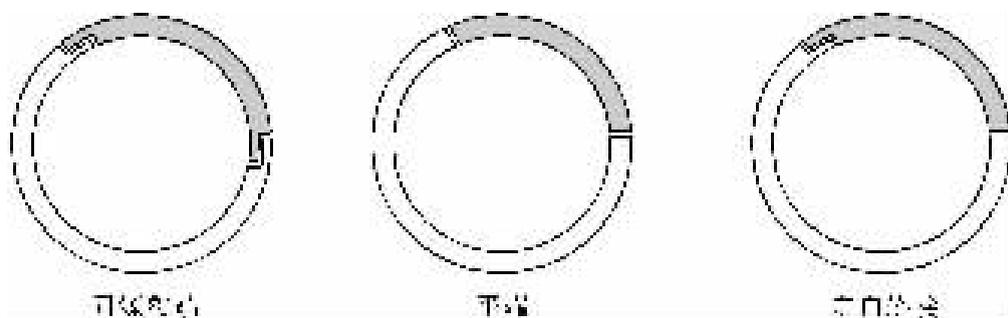


图 17-4 目的基因与载体的各种连接方式

当目的基因和载体之间没有相同的酶切位点不能产生相同的酶切末端时,可以设计合成一段短的双链 DNA,一端碱基与酶切后的目的基因末端同源,另一端与酶切后的载体末端同源,作为桥梁把目的基因和载体连接起来。

(三) 重组体导入受体细胞

受体细胞也称宿主细胞,是重组子扩增和表达的场所,分原核和真核两类。原核细胞主要是指大肠杆菌。

以质粒为载体把外源基因转入细菌称为转化(transformation),以噬菌体和病毒为载体导入细胞称为

转染(transfection),有人又把以噬菌体为载体将外源基因导入细菌称为转导(transduction)。

不经处理的细菌很难转化,只有经过敏感处理的细胞才有较高的转化率,这种细胞称为感受态细胞(competence cell)。诱导感受态细胞一般用化学方法,即用冷的氯化钙处理细菌。细菌在 0 °C 的氯化钙低渗溶液中膨胀成球形,细菌的细胞壁和膜的通透性增强。外源 DNA 与钙离子形成复合物,黏附在细菌表面,经 42 °C 热处理促进细胞吸收。细菌细胞在数小时培养后恢复原形并进行分裂繁殖。

另一种常用的转化方法是电击法,即用短暂的高压电脉冲使 DNA 进入细菌。电击法不需要制备感受态细胞。当电场强度、电脉冲幅度和脉冲次数等组合合适,细菌的死亡率达 50% ~ 75% 时有较高的转化率。

以 λ 噬菌体和黏粒为载体的重组 DNA 导入大肠杆菌需体外包装,即在试管内将重组 DNA 和 λ 噬菌体的头部和尾部蛋白混合,包装成完整的噬菌体感染大肠杆菌。

(四) 基因工程菌的筛选

转化的细菌涂布在含有抗生素的平皿上,长成单个菌落。这些菌落有的转入了自身环化的质粒,有的转入了重组质粒。重组质粒仅表示质粒上插入了外源基因,这些外源基因不一定是目的基因。基因工程菌的筛选(screening)和鉴定(identification)即是在这些菌落中筛选出含有目的基因的菌落,并鉴定其正确性。

DNA 重组体和质粒自身环化的鉴别:带有双抗生素标记的质粒自身环化在两种抗生素培养基上都能生长,DNA 重组体只能在其中一种抗生素培养基上生长。带有 LacZ 基因的质粒自身环化在 X-gal 培养基上经异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)诱导生成蓝色的菌落,DNA 重组体长成白色的菌落。

基因工程菌的筛选一般选用菌落或噬菌斑原位杂交方法(colony/ plaque in situ hybridization)。首先将在琼脂平板上生长的重组菌落或噬菌斑转移到硝酸纤维素膜上,以 NaOH 裂解菌落,并使 DNA 变性,固定到膜上,用特异的 DNA 或 RNA 探针与之进行分子杂交。挑选含有目的基因的克隆菌(图 17-5)。

外源基因获得表达的基因工程菌也可以用免疫学的方法筛选。操作过程与菌落原位杂交基本相似。硝酸纤维素膜上的菌落裂解后,固定蛋白质并用相应的抗体检测菌落。

对筛选出的基因工程菌还需要进行结构分析鉴定。提取基因工程菌中的质粒,用限制酶切,经凝胶电泳检测插入片段的大小,作物理图谱。更可靠的方法是作 DNA 的序列分析。

(五) 外源基因的表达

载体依据功能的不同可分为克隆载体和表达载体两类。克隆载体以复制基因,增加基因的拷贝数为目的。只需要具备复制子、多克隆位点和筛选标志。表达载体不仅要复制外源基因,还要表达外源基因。除需具备克隆载体的条件外,还要有基因表达的调控序列。

原核细胞中基因表达的调控元件有以下几种:

(1) 启动子 启动子是 DNA 上转录起始位点上游的一段序列,是 RNA 聚合酶的识别和结合位点(见第十三章)。原核细胞基因工程采用的强启动子包括色氨酸操纵子启动子, λ 噬菌体左向和右向启动子, T_7 噬菌体的启动子等。

(2) SD 序列 SD 序列是 mRNA 翻译起始点上游的一段序列,该序列和核糖体小亚基上 16 S rRNA 的 3' 端的碱基互补,是核糖体的结合位点(参见第十四章),SD 序列和翻译起始点之间的距离影响翻译的效率。

(3) 终止子 利用强启动子表达外源基因时,在外源基因的下流必须加入不依赖 ρ 因子的转录终止

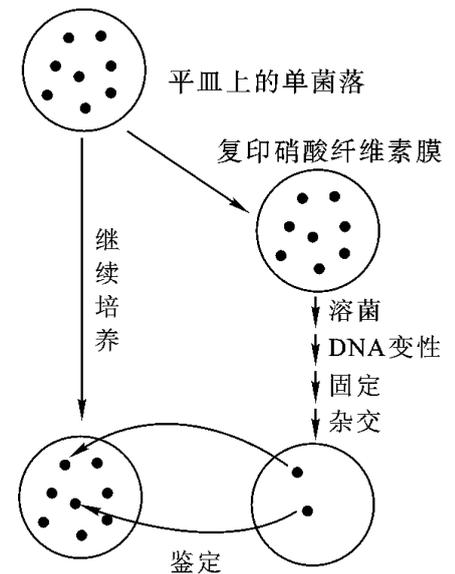


图 17-5 菌落原位杂交

子,以防转录的“通读”并提高质粒的稳定性。终止子是 DNA 3'端的一段序列,具有终止转录的功能。终止子转录出来的 mRNA 能形成茎环结构,并紧接着多聚 U,形成转录终止信号。

用于原核细胞基因工程的表达载体,根据基因表达的蛋白质是否与细菌蛋白融合型分为非融合蛋白表达载体和融合型蛋白表达载体。非融合蛋白载体表达的产物,结构和生物学功能都接近天然产物,缺点是易被细菌蛋白酶降解。融合蛋白载体表达的蛋白质不被细菌蛋白酶降解,可用针对原核蛋白的亲合层析纯化融合蛋白。但纯化后还需要采取措施从融合蛋白上切下所需要的蛋白质或多肽(图 17-6)。

不论是融合型表达载体还是非融合型表达载体,操作时都要注意不能改变外源基因的开放阅读框架。

大肠杆菌是最常用的基因表达系统,由于缺少转录后的加工系统和翻译后的加工系统,真核基因在大肠杆菌中转录和翻译后都不能进行加工,使它的应用受到一定的限制。可选择昆虫细胞和哺乳动物细胞替代大肠杆菌作为表达系统。哺乳动物细胞作为表达系统具有如下优点(1)重组质粒转染的细胞具有遗传的稳定性和可重复性;(2)哺乳动物细胞能对外源基因转录的 hnRNA 剪切加工成成熟的 mRNA;(3)对表达的蛋白质能进行转录后的加工,如糖基化;(4)可将表达产物分泌到培养基中方便下游的提纯。

基因工程技术在医药卫生领域中的广泛应用促进了医学的进步与发展。基因工程疫苗因剔除了致病基因,比传统疫苗安全,也没有血液制品的潜伏交叉感染的危险。由基因工程技术生产的生物制剂,如干扰素、白介素、多种细胞生长因子等已经投入临床使用。基因诊断、基因治疗都离不开基因工程技术。基因工程技术为生命科学和医学研究提供了新的方法和手段。

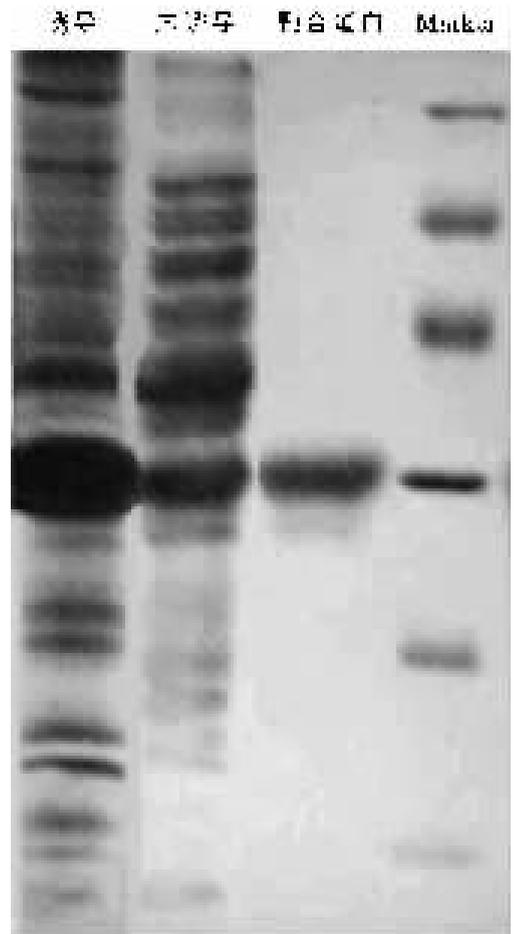


图 17-6 基因工程表达的蛋白质电泳图

第二节 分子杂交

分子杂交(molecular hybridization)是基因工程和分子生物学的重要技术之一,也是基因诊断中最常用的技术。

分子杂交以 DNA 的变性和复性为理论基础。DNA 在某些理化因素的作用下碱基对间氢键破坏,由双链变成单链的过程谓之 DNA 变性。变性 DNA 的单链重新合成双链的过程为 DNA 的复性。分子杂交是指不同来源的单链核酸通过碱基互补形成杂合双链的过程。其中的一条单链杂交前要进行标记,称为探针。分子杂交中探针的浓度大于待测核酸的浓度,以保证探针与 DNA 充分杂交。

一、核酸探针

核酸探针(probe)是分子杂交的技术基础,它是一段与被检测的核酸序列互补的带有标记的核苷酸片段,长度一般为十几到几千个碱基不等。探针标记的方法分为:

(一)放射性同位素标记

用于标记核酸探针的同位素主要是³²P,³²P 标记的探针广泛用于各种滤膜杂交,它的放射活性高,能释放β粒子,穿透力强,通过放射自显影,灵敏度高,需要时间短,但它半衰期短,标记的探针最好在一周内

使用。

(二) 光敏生物素标记

光敏生物素(photobiotin)是一种光敏化合物,通过一个连接臂,一端连接生物素,另一端连接化学性质活泼的光敏基团。在强可见光下,光敏基团与核苷酸特定部位共价结合,合成光敏生物素标记探针。

(三) 地高辛标记物

地高辛(digoxigenin ,Dig)是类固醇半抗原化合物,通过一个 11 个碳原子的交联臂与尿嘧啶核苷酸的嘧啶环上的第 5 位碳相连,形成地高辛标记的尿嘧啶核苷酸。地高辛标记的效率,一般每 20 ~ 25 个核苷酸(nt)中就带一个地高辛配基,杂交后又有灵敏的免疫酶学检测系统,灵敏度高,有取代生物素标记探针的趋势。

(四) 分子信标

分子信标(molecular beacon)是根据核酸碱基配对原则和荧光共振能量转移现象设计的。分子信标长约 25 nt,空间结构呈茎环状,其中环序列是和靶核酸互补的探针,茎长 5 ~ 7 nt,由与靶序列无关的互补序列构成,茎的一端连上一个荧光分子,另一端连上一个淬灭分子(quencher)。当无靶序列时,分子信标呈茎环结构,荧光分子和淬灭分子非常接近,荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热的形式散发,检测不到荧光信号。当有靶序列存在时,分子信标的环序列和靶序列特异的结合,形成的双链比茎环结构更稳定,荧光分子和淬灭分子分开,荧光分子发出的荧光不被淬灭分子吸收,则可检测到荧光。

二、分子杂交的方法

分子杂交分为固相杂交、液相杂交和固相-液相杂交。固相-液相杂交是把欲检测的核酸样本或探针先结合到固相载体上,再与液体中的探针或核酸样品进行杂交反应,漂洗去除未反应的探针或核酸样品,经检测杂交信号,判断杂交结果。

(一) 斑点杂交

斑点杂交(dot blot hybridization)是将 RNA 或 DNA 变性后直接点样在硝酸纤维素膜上,探针放在杂交液内进行杂交。方法简便、快速、灵敏,用于特定基因的定性分析。

DNA 点阵(DNA array)是将相关的探针按顺序点在硝酸纤维素膜上,待检样品放在杂交液内,检查样品中的核酸能和哪一个探针杂交。

基因芯片(gene chips)是将探针点在硅片上,待测样品放在杂交液内进行杂交,借助计算机判断样品中的核酸能和哪一个探针杂交。DNA 点阵和基因芯片点在固相上的是探针的序列,没有进行标记。待测核酸样品在杂交前进行标记。

斑点杂交、DNA 点阵、基因芯片主要是确定待检样品中有没有所要的核酸。

(二) 原位杂交

原位杂交(in situ hybridization)是用核酸探针与细胞和组织切片中的核酸进行杂交并对其进行检测的方法。分为细胞原位杂交和组织切片原位杂交。原位杂交为核酸序列在细胞水平的定位和测定提供了方法,可确定含有特定核酸序列的细胞类型和数目,可检出基因和基因产物的亚细胞定位。查明染色体中特定基因的位置,为染色体病的诊断提供方法。

(三) 转移印迹技术

转移印迹技术是将电泳和分子杂交技术结合起来的一种试验方法。根据检测样品种类的不同又分为三类:

(1) Southern 印迹杂交(southern blotting) DNA 分子经限制酶切,在琼脂糖凝胶上电泳使 DNA 片段依据相对分子质量大小分开,再将电泳结果从凝胶中转印到硝酸纤维素膜上,经固定和变性后,在膜上与探针进行杂交,确定电泳条带中哪一条是所要的 DNA。开始将琼脂糖上的 DNA 条带转移到硝酸纤维素膜上,采用的是用吸墨汁纸吸水(blotting)的方法(见图 17-7A)。英国爱丁堡大学的 Edwin Southern 博士

建立了此方法，Southern 印迹杂交由此得名。现在将 DNA 转移到硝酸纤维素膜上多采用转移电泳的方法（见图 17-7B）。

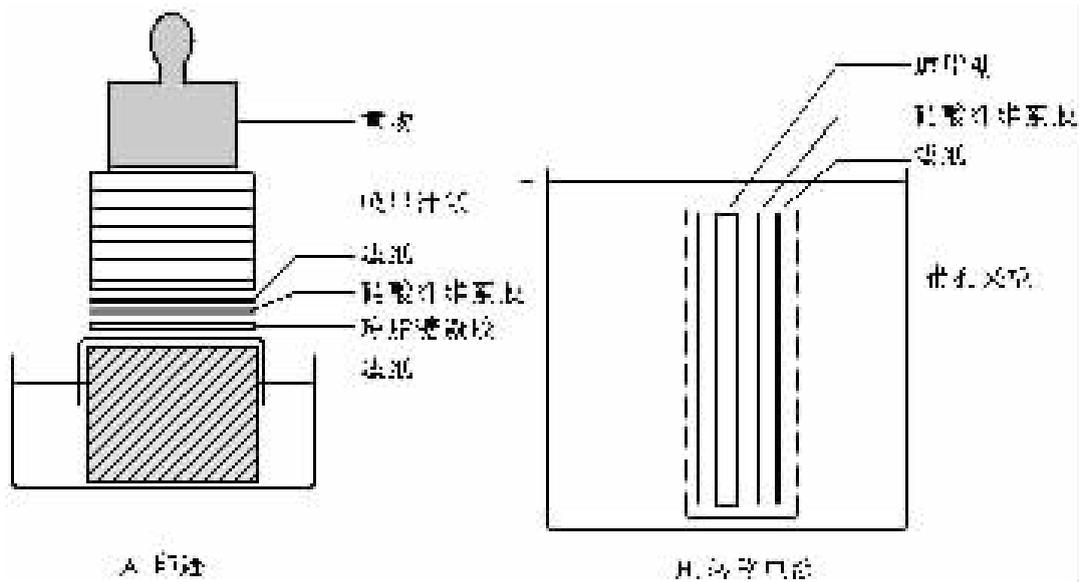


图 17-7 Southern 印迹杂交

(2) Northern 印迹杂交 (northern blotting) Northern 印迹杂交是经典的 RNA 分析法。操作方法和 Southern 印迹杂交方法基本相似，是将 RNA 经电泳分开后转移到硝酸纤维素膜上进行杂交。

(3) Western 印迹杂交 (western blotting) Western 印迹杂交是将蛋白质经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上，检测哪一种蛋白质能和抗体反应，也叫免疫印迹技术。

第三节 聚合酶链反应

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种在体外由引物介导的 DNA 酶促合成反应，也叫基因扩增技术，类似体内的 DNA 复制过程。主要是利用 DNA 聚合酶依赖 DNA 模板的特性，在一对引物间诱发聚合酶反应。整个过程包括模板变性、模板与引物退火和引物延伸三个步骤。PCR 具有特异性强、灵敏度高、操作简便、对待检材料质量要求低等特点，能够快速扩增任何目的基因。

开始进行聚合酶链反应时用的聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段。由于此酶不耐热，在 DNA 变性过程的高温中失活，需要不断的加入新的酶。不仅操作麻烦，而且成本很高，难于推广。只有耐热 DNA 聚合酶被发现后，聚合酶链反应才得到广泛的应用。

Taq DNA 聚合酶是目前应用最广的耐热性 DNA 聚合酶，是从一种在 70 ~ 75 °C 温泉中生活的耐热菌中分离提纯的，由 832 个氨基酸残基组成的蛋白质。该酶在 95 °C 处理 2 h 经过 50 个反应周期酶活性仍可保持在很高水平。一次性加入可以满足反应的全过程需要。Taq DNA 聚合酶大约有 1/1 000 的错配率。目前已有高保真的 Taq DNA 聚合酶。

PCR 可以在 DNA 自动化扩增仪上很方便的进行。这种扩增仪可以根据输入的正确程序，自动的快速的改变温度，调控各个循环周期中模板变性、模板和引物退火及引物延伸的温度转换，实现反应的自动化操作。各种 PCR 反应的操作基本相同，反应体系中包括模板 DNA、两种引物、四种 dNTP、Taq DNA 聚合酶和缓冲液。每个循环周期包括三个反应步骤：

1. DNA 模板变性

变性温度一般为 95 °C 15 s，待扩增的 DNA 模板于高温下变性，双链解开，变成单链，作为聚合反应的模板。

2. 模板与引物的退火

退火温度一般为 55 °C 30 s。在退火过程中，引物分别与待扩增的 DNA 片段的两条链的 3' 端互补配

对。由于引物的浓度大于待测模板的浓度,引物与模板结合的概率远大于模板的自身复性。

3. 引物的延伸

Taq 酶的最适温度为 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$,在此温度下 Taq 酶以单链 DNA 为模板将单核苷酸逐个加入到引物的 3' 端,使引物不断延长,从而合成新的 DNA 链。新合成的引物延伸链在下一轮循环时便可以作为扩增的模板。引物延伸的时间一般为 1.5 min 以上,反应步骤的温度和时间可以依据自己的试验要求自行设定,一般要经过 25~30 个循环。扩增产物需经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

在第一个反应周期中,分别以互补的两条 DNA 链为模板,引物的延伸从模板的 3' 端开始,这样新合成链的 5' 端是一段引物的序列,3' 端则长短不等,称为“长产物片段”。从第二个反应周期开始,引物除与原模板结合外,也与新合成的链结合。当引物与新合成的链结合时,由于新合成的链的 5' 端序列是固定的,DNA 聚合酶催化新链的延伸只能到此为止。这样就出现了 5' 端和 3' 端分别对应两种引物的产物片段,称为“短产物片段”。从第二个反应周期起,短产物片段以指数的方式增加,长产物片段每个周期只增加两个(图 17-8)。经过 25~30 个循环后,短产物片段在反应体系中占有绝对优势,不必经过提纯即可用于各种分析。

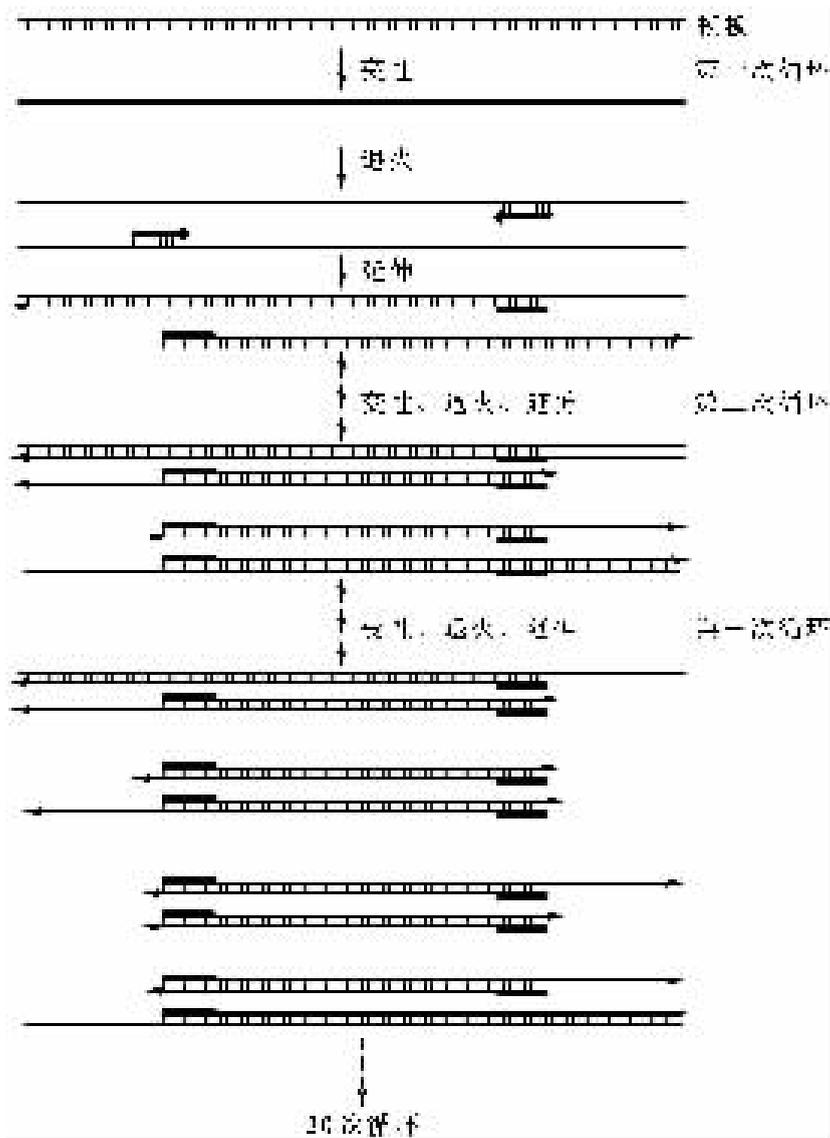


图 17-8 PCR 工作原理及长片断/短片断形成示意图

PCR 的主要用途是扩增微量的 DNA,理论上只要有一条双链 DNA 作为模板,即可通过 PCR 扩增到足够下一步试验需要的 DNA 量。PCR 的另一个主要用途是基因工程中获得目的基因。通过 PCR 获得目的基因要注意 Taq DNA 聚合酶的错配率,尽可能选用高保真的 Taq DNA 聚合酶。PCR 的第三种主要用途是通过检测 mRNA 含量测定基因的表达水平。PCR 的第四种主要用途是进行定点突变。将待诱变的碱基设计在引物中,当下一轮 PCR 以引物延伸的链为模板扩增时,DNA 的碱基就产生了定点突变。用这种方

法可以使蛋白质的氨基酸产生定向改变。

第四节 DNA 的序列分析

DNA 序列分析主要有双脱氧合成末端终止法和化学修饰法两种方法。

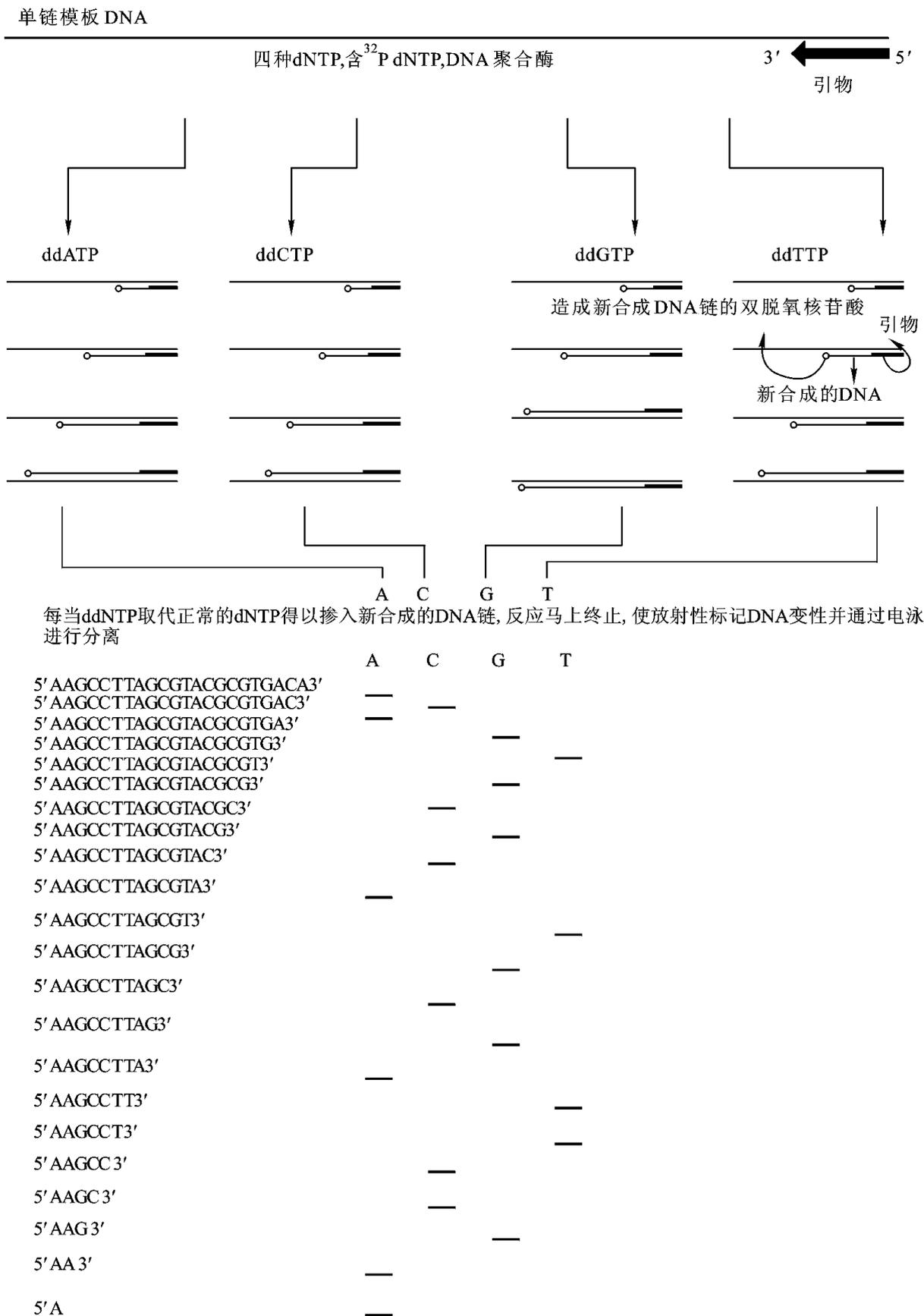


图 17-9 双脱氧末端终止法测序

一、双脱氧合成末端终止法

Frederick Sanger 的双脱氧合成末端终止法实际上是一种试管内的复制 DNA 互补链并使之逐个核苷酸延伸的比较分析方法。

DNA 序列分析除需要 DNA 的复制所必需的四个条件,即 DNA 聚合酶、单链 DNA 模板、带有 3' 羟基的引物、四种脱氧核苷三磷酸 (dATP dTTP dGTP dCTP) 外,还需要四种脱氧核苷三磷酸的类似物 2',3'-双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP)。ddNTP 能够以它的 5' 磷酸和它上一位的核苷酸形成正常的 3',5' 磷酸二酯键,但是 ddNTP 没有 3' 羟基,下一个核苷酸不能与之形成 3',5' 磷酸二酯键,使 DNA 链的延伸终止在 ddNTP 处。

双脱氧合成末端终止法 DNA 序列分析操作中要用四个反应管,每一管都加入 DNA 模板, DNA 聚合酶,四种 dNTP,其中一种 dNTP 是用同位素标记的。除此之外,每一管还要加入一种 ddNTP,即 A 管加入 ddATP, T 管加入 ddTTP, G 管加入 ddGTP, C 管加入 ddCTP。以 A 管为例,当模板上碱基是 T 时,反应体系中有两种碱基可与之配对:dATP 和 ddATP。如果是 dATP 与之配对,引物的延伸还能继续下去。如果是 ddATP 与之配对,引物的延伸就会到此终止。A 管中会出现长短不一,但总是终止在 A 位的核苷酸链。另外三管中出现的情形也如此,即四个反应管分别存在以四种不同核苷酸为 3' 末端的长度不等的核苷酸链。这四个反应管中核苷酸链的总的结果是一系列长度只差一个核苷酸的 DNA 聚合链。聚合反应结束后,把 4 管内的产物分别加到超薄的聚丙烯酰胺—尿素变性凝胶板上电泳,这种电泳分辨能力可达到相差一个核苷酸的水平,四条泳道形成不同的电泳条带。经过放射自显影,从下向上读即是新合成链 5'→3' 的碱基排列顺序 (图 17-9)。

二、化学修饰法

化学修饰法也叫 Maxam-Gilbert 法,该法是先同位素对 DNA 片段的末端进行标记,然后用专一的化学试剂对特定的碱基进行化学修饰,经过修饰的碱基从糖环上脱落,同时和该糖环相连的磷酸二酯键断裂,产生在该修饰碱基处断开的长短不一的 DNA 片段。硫酸二甲酯专一修饰鸟嘌呤,甲酸修饰嘌呤碱基,胍修饰嘧啶碱基,在有 NaCl 存在的条件下,胍只修饰胞嘧啶。分别用上述化学试剂降解 DNA,然后电泳。电泳条带从下向上读即是待测 DNA 5'→3' 的核苷酸序列 (图 17-10)。

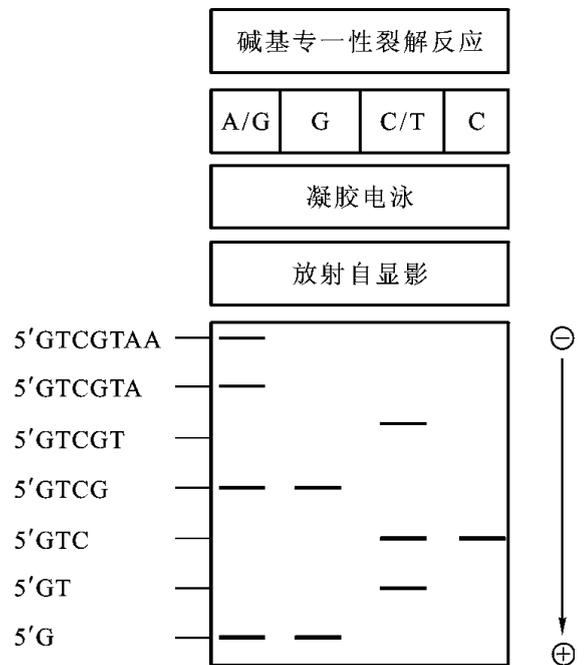


图 17-10 化学修饰裂解法测序原理

第五节 转基因动物、克隆动物和基因剔除技术

一、转基因动物

转基因动物 (transgenic animals) 是利用基因工程和胚胎工程技术,改变动物遗传性状的新方法,是将外源基因导入动物的受精卵,再将受精卵植入到代孕动物的输卵管或子宫中培育的动物 (图 17-11)。转基因动物中的外源基因已与动物本身的基因组整合,外源基因随细胞分裂而增殖,在体内得到表达,并传

给下一代。也有人先将外源基因导入精子或卵细胞,再让导入外源基因的精子或卵细胞受精,培育转基因动物。

转基因动物能够创造医学研究需要的动物模型、改良动物品质、培育动物新品种。例如,将大鼠的生长激素基因导入小鼠受精卵培育的转基因小鼠体重是普通小鼠的二倍,成为超级鼠。

人体内有许多种活性肽和生长因子,它们在体内的生理功能十分重要,但含量极少,提取和纯化都很困难。可利用转基因技术将人类的这些基因转入动物的受精卵,培育转基因动物,从转基因动物的某些产物中提取这些基因的产物。如将人类的基因转入奶牛,从牛奶里提取人类基因的产物。或将人类基因转入鸡,从鸡蛋内提取基因产物。这些转基因动物就像工厂一样可以源源不断的提供人类需要的产品,因此称其为动物工厂或生物工厂。

外源基因能够转入动物,建立转基因动物,也可以转入植物,建立转基因植物。以这些转基因生物为直接食品或作为原料加工生产的食品为转基因食品。转基因食品的出现有望帮助解决人们吃饭的难题。但对转基因食品的安全性还没有取得共识,对目前应不应该把转基因食品投放市场还存在着争论。

二、克隆动物

克隆是英语 clone 的音译,即无性繁殖。克隆动物是生物体通过体细胞进行的无性繁殖以及由无性繁殖形成的基因型完全相同的后代个体组成的种群。克隆动物是多种生物技术结合的产物,是把细胞核转移到去核的卵细胞中,培育新型生物品种的细胞工程技术。克

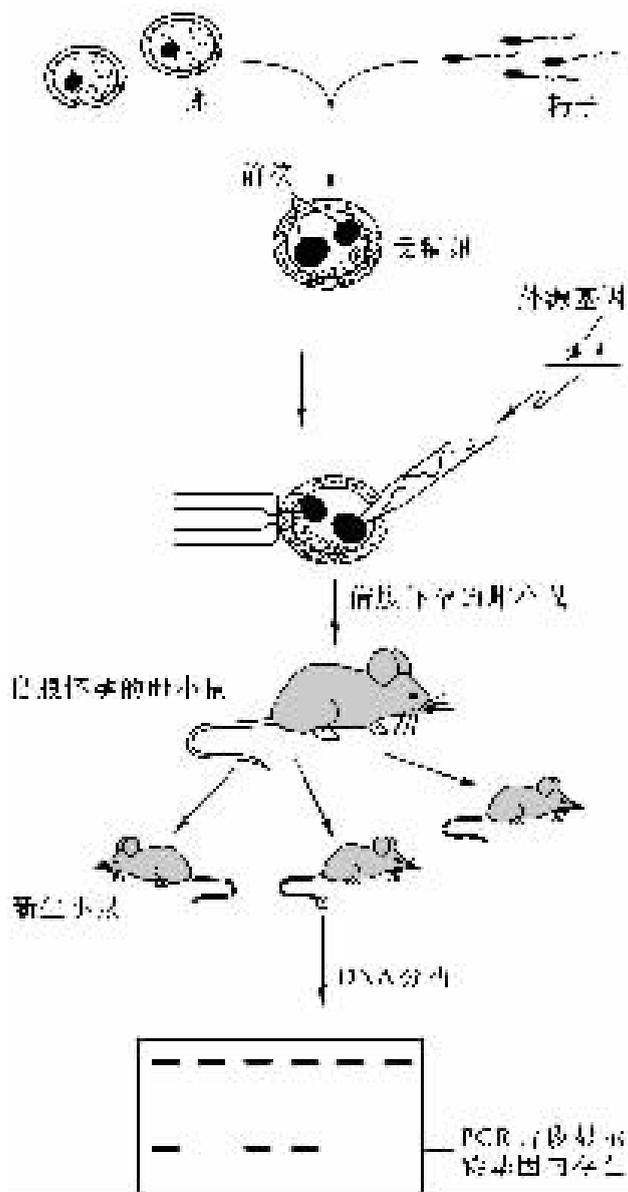


图 17-11 转基因动物原理

隆动物技术主要包括三个步骤。

1. 制备成熟的卵细胞。
2. 细胞核移植,将供体细胞的细胞核与去核的卵细胞融合成一个杂合细胞。
3. 将“核质融合”的卵细胞移植到借腹怀孕动物的子宫发育直到出生(图 17-12)。

克隆动物的遗传信息完全来自于提供细胞核的动物,即克隆动物是供核动物的复制品。由此可见,克隆动物与转基因动物不同。转基因动物是将外源基因转入动物的受精卵内,产生后代个体的方式仍然是有性繁殖,只不过后代细胞染色体内插入了外源基因。克隆动物是将供体细胞核移入到去除了细胞核的未受精卵细胞内,是细胞无性繁殖的产物。

绵羊多莉(Dolly)是世界上第一只用体细胞(乳

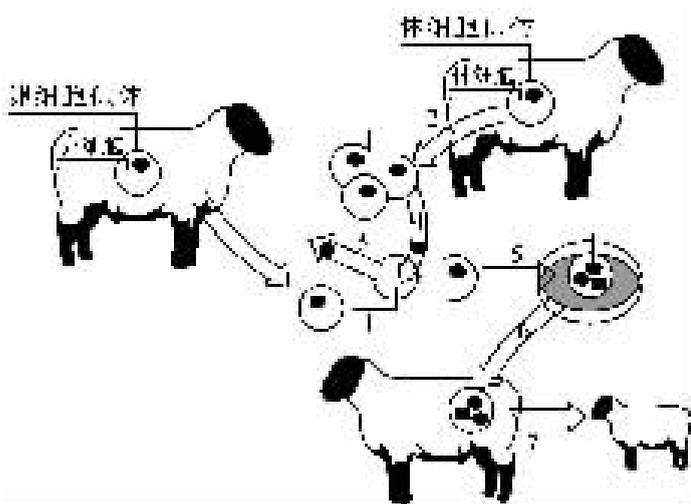


图 17-12 克隆动物

1. 提取卵细胞; 2. 提取体细胞; 3. 卵细胞去核; 4. 体细胞核转入去核卵细胞; 5. 筛选; 6. 送入子宫培育; 7. 克隆动物

腺细胞)培育的克隆动物。动物的体细胞是高度分化了的细胞,按着发育生物学的观点,高度分化的细胞不具有“全能性”,即不可能再像胚胎细胞那样,可以分裂分化成器官、组织、系统,形成完整的机体。如乳腺细胞只能发育成乳腺组织,不再具有繁殖出新个体的能力。体细胞克隆动物的成功推翻了上述观点,高度分化的体细胞具有和胚胎细胞完全相同的基因组,在一定的条件下,仍然具有“全能性”,即也可以发育成新个体。

有性繁殖是成熟的卵细胞(单倍体)和精子(单倍体)结合,成为双倍体的受精卵,发育成一个新生命的过程。这个新生命的遗传物质一半来自父方,另一半来自母方,它既不可能完全像父亲,也不可能完全像母亲。克隆动物的遗传物质全部来自供体细胞核,新个体的遗传物质与供体完全相同,新个体就是供体的“复制品”。克隆动物技术使人类掌握了复制动物的技术。

绵羊和人同属哺乳动物,克隆羊的成功证明克隆人在技术上是没有任何问题的。但克隆人要充分考虑到社会、伦理道德等方面的问题。人们的思想、行为除与遗传因素有关外,受后天的环境、教育影响很大,克隆人与细胞核提供者所处的后天条件不可能一样,尽管他们的基因完全相同,他们的思维方式,行为方法也不可能完全相同。用克隆的方法不可能制造出两个完全一样的人来。基于上述考虑,大多数国家的政府和科学家都反对进行克隆人的试验。

三、基因剔除技术

通过 DNA 定点同源重组,定向地去除基因组中的某一基因,称为基因敲除(gene knockout)或基因剔除。基因剔除技术目前主要在小鼠的胚胎干细胞(embryo stem cells, es)中进行。具体过程见图 17-13。

1. 先将待剔除基因的同源基因片段与质粒载体重组,再用新霉素抗性基因取代同源基因的中间部分。

2. 重组质粒转入小鼠的胚胎干细胞,新霉素抗性基因利用同源基因的序列与基因组中待剔除的基因发生同源重组,用新霉素抗性基因取代待剔除基因。

3. 胚胎干细胞注入胚泡,胚泡植入子宫培育出嵌合体小鼠。一般认为基因同源重组只发生在一条染色体上。当一条染色体的基因被剔除后,另一条染色体上的等位基因就不再发生置换。因此只能得到嵌合体小鼠。

4. 嵌合体小鼠与野生型小鼠交配产生嵌合体小鼠,证明生殖细胞中的基因已被剔除。

5. 嵌合体小鼠再与嵌合体小鼠交配,得到基因剔除的纯系小鼠。基因剔除技术在医学中主要用于建立基因剔除动物,研究基因的功能和疾病发生的机制。

基因剔除的目的是灭活基因组中的某一个基因。通过 DNA 定点同源重组改变基因组中某一基因的技术可笼统的称为基因打靶(gene targeting)。若基因打靶的目的不是灭活基因组中的某一个基因,而是用某一基因替代基因组中的另一个基因,让其表达产物在生物体内产生作用,研究其功能,这一技术则称为基因敲入(gene knockin)。

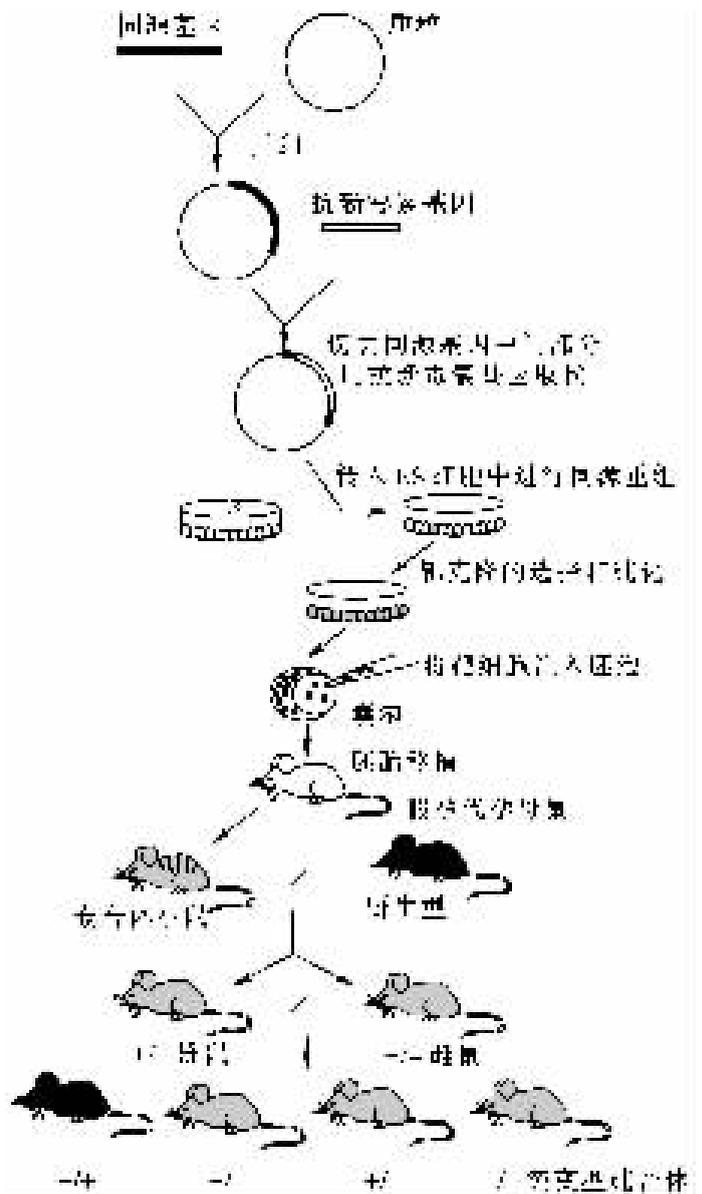


图 17-13 基因剔除原理

第六节 基因诊断

人类大多数疾病的发生都和基因有关。基因变异是疾病产生的重要原因。基因变异包括外源基因的入侵,内源基因结构的改变和表达的异常。基因诊断(gene diagnosis)是指利用分子生物学和分子遗传学的技术方法,通过直接检测基因结构是否改变、基因表达有否异常,对疾病作出诊断。和其他诊断方法比较,基因诊断具有针对性强、灵敏度高、适用范围广和可以做到早期诊断等特点。

一、基因诊断的常用技术和方法

基因诊断的常用技术包括分子杂交、PCR、DNA 序列测定、多态性分析等。

(一) 基因突变的诊断方法

1. 点突变的诊断方法

对已知的点突变可用等位基因特异性寡核苷酸探针法(allele specific oligonucleotide, ASO)检查。针对突变分别合成一对寡核苷酸探针,其中一条为正常探针,另一条是突变探针。待测 DNA 只与正常探针杂交表示受检者基因是正常的,没有突变。待测 DNA 只与突变探针杂交说明两个等位基因都发生了突变,突变基因是纯合子。待测 DNA 既能与正常探针杂交也能与突变探针杂交,则突变基因是杂合子,一个等位基因突变,另一个等位基因正常。待测 DNA 与正常探针和突变探针都不能杂交,提示基因发生了新的突变(图 17-14)。

对未知的点突变,先用单链构象多态性检查有没有点突变,然后再进行 DNA 序列测定确定突变的确切位置。单链 DNA 因其分子内碱基之间的相互作用可形成一定的立体结构。长度相同的单链 DNA 分子因碱基序列不同可形成不同的立体构象,在聚丙烯酰胺凝胶电泳中产生不同的迁移率,称为单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)。

2. 插入和丢失片段的诊断方法

利用 DNA 缺失区或片段插入区的 5'和 3'引物进行 PCR 扩增,通过凝胶电泳检查扩增 DNA 片段的大小确定有没有片段的丢失或插入。

3. 限制性片段长度多态性分析

点突变如果发生在限制酶的切点上,可导致限制酶切点的丢失或产生新的限制酶切点。用限制酶切割 DNA 产生的限制性片段的数目和每个片段的长度就会发生改变。在限制酶切点附近如有片段的丢失或插入,酶切后的限制性片段长度也会发生变化。限制性片段数目和长度的改变可以通过凝胶电泳检测出来。由于基因突变导致限制性片段数目和每个片段长度的不同称为限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。

(二) 基因表达异常的诊断

基因表达异常包括基因表达水平的改变,正常情况不表达的基因得到了表达或正常情况应该表达的基因没有表达。这三种情况都可能引起疾病。诊断基因表达的异常主要是应用 RT-PCR 来检查 mRNA 的量。详见本章第三节。

(三) 外源基因侵入的诊断

病毒、细菌、立克次体、衣原体、寄生虫等侵入机体引起感染性疾病。可针对这些病原微生物的基因制备特异的探针,通过分子杂交对这些感染性疾病作出诊断。

在应用以上方法进行基因诊断的过程中,如果得到的核酸样品量不足,可先用 PCR 对核酸样品进行



图 17-14 ASO 杂交法结果判定

扩增,再用上述方法进行诊断。PCR 与 ASO 结合称为 PCR/ASO ;PCR 与 SSCP 结合称为 PCR/SSCP ;PCR 与 RFLP 结合称为 PCR/RFLP。

二、某些疾病的基因诊断

(一) 遗传性疾病的基因诊断

遗传性疾病都是由于某一个基因突变引起的。如果引起遗传性疾病的基因突变和某一种遗传多态性连锁,就可以用连锁性分析对遗传性疾病作出诊断。

甲型血友病是一种女性携带,男性发病的隐性遗传病。甲型血友病的病因是凝血因子Ⅷ基因异常。凝血因子Ⅷ基因位于 X 染色体上,第十八个外显子上的一个 142 bp 的片段内有一个 *Bcl* I 限制酶的切点。用 *Bcl* I 限制酶切割此 142 bp 的片段可产生 99 bp 和 43 bp 的两个片段。甲型血友病人的基因突变导致该 *Bcl* I 的酶切位点丢失,*Bcl* I 酶不能切割病人的 142 bp 片段。因此可用限制性片段长度多态性分析对甲型血友病作产前诊断(图 17-15)。

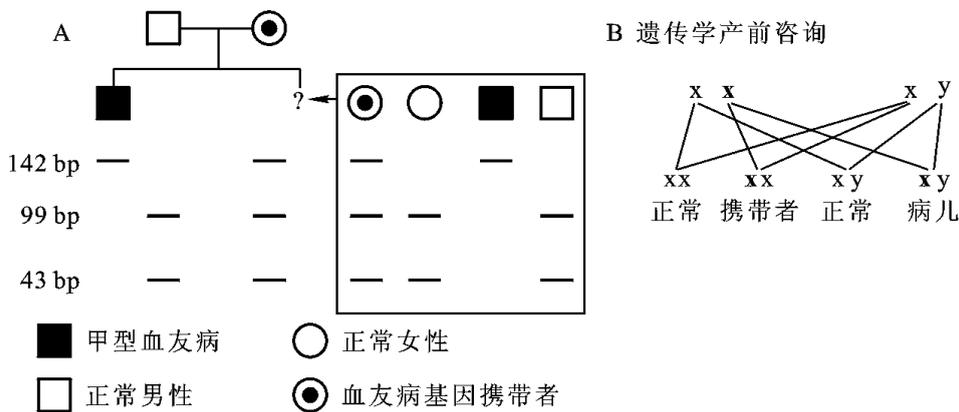


图 17-15 甲型血友病基因诊断分析图

对甲型血友病的产前咨询,传统的遗传学只能推测,是女孩有 50% 的可能是正常的,50% 是携带者。是男孩有 50% 可能是正常的,50% 的可能还是血友病儿。对妊娠中的胎儿究竟是继续妊娠还是需要终止妊娠,提供不出准确的咨询意见。基因诊断则能明确确定妊娠中的胎儿究竟是正常儿、携带者还是血友病儿,为产前咨询提出准确的具体的建议。

(二) 感染性疾病的基因诊断

感染性疾病是感染了病原微生物引起的。不同的病原微生物有其特异的基因或 RNA 片段。可针对病原微生物的特异基因设计探针,通过分子杂交对感染性疾病作出基因诊断。

目前国内能开展的基因诊断包括肝炎病毒、人巨细胞病毒、人类免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、结核杆菌和虐原虫等。

(三) 肿瘤的基因诊断

人类肿瘤是多基因、多步骤演变过程的复杂的疾病,涉及原癌基因的结构突变、表达异常和抑癌基因的失活。这些基因的改变可作为肿瘤的基因标志。通过对这些癌基因、抑癌基因的检测对肿瘤作出基因诊断。

ras 基因是人类肿瘤中最常被激活的原癌基因,常见的点突变是 12、13、61 位密码子的突变。膀胱癌、直肠癌和肺癌病人的 *K-ras* 基因的第 12 位密码子常常从 GGC(编码甘氨酸)突变成 GTC(编码缬氨酸)。应用 PCR/ASO 和 PCR/SSCP 技术可以对这种突变进行检测。

p53 基因是常见的抑癌基因。p53 基因的突变、缺失、失活是许多肿瘤发生的原因。应用 PCR 结合 SSCP 或 DNA 测序等方法可对 p53 基因的改变进行检测。

(四) 基因诊断在法医学鉴定中的应用

法医学鉴定的主要目的是个人识别和亲子鉴定。小卫星 DNA(15 ~ 200 bp)和微卫星 DNA(2 ~ 6 bp)是高度重复序列。这些高度重复序列重复的次数因人而异。针对重复序列制备寡核苷酸探针,与小卫星 DNA 或微卫星 DNA 进行 Southern 印迹杂交可以得到大小不等的杂交条带。杂交条带的大小和多少具有个体特异性,可作为个体识别的依据,其图谱称为 DNA 指纹图或基因指纹图(gene finger-printing)。

法医学检测时,在同一张 Southern Blot 图中,现场得到的 DNA 指纹与嫌疑对象的 DNA 指纹条带如果完全一致则可认定为同一个体。

亲子鉴定时要同时分析父母的 DNA 指纹。被鉴定对象的 DNA 指纹条带分别来自父母双方,在生物学父母的 DNA 指纹图中应该能找到对应的条带。

第七节 基因治疗

一、基因治疗的概念

基因治疗(gene therapy)是指将遗传物质转移到患者细胞内,使其在体内发挥作用,达到治疗目的。早期人们对基因治疗的认识是狭义的,仅将通过基因转移技术用正常基因原位置换有缺陷的基因治疗单基因遗传病叫做基因治疗。随着基因治疗技术的发展,基因治疗的概念也不断地扩展。现在不仅可以将外源正常基因导入病变细胞取代有缺陷的基因,产生正常基因表达的产物来治疗疾病,也可以采用适当技术抑制细胞内某些基因的异常表达,达到治疗疾病的目的,还可以将特定的基因导入正常细胞,在体内表达特定基因的产物,达到治疗疾病的目的。这些都称为基因治疗。目前基因治疗的方法主要有以下几类。

1. 基因矫正(gene correction)

在体内对致病基因的突变碱基进行纠正而保留基因中的正常部分。

2. 基因置换(gene replacement)

通过同源重组,用正常基因取代细胞内的异常基因。

3. 基因增补(gene augmentation)

不去除或纠正有缺陷的基因,将目的基因导入有病变的细胞或正常细胞,让目的基因的产物补偿或替代有缺陷基因的功能。

4. 基因失活(gene inactivation)

用特定的方式抑制某个基因的表达。常用的方法包括反义核酸、核酶。也可以用基因剔除技术使某个基因被破坏而不能正常表达。

二、基因治疗的基本程序

基因治疗的方式有两种。一种是直接体内基因治疗(in vivo),即将目的基因在体内直接转移到靶细胞内。所用载体必须具有特异的导向性和对靶细胞有较高的转移效率。另一种是间接体内治疗(ex vivo),即先将合适的靶细胞在体外进行培养和增殖,将目的基因转移到在体外培养的靶细胞内使其高效表达,然后再将这些靶细胞回输病人体内,使目的基因在体内表达,达到治疗的目的。直接体内基因治疗是最有前途的基因治疗方式,但技术方面还存在许多困难。目前基因治疗主要采用间接体内治疗的方式,基本程序包括:

(一) 治疗基因的选择

为达到基因治疗的目的,首先要选择对疾病有治疗作用的目的基因。对由于单基因缺陷引起的遗传病而言,其野生型基因即可作为目的基因。对于血管栓塞性疾病可选择血管内皮生长因子基因。对于肿瘤性疾病可选择反义核酸或核酶作为治疗基因。

(二) 基因载体的选择

目前基因治疗使用的载体有病毒载体和非病毒载体两大类。

病毒性载体有逆转录病毒(retrovirus)、腺病毒(adenovirus)和腺病毒相关病毒(adenoassociated virus)。逆转录病毒载体特点见本节基因转移部分。腺病毒是双链线性 DNA ,不整合到细胞的染色体 ,以附加体形式存在 ,表达不稳定。腺病毒基因较多 ,表达的产物可能会引起过敏反应或其他副作用。腺病毒相关病毒的繁殖需依赖辅助病毒 ,如腺病毒 ,缺少辅助病毒时基因整合到细胞染色体上潜伏下来 ,有辅助病毒时 DNA 才开始复制。整合位点固定在 19 号染色体的 13.4 带上。

(三) 靶细胞的选择

根据靶细胞种类的不同 ,基因治疗分为体细胞基因治疗和生殖细胞基因治疗两类。

生殖细胞的基因治疗结果有可能通过生殖细胞遗传给后代。从安全和伦理学角度考虑 ,生殖细胞基因治疗还不能直接用于人 ,仅限于动物试验。

体细胞基因治疗所选用的细胞包括淋巴细胞、造血细胞、肝细胞、内皮细胞、肌细胞和肿瘤细胞等。这些细胞要易于从体内取出和移植 ,易于体外培养 ,易于外源基因的导入 ,并有较长的寿命。

干细胞是能够分化的细胞 ,如骨髓多能干细胞可以分化成各种血细胞。选择骨髓干细胞作为基因治疗的靶细胞 ,能够使转移基因存在于所有的血细胞内。

(四) 基因转移的方法

有效的基因治疗与如何将目的基因转移到受体细胞并进行有效的表达是分不开的。体外试验中将外源基因导入哺乳动物细胞分为病毒介导和非病毒介导两种方法。

1. 非病毒介导的基因转移

非病毒介导的基因转移又分为物理方法和化学方法两类。物理方法包括电打孔、基因枪、显微注射等。化学方法包括磷酸钙沉淀、DEAE—葡聚糖(diethyl aminoethyl - dextran ,DEAE - Dextran)和脂质体法。

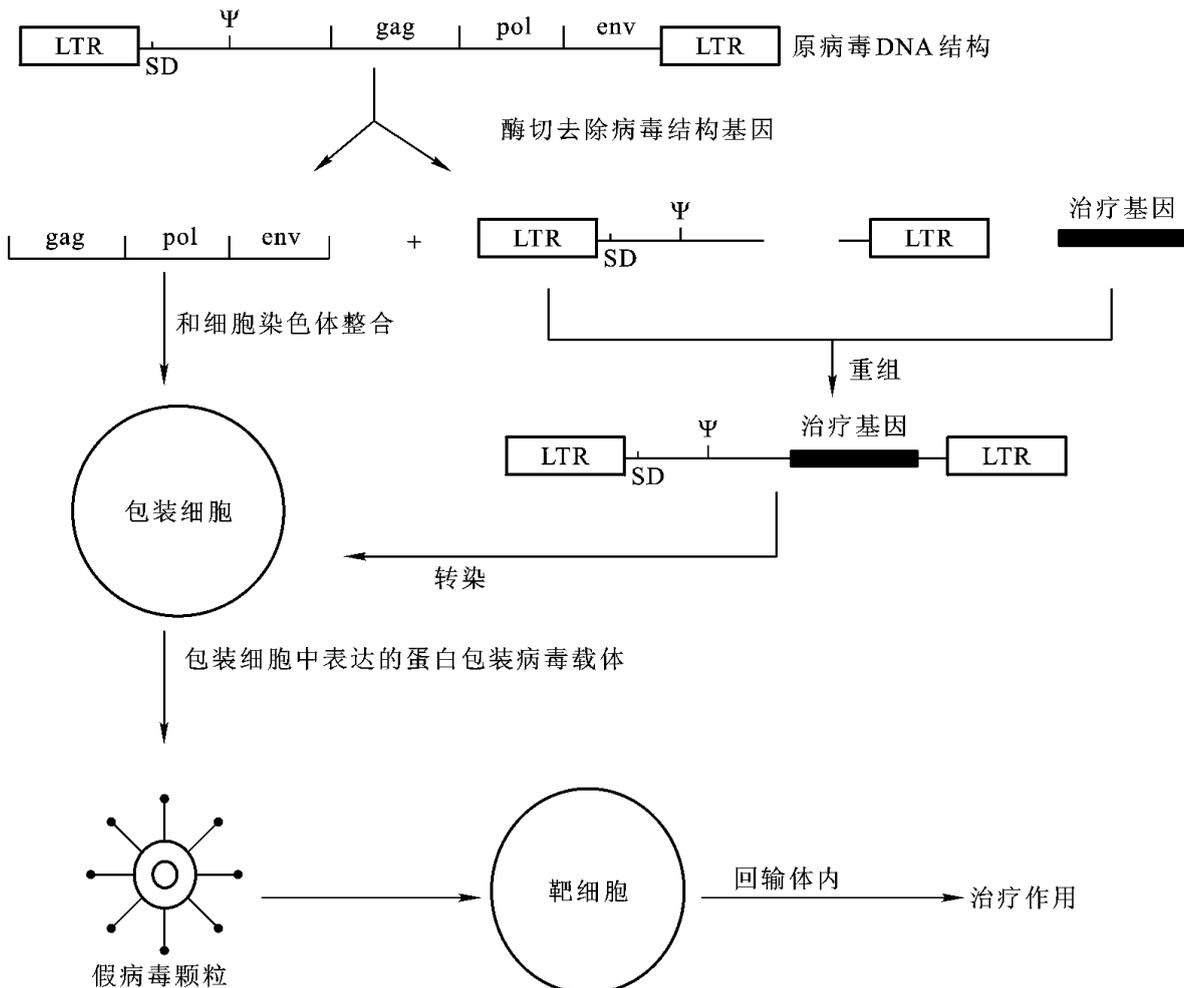


图 17-16 逆转录病毒载体基因结构示意图

磷酸钙能将任何外源 DNA 有效的导入培养的哺乳动物细胞,转运到各个细胞器包括细胞核。以瞬时和稳定两种形式存在。DEAE—葡聚糖是一种阳离子高分子多聚物,和带负电荷的 DNA 形成复合物黏附于细胞表面,促进 DNA 的内吞作用。适用于瞬时表达,从不整合到染色体。脂质体(liposome)是由脂质双层分子组成的环形封闭囊泡,DNA 被包裹在小囊内,通过脂质体膜和体细胞膜的相互作用将 DNA 转移到细胞内。

2. 病毒介导的基因转移

基因治疗中最常用的病毒载体是逆转录病毒。有关逆转录病毒介导基因转移的过程见图 17-16。

(五) 外源基因表达的检测

表达载体上一般都有新霉素抗性基因(neomycin resistance)。转化细胞可在 G418 培养基中生长。未转化细胞因没有新霉素抗性基因,不能在 G418 培养基中生长。

基因治疗作为一门新兴学科发展迅速,但也有许多理论和技术性问题有待深入研究,对其潜在的风险也需有更充分的认识。目前基因治疗还仅限于体细胞。大多数采用的是间接体内治疗方式。选择的病例是明确的单基因缺陷病。选用的治疗基因在体内表达不需要进行严格控制。治疗效果必须明显大于可能引起的副作用。基因治疗方案用于人体之前必须经过体外研究、小鼠体内试验和灵长类体内试验以保证对人体无害。

Summary

Gene engineering is also called gene cloning or molecular cloning. The target genes are inserted into the vector and the resulting recombinants are transformed to host cells for amplification and expression. The general enzymes in gene engineering are restriction enzymes and DNA ligases etc. Vectors include plasmids, phages, cosmids and viruses. The target gene can be obtained by isolation from organism, reverse transcription, PCR and artificial synthesis. The ligation methods between target genes and vectors include compatible cohesive terminal ligation, blunt ends ligation and directed ligation.

Molecular hybridization is the process in which double strains are produced by single strain nucleic acid by base pairs complementation. One of DNA double strains is labelled as probe before hybridization.

Polymerase chain reaction (PCR) is DNA replication in vitro. Target sequences are amplified by the extension in the 3' end primers, which is hybridized to parent DNA strand (template) in the test tube.

Two methods used to determine DNA sequences are chemical modified method and chain-termination method. The latter (also called Sanger Dideoxy Method) is widely used and has been carried out automatically.

Transgenic animal is produced by introducing foreign genes into oosperm. Though it still a zoogamy, the genome has integrated with foreign gene.

Cloned animal is produced by introducing the nucleolus of somatic cells into nucleolusless oocyte. The whole genetic material in cloned offspring come from the nucleolus donor, and the descendant is the genetic copy of donor animal asexually.

Gene knockout relies on the process of homologous recombination. Through this process, target genes in chromosome are replaced by the foreign genes and become inactive.

Gene diagnosis is an approach for the diagnosis in some diseases by detection of abnormality in gene structure and in gene expression.

Gene therapy is an experimental medical intervention that involves gene correction, gene replace-

ment ,gene compensation and gene inaction to fight disease of abnormality in gene structure and expression . So far gene therapy is limited in somatic cells. In most studies the therapy is carried out by gene compensating ,in which therapeutic DNA was introduced into target cells and the cells are delivered back to the body.

思 考 题

1. 限制性内切酶有几类？如何命名？有何特点？
2. 载体在基因工程中有何作用？作为载体的质粒应具备哪些特点？
3. 基因工程中目的基因和载体的连接方式有几种？各在什么情况下使用？
4. 简述 DNA 克隆的筛选方法和原理。
5. 试述分子杂交的原理、种类和应用。
6. 试述 PCR 的操作过程和主要用途。
7. 简介双脱氧合成末端终止法测 DNA 序列的原理和过程。
8. 试比较转基因动物、克隆动物和基因剔除技术。
9. 试说出基因诊断的常用技术方法和用途？
10. 基因治疗的方法、方式和注意事项各有哪些？

(刘兴汉)

第四篇

综合篇

本篇包括生物膜、细胞信号转导、血液生物化学、肝胆生物化学、脑生物化学和无机物的生物化学等六章。由于这几章的内容涉及到前三篇生物分子的结构与功能、物质代谢的途径与调节、遗传信息的传递等相关的知识,所以取名为综合篇。本篇从生物化学角度,在分子水平上阐述一些重要的生理机能,包括有机体细胞对外界刺激应答的传递过程和某些组织器官的生理功能。本篇更多地体现出医学生物化学的特殊性。

生物膜是由脂质、蛋白质和糖类所构成的复杂的生物大分子复合体。生物膜不仅使细胞具有相对独立和恒定的内环境,并形成细胞内各种代谢区域化进行的物理屏障,同时还执行物质转运、分子识别、信息传递和能量交换等多种重要的生物学功能。了解生物膜的生物化学知识对于学习后续课程十分必要。

生物体不断地接受各种信号刺激,信号分子经过由多种相关成分参与的跨细胞膜的复杂级联传递,最终引起生物效应,对外来刺激进行应答。这一过程称为信号转导。信号转导对于生物体适应外界环境、生物体的生长、发育,细胞的增殖与分化、凋亡,以及肿瘤等疾病的发生等均有重要的意义。

无机物是生物体的重要组成成分之一。水和无机盐都有其重要的生理功能。微量元素对生物体的作用已日益受到重视。它们在人体的作用是多方面的,而且与许多疾病密切相关。

血液、肝胆和脑的生物化学描述这三个组织、器官在机体代谢中重要地位和作用,以及体现其特有功能的物质代谢特点。脑生物化学是本世纪生命科学的热点话题,发展迅速。人类脑的结构、功能非常复杂,破解人脑的奥秘必将对生物医学研究的最大挑战。脑生物化学一章为医学生进一步了解这一医学领域的前沿知识奠定了必要的基础。

第十八章 生物膜

本章教学要求

- 细胞膜的分子组成
- 膜的不对称性、流动性和液态镶嵌模型
- 膜转运的种类和特点
- 膜的主要功能

细胞是生命活动的基本单位,含有多种膜结构。细胞膜又称质膜(plasma membrane),包绕在细胞的最外层;在真核细胞中,还有参与各种细胞器,如内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体及细胞核等构成的内膜系统,这些统称为生物膜(biomembrane)。

生物膜是一个物理屏障,它不仅使细胞具有相对独立和恒定的内环境,并且使细胞内的各种代谢区域化(compartmentation)进行。生物膜还具有物质转运、分子识别、信息传递和能量交换等多种重要的生物学功能。

生物膜是由脂质、蛋白质和糖类所构成的复杂的生物大分子复合体。各种膜的结构基本相似,但在组成、代谢和功能上各具特点。

在电镜下观察,细胞膜为厚6~10 nm的薄膜,脂双分子层(lipid bilayer)是细胞膜及其他细胞器膜的基本结构。细胞膜对进出细胞的各种离子和分子具有选择性。细胞膜是动态并有序的液晶结构,是细胞多种生物学功能得以正常发挥的物质基础。生物膜结构及功能的异常会导致多种膜相关疾病的发生。

生物膜结构及功能的研究是一个涉及生物物理、生物化学、生理、细胞生物、药理及临床医学等多学科领域的命题,并一直受到人们的极大重视。随着冰冻蚀刻电子显微镜、X射线晶体衍射、膜谱和膜工程及分子生物学等分析方法和技术在膜研究中的开展,人们对生物膜结构和功能的认识也在不断深入,并促进了生物膜在生物医学领域及在工农业生产和环境保护中的应用。

本章着重介绍细胞膜的分子组成、结构和功能。

第一节 细胞膜的分子组成

生物膜的化学组成基本相同,主要为脂质、蛋白质和糖类。此外,还有少量的水和金属离子。膜脂和膜蛋白平均各占膜重量的40%~50%。膜上的糖类以糖蛋白和糖脂的形式存在,含量约为1%~10%。不同的膜结构其组分的含量也有很大的差别,如线粒体内膜的蛋白质含量达75%以上,而神经髓鞘膜的蛋白质含量仅约25%,这种分子组成上的差别与膜的功能密切相关。

一、脂质

膜脂是细胞膜的基本组分,是物质选择性通透的屏障。1 μm^2 的细胞膜中约含有 5×10^6 个脂质分子,一个哺乳动物细胞膜上的脂质分子可达 10^9 个。膜脂主要含磷脂、胆固醇和糖脂(表18-1)。这些分子均为亲水和亲脂的兼性分子,但它们的含量、结构、理化性质,及对膜的构成及功能的影响和作用却不同。

表 18-1 生物膜脂质分子的组成和含量

生物膜	总脂(%)						
	PC	PE	PS	鞘磷脂	胆固醇	糖脂	其他
肝细胞	24	7	4	19	17	7	22
红细胞	17	18	7	18	23	3	14
神经髓鞘	10	15	9	8	22	28	8
线粒体	49	25	2	0	3	痕量	21
内质网	40	17	5	5	6	痕量	27

(一) 磷脂

磷脂是膜脂中含量最高的一种,包括甘油磷脂和鞘磷脂两类。甘油磷脂主要有磷脂酰胆碱(PC,亦称卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(PE,亦称脑磷脂)和磷脂酰丝氨酸(PS),另外还有少量的磷脂酰肌醇(PI)和心磷脂(CL)。鞘磷脂分子中含有鞘氨醇和胆碱(见第八章第四节)。

磷脂分子有一个亲水的极性头部和一个疏水的非极性尾部,极性头部由甘油或鞘氨醇、磷酸及胆碱等小分子化合物构成,疏水的尾部是两条脂酸链(图 18-1)。同一种组织中磷脂的脂酸链组成极为相近,并可在一定的生理和病理过程中发生变化。脂酸链一般含 14~24 个碳,以 16 碳和 18 碳多见。两条脂酸链(R_1, R_2)中, R_1 一般为饱和的, R_2 为不饱和的脂酸链。不饱和脂酸链含一个或多个顺式(cis)双键,并于链尾部呈一定的角度和扭转,对磷脂分子间的相互作用及膜的组装有影响,可使膜结构变得松散。除磷脂酰丝氨酸带负电荷外,其余三种磷脂均为电中性。

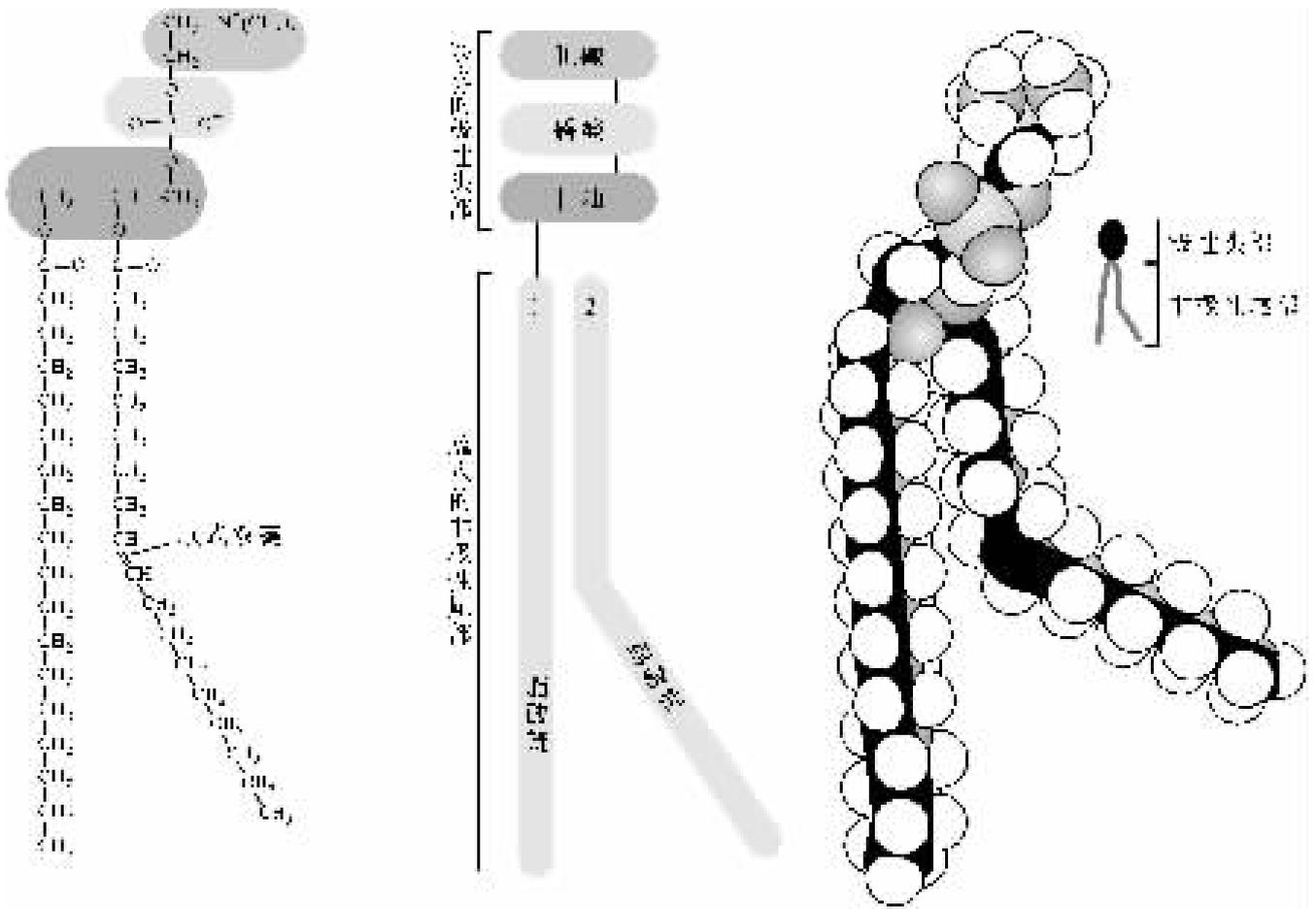


图 18-1 磷脂的分子结构

(磷脂酰胆碱的分子式、分子式简图、原子空间排布及结构示意图)

生物膜以磷脂分子的脂双分子层为基本结构(图 18-2)。实验证明,脂质分子的形状和兼性性质决定了其在液态环境中的存在状态。例如,将游离脂肪酸、含一条脂酸链的溶血磷脂及去垢剂(兼性小分子)加入到水溶液中后,它们容易形成单分子层微团(micelle)。磷脂的两条脂酸链所占的疏水表面积较大,故在水溶液中形成闭合的脂双层分子结构。脂双层分子结构的形成是一个自发的组装过程,并且是热力学上最为稳定的形式,这对于细胞的形成和功能的发挥极为重要。在此结构中,磷脂分子极性的头部与水相接触,非极性的脂酸链间通过疏水作用和 van der Waals(范德华)力相互靠近,构成连续而有序排列的二维的分子集合。

脂质体(liposome)是一种人工合成的膜结构。例如,磷脂经超声处理后可形成双分子层微团,直径为 25 nm ~ 1 μm。脂质体在生物膜的结构和功能研究中发挥了重要的作用。

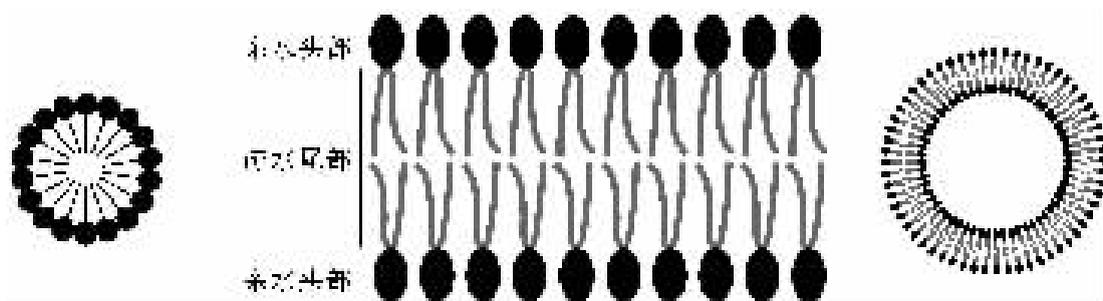


图 18-2 单分子层微团、脂双分子层和脂质体结构

(二) 胆固醇

动物细胞膜上的胆固醇含量较高,占膜脂的 15% ~ 30%,并可随营养状态波动。细胞膜上的胆固醇还高于内膜系统。胆固醇分散地插在磷脂分子之间,其极性的头部为刚性甾环上所连接的羟基,与磷脂分子的极性头部相靠近,疏水的尾部为含 8 个碳的短烃链。刚性的甾环限制了磷脂头部附近脂酸链的运动(图 18-3)。

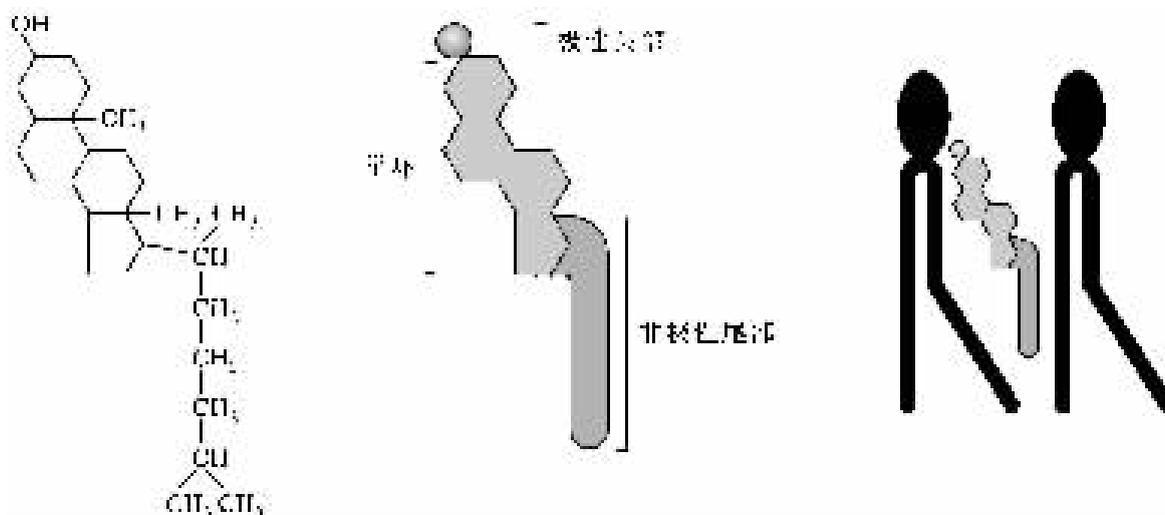


图 18-3 胆固醇的分子结构及在磷脂分子中的分布

(三) 糖脂

糖脂占总脂的 5%,存在于几乎所有的细胞膜上,并位于脂双分子层的外层。糖脂包括甘油糖脂和鞘糖脂,前者主要存在于细菌和植物的细胞膜上,动物细胞膜上的为鞘糖脂(见第三章第四节)。鞘糖脂,如脑苷脂多见于神经髓鞘膜上,可达膜脂的 40% 以上。神经节苷脂是含有 1 ~ 4 个唾液酸的酸性鞘糖脂,唾液酸所携带的负电荷使膜局部的电负性增加,并可结合膜表面的 Ca^{2+} 。鞘糖脂通常含有较长且饱和度较

高的脂酸链,如半乳糖脑苷脂的脂酸链(24个碳)。糖脂的极性头部为含糖基的寡糖链,非极性尾部是神经酰胺上的两条脂酸链。糖脂分子间倾向于通过头部的氢键和尾部脂酸链的疏水作用自身聚集。

二、蛋白质

生物膜许多重要的功能都是由膜蛋白完成的,转运蛋白、受体、酶、抗原(如主要组织相容性抗原)及结构蛋白等都是膜蛋白。膜蛋白的分子较大,膜脂相当于膜蛋白的一种溶剂,为膜蛋白的存在和其功能的发挥提供必要的环境和条件。目前已发现,人类基因组所表达的蛋白质中,膜蛋白占25%~30%。根据膜蛋白在膜上的定位,膜蛋白分为外周蛋白(extrinsic或peripheral protein)和内在蛋白(intrinsic或integral protein)两种(图18-4)。

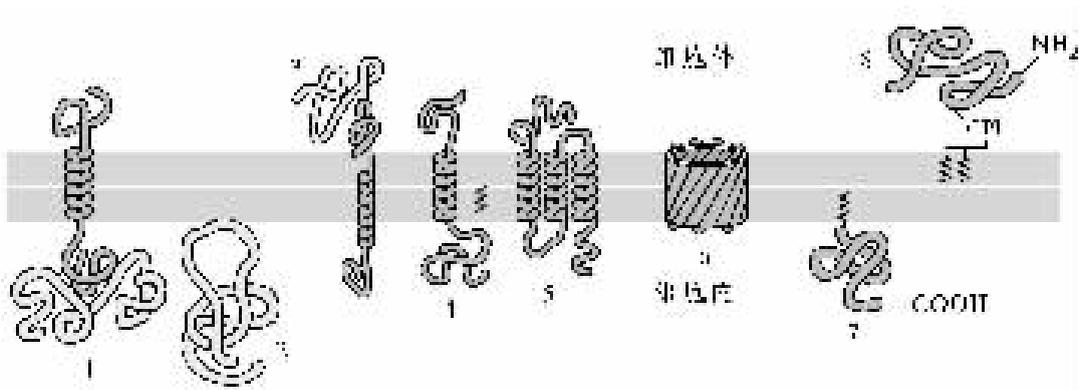


图18-4 膜蛋白在脂双分子层上的定位
(图中1~3为外周蛋白,4~8为内在蛋白)

(一) 外周蛋白

膜的外周蛋白占膜总蛋白质的20%~30%,它们分布于脂双分子层的内、外表面。外周蛋白一般为水溶性蛋白质,其亲水性氨基酸的极性基团暴露在蛋白质的表面。外周蛋白主要是通过静电引力及氢键与膜的内在蛋白或与膜脂分子的头部相互作用而膜结合于膜上,结合力一般较弱,采用高浓度的盐溶液可将外周蛋白从膜上提取出来。

(二) 内在蛋白

膜内在蛋白又称为镶嵌蛋白,占膜蛋白总量的70%~80%。内在蛋白可部分的插入或全部穿越脂双分子层,后者也称为跨膜蛋白(transmembrane protein)。内在蛋白的亲水部分含极性氨基酸,暴露于膜内、外表面的液体环境中。跨膜蛋白在脂双分子层的疏水部分中的结构为含18~23个氨基酸的 α 螺旋。 α 螺旋的骨架包藏在螺旋的内部,而非极性氨基酸的疏水侧链则位于螺旋表面,并与膜脂分子疏水的尾部相互作用。有些跨膜蛋白的 α 螺旋在脂双分子层中穿越一次,即单次跨膜(single pass),如红细胞膜上的血型糖蛋白(glycophorin);另有一些跨膜蛋白含有多个 α 螺旋,并多次跨膜(multiple pass),如膜受体中的七个跨膜 α 螺旋受体或称蛇型受体(serpentine receptor)(见第十九章)。 α 螺旋是跨膜蛋白穿膜的最常见的结构域,但也有些跨膜蛋白,如E. coli大肠杆菌等细菌的孔道蛋白(porin)则以反向平行的多个 β 片层环绕而成的“桶”状结构(β barrel)结合于膜上。膜内在蛋白质还可通过共价键结合在膜脂内面的脂酸链上或通过GPI锚定于细胞膜上。

内在蛋白与膜的结合较为牢固,进行分离时需要加入兼性小分子物质助溶,如SDS或Triton X-100等去垢剂。兼性小分子物质可取代膜脂分子而与膜内在蛋白的疏水部分相结合,但当它们去除后,膜内在蛋白又变为不溶状态。因此,获得膜内在蛋白的结晶,并通过X射线晶体衍射分析其三维空间结构的难度较大。

结合于不同生物膜上的酶类多以内在蛋白的方式存在,如线粒体内膜中参与氧化呼吸链组成的电子

传递复合体(氧化还原酶)均为跨膜蛋白。有些酶在膜上有特殊的定位和分布,如位于细胞膜的5'-核苷酸酶、 Na^+ 、 K^+ -ATP酶、腺苷酸环化酶,内质网膜的葡萄糖-6-磷酸酶,高尔基体膜的半乳糖基转移酶、唾液酸基转移酶及线粒体内膜的琥珀酸脱氢酶和ATP合酶等,它们可作为相应的膜结构分离纯化及鉴定的标志。

三、糖

细胞膜表面的糖主要以糖脂、糖蛋白以及蛋白聚糖等糖复合物中糖链(见第三章)的形式存在。各种糖链的单糖种类、数目及连接方式不同,是糖链结构复杂多样性并具有多种生物学功能的基础。例如,膜蛋白大部分为糖蛋白,其糖链参与和介导了细胞-细胞、细胞-细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的识别和黏附过程中分子间的相互作用。细胞膜上糖复合物的糖链及所吸附的ECM中的糖蛋白和蛋白聚糖的糖链,在膜脂外表面相互交织,形成厚约5~20 nm的糖萼(glycocalyx),亦称细胞外被(cell coat)。糖萼可作为细胞的一种保护性屏障,使细胞免受机械性和化学性损伤,及病原体感染等。

第二节 生物膜的结构

生物膜是脂质、蛋白质和糖类构成的生物大分子复合体。这些生物大分子之间的有机结合依赖于它们之间的相互作用和影响。生物膜的主要特征为膜结构的不对称性和膜的流动性。对膜分子结构的认识始于1925年E. Gorter和F. Grendel对人红细胞膜的研究发现:用丙酮提取的红细胞膜脂铺展于水面上的单分子层面积约为红细胞表面积的两倍,揭示了膜结构的脂双分子层性质。尽管生物膜的结构极为复杂,随着新的膜分离和分析技术的开展和应用,关于膜结构模型的理论也不断完善。

一、膜结构的不对称性

各种膜分子在细胞膜内外两层及膜上不同区域的分布不同,它造成了膜结构的不对称性,并且与膜的特定功能密切相关。

磷脂分子在人红细胞膜上的分布特点是:磷脂酰胆碱和鞘磷脂主要位于膜的外层,而磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸则主要存在于膜的内层。磷脂酰丝氨酸不仅使膜的内层带较多的负电荷,还参与了信号分子的跨膜信号转导作用。如胞液中的蛋白激酶C(PKC)需要与PS带负电荷的头部结合来维持其激活状态。当细胞发生凋亡时,PS会很快地从膜内层易位到膜外层,并作为一种被吞噬细胞吞噬和消化的信号。胆固醇在膜上的分布也是不对称的,它主要分布于膜外层。糖脂仅分布于细胞膜外层或高尔基体膜的腔内侧面,因二者在拓扑结构上相当。

膜蛋白在合成及插入膜时就决定了其N端和C端在膜上定位的方向性。例如,有的跨膜蛋白N端伸向细胞膜外面,有的则留在细胞内,还有的N端和C端同在细胞内等。对红细胞膜进行的冰冻蚀刻实验结果显示,其外层膜的内侧和内层膜的外侧中的蛋白颗粒的数量不同,前者的蛋白颗粒约是后者的2倍。

膜上含有糖链的糖复合物也位于细胞膜的脂双分子层的外层。

膜分子分布的不对称性不是随机的,如磷脂分子在膜上的不对称分布与磷脂分子合成时内质网膜上的磷脂转位因子(phospholipid translocator)的作用有关。膜分子分布的不均一性还体现在细胞膜上形成一些微域(microdomains),如脂筏(lipid raft),其直径约70 nm,富含鞘糖脂和胆固醇,因鞘糖脂长且饱和的脂肪酸链相对伸展而使局部细胞膜增厚。脂筏有利于功能相关的蛋白质聚集及功能的发挥。在肠和肾上皮细胞的腔内和基底面上,分布有不同种类的载体蛋白,并通过各自的转运机制,协调完成对物质的跨膜运输。

膜分子分布的不对称性决定了膜功能的不对称性。

二、膜的流动性

膜各种功能的正常发挥依赖于膜的流动性。膜脂和膜蛋白的运动是膜流动性的源动力。

(一) 膜分子的运动

1. 膜脂的运动

1970 年前后,人们开始认识到单个脂分子可以在脂双分子层的二维结构中运动。对人工膜及生物膜磷脂分子运动情况的研究发现,磷脂分子的运动有以下几种方式:(1)磷脂分子可在脂双层的同一层中作侧向扩散,其速率很快,达 10^7 次/s,相当于一个 $2\mu\text{m}$ 细菌的范围大小。在人工膜中,磷脂分子的侧向扩散系数为 10^{-8} cm^2/s ,比生物膜还要高 10 倍左右(2)磷脂分子从脂双分子层的一层翻转到另一层,称为翻转(flip-flop)运动。由于运动中磷脂分子极性的头部须通过脂双层的

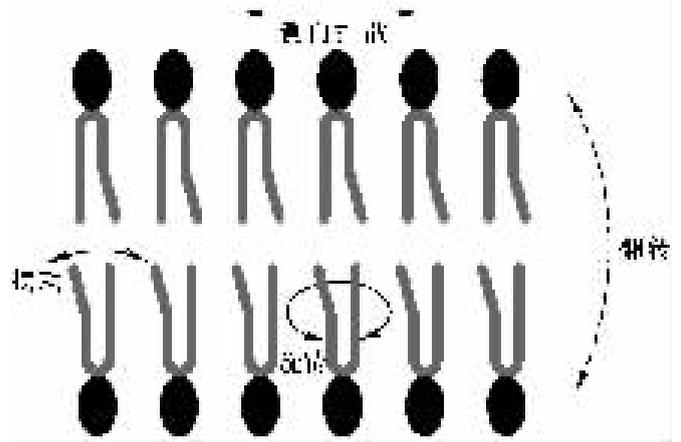


图 18-5 磷脂分子的运动方式

疏水区,因此,这种运动极其缓慢,并对维持膜结构的不对称起重要作用(3)磷脂分子围绕与膜平面垂直的分子长轴的旋转运动(4)磷脂分子的脂酸链的摆动运动,靠近极性头部的脂酸链摆动幅度小,而以脂酸链尾部的摆动幅度最大(图 18-5)。

2. 膜蛋白的运动

膜蛋白也有与膜脂类似的侧向扩散和旋转运动,但无翻转运动。膜蛋白存在侧向扩散的证据来自于一个经典的实验研究。将培养的小鼠细胞和人细胞融合,可形成杂交细胞。在杂交细胞中同时加入用绿色荧光标记的抗小鼠膜蛋白抗体,及用红色荧光标记的抗人膜蛋白抗体。两种荧光抗体加入后的即刻观察发现:绿色荧光和红色荧光各自结合于杂交细胞中的小鼠细胞膜部分和人细胞膜部分,使杂交细胞一半呈绿色,另一半呈红色。经 37°C 培养 40 min 后再观察则发现,两种颜色的荧光均匀分布于杂交细胞膜表面(图 18-6)。目前,常采用光漂白荧光恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)技术研究膜蛋白的侧向扩散速率。FRAP 的工作原理是利用激光使荧光标记的特异膜蛋白或表达绿色荧光蛋白的膜融合蛋白在局部淬灭,即漂白。当附近标记的分子扩散过来时,原漂白区的荧光强度恢复,并由此计算出扩散系数。扩散系数越大,则膜蛋白的侧向扩散速率越快。

膜蛋白的运动也受到一定程度的限制。例如,尽管精子的质膜是连续的,但用荧光标记的抗精子膜蛋白抗体的研究发现,膜蛋白在精子头部的前段、后段及尾部均有不同。这种定位分布反应了膜蛋白运动的局限性。另外,膜蛋白与膜内侧面细胞骨架蛋白的结合,也限制了膜

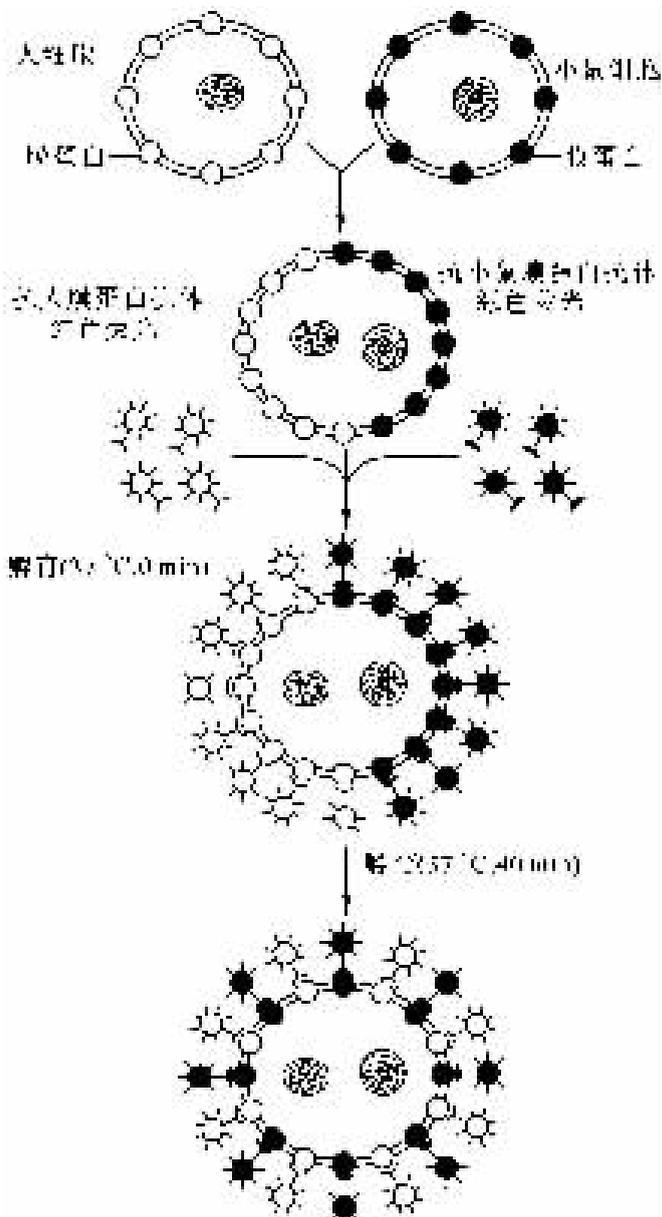


图 18-6 膜蛋白运动的细胞膜融合实验

蛋白的运动。

随着糖脂和糖蛋白在膜平面上的侧向移动,它们所结合的糖链也会随之移动。因此,糖萼也是处于动态变化之中。

(二) 影响膜流动性的因素

在生理状态下,细胞膜为液晶态(liquid crystal state),即处于液态和晶态之间的过渡状态。它既有液态分子的流动性,又有晶态分子排列的有序性。超过或低于相变温度,膜脂将出现液态或晶态的相变,并会影响膜的正常代谢和功能。膜的组成成分及温度对膜的流动性有较大的影响:

1. 磷脂

磷脂分子所含的脂酸链越长且饱和度越高,则脂酸链间的相互作用也就越强。因此,流动性随之降低,相变温度增高。例如,含18碳的磷脂分子比含16碳的同样磷脂分子的相变温度高17℃。通过改变所合成的脂酸链的长度和饱和度来调整膜的流动性,也是细胞膜的一种自我保护性功能。例如,当培养E. coli大肠杆菌的培养基的温度从42℃降到27℃时,细菌中饱和脂酸链和不饱和脂酸链的比例从1.6降到1.0,以维持膜的流动性。

2. 胆固醇

胆固醇分子对细胞膜流动性的影响具有两重性:在相变温度以上减少膜的流动性;在相变温度以下,增加膜的流动性。前者与胆固醇插入磷脂分子中的刚性甾环限制了磷脂分子脂链的运动有关;后者涉及其短烃链影响了磷脂分子中脂酸链间的相互作用。一般来讲,胆固醇分子具有增强细胞膜稳定性的作用。例如,不能合成胆固醇的细胞突变株,因为膜的流动性过大而裂解死亡。如在培养液中加入适量的胆固醇,使膜脂双分子层保持正常的流动性,细胞便能存活。

3. 蛋白质

膜蛋白通过与膜脂分子的相互作用也影响膜的流动性。膜内在蛋白越多,结合在其周围的界面脂就越多,膜的流动性也就越小。事实上,膜蛋白在限制膜脂运动的同时,也限制了自身的运动。

4. 温度

由于膜脂和膜蛋白分子的运动是热运动,因此,温度升高,细胞膜的流动性增强;反之,温度降低,流动性减弱。随着细胞膜的流动性的增强,膜对水及其他亲水分子的通透性增加,膜内在蛋白的扩散运动也增加。但超过相变温度,如温度过高,将破坏细胞膜的液晶态结构,导致细胞膜的过分流动,影响细胞膜的正常代谢和功能。

三、生物膜的分子结构模型

根据大量的实验研究和分析,人们提出了关于多种生物膜的分子结构模型。

片层结构模型(lamella structure model)于1935年由J. D. Davson和J. Danielli提出,该模型理论认为,细胞膜由脂双分子层构成,球形的蛋白质分子结合于脂双层的两侧。单位膜模型(unit membrane model)是在片层结构模型的基础上,于1959年由J. D. Robertson根据电镜的观察结果提出的。电镜下,细胞膜呈现两侧电子密度高,中间电子密度低的三层结构,其他细胞器的膜也有相似的结构。该模型认为:所有生物膜都是“蛋白质—脂双分子层—蛋白质”的三层结构,蛋白质分子以 β 折叠形式,通过静电引力与磷脂分子极性头部的结合。片层结构模型和单位膜模型都有一定的局限性,例如,它们均忽视了膜的流动性及膜蛋白分布的不对称性,对生物膜复杂的功能尚不能给予充分合理的解释。

目前,人们普遍接受的是液态镶嵌模型(fluid mosaic model)。液态镶嵌模型是S. J. Singer和G. L. Nicolson于1972年在多种膜结构模型理论的基础上,并根据免疫荧光、电子顺磁共振(ESR)和冰冻蚀刻等实验研究提出的。液态镶嵌模型认为:生物膜是流动的脂双分子层中,镶嵌着球形的蛋白质分子——“海洋中的冰山”(图18-7)。它强调了生物膜的流动性和膜蛋白分布的不对称性,认为膜脂和膜蛋白分子在膜平面上可侧向移动,膜上结合着不同种类和功能的蛋白质。该模型可以解释生物膜的许多生理现象,但

仍不能回答细胞膜的完整性和稳定性在细胞膜流动性的变化中是何以保持的。

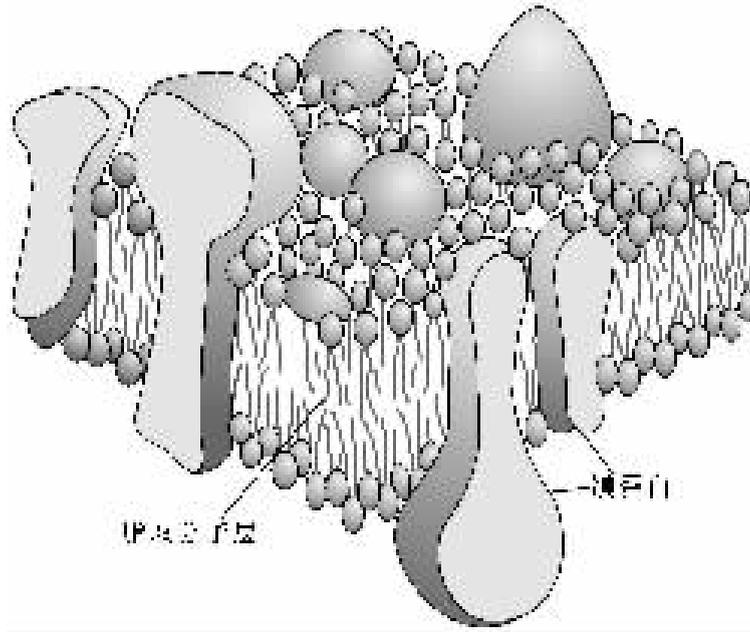


图 18-7 生物膜的液态镶嵌模型

在这以后的 5 年内,又有学者出现了晶格镶嵌模型及板块模型的膜结构理论,它们都是对液态镶嵌模型的进一步补充。如晶格镶嵌模型描述了膜蛋白分子对磷脂分子流动性的限制作用,认为内在蛋白周围结合的磷脂分子为界面脂,界面脂只能随内在蛋白运动,并与内在蛋白构成晶格;板块模型则认为在流动的脂双层中存在着结构和性质不同,但有序又可独立移动的镶嵌板块,板块内不同组分的相互作用以及不同板块间的相互作用,使生物膜具有复杂的生物学功能。

第三节 生物膜的转运功能

细胞通过细胞膜与周围环境进行物质和信息交流。细胞内的合成代谢和分解代谢非常活跃,需要不断的从细胞外摄取合成原料并排出一些代谢产物。细胞膜在对物质的转运上表现为“半透性”,即选择性地允许一些物质通过,而阻止另一些物质的通过。虽然分子大小、结构及理化性质不同的物质跨膜转运的生化机制不同,但对于整个细胞来说,各种代谢物质的转运在多种因素的精确调控下,与细胞的基本生命活动及特殊的生理需要相适应。因此,物质转运方式及其调控机制的研究非常重要。

小分子和离子的转运方式主要为被动转运(passive transport)和主动运输(active transport),而大分子和颗粒物质的运输主要依靠胞吞(endocytosis)和胞吐(exocytosis)的运输方式。

一、被动转运

被动转运是指物质顺浓度梯度的方向,即从膜的高浓度的一侧转运到低浓度一侧的运输过程。它不消耗 ATP 水解释放的能量。被动转运有两种方式:简单扩散(simple diffusion)和易化扩散(facilitated diffusion)(图 18-8)。

(一) 简单扩散

有些物质可通过细胞膜自由扩散,如 O_2 、 N_2 、 CO_2 和 NO 等气体,类固醇激素等脂溶性物质,以及水、甘油、尿素等不带电的极性小分子。这类物质扩散的速率主要取决于膜两侧的浓度差,并趋于达到扩散平衡。另外,它们的扩散速率也与自身的分子大小及在膜疏水区域内脂溶性的高低有关。

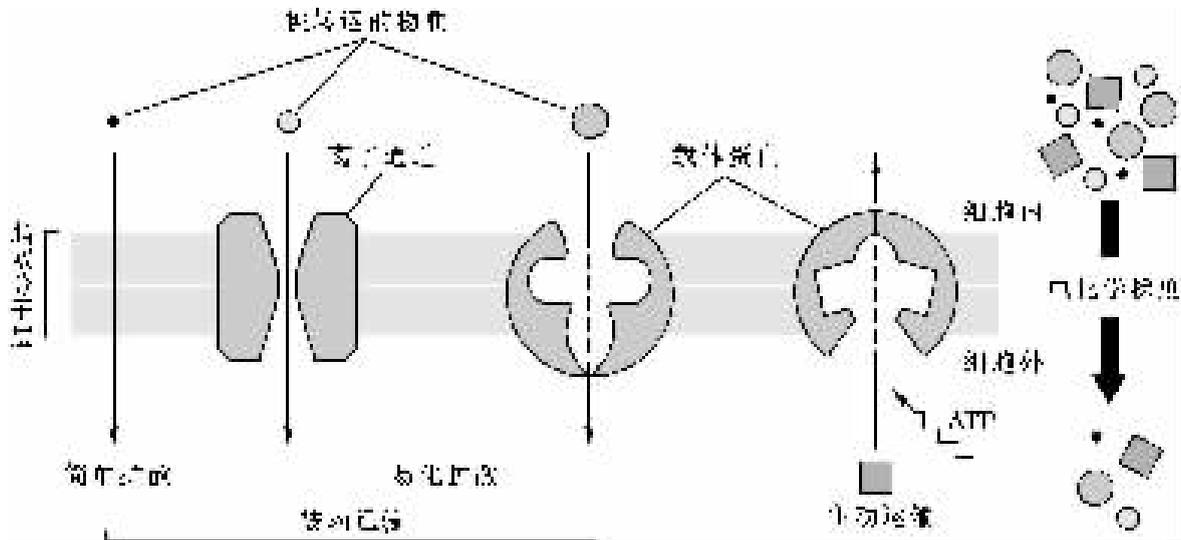


图 18-8 被动转运和主动转运

(二) 易化扩散

不能通过自由扩散进行膜交换的物质,必须与膜上特异的转运蛋白结合才能完成跨膜运输。虽然易化扩散与简单扩散一样,都是物质顺浓度梯度且不消耗能量的运输过程,但易化扩散中需要转运蛋白的协助,因此,易化扩散也被称为协助扩散。一些通过简单扩散运输极为缓慢的物质,通过易化扩散运输其速率显著增加。转运蛋白对所运输的离子及小分子物质有高度的选择性。

转运蛋白(transporter)分为两类。一类是通道蛋白,包括配体门控通道(ligand-gated channel)和电压门控通道(voltage-gated channel),它们在有特异配体或离子结合时,发生构象变化,类似门的“关和开”一样,选择性的使离子瞬时高流量通过。例如,乙酰胆碱受体是一种相对分子质量为 50 000 ~ 58 000 的配体门控通道,是第一个被分离纯化和进行氨基酸测序的通道蛋白。它由 4 种序列相近的跨膜亚基组成 5 聚体($\alpha_2\beta\gamma\delta$),并构成中空的 Na^+ 通道。当神经冲动引起突触前膜释放到突触间隙的乙酰胆碱增加时,乙酰胆碱与突触后膜上的乙酰胆碱受体结合,使受体发生 α 螺旋转动、疏水基团向通道周边移动等有利于通道打开的构象变化,并引起大量的 Na^+ 内流和膜的去极化。电压门控通道,又称离子通道,包括 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Cl^- 等离子的转运通道。这类离子通道有类似的由多个跨膜区(每个包含 6 次 ~ 12 次跨膜)构成的聚合结构。对多种 K^+ 离子通道的研究表明,其保守的 Thr-Val-Gly-Tyr-Gly 序列是允许 K^+ 选择性通透的关键部位,并作为判断一种跨膜蛋白是否为 K^+ 离子通道的一个序列标签。离子通道转运离子的速率非常快,通常在 10^7 离子/s 范围内,接近于 K^+ 离子在水溶液中的自由扩散速率。红细胞膜上的带 3 蛋白(band 3)为阴离子交换蛋白,是通过反向协同方式转运 Cl^- 和 HCO_3^- 的阴离子通道。

另一种转运蛋白为载体蛋白,如葡萄糖、氨基酸和核苷酸等小分子都有特异结合的载体蛋白。已经发现多种葡萄糖载体蛋白,亦称葡萄糖转运蛋白(GLUT,见第六章)。有些是非激素依赖性的,有些则为激素依赖性的。激素对易化扩散中载体数目的调节也是对物质代谢调节的一种方式。如胰岛素降低血糖的作用机制与调动脂肪细胞和肌细胞所贮存的载体蛋白并增加其葡萄糖的结合力,促进葡萄糖的摄取及利用有关。在动物细胞中也有多种氨基酸的特异转运载体(第九章),胰岛素、糖皮质激素及生长激素对氨基酸的摄取和利用的调节作用与上述类似。载体蛋白的转运速率低于离子通道,约为 $10^2 \sim 10^3$ 分子/s。

易化扩散的分子机制涉及载体蛋白的“乒乓”构象及伴随的对转运分子结合力的变化(图 18-9)。当载体蛋白暴露于分子浓度较高的膜的一侧时,处于“乒”构象,与所转运的分子的结合力高;当载体蛋白转向分子浓度低的膜的另一侧时,变成“乓”构象,与分子的结合力降低,于是完成分子从高浓度到低浓度的转运。载体蛋白和转运分子的结合类似酶和底物的结合过程,如载体蛋白也表现为具有转运分子的特定结合位点,有饱和现象和最大转运流量,及与转运分子结构相似的竞争性抑制剂可以阻断转运等,但不引起转运分子的化学变化。

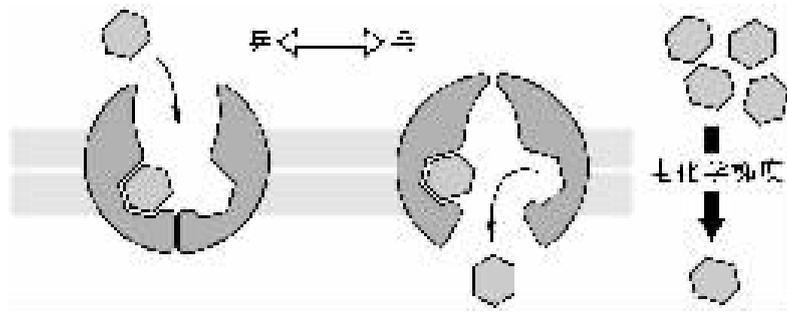


图 18-9 易化扩散中载体蛋白的“乒乓”构象

二、主动运输

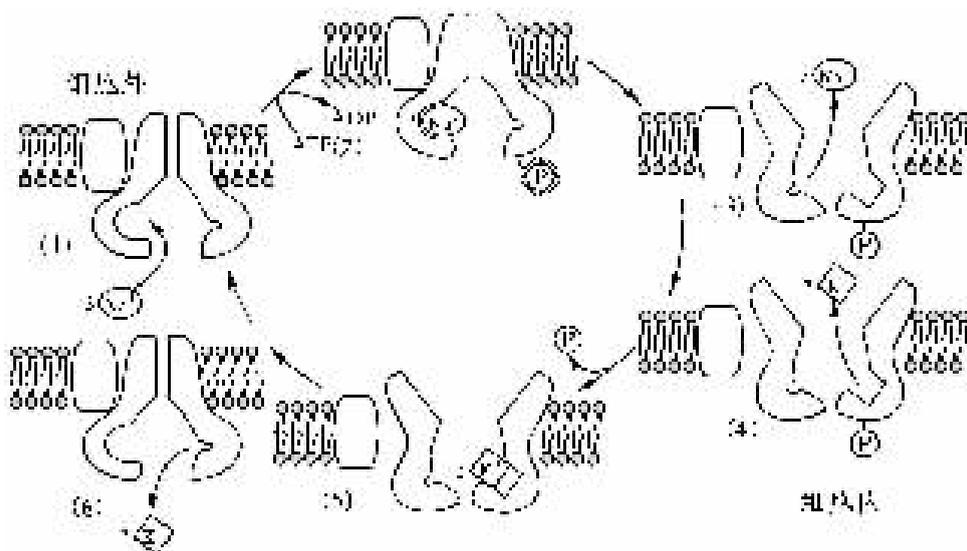
主动运输是物质由低浓度的一侧跨膜转运到高浓度的一侧,同时消耗 ATP 能量的运输方式。主动运输过程中也需要载体蛋白,在这点上与易化扩散相同。其不同之处在于易化扩散可不耗能地使物质顺浓度梯度双向转运,主动运输一般为定向转运。

(一) Na^+ 、 K^+ -ATP 酶与 Na^+ 和 K^+ 的转运

Na^+ 、 K^+ -ATP 酶,亦称 Na^+/K^+ 泵,其水解 ATP 的活性为 Na^+ 和 K^+ 依赖性的,并且也需要 Mg^{2+} 的存在。ATP 水解所释放的能量,驱动 Na^+ 和 K^+ 逆电化学梯度分别向细胞外和细胞内转运,保持了细胞内的高 K^+ 和低 Na^+ 状态。细胞内和细胞外 Na^+ 和 K^+ 的浓度差别很大,例如,细胞内和细胞外 Na^+ 的浓度分别为 10 mmol/L 和 145 mmol/L,而 K^+ 的浓度为 140 mmol/L 和 5 mmol/L。这种电化学梯度是一种重要的能量的贮存和利用方式,生物体内所产生的能量约有三分之一用来维持此电化学梯度,它可驱动细胞逆浓度梯度偶联运输多种物质。细胞内外 Na^+ 和 K^+ 电化学梯度的存在,还对维持细胞的渗透压和神经冲动的传导具有重要作用。

Na^+ 、 K^+ -ATP 酶是膜内在蛋白,由四个亚基($\alpha_2\beta_2$)组成。 α 亚基相对分子质量为 110 000,具有 ATP 酶活性,在膜内侧面有 Na^+ 和 ATP 结合部位,膜外侧面有 K^+ 的结合部位。 β 亚基的相对分子质量为 55 000,具有稳定分子构象的作用。

Na^+ 、 K^+ -ATP 酶存在 Na^+ 依赖的磷酸化构象和 K^+ 依赖的去磷酸化构象,分别与 Na^+ 和 K^+ 的结合和转运有关。 Na^+ 和 K^+ 的主要转运过程为(1) Na^+ 在膜内侧面与酶结合,使酶激活并水解 ATP(2) ATP 水解产生的磷酸基与酶分子中的一个天冬氨酸残基结合,酶转变为磷酸化构象;(3) 磷酸化构象与 Na^+ 的亲合力降低,并将 Na^+ 释放到膜外(4) K^+ 在膜外侧与酶结合(5) 酶转变为去磷酸化构象;

图 18-10 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶与 Na^+ 和 K^+ 的转运

(6) 去磷酸化构象的酶与 K^+ 亲和力降低, 将 K^+ 释放到膜内, 酶构象恢复。

Na^+ , K^+ -ATP 酶水解的速率约为 1 000 个 ATP 分子/s, 每次转运 3 个 Na^+ 出胞和 2 个 K^+ 入胞 (图 18-10)。地高辛和乌本苷 (ouabain) 等物质可竞争性结合 Na^+ , K^+ -ATP 酶膜外侧面 K^+ 的结合部位, 对 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性起抑制作用。

与 Na^+ , K^+ -ATP 酶相似的还有存在于细胞膜和肌细胞肌质网上的 Ca^{2+} -ATP 酶或称 Ca^{2+} 泵。它们的作用是将细胞质中的 Ca^{2+} 逆电化学梯度“泵”到细胞外或肌质网内。钙调蛋白对 Ca^{2+} -ATP 酶有激活作用。

在真核和原核生物细胞膜中, 有许多高度保守的 ATP 依赖性转运蛋白, 它们的结构中除含有特异的转运物质结合域外, 还有高度保守的 ATP 结合域 (ATP-binding cassettes, ABCs), ABC 是引发转运的关键。因此, 这类转运蛋白又称为 ABC 转运蛋白。例如, 纤维囊性增生跨膜传导调节蛋白 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 是存在于上皮细胞中的一种 Cl^- 转运蛋白, 含有两个 ATP 结合域 (NBF-1 和 NBF-2), 两个跨膜结构域和一个调节结构域。CFTR 基因的缺失性突变, 引起纤维囊性增生病 (见后)。由多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 基因编码的产物多药耐药蛋白 (也称 P-糖蛋白) 与 CFTR 的结构相似, 是一种可从细胞内向细胞外转运疏水性小分子物质的 ABC 转运蛋白。肿瘤细胞的耐药性与 MDR 基因的激活和过表达, 使抗肿瘤药物从细胞中排出而不能发挥作用有关。

一种物质转运的同时可偶联另外一种物质的转运, 此种转运称为协同转运, 包括同向协同转运 (symport) 和反向协同转运 (antiport)。上述 Na^+ 和 K^+ 的转运即为反向协同转运, 同向协同转运见下。

(二) Na^+ 依赖性葡萄糖转运

Na^+ 依赖性葡萄糖转运是葡萄糖和 Na^+ 的同向协同转运, 转运葡萄糖的动力是 Na^+ 的电化学梯度。小肠上皮细胞微绒毛的表面除参加葡萄糖易化扩散的 GLUT 外, 还有丰富的 Na^+ 依赖性葡萄糖转运蛋白 (SGLT, 见第六章), SGLT 分子中有 Na^+ 和葡萄糖的特异结合位点。在哺乳动物、酵母和细菌中已经发现了 35 个 SGLT 基因家族成员。小肠上皮细胞从肠腔中摄取葡萄糖时, Na^+ 顺电化学梯度内流, 并偶联葡萄糖逆浓度梯度进入小肠上皮细胞内。并且, 细胞内外 Na^+ 的梯度差越大, 转运到细胞内的葡萄糖就越多。如果肠腔中的 Na^+ 浓度过低, 则葡萄糖的跨膜转运就会停止。小肠上皮细胞基底面参与葡萄糖易化扩散的 GLUT, 使细胞内高浓度的葡萄糖扩散至细胞间液, 再进入血液。同时基底面含有的 Na^+ , K^+ -ATP 酶将 Na^+ 转运到细胞外, 以维持细胞内外原有的 Na^+ 的电化学梯度。因此, 葡萄糖的吸收涉及多种跨膜转运机制 (图 18-11)。

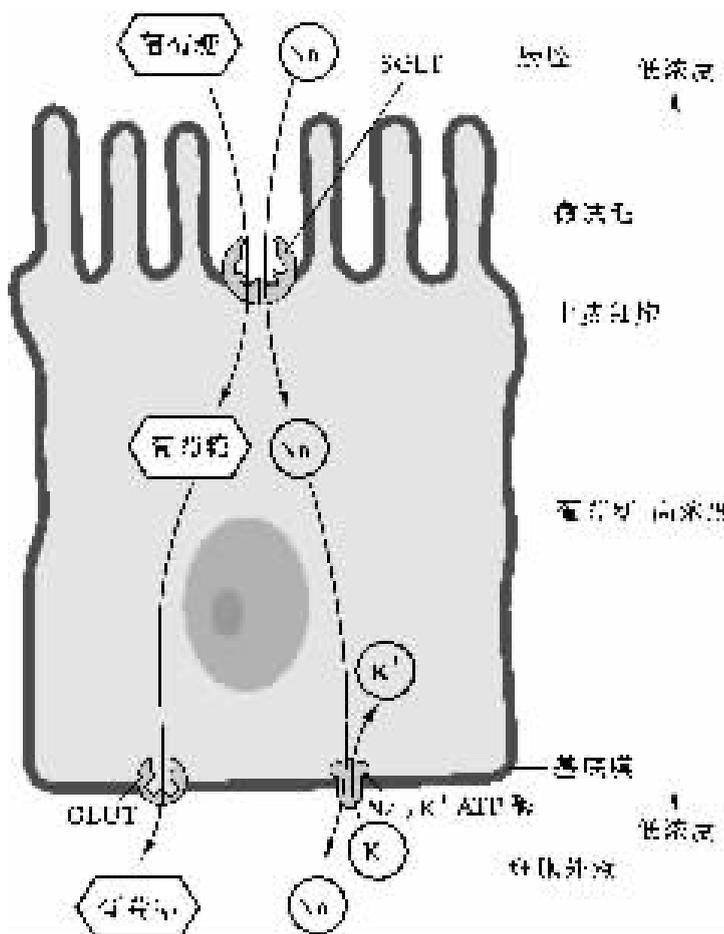


图 18-11 Na^+ 依赖性葡萄糖转运

并且, 细胞内外 Na^+ 的梯度差越大, 转运到细胞内的葡萄糖就越多。如果肠腔中的 Na^+ 浓度过低, 则葡萄糖的跨膜转运就会停止。小肠上皮细胞基底面参与葡萄糖易化扩散的 GLUT, 使细胞内高浓度的葡萄糖扩散至细胞间液, 再进入血液。同时基底面含有的 Na^+ , K^+ -ATP 酶将 Na^+ 转运到细胞外, 以维持细胞内外原有的 Na^+ 的电化学梯度。因此, 葡萄糖的吸收涉及多种跨膜转运机制 (图 18-11)。

葡萄糖的主动运输是间接消耗 ATP 能量的过程, 因为虽然直接利用的是 Na^+ 的电化学梯度, 但后者的产生仍来自

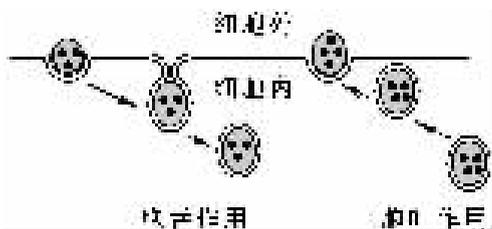


图 18-12 胞吞作用和胞吐作用

ATP 水解释放的能量。所以,这种主动运输过程又称为次级主动运输(secondary active transport)。次级主动运输也是细菌等原核生物依靠跨膜的 H^+ 电化学梯度,摄取营养物质的主要方式。在大肠杆菌 *E. coli* 的 4 000 余种蛋白质中,约有 160 种为参与次级主动运输的转运蛋白。例如,乳糖通透酶(lactose permease)在膜外侧分别有 H^+ 和乳糖结合部位,乳糖通透酶可将乳糖逆浓度梯度摄入到细胞内。

三、胞吞作用和胞吐作用

细胞通过胞吞作用摄取蛋白质、核酸和聚糖等大分子,而通过胞吐作用释放及分泌大分子。胞吞作用和胞吐作用虽然是物质进出细胞的两个相反过程,但二者都有转运小泡的形成及细胞膜融合过程。因此,也称此种运输为膜泡运输。这种运输方式不仅反映了膜在代谢上的动态变化,而且也提供了膜组成和结构的特定调节方式。

(一) 胞吞作用

胞吞过程中,细胞膜的特定区域内陷,并包围少量的细胞外液。然后,发生内陷的膜的两侧融合,形成胞吞小泡,并从膜上脱落下来,进入胞质。大多数胞吞小泡与初级溶酶体融合后形成次级溶酶体,次级溶酶体内含有的多种水解酶将所包含的生物大分子消化为氨基酸、单糖和核苷酸等小分子物质,后者扩散至胞质中被重新利用。胞吞作用也是需要 ATP 的水解来供能的运输。 Ca^{2+} 有刺激胞吞的作用。例如, DNA 转染中,加入的磷酸钙使 DNA 沉积于细胞膜上并刺激胞吞作用,促进宿主细胞对 DNA 的摄取。胞吞作用有两种:

1. 吞噬作用(phagocytosis) 为细胞对大的颗粒物质的摄取过程,所形成的吞噬体的直径一般大于 250 nm。例如,巨噬细胞和粒细胞等对病毒、细菌、细胞碎片等的处理,巨噬细胞通过吞噬作用每小时对膜的摄取量相当于细胞自身膜总量的 25%。

2. 胞饮作用(pinocytosis) 是细胞摄取细胞外液及其成分的普遍行为,所形成的胞吞小泡的直径约为 100 nm。胞饮作用包括非特异性的液相胞饮作用和特异性的吸附胞饮作用两种。非特异性的液相胞饮作用中,胞饮小泡摄取细胞外液及其中的溶质作为细胞的营养成分。虽然这些转运小泡的形成是一个极为活跃的持续过程,但细胞的表面积却无显著变化,这与胞吐作用也以近同样的方式带走膜的平衡有关。

特异性的吸附胞饮作用是一种受体介导的内吞,多见于细胞对某些大分子的摄取。细胞膜表面存在特异的受体,选择性地与细胞外液中的大分子配体结合,使配体分子以较高的浓度快速进入细胞。在该过程中,于细胞膜的特定区域形成胞质面有外周蛋白包绕的衣被小凹(coated pit)。蛋白外衣中主要含网格蛋白(clathrin)。网格蛋白是一种由相对分子质量为 35 000 ~ 40 000 的轻链和 180 000 的重链组成二聚体,及由 3 个二聚体再聚合而构成的三臂蛋白(triskelion)。衣被小凹形成后很快转变成游离的衣被小泡并脱去包绕的蛋白外衣,最终将内容物送到溶酶体内消化,而网格蛋白及受体可返回细胞膜被循环利用。胆固醇由 LDL 携带并运输,外周组织对胆固醇的摄取,即通过这种 LDL 受体介导的 LDL 的胞吞作用方式实现的,这也是影响胆固醇代谢的重要环节。LDL 是直径为 22 nm 的球状分子,其核心含有约 1 500 个酯化胆固醇分子,表面覆盖有非酯化胆固醇(游离胆固醇)、磷脂和载脂蛋白 B-100。胞吞作用主要依赖于衣被小凹处的 LDL 受体与 LDL 分子中的载脂蛋白 B-100 特异结合,及 LDL-LDL 受体复合物进入细胞内的进一步代谢。

(二) 胞吐作用

大多数细胞通过胞吐作用向外释放和分泌大分子。高尔基体内合成的生物大分子由转运小泡运送到细胞膜,转运小泡与膜融合并将这些分子释放和分泌。这些经胞吐作用运输的分子可成为细胞的外周蛋白、参与构成细胞外基质(蛋白聚糖)及作为信息分子(激素)等。有些胞吐作用尚受到特定分子的调控,即转运小泡形成后,其内容物并不立刻释放出来,需要获得释放信息。例如,激素与细胞表面受体结合时,导致该局部 Ca^{2+} 浓度的变化,由 Ca^{2+} 触发胞吐作用。经过胞吐作用,转运小泡的膜结构融合到质膜上,使

整个细胞的膜系处于动态变化中。

第四节 生物膜与医学

一、红细胞膜与医学

对红细胞膜的研究不仅对其自身的认识有意义,而且也有助于了解细胞膜结构和功能的一般规律。红细胞膜也是研究的最多的生物膜。

(一) 红细胞膜可作为生物膜研究的材料

红细胞来源丰富,并且由于红细胞无细胞器,可避免其他内膜系统的干扰,因此是常用的生物膜研究材料。红细胞在低渗的条件下容易裂解,裂解后的红细胞经去除细胞质等不同的方法处理后,其胞膜可形成有缺口的或封闭的血影,并在一定条件下形成外翻血影(胞质面朝外)。这两种类型的血影对于分析膜脂和膜蛋白的组成、分布及功能,特别是对膜两侧结构和功能不对称性的比较非常有帮助。如在采用放射性或荧光标记的水溶性特异分子与血影样品结合特性的研究中,若标记信号在二者均被检测到,则推测被结合的物质为跨膜蛋白;用特异的蛋白酶进行消化,也可获得蛋白质在膜上定位的信息。

(二) 人红细胞膜的结构特点

人红细胞膜经 SDS-PAGE 分析显示的主要蛋白为:血影蛋白(spectrin)、锚蛋白(ankyrin)、带3蛋白、血型糖蛋白、带4.1蛋白和肌动蛋白等。带3蛋白和带4.1蛋白都是根据它们在电泳中的迁移率命名的(图18-13)。另外,在人红细胞膜中还发现有100余种含量较少的蛋白质。

除血型糖蛋白和带3蛋白为跨膜的内在蛋白外,其他主要的蛋白均为膜外周蛋白。这些蛋白质相互作用并结合,协调而有序,所形成的膜性网络对维持红细胞的形状和功能极为重要(图18-14)。

血影蛋白是构成细胞骨架的主要蛋白质。它由两条相似的,含106个氨基酸的反向平行多肽链组成二聚体,长约100 nm。两个二聚体再对相接成四聚体。血影蛋白通过锚蛋白与带3蛋白的胞质侧并被固定于膜上,这种结合的同时也影响带3蛋白在膜上的扩散运动。带4.1蛋白也参与血影蛋白与膜的结合。带3蛋白多次跨膜,并形成 Cl^- 和 HCO_3^- 交换的离子通道,因此又被称为阴离子交换蛋白,是一种以反向协同方式发挥作用的转运蛋白。血型糖蛋白由131个氨基酸构成单次跨膜蛋白。血型糖蛋白亲水的N端位于膜外侧,而C端位于膜内侧,膜的疏水部分是由23个氨基酸(73~91)形成的 α 螺旋。红细胞膜表面大部分的糖结合于血型糖蛋白分子中。血型糖蛋白A为主要的血型糖蛋白类型,其氨基末端结合了15个O-连接寡糖链和1个N-连接寡糖链,二者约含100个糖基,占整个分子重量的60%。血型糖蛋白的基因多态性是决定MN血型系统的分子基础。

红细胞主要依靠葡萄糖供能。红细胞膜上有特异的葡萄糖转运蛋白,约占红细胞膜蛋白总量的2%。红细胞膜的GLUT含492个氨基酸,形成12个 α 螺旋跨膜区。各种细胞膜中的葡萄糖转运蛋白中,以红细胞膜的GLUT与葡萄糖的亲合力最高, $K_m \approx 6.2 \text{ mmol/L}$ 。与肌肉和脂肪组织中的GLUT不同,红细胞膜的GLUT是非胰岛素依赖性的,一些葡萄糖结构的类似物,如根皮素(phloretin)和2,4,6-三羟苯乙酮(2,

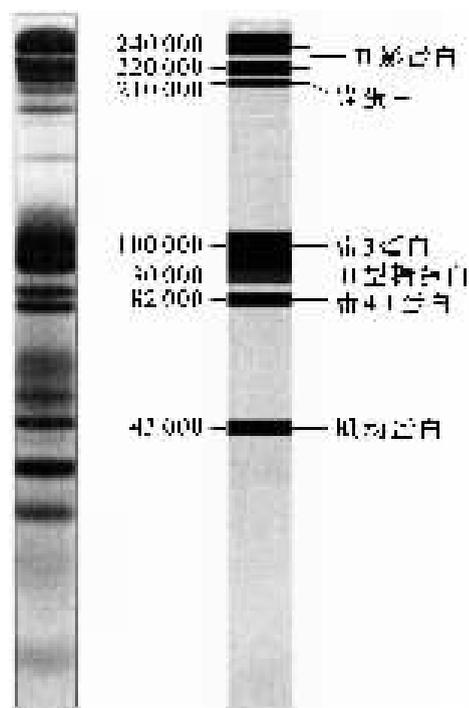


图18-13 人红细胞膜蛋白的 SDS-PAGE 分离图谱

注:血型糖蛋白结合大量带负电的糖,使电泳的迁移速率减慢,条带位置与带3蛋白相近。

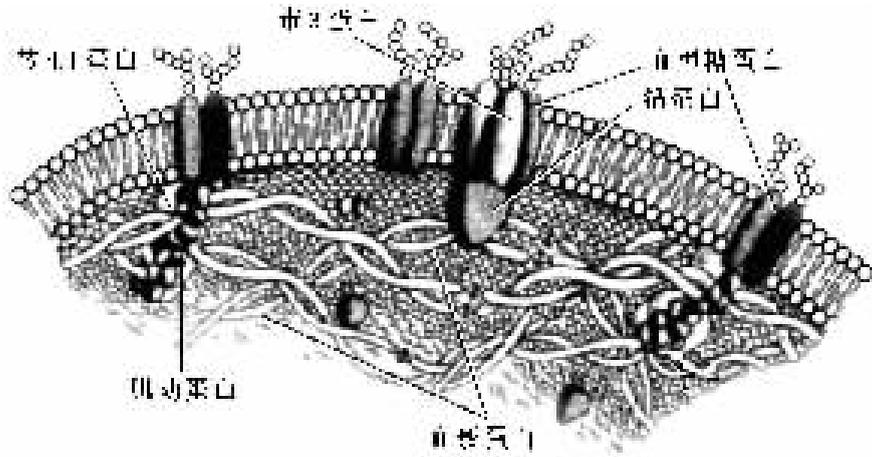


图 18-14 人红细胞膜蛋白的构成

4- β -Trihydroxyacetophenone)等可抑制其转运功能。

(三) 红细胞膜异常与疾病

多种血液系统的疾病与红细胞膜的结构和功能异常有关。例如,棘状红细胞贫血是由于病人缺乏 β 脂蛋白,并使红细胞膜中的胆固醇含量异常增加,红细胞变为棘状。遗传性球形红细胞症和遗传性椭圆形红细胞症均为先天性遗传疾病,涉及各种染色体异常及基因突变导致的红细胞外周和内在蛋白结构和表达量的改变,并直接影响到它们之间的相互作用,而引起红细胞呈球形或椭圆形改变。形状异常的红细胞膜的脆性增加,并容易在脾脏中被破坏,导致溶血性贫血。

二、脂质体在医学中的应用

脂质体是人工合成的模拟生物膜结构,它不仅对研究膜结构和功能方面有帮助,并且在生物医学中有很大的应用价值。在脂质体制备过程中,可选择性的改变所加入的膜组分的种类及含量,例如,加入不同长度及饱和度的脂肪酸所制备的脂质体,可较系统的研究脂肪酸的性质对膜结构和流动性的影响。将从细胞膜上纯化出来的具有一定功能的膜蛋白与脂质体结合,可在体外研究其作用机理及影响因素。例如,从细胞膜中纯化的 Na^+ 、 K^+ -ATP酶,与由单纯磷脂制备的脂质体结合后仍具有 Na^+ 和 K^+ 的转运功能。脂质体具有分子小、扩散速率快、脂溶性好及可生物降解等优点,因此可作为药物和基因等的载体。此外,如在脂质体中掺入特异的组织和细胞的识别配体或抗体等,脂质体即可将药物和基因靶向运输,增加药物作用的局部浓度和作用时间并减少全身的毒副作用。目前,抗肿瘤化疗药物及肿瘤基因治疗的脂质体投送系统的研究和应用已取得了较大的进展。

三、膜相关疾病

除上述提到的红细胞膜异常引起的疾病外,膜结构和功能的异常还与其他多种疾病的发生有关。胱氨酸尿症(cystinuria)是一种遗传性疾病,患者的尿中常含有大量的胱氨酸,并可形成肾结石。该病是由于某些氨基酸(包括胱氨酸)的转运蛋白的基因突变所致。重症肌无力患者体内产生抗乙酰胆碱受体的抗体,竞争性的与乙酰胆碱受体结合,干扰乙酰胆碱引发的 Na^+ 的细胞内流和膜去极化的作用。约70%的纤维囊性增生病病人伴有NBF-1结构域基因突变引起的苯丙氨酸(Phe508)的缺失,并影响了NBF-1的正常折叠及CFTR的 Cl^- 转运功能,病人表现为多种分泌液减少,典型症状是肺黏液栓的形成所引起的慢性肺部感染。家族性高胆固醇血症患者的LDL受体表达水平降低或基因有缺陷,如LDL受体的胞外LDL结合部分或胞内网格蛋白等的基因缺陷所引起的LDL受体结构异常,均使细胞不能正常摄取LDL,引起病人血中胆固醇量升高并继发其他心血管疾病等病理改变。补体蛋白抗病原微生物感染作用的机制之一

是在病毒及细菌表面形成膜攻击复合物(membrane attack complex, MAC),并通过 MAC 分子中的膜孔道使大量离子和水分子等向细胞内流,最终导致细胞裂解。因此,补体蛋白的原发性或获得性缺陷常导致各种感染性疾病的发生。另外,一些自身免疫性疾病患者的体内出现针对自体细胞表面抗原的抗体,通过补体介导的细胞裂解机制可造成病理性损伤。肿瘤细胞的生长和转移特性,如接触抑制丧失、表皮生长因子受体(EGFR)和血管内皮生长因子受体(VEGFR)等膜受体表达增加、出现特异的肿瘤细胞膜抗原、糖蛋白和糖脂糖链改变引起的细胞的识别和黏附的变化,以及肿瘤的耐药性等也都与细胞膜的异常密切相关。

Summary

Cellular membrane system includes plasma membrane and other organelle membranes. Biomembranes function not only as physical barriers but also as executives of many important roles in the body, such as transportation, recognition, signal transduction, energy exchange and so on.

Biomembranes are composed of three kinds of molecules: lipid, protein and carbohydrate. The major constituent of membrane is lipid which forms the framework of membrane. All three kinds of lipids, including phospholipid, cholesterol and glycolipid, are amphipathic. The phospholipid molecule has a polar head and a hydrophobic tail which contains both saturated and unsaturated fatty acid chains. By self-assembly, phospholipid molecules, with the polar head facing water and the hydrophobic tail hiding inside, build the lipid bilayer structure of membrane. The proteins of the membranes are grouped according to their location on the membrane. They are peripheral proteins and intrinsic proteins. Generally, peripheral proteins are water soluble and bound loosely to the membrane. Intrinsic proteins can either insert into the lipid bilayer partially or transverse the membrane, the latter are also called transmembrane proteins. Transmembrane proteins are anchored by α -helix formation. The distribution of the membrane molecules cause the asymmetry of the membrane structure and function. Membrane fluidity relies on the movements of the lipid and protein molecules. Many factors may affect membrane fluidity, such as the length and the degree of saturation of fatty acid chain. Liquid mosaic model is recognized in the elucidation of membrane structure.

Membrane transportation of the ions and molecules may be by passive or active transport, as well as endocytosis and exocytosis. Formation of transport vesicles and membrane fusion are involved in both endocytosis and exocytosis. The major difference between passive and active transportation is determined by whether it consumes energy or not. Biomembranes are closely related to the medicine. The membrane of red blood cell is a good model in the study of membrane structure and function. Liposome, an artificial membrane, is applied as drug delivery system, especially in antitumor treatment. Many diseases result from membrane abnormality.

思考题

1. 名词解释

糖萼 膜内在蛋白 膜载体蛋白 易化扩散 脂质体

2. 细胞膜主要由哪些分子组成,各有何作用?

3. 简述细胞膜的不对称性和流动性及其生物学意义。

4. 简述葡萄糖的吸收和转运机制。

5. 红细胞膜的结构和功能有何特点？
6. 如何证明一种蛋白质为跨膜蛋白？

(燕 秋)

第十九章 细胞信号转导

本章教学要求

- 细胞外信号转导体系组成、特点
- 信号分子受体类型、结构, G 蛋白家族
- 环核苷酸、肌醇磷脂介导的信号转导途径
- 酪氨酸蛋白激酶、PI-3K、NF κ B 信号转导途径
- 细胞内受体介导的信号转导途径
- 信号转导异常与疾病

人体是多细胞生物体。细胞除能通过直接接触传递调节信息外,主要通过分泌各种化学物质,对自身和其他细胞的代谢和功能进行调节,以不断适应内外环境的改变。这些有调节信号作用的化学物质称为信号分子。生物体有多种细胞外信号分子。细胞间调节信号的交流与协调是多细胞生物存活的必需机制。因此,细胞信号传递过程的各种异常,会引起人体的代谢失常或疾病发生。

在调节过程中,信号分子经过由多种相关成分参与的跨细胞膜的复杂级联传递,最终引起生物效应,这一过程称为信号转导(signal transduction)。一般说来,信号分子先经过血液运输或扩散到达相应靶细胞,由靶细胞特异受体接受信号,再经多种细胞内相关成分逐级传递、放大,最后诱导细胞发生对信号的各种应答反应,即生物效应。细胞内各种信号转导途径互相作用,形成复杂的信号转导网络,精密调节各种生理过程。近年来,信号转导在生物医学研究中受到很大关注。

第一节 信号转导的相关概念

一、细胞外信号分子

(一) 细胞外信号分子的类型

细胞外信号分子是指由特定细胞释放的各种对靶细胞有调节作用的物质。随着现代生物学的进展,信号分子的范围不断扩充,包括了对机体有调节作用的多种外界信号。现在认为细胞外信号分子除经典的激素外,还包括神经递质、生长因子、细胞因子和发育信号、抗原、细胞外基质成分,甚至包括引起视觉、嗅觉、味觉、触觉的光线信号、气味、味道分子等。

1. 激素

激素是多细胞生物在细胞间传递调节信号的一类化学信使。按照其化学本质,激素可分为蛋白质和肽类激素、氨基酸衍生物激素和类固醇激素。按照激素的受体部位及信号传递的方式不同,又可将激素分为细胞内受体激素和细胞膜受体激素。细胞内受体激素包括类固醇激素、甲状腺素等,它们分子小,脂溶性强,可通过细胞质膜进入细胞内与胞内受体结合而发挥作用。细胞膜受体激素包括蛋白质、肽类、儿茶酚胺类激素,或分子较大或水溶性强,不易透过细胞膜。它们通过质膜上受体介导,在胞液生成第二信使分子,转导信号引起效应。

2. 神经递质

哺乳动物神经元之间信息传递,除少部分通过突触的电传递外,绝大多数神经元的突触传递通过某种化学物质介导,称为神经递质(neurotransmitter)。神经递质与受体相互作用,诱导突触后神经元产生生物效应。

3. 生长因子和细胞因子

它们是活细胞产生、分泌的多肽类信号分子,属细胞可溶性蛋白。此类信号分子种类极多,作用广泛,具有调节细胞生长、增殖、分化及免疫功能等多方面的生物活性。细胞因子(cytokine)包括干扰素、淋巴因子、炎性细胞因子、巨噬细胞因子等。

(二) 细胞外信号分子的作用方式

1. 内分泌方式

各种激素由特殊分化的内分泌细胞合成、分泌,经血液运输到相应的靶细胞,发挥特异调节作用。这种远距离的作用方式称为内分泌方式。

2. 旁分泌方式

某些细胞分泌有局部作用的化学介质,如前列腺素、生长因子、生长抑素、一氧化氮(NO)等。它们不需经血液运输,可通过组织液直接扩散到附近靶细胞并发挥作用。这种仅对临近细胞起作用的方式称为旁分泌方式。

3. 自分泌方式

某些细胞,如肿瘤细胞合成分泌的生长因子等,可作用于自身细胞表面相应受体,刺激细胞自身的生长、增殖。这种作用于自身细胞的方式称为自分泌方式。

4. 突触分泌方式

当神经元受到动作电位等刺激时,可经突触前膜释放突触小泡内的神经递质,后者经突触间隙作用于突触后膜上相应受体,引起短暂生物效应。这种作用方式称为突触分泌方式。

二、细胞内信号分子和转导系统

(一) 第二信使

肽类激素等作为第一信使不能透过细胞膜,需经质膜受体介导,刺激细胞产生在细胞内传递信号的小分子,这些小分子信号物质称为第二信使(secondary messenger)。第二信使的特点是:能转换、放大胞外调节信号;能在细胞内扩散;其直接作用是改变信号转导酶或离子通道活性,最终引起细胞生物效应。细胞内常见的第二信使包括cAMP、cGMP、IP₃、DAG、Ca²⁺等。

(二) 信号转导酶类和蛋白质

细胞内存在很多作为信号转导组分的特异酶类,称为信号转导酶类。蛋白质磷酸化是信号转导的最重要作用方式,各种蛋白激酶可使下游蛋白磷酸化,进而激活其转导信号的功能。信号转导酶通过连续的酶促反应传递信号,形成信号放大系统。信号转导酶分为两类:一类是受体酶,如生长因子膜受体具有酪氨酸蛋白激酶活性;另一类为可溶性酶,其中某些酶类相互偶联,一种酶既是上游信号酶的底物,又可作用于下游信号分子。由于酶可特异、高效催化多个底物分子转变,形成逐级放大的信号转导级联(signal transduction cascades)系统,因此这些可溶性信号转导酶类可显著放大细胞外的调节信号。

有些信号转导组分的蛋白质称为连接物蛋白(adaptor protein)。连接物蛋白具有SH2、SH3、PH等特定结构域,可通过这些特殊结构与其他蛋白或膜脂互相识别、结合从而传递信号。

(三) 靶细胞生物效应

各类信号分子可以作用于特定的靶细胞、靶组织,产生多种类型的生物效应。有的引起代谢、功能变化,如改变关键酶活性而调节代谢途径的速率、方向;调节质膜离子通道或载体蛋白的开放、关闭等。有的则调节关键基因的转录、表达活性,进而刺激细胞增殖或分化。一种信号常可引起靶细胞多种生物效应。

信号转导过程的基本特点是:①高度特异性。特定信号分子只能识别并结合相应受体的配体结合部

位。② 级联放大特性。在酶促级联中,1 个信号转导酶可催化多个下游底物分子的转变,可将胞外信号放大 10^5 倍。③ 生物效应发生的时效性。任一组分被上游信号激活后,随即以某种方式迅速灭活,保证调节的精确性。④ 细胞能对接受的多种信号进行整合,决定细胞应答反应。

第二节 信号转导的受体

信号分子通过与专一性受体(receptor)识别并结合,然后激活特定信号放大系统,引起多种生物效应。大部分受体位于细胞质膜上,称为质膜受体,多为膜内在糖蛋白。有的则位于细胞液或细胞核,称细胞内受体,均为 DNA 结合蛋白。

受体与配体作用的主要特点是,有高度亲和力和高度特异性,二者结合是可逆、非共价的。细胞膜或细胞内存在的受体分子数量有限,因此受体与配体结合作用有可饱和性。受体与配体结合具有特定的作用模式,并引起特定的生物学效应。

可根据受体结构及信息传递机制的不同,对受体进行分类。下面分别进行讨论。

一、G 蛋白和 G 蛋白偶联型受体

(一) G 蛋白偶联型受体

G 蛋白偶联型受体(G-protein-coupled receptor, GPCR)是一大类具有信号转导功能的蛋白质。胞外信号与此类受体结合后必需活化 G 蛋白,才能将其传递到胞内。多种激素、神经递质类受体以及接受视觉、嗅觉、味觉等胞外信号的大量受体属于此类受体。这类受体的空间结构相似。如 β -肾上腺素受体是单一多肽链构成的跨膜糖蛋白,分 N 端胞外区、跨膜区和 C 端胞内区。其跨膜区是含 7 个疏水 α 螺旋的反复跨膜结构。所以,此受体又称蛇型受体(serpentine receptor)或七个跨膜 α 螺旋受体。跨膜区的 7 个疏水 α 螺旋由 3 个胞外环和 3 个胞内环相连接。胞内的第 3 个内环较大,具亲水性,它和 C 端区是与 G 蛋白结合的区域。多肽配体结合于受体胞外亲水域,小分子配体可结合在跨膜疏水区(图 19-1)。胞内区近 C 端有特异的丝/苏氨酸位点,可被磷酸化而调节受体活性。

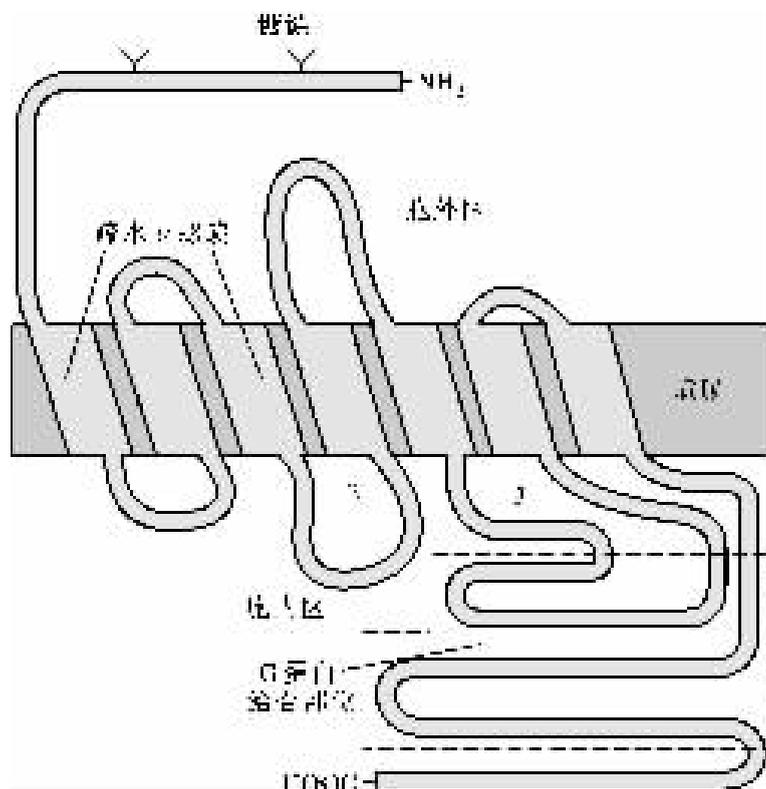


图 19-1 G 蛋白偶联型受体结构

(二) G 蛋白

G 蛋白即鸟苷酸结合蛋白(guanine nucleotide binding protein) ,广泛存在于真核细胞中 ,是一种重要的信号成分 ,可在多种膜受体介导的信号传递途径中起作用。

1. G 蛋白的结构与分类

G 蛋白均为 α 、 β 、 γ 三种亚基组成的异源三聚体。不同的 G 蛋白 α 亚基结构不同 ,但多数 G 蛋白的 β 、 γ 亚基结构相同或相似。各种 α 亚基均为一单链多肽(相对分子质量 43 000) ,其共有保守区域在功能上是 GDP/GTP 结合部位和潜在 GTP 酶活性区。 α 亚基还有受体结合位点、 $\beta\gamma$ 亚基结合位点、下游效应酶作用区及百日咳毒素(pertussis toxin ,PT)或霍乱毒素(cholera toxin ,CT)作用点。细菌毒素 ,如百日咳毒素、霍乱毒素可催化将 NAD^+ 分子中的 ADP-核糖基结合到 α 亚基特异的 Arg 残基上 ,改变 G 蛋白功能。 β 亚基(相对分子质量 37 000)和 γ 亚基(相对分子质量 7.5 000 ~ 10 000)紧密结合 ,作为同一功能单位 ,参与信号传导。G 蛋白的 α 和 γ 亚基都通过共价结合的脂酰基锚定于质膜中 ,使 G 蛋白成为膜内在蛋白。

根据基因分析 ,人类有 20 余种 α 亚基、6 种 β 亚基和 10 种 γ 亚基。不同亚基组合成上千种三聚体 G 蛋白 ,构成 G 蛋白家族。G 蛋白可参与不同信号途径 ,偶联不同效应分子 ,根据功能可将其分为不同种类(表 19-1)。调节腺苷酸环化酶(adenylyate cyclase , AC)的 G 蛋白中 ,可激活 AC 的称激活型 G 蛋白(stimulatory G protein ,Gs) ,抑制 AC 的称抑制型 G 蛋白(inhibitory G protein ,Gi)。调节磷脂酶 C 的 G 蛋白称为磷脂酶 C 型 G 蛋白。它们分别参与激素、神经递质的信号转导过程。

2. G 蛋白的活化机制

G 蛋白的活化分 4 阶段。① 无信号刺激时 ,G 蛋白在膜上呈 $\alpha\beta\gamma$ 三聚体 ,GDP 与 α 亚基结合 ,无活性。② 胞外信号与受体结合 ,受体变构激活 ,并与 G 蛋白结合促进其 α 亚基释放 GDP 并结合 GTP ,同时与 $\beta\gamma$ 亚基分离 , α -GTP 即为 G 蛋白的活化形式。③ α -GTP 在膜内移动 ,结合作用于下游不同效应酶、蛋白或离子通道 ,引起不同生物学效应。 α 亚基的内在 GTP 酶将 α -GTP 水解为 α -GDP ,效应过程终止。④ α -GDP 与效应靶蛋白解离 ,与 $\beta\gamma$ 亚基重新结合 ,回复三聚体无活性的基态(图 19-6)。在某些信号途径中 $\beta\gamma$ 亚基不仅调节 α 亚基的活性 ,也可直接影响效应蛋白。

表 19-1 信号转导途径中 G 蛋白的类型

G 蛋白类型	亚基	偶联受体	功能	敏感毒素
Gs	α_s	胰高血糖素 ,肾上腺素	激活腺苷酸环化酶	CT
	α_{olf}	气味分子	激活腺苷酸环化酶	
	α_{11}	乙酰胆碱	抑制腺苷酸环化酶	PT
Gi	α_{12}	α_2 -肾上腺能 , M_2 -胆碱能	激活钠通道	PT
	α_o	阿片肽 ,内啡肽	抑制钙通道	
	α_t	光线	激活 cGMP 磷酸二酯酶	
Gq	α_q	M_1 胆碱能 , α_1 -肾上腺能	激活 PI-磷脂酶 C- β_1	
	α_{11}	α_2 -肾上腺能	激活 PI-磷脂酶 C- β_2	

二、具有酶活性的受体

(一) 受体型酪氨酸蛋白激酶

胰岛素、生长因子等胞外信号的受体具有酪氨酸蛋白激酶(tyrosine-specific protein kinase ,TPK)活性 ,可催化靶蛋白上特异酪氨酸残基(Tyr)的磷酸化 ,故称受体酪氨酸蛋白激酶(receptor tyrosine protein

kinase, RTPK)。此类受体为跨膜糖蛋白,含4个结构域。N端为胞外配体结合域,常含寡糖链。各种受体的该区域结构是多样的,如有富含Cys结构区、免疫球蛋白(Ig)样结构区、或纤连蛋白样结构区等不同结构模体,这些结构再折叠能形成复杂专一的三维配体结合位点。跨膜区为单一疏水跨膜 α 螺旋片段(所以,此受体又称单个跨膜 α 螺旋受体)。胞内部分含催化域即TPK活性区,有ATP结合、底物Tyr识别两个保守模体。还有位于C端的调节域,含特定自身磷酸化的Tyr位点及可被其他激酶磷酸化而下调受体活性的Ser/Thr位点。各类受体型TPK结构见图19-2。

(二) 鸟苷酸环化酶活性受体

心钠素(atrial natriuretic factor, ANF)受体及鸟苷蛋白(guanylin)受体具有鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)活性。该类受体的胞外N端区为配体结合区,中间肽段为跨膜区,C端胞内区含鸟苷酸环化酶(GC)结构域。心钠素结合受体后可激活受体的GC活性。

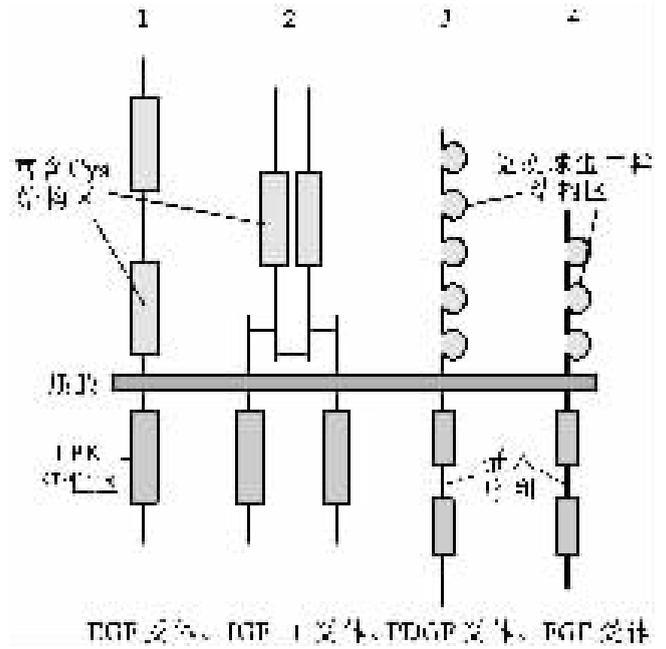


图 19-2 酪氨酸蛋白激酶活性受体的类型

三、细胞因子类受体

如生长激素受体、干扰素等细胞因子受体也是具有单跨膜 α 螺旋的膜蛋白。受体胞外区含配体结合部位,中间是跨膜区,胞内区无TPK活性域。受体与信号分子结合后,可通过偶联、激活下游非受体型TPK,传递调节信号,引起细胞的增殖、分化、癌变等细胞效应。

四、离子通道型受体

某些神经递质受体为配体门控离子通道。如烟碱型乙酰胆碱受体(NR)是跨膜阳离子通道($\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ 通道)。受体为 $\alpha_2\beta\gamma\delta$ 四种亚基组成的5聚体,5个亚基垂直于膜对称排列成圆桶形,中间形成离子通道。乙酰胆碱与NR结合,使NR构象改变,通道活化开放, Na^+ 内流超过 K^+ 外流,使局部去极化引起神经冲动(图19-3)。另外,兴奋性氨基酸受体是跨膜阳离子通道,而 γ -氨基丁酸受体、甘氨酸受体是跨膜阴离子通道(Cl^- 通道),这些受体结构特点与上述NR相似。

五、细胞内受体

细胞内受体包括雄激素受体(AR)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、糖皮质激素受体(GR)、盐皮质激素受体(MR)等类固醇激素受体家族,以及甲状腺激素受体(TR)、1,25-二羟维生素 D_3 受体(VDR)、视黄酸受体(RAR)等。此类受体本质是激素依赖的转录因子(反式作用因子),配体和受体结合成活性复合物,可与DNA特异的顺式作用元件相结合,调节基因

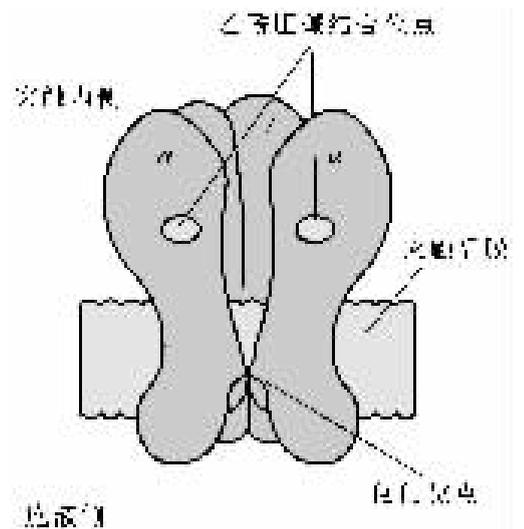


图 19-3 烟碱型乙酰胆碱受体(NR)结构

转录表达。

这些受体结构上有较大保守性,都是单链蛋白质,长度不一,但有几个相似的结构区:①近N端为转录激活域(TAD),约含100~500个氨基酸残基,各受体的TAD长度和序列均有较大差异,又称可变区,是具有转录激活及产生抗原特异性作用的部位。②中部有DNA结合域(DBD),约含66~68个氨基酸残基,各类受体中同源性高达42%~94%。具有DNA结合蛋白的典型模体,如锌指和螺旋—转角—螺旋结构,有利于受体的二聚化及与DNA分子结合。③C端具有配体结合域(LBD),约含225~285个氨基酸残基。LBD有多种功能:特异的结合相应配体;结合热休克蛋白(HSP90),促进受体二聚化;有转录激活作用;有可被磷酸化调节的特异Tyr位点。DBD与LBD间的肽链称铰链区,可能与转录因子相互作用及启动受体向核内转移有关(图19-4)。如果DBD或LBD发生突变可影响受体与DNA的结合或激素功能的发挥,引起激素对抗症。



图19-4 糖皮质激素受体结构示意图

第三节 信号转导途径

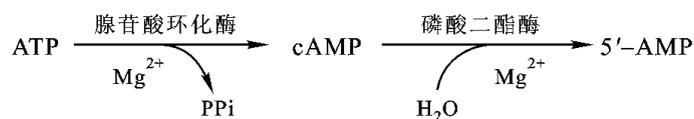
一、环核苷酸依赖性蛋白激酶的信号转导途径

(一) cAMP-蛋白激酶A信号转导途径

许多信号分子在传递其信息时以cAMP为第二信使,包括胰高血糖素、肾上腺素、甲状旁腺素等激素和多巴胺等神经递质等。此途径还涉及视、嗅、味觉等的信号转导。现以肾上腺素为例说明该途径的信号转导过程。

1. cAMP第二信使的生成阶段

肾上腺素与膜上相应的G蛋白偶联型受体的结合使受体活化,进而激活膜上G蛋白(G_s),活化的 $G_{s\alpha}$ -GTP再结合、活化膜上腺苷酸环化酶(AC)。AC广泛存在于哺乳动物各种组织,是跨膜蛋白,胞内结构域含催化部位。AC催化ATP分解生成3',5'-环腺苷一磷酸(简称cAMP)和焦磷酸,这使胞液cAMP的浓度迅速增高5倍。cAMP可在特异磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)的催化下转变为5'-AMP而失活。



为保证各种信号转导调节的精确性,信号在转导过程的每一个阶段都需及时终止。除了cAMP的降解,受体也发生脱敏(desensitization)作用。如肾上腺素持续作用时,上述G蛋白活化时生成的 $G_{s\beta\gamma}$ 募集一种受体激酶(β -肾上腺素受体激酶 β -adrenergic receptor kinase β -ARK)到质膜,使肾上腺素受体C端特异丝/苏氨酸残基磷酸化。另一抑制蛋白(β -arrestin)可结合于此磷酸化位点,再诱导此受体经内吞进入胞液灭活。内吞颗粒中的受体可脱磷酸,回到质膜再被利用(图19-5)。所有G蛋白偶联受体都能经相应的G蛋白偶联受体激酶(GRKs)的作用,促进类似的受体脱敏机制。

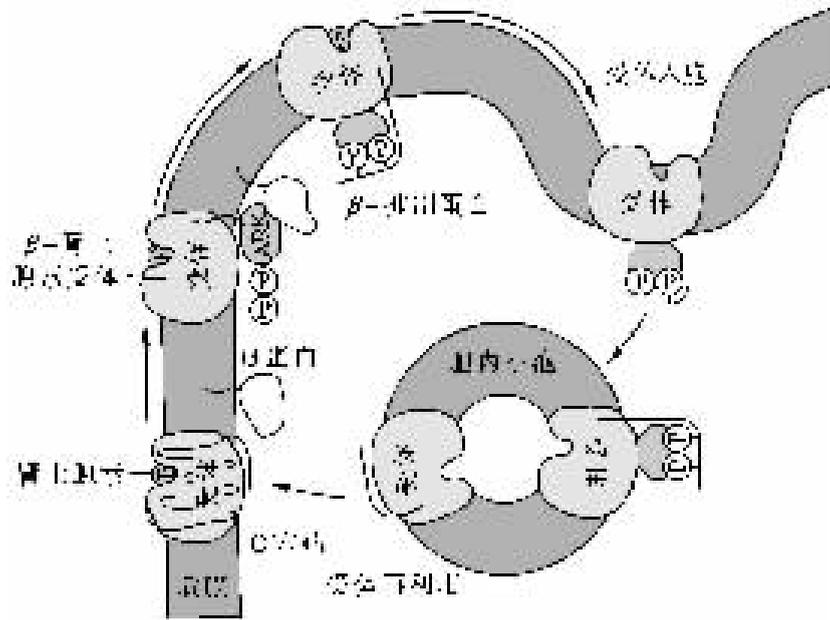


图 19-5 β-肾上腺素受体脱敏机制

2. 蛋白激酶的活化及作用

胞液中依赖 cAMP 的蛋白激酶又称蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)。PKA 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Ser/Thr-PK) 家族, 广泛分布于体内。无信号作用时, PKA 是由两个催化亚基 (C) 和两个调节亚基 (R) 组成的无活性四聚体。R 亚基为抑制亚基, 含有与 PKA 所识别、催化的底物肽段相似的“假底物模体”, 可与 C 亚基活性部位结合, 产生“自身抑制”作用。当胞液 cAMP 增加时, 每个 R 亚基结合 2 个 cAMP 而发生构象改变, C 亚基与二聚体 R 亚基分离而成为活性激酶 (见图 5-3)。各类第二信使依赖的蛋白激酶都有类似假底物序列自身抑制的调节方式。

活性 PKA 可识别并结合靶蛋白的特异底物模体 (R-R-X-S-Z 或 R-R-X-T-Z, 其中 S 和 T 为磷酸化位点, X 为小分子侧链, Z 为大分子疏水侧链) 及 ATP, 催化 ATP 磷酸基团的转移。这使多种靶蛋白特定的丝/苏氨酸残基磷酸化, 改变其活性, 进而产生多样的生物效应 (图 19-6)。各种信号分子可通过 PKA 介导以下的生物效应。

(1) PKA 对细胞代谢与功能的调节作用 ① 使物质代谢关键酶磷酸化而改变其活性, 如调节糖原代谢、脂肪动员等过程; ② 磷酸化质膜 Ca^{2+} 通道, 促进 Ca^{2+} 内流; ③ 通过微丝、微管蛋白磷酸化, 调节细胞分泌; ④ 使某些受体的 Ser/Thr 残基磷酸化, 使受体脱敏, 调节相关信号途径 (表 19-2)。

表 19-2 蛋白激酶 A 对底物蛋白的磷酸化作用

底物蛋白	磷酸化后果	生理意义
糖原合酶	失活	抑制糖原合成
磷酸化酶 b 激酶	激活	促进糖原分解
激素敏感脂肪酶	激活	促进脂肪动员、脂肪酸氧化
CREB	活化转录因子作用	加速基因转录
组蛋白	失去对转录的阻遏作用	加速转录, 促进蛋白质的合成
核糖体蛋白	加速翻译	促进蛋白质的合成
微管蛋白	膜蛋白构象及功能改变	改变膜对水及离子的通透性
心肌肌原蛋白	易与 Ca^{2+} 结合	影响细胞分泌

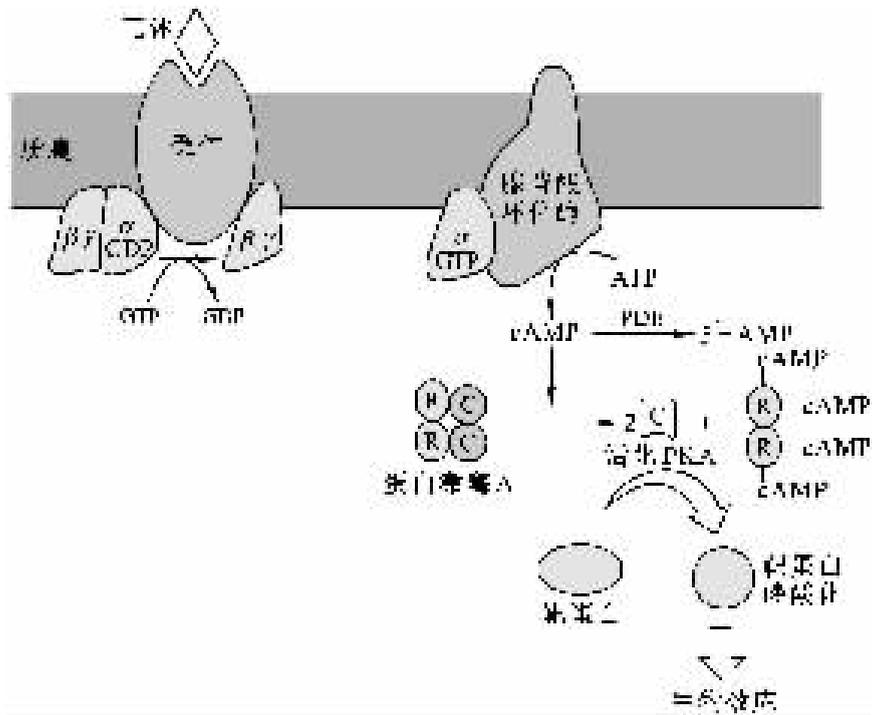


图 19-6 G 蛋白介导的 cAMP-PKA 信号转导过程

心肌肌质网膜蛋白

加速 Ca^{2+} 释入肌质网

加速肌纤维舒张

(2) PKA 对基因表达的调控 某些信号经 cAMP 介导可促进特异基因的表达。这些基因的转录调控区有共同的 DNA 序列-TGACGTCA 称为 cAMP 反应元件 (cAMP response element, CRE) 核转录因子 CRE 结合蛋白 (CRE binding protein, CREB) 能与 CRE 作用而激活转录。CREB 含 C 端 DNA 结合域与 N 端转录活化域。活化的 PKA 的催化亚基由胞液进入胞核后,可使 CREB 的 N 端 Ser133 磷酸化而被活化,活化的 CREB 与 CRE 结合,促进相应基因转录表达。PKA 的催化亚基还催化 CRE 调节蛋白 (CREM) 及活化转录因子 (ATF) 等磷酸化而被激活,共同参与 CREB 的转录激活 (图 19-7)。

(二) cGMP-PKG 信号途径

某些信号转导途径的第二信使为 cGMP, cGMP 可由鸟苷酸环化酶催化 GTP 环化生成,再被 cGMP 磷酸二酯酶 (cGMP-PDE) 催化分解。cGMP 的细胞水平仅为 cAMP 的 1/10 ~ 1/100。

鸟苷酸环化酶 (GC) 分为两类。受体型 GC 存在于肾、肠、血管平滑肌等细胞。心钠素 (ANF) 是心房分泌的肽类激素,可促进肾排泄 Na^+ 、 H_2O 和血管扩张等生物效应。而鸟苷蛋白是肠肽激素,调节肠壁 Cl^- 的分泌。ANF 和鸟苷蛋白受体的胞内区都有 GC 活性域。若 ANF 与肾集合管细胞膜 ANF 受体相结合,则激活 GC,后者催化 GTP 生成 cGMP。cGMP 可激活依赖 cGMP 蛋白激酶,即蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG),此酶也是丝/苏氨酸蛋白激酶。PKG 分子催化域和调节域共存于一条肽链 (相对分子质量 80 000)。cGMP 结合于调节域的两个 cGMP 结合位点,激活 PKG,进而磷酸化靶蛋白而引起生物效应。

可溶型 GC 可见于心、血管平滑肌、脑等多种组织细胞,其辅基为血红素。哺乳动物很多组织中 Ca^{2+} 依赖的一氧化氮合酶 (NO synthase, NOS) 催化精氨酸分解产生一氧化氮 (NO), NO 自由扩散到附近靶细胞,结合于可溶性 GC 的血红素辅基,并将酶激活,进而促进产生 cGMP。cGMP 再激活 PKG,后者将靶蛋白磷酸化,并引起生物效应。如激活心肌细胞 Ca^{2+} 泵,降低胞液 Ca^{2+} 浓度,促进平滑肌松弛,扩张血管、抑制心肌收缩、血小板凝集等。治疗冠心病的硝酸甘油类药物由于持续产生 NO,可以相似机制舒张血管和心肌。

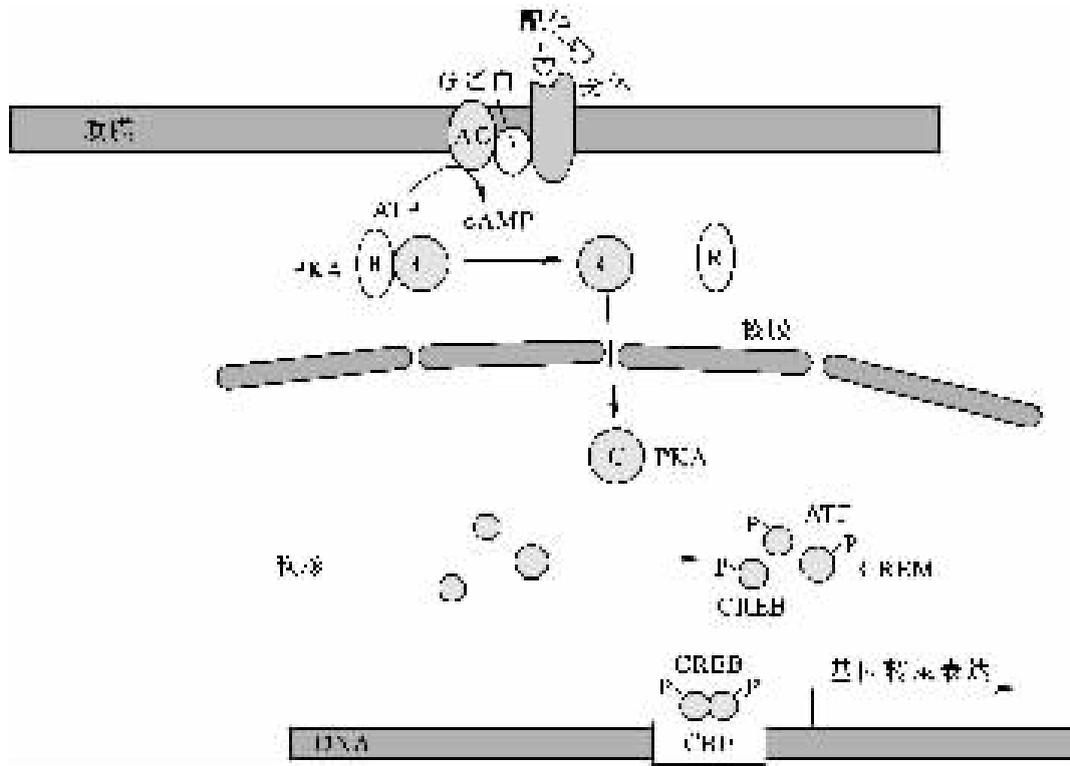
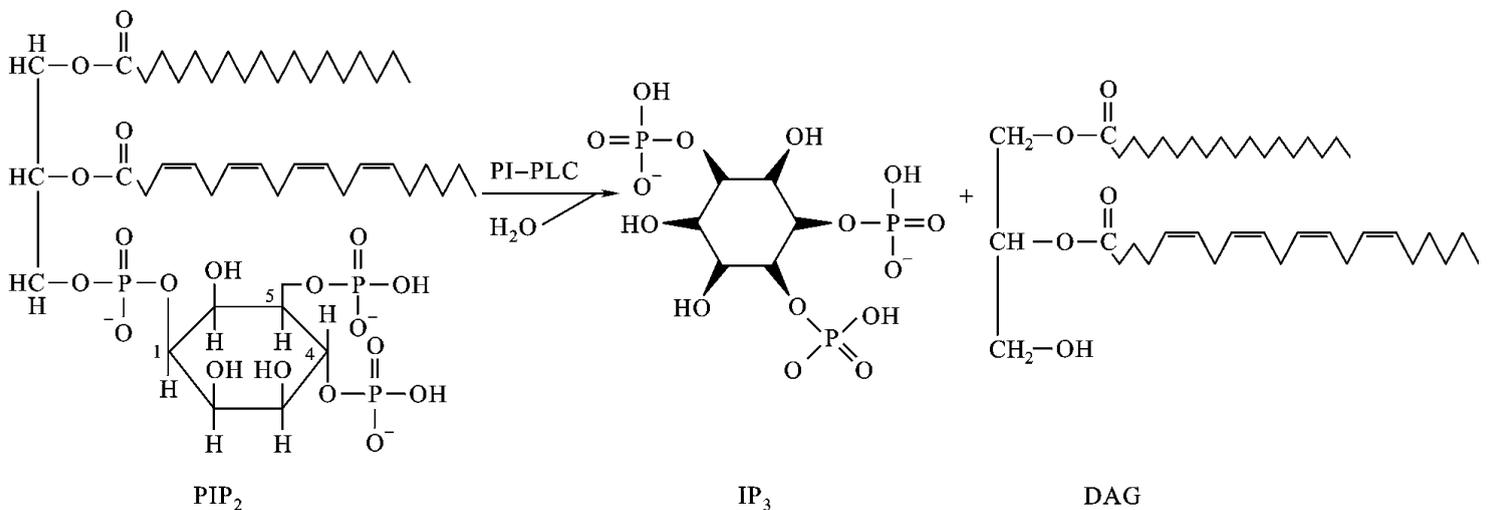


图 19-7 蛋白激酶 A 的活化及对基因表达调节

二、肌醇磷脂介导的信号转导途径

甲状腺素释放激素、抗利尿激素及组胺、5-羟色胺等激素、神经递质等与相应的 G 蛋白偶联受体结合,激活磷脂酶 C 型 G 蛋白(G_q),活化质膜磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C β (phosphatidylinositol-specific phospholipase C β , PI-PLC β), PI-PLC 催化膜磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)水解生成肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)和二酰甘油(diacylglycerol, DAG)。 IP_3 和 DAG 均为重要的第二信使,分别通过两条独立的而又互相协调的途径参与信号转导。



IP_3 可经磷酸酶作用逐步脱磷酸而成肌醇,进入代谢循环。质膜磷脂 PI 类含量较低,但代谢非常活跃,多种 PI 衍生物参与细胞信号转导。

(一) Ca^{2+} -钙调蛋白激酶信号途径

1. IP_3 的第二信使作用

正常胞液 Ca^{2+} 浓度为 10^{-7} mol/L ($0.1 \mu\text{mol/L}$),远低于胞外 Ca^{2+} 水平(2.5 mmol/L)。内质网、肌质

网、线粒体为细胞内 Ca^{2+} 贮存库。IP₃ 在质膜生成后扩散到胞液,与内质网或肌质网膜上 IP₃ 受体结合,受体的 IP₃ 门控 Ca^{2+} 通道开放,其贮存 Ca^{2+} 释放,胞液 Ca^{2+} 浓度迅速升高。IP₃ 还能激活质膜钙通道,使胞外 Ca^{2+} 内流。因此,IP₃ 作用是通过动员 Ca^{2+} 实现的(图 19-8)。

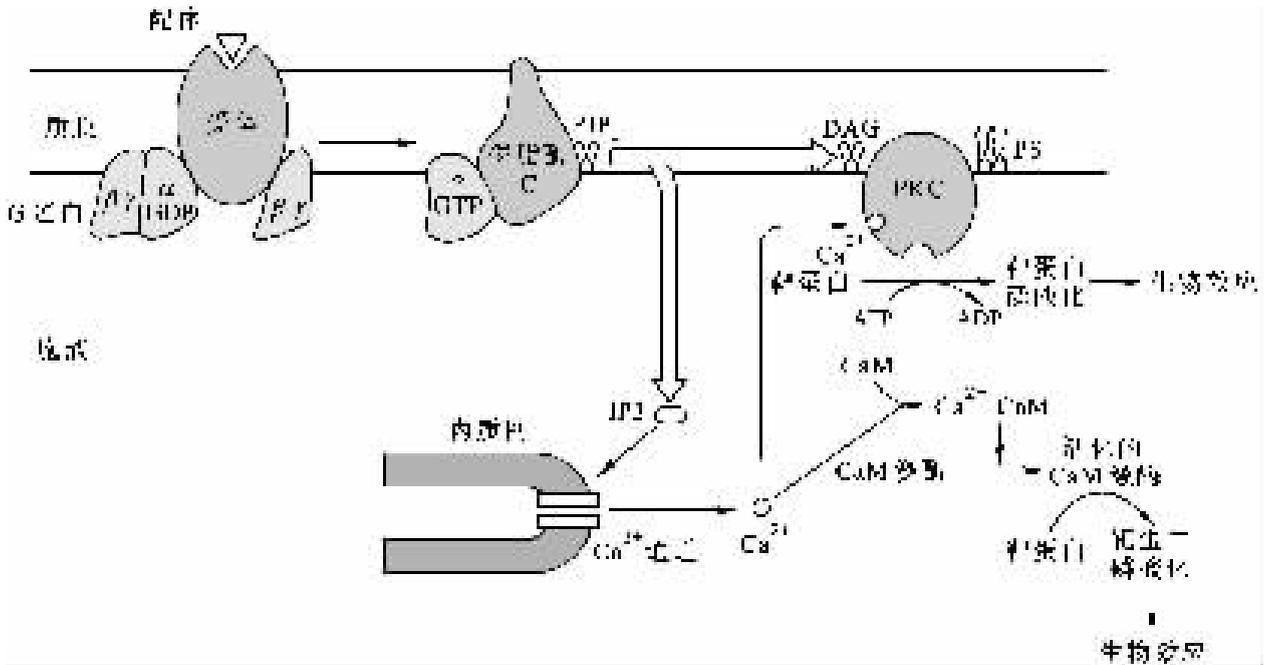


图 19-8 第二信使 IP₃ 和 DAG 介导的信号转导途径

2. 钙调蛋白依赖蛋白激酶作用

钙调蛋白(calmodulin, CaM)广泛分布于各种组织,为含 4 个 Ca^{2+} 结合位点的单肽链(相对分子质量 17 000)。因 Ca^{2+} 与 CaM 的结合有正协同性,当 Ca^{2+} 增到仅 10^{-6} mol/L 时 CaM 即迅速结合 Ca^{2+} 而变构激活为 Ca^{2+} -CaM 复合物。 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖蛋白激酶(Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase, CaM 激酶)属于 Ser/Thr 蛋白激酶, Ca^{2+} -CaM 复合物与其结合可使之活化。胞内升高的 Ca^{2+} 可经 Ca^{2+} 泵迅速移出细胞。在各类 CaM 激酶中,多功能 CaM 激酶分布广泛,作用最重要,可使多种靶分子 Ser/Thr 残基磷酸化改变活性,引起各种生物效应。包括:① 磷酸化关键酶调节物质代谢;② 能激活腺苷酸环化酶,又可激活 cAMP-PDE,参与调节信号转导过程。另外还有调节平滑肌收缩、神经递质合成、调节质膜 Ca^{2+} 泵、离子通道活性及促进基因表达和细胞增殖等多种功能。

(二) 二酰甘油-PKC 信号传递途径

脂溶性 DAG 生成后存在于质膜,当 IP₃ 等使胞液内 Ca^{2+} 升高时, Ca^{2+} 结合并促进胞液无活性的蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 移位到质膜, DAG 在质膜磷脂酰丝氨酸(PS)的配合下将 PKC 激活,形成有活性的 PKC。胞外刺激消失后, DAG 与 PKC 分离而使酶钝化为无活性形式。

蛋白激酶 C 属 Ser/Thr 蛋白激酶,广泛存在于各组织。PKC 均为单链多肽(相对分子质量 80 000~90 000),其 N 端为调节域,包括结合 DAG、 Ca^{2+} 的部位和 PS 作用部位,还含有产生自身抑制的“假底物模体”,C 端为激酶催化域。PKC 激活可使大量底物蛋白磷酸化而产生广泛的生理效应(图 19-8)。

(1) PKC 对细胞代谢、功能的调节作用 PKC 的靶蛋白很多,包括代谢途径关键酶,如糖原合酶;细胞骨架蛋白,如肌钙蛋白、微管结合蛋白等;膜载体、通道蛋白,如 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶等;信号转导蛋白,如 Raf 蛋白、GTP 酶激活蛋白(GTPase-activating protein, GAP)等;膜受体,如表皮生长因子受体、肾上腺素 β 受体等。

(2) PKC 对基因表达的调控 PKC 活化后可转移到胞核,磷酸化调节某些癌基因编码的转录因子,促进细胞增殖。① 促进立早基因表达,引起初期应答。PKC 磷酸化激活核中血清反应因子(SRF),它可结合于基因调节区的血清反应元件(SRE)增加转录因子 *fos*、*myc*、*jun* 等基因的表达。这些基因因其产物

出现早,寿命短而被称为立早基因(immediate-early gene)。②促进转录因子 *Fos*、*Jun* 磷酸化。磷酸化的 *Jun* 和 *Fos* 组合形成二聚体的转录激活因子(如 AP-1)。后者可促进相关基因的转录与表达,完成细胞生长、分裂的次级应答。③核因子 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 是异二聚体转录因子,可穿梭于胞质和胞核,在胞质中被抑制蛋白 I κB 结合而受到抑制。PKC 使 I κB 磷酸化脱离 $\text{NF}\kappa\text{B}$,活化的 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 则进入细胞核促进相应基因的转录表达(图 19-9)。佛波酯(phorbol ester)是一种化学致癌剂,因佛波酯可模拟 DAG 结合并持续激活 PKC,导致细胞异常生长、分裂而致癌。

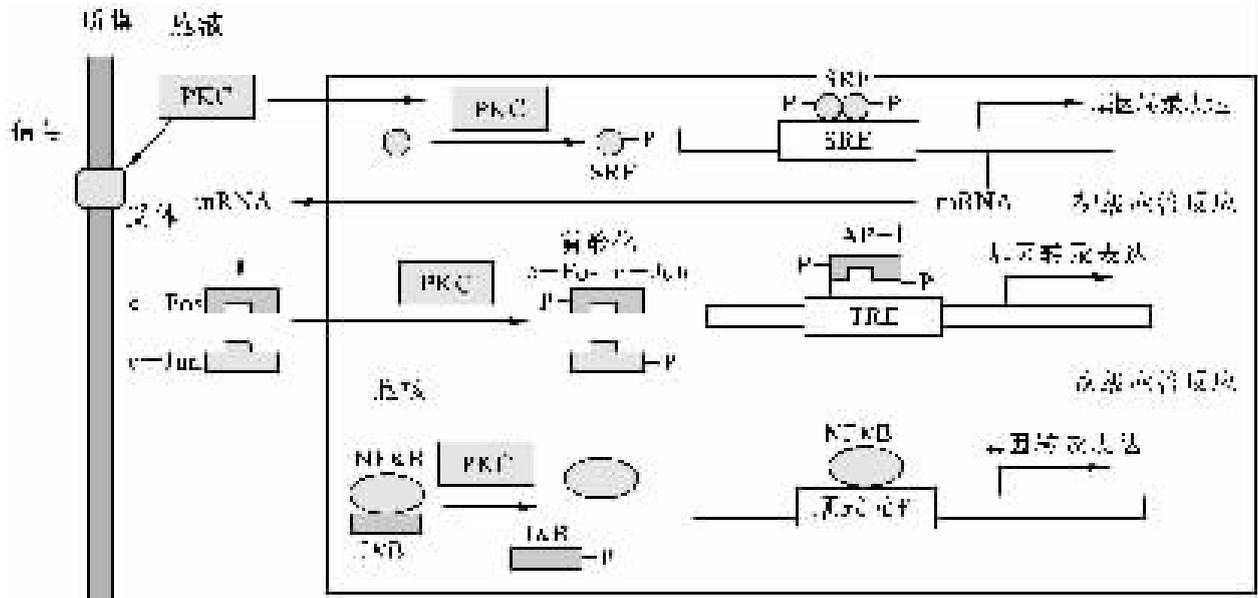


图 19-9 PKC 对基因表达的调控机制

SRF 血清反应因子 SRE 血清反应元件 TRE 甲状腺激素反应元件 AP-1 二聚体 DNA 结合蛋白 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 核因子 κB

三、生长因子、细胞因子信号转导途径

生长因子和细胞因子是细胞分泌的蛋白质、多肽类信号分子,能诱导特异核转录因子合成,进而促进与细胞分裂周期、DNA 复制等相关酶的表达,调节细胞生长和增殖。生长因子通过受体酪氨酸蛋白激酶(TPK)转导信号而发挥作用。某些诱导分裂的细胞因子则通过非受体 TPK 传递信号。近年发现,生长因子、细胞因子、癌基因产物等的信号转导途径的调节与细胞的分化与增殖密切相关,调节的异常经常引起肿瘤的发生,是现代生物医学研究的热点之一。

(一) 酪氨酸蛋白激酶

可被生长因子与细胞因子等信号分子结合的靶细胞膜上的受体有两种,一是受体型酪氨酸蛋白激酶,当信号分子与此受体结合后,此受体的 TPK 活性被激活,从而发生一系列相应的级联反应。二是非 TPK 受体,此种受体无 TPK 活性,但可借助细胞内一类具有 TPK 活性的连接物蛋白完成信号转导。这些信号蛋白也称为非受体型酪氨酸蛋白激酶。非受体型酪氨酸蛋白激酶对于上述两种受体途径均有重要的作用。

非受体型酪氨酸蛋白激酶广泛存在于各组织细胞的胞质或胞内颗粒中,可根据其亚细胞定位和组织特异性分为 8 个家族,如 Jak 及 Src 家族。Src 为典型的非受体 TPK,它包含 3 种重要的同源结构域。① TPK 活性域(又称 Src 同源序列 1,Src homology domain 1,SH1),它可催化靶蛋白 Tyr 残基磷酸化;②SH2 结构域,约由 100 个氨基酸组成,可通过两个独立的序列识别与其结合的蛋白质中磷酸化的 Tyr 及其羧基侧的几个氨基酸序列;③SH3 结构域,约含 60 个氨基酸,能与富含脯氨酸(Pro)残基和疏水区的特异肽段相结合。很多信号转导蛋白就是通过上述特殊结构域间的结合来参与信号转导过程的。

(二) 受体型 TPK - Ras - MAPK 信号转导途径

现以表皮生长因子(epidermal growth factor ,EGF)为例 ,讨论各种生长因子胞外信号从质膜到胞核的受体型 TPK - Ras - MAPK 信号转导途径。

1. 生长因子受体的活化

EGF 能刺激表皮细胞、上皮细胞生长。EGF 与靶细胞表面无活性 EGF 受体(EGFR)胞外配体结合部位结合 ,引起受体变构、二聚化。并激活受体胞内区 TPK 活性 ,二聚化使受体间互相接近 ,一受体 TPK 对另一受体的 Tyr 残基发生交互磷酸化。在此活化的受体中 ,自身催化生成的磷酸化 Tyr 肽段便成为多种含 SH2 域信号蛋白的停泊位点(docking site) ,进而激活下游的信号。

2. 小 G 蛋白 Ras 的激活

胞质内信号蛋白 Grb2(Growth factor receptor binding protein2)为含 SH2 和 SH3 域的连接物蛋白。Grb2 的 SH2 域识别、结合活化的生长因子受体中磷酸化的 Tyr 序列 ,从而定位于质膜。Grb2 的 SH3 域识别并结合信号蛋白 Sos(Son of sevenless)中富脯氨酸及疏水残基的部位 ,并激活 Sos 的鸟苷酸交换因子(GEF)活性。Sos 进而促进膜定位的小 G 蛋白(small G protein) Ras - GDP 转化为活化的 Ras - GTP。

小分子 G 蛋白又称小 GTP 酶(small GTPase) ,属于 Ras 蛋白超家族。小 G 蛋白多为细胞原癌基因的表达产物 ,广泛参与细胞生长、分化、增殖等多种信号转导过程。小 G 蛋白约 50 多种 ,包括 Ras、Rho、Arf、Rab、Ran 几族(表 19 - 3)。小 G 蛋白是单一多肽链的蛋白质(相对分子质量 20 000 ~ 25 000) ,具有结合 GDP/GTP 的能力和潜在 GTP 酶活性 ,结合 GTP 时被活化而结合 GDP 时失活。小分子 G 蛋白与 G 蛋白 α 亚基有相似的结构与功能。

表 19 - 3 小 G 蛋白 Ras 超家族的组成和功能

家 族	功 能
Ras	通过丝-苏氨酸蛋白激酶介导调节细胞生长
Rho	通过丝-苏氨酸蛋白激酶介导重组细胞骨架
Arf	激活霍乱毒素的 ADP-核糖基化 ,调节囊泡转运途径 ,活化磷脂酶 D
Rab	在分泌和入胞途径中起关键作用
Ran	RNA、蛋白质进出胞核转运中起作用

Ras 等小 G 蛋白虽有内在的 GTP 酶活性 ,但活性很弱。有两类调控蛋白可参与调节小 G 蛋白的活化及功能。鸟苷酸交换因子(guanine - nucleotide exchange factor ,GEF)可与之结合 ,促使 Ras - GDP 交换为 Ras - GTP 而被活化。GTP 酶激活蛋白(GTPase activating protein ,GAP)可与 Ras - GTP 结合 ,促进 GTP 水解生成无活性的 Ras - GDP。

3. Raf - MEK - MAPK 级联信号传递

活化的 Ras 可与胞液 Ser/Thr 蛋白激酶 Raf - 1 结合 ,并使 Raf - 1 转位到质膜并被激活。活化的 Raf - 1 可激活胞质的有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen - activated protein kinase ,MAPK)系统。Raf - 1 作为一种 MAPK 激酶的激酶(MAPK kinase kinase ,MAPKKK) ,激活一种 MAPK 激酶(MAPKK) ,后者再激活一种 MAPK。这样 ,信号传递由 MAPKKK \longrightarrow MAPKK \longrightarrow MAPK ,形成生长因子信号的三类激酶的级联放大过程。

MAPK 也是 Ser/Thr 蛋白激酶 ,有广泛生物功能。MAPK 转移核中使血清反应因子(SRF)和 Elk - 1 因子等转录因子磷酸化 ,形成复合物结合于 SRE ,激活立早基因转录(图 19 - 10)。受 MAPK 作用活化的因子包括 RNA pol II 及转录因子 c - Fos、c - Myc、c - Myb、p53 和 STAT 等。也就是说 ,生长因子通过激活 MAPK ,以 PKC 类似方式诱导细胞的初级应答和次级应答反应 ,从而引起细胞生长、增殖等效应。此外 ,MAPK 还可调节花生四烯酸代谢和细胞微管形成。

(三) PI - 3K - PKB 信号转导作用

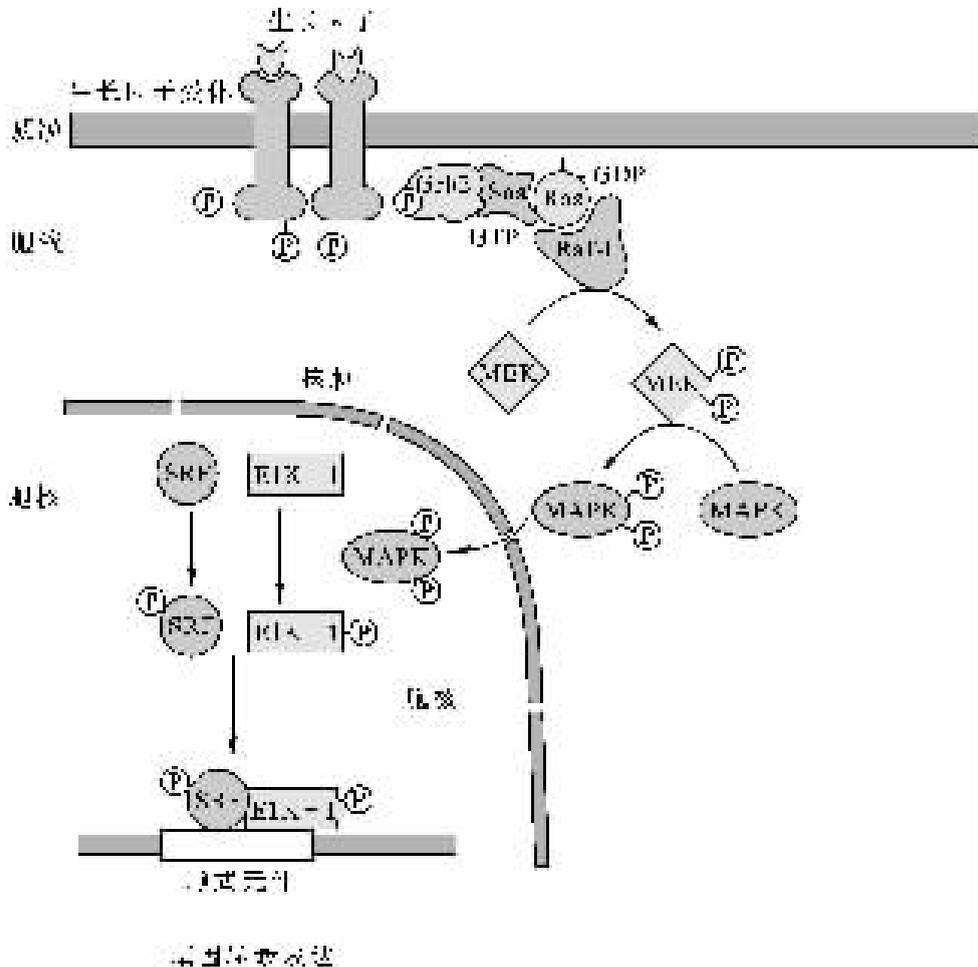


图 19-10 生长因子受体介导的信号途径

生长因子和胰岛素、生长激素等多种信号分子可以通过激活 PI-3K-PKB 信号转导途径,介导完成其信号的转导。此途径有磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI-3K)和蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)参与。

PI-3K 能特异催化磷脂酰肌醇 3 位羟基磷酸化,使 PI-4,5-P₂ 磷酸化生成 PI-3,4,5-P₃(PIP₃)。PI-3K 是含 P110 和 P85 亚基的异二聚体。P110 为催化亚基,从 N 端依次有 Ras 结合域、PI-3K 域和 Ser/Thr 激酶域;P85 为调节亚基,含 SH2、SH3 域。PI-3K 可以被活化的 Ras 激活。

PKB 因与 PKA、PKC 有较高同源性而称之,又称 Akt(相对分子质量 60 000),广泛存在各组织。PKB 结构有 3 个结构域,① N 端的血小板-白细胞 C 激酶底物同源域(pleckstrin homology domain, PH 域)可与膜磷脂结合。② Ser/Thr 激酶催化域,其中 Thr308 磷酸化为 PKB 活化必需。③ C 端为调节区,静息时掩盖催化域,使 PKB 无活性,而此区 Ser478 磷酸化使其变构,解除抑制。

生长因子(PDGF、EGF 等)和胰岛素、生长激素等与受体型 TPK 结合使受体活化并自身磷酸化后,PI-3K 的 P85 亚基通过 SH2 域结合受体磷酸化 Tyr 部位,受体 TPK 催化其 P110 亚基活化,从而使 PI-3K 激活。活化的 Ras 蛋白也可直接使 PI-3K 激活。活化的 PI-3K 使质膜 PIP₂ 磷酸化成 PIP₃ 并留在膜上。质膜生成的 PIP₃ 成为多种含 PH 域蛋白的停泊及激活位点。PKB 和另外一类 PIP₃ 依赖蛋白激酶(PIP₃-dependent protein kinase, PDK)均可通过其自身的 PH 域与质膜的 PIP₃ 结合并被固定于质膜。PDK 可特异地催化 PKB 的 Thr308、Ser478 磷酸化,导致 PKB 完全激活(图 19-11)。

活化的 PKB 可催化多种靶蛋白磷酸化,产生广泛影响。

(四) 非 TPK 受体信号途径

生长激素、干扰素(interferon, INF)等细胞因子受体的胞内区无 TPK 活性,但受体与信号分子结合后,可偶联并激活其下游非受体型 TPK(如 Janus kinase, Jak),传递调节信号,引起细胞增殖、分化、癌变等细胞效应。下面以干扰素为例讨论这类胞外信号通过 Jak-STAT 信号途径的转导过程。

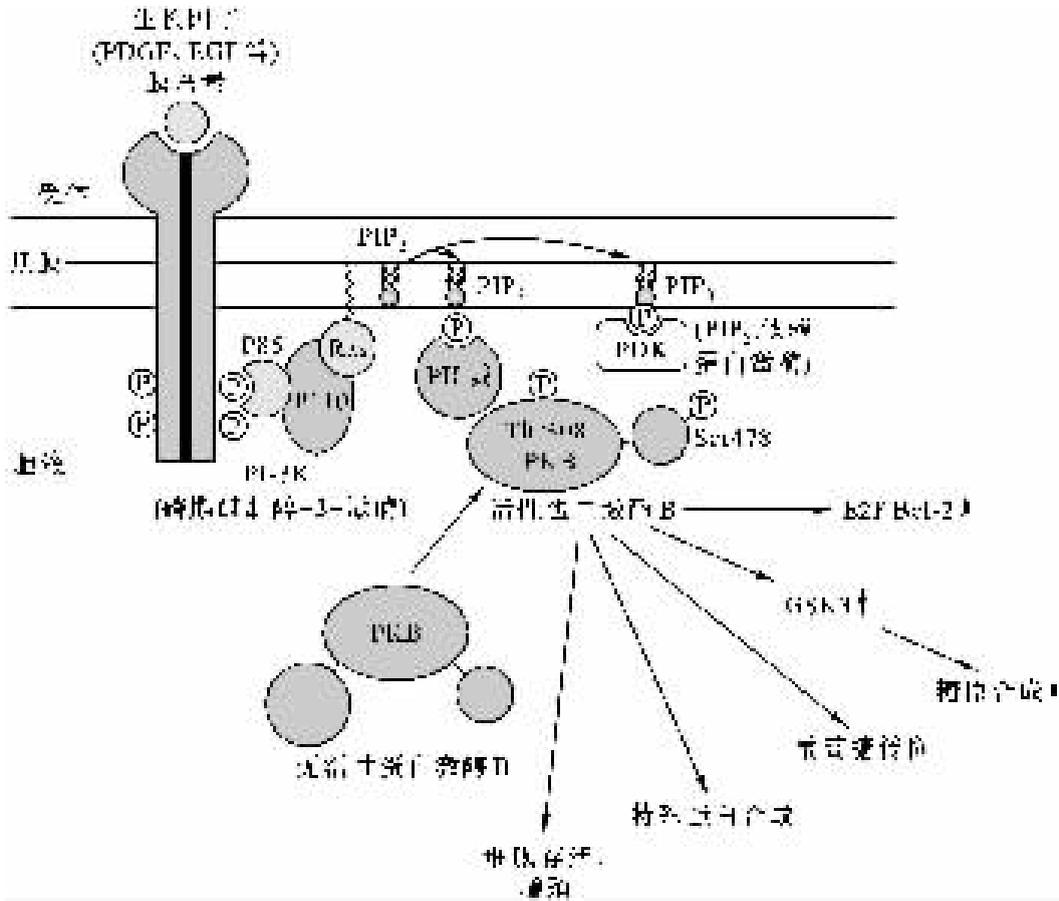


图 19-11 PI-3K-PKB 信号转导途径

Jak 属非受体性 TPK 家族,其成员主要有 Jak1、Jak2、Tyk2 和 Jak3。Jak 分子 N 端有与质膜的作用域,可与质膜结合;C 端侧的 SH1 域具有 TPK 活性。

IFN α/β 结合受体胞外区,受体发生二聚化而被激活,受体胞内近膜区可募集并活化 Jak1 和 Tyk2。进而活化的 Jak1 催化受体 C 端区 Tyr 磷酸化,含 SH2 域的信号转导子和转录活化子(signal transducer and activator of transcription, STAT)通过该停泊位点与受体结合。结合于受体的 STAT 分子的 Tyr,分别被 Jak1、Tyk2 磷酸化而脱离受体并形成活性二聚体。活化的 STAT 进入胞核后与干扰素调节因子-9(IRF-9)结合,识别并结合于基因启动子中干扰素刺激反应元件(ISRE)而激活基因转录表达(图 19-12)。

不同细胞因子受体可特异结合不同种类的 STAT 和 Jak 激酶。如 IFN γ 结合受体后激活的是 Jak1 和 Jak2,再促进 STAT1 形成同源二聚体。该二聚体 STAT 进入核内作用于 γ -干扰素活化序列(GAS),促进相应基因转录。

(五) 核因子 NF κ B 信号作用

核转录因子 NF κ B(nuclear factor - kappa B, NF κ B)是一种可穿梭于胞液和胞核间的关键转录因子。核内 NF κ B 可结合于一类 DNA 特异顺式作用元件称为“ κ B 序列”激活编码细胞因子、

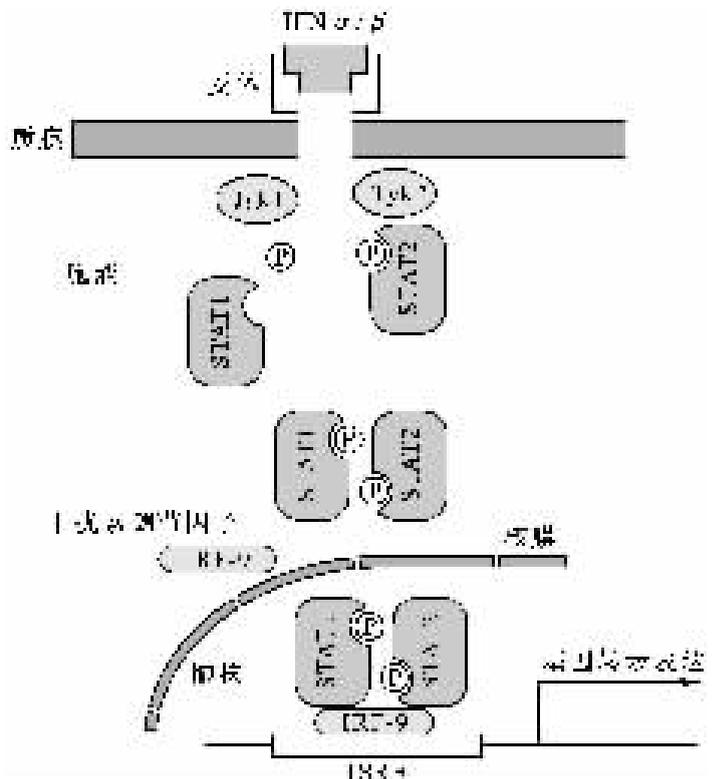


图 19-12 干扰素 Jak-STAT 信号转导途径

生长因子、细胞间黏附分子和某些应激性蛋白基因的转录及表达。NF κ B 的作用涉及免疫细胞活化、T 和 B 淋巴细胞的发育、机体应激反应、炎症反应,以及细胞增生、转化、凋亡等多种细胞活动。

NF κ B 属于癌蛋白 Rel 家族,为异源二聚体分子,含 P65 亚基(RelA)和 P50 亚基(NF κ B1)。P65 亚基含有 DNA 结合域、胞核定位序列(NLS)及二聚化结构域。静息状态胞液的 NF κ B 结合其抑制蛋白,如 I κ B α 、I κ B β 等。I κ B α 掩盖 NF κ B 的 NLS 部位, NF κ B 以无活性复合物形式存在。

多种内外源成分,如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素、细菌、病毒、脂多糖、佛波酯等激活物,以及活性氧、辐射等应激因素等可诱导 NF κ B 的激活。通过激活 I κ B 激酶(I κ K),使 I κ B α 构象改变而脱离 NF κ B,并迅速分解。NF κ B 的 NLS 部位暴露并被激活。活化的 NF κ B 经核孔进入胞核,可识别结合 κ B 序列激活相应基因转录、表达,引起各种生物效应(图 19-10)。胞液新合成的 I κ B α 再进入胞核,结合 NF κ B,使其从 DNA 解离,终止信号途径。重新形成的 NF κ B 无活性复合物返回胞液。前述信号转导途径中激活的 PKC、PKA 等也可直接磷酸化 I κ B α ,促使 NF κ B 活化。

研究发现,急性肺损伤、急慢性炎症反应、癌症等多种疾病与 NF κ B 的过度激活有关。通过抑制 NF κ B 的异常活化,可以治疗、缓解这些疾病。糖皮质激素类药物可以直接作用于 NF κ B 阻断其与 DNA 结合或者通过促进 I κ B α 基因的表达与合成,抑制 NF κ B 介导的生物效应,如阻断免疫和炎症反应。它们是目前临床最广泛使用的抑制 NF κ B 过度活化药物。

四、细胞内受体信号途径

类固醇激素类的受体位于胞内(胞液或胞核),类固醇激素是脂溶性的小分子,易透过细胞膜,与胞内特异受体结合转导信号。除糖皮质激素受体(GR)在胞液,其他类固醇激素受体均位于胞核。

无激素时,类固醇激素受体(如 GR)与热休克蛋白 HSP90(阻遏蛋白)结合,受体 DNA 结合域被掩盖,无激活转录作用。糖皮质激素与 GR 的 LBD 结合后,受体构象改变, HSP90 解离,受体被激活并二聚化。激素-受体复合物转位进胞核,作为转录因子识别、结合于特异 DNA 序列(激素反应元件, hormone response element, HRE),促进特异基因的转录,发挥激素生物效应(图 19-13)。激素-受体复合物也可在其他元件或因子协同下激活靶基因转录。甲状腺素-受体复合物不仅可与核内 DNA 结合,调节基因表达,还能结合线粒体内膜受体,促进氧化磷酸化有关基因的表达。

细胞外信号的转导过程十分复杂,细胞可通过多种受体接受不同胞外信号,而一种激素信号可通过几条途径传递信号。细胞代谢重要的关键酶,如糖原磷酸化酶活性,能接受不同信号途径调节。不同信号途径也可共同调控同一重要基因表达。细胞接受的多种信号,包括引起相反效应的信号,可在细胞内整合后产生作用。信号分子诱导的生物效应可在不同层面影响细胞的不同功能。说明各条信号传递途径并不是独立存在,而是相互联络、互相影响和作用形成复杂的信号转导网络,这称为信号途径的交互对话(cross talk)。一条信号途径的激活可以启动或活化另一条途径,也可以抑制另一条途径,这对于各条信号途径间作用的平衡和细胞的正常活动具有十分重要的意义。

如胰岛素胞外信号转导既通过 Ras - MAPK 激酶途径,又可通过 PI - 3K - PKB 途径。生长激素受体活化 Jak,进而激活 JAK - STAT 途径或 Grb - 2 - Ras - MAPK 途径,又能通过结合活化含 SH2 的 PLC - γ 进入 PKC 途径。

不同第二信使介导的信号途径之间也能相互联系或相互制约。如信号途径动员的 Ca^{2+} 对 cAMP 具双重调节,通过激活 PDE 加速 cAMP 水解,同时 Ca^{2+} 促进 DAG 与 PKC 结合,激活的 PKC 促进 Gs 与 AC 偶联,使 cAMP 生成增加。活化的蛋白激酶可通过磷酸化其他受体下调其活性,抑制另一信号途径。

G 蛋白在胞外信号跨膜传递中起核心作用,可参与调节 AC - cAMP、PI - PLC - IP $_3$ /DAG 信号途径及多种离子通道等。

信号转导过程涉及 PKA、PKG、PKC 和 TPK 等多种蛋白激酶的作用,表明蛋白激酶使靶蛋白磷酸化并

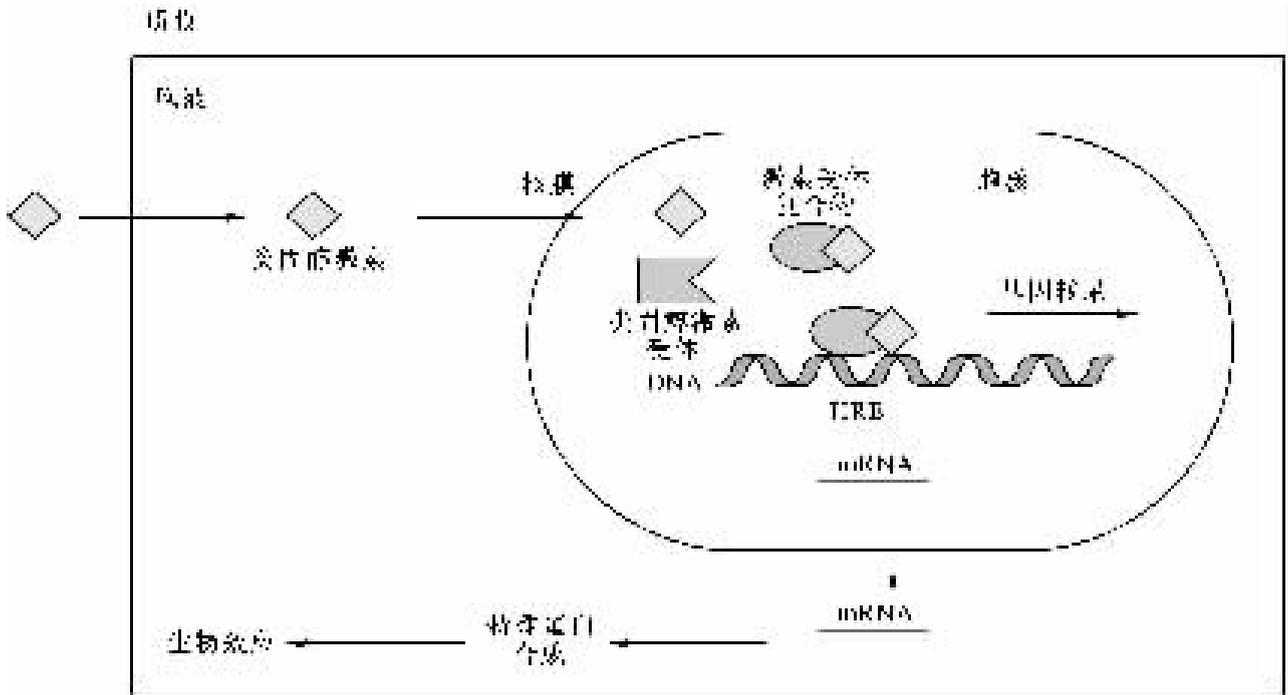


图 19-13 类固醇激素类的信号转导途径

改变其活性,是信号转导的最重要方式。同时,细胞存在多种特异性蛋白磷酸酶(protein phosphatase),可分别催化从靶蛋白磷酸化的丝/苏氨酸或酪氨酸残基上脱磷酸基,终止靶蛋白的信号转导作用。形成细胞蛋白质磷酸化和脱磷酸两种过程的可逆互变。已发现数百种蛋白激酶和近千种磷酸酶,参与细胞代谢、增殖及癌变等信号转导过程。

第四节 信号转导异常与疾病

一、G 蛋白异常与疾病

霍乱毒素在肠上皮细胞中可催化激活型 G_s 的 α 亚基发生 ADP-核糖基化,阻断 GTP 酶活性,导致 G_s -cAMP-PKA 途径持续激活,膜阴离子通道持续开放,造成大量 Cl^- 、 HCO_3^- 、 H_2O 经通道分泌肠腔,发生严重腹泻。百日咳毒素则催化抑制型 G_i 的 α 亚基发生 ADP-核糖基化,阻断 $G_i\alpha$ -GDP 被 GTP 交换活化,不能抑制 AC 活性。这导致百日咳患者对组胺敏感增高以及血糖降低。

二、信号转导障碍与肿瘤

生长因子、细胞因子等是调控细胞分裂增殖的主要胞外信号。细胞原癌基因的表达产物多为涉及细胞增殖信号转导各阶段的关键成分。多种原癌基因突变,表达产物异常,能在多个环节造成细胞增殖信号转导过程障碍,导致肿瘤产生。

三、受体异常与疾病

受体的数目、亲和力、结构与功能异常,可影响胞外信号与受体结合及产生相应生物效应,这类疾病可称受体病。

1. 遗传性受体缺陷

因某种受体基因突变,使受体产物的表达、结构异常,导致疾病。如雄激素受体异常,导致雄激素不敏感综合征(AIS)等疾病。

2. 自身免疫性受体缺陷

在某些因素作用下,患者体液中出现激素受体的自身抗体,抑制激素生物效应。如重疾肌无力患者体内有乙酰胆碱受体的抗体,B型抗胰岛素性糖尿病患者存在抗胰岛素受体抗体。

3. 继发性受体缺陷

受体缺陷继发于某种疾病。如单纯性肥胖症可引起胰岛素受体功能低下。

Summary

Signal transduction is the specific and sensitive process that cells receive extracellular signals by protein receptors, then the signals are transmitted through the cell membranes and mediated by the signal transducing enzyme and protein cascades to generate cell response effects such as changes in metabolic enzyme activities, gene expressions and ion channel activities. There are diverse signal molecules in cell environment, including hormones, neurotransmitters, growth factors, cytokines, even photons, odorants and tastants. The highly specific binding of signal molecules to the receptor initiates the subsequent signal transduction pathways, which amplify and integrate the signals. Secondary messengers carry the signal inside the cell and often use protein phosphorylation as a signaling device. The epinephrine binds the G-protein-coupled receptor with 7 transmembrane segments, which activates the G proteins and adenylate cyclase (AC). The increased cAMP stimulates the protein kinase A (PKA), PKA mediated the effect by phosphorylating the key target protein. Atrial natriuretic factor (ANF) binds to receptor enzyme with guanylate cyclase activity, then cGMP activates PKG. Some serpentine receptors are coupled to phospholipase C (PLC) that cleaves PIP_2 to IP_3 and DAG. As the secondary messengers, IP_3 raises cytosolic $[Ca^{2+}]$ and activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase), and DAG activates the PKC cooperated with Ca^{2+} and PS. The activated PKA, PKG, PKC and CaM kinase can induce the diverse cellular effects by phosphorylating the Ser/Thr in key target proteins. The insulin and growth factor receptors have tyrosine protein kinase (TPK) activity. When binding with ligands, the GF receptors are dimerized, activated and autophosphorylated at its Tyr, which induce Ras activation and Raf-1 – MAPKK-MAPK kinase cascades, MAPK moves into the nucleus and stimulates the key gene expression. The interferon (IFN) binding can trigger its receptors dimerization, then the activation of Jak kinase (TPK) and STAT. As an active transcription factor, dimerized STAT can modulate key gene transcription. All the activated PKA, PKC, MAPK and Jak kinase may trigger the phosphorylation and activation of specific nuclear transcription factors essential for gene expression or cell division. And there are other important signal transduction pathways that mediate the phosphatidylinositols-3-kinase-PKB (PI-3-K-PKB) and the nuclear factor-kappa B (NF κ B) in cells.

In the cell, different signal transduction pathways are interacted to cross talk and to form the signal transduction network. Some defects in signaling pathways can lead to cancer and other diseases.

思 考 题

1. 应如何认识信号分子和信号转导途径。
2. 简述信号转导系统的主要成分和其转导信号的方式。

3. 说明 G 蛋白家族的结构、分类和活化机制。
4. 讨论胞外信号分子受体的种类和主要特点。
5. 比较说明以 cAMP 和 cGMP 为第二信使的信号转导过程。
6. 比较说明 IP₃、DAG 两种第二信使的生成和作用。
7. 讨论各种信号途径终止转导过程的方式。
8. 简述生长因子受体性 TPK 信号转导机制。
9. 比较三种 Jak - STAT 信号转导途径过程。
10. 说明类固醇激素受体结构及信号转导机制。
11. 总结各种参与信号途径的蛋白激酶特性。
12. 讨论信号分子是如何调节基因表达和细胞增殖的。

(崔 行)

第二十章 血液生物化学

本章教学要求

- 血浆蛋白的组成和主要功能
- 血浆中的凝血因子和抗凝血因子
- 血液凝固的内源性途径和外源性途径
- 纤维蛋白的溶解
- 红细胞和白细胞代谢的特点

血液(blood)又称全血,由液态的血浆(plasma)和混悬在其中的红细胞、白细胞和血小板组成。血液凝固后析出浅黄色透明的液体为血清(serum)。血清中不含正常血浆中存在的纤维蛋白原和各种凝血因子,但含有血液凝固过程中产生的凝血因子的降解产物。

正常成人的血液总量约占体重的 8% ,平均约为 5 000 mL。血液的含水量约为 77% ~ 81% ,pH 为 7.35 ~ 7.45 ,密度为 1.050 ~ 1.060 g/cm³ ,37 °C 时渗透压为 770 kPa。血浆约占血液总体积的 55% ~ 60% ,约为 3 000 mL。

溶解于血液的化学成分分为有机物和无机物两大类。无机物以电解质为主,重要的阳离子有 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺,重要的阴离子有 Cl⁻、HCO₃⁻、H₂PO₄⁻。这些离子在维持神经肌肉正常的兴奋性、血浆晶体渗透压和体液的酸碱平衡等方面起重要作用。有机物包括蛋白质、糖类和脂质物质、非蛋白含氮化合物等。非蛋白含氮化合物主要有尿素、尿酸、肌酸、肌酐、铵离子和胆红素等,这些化合物中所含的氮总称为非蛋白氮(non - protein nitrogen, NPN),正常人血中 NPN 的量为 14.28 ~ 24.99 mmol/L,其中尿素氮(blood urea nitrogen)约占 NPN 的 50%。肾功能不全的病人 NPN 的含量增高。

第一节 血浆蛋白

一、血浆蛋白的组成

蛋白质是血浆中含量最多的固体成分,正常成人血浆内的蛋白质浓度为 60 ~ 80 g/L。血浆蛋白种类繁多(表 20 - 1),目前已知有 200 余种。人们利用盐析、电泳、超速离心、层析等方法对血浆蛋白进行分离。用醋酸纤维素薄膜电泳可将血清蛋白质分成:清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白、纤维蛋白原和 γ -球蛋白(图 20 - 1)。如用分辨率更高的聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫电泳可将血浆蛋白分成几十种。

尽管血浆蛋白种类繁多,但有以下几个共同特点:① 绝大多数血浆蛋白合成于肝。如清蛋白、 α_1 -球蛋白、 α_2 -球蛋白、 β -球蛋白和凝血因子等。 γ -球蛋白由浆细胞合成。② 除了清蛋白外,几乎所有的血浆蛋白都是糖蛋白。糖蛋白中所含的寡糖链携带着可起识别作用的生物学信息。③ 每种血浆蛋白都有自己独特的半衰期。正常成人血浆清蛋白(albumin)的半衰期为 20 d,结合珠蛋白为 5 d,前清蛋白(prealbumin)大约 8 h。④ 许多血浆蛋白呈现遗传多态性(polymorphism)。即在人群中,一种蛋白质至少有两种表型。例如 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 - antitrypsin)至少有 5 种等位基因: Pi^M 、 Pi^S 、 Pi^Z 、 Pi^F 和 Pi^- 。最普通的

表 20-1 人类正常血浆蛋白

蛋白质	相对分子质量($\times 10^3$)	血浆浓度(mg/L)	生物学作用
前清蛋白	55	100 ~ 400	运输甲状腺素、视黄醇等
清蛋白	66.3	35 000 ~ 55 000	维持渗透压、运输胆红素、脂肪酸
α -球蛋白			
α_1 -酸性糖蛋白	44	550 ~ 1 400	
α_1 -抗胰蛋白酶	54	2 000 ~ 4 000	抑制丝氨酸蛋白酶
α_1 -脂蛋白	220	2 800 ~ 3 870	运输脂质
α_2 -球蛋白			
α_2 -巨球蛋白	725	1 500 ~ 4 200	抑制丝氨酸蛋白酶
铜蓝蛋白	134	150 ~ 600	运输铜离子, Fe^{2+} 氧化酶活性
结合珠蛋白(1-1)	100	1 000 ~ 2 200	结合血红蛋白
β -球蛋白			
运血红素蛋白	57 ~ 80	500 ~ 1 000	移出血液循环中的血红素
运铁蛋白	76	2 000 ~ 3 600	运输 Fe^{2+}
β -脂蛋白	3 000	2 500 ~ 4 400	运输脂质
纤维蛋白原	341	2 000 ~ 4 500	参与凝血
γ -球蛋白			
IgA、D、E、G、M	160 ~ 950	9 000 ~ 18 000	参与免疫反应

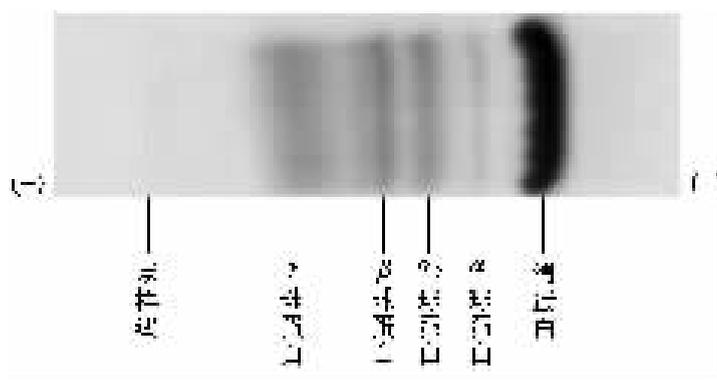


图 20-1 血浆蛋白醋酸纤维素薄膜电泳

表型 MM(等位基因 P_i^M)和正常的抗胰蛋白酶活性相关。纯合子 ZZ 表型的个体由于血浆缺乏 α_1 -抗胰蛋白酶活性,导致严重的肝、肺疾病。杂合子 MZ 和 MS 表型的个体,虽然表型正常,但是其后代可能出现 ZZ 表型。

正常血浆中清蛋白与球蛋白浓度的比值为 1.5 ~ 2.5。肝功能不全的病人,由于肝合成清蛋白能力下降,而使清蛋白与球蛋白浓度的比值下降。

二、血浆蛋白的功能

各种血浆蛋白的功能各不相同。人们对它们的结构与功能进行了广泛的研究。现将血浆蛋白的主要功能叙述如下(表 20-2)。

表 20-2 血浆蛋白的功能

功能种类	血浆蛋白
1. 载体蛋白	前清蛋白、清蛋白、脂蛋白、运铁蛋白、视黄醇结合蛋白、维生素 D 结合蛋白
2. 酶	对氧磷脂酶-1、芳香酯酶、磷脂酰胆碱、胆固醇酰基转移酶、胆碱酯酶、铜蓝蛋白等
3. 参与凝血与溶纤的蛋白	凝血酶原、纤溶酶原、凝血因子 VII、VIII、XII、XI、IX、X 等
4. 免疫防御蛋白	IgA、IgD、IgE、IgG、IgM, 补体 C1 ~ 9 等
5. 蛋白酶抑制剂	α_1 -抗胰蛋白酶、 α_2 -巨球蛋白、抗凝血酶 III 等
6. 激素	胰岛素、促红细胞生成素
7. 急性反应蛋白	C-反应蛋白、 α_2 -酸性糖蛋白

(一) 维持血浆胶体渗透压

血浆蛋白溶解在血浆中,很难通过毛细血管壁扩散到组织间液。即使有些血浆蛋白能够扩散到组织间液,也很快通过淋巴管回流到静脉中。血浆中血浆蛋白的浓度比组织间液蛋白浓度大约高三倍。血浆胶体渗透压是各种血浆蛋白胶体渗透压的总和。血浆胶体渗透压虽然仅占血浆总渗透压的 0.4%,但对水在毛细血管内外的分布起着决定性的作用。清蛋白在血浆蛋白中的摩尔浓度最高,相对分子质量相对较小。故血浆清蛋白在维持血浆胶体渗透压方面起着主要作用,约占血浆总胶体渗透压的 75%,而球蛋白只占大约 25%。当血浆蛋白浓度降低,尤其是清蛋白浓度过低时,血浆总胶体渗透压下降,水分滞留在组织间隙,导致组织水肿。水肿常见于肝功能不全和肾功能障碍的病人。

(二) 维持血浆正常的 pH

血浆的正常 pH 是 7.35 ~ 7.45。血浆蛋白的等电点在 pH4.0 ~ 7.3 之间,解离的蛋白可以和相应未解离的蛋白形成缓冲对。其中以蛋白质末端氨基和组氨酸残基的咪唑基解离后形成的缓冲对作用最强,因为这些基团的 pK_a 与血液的 pH 值最接近。

(三) 运输作用

血浆清蛋白可以结合胆红素、唾液酸、脂肪酸、钙离子、镁离子和某些药物;载脂蛋白可以结合脂质物质;维生素 A 与视黄醇结合蛋白结合,再与前清蛋白形成维生素 A-视黄醇结合蛋白-前清蛋白复合物而运输。运铁蛋白运输铁离子、铜蓝蛋白可运输铜离子。被运输的小分子物质和金属离子与血浆蛋白结合后,可防止它们进入不该进入的细胞,引起细胞中毒,也可防止通过肾,随尿液排出。

(四) 免疫作用

血浆中的免疫球蛋白和补体参与体液免疫和细胞免疫。免疫球蛋白(即抗体,antibody)能直接攻击入侵者,产生凝集、沉淀抗原、中和抗原毒素、或溶解细胞;或形成的抗原-抗体复合物,通过激活补体系统,导致细菌或细胞的溶解。

(五) 营养作用

单核吞噬细胞系统可以胞吞血浆蛋白,吞入的蛋白质在溶酶体分解成氨基酸进入氨基酸代谢池,用于细胞合成蛋白质,或进一步分解供能,或转变成其他含氮化合物。

(六) 血浆中酶的催化作用

血浆中的酶主要是指那些在细胞内合成,分泌进入血液,在血液中发挥生理功能的酶。其中主要是以酶原的形式存在于血液中的蛋白酶类,包括凝血、纤溶和补体系统的多种蛋白酶原。在一定的条件下,通过酶解激活,发挥凝血、纤溶和免疫的功能。此外,在血浆中发挥生理功能的酶还有磷脂酰胆碱:胆固醇脂酰基转移酶、脂蛋白脂肪酶、肾素及血管紧张素转换酶等。

血浆中还存在少量逸入血液或因细胞更新释放至血液的酶,它们的催化活性与血浆正常的生理功能无直接关系。这类酶在细胞内的浓度比在血浆的浓度高数千倍。在病理情况下,如细胞膜通透性升高或细胞膜破损,它们漏出或释放至血液,使它们在血浆中的活性增高。检测它们在血浆中的活性具有诊断、监测病情、判断预后的临床价值。

(七) 参与炎症反应

在机体发生急性炎症和某些组织损伤时,某些血浆蛋白水平升高,这些蛋白质被称为急性时相蛋白(acute phase protein)。这些蛋白包括纤维蛋白原(fibrinogen)、 α_1 -抗胰蛋白酶、 α_1 -酸性糖蛋白(α_1 -acid glycoprotein)等。C-反应蛋白(C-reactive protein)在正常成人血浆中难于鉴定到,在急性炎症和某些损伤时显著升高。另外在妊娠、服用避孕药时,这些蛋白的血浆水平也可以升高。

(八) 凝血、抗凝血和纤溶作用

这部分内容将在下一节详细叙述。

第二节 血液凝固与纤维蛋白溶解

一、血液凝固

血管是一个封闭的系统。当血管破损时,血液从血管中流出,流出的血液发生级联酶促反应,催化血液转变为凝胶状态的血凝块。这个过程称为血液凝固(blood coagulation)。血凝块堵住血管的破损处,阻止血液继续从血管流出,这一过程称为止血(hemostasis)。止血过程包括受损血管的收缩,减少、减慢局部血流,缩小血管的破损,形成血小板栓子,即白色血栓;血液凝固,纤维组织生长进入血凝块,封闭破损的血管等程序。

(一) 血浆中的凝血因子

参与血液凝固的物质统称凝血因子(coagulation factor)。国际凝血因子命名委员会按其发现的先后顺序,对14种凝血因子中的12种用罗马数字进行了统一命名。发现较晚的前激肽释放酶(prekallikrein, PK)和高相对分子质量激肽原(high molecular weight kininogen, HMWK)则未用罗马字命名。因子IV是钙离子,现在已不用IV表示。后来发现因子VI就是因子V,两者实为一种凝血因子。现将凝血因子特性列表于20-3。

表 20-3 血液和组织中的凝血因子

凝血因子	中文名	相对分子质量	合成部位	血浆浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	半衰期/ h	功能
I	纤维蛋白原	340 000	肝	200 ~ 700	90	结构蛋白
II	凝血酶原	72 000	肝	200	60	蛋白酶原
III	组织因子	45 000	组织、内皮、单核细胞	0		辅助、启动因子
IV	Ca^{2+}	330 000	肝	40 ~ 50	12 ~ 36	辅因子
V	易变因子(前加速因子)	55 000	肝	5.0 ~ 10	6 ~ 8	辅因子
VII	稳定因子	2 000 000	肝、内皮细胞	2.0	12	蛋白酶原
VIII	抗血友病球蛋白	57 100	肝	10 ~ 20	12	辅因子
IX	血浆凝血活酶成分(Christmas成分)	59 000	肝	3 ~ 4.0	48 ~ 72	蛋白酶原
X	Stuart - Prower 因子	160 000	肝	6 ~ 8.0	48 ~ 84	蛋白酶原
XI	血浆凝血活酶前体	80 000	肝	4.0	48 ~ 52	蛋白酶原
XII	Hageman 因子	300 000	骨髓	30	(3 ~ 5)d	蛋白酶原
XIII	纤维蛋白稳定因子	85 000	肝	25	35	转谷氨酰胺酶原
	前激肽释放酶	120 000	肝	15 ~ 50	6.5 d	蛋白酶原
	高相对分子质量激肽原			25		辅因子

所有凝血因子除因子XIII、III外,都合成于肝,除因子IV外,都是糖蛋白。它们有些是丝氨酸蛋白酶的底物,如因子II、V、VII、VIII、XIII是凝血酶的底物;有些是酶的辅助因子,例如因子III、V、VIII和高分子量激肽原。

因子 XI、XII、PK 和 HMWK 在体外能被表面带负电荷的物质激活,并通过接触激活其他凝血因子。因子 III 是各种组织细胞合成的一种跨膜脂蛋白,又称组织因子(tissue factor,TF),不存在于血浆中。其氨基末端 1~219 氨基酸残基在膜的细胞外侧,形成因子 VII 的受体。组织损伤时,血液与组织细胞接触,因子 VII 与 TF 结合,而被激活。

凝血因子 II、VII、IX、X 合成以后,其 N 末端某些谷氨酸残基需要 γ -羧化修饰才能成熟。催化谷氨酸残基 γ -羧化的 γ -羧化酶以维生素 K 为辅助因子,故因子 II、VII、IX、X 是依赖维生素 K 的凝血因子。 γ -羧化谷氨酸残基的侧链在生理条件下带两个负电荷,通过盐键结合 Ca^{2+} 。在凝血时,这些凝血因子再通过 Ca^{2+} 结合到血小板上,形成多酶复合物,在凝血过程中起着关键作用。缺乏维生素 K,或没有 γ -羧基谷氨酸残基,这四个凝血因子则没有凝血活性,并可导致疾病发生。

(二) 血液凝固途径

血液凝固有内源性和外源性两条不同的途径,它们的区别仅在于启动方式和参与启动的凝血因子不同(图 20-2)。这两个途径分别将因子 X 被活化后便共用一个途径,最后将纤维蛋白原转化为纤维蛋白。

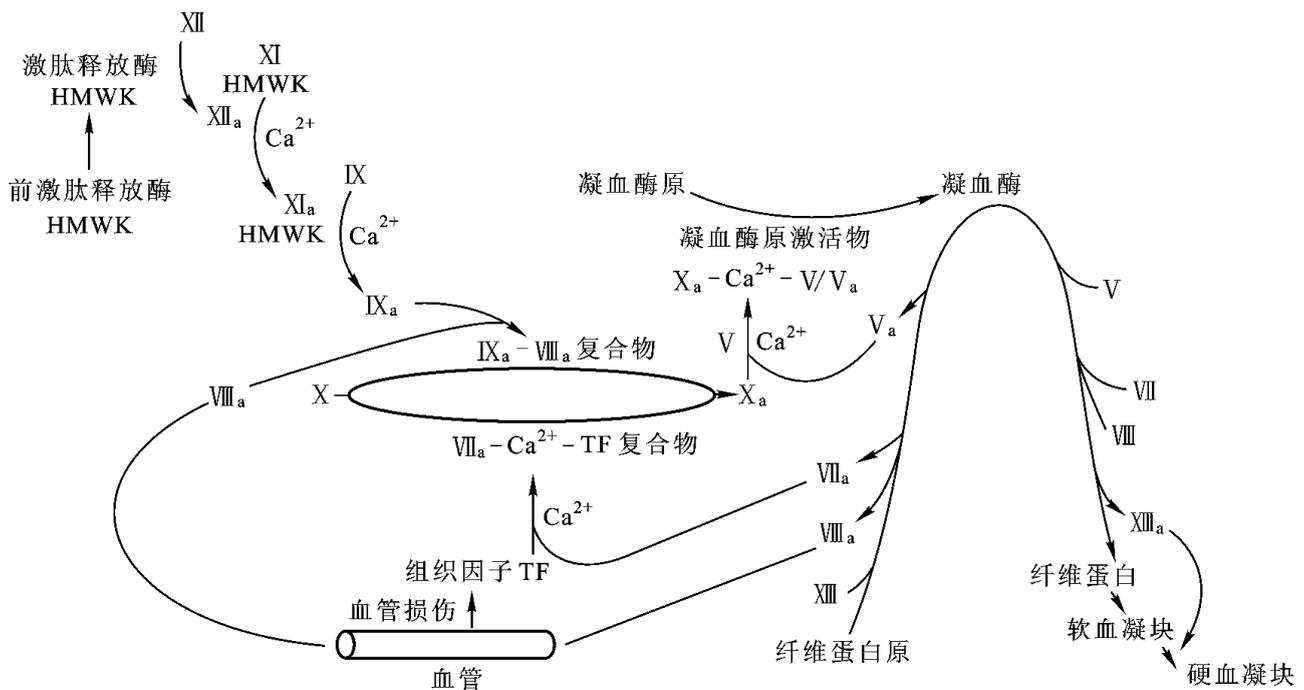


图 20-2 血液凝固途径

1. 内源性途径

血液在受损的血管内膜或在血管外与异物表面接触而触发的凝血过程称为血液凝固的内源性途径(intrinsic pathway)。参与该途径的凝血因子全部存在于血浆中。

血管内皮损伤暴露出阴离子膜表面。血浆与阴离子表面接触时,因子 XII 直接与阴离子表面一些区域结合,发生变构激活,酶的活性可增加万倍以上。高相对分子质量激肽原(HMWK)可分别与前激肽释放酶原和因子 XI 结合,生成前激肽释放酶原-HMWK 和 XI-HMWK 复合物,并将其携带到受损的表面。在损伤的膜表面,变构激活的 XIIa(活化的因子均在因子的罗马字母后加 a 表示)分别催化前激肽释放酶原、高相对分子质量激肽原和因子 XI 水解生成激肽释放酶、高相对分子质量激肽酶和因子 XIa。前两者还可反馈激活因子 XIIa 的生成。因子 XI、XII、激肽释放酶原、高相对分子质量激肽原等在带负电荷的表面被转变成有活性的 XIa、XIIa、激肽释放酶、高相对分子质量激肽酶的过程称为接触活化,均属于酶原的激活。

XIa 激活因子 IX 成 IXa;IXa 在有 VIIIa 存在的情况下,激活因子 X 生成 Xa。从接触阴离子表面后初步活化的因子 XII 和前激肽释放酶到生成 Xa,共有四步酶促反应。Xa 催化凝血酶原生成凝血酶需要因子 Va 作辅助因子,凝血酶水解纤维蛋白原生成可溶性纤维蛋白。凝血酶对因子 VIII 和因子 V 具有激活作用。最后,被凝血酶激活的因子 XIIIa 催化可溶性纤维蛋白分子共价交联成不溶性纤维蛋白多聚体。

因子Ⅷ在血浆中与一种叫 von Willebrand 因子(vWF)的蛋白质结合而运输。因子Ⅷ被凝血酶激活生成Ⅷa 后,与 vWF 分离。因子Ⅷ缺乏可导致血友病 A(hemophilia A)。

凝血过程中具有多种酶催化的级联反应,具有放大效应。例如,如果每个酶激活 100 个催化下一步反应的酶,则前四步反应就可以将酶促反应放大 10^6 倍。再加上某些产物反馈促进作用,可大大加速纤维蛋白的形成。

2. 外源性途径

组织因子与血液接触而启动的凝血过程称为血液凝固的外源性途径(extrinsic pathway)。参与该途径的凝血因子部分由组织进入血液。正常情况下,组织因子不能接触到血液。只有血管受到损伤和血管内皮细胞、单核细胞受到某些刺激时,组织因子才能与血液接触。在 Ca^{2+} 存在的情况下,血液中的因子Ⅶ与组织因子结合,形成少量 $Ca^{2+} - TF - VII$ 复合物。复合物中的因子Ⅶ可被血液中微量的 X_a 激活,转变成 $Ca^{2+} - TF - VII_a$ 复合物。因子Ⅶ也可被此后生成的凝血酶激活。 $Ca^{2+} - TF - VII_a$ 复合物催化因子 X 转变成 X_a 。

无论内源性还是外源性途径,凝血过程都是在损伤部位的膜表面启动,共同部分是因子 X 被切除 145 ~ 151 的 6 肽,转变成 X_a ,参与形成凝血酶原激活复合物($X_a - Ca^{2+} - V_a$)。凝血酶原的 N-末端区域含有 10 个 γ -羧基谷氨酸残基。这些残基结合 Ca^{2+} ,促进与损伤部位膜表面结合和 $X_a - Ca^{2+} - V_a$ 复合物的形成。 $X_a - Ca^{2+} - V_a$ 复合物先后水解凝血酶原的 320 位、284 位精氨酸残基构成的肽键,使只含一条多肽链的凝血酶原转变成含有两条多肽链的凝血酶。两条多肽链之间通过二硫键相连接(图 20-3)。

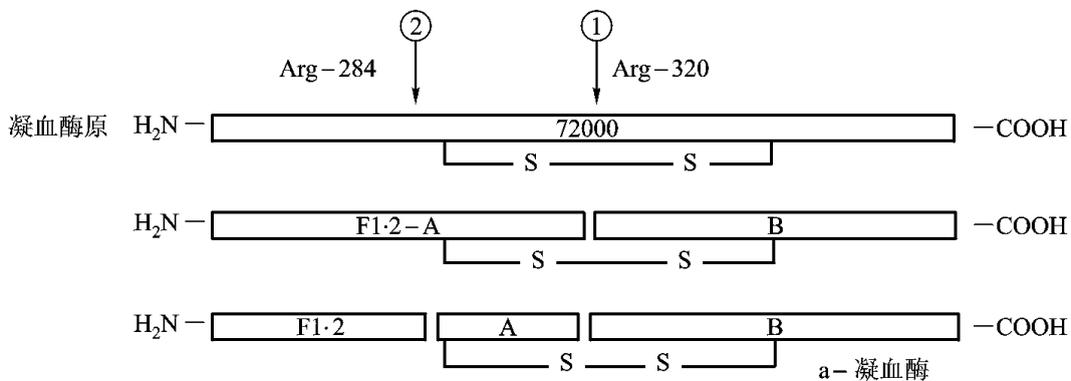


图 20-3 凝血酶原激活示意图

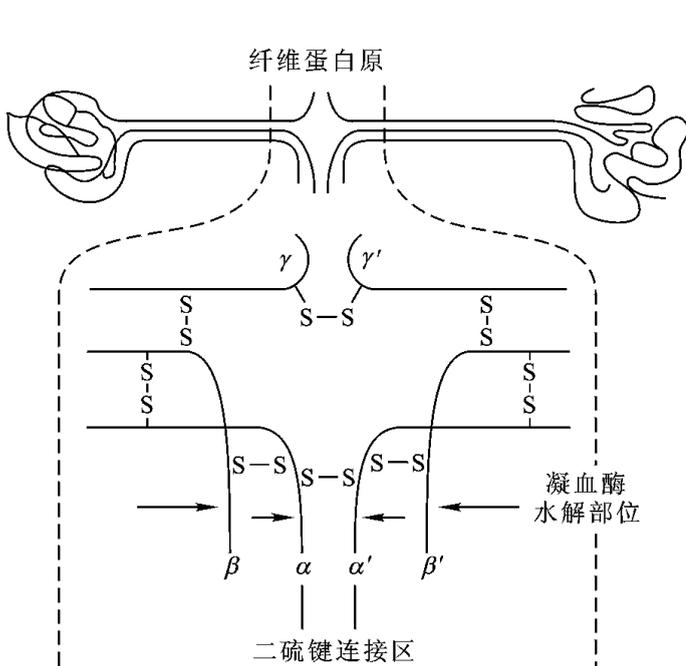


图 20-4 纤维蛋白原分子的结构

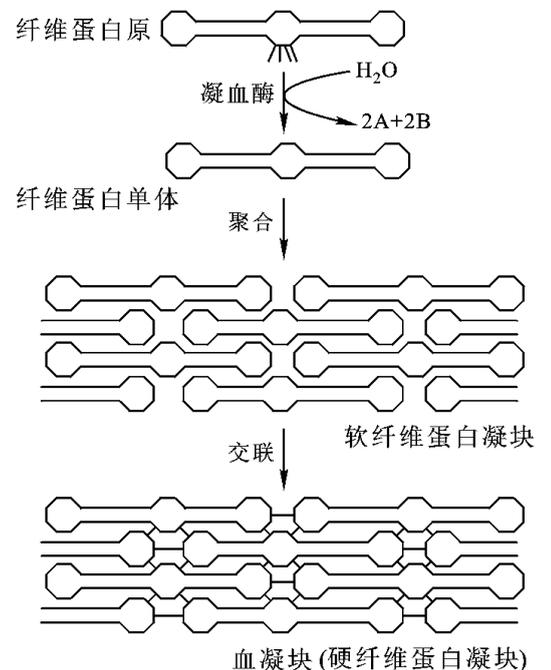


图 20-5 纤维蛋白原形成血凝块

凝血酶催化纤维蛋白原转变成纤维蛋白丝状物,网住血小板、血细胞和血浆形成血凝块。纤维蛋白原由3对多肽链(α 、 β 、 γ 肽链各2条)组成。这些肽链的N-末端区域通过二硫键连接,形成两端和中间三个球形结构域,这些球形结构域之间是棒状结构域。中间的球形结构域是肽链的连接区。N-末端伸出球形结构域外(图20-4)。两个 α 亚基、两个 β 亚基的N-末端区域由于同种电荷的排斥,防止纤维蛋白原的聚集。凝血酶水解去掉了纤维蛋白原的两个 α 亚基和两个 β 亚基的N-末端肽段,生成可溶性纤维蛋白。可溶性纤维蛋白分子之间没有同种电荷的排斥,可以聚集成纤维蛋白凝块(图20-5)。

因子XIIIa催化纤维蛋白中一条肽链的谷氨酰胺残基的 δ -酰胺基和另一条链的赖氨酸残基的 ϵ -氨基反应,释放一分子氨,形成共价的异肽键,使血凝块更加牢固和稳定(图20-6)。血小板来源和血浆来源的因子XIII都是转谷氨酰胺酶原(protransglutaminase)。在凝血酶的催化下,被水解激活。

(三) 抗凝血物质

体内存在许多抗凝物质,它们通过和蛋白酶形成复合物抑制蛋白酶的活性,从而抑制血液凝固。现将主要的抗凝物质介绍如下:

1. 抗凝血酶III

抗凝血酶III(Antithrombin III,AT III)是单链糖蛋白,主要由肝合成,抑制凝血酶和Xa的活性,同时也可抑制因子IXa、XIa、XIIa、纤溶酶、尿激酶、胰蛋白酶和激肽释放酶的活性。抗凝血酶III占血浆总抗凝血活性的80%左右。抗凝血酶III可以直接与凝血酶结合,也可先与肝素结合成复合物,再与凝血酶结合形成三元复合物。其抑制作用比AT III单独作用时高出9 000倍。

2. 组织因子途径抑制物

组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor,TFPI)是相对分子质量为32 000的蛋白质,通常与血浆脂蛋白结合。它能特异地与外源性凝血途径的TF-VIIa-Ca²⁺-Xa复合物相互作用,抑制其活性,从而抑制外源性凝血途径。

3. α_2 -巨球蛋白

α_2 -巨球蛋白(α_2 -macroglobulin)是肝细胞合成的二聚体球蛋白,相对分子质量360 000。它抑制正常存在于血液中大约1/4的凝血酶活性;此外,它还与几种具有蛋白水解酶性质的凝血因子结合,抑制其蛋白水解作用。但 α_2 -巨球蛋白本身不是蛋白酶,不能水解蛋白质。

4. 蛋白C和蛋白S

蛋白C(protein C,PC)是一种蛋白酶原,蛋白S(protein S,PS)是其辅助因子,两者都含 γ -羧基谷氨酸残基,需要维生素K参与其合成。PC被膜结合的凝血酶-凝血调节素(thrombomodulin)-Ca²⁺复合物激活。活化的PC在PS参与下,水解Va和VIIIa分子中某些位置的精氨酸构成的肽键,将其灭活,从而抑制

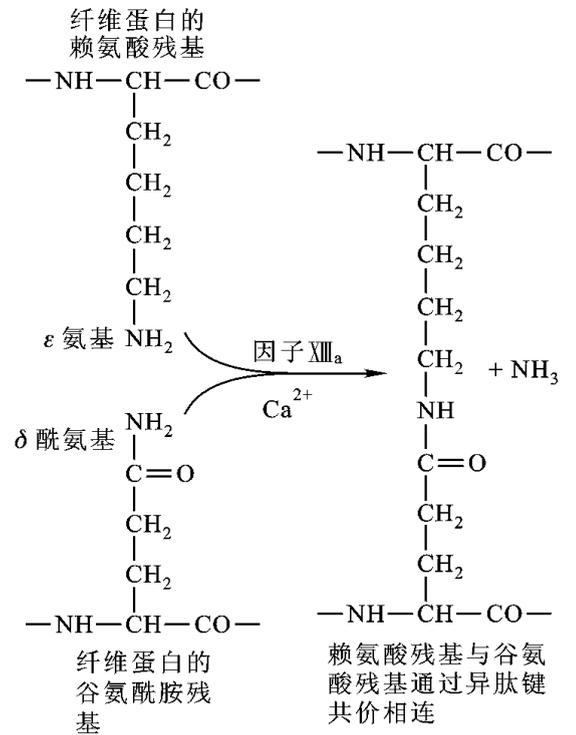


图20-6 因子XIII催化纤维蛋白的交联

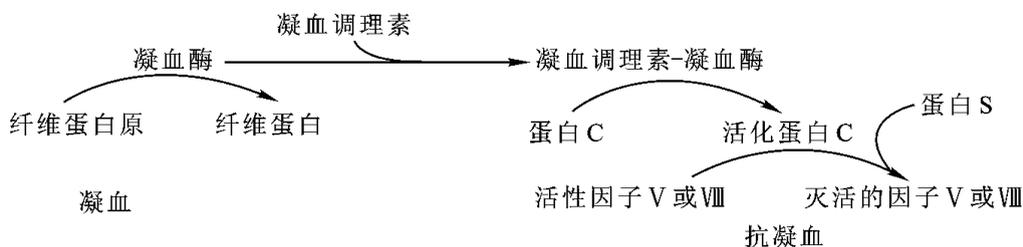


图20-7 凝血酶的变构效应对纤维蛋白原及蛋白C的作用

凝血。可见,凝血酶具有凝血和抗凝血的双重作用(图 20-7)。蛋白 C 和蛋白 S 缺乏或者突变可导致血栓性疾病。

5. 蛋白 Z

蛋白 Z (protein Z, PZ) 是含 γ -羧基谷氨酸残基的血浆糖蛋白,它没有蛋白酶的功能。它可与血浆中的依赖蛋白 Z 的蛋白酶抑制剂 (protein Z dependent protease inhibitor, ZPI) 形成复合物。该复合物能特异地抑制 X_a 的活性。

二、纤维蛋白溶解

血液中经常有少量纤维蛋白形成并附着于血管内皮细胞表面;血管内皮细胞损伤脱落、或血管破损后,局部血管内极易形成血栓,两者均需要不断地加以清除,才能避免阻断血液循环,保证血流通畅。在纤维蛋白溶解(纤溶)系统中,纤溶酶原(Plasminogen)被纤溶酶原激活剂活化成纤溶酶(Plasmin),纤溶酶水解血凝块中的纤维蛋白而使血凝块溶解。

纤溶酶原中肝合成的含 790 氨基酸残基的单链糖蛋白,血浆浓度为 $1.5 \sim 2.0 \mu\text{mol/L}$,半衰期约 5 min。纤溶酶原可被组织纤溶酶原激活剂所激活,生成纤溶酶。纤溶酶水解纤维蛋白中由精氨酸或赖氨酸残基的羧基所形成的肽键,使纤维蛋白凝块溶解(图 20-8)。

组织纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, t-PA) 是含 530 个氨基酸残基的单链糖蛋白,主要由血管内皮细胞合成、释放。t-PA 的半衰期约为 5 min,肝是清除 t-PA 的主要器官。当血管内出现纤维蛋白和血栓时, t-PA 能有效地激活纤溶酶原,形成纤溶酶,水解局部的纤维蛋白和血栓。

此外,血液中还存在纤溶酶原激活物抑制剂 (plasminogen activator-inhibitor),能特异地、迅速地与人 tPA 反应,抑制其活性。

体内的凝血和纤溶相互制约,保持动态平衡。如果此平衡被破坏,就会出现出血或者血栓形成。

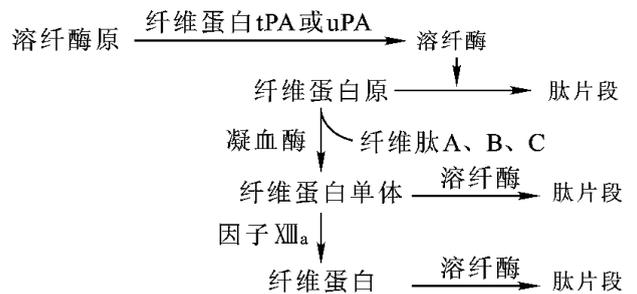


图 20-8 纤溶酶原的激活及纤溶酶的作用

第三节 血细胞的代谢特点

一、红细胞的代谢

红细胞是血液中数目最多的细胞。成熟红细胞没有细胞核、线粒体、溶酶体、过氧化酶体、高尔基体等细胞器,主要利用葡萄糖的酵解供能。血循环中的红细胞每天大约分解 30 g 葡萄糖,其中经糖酵解途径代谢占 90%~95%,磷酸戊糖途径代谢占 5%~10%。

(一) 糖代谢

1. 糖酵解

糖酵解是红细胞获得能量的唯一途径。红细胞内 ATP 的浓度维持在 $1.85 \times 10^3 \text{ mol/L}$ 。红细胞 ATP 的主要作用是① 维持其膜上的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 的正常功能,保持细胞内的正常的离子浓度;② 参与磷酸化葡萄糖,启动糖酵解;③ 为膜脂质与血浆脂蛋白中的脂质交换供能;④ 参与谷胱甘肽、 NAD^+ 等物质的合成。

2. 2,3-二磷酸甘油酸支路

糖酵解途径中的 1,3-二磷酸甘油酸 (1,3-BPG),在二磷酸甘油酸变位酶催化下生成 2,3-二磷酸

甘油酸(2,3-BPG)再经2,3-BPG磷酸酶催化,水解生成3-磷酸甘油酸。糖酵解途径中的这一条支路称为2,3-BPG支路(图20-9)。正常情况下,葡萄糖经2,3-BPG支路酵解的仅占糖酵解总量的15%~50%。2,3-BPG磷酸酶催化能力低,2,3-BPG分解缓慢,红细胞内2,3-BPG生成大于分解,保持较高水平的2,3-BPG,其浓度约为 4.5×10^{-3} mol/L,几乎与Hb浓度相等。红细胞内无糖原贮备,随着葡萄糖的不断降解,2,3-BPG可成为红细胞的能源。但2,3-BPG的主要功能是调节血红蛋白与O₂结合的能力。

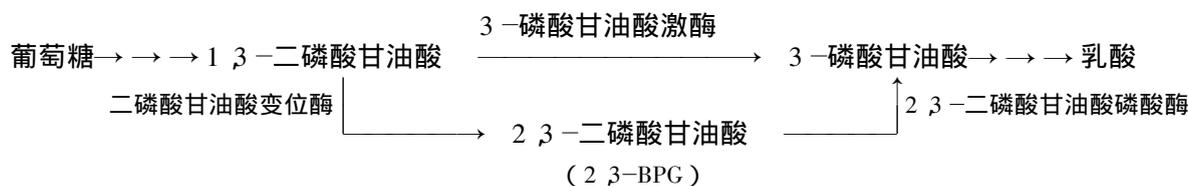


图20-9 2,3-BPG支路

2,3-BPG分子带有5个负电荷,负电性很高,能进入脱氧血红蛋白分子对称中心的空穴,以1:1的比例和空穴侧壁的2个β-亚基上的正电基团形成盐键,紧密结合。结合了2,3-BPG的脱氧血红蛋白分子处于紧张状态(T态),对氧的亲合力降低,表明2,3-BPG对Hb与O₂的结合具有抑制作用。这样,当血液流入组织时,2,3-BPG就能显著地促进的红细胞中HbO₂释放O₂,供组织需要。正常人从低海拔地区进入海拔数千米的高原时,高原氧气稀薄,红细胞内糖酵解增强,红细胞内2,3-BPG水平迅速增加。2,3-BPG的升高降低Hb与O₂的亲合力,使HbO₂在组织中释放出更多O₂以适应机体的需要。胎儿HbF(α₂γ₂)比成人HbA(α₂β₂)对O₂的亲合力高。这是因为HbFγ链143位为丝氨酸残基(β链143位是组氨酸残基)。在生理条件下,丝氨酸残基侧链不带电荷,HbF分子中两条γ链不能与2,3-DPG形成盐键;HbF比HbA对2,3-DPG的亲合力低,这样胎儿HbF容易从母体HbA₂O₂夺取O₂,保证胎儿对氧的需要。

3. 磷酸戊糖途径

磷酸戊糖途径产生的NADPH可保护膜、酶等免遭氧化损伤。红细胞运输O₂,血红素的Fe²⁺是与O₂结合的部位,它若被氧化成Fe³⁺,而失去结合O₂的能力。此外,红细胞膜和胞内的酶易受氧化损伤,可导致溶血和代谢障碍,这些都影响红细胞的运O₂功能。红细胞内的谷胱甘肽(GSH)可保护酶、细胞膜、Fe²⁺免受氧化的同时,自身被氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG)。GSSG可在谷胱甘肽还原酶催化下,由NADPH提供氢,还原成GSH,以维持红细胞内GSH的正常浓度。NADPH/NADP⁺的降低可刺激磷酸戊糖途径,加速NADPH的生成(图20-10)。

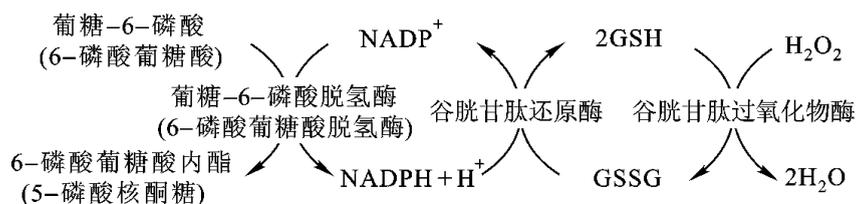


图20-10 谷胱甘肽的氧化还原

4. 血红蛋白的糖化

糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin)是红细胞内的血红蛋白与葡萄糖非酶催化生成的。血糖浓度越高,生成速率越快。糖化血红蛋白约占正常人血红蛋白总重的3%,有几种不同的类型,其中含量最高的是HbA_{1c}。HbA_{1c}β链N-端的缬氨酸残基的α-氨基共价结合了一分子葡萄糖。糖尿病患者空腹血糖持续在高水平,血红蛋白的糖化速率加快,生成的HbA_{1c}含量增加。目前已用血液的HbA_{1c}水平作为糖尿病诊断、监测病情、判断预后的一项指标。

(二) 脂代谢

红细胞缺乏合成脂质的酶系,不能以乙酰辅酶 A 为原料从头合成脂肪酸,也不能合成磷脂、胆固醇。但其膜脂质不断与血浆脂蛋白的脂质进行交换,以更新膜脂质,维持膜脂正常的组成、结构和功能。若膜脂质更新受阻,红细胞可塑性降低,易被破坏。

(三) 血红蛋白的合成与调节

红细胞中最主要的固体成分是血红蛋白,血红蛋白由珠蛋白和血红素组成。体内多种细胞内都能合成血红素,合成的血红素可分别作为肌红蛋白、细胞色素、过氧化物酶等的辅基。血红蛋白中血红素主要在骨髓的幼红细胞和网织红细胞中合成。

1. 血红素的生物合成

甘氨酸、琥珀酰 CoA 和 Fe^{2+} 是合成血红素的基本原料。合成的起始和终末阶段均在线粒体内,中间阶段在胞质内进行。多种因素可以调节血红素的生物合成。血红素生物合成可分为四个步骤。

(1) δ -氨基- γ -酮戊酸的生成 ALA 合酶(ALA synthase)催化琥珀酰辅酶 A 与甘氨酸在线粒体内缩合生成 δ -氨基- γ -酮戊酸(aminolevulinic acid, ALA),其辅酶是磷酸吡哆醛。ALA 合酶是血红素合成的限速酶,受血红素的反馈调节。

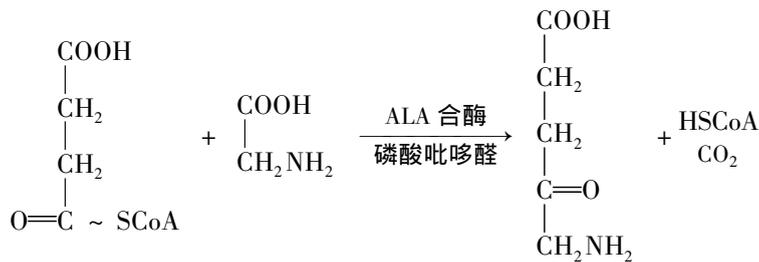


图 20-11 δ -氨基- γ -酮戊酸(ALA)的合成

(2) 胆色素原的生成 生成的 ALA 由线粒体进入胞液。在 ALA 脱水酶(ALA dehydratase)催化下 2 分子 ALA 脱水缩合生成 1 分子胆色素原(porphobilinogen, PBG)(图 20-12)。ALA 脱水酶含有巯基,铅等重金属的对其有抑制作用。

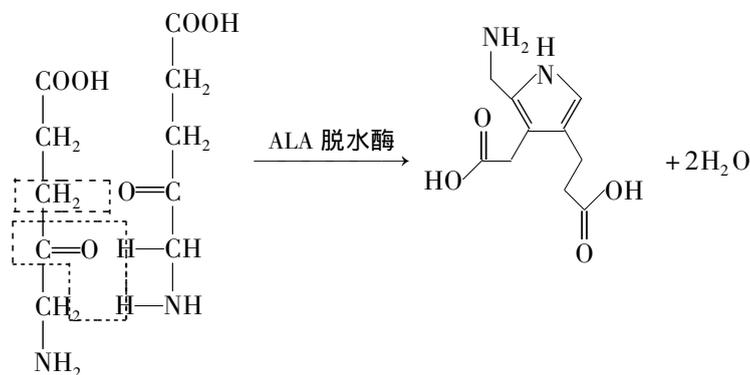


图 20-12 胆色素原的生成

(3) 粪卟啉原的生成 在胞液中,胆色素原脱氨酶催化 4 分子胆色素原生成线状四吡咯。尿卟啉原 III 同合酶(cosynthase)、尿卟啉原 III 脱羧酶依次催化线状四吡咯生成尿卟啉原、尿卟啉原生成粪卟啉原 III。

(4) 血红素的生成 粪卟啉原 III 再从胞液进入线粒体,在粪卟啉原 III 氧化脱羧酶和原卟啉 IX 氧化酶催化下,侧链氧化生成原卟啉 IX(protoporphyrin IX)。血红素合成酶即亚铁螯合酶(ferrochelatase)催化原卟啉 IX 与 Fe^{2+} 结合生成血红素。铅等重金属对亚铁螯合酶有抑制作用。生成的血红素从线粒体转运到胞液,在骨髓的有核红细胞及网织红细胞中,与珠蛋白(globin)结合成血红蛋白。血红素合成的全过程见图 20-13。血红素合成的特点可归结如下:① 体内大多数组织细胞均有合成血红素的能力,但主要是骨髓与肝。成熟红细胞无线粒体,不能合成血红素;② 琥珀酰辅酶 A、甘氨酸及 Fe^{2+} 等小分子物质是合成

血红素的原料。合成途径的中间反应主要是吡咯环侧链脱羧和脱氢；③ 血红素合成的第一步反应和最后两步反应在线粒体中进行，其他反应则都在胞液中进行，这对血红素的反馈调节作用具有重要意义。关于中间产物进出线体的机制，目前尚不清楚。

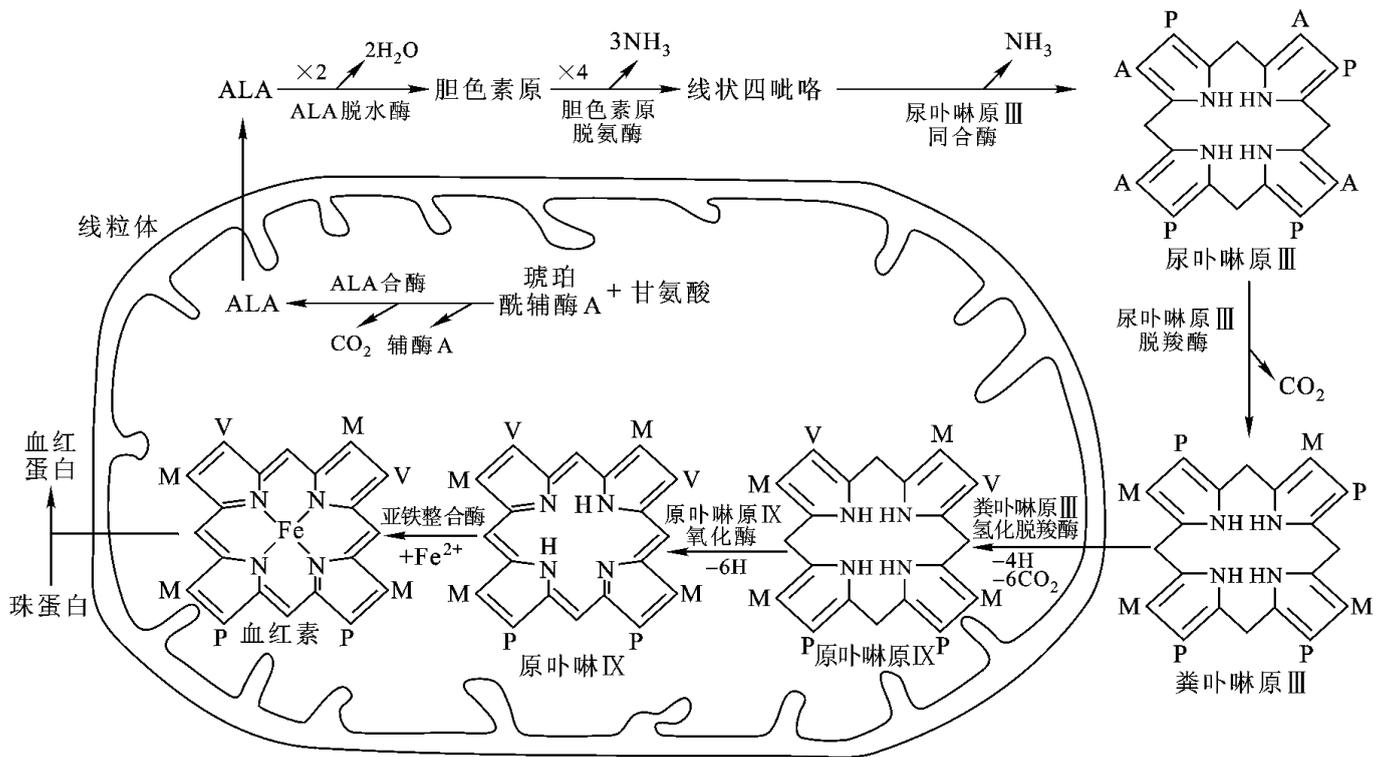


图 20-13 血红素的生物合成

2. 血红素合成的调节

多种因素可调节血红素的合成，但对 ALA 的生成的调节是最主要的环节。

(1) 对 ALA 合酶的调节 ALA 合酶是血红素合成途径的限速酶，其调节包括酶活性和酶量的调节。酶活性受游离血红素的变构抑制。ALA 合酶的辅基是磷酸吡哆醛，缺乏维生素 B6 将减少血红素的合成。正常情况下，合成的血红素迅速与珠蛋白结合成血红蛋白，如果血红素分子多于珠蛋白分子，游离血红素被氧化，生成高铁血红素，对 ALA 合酶活性也具有强烈抑制作用。

血红素还与细胞内的一种蛋白质结合成一种血红素蛋白，该蛋白质抑制 ALA 合酶的 mRNA，因而抑制 ALA 合酶的合成。

睾丸酮的 5-β 还原物、致癌剂、药物（磺胺、苯妥英钠等）和杀虫剂等都能诱导 ALA 合酶的合成，从而促进血红素的生成。

(2) 铅和重金属抑制 ALA 脱水酶、尿卟啉原同合酶、亚铁螯合酶。它们虽非血红素合成的限速酶，但铅和重金属中毒时，这些酶的活性明显减低，血红素合成下降。另外，亚铁螯合酶的活性需要有还原剂（如还原型谷胱甘肽）的存在，缺乏还原剂也会抑制血红素的合成。

(3) 促红细胞生成素（erythropoietin, EPO）在肾合成，缺氧时释放入血。EPO 与原始红细胞膜受体结合，促使原始红细胞血红素和血红蛋白的合成，进而促进红细胞的增殖、分化和成熟。EPO 是红细胞增殖、分化和成熟的主要调节剂。

卟啉或其中间代谢物在体内积聚和排出增多，称为卟啉症（porphyria）。先天性卟啉症是血红素合成途径中的某种酶遗传性缺陷所致；后天性卟啉症则由铅中毒或某些药物中毒引起。无论先天性是后天性，共同的特点是铁卟啉合成障碍。

二、白细胞的代谢

人体白细胞由粒细胞、淋巴细胞和单核吞噬细胞三大系统组成,主要功能是对抗侵入机体的各种细菌、病原体。白细胞的代谢与白细胞的功能密切相关。

(一) 糖代谢

由于粒细胞的线粒体很少,中性粒细胞主要通过酵解外源性的单糖和内源性的糖原提供能量,满足吞噬作用的需要。在中性粒细胞中,约有10%的葡萄糖通过磷酸戊糖途径进行代谢。单核吞噬细胞的糖代谢与中性粒细胞相似,其糖原贮备较少,主要利用葡萄糖酵解供能。单核吞噬细胞和中性粒细胞被趋化因子刺激后,细胞内磷酸戊糖途径被激活,产生大量的 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 。 $\text{NADPH} + \text{H}^+$ 经NADPH氧化酶递电子体系可使 O_2 接受单个电子而被还原,产生大量的超氧阴离子自由基(O_2^-)。超氧阴离子自由基再进一步转变成 H_2O_2 和 OH^- 等自由基,起杀菌作用。NADPH氧化酶递电子体系的成分包括NADPH氧化酶、细胞色素b₅P450和胞液多肽等。

(二) 脂代谢

中性粒细胞缺少乙酰辅酶A羧化酶,不能从头合成脂肪酸。中性粒细胞、单核吞噬细胞受多种刺激因子激活后,在脂氧化酶的作用下,可将花生四烯酸转变成白三烯,后者是炎症和过敏反应中的活性物质。单核吞噬细胞还能利用花生四烯酸生成血栓烷和前列腺素。

(三) 蛋白质和氨基酸代谢

单核巨噬细胞能合成和分泌多种蛋白质,包括酶、补体和各种细胞因子。其中合成分泌最多的是溶菌酶(lysozyme)。白细胞中的内质网结构偏少,蛋白质合成不活跃,但细胞内的氨基酸代谢,尤其是组氨酸脱羧酶催化组氨酸脱羧生成组织胺的反应十分活跃,与白细胞参与变态反应有关。

Summary

Blood consists of red blood cells, white blood cells and platelets suspended in a liquid medium, the plasma. Plasma consists of water, inorganic chemicals and organic chemicals including proteins, lipids, carbohydrates, and non-protein nitrogen-containing compounds.

The protein comprises the major part of the solid components in plasma. Most plasma proteins are synthesized in liver, and almost all of them are glycoproteins except albumin, which is the main protein and the principal determinant of intravascular colloid osmotic pressure. Many plasma proteins exhibit polymorphism, and each plasma protein has a specific half-life in blood circulation. The serum protein can be separated into 5 bands designated albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin, and γ -globulin respectively according to their electrophoresis on cellulose acetate membrane.

Plasma has many functions, such as maintaining normal osmotic pressure and pH, transportation, immunological defense, catalysis, blood clotting, anticoagulation and fibrinolysis.

As a result of various types of damages in blood vessel, blood leaks from the blood vessel, which is called bleeding. Blood clotting in the site of damage is initiated, speeds up, and forms blood clot to stop bleeding. The process of clot formation is in balance with the process of preventing clot formation and blood clot dissolution. Blood clot formation is the cascade of reactions catalyzed by a series of proteases. As a result, the fibrinogen is changed into fibrin by thrombin. There are two blood coagulation pathways, intrinsic pathway and extrinsic pathway. The pathways converge at factor Xa. As soon as blood coagulates, anticoagulation and fibrinolysis are activated. An important nature inhibitor of coagulation is antithrombin III. The fibrin is dissolved by plasmin. Plasmin exists as an inactive pre-

cursor plasminogen, which can be activated by tissue plasminogen activator (t-PA).

Because of mitochondria free, mature red blood cell has an unique and relatively simple metabolism. ATP is synthesized in glycolysis by substrate level phosphorylation. 2,3-bisphosphoglycerate is generated and regulates O_2 binding to hemoglobin. NADPH is produced in pentose phosphate pathway and plays an important role in antioxidation. Heme is an iron-porphyrin in which four pyrrole rings are joined by methenyl bridges. Biosynthesis of heme occurs in mitochondria and cytosol via eight enzymatic steps by using succinyl-CoA, glycine and Fe^{2+} as original materials. In heme biosynthesis, ALA synthase, the rate-limiting enzyme of the pathway, can be regulated.

The major biochemical features of white blood cells are active aerobic glycolysis, active pentose phosphate pathway, moderately active oxidative phosphorylation and a high content of lysosomal enzymes.

思 考 题

1. 血浆蛋白的分类和主要功能是什么？
2. 内源性凝血途径与外源性凝血途径有何异同？
3. 根据凝血因子的化学性质和功能,试将凝血因子进行分类。
4. 血液中有哪些抗凝血因子？各有什么功能？
5. 血液的纤溶系统含有哪些成分？是如何溶解纤维蛋白的？
6. 红细胞的代谢与其功能有何关系？
7. 血红素在体内是如何合成的？
8. 2,3-BPG 是如何生成的,其生理功能如何？
9. 白细胞的代谢与其功能有何关系？

(曾昭淳)

第二十一章 肝胆生物化学

本章教学要求

- 肝在糖、脂、蛋白质、维生素、激素等代谢中的作用
- 肝生物转化作用的类型和生理意义
- 胆汁酸的组成、生成、转化和生理作用
- 胆色素生成、转化、排泄和生理意义,黄疸

肝是人体最大的腺体,成人肝重约 1 500 g。肝具有复杂的代谢功能,它在人体糖、脂、蛋白质、维生素、激素等物质代谢中均起着重要的作用。此外,肝还有分泌、排泄、生物转化等方面的功能。肝所以能够完成如此复杂的功能,与其组织结构和化学组成特点密切相关。肝接受肝动脉和门静脉的双重血液供应,使得肝既可以从肝动脉的体循环血液中接受由肺及其他组织运来的氧气及代谢产物,又可以从门静脉的血液中获得大量的由肠道吸收的营养物质。肝还有丰富的血窦,肝动脉和门静脉入肝后经反复分支,形成小叶间动脉及小叶间静脉,最后均进入肝血窦。血窦使肝细胞与血液的接触面积扩大,血窦中血流速率减慢又使肝细胞有充足的物质交换时间。肝有两条输出通路:肝静脉与体循环相连,胆道系统与肠道相通,使肝的代谢废物可随胆汁排入肠腔。肝丰富的血液供应,独特的形态结构及组成特点,使其代谢十分活跃,肝细胞除了具备一般细胞所具有的代谢途径外,还具有一些特殊的代谢功能。

第一节 肝在物质代谢中的作用

一、肝在糖代谢中的作用

肝在糖代谢中的最重要作用是维持血糖浓度的相对恒定,从而确保全身各组织特别是大脑和红细胞的能量供应,肝维持血糖浓度的相对恒定是通过糖原合成、糖原分解和糖异生来实现的。

进食后,自肠道吸收进入门静脉血液中的葡萄糖浓度升高,肝细胞迅速摄取葡萄糖,并立即将其合成糖原贮存起来。每千克肝最多可贮存 65 g 糖原。从而保持体循环中相对恒定的血糖浓度。相反,在空腹时,血糖浓度下降,肝糖原即迅速分解为 6-磷酸葡糖,再由肝细胞中含量丰富的葡糖-6-磷酸酶催化,生成葡萄糖以补充血糖。肝含有丰富的葡糖-6-磷酸酶,肌肉中却无此酶活性,因此,肌肉中虽含大量的肌糖原,但其不能直接分解为葡萄糖。

一般在空腹十多小时后,肝糖原几乎被耗尽,此时糖异生便成为血糖的主要来源。肝含有丰富的糖异生酶类,能催化某些非糖物质,如甘油、乳酸、丙氨酸等异生成糖。禁食 24~48 h 后,肝糖异生可达最大速率。其主要原料生糖氨基酸来自肌肉蛋白质的分解。肝严重损伤时,往往易出现空腹低血糖现象,其耐糖能力也下降。饥饿状态下,肝还可将脂肪动员所释放的脂肪酸氧化成酮体,供大脑利用以节省葡萄糖,这也可间接的维持血糖浓度的相对恒定。

二、肝在脂质代谢中的作用

肝在脂质的消化、吸收、分解、合成及运输等代谢过程中均起重要的作用。

肝能分泌胆汁,胆汁可乳化脂质,促进脂质的消化和吸收。肝损伤时,肝细胞分泌胆汁的能力下降,胆道梗阻时,胆汁排出障碍,均可出现脂质消化不良,产生厌油腻及脂肪等临床症状。肝是脂肪酸 β -氧化的重要场所,饥饿时肝摄取脂库脂肪动员所释放的脂肪酸,此时,肝内脂肪酸氧化甚为活跃。肝也是酮体生成的重要场所,肝能合成酮体,但不能氧化利用酮体,必须由血液运至肝外,如脑组织等氧化利用。饱食后,肝能利用糖及某些氨基酸合成三酰甘油、磷脂和胆固醇,并以VLDL的形式分泌入血,供肝外组织、器官摄取利用。当肝合成三酰甘油的量超过其合成与分泌VLDL的能力,三酰甘油便堆积在肝内,造成脂肪肝。

肝是人体中合成胆固醇最旺盛的器官,肝合成的胆固醇占全身合成胆固醇总量的80%以上,是血浆胆固醇的主要来源。肝也是胆固醇的重要排泄器官,肝可将胆固醇转化为胆汁酸,随胆汁排入肠腔。肝还合成并分泌磷脂酰胆碱、胆固醇脂酰基转移酶(LCAT)。肝严重损伤时,不仅影响胆固醇的合成而且影响LCAT的生成,故除可出现血浆胆固醇下降外,血浆胆固醇酯的降低往往出现得更早、更明显。

肝磷脂的合成非常活跃。尤其是磷脂酰胆碱,如果磷脂的合成发生障碍,就会影响VLDL的合成和分泌,造成脂肪运输障碍而导致肝中脂肪堆积,肝合成磷脂酰胆碱需要胆碱或作为甲基供体的蛋氨酸,所以食物中的胆碱或蛋氨酸可防止脂肪肝。

肝是LDL降解的主要器官,肝细胞膜上有LDL受体,能特异的结合LDL,并将其吞入肝细胞内降解。HDL也是肝细胞合成的。肝细胞合成的载脂蛋白C-II可激活毛细血管内皮细胞脂蛋白脂肪酶,进而水解脂蛋白中的三酰甘油。

肝是脂肪酸碳链长短的加工和饱和度改造的重要场所。

三、肝在蛋白质代谢中的作用

肝在人体蛋白质合成和分解代谢中均起重要作用。

肝中蛋白质更新速率远远高于肌肉等组织。肝除合成自身固有蛋白质外,还可合成与分泌血浆蛋白质。除 γ -球蛋白外,几乎所有的血浆蛋白质均来自肝。血浆脂蛋白所含的多种载脂蛋白(apoA、B、C、E等)也是在肝合成的。

血浆清蛋白是体内各组织合成自身所需蛋白质的原料,成人肝每日可合成12g清蛋白,几乎占肝合成蛋白质总量的1/4。肝细胞严重受损时,血浆清蛋白由于合成减少而浓度降低,A/G比值下降,甚至倒置。此种变化可作为肝病的辅助诊断指标。胚胎期肝可合成结构与清蛋白相近的胎儿甲种球蛋白(α -fetoprotein),此种蛋白被认为是血浆清蛋白的胚胎型。胎儿出生后其合成受到抑制,正常人血浆中很难检出。肝癌时,癌细胞中胎儿甲种球蛋白基因的表达失去阻遏,血浆中可能再次检出此种蛋白质,对肝癌诊断有一定价值。

凝血因子大部分是肝合成的,所以肝细胞严重受损时,可出现凝血时间延长及出血倾向。

肝也是清除血浆蛋白质(除清蛋白外)的重要器官。肝细胞膜有特异的受体可识别某些血浆蛋白质(如铜蓝蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶等)而将其吞入肝细胞内,在溶酶体中降解。

肝富含有关氨基酸代谢的酶,如转氨酶、脱羧酶等,是体内氨基酸分解和转变的重要场所,当肝细胞受损时,细胞内酶逸出,致使血浆中酶活性升高,临床检测血浆中某些酶的活性增高可作为诊断肝疾病的指标。

肝的一个重要功能是将有毒的氨通过鸟氨酸循环合成无毒的尿素。严重肝病患者,肝合成尿素的能力下降,血氨升高是肝性脑病发病的指征之一。

肝也是胺类物质的重要解毒器官,肠道细菌对芳香族氨基酸的脱羟基作用可产生苯乙醇胺、酪胺等,在正常人体内经肝内单胺氧化酶作用被氧化分解而清除。严重肝病患者,这些芳香胺类得不到及时清除,通过血脑屏障进入脑组织,羟化后生成苯乙醇胺和羟酪胺作为假神经递质,可取代正常神经递质,引起中枢神经系统活动紊乱。

四、肝在维生素代谢中的作用

肝在维生素的吸收、贮存、运输、转化等方面起重要作用。

肝是体内含维生素(A、K、B₁、B₂、B₆、B₁₂、泛酸和叶酸)较多的器官,人体内维生素A、E、K及B₁₂主要贮存在肝,肝中维生素A的含量占体内总量的95%。肝还可以合成维生素D结合球蛋白和视黄醇结合蛋白,通过血液循环运输维生素D与维生素A。

肝分泌胆汁酸,可促进脂溶性维生素A、D、E、K的吸收。维生素K参与肝细胞中凝血酶原及凝血因子Ⅶ、Ⅸ及Ⅹ的合成,故维生素K吸收障碍会出现出血倾向。

肝还参与多种维生素的转化。例如,将胡萝卜素转变为维生素A,将维生素PP转变为辅酶I(NAD⁺)和辅酶II(NADP⁺),将维生素B₁转变为焦磷酸硫胺素等。维生素D₃羟化生成25-羟D₃也是在肝进行的。

五、肝在激素代谢中的作用

多种激素在发挥其调节作用后,主要在肝中被代谢,从而降低或失去其活性,此过程称激素的灭活。激素的合成与灭活处于动态平衡,使血液中激素水平总是维持相对恒定。

肝细胞表面具有某些水溶性激素(如胰岛素、去甲肾上腺素)的受体,可以特异地结合激素,通过内吞作用,将激素吞入细胞内进行分解代谢。一些类固醇激素可通过扩散作用进入肝细胞,与肝内的葡糖醛酸或活性硫酸等结合,失去其活性。严重肝疾病时,激素灭活功能降低,体内雌激素、醛固酮、抗利尿激素等水平升高,可出现男性乳房发育、蜘蛛痣、肝掌(雌激素有扩张小动脉的作用)以及水、钠潴留等现象。

第二节 肝的生物转化作用

一、生物转化的概念

人体内存在一些非营养性物质,它们既不能作为构建组织细胞的成分,又不能氧化供能,机体在排出这些物质以前,将其进行各种代谢转变,使其极性增强,水溶性增高,易于溶解在胆汁或尿液中排出体外。这一过程称为生物转化(biotransformation)。体内进行生物转化的非营养性物质分内源性和外源性两类,内源性物质是机体在代谢过程中产生的,如氨、胺、胆红素、激素、神经递质等,它们或者对机体有强烈的生物学活性,或者对机体有毒性;外源性物质有药物、毒物、食物添加剂、环境污染物和从肠道吸收来的腐败物质等。这些物质大部分是脂溶性的,均需经过生物转化排出体外,虽然生物转化在机体很多组织都可进行,但肝是机体生物转化最重要的器官。

通过生物转化大部分有毒物质的毒性减低或消除,所以过去曾将此种作用称为“解毒作用”(detoxification)。但有些物质经过肝生物转化后,虽然溶解性增加,其毒性反而增强,有的可能溶解性反而下降,不易排出体外。苯并芘本身没有直接致癌作用,但经过微粒体生物转化后便成为致癌物,可诱发细胞癌变。有些药物,如环磷酰胺、水合氯醛、大黄等需经肝的生物转化作用后才能成为有活性的药物,所以不能将生物转化作用简单的看作是“解毒作用”。

二、生物转化的反应类型

肝的生物转化包括氧化、还原、水解、结合四种反应。其中氧化、还原、水解属第一相反应,结合属第二

相反应。许多非营养物质经过第一相反应,其极性就可增强,即可大量排出体外;但有些物质经过第一相反应后极性改变不够大,必需再进行第二相反应,与某些极性更强的物质结合,增加溶解度才能排出体外。肝含有的生物转化酶类见表 21-1。

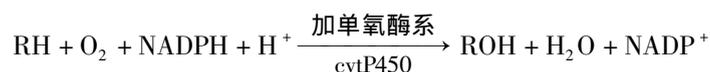
表 21-1 肝生物转化的酶类

酶 类	辅酶或结合物	细胞内定位
第一相反应		
氧化酶类		
加单氧酶系	NADPH + H ⁺ 、O ₂ 、P450	内质网
胺氧化酶	黄素辅酶	线粒体
脱氢酶类	NAD ⁺	胞液或线粒体
还原酶类		
硝基还原酶类	NADH + H ⁺ 、NADPH + H ⁺	内质网
偶氮还原酶类	NADH + H ⁺ 、NADPH + H ⁺	内质网
水解酶类		
脂类水解酶		胞液或内质网
酰胺水解酶		胞液或内质网
糖苷水解酶		胞液或内质网
第二相反应		
转葡糖醛酸酶	活性葡糖醛酸(UDPGA)	内质网
转硫酸酶	活性硫酸(PAPS)	胞液
谷胱甘肽转硫酶	谷胱甘肽(GSH)	胞液与内质网
乙酰基转移酶	乙酰 CoA	胞液
酰基转移酶	甘氨酸	线粒体
甲基转移酶	S-腺苷蛋氨酸	胞液与内质网

(一) 氧化反应

1. 加单氧酶系

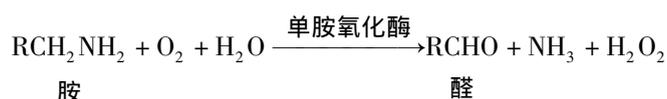
此酶存在于肝细胞的微粒体中,催化多种化合物(如药物、毒物和类固醇激素等)的芳香族环上和侧链烃基羟化,以及脂肪族烃链的羟化。加单氧酶又称羟化酶或混合功能氧化酶(见第七章 生物氧化)。该酶是肝参与药物、毒物代谢非常重要的酶类,此酶系有 NADPH-细胞色素 P450 还原酶参与。反应通式如下:



加单氧酶系的羟化作用不仅增加药物、毒物的水溶性,有利于排泄,而且参加体内许多物质的羟化过程。如维生素 D₃ 羟化成为具有生物学活性的维生素 D₃,参与胆汁酸、肾上腺皮质激素和性激素的合成等。此酶能诱导合成,如长期服用苯巴比妥安眠药的病人,由于诱导此酶的合成,使药物代谢速率加快,增加病人对异戊巴比妥、氨基比林等多种药物的耐受能力。

2. 单胺氧化酶系

单胺氧化酶(monoamine oxidase, MAO)存在于肝细胞的线粒体中,是一种黄素蛋白,蛋白质腐败作用产生的胺类物质,如组胺、酪胺、色胺、尸胺、腐胺等,以及一些拟肾上腺素能药物如 5-羟色胺、儿茶酚胺类等均可在单胺氧化酶作用下氧化脱氨基生成相应的醛类,使其丧失活性。



3. 脱氢酶系

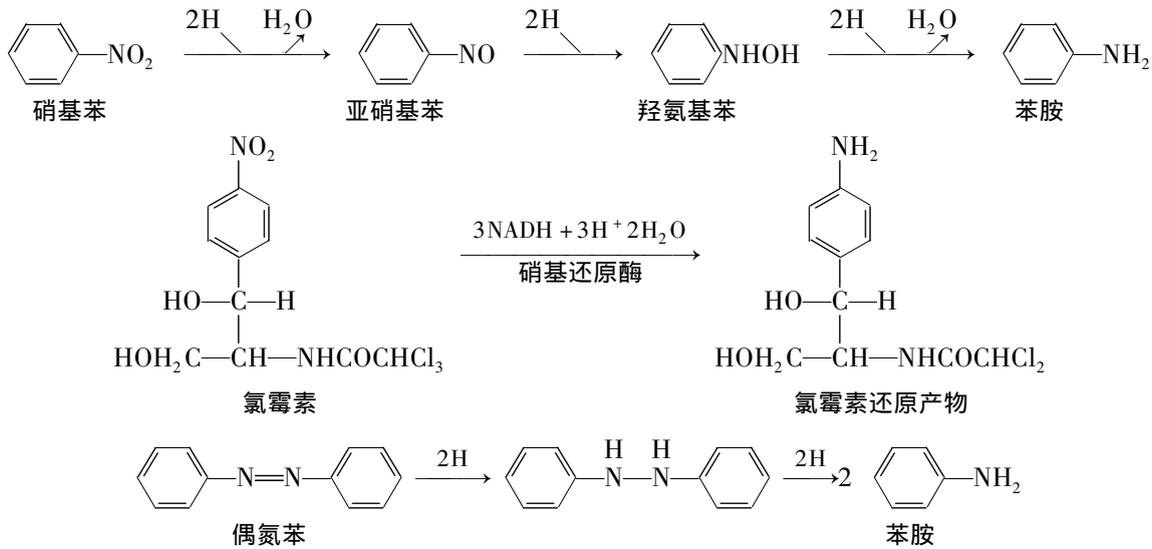
此酶存在于肝细胞胞质及线粒体中,以 NAD^+ 为辅酶,包括醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)和醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH),分别催化醇类和醛类氧化生成酸。



乙醇(alcohol)作为饮料和调味剂广为利用,人类摄入乙醇后可被胃、肠道迅速吸收。吸收后乙醇的90%~98%在肝代谢,剩余经肺和肾排出体外,大量饮酒除经ADH氧化外,还可诱导肝微粒体乙醇氧化系统(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)。MEOS是乙醇- P_{450} 加单氧酶,只有血中乙醇浓度很高时,才诱导此酶产生。乙醇诱导MEOS活性不但不能使乙醇氧化产生ATP,反而增加对氧和NADPH的消耗,造成肝内能量的耗竭,增加对肝的损害。

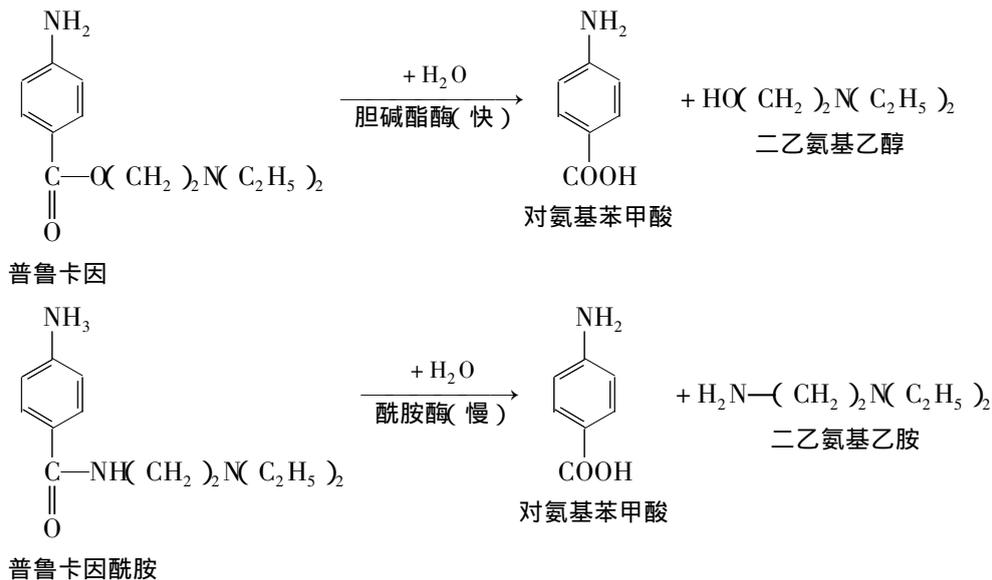
(二) 还原反应

肝细胞微粒体中含有还原酶系,主要有硝基还原酶(nitroreductase)和偶氮还原酶类(azoreductase),此酶以NADH为供氢体,分别催化硝基化合物和偶氮化合物还原,最终生成胺。例如:



(三) 水解反应

肝细胞的胞质和微粒体中含有多种水解酶类,主要有脂酶、酰胺酶和糖苷酶,分别水解酯键、酰胺键、糖苷键。如局部麻醉药普鲁卡因和普鲁卡因酰胺可分别经酯酶和酰胺酶水解,而失去其药理作用。由于普鲁卡因水解速率快,故注射后迅速失效,而普鲁卡因酰胺水解较慢,可维持较长的作用时间。



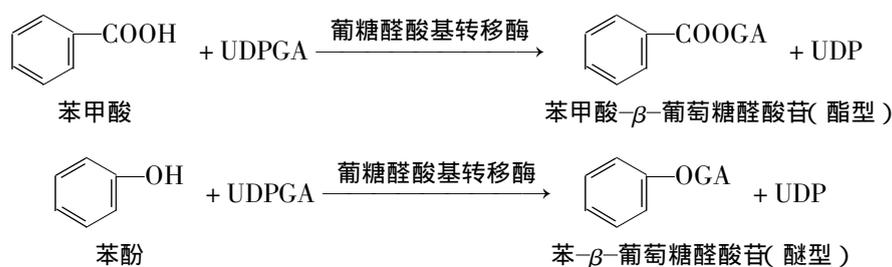
有些药物或毒物经上述氧化、还原或水解以后,极性仍不够强,常需结合反应以完成生物转化作用。

(四) 结合反应

第二相反应是结合反应(conjugation reaction)。有些脂溶性化合物经第一相反应后 ,分子极性变化不够大 ,还需进一步与体内一些极性较强的物质或化学基团结合 ,才能使它们的极性、溶解度和生物学活性发生明显变化。常见的结合物或基团有葡萄糖醛酸、硫酸、乙酰基和甲基等 ,其中以葡萄糖醛酸的结合反应最为普遍。

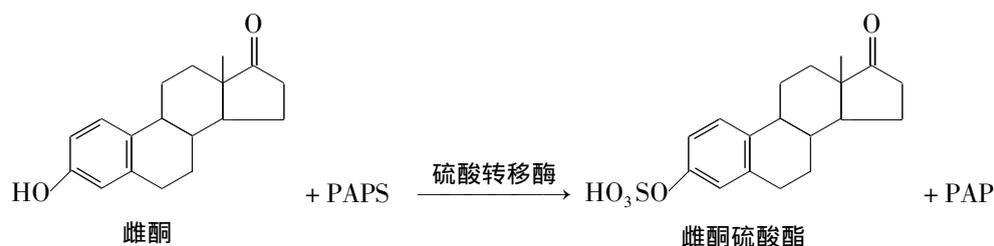
1. 葡萄糖醛酸结合反应

肝细胞微粒体中有非常活跃的葡萄糖醛酸基转移酶(UDP - glucuronyl transferase ,UGT) ,它以尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(uridine diphosphate glucuronic acid ,UDPGA)为供体 ,催化含有醇、酚、胺及羧基等极性基团的化合物与之结合 ,使其毒性降低 ,极性增加 ,易排出体外。胆红素、类固醇激素等代谢产物均在肝与葡萄糖醛酸结合、进而排出体外。



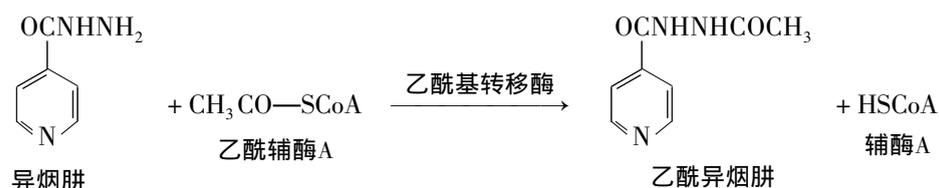
2. 硫酸结合反应

3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)为活性硫酸供体 ,在硫酸转移酶(sulfate transferase)的催化下 ,将硫酸基转移到醇、酚和芳香胺类化合物的分子上 ,生成硫酸酯。例如 雌酮通过硫酸酯的形式灭活和排泄。

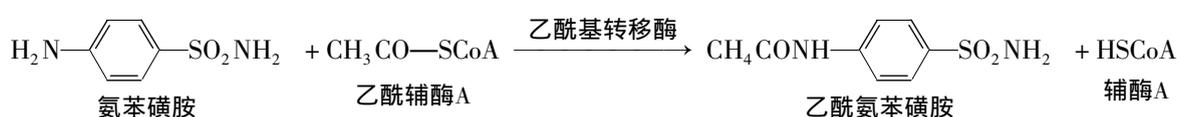


3. 乙酰基结合反应

肝细胞胞液中含有乙酰基转移酶(acetylase) ,此酶催化各种芳香胺化合物(如苯胺、磺胺、异烟肼等)的氨基与乙酰基结合 ,形成乙酰基化合物。乙酰辅酶 A 是乙酰基的直接供体。例如 ,抗结核药物异烟肼在肝内乙酰化而失去活性。

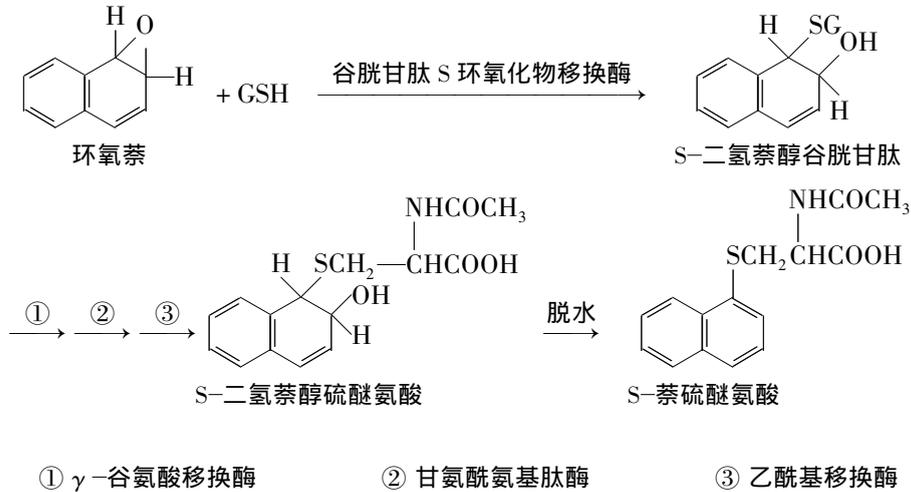


磺胺类药物也通过乙酰化反应灭活 ,但磺胺药物经乙酰化后 ,溶解度反而降低 ,在酸性尿中易析出 ,所以服用磺胺药物的同时口服适量的小苏打 ,提高其溶解度 ,使其易于溶于尿中排出。



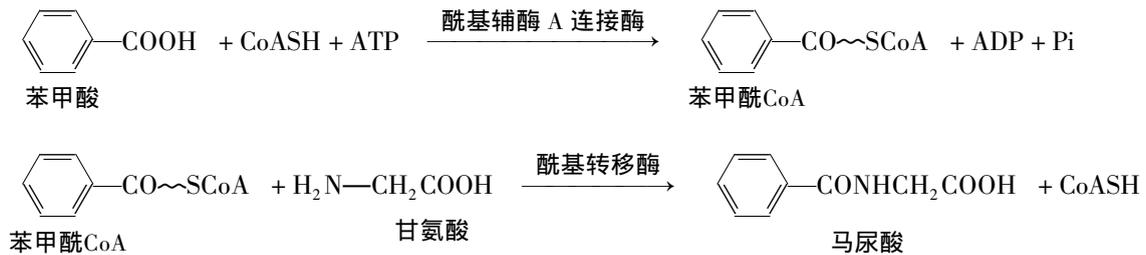
4. 谷胱甘肽结合反应

谷胱甘肽 S-转移酶(glutathione S-transferase)分布在肝细胞质中 ,可催化谷胱甘肽(GSH)与环氧化合物和卤代化合物结合 ,生成谷胱甘肽结合物 ,然后随胆汁排出体外。例如 :



5. 甘氨酸结合反应

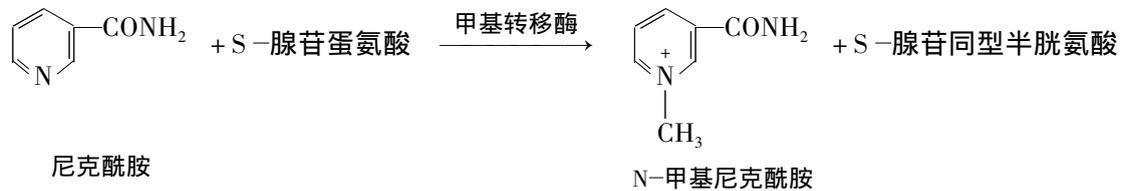
某些药物、毒物的羧基在酰基辅酶 A 连接酶的催化下与辅酶 A 结合,形成酰基辅酶 A,然后再与甘氨酸结合,生成相应的结合产物。例如,



胆酸和脱氧胆酸与甘氨酸或牛磺酸结合生成结合胆汁酸,其反应步骤与上述相同。

6. 甲基化反应

此反应由甲基移换酶(methyltransferase)催化,该酶存在于肝细胞胞质和微粒体中,可使某些胺类生物活性物质或药物甲基化而灭活,S-腺苷蛋氨酸(SAM)是甲基的直接供体。反应如下:



三、生物转化反应的特点

1. 生物转化反应的连续性

一种物质生物转化的反应过程往往相当复杂,常需要连续进行几种反应,产生几种产物。一般先进行第一相反应,但极性改变仍不够大时,必须再进行第二相反应,极性进一步增强才能排出体外。

2. 生物转化反应类型的多样性

同一类或同一种物质在体内可进行多种不同的生物转化反应,产生不同的产物。例如,乙酰水杨酸水解生成水杨酸,水杨酸既可与甘氨酸反应,又可与葡糖醛酸结合,还可进行氧化反应。

3. 解毒与致毒的双重性

生物转化后,多数物质毒性减弱或消失,生物学活性消失,但有些物质经过生物转化后毒性反而增强,生物学活性增高。例如,前面提及的苯并芘本身无致癌作用,进行生物转化后,形成环氧化物,便能与核酸分子中的鸟嘌呤结合而发挥致癌作用。环氧化物需经过一步生物转化才能排出体外。

四、影响生物转化作用的因素

生物转化受年龄、性别、疾病、诱导物、抑制物等多种因素的影响。

新生儿肝中生物转化酶系还未发育完善,对药物、毒物的耐受力差,易发生药物中毒。老年人肝重量和肝细胞数量明显减少,对氨基比林、保泰松等药物转化能力差。例如,保泰松的半衰期在青年人为 81 h,老年人则为 105 h。因此老年人长时间服用某些药物会使药效过强,副作用增大,应适当降低用药剂量。但老年人肝中非微粒体酶活性不降低,如醇脱氢酶、乙酰基移换酶,故乙醇和普鲁卡因等代谢速率并不减慢。生物转化除受年龄影响外还受性别影响,氨基比林在男性半衰期约 13.4 h,而在女性只有 10.3 h。

药物或毒物可诱导有关酶的合成。例如,长期服用苯巴比妥和甲苯磺丁脲(D_{860})的病人除对该药的转化能力增强外,对非那西丁、氯霉素、氢化可的松的转化能力也大大加强。另外,许多物质的生物转化常受同一酶系催化,因而同时服用几种药物,可发生药物对同一酶系的竞争性抑制作用,使药物的生物转化速率降低,引起药物的协同作用。例如,保泰松可抑制双香豆素的代谢,增强双香豆素的抗凝血作用,易发生出血现象。

由于多数药物是在肝中进行转化的,所以当肝功能低下时,生物转化能力下降,药物灭活速率降低,药物的治疗剂量和中毒剂量之间差距减小,因此,对肝病病人用药应慎重。

第三节 胆汁与胆汁酸的代谢

一、胆汁

胆汁(bile)是肝细胞分泌的一种液体,通过胆道系统循胆总管进入十二指肠。正常成人平均每天分泌胆汁 300~700 mL。肝胆汁(hepatic bile)是肝细胞分泌的胆汁,呈金黄色,澄清透明,固体成分含量较少。肝胆汁进入胆囊后,胆囊壁吸收其中水分、无机盐等,并分泌黏液,使胆汁浓缩成为胆囊胆汁(gall-bladder bile)。胆囊胆汁呈暗褐色或棕绿色。两种胆汁的组成见表 21-2。

表 21-2 两种胆汁组成百分比

	肝 胆 汁	胆 囊 胆 汁
比重	1.009 ~ 1.013	1.026 ~ 1.032
pH	7.1 ~ 8.5	5.5 ~ 7.7
水	96 ~ 97	80 ~ 86
固体成分	3 ~ 4	14 ~ 20
无机盐	0.2 ~ 0.9	0.5 ~ 1.1
黏蛋白	0.1 ~ 0.9	1 ~ 4
胆汁酸盐	0.2 ~ 2	1.5 ~ 10
胆色素	0.05 ~ 0.17	0.2 ~ 1.5
总脂质	0.1 ~ 0.5	1.8 ~ 4.7
胆固醇	0.05 ~ 0.17	0.2 ~ 0.9
磷脂	0.05 ~ 0.08	0.2 ~ 0.5

胆汁的主要固体成分是胆汁酸盐(bile salts)约占固体成分的 50%,其余的是胆色素、胆固醇、磷脂、黏蛋白。胆汁中还含有多种酶类,包括脂肪酶、磷脂酶、淀粉酶、磷酸酶等。除胆汁酸盐和某些酶类与脂质的消化有关外,其他成分多属排泄物。进入体内的药物、毒物、食物添加剂及重金属盐等,经过肝生物转化后均可从胆汁排出体外。

二、胆汁酸的代谢

(一) 胆汁酸的分类

胆汁酸 (bile acid) 按其来源可分为初级胆汁酸 (primary bile acid) 和次级胆汁酸 (secondary bile acid)。初级胆汁酸是肝细胞以胆固醇为原料合成的, 包括胆酸 (cholic acid)、鹅脱氧胆酸 (chenodeoxycholic acid) 以及它们和甘氨酸、牛磺酸结合的产物: 甘氨酸胆酸 (glycocholic acid)、牛磺胆酸 (taurocholic acid)、甘氨酸鹅脱氧胆酸 (glycochenodeoxycholic acid) 和牛磺鹅脱氧胆酸 (taurochenodeoxycholic acid)。次级胆汁酸是初级胆汁酸在肠道受细菌的作用生成的脱氧胆酸 (deoxycholic acid) 和石胆酸 (lithocholic acid) 以及它们和甘氨酸、牛磺酸的结合产物。(图 21-1)。

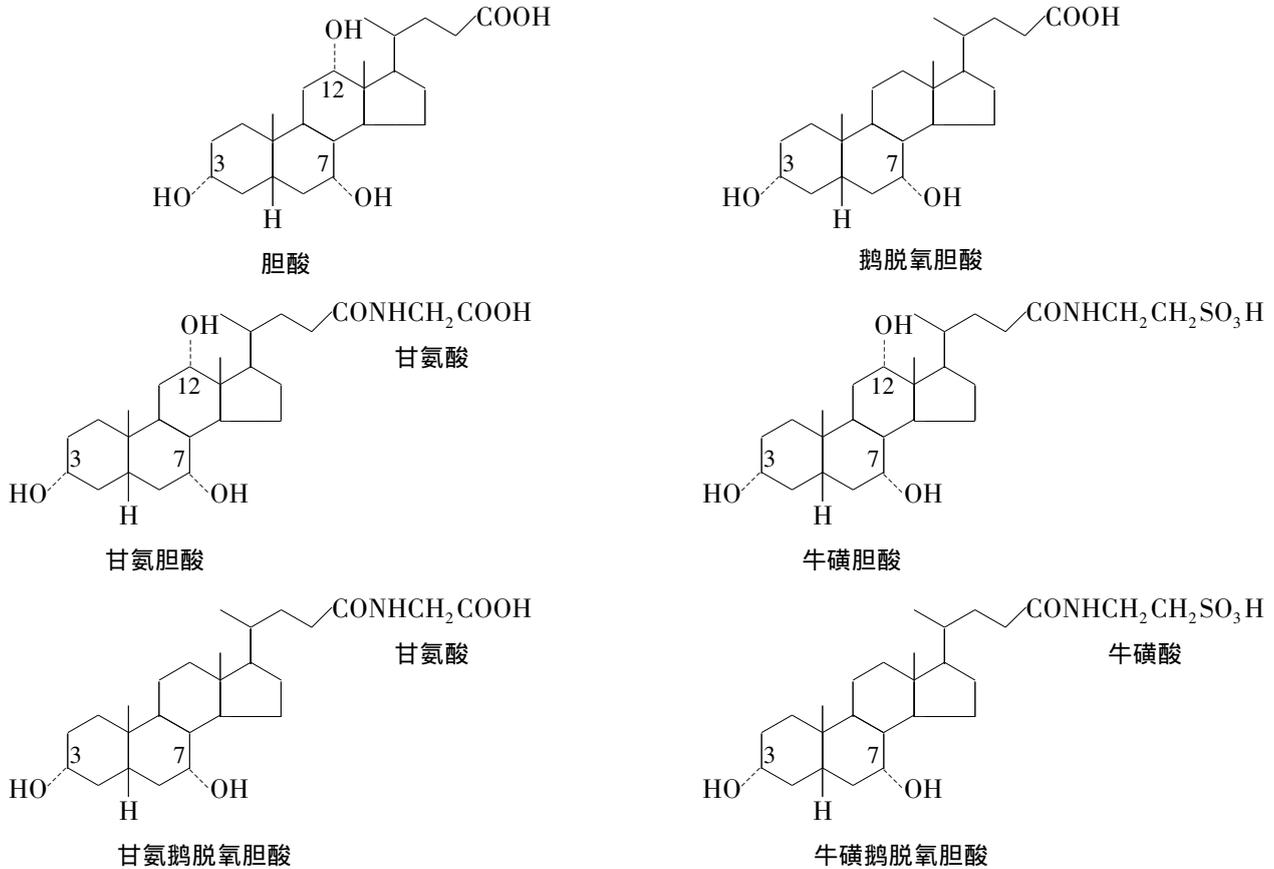
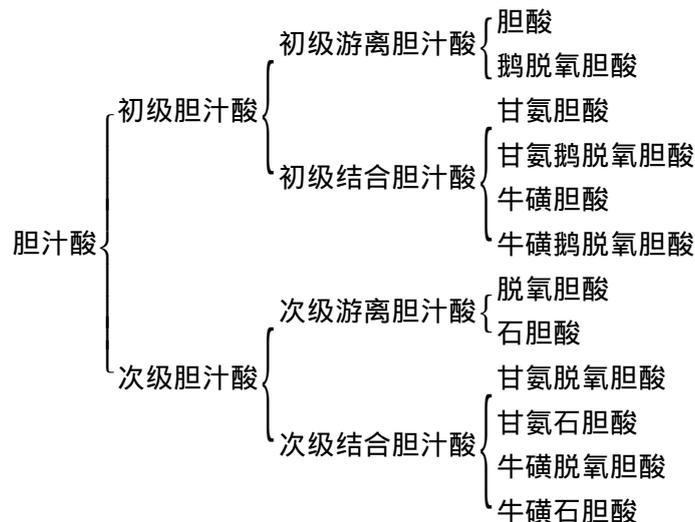


图 21-1 初级胆汁酸的结构式

胆汁酸按其结构也可分为两类, 一类是游离型胆汁酸 (free bile acid), 包括胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸和石胆酸。另一类是结合型胆汁酸 (conjugated bile acid), 是上述游离胆汁酸与甘氨酸、牛磺酸的结合产物。

现将胆汁酸分类总结如下:



人胆汁中的胆汁酸以结合型为主。均以钠盐或钾盐的形式存在,即胆汁酸盐,简称胆盐。

(二) 胆汁酸的代谢

1. 初级胆汁酸的生成

初级胆汁酸是以胆固醇为原料,在肝细胞内经过复杂的酶促反应合成的,正常人每日合成 0.4 ~ 0.6 g 初级胆汁酸。

(1) 游离型初级胆汁酸的生成 肝细胞微粒体及胞液中存在胆固醇 7α -羟化酶,能催化胆固醇的 7 位碳原子羟化,转变为 7α -羟胆固醇,然后再经 3α 、 12α 羟化,加氢还原,最后经侧链氧化断裂,加辅酶 A,水解生成 24 碳的胆酸和鹅脱氧胆酸。

(2) 结合型初级胆汁酸的生成 初级游离胆汁酸,可与甘氨酸、牛磺酸结合,生成初级结合型胆汁酸,正常人甘氨酸胆酸与牛磺胆酸的比例为 3: 1。

2. 次级胆汁酸的生成与胆汁酸的肠肝循环

肝细胞合成的初级胆汁酸进入肠道,在完成脂质物质的消化吸收后,在回肠和结肠上段细菌的作用下,结合胆汁酸水解脱去甘氨酸或牛磺酸,释放出游离胆汁酸,后者进一步脱去 7α -羟基,形成次级游离胆汁酸。即胆酸转变为脱氧胆酸,鹅脱氧胆酸转变为石胆酸(图 21-2)。

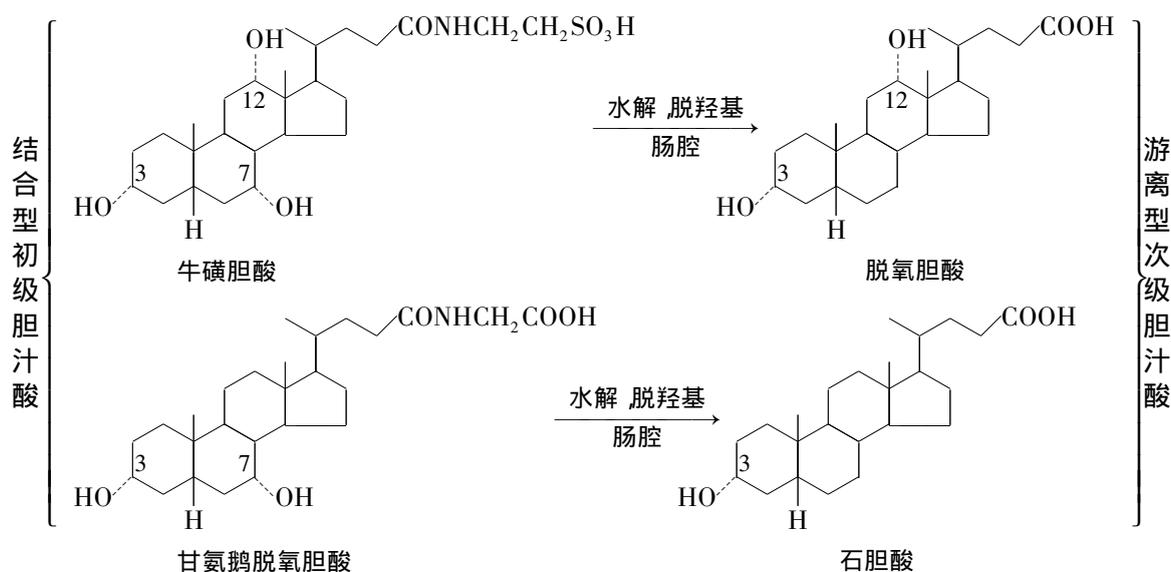


图 21-2 次级胆汁酸的生成

随胆汁进入肠道的胆汁酸(包括初级、次级、结合型与游离型)绝大部分(约 95% 以上)被肠壁重吸收,经门静脉入肝,被肝细胞摄取。在肝细胞内,游离型胆汁酸被重新合成结合型胆汁酸,与新合成的结合胆汁酸一起排入肠腔。这一过程称为胆汁酸的“肠肝循环”(enterohepatic circulation)。胆汁酸在肠道的重吸收主要有两种方式:一种是结合型胆汁酸在回肠部位的主动重吸收;另一种是游离型胆汁酸在肠道各部通过扩散作用的被动重吸收。大部分胆汁酸的吸收是主动的重吸收(图 21-3)。石胆酸溶解度较小,几乎不能吸收,大部分随粪便排出体外。

胆汁酸的肠肝循环具有重要的生理意义。肝每日合成胆汁酸的量仅有 0.4 ~ 0.6 g,肝胆的胆汁酸代谢池总共约 3 ~ 5 g,即使饭后全部倾入小肠也不能满足食物中脂质物质消化吸收的需要。然而,由于每次饭后可进行 2 ~ 4 次胆汁酸的肠肝循环,使有限的胆汁酸得以重新利用,发挥其最大的乳化作用,以满足脂质物质消化、吸收的需要。

未被肠壁吸收的那一小部分胆汁酸在肠菌的作用下,衍生成多种胆烷酸的衍生物随粪便排出体外。每日排出量约 0.4 ~ 0.6 g,与合成量相当,达到动态平衡。一些降胆固醇药物的作用机理就是抑制胆汁酸的重吸收,打破胆汁酸的肠肝循环。由于胆汁酸排出增加,促使肝细胞合成更多的胆汁酸,增加胆固醇的去路,起到治疗高胆固醇血症的作用。

(三) 胆汁酸的功能

1. 促进脂质的消化

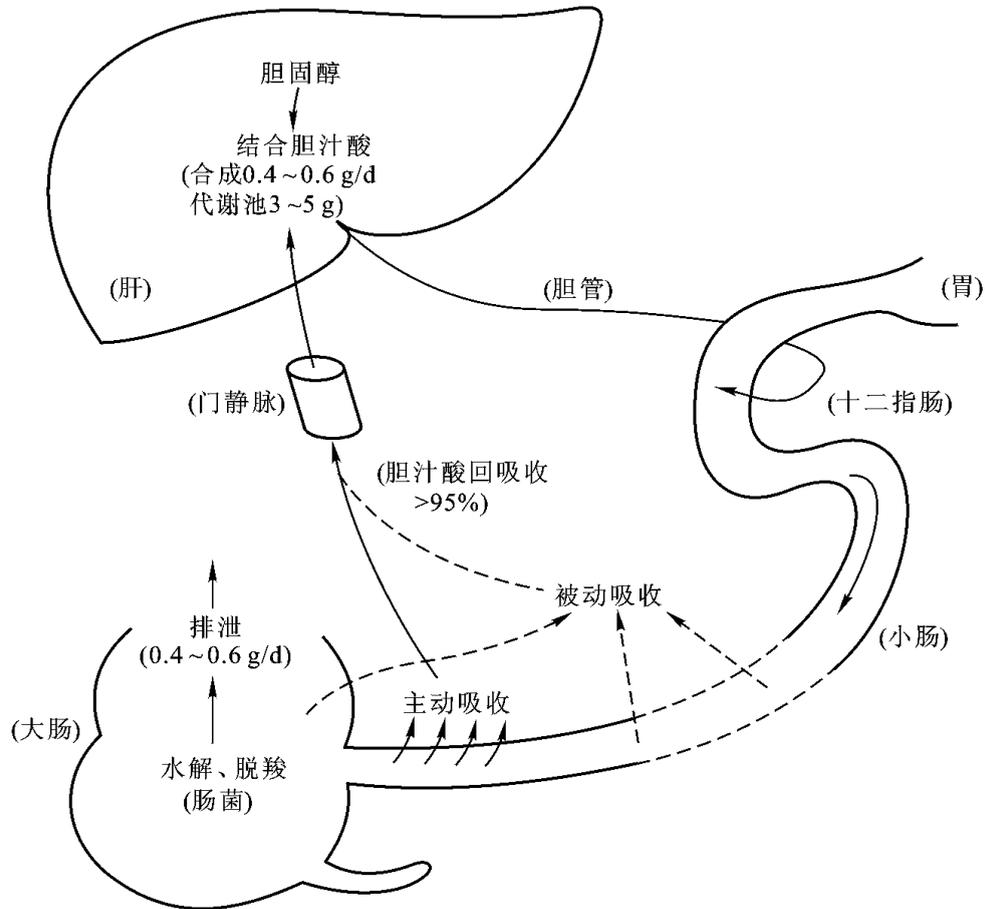


图 21-3 胆汁酸的肠肝循环

胆汁酸分子既含有羟基、羧基、磺酸基等亲水基团,又含有甲基、烃核等疏水部分,两类不同性质的结构恰好分别排列于环戊烷多氢菲核的两侧。因此胆汁酸的立体构象具有亲水和疏水两个侧面,这种结构使胆汁酸具有很强的界面活性,能降低油/水两相之间的表面张力(图 21-4)。胆汁酸的结构特点,使其成为较强的乳化剂,能使疏水的脂质物质在水中乳化成 $3 \sim 10 \mu\text{m}$ 的细小微团,从而扩大脂质物质与酶的接触面积,有利于脂质物质的消化。

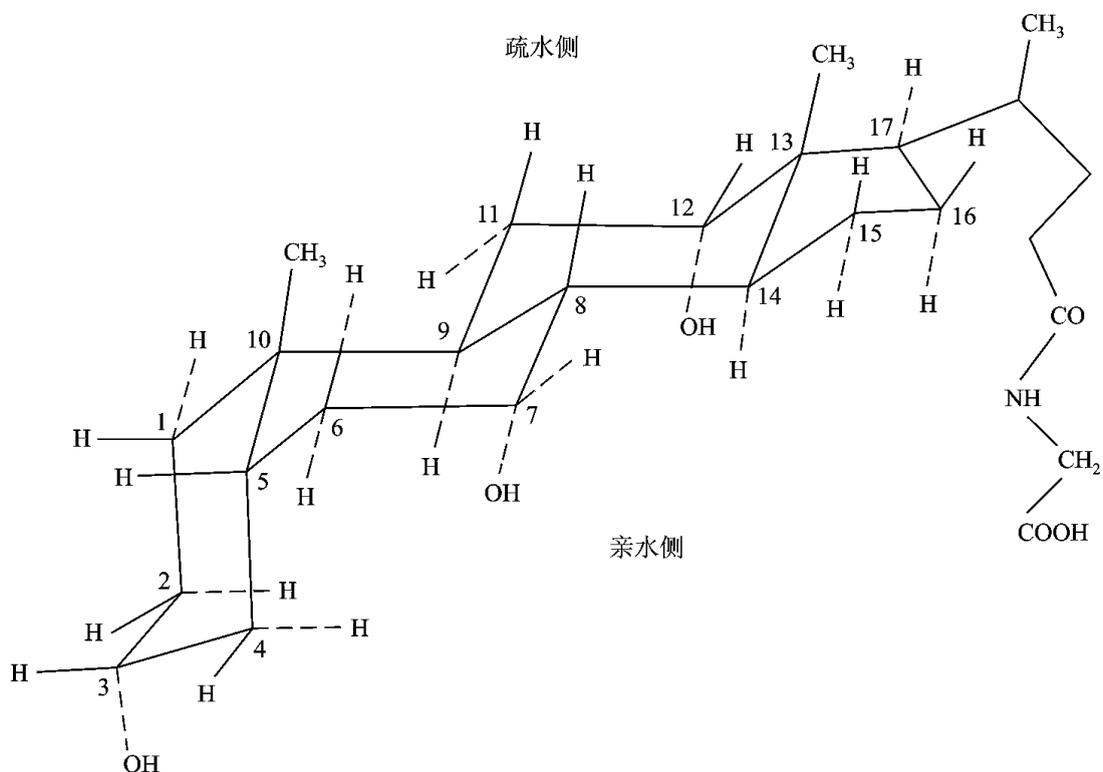


图 21-4 甘氨酸胆汁酸的立体结构

2. 促进脂质物质的吸收

脂质物质消化后的产物仍是脂溶性的,不容易通过肠黏膜吸收。这些消化产物,包括一酰甘油、脂肪酸、胆固醇、磷脂等必需和胆汁酸盐结合成混合微团,才能溶于水中,从而促进肠黏膜的吸收。

3. 抑制胆汁中胆固醇的析出

胆固醇是难溶于水的,但在胆汁中与胆汁酸盐及磷脂酰胆碱形成微团,使之不易结晶沉淀。若排入胆汁的胆固醇过多(高胆固醇血症病人),或肝合成胆汁酸的能力下降,肠肝循环中摄取的胆汁酸的量减少或胆汁酸在肠道丢失过多,均可造成胆汁中胆汁酸、磷脂酰胆碱和胆固醇的比值下降(小于10:1),易引起胆固醇沉淀,形成胆结石。

第四节 胆色素代谢与黄疸

胆色素(bile pigment)是铁卟啉化合物在体内分解代谢的产物,包括胆红素(bilirubin)、胆绿素(biliverdin)、胆素原(bilinogen)和胆素(bilin)。它们主要随胆汁排出体外,且具有颜色,故称胆色素。胆红素是胆汁中的主要色素,其毒性可引起大脑的不可逆损害。胆色素代谢异常,可导致高胆红素血症——黄疸(jaundice)。

一、胆红素的来源、生成和运转

(一) 胆红素的来源

体内含铁卟啉的化合物有血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶等。正常成人每天约产生250~350 mg胆红素,其中80%左右来自衰老红细胞中血红蛋白的分解,其他部分来自含铁卟啉化合物的酶类,肌红蛋白由于更新速率慢,所占比例很小。

(二) 胆红素的生成过程

红细胞的寿命为120 d,衰老的红细胞由于细胞膜的变化被肝、脾、骨髓网状内皮系统识别并吞噬,释放出血红蛋白。正常人每天有约 2×10^{11} 个红细胞破坏,约释放6 g血红蛋白。血红蛋白分解为珠蛋白和血红素,其中珠蛋白分解为氨基酸,进入氨基酸代谢池,供体内再利用。血红素则在微粒体血红素加氧酶(heme oxygenase)的催化和氧与NADPH的参与下,血红素的 α -甲炔桥($-\text{CH}=\text{}$)氧化断裂,释放出CO和铁,并生成胆绿素。铁可被机体再利用或以铁蛋白的形式贮存,一部分CO从肺排出。胆绿素在胆绿素还原酶的作用下,生成胆红素(图21-5)。胆绿素还原酶活性很强,反应迅速,故血中无胆绿素堆积。

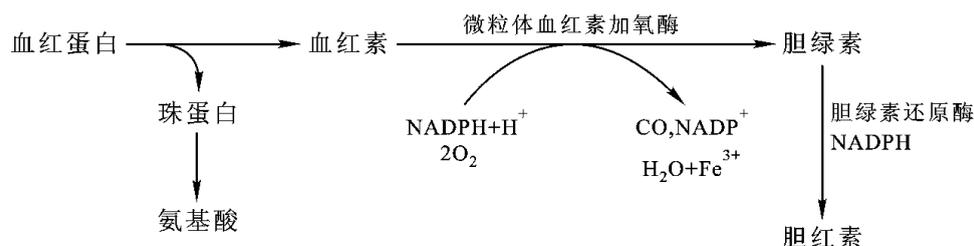


图 21-5 胆红素的生成

近期的研究表明,血红素加氧酶是一种诱导酶,氧化应激、缺血、内毒素、细胞因子、炎症等多种刺激因素均可诱导此酶的表达,从而增加CO、胆绿素及胆红素的生成。目前认为血红素加氧酶催化的反应是体内生成内源性CO的主要反应。CO部分从肺呼出,其排出量可作为体内血红蛋白分解的指标,此外,CO可作为细胞间和细胞内信号分子,激活鸟苷酸环化酶,增加细胞内cGMP的含量,从而表现出舒张血管平滑肌的功能,发挥增加血流量,调节血压的作用。这一机制对肝微循环尤为重要。人们试图诱导血红素加

氧酶的基因表达以达到对心血管疾病的治疗目的。CO 还可作为下丘脑中的神经递质,发挥神经内分泌调节作用。

此外有研究发现,胆绿素和胆红素是体内强有力的抗氧化剂,能有效地清除超氧化物和过氧化物自由基,其作用优于维生素 E,能增强细胞对氧攻击的抵抗力。

(三) 胆红素在血液中的运输

胆红素分子中虽然含有羧基和丙酸基,但由于这些极性基团在分子内部形成了氢键,使其隐藏于分子内部,而疏水基团暴露于分子表面,使分子呈现脂溶性(图 12-6)。胆红素难溶于水,网状内皮系统中生成的胆红素透出细胞进入血液后,主要与清蛋白结合而运输。有少量的胆红素与 α_1 -球蛋白结合成复合物。这些胆红素因尚未进入肝细胞,没有经过肝的生物转化,故称为未结合胆红素。胆红素与清蛋白或 α_1 球蛋白的结合既增加了胆红素在血浆中的溶解度,有利于运输,又限制了胆红素自由通过各种生物膜对组织造成的毒性作用。正常成人每 100 mL 血浆能结合 20~25 mg 胆红素,而正常人血浆胆红素的浓度仅有 0.2~0.9 mg/dL,故血浆中清蛋白足以结合全部胆红素。当血浆中胆红素浓度过高,清蛋白浓度明显下降,或结合部位被其他物质占据,均可促使胆红素游离,进入组织引起中毒。许多药物如磺胺类药物、镇痛药、抗炎药、某些有机阴离子,如脂肪酸、胆汁酸等都可同胆红素竞争与清蛋白的结合。因此,临床上对有黄疸倾向的病人或新生儿用药应慎重,以免引发血红素脑病(bilirubin encephalopathy)。

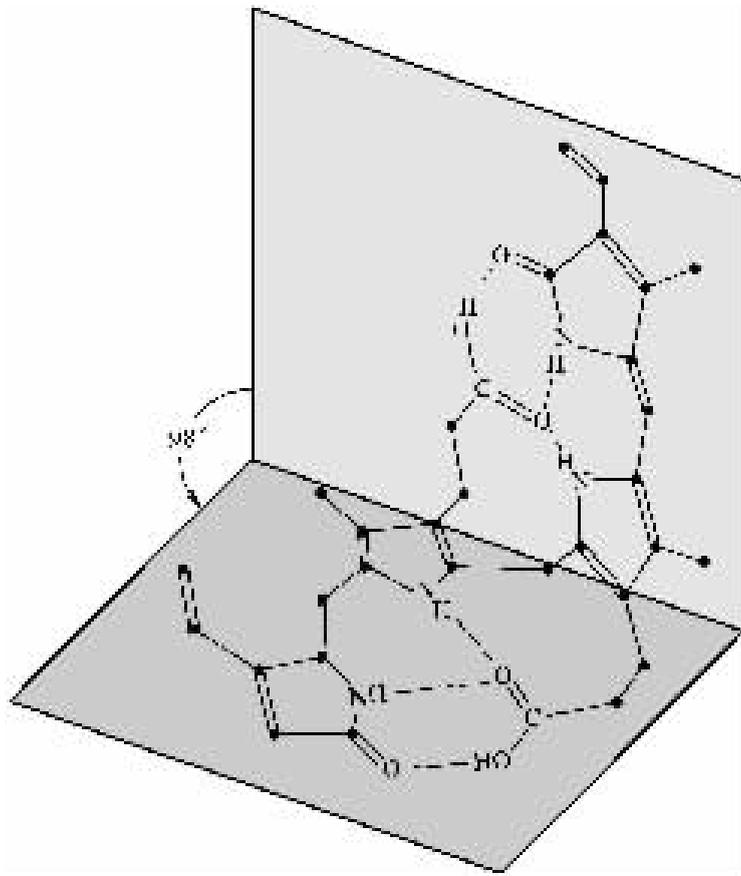


图 21-6 胆红素的立体结构

二、肝细胞对胆红素的代谢

(一) 肝细胞对胆红素的摄取

血中胆红素-清蛋白复合物随血液循环运至肝,在肝血窦中胆红素与清蛋白分离。胆红素在肝血窦中可自由双向通透肝细胞膜进入肝细胞,肝细胞对胆红素的摄入量取决于肝细胞对胆红素的代谢能力。

胆红素进入肝细胞后与胞质的配体蛋白(ligandin)结合。小鼠肝细胞中配体蛋白由相对分子质量分别为 22 000 和 27 000 的亚基组成,每分子配体蛋白可结合一分子胆红素。小鼠肝细胞配体蛋白的含量很高,占其胞液总蛋白量的 6%。配体蛋白还具有谷胱甘肽 S-表氧化物转移酶(glutathione S-epoxidetransferase)活性,具有对芳香基化合物解毒的重要功能。配体蛋白除对胆红素有较高的亲和力外,还能结合多种有机阴离子、某些染料、甲状腺素等,因此上述这些物质能竞争性影响胆红素的运转。新生儿非溶血性黄疸就是因为缺少配体蛋白,因为婴儿在出生后 7 周,配体蛋白才接近成人水平。许多药物能诱导配体蛋白的生成,如苯巴比妥可诱导合成配体蛋白,加强胆红素的摄取,临床上可用苯巴比妥消除新生儿黄疸。

(二) 肝细胞对胆红素的转化作用

胆红素与配体蛋白结合后,以“胆红素-配体蛋白”的形式转运至滑面内质网,在葡糖醛酸基转移酶(glucuronyl transferase)的催化下,胆红素脱离配体蛋白,与葡糖醛酸结合,生成葡糖醛酸胆红素(bilirubin glucuronide)。葡糖醛酸的供体是尿苷二磷酸葡糖醛酸(UDPGA)。因胆红素有两个自由羧基,可与两分子葡糖醛酸结合,故双葡糖醛酸胆红素为主要结合产物,也有少量单葡糖醛酸胆红素(图 21-7)。此外,还有少量胆红素与活性硫酸结合,生成硫酸酯。与葡糖醛酸结合的胆红素和与硫酸结合的胆红素称为结合胆红素,由于结合作用破坏了胆红素分子内部氢键,所以结合胆红素水溶性增强。

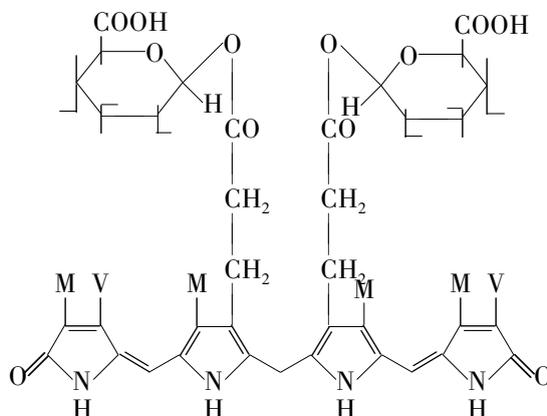
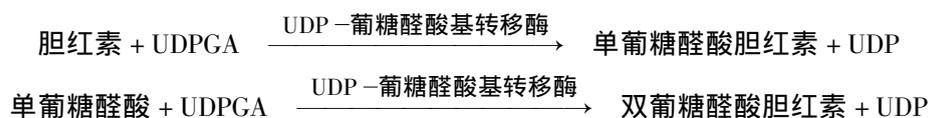


图 21-7 葡糖醛酸胆红素的生成及其结构

M :—CH₃ V :—CH=CH₂

胆红素在肝细胞内经结合、转化后,其理化性质发生了改变,从极性低的未结合胆红素转变为极性强的结合胆红素,既有利于胆红素的排泄,又消除了其对细胞的毒性作用。两种胆红素理化性质的比较见表 21-3。

表 21-3 两种胆红素理化性质的比较

理化性质	未结合胆红素 (间接胆红素)	结合胆红素 (直接胆红素)
水溶性	小	大
脂溶性	大	小
与清蛋白亲和力	大	小
对细胞膜的通透性及毒性	大	小
能否通过肾小球	不能	能
与重氮试剂反应	间接阳性	直接阳性

注:重氮试剂反应又称凡登白反应,根据我国卫生部的规定,临床检验已停止使用。

未结合胆红素因分子内氢键的形成,不能与重氮试剂直接起反应,必须加入乙醇或尿素破坏氢键后才能与重氮试剂生成紫色偶氮化合物,故未结合胆红素又称间接胆红素。结合胆红素加入重氮试剂后能立

即发生偶氮反应,呈现紫红色,故结合胆红素又称直接胆红素。

当肝内配体蛋白缺乏,或 UDPGA 来源不足,或葡糖醛酸基转移酶缺乏时,胆红素被肝细胞摄取及进行结合反应皆受影响,血中未结合胆红素升高,可导致黄疸。

(三) 肝对胆红素的排泄作用

在肝细胞中经转化生成的结合胆红素水溶性增强,容易溶解在胆汁中,自肝细胞释放到毛细胆管随胆汁排入肠腔。毛细胆管中胆红素的浓度远高于肝细胞,所以肝细胞排出胆红素的过程是一个逆浓度梯度的主动运转过程。血浆中的胆红素通过肝细胞膜、肝细胞质配体蛋白和内质网的葡糖醛酸基转移酶的联合作用,不断地被肝细胞摄取、结合、排泄,从而得到不断地清除。肝细胞内胆红素代谢过程见图 21-8。

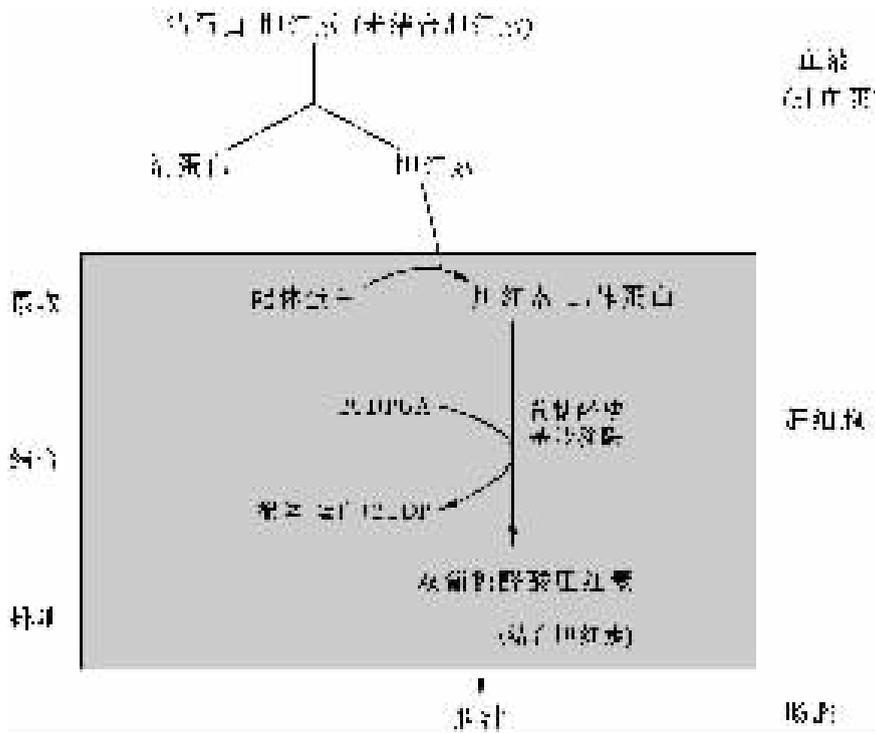


图 21-8 肝细胞内胆红素代谢示意图

三、胆红素在肠腔内的转变

结合胆红素随胆汁排入肠腔后,在回肠下段或结肠中,在肠菌酶的作用下,先脱去葡糖醛酸,再逐步还原生成无色的胆素原族化合物,包括中胆素原(mesobilirubinogen)、粪胆素原(stercobilinogen)和尿胆素原(urobilinogen)。大部分胆素原族化合物随粪便排出体外,经空气氧化,粪胆素原可氧化成棕黄色粪胆素,此即粪便颜色的主要来源(见图 21-9)。正常人每日从粪便排出的胆素原为 40~280 mg,当胆道完全梗阻时,胆红素不能排入肠腔,胆素原无法生成,粪便中无胆素,呈灰白色。

肠道中形成的胆素原约有 10%~20% 可被肠黏膜重吸收,经门静脉入肝,其中大部分以原形再次随胆汁排入肠腔,形成胆素原的肠肝循环(bilinogen enterohepatic circulation)。小部分进入体循环,通过肾小球滤过随尿排出,即为尿胆素原,被空气氧化后生成尿胆素,它是尿中的主要色素。正常人每日从尿中排出的尿胆素原约为 0.5~4.0 mg。尿胆素原、尿胆素、尿胆红素在临床上被称为尿三胆,但正常人尿中不会出现胆红素,如出现则是黄疸。

四、影响尿胆素原排泄的因素

进入血液的胆素原约有 80% 与血浆蛋白质结合,仅有小部分可以通过肾小球滤出。在近曲小管可被

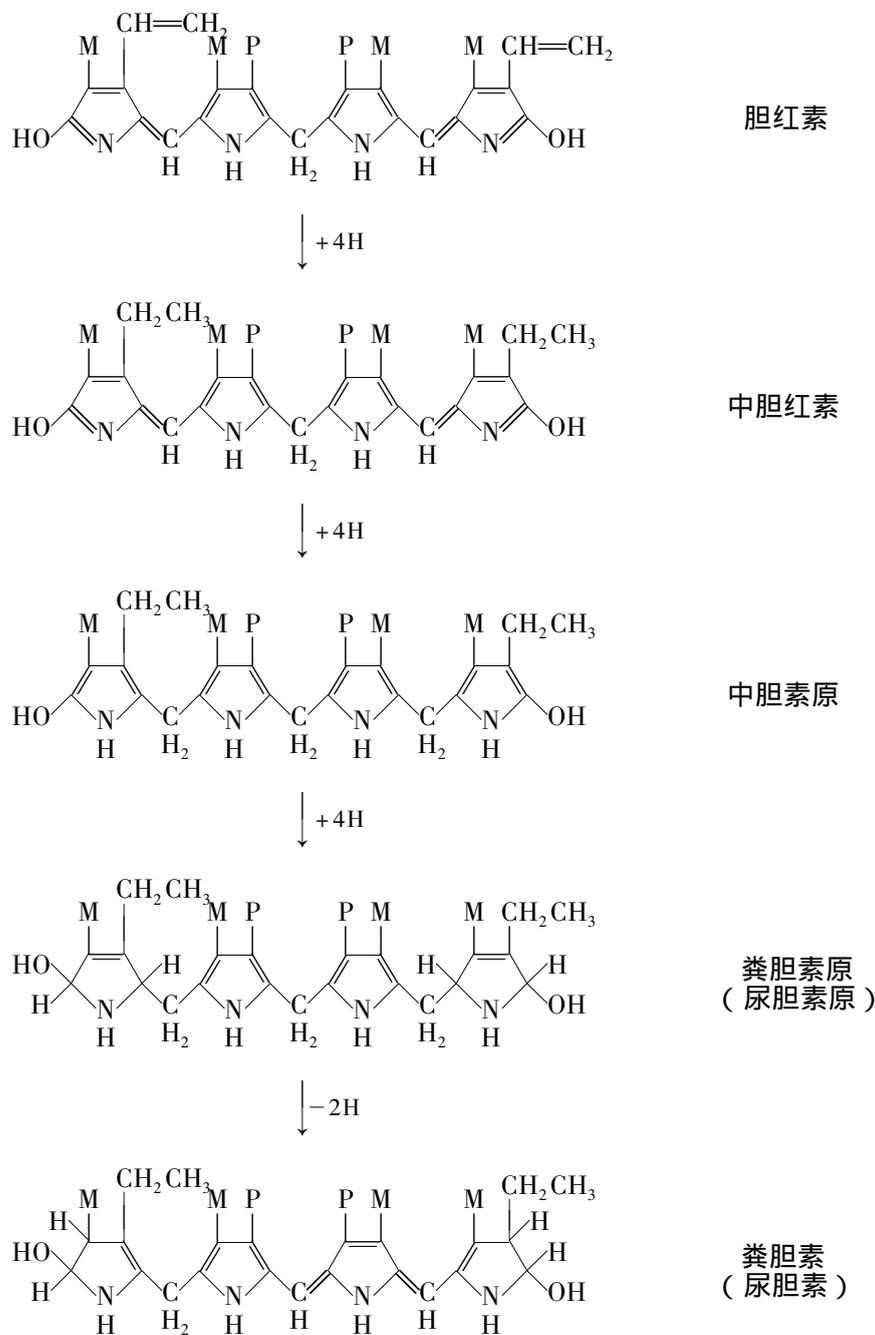


图 21-9 胆红素在肠内的变化

重吸收一部分,在远曲小管可被排出一部分,尿胆素原的排出量与下列因素有关:

1. 尿液的 pH

酸性尿中,尿胆素原生成不解离的脂溶性分子,易被肾小管重吸收,排出量减少,碱性尿胆素原解离,水溶性增大,排出量增加。

2. 胆红素的生成量

胆红素来源增加时,如溶血,随胆汁排入肠腔的胆红素增加,肠道中形成胆素原增加,重吸收进入体循环,从尿排出的胆素原增加;反之,当胆红素生成量减少时,如贫血,尿胆素原的排出量减少。

3. 肝细胞功能

肝细胞功能损伤时,从肠道重吸收的胆素原不能有效地进行肠肝循环随胆汁再排出,则逸入体循环的量增加,尿中胆素原的排出量也会增加。

4. 胆道梗阻

由于结合胆红素不能顺利排入肠道,肠道中胆素原无法形成,从尿中排出的胆素原明显减少,甚至完全消失。

胆红素的正常代谢过程概括如图 21-10。

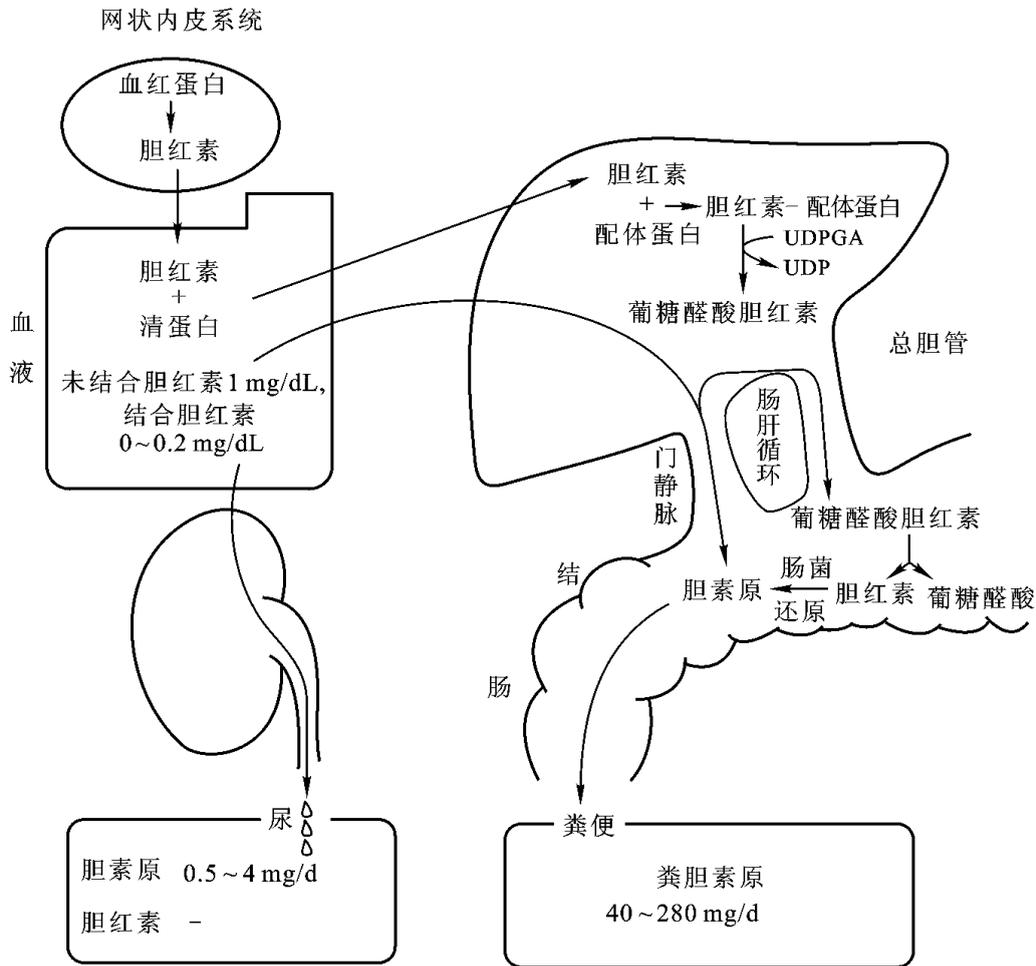


图 21-10 胆红素的代谢过程

五、血清胆红素与黄疸

(一) 正常人血清胆红素

正常人血清胆红素含量不超过 1 mg/dL,其中未结合胆红素占 4/5,其余为结合胆红素。胆红素是有毒的脂溶性物质,易穿透细胞膜造成危害,对富含脂质的神经细胞危害更大。正常人每天可生成 200~250 mg 胆红素,但是由于肝对胆红素有强大的处理能力,每小时能清除 100 mg 胆红素,因此正常情况下,血中胆红素含量甚微。

(二) 黄疸及其发生机理

由于体内胆红素生成过多,或肝摄取、结合、排泄的过程发生障碍,均可引起血浆中胆红素浓度升高。胆红素为金黄色物质,胆红素扩散进入组织,造成组织黄染,称为黄疸(jaundice)。由于巩膜和皮肤含有较多的弹性蛋白,对胆红素有较强的亲和力,因此,这些组织极易染黄。黄疸的程度与血清胆红素的浓度成正比。当血清胆红素浓度在 1~2 mg/dL 之间,胆红素浓度虽然高于正常,但肉眼看不到巩膜与皮肤黄染,称隐性黄疸。大于 2 mg/dL,肉眼可明显观察到组织黄染,称为显性黄疸。

根据黄疸发病原因不同,可将黄疸分为三类:

1. 溶血性黄疸

溶血性黄疸(hemolytic jaundice)又称肝前性黄疸,是由于红细胞大量破坏,在网状内皮系统内生成过量的胆红素,超出了肝摄取、结合和排泄的能力。因此,血中未结合胆红素浓度显著增高,结合胆红素浓度变化不大,重氮试剂反应间接阳性,尿中胆红素阴性。由于肝对胆红素的摄取、结合和排泄增多,肠道中胆素原增多,肠肝循环增多,因此,尿胆素原也增多。药物或输血不当、恶性疟疾、过敏等均可引起溶血性

黄疸。

2. 阻塞性黄疸

各种原因引起的胆汁排泄障碍,使胆小管和毛细胆管内压力增高而破裂,导致结合胆红素回流入血,这种黄疸称为阻塞性黄疸(obstructive jaundice),又称肝后性黄疸。临床检验,血清中结合胆红素明显升高,重氮试剂反应直接阳性,血清中未结合胆红素无明显变化。由于结合胆红素可透过肾小球,故尿胆红素阳性。胆道阻塞使肠道胆素原减少,粪胆素原、尿胆素原均减少。阻塞性黄疸可见于先天性胆道闭锁,胆管炎、肿瘤、结石等。

3. 肝细胞性黄疸

肝细胞性黄疸(hepatocellular jaundice)也称肝原性黄疸。由于肝细胞的损坏,对胆红素的摄取、结合和排泄的能力降低,从而导致黄疸。若摄取和结合发生障碍,可使血清中未结合胆红素增多,临床检验与肝前性黄疸相似;若排泄出现障碍,胆汁反流入血,血清中结合胆红素增多,临床检验与肝后性黄疸相似。若同时出现障碍,血清中结合胆红素,未结合胆红素均增多,临床检验发现血清重氮试剂反应双向阳性,尿胆素原升高,尿胆红素阳性。肝细胞性黄疸常见于肝实质性病变,如肝炎、肝硬化、肝肿瘤等。各种黄疸血、尿、粪的变化见表 21-4。

表 21-4 各种黄疸血、尿、粪的变化

指 标	正 常	溶血性黄疸	肝细胞性黄疸	阻塞性黄疸
血清胆红素				
总量	< 1 mg/dL	> 1 mg/dL	> 1 mg/dL	> 1 mg/dL
结合胆红素	0 ~ 0.8 mg/dL		↑	↑↑
未结合胆红素	< 1 mg/dL	↑↑	↑	
尿三胆				
尿胆红素	—	—	++	++
尿胆素原	少量	↑	不一定	↓
尿胆素	少量	↑	不一定	↓
粪便颜色	正常	深	变浅或正常	完全阻塞时陶土色

Summary

The liver has complex functions because of its peculiarity in chemical components and morphological structure. It plays an important role in the metabolism of carbohydrates, lipids, proteins, vitamins and hormone, etc.

The liver can increase the water-solubility of the internal and external non-nutritious materials through the biotransformation so as to make them soluble in bile and urine. Its reaction types include oxidation, reduction, hydrolysis and conjugation. Normally, the conjugating reagents are glucuronyl, sulfate, acetyl and methyl, etc. Mono-oxygenase, which can be induced, is the most important oxidase system in biotransformation.

Bile is a kind of liquid that is secreted by the liver and an important ingredient of bile is the bile acid which can improve the digestion and assimilation of lipids. The primary free bile acids (i. e. cholic acid and chenodeoxycholic acid) are synthesized from the cholesterols in the liver, and then they transform into the primary conjugated bile acids by binding the glycine and the taurine. Due to the action of the 7- α dehydroxylation of the primary free bile acids in intestinal bacteria, it is trans-

formed into secondary free bile acids as deoxycholic and lithocholic acid. The bile acids in intestinal tracts are mostly re-assimilated through the liver ,and at the same time ,the free bile acids are transformed into conjugated bile acids and enter the intestinal tracts to form the enterohepatic circulation of the bile acids so that the limited bile can be used repeatedly ,which as a result can meet the needs of digesting and assimilating lipids. Because of its lower solubility ,most the lithocholic acids are excreted with the feces.

Another important ingredient in bile is bilirubin that is the product of catabolism of heme. The break-up of the senium red cells in reticuloendothelial system releases globin ,in which way heme is produced. Heme ,catalyzed by the heme-oxygenase ,transforms into biliverdin and then it is reduced to bilirubin.

Bilirubin is only sparingly soluble in water ,but its solubility is increased and is delivered in plasma by noncovalent binding to albumin. Bilirubin on serum albumin is rapidly cleared by liver ,where there is a free bi-directional flux of the bilirubin across the sinusoidal-hepatocyte interface. In hepatocytes ,bilirubin is mainly bound to ligandin and is converted to bilirubin glucuronide (conjugated bilirubin) ,a polar form ,by adding glucuronic acid molecules in it. As the conjugated bilirubin enters the intestine ,the glucuronides are removed by specific bacterial enzymes ,and bilirubin is subsequently reduced to bilinogens. Normally ,most bilinogens formed in the colon are oxidized there to stercobilinogen and excreted into the feces. Darkening in the air is due to the oxidation of stercobilinogen to stercobilin. In the intestine ,a small fraction of bilinogen is re-absorbed and re-excreted through the liver to guts to constitute the bilinogen enterohepatic circulation and very small bilinogen may be excreted into urine and then oxidized to urobilin in the air.

Bilirubin can damage the central nervous system because of its toxicity. Normally ,the concentration of bilirubin in the blood is very low. The metabolic disturbance of bilirubin in the blood may cause jaundice ,which can be classified into prehepatic ,hepatic and post-hepatic in clinic. The three types of jaundice can be identified by testing blood ,urine and stool samples.

思 考 题

1. 肝在人体糖、脂质、蛋白质代谢中的作用。
2. 肝在维生素、激素代谢中的作用。
3. 何谓生物转化作用？生物转化作用有哪些反应类型？举例说明之。生物转化有何生理意义？
4. 举例说明药物诱导生物转化作用有何实用价值？
5. 区别初级胆汁酸与次级胆汁酸 ,游离胆汁酸与结合胆汁酸。
6. 试比较胆汁酸与胆色素的肠肝循环。
7. 简述胆红素的来源和去路。
8. 试述肝在胆红素代谢中的作用。
9. 简述胆固醇与胆汁酸代谢的关系。
10. 根据血清中胆红素的来源可将黄疸分为哪几类？各种黄疸血、尿、粪化验结果有何不同？
11. 严重肝疾病可产生水肿、转氨酸升高、出血倾向、黄疸及肝昏迷 ,试说明这些症状产生的生化机制。

第二十二章 脑生物化学

本章教学要求

- 脑组织生化成分
- 脑的物质代谢与能量代谢
- 乙酰胆碱、单胺类神经递质及受体
- 氨基酸类神经递质及受体
- NO、嘌呤类神经递质

神经组织占人体重的 2.4% ,而神经组织重量的 83% 为脑。脑是人体最复杂、最精密的结构 ,脑的生物功能包括从调节机体感觉、运动和自主活动到情绪、学习记忆和思维语言等高级神经活动。各种脑神经细胞由以蛋白质、脂质、多糖为主的各种物质组成 ,是脑极其复杂的生物功能的物质基础。

近年来各种现代研究方法 ,尤其是生物化学和分子生物学技术方法的应用 ,使脑的组成和脑功能分子机制的研究迅速进展。国际生物学家将 1990 年开始的十年确定为“ 脑的十年 ”。由于脑的结构、功能非常复杂 ,脑科学研究必定是多学科、多层次的综合研究 ,解释人脑的奥秘将是对生物医学研究的最大挑战。本章通过介绍脑生物化学一些基本知识 ,为今后深入学习脑科学理论打下基础。

脑细胞主要包括神经元和各种神经胶质细胞。脑的基本结构单位是神经元(neurons) ,脑内神经元总数约 $10^{10} \sim 10^{12}$ 个。神经元可看作脑的遗传单位和功能单位 ,脑传送和整合信号的基本功能主要由神经元完成。神经元为高度分化的细胞 ,其结构包括胞体(perikaryon)和胞体发出的数目不等的神经胶质突起。神经突起分为轴突(axon)和树突(dendrites)。轴突外包绕富含脂质的髓鞘(myelin sheath)或神经鞘(neurilemma) ,有的突起极长。细胞质突为神经元的独特结构(图 22 - 1) ,可根据神经元的突起数目、功能或电生理特性对神经元进行不同的分类。

神经胶质细胞作为脑组织的间质细胞或支持细胞分布在神经元间 ,数量为神经元的 10 ~ 15 倍 ,有一定形态和功能。脑组织主要的星型胶质细胞(astrocyte)含有胶质纤维 ,包含

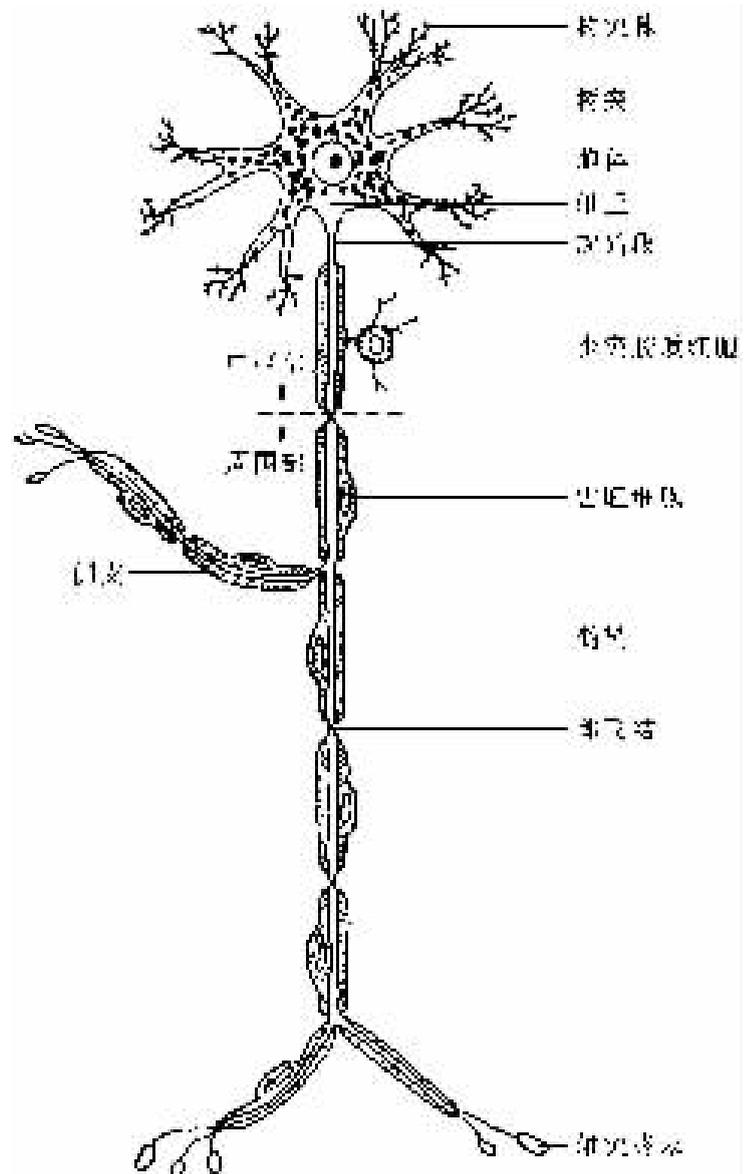


图 22 - 1 神经元的结构

胶质原纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein ,GFAP)。星型胶质细胞的功能是构成神经组织网架,起支持作用,常作为大神经元的卫星细胞,有分裂能力,从而能修复神经创伤。此外,星型胶质细胞还参与构成血脑屏障,为神经元提供从血液摄取的营养物质和参与递质代谢等。少突胶质细胞(oligodendrocyte)特异的含有髓磷脂碱性蛋白、半乳糖脑苷脂, O1 ~ O4 抗原及 NS - 1 抗原,参与形成、维持髓鞘。小胶质细胞(microglial cell)属中枢神经系统吞噬细胞,在脑损伤、出血时大量出现。

神经元、胶质细胞的形态、结构、生化成分、代谢特点,都是和它们接受和传递信息等功能的特殊需要相一致的。

第一节 脑神经组织的生物化学成分

一、脑组织的生物化学组成特点

脑组织的生化成分除水、无机物质以外,各种有机物质占固体组分的 85%,其中主要是脂质和蛋白质,另外有少量核酸、氨基酸、肽类等。糖类在神经组织中含量极少。作为代谢活跃的组织,神经组织含较多水分。成熟期大脑含水量约 83%,胚胎及幼年大脑含水更多,随年龄增加神经组织含水量减少。

二、脑组织的脂质

脑组织含大量脂质。髓鞘质、白质和灰质所含脂质分别为其干重的 80%、60% 和 40%。脑组织中的脂质主要是类脂,包括甘油磷脂和鞘脂质。胆固醇是脑脂的第二个主要成分,神经组织中所含的胆固醇占机体总量的 25%。

1. 甘油磷脂

脑中的甘油磷脂占总脂量的 50%,磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)和磷脂酰丝氨酸(PS)的含量较多,而磷脂酰肌醇(PI)和心磷脂的含量很少。缩醛磷脂 C - 1 的脂酰基被醚键连接的 α 、 β 烯烃链取代。脑组织各种甘油磷脂都有其特定的脂肪酸成分,脑脂质中存在某些特异的不饱和脂肪酸,它们属于 ω 3 和 ω 6 类必需脂肪酸的衍生物(图 22 - 2)。

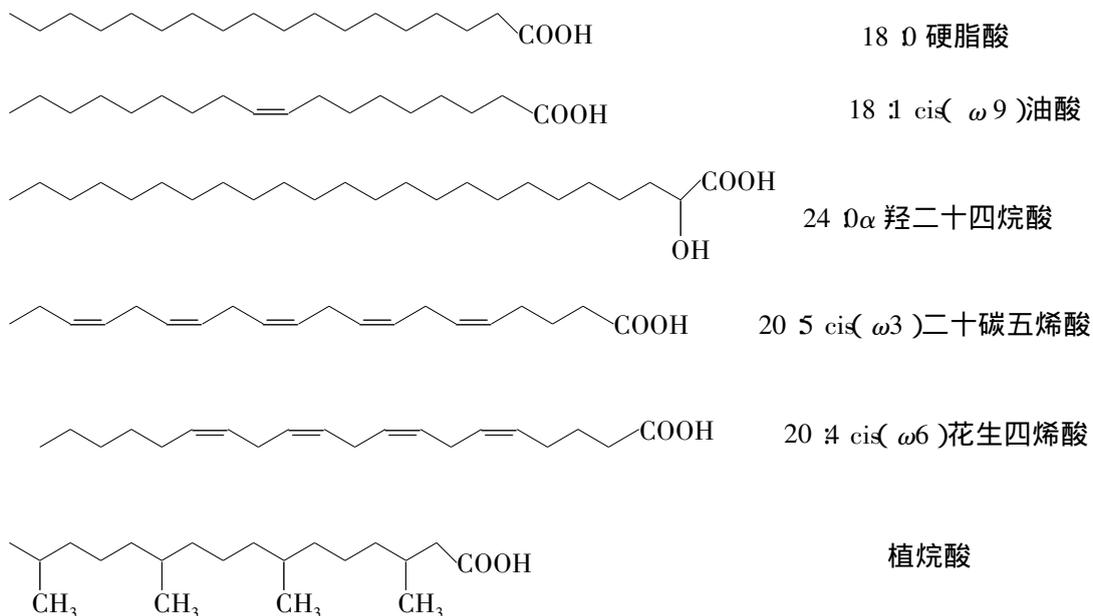


图 22 - 2 脑神经某些脂肪酸的结构

2. 鞘脂质

鞘脂质包括鞘磷脂和鞘糖脂,属于神经酰胺的衍生物。脑苷脂为神经髓鞘的重要组分,包括半乳糖脑苷脂及脑硫脂,它们是神经酰胺单己糖苷。正常人脑含有大量半乳糖脑苷脂。神经节苷脂是含唾液酸的鞘糖脂,中枢神经系统的神经节细胞及神经末梢中含量较高。神经节苷脂参与神经系统与环境的相互作用和信号转导过程,还与神经元突触的可塑性及学习记忆等高级神经活动相关,并在神经元损伤后的再生中起重要作用。在神经发育的各阶段,神经节苷脂的含量和成分可有特异的改变。

3. 类固醇

脑中的胆固醇是生物膜的重要组分,但成年脑中几乎不含胆固醇酯。脑组织自身合成胆固醇,但合成后分解更新率极低。近年来发现脑中有内源的类固醇激素,称神经类固醇。神经类固醇可以通过某些神经递质受体介导,产生快速效应,例如,孕类固醇可能通过 GABA_A 型受体介导,产生麻醉、镇静、催眠、抗惊厥、抗焦虑等作用。

三、脑神经特异蛋白质

脑组织功能的复杂多样可能源于其蛋白质组成的丰富多样。组成脑组织的蛋白质约占其干重的 35%,不同神经部位其蛋白质种类、含量各有特点。灰质中的蛋白质含量高于白质。中枢神经组织除含有一般的组织蛋白外,还有其特有的蛋白质。应用免疫组织化学分析某些神经细胞的特异蛋白可作为确定细胞类型的标记,广泛用于脑神经研究。

1. 钙结合蛋白

脑神经系统钙结合蛋白包括 S-100 蛋白、钙调蛋白、肌钙蛋白 C、肌球蛋白轻链等。这类蛋白空间构象与钙调蛋白相似。如 S-100 蛋白(主要是 S-100a 和 b)是脑特异的强酸性蛋白质,大量存在于神经胶质细胞,少量在神经元。S-100 功能可能包括:有关记忆形成,参与调节激素的细胞间信号转导,钙依赖的与微管蛋白结合引起微管解聚等。小脑钙结合蛋白存在于小脑浦肯野(Purkinje)细胞,参与小脑信号转导。在老龄脑及退行性神经疾病脑中,该蛋白表达明显降低。

2. 神经细胞骨架蛋白

中枢神经元细胞骨架结构包括微管、微丝和神经细丝,组成以上骨架结构的蛋白质有以下种类:

(1) 微管蛋白 中枢神经组织微管(microtubules)含量高于其他组织,神经元树突及轴索中富含微管,参与轴质流运输。占微管总蛋白 80% 的微管蛋白(tubulin)是由 α 和 β 亚基组成的二聚体,它们聚合成链,再螺旋盘曲装配形成微管。

(2) 微管伴随蛋白(microtubule associated protein, MAP) 可占微管总蛋白的 15% ~ 20%,参与微管装配、微管间及微管与其他丝状成分间联系和微管物质转运。微管伴随蛋白包括相对分子质量较高的 MAP₁ 和 MAP₂ 及低相对分子质量 τ 蛋白(tau protein)。不同的 MAP 或分别存在于胚胎或成年神经元,或存在于神经元的不同的特定部位,如轴突主要有 τ 蛋白,树突含高相对分子质量 MAP₂,缺乏 τ 蛋白。MAP 和 τ 蛋白通过可逆磷酸化修饰调节细胞骨架的聚合或解聚。参与微管调节的还有其他几类蛋白。

(3) 球状肌动蛋白(G-actin) β 及 γ 球状肌动蛋白是神经元和胶质中微丝的主要成分。微丝(microfilaments)是直径为 5 nm ~ 6 nm 的双股螺旋丝。微丝从胞体至末梢呈网状分布。微丝在轴突生长锥和树突等神经元的高度活动部分分布密集。

(4) 神经细丝蛋白 神经细丝(neurofilaments, NF)又称中间丝,直径 10 nm。神经细丝在神经元中主要起支持作用,同时也与细胞内物质转运有关。神经细丝占轴索总蛋白的 25%,其主要成分为 3 种蛋白质,即高、中、低相对分子质量神经细丝蛋白(NF-H、NF-M、NF-L)。

(5) 胶质原纤维酸性蛋白(GFAP) 胶质细胞的胶质纤维属于神经细丝,主要成分是胶质原纤维酸性蛋白。此蛋白质富含酸性氨基酸,特异地存在于星形胶质细胞,在纤维性星形胶质细胞中含量更多。GFAP 可作为标记蛋白用于鉴定星形胶质细胞,脑脊液 GFAP 免疫测定可用于脑肿瘤等的诊断。

四、脑组织重要的特异酶类和其他蛋白

1. 脑神经特异酶类

动物脑中的烯醇化酶有由 α 和 γ 亚基组成的 3 种同工酶。一般将 $\gamma\gamma$ -烯醇化酶称为神经元特异烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE), 主要存在于神经元, 可以作为神经元的标志酶。此酶在脑灰质和成神经细胞瘤中浓度较高。NSE 与脑学习记忆功能有关。一种最早发现的脑特异蛋白被命名为 14-3-3 蛋白, 主要存在于神经元。醛缩酶 C 主要存在于胶质细胞, 可作为胶质细胞标志物。

另外, 某些递质合成酶类主要集中于神经元, 可作为神经元标记酶, 如胆碱乙酰基转移酶、谷氨酸脱羧酶等。某些在神经胶质细胞中活性高的酶类可作为胶质细胞标记酶, 如谷氨酰胺合成酶。而碳酸酐酶、2', 3'-环核苷酸-3'磷酸酶是少突胶质细胞的标记酶。

2. 神经细胞黏着分子

神经细胞黏着分子是指神经细胞之间、神经细胞与其他细胞或周围基质分子之间起识别和连接作用的一类细胞表面蛋白。它们的功能涉及神经细胞的发生、形成、修复和再生等过程。

钙黏着蛋白 (Cadherin) 为钙依赖性细胞黏着分子, 分布于脑组织的是 N 型钙黏着蛋白, 在突触伸展过程中有重要作用。整合蛋白是连接细胞一侧的黏着分子, 参与细胞与基质中黏着分子如纤连蛋白的连接。免疫球蛋白超家族的神经细胞黏着素在神经元、神经胶质细胞自身或相互间黏着方面有作用。

3. 脑神经髓鞘蛋白

髓鞘是特化的细胞膜, 由于中枢神经和周围神经组织髓鞘分别由少突细胞和雪旺细胞膜重叠包绕形成, 故有不同的蛋白质组成。中枢神经髓鞘膜蛋白含量约为其干重的 20% ~ 30%, 主要蛋白质成分包括: 髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 含 24% 碱性氨基酸, 人脑中共有 4 种。MBP 基因突变或表达障碍可造成髓鞘形成不良并伴有震颤。Folch-Lees 蛋白脂 (proteolipid, PLP) 为中枢神经髓鞘膜的主要结构蛋白, 可占总髓鞘膜蛋白的 50%。Folch-Lees 蛋白脂含 30% 脂质, 它们主要是鞘糖脂和神经节苷脂。

此外, 人脑中还含有其他一些特有的蛋白质。如 P400 蛋白特异存在于小脑浦肯野细胞树突膜中, 此蛋白为糖蛋白, 含糖量约 40%。突触小泡蛋白可作为突触标记蛋白, 是主要存在于大脑皮质和海马的糖蛋白。其他的脑特有蛋白还包括神经钙蛋白、GP350 糖蛋白等。

第二节 脑的物质代谢与能量代谢

脑神经系统需要大量能量维持其持续活动。脑和神经组织仅占总体重的 1/40, 但正常人体在体力、脑力活动及睡眠等情况下的脑耗氧量却占全身总需氧量的 20% ~ 25%, 说明脑神经组织的物质代谢和能量非常旺盛。物质代谢所产生的 ATP 主要用于维持细胞跨质膜离子梯度和神经递质、其他细胞成分的合成。脑物质和能量代谢都有其明显特点, 以适应脑组织复杂的生物功能。

一、糖代谢

脑组织的糖代谢与其他组织糖代谢的不同特点在于, 正常脑神经元活动的能量几乎全部来自葡萄糖的氧化。大脑每天从血液里约摄取 120 g 葡萄糖, 当血糖降低时, 机体则减少或停止脑外组织对葡萄糖的消耗, 维持脑内的葡萄糖供应, 避免脑功能突然丧失。

葡萄糖转运蛋白 GLUT-1 可在脑血管内皮细胞中表达, 介导葡萄糖经血脑屏障向脑转运, GLUT-1 对葡萄糖的亲合力比血脑屏障的高 30 倍, 使葡萄糖能迅速通过血脑屏障。而 GLUT-2 和 GLUT-3 可参与转运葡萄糖进入神经元和胶质细胞。神经细胞内含糖量少, 脑内葡萄糖主要存在于细胞外液, 其浓度和脑脊液中的水平相似。

葡萄糖氧化途径的酶系位于神经元胞体及轴突末端,脑中的葡萄糖仅 15% 进入糖酵解,乳酸产量很少,脑组织能高速率转运出乳酸,未成熟脑乳酸运出脑更快,避免乳酸对脑功能的潜在毒性影响。葡萄糖主要进入有氧氧化,充分供氧时,脑中三羧酸循环以最大速率进行,ATP/ADP 比值变化是敏感调节因素。脑内三羧酸循环除释放能量外,还是合成氨基酸的重要原料来源。成人脑中,约 3% ~ 8% 葡萄糖经磷酸戊糖途径分解,发育期脑此途径活跃,特别在髓鞘形成的髓鞘化时期活性最高。该途径主要为脂肪酸、胆固醇类合成提供所需的 NADPH 及提供合成核苷酸需要的磷酸核糖。脑中糖原含量很少,仅含 3.3 mmol/kg 脑组织,可为神经元提供可利用的能量。脑糖原更新迅速,糖原合成、分解进行得快而持续。

用葡萄糖作为能源是正常脑能量代谢的特点。脑肌酸激酶活性高,促进磷酸肌酸 + ADP → 肌酸 + ATP,作为补充 ATP 的储备,维持细胞内高水平的 ATP。神经元线粒体分布不均,肌酸激酶可促进 ~P 穿梭输送到 ATP 酶和轴突等位点,完成能量的转运。

脑在异常情况下可利用其他糖类和非糖物质,如甘露糖、麦芽糖、酮体等。

二、脂质代谢

脑组织含有多种特异和复杂的脂质成分,其主要功用是维持膜结构的完整性,保证神经元间神经冲动电信号的正常传递。脂质构成神经细胞膜、膜性细胞器、髓鞘等,脂质代谢失常能引起相应的疾病。

(一) 脂肪酸代谢

脑中有利用酮体的酶系。在胎儿期、发育期或饥饿所造成的长久低血糖状态或糖尿病人体内无法利用葡萄糖时,脑可利用肝内脂肪酸氧化生成的酮体取代葡萄糖作为能源。此时酮体氧化耗氧可占脑总耗氧量的 1/4,最多可达 50%。

组成脑脂质的脂肪酸有少见的长链多不饱和脂肪酸,脑苷脂脂酰基中有 α -羟化的或 C_{23} 、 C_{25} 奇数碳原子脂肪酸(图 23-2)。脑脂肪酸解解除常见 β -氧化外还存在 α -氧化,每次脱去 1 个碳。通过 α -氧化过程可产生脑特有的 α -羟脂酸和奇数碳脂酸。脑中植烷酸等支链脂酸也需通过 α -氧化降解。植烷酸 α -羟化酶先天缺乏可使植烷酸在神经组织堆积造成严重神经疾病。脑甘油磷脂中多烯酯酸的生成,需食物提供亚油酸、亚麻酸(ω_3 、 ω_6 脂酸),它们被脑摄入后,逐步衍生成脑特有的 ω_3 、 ω_6 系列长链多不饱和脂肪酸。

(二) 类脂的代谢

脑中甘油磷脂合成代谢与其他组织相似。脑中可由磷酸二羟丙酮(DHAP)与脂酰 CoA 反应生成脂酰 DHAP,其酰基经酶促交换为烷基而形成醚酯。醚酯经脂酰化生成烷基 PE,再氧化为 PE 缩醛磷脂(图 22-3)。催化醚酯途径的酶系存在于脑细胞过氧化物酶体。

脑组织鞘脂质的合成类似其他组织。鞘脂质主要经溶酶体水解酶类的作用逐步降解,这些酶类缺陷可导致各种鞘脂质沉积症,多数病引起智力发育不全。

脑组织能合成大部分胆固醇,脑中胆固醇的更新速率极慢,神经元中则更慢。

三、氨基酸和蛋白质代谢

脑功能复杂,蛋白质含量丰富,种类多样,代谢旺盛,脑蛋白仅 85 h 就更新一遍。神经细胞胞体和线粒体是合成蛋白质的主要部位。部分细胞骨架蛋白由轴突直接合成。

脑内氨基酸交换更新非常迅速,半衰期仅几分钟。脑组织不断地从血浆及脑脊液中摄取氨基酸和自身合成非必需氨基酸,以保持脑中游离氨基酸含量的恒定。脑中氨基酸代谢有以下特点:① 脑组织内总氨基酸含量显著高于脑脊液和血液。② 必需氨基酸含量接近血浆水平,但更新极迅速,需及时由血液补充;非必需氨基酸的合成代谢活跃,其浓度比必需氨基酸高 8 ~ 300 倍。其中谷氨酸和天冬氨酸及其衍生物谷氨酰胺、GABA 等含量约占总游离氨基酸的 75%。③ 少数几种氨基酸和代谢酶为脑所特有。如 GABA 及 *N*-乙酰天冬氨酸仅在脑中富含,催化 GABA 生成的谷氨酸脱羧酶主要集中于脑灰质。脑内还特异

地存在某些肽类,如谷胱甘肽(GSH)含量很丰富。

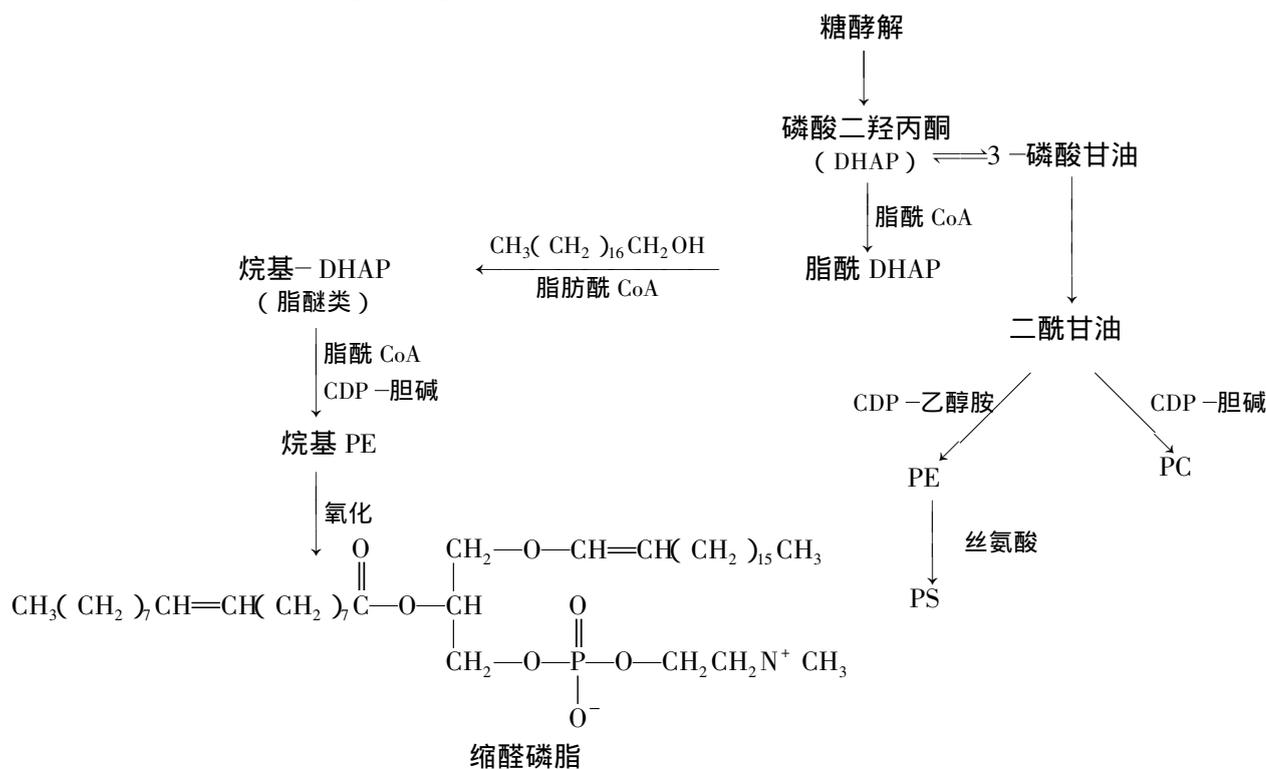


图 22-3 脑神经组织甘油磷脂合成

血液中的极性氨基酸分子不能自由通透血脑屏障进入脑组织,需要特殊氨基酸转运载体进行 Na^+ 依赖的耗能主动转运。脑内存在多种氨基酸转运系统,其中,广泛存在的低亲和力转运系统主要转运有一般代谢功能的氨基酸,对 Na^+ 梯度依赖性不确定。而高亲和、高底物特异转运系统主要转运清除具有生理活性的氨基酸神经递质,该载体依赖 Na^+ 梯度,存在于突触和突触后膜。

四、核苷酸和核酸代谢

脑组织核苷酸代谢活跃。脑不能进行嘧啶从头合成,但可利用肝合成的尿苷,通过补救途径生成 UMP,进而产生 UTP 和 CTP。脑有嘌呤核苷酸从头合成的全部酶系,同时补救合成也是脑产生嘌呤类产物的有效方式。脑神经元失去 DNA 复制能力,停止分裂。机体中以神经元的 RNA 含量最多,合成最旺盛,更新速率更快。

第三节 神经递质及神经递质受体

哺乳动物神经元之间的信息传递,除少部分通过突触的电传递外,绝大多数通过化学递质介导。神经递质在突触传递中起关键作用。现已发现的神经递质达 50~60 种。神经元通过神经递质进行的信号转导过程见图 22-4。神经细胞合成的递质贮存于突触前末梢的特定囊泡中。当动作电位刺激突触前神经元时,可引起相应递质释放入突触间隙,该过程依赖 Ca^{2+} ,并可被 K^+ 激活。递质作用于突触后膜相应受体,有的直接结合于离子通道受体,引起离子通道开闭;有的结合于相应的受体后,产生第二信使再引起离子通道开闭,造成快速、短暂的突触后电位改变和细胞代谢改变。根据信号转导的机制不同,神经递质的受体有离子通道型受体和 G 蛋白偶联型受体两类(图 22-5)。神经末梢 Na^+ 依赖的高亲和摄取系统促进多余递质迅速失活。

一、乙酰胆碱受体

乙酰胆碱(Ach)是中枢神经递质。胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)催化乙酰 CoA 与

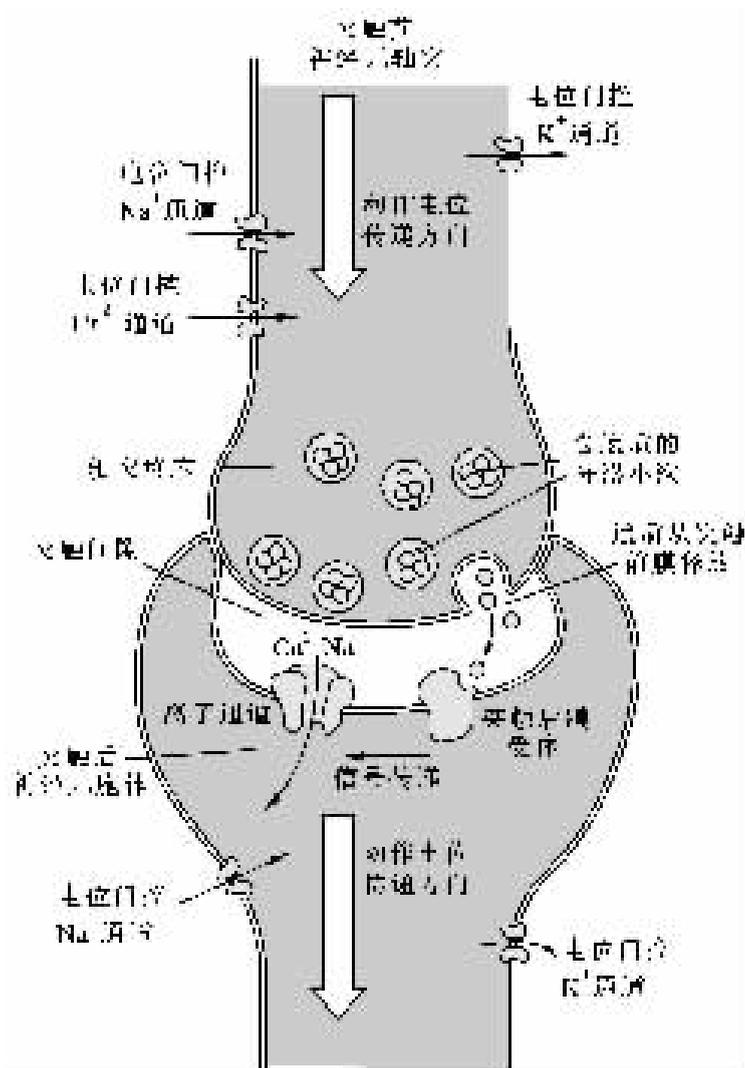


图 22-4 神经递质的突触传递机制

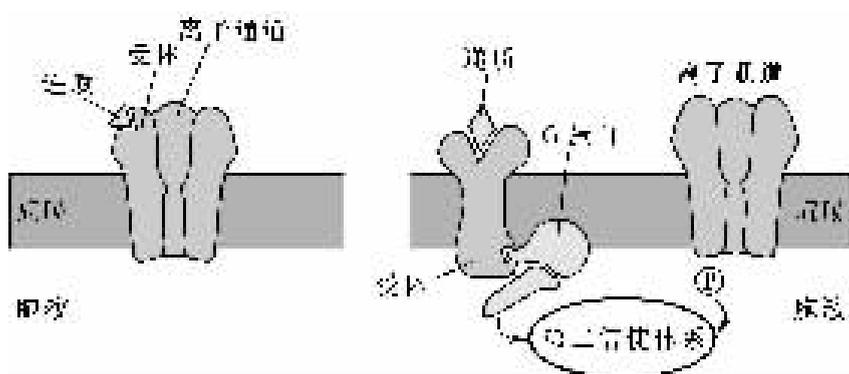


图 22-5 两类神经递质的受体及作用方式

胆碱缩合成 Ach。ChAT 在胆碱能神经元胞体合成,为胆碱能神经元的标记酶。乙酰胆碱能受体有烟碱受体(nicotinic receptor, NR)和毒蕈碱受体(muscarinic receptor, MR)。前者属快速反应受体,后者属慢速反应受体,各又有不同亚型。

1. 烟碱受体

烟碱受体是跨膜阳离子通道($Na^+/K^+/Ca^{2+}$ 通道),其结构见图 19-4。Ach 与 NR 结合后,通道被活化开放, Na^+ 内流超过 K^+ 外流,使局部去极化引起神经冲动(图 22-6)。

各类门控离子通道型受体结构与烟碱受体相似。该受体是由四种不同的亚基组成的五聚体糖蛋白($\alpha_2\beta\gamma\delta$)形成离子通道。每个亚基的跨膜区有 4 个疏水 α 螺旋结构域($M_1 \sim M_4$),其中的 $M_2\alpha$ 螺旋结构域围成离子通道孔的衬里,构成对离子流有限制作用的部位。5 亚基的 M_2 螺旋外侧疏水氨基酸与膜结

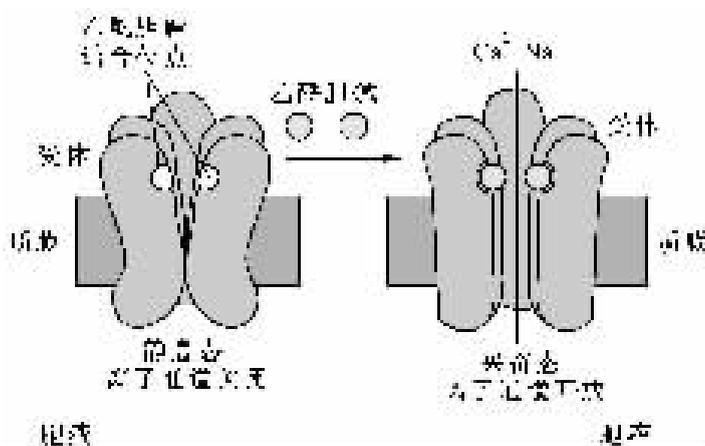


图 22-6 Ach 诱导烟碱受体开放

合,内侧所含的丝氨酸残基朝向孔道,为离子和水分子移动提供极性环境。另外, M_2 螺旋两端含带负电的氨基酸,使阳离子易进入通过。相反 GABA 受体为门控 Cl^- 通道,其受体结构与上述相似,但 M_2 螺旋两端含带正电的氨基酸残基,有利阴离子的通过。

2. 毒蕈碱受体

MR 为 G 蛋白偶联型受体(图 19-1),其活动规律与其他 G 蛋白偶联型受体相同。

3. 乙酰胆碱的递质功能

乙酰胆碱作为中枢神经递质有广泛的生物效应,如镇痛作用、觉醒与睡眠及体温调节等。乙酰胆碱在学习与记忆行为中起着重要的调节作用,基底前脑中胆碱能神经元广泛支配大脑皮层及有关结构,在识别、记忆功能中起重要作用。老年性痴呆患者表现胆碱能神经元选择性退行性病变。富含胆碱能神经元的大脑皮层、隔区和海马的损伤可引起学习、记忆功能缺陷。

二、单胺类神经递质和受体

单胺类神经递质包括儿茶酚胺类、5-羟色胺和组胺。脑中儿茶酚胺(CA)类递质包括多巴胺(DA),去甲肾上腺素(NE)和肾上腺素(E)。

5-羟色胺(5-HT)属于中枢神经递质,平均含量为 3 nmol/g 脑组织。组胺(HA)存在于脑神经细胞和肥大细胞,在脑中有神经递质作用。

生物胺类神经递质在脑中有多种重要的生理功能。多巴胺递质可调节锥体外系的运动功能,帕金森症病人脑黑质中 80% 以上的多巴胺能神经元退变,锥体外系失去自我平衡调控的运动功能。多巴胺递质还参与调控精神活动。脑内去甲肾上腺素含量比肾上腺素高 50~100 倍。脑中的去甲肾上腺素递质可介导中枢神经对心血管活动和脑血流量的调节等。脑 5-羟色胺递质有多种生理功用,可影响精神活动,在脑中突触前抑制 5-羟色胺能神经元,可产生抗焦虑作用,抑制 5-HT 合成可缓解焦虑。组胺在脑中的递质能调节神经内分泌和边缘系统的功能等。

三、氨基酸类神经递质和受体

氨基酸类神经递质按其作用可分为抑制性递质和兴奋性递质。

(一) 抑制性氨基酸

1. γ -氨基丁酸

γ -氨基丁酸(GABA)是一种中枢神经抑制性神经递质。GABA 主要分布于脑内,GABA_A 受体属配体门控 Cl^- 离子通道。开放后 Cl^- 内流,突触后膜超极化,抑制神经元放电而产生突触后抑制效应。GABA_B

型受体属 G 蛋白偶联型受体。脑神经 γ -氨基丁酸递质的功能包括抗焦虑、抗惊厥、镇痛及调节下丘脑、垂体内分泌作用。安定类药物通过变构调节增加 GABA 与受体结合,进而开启 Cl^- 通道,以治疗焦虑和防治惊厥。

2. 甘氨酸

甘氨酸主要是脊髓中间神经元的抑制性递质,对延脑、皮层等脑区抑制较弱。其受体广泛分布。此外,牛磺酸可能是脑干、脊髓等部位的抑制性神经递质,可通过甘氨酸受体起作用。

(二) 兴奋性氨基酸

哺乳动物脑中,谷氨酸和天冬氨酸是最重要的内源性氨基酸,有兴奋性神经递质效应,称兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)。实验证明,谷氨酸和天冬氨酸对中枢神经系统各部位神经元都有强烈兴奋作用。

哺乳动物脑中兴奋性氨基酸受体有以下类型:

1. 促离子型兴奋性氨基酸受体

促离子型 EAA 受体(ionotropic receptor)属于配体门控的离子通道,参与脑兴奋性突触传递过程。如 NMDA 型受体,其选择性激动剂为 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)。谷氨酸和天冬氨酸也是该受体的激动剂,受体主要分布于大脑皮质、海马、纹状体、中隔等部位的突触后膜。NMDA 受体活化开放 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ 通道,海马 NMDA 受体仅在学习和记忆中开放,充分参与和学习记忆机制相关的长时程增强和长时程抑制效应,因此 EAA 是与学习和记忆功能有关的重要递质。

2. 促代谢型兴奋性氨基酸受体

促代谢型 EAA 受体(metabotropic receptor)属于 G 蛋白偶联型受体,存在于各脑区。此类受体的重要作用是参与脑内兴奋性突触传递和调节神经元兴奋性。

兴奋性氨基酸及其他激动剂结合相应的受体除产生兴奋作用外,还有潜在的神经毒性。几乎所有神经元都有谷氨酸受体,各种急性脑损伤可导致兴奋性氨基酸递质大量释放,引起神经元细胞肿胀以至死亡,这种毒性作用称为兴奋毒性。中风、颅脑损伤、脑缺血等多种脑病理过程均可导致兴奋性氨基酸异常释放和兴奋毒性。老年性痴呆、帕金森症等脑退行性疾病发病过程中,兴奋毒性可能诱导神经元死亡。

四、一氧化氮和嘌呤类神经递质

(一) 一氧化氮

一氧化氮(NO)是一种脑中神经递质。NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)合成,合成后通过旁分泌直接作用于相邻神经细胞,诱导 cGMP-PKG 信号途径,NO 在发挥作用后数秒内即失活。脑中神经的 NO 参与突触可塑性形成,是动物学习记忆的细胞基础之一。

(二) 腺苷酸神经递质

脑内存在嘌呤能神经元,突触释放的 ATP、ADP 和腺苷也是一类中枢神经递质。嘌呤核苷酸的特异受体称为嘌呤受体,分 3 类,分别介导腺苷或腺苷酸作用。腺苷是脑神经抑制性神经递质,有神经保护作用。ATP 在蓝斑、海马显示为兴奋性神经递质,可介导细胞毒,引起细胞死亡。

除传统神经递质外,脑神经元末梢突触前还释放有生物活性的神经肽。至今已发现 50 余种。神经肽主要通过 G 蛋白偶联型受体介导,作用多样。很多神经肽作用出现慢,影响范围大,引起的电位、生化改变持久,属于慢化学传递。主要神经肽类型包括:① 神经激素类神经肽;② 内源性阿片肽类神经肽;③ 脑肠肽类神经肽;④ 其他类神经肽。有关这方面的知识,详见生理学教科书。

Summary

Brain nervous system is the command center of the body, which provides the communication net-

work between the environment and all parts of the body. Two sorts of nervous cells exist in brain. The neurons are responsible for collecting and transmitting messages. Each neuron consists of a cell body, dendrites and an axon. And the brain has about ten times more glial cells than neurons, they occupy spaces between neurons. The chemical composition of the brain includes carbohydrates, lipids and proteins. Compared with those in other tissues, the metabolisms of the three sorts of nutrients in the brain appear specific features to fit in with the brain function. Under normal conditions, the brain derives its energy from glucose metabolism. The brain contains specialized and complex phospholipids and sphingolipids. The brain has specific proteins system and higher proteins turnover rate.

In the brain the individual neurons can receive inhibitory and excitatory stimuli signals from a variety of different sources. A stimulus to the neuron results in the release of chemical neurotransmitters from presynaptic membrane into synaptic cleft, then the neurotransmitters bind to receptors in postsynaptic membrane and induce effectors. There are two sorts of neurotransmitter receptors. In the chemical synapses some neurotransmitters can bind directly to the ion channel-receptors and causes it to open or to close. Other neurotransmitter can bind to G protein-coupled receptor to pass through signal transduction pathway and to react with ion channel. Excitatory neurotransmitters include acetylcholine, catecholamines and excitatory amino acids etc. Inhibitory neurotransmitters include γ -aminobutyric acid (GABA), glycine etc. Nitric oxide and purine nucleotide are also neurotransmitters in brain.

思 考 题

1. 简述脑生化组成的特点。
2. 脑组织有何主要特异蛋白质和酶类。
3. 以神经元骨架蛋白、特异类脂组成为例说明神经细胞组成和功能的关系。
4. 说明脑神经糖代谢和能量代谢如何适应脑功能需要。
5. 比较乙酰胆碱、GABA 的离子通道型受体结构功能特点。
6. 脑中有哪些单胺类神经递质, 比较生理作用。
7. 论述不同神经递质通过 G 蛋白偶联受体介导的信号过程。
8. 简述氨基酸类神经递质受体和生理功能。
9. 讨论中枢 NO、嘌呤类神经递质作用特点。

(崔 行)

第二十三章 无机物生物化学

本章教学要求

- 水和无机盐的分布特点与生理功能。
- 钠、钾的代谢特点。血钠、血钾的平衡。
- 钙、磷、镁的代谢特点。血钙、血磷的平衡。
- 微量元素的定义、作用。铁、锌、碘的来源、体内代谢及生理功能。铜、锰、硒等其他微量元素的作用。微量元素缺乏症的原因。

人体各种细胞的内外都充满着水溶液,通常称为体液。体液分为细胞内液和细胞外液(包括组织间液与血浆)。它们都是由水与溶于水中的无机盐、有机物组成的,无机物与部分以离子形式存在的有机物统称为电解质。体液构成机体的内环境。保持体液的容量、分布和组成的动态平衡是维持正常生命活动的必要条件。

第一节 水和无机物在体内的重要功能

一、水的生理功能

水(water)对任何生物体都是不可缺的。这是因为水能促进体内物质的代谢。水是最好的溶剂,体内生化反应都是水相反应。此外,水还直接参与一些化学反应过程。水维持组织的形态与功能。体内的水除以自由水形式存在外,还有相当大一部分以结合水的形式与蛋白质、多糖及磷脂等结合,参与构成细胞原生质的特殊形态,保证一些组织独特生理功能的发挥。水能调节体温。水的比热大,流动性也大,是体内最有效的体温调节剂。水还有润滑作用。

二、主要无机盐的一般生理功能

(一) 维持体液的容量与渗透压

无机盐离子能调节细胞膜对水的通透性,控制水分的走向,维持正常渗透压。其中 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、 HPO_4^{2-} 在维持细胞内、外液的容量和渗透压方面更起着重要作用。

由于 Na^+ 、 Cl^- 主要存在于细胞外液(约占80%),而 K^+ 主要存在于细胞内,所以它们分别是决定细胞内外液的容量与渗透压的主要无机离子。

由于钠能调节细胞外液容量、维持血压,所以细胞外液钠浓度的细小而持续的变化对血压就有很大的影响。

(二) 维持体液的酸碱平衡

在血液的缓冲系统、肺和肾的调节下,正常人的组织间液与血浆的pH总是稳定在7.35~7.45范围内,维持着相对的恒定。在血浆众多的缓冲系统中,由 NaHCO_3 与 H_2CO_3 组成的缓冲对最为重要,因为血浆中 HCO_3^- 和 H_2CO_3 的浓度较高,而且肺通过排出 CO_2 对调整血浆中 H_2CO_3 的量,肾则通过对 Na^+ 的重

吸收或排泄来调整 NaHCO_3 的含量,以维持血浆 NaHCO_3 与 H_2CO_3 的正常浓度和比值。正常血浆的 $[\text{NaHCO}_3]$ 与 $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ 分别为 25 mmol/L 和 1.25 mmol/L ,其比值为 $20:1$,根据 Henderson - Hasselbalch 方程式,可计算出血浆 $\text{pH} = 7.4$ 。

$$\text{pH} = \text{pK} + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} \quad (\text{pK} = 6.11)$$

体内代谢过程中产酸大大多于产碱,这是因为食物中的糖类、脂质、蛋白质等在体内经代谢最终都要产生大量的酸性物质,食物中只有蔬菜、水果含有较多的 Na^+ 、 K^+ 等无机金属离子,它们经体内代谢后将与 HCO_3^- 离子组成 NaHCO_3 或 KHCO_3 ,它们作为碱性物质的贮备,用以对酸性物质的缓冲。尤其是 K^+ 往往被称为“碱性离子”,具有抗疲劳作用,其原因就是因为它能维持体内的微碱性环境,从而使体内绝大多数酶能在最佳 pH (一般都在微碱性)条件下发挥作用。

(三) 维持神经肌肉的应激性

各种无机离子的浓度决定神经肌肉的应激性。

$$\text{神经肌肉应激性} \propto \frac{[\text{Na}^+] + [\text{K}^+]}{[\text{Ca}^{2+}] + [\text{Mg}^{2+}] + [\text{H}^+]}$$

当血浆中 Na^+ 、 K^+ 浓度增高时,神经肌肉应激性增高。钾和细胞外钠合作,激活细胞膜 Na^+/K^+ -ATP 酶,释放能量,维持细胞内外钾、钠离子的浓差梯度,产生膜电位,使膜具有电信号能力。膜去极化时在轴突产生动作电位,激活肌肉纤维收缩并引起突触释放神经递质。钾、钠维持神经肌肉的应激性和正常功能。钾、钠过低时,神经肌肉应激性降低,可出现肌肉软弱无力,甚至麻痹。而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 H^+ 浓度增高时,神经肌肉应激性降低;血 Ca^{2+} 过低时,神经肌肉应激性升高,所以在小儿缺钙时,常出现手足搐搦。

无机离子对心肌细胞的应激性也大有影响。

$$\text{心肌应激性} \propto \frac{[\text{Na}^+] + [\text{Ca}^{2+}] + [\text{OH}^-]}{[\text{K}^+] + [\text{Mg}^{2+}] + [\text{H}^+]}$$

血 K^+ 过高对心肌有抑制作用,可使心搏舒张期延长,心率减慢,严重时甚至可使心跳停止于舒张期。血 K^+ 过低常出现心率紊乱,使心跳停止于收缩期。 Na^+ 和 Ca^{2+} 可拮抗 K^+ 对心肌的作用,正常的血钠和血钙浓度可维持心肌的正常应激状态,以保证其完成正常的功能。

(四) 维持细胞正常的新陈代谢

无机盐尤其是金属离子往往作为辅基(辅酶)或酶的激活剂而起作用,直接参与或影响体内的物质代谢。

第二节 水和重要电解质的代谢

一、水代谢

(一) 水的来源

正常成人在一般情况下,每日需要总量约 $2000 \sim 2500 \text{ mL}$ 的水。其来源除了食物与饮料外,还来自物质代谢生物氧化过程所产生的水,即代谢水(内生水)。每天若摄入 12600 kJ (3000 kcal)的热量,将生成约 300 mL 的内生水。

(二) 水的去路

正常成人在一般情况下,每日排出的水量也约在 $2000 \sim 2500 \text{ mL}$ 。其去路有(1)肾排出。这是水的主要排出途径,也是水平衡的主要调节手段。一般成人每天排尿量约 $1000 \sim 1500 \text{ mL}$,排尿的目的是

为了将溶解于水的物质代谢所产生的固体性废物,如非蛋白含氮化合物及多余的电解质等排出体外。据测定,每日约产生 35 g 以上的上述物质,需要至少 500 mL 水才能使其充分溶解,否则代谢废物将潴留体内,造成中毒。所以 500 mL 被认为是每天最低排尿量。若低于 500 mL,在临床上称为少尿,少于 100 mL 称为无尿。(2)皮肤蒸发。在一般(不考虑明显出汗)的情况下,每日从皮肤蒸发的水分约为 500 mL,称隐性出汗。(3)肺呼出。呼吸过程伴有气体交换,同时要排走部分水分。每日从肺排出的水分约 350 mL。(4)粪便排出。每日约 150 mL。根据以上计算,每日排出水量约不少于 1 500 mL。为了保持体内水的平衡,人体每天理应补充至少 1 200 ~ 1 500 mL 的水。此数值常被称作为最低需水量,是临床补充水分的一个依据。

二、钠、钾的代谢

(一) 钠的代谢

钠(sodium)是细胞外液的主要阳离子。钠主要来自食物中的盐,每天需要的氯化钠约 5 g ~ 9 g。约有 45% 的钠存在于骨组织,45% 的钠分布在细胞外液,只有 10% 的钠在细胞内液。正常人血钠浓度为 135 ~ 145 mmol/L。

钠主要由肾排出,少量由粪便与汗液排出。肾排钠阈值为 110 ~ 130 mmol/L。肾对血钠浓度的调节能力很强,血钠过高则很容易由肾排出,若过低,则刺激肾小管对钠的重吸收能力,若无钠摄入,则肾排钠量可以降至零。大量排汗时将丢失较多的钠(汗液含钠量约为 0.25%,属低渗溶液),此时应及时补充氯化钠。

钠作为重要的无机盐,对于人体的功能是重要的,但钠过量所造成的危害更加令人关注。据流行病学调查,钠过量是高血压、肥胖及动脉硬化的重要诱发因素之一。钠在肿瘤形成过程中也起促进作用。另外,过高的钠将造成肾的损伤等。不幸的是,在我国,尤其在沿海与北方地区,钠的摄入量远超过正常需求量,应引起高度警惕。

(二) 钾的代谢

钾(potassium)是细胞内的主要阳离子。钾主要来自植物性食物及肉类。正常成人每天需钾约 2.5 g。体内钾主要贮存于肌细胞中,约占 70%。血清中钾含量较少,约 3.5 ~ 5.3 mmol/L,但相当稳定。

钾主要由肾排出,肾有很强的排钾能力,但与排钠不同的是,肾对钾的控制能力远不如对钠那么严格而有效。肾每天至少排钾 10 mmol,即使在人体总体缺钾时,肾仍然以一定的速率排出钾。所以对长期不能进食的患者要监测其血钾含量,以确定是否需要补钾。

细胞内外的钾虽能自由透过细胞膜,但速率十分缓慢。静脉注射同位素钾,15 h 才能与细胞内钾达到平衡,心脏病患者则要 45 h 才能达到平衡。因此,临床上在补钾时一定要慎重,首先在肾功能基本正常的前提下,应尽可能选择口服补钾。若静脉注射,则浓度不宜过高,且要缓慢、均匀地输入,以免因过多、过快而造成暂时性的高血钾。

血钾还受代谢的影响。当糖原、蛋白质合成时,钾将进入细胞内,参与反应过程。实验证明,当合成 1 g 糖原时,有 0.15 mmol 的钾进入细胞,而合成 1 g 蛋白质时,将有 0.45 mmol 的钾进入细胞。反之,当它们分解时,则有同量的钾释出细胞。因此,在创伤愈合期、组织生长旺盛期或静脉注射胰岛素加葡萄糖时,由于合成糖原和蛋白质增多,可能造成血钾下降。反之,当严重创伤(包括烧伤、大手术)、感染和缺氧的情况下,应注意有引起高血钾的可能。

K^+ 的平衡还受血浆 pH 的影响。当 $[H^+]$ 升高时,组织细胞膜处的 H^+ 与 K^+ 交换加强,使 K^+ 释出细胞;同时肾小管细胞泌 H^+ 作用加强,会减弱正常 K^+ 的排出。这些都可能导致高血钾。所以在临床上酸中毒易并发高血钾。反之,碱中毒将诱发低血钾。

总之,钾代谢的特点是细胞内外钾分布极不均匀,钾进入细胞极为缓慢,肾排钾,但不随缺钾而减缓;钾的平衡还与物质代谢及酸碱平衡有着相互影响。

三、水和钠、钾代谢的调节

由于水和钠、钾的代谢与体液的组分及容量密切相关,所以它决定了体液的等渗性及等容性,而这正是细胞生存和生命活动最基本的条件。机体在中枢神经系统的总体控制下,通过神经—体液调节途径,对水和钠、钾进行着动态平衡的调节(图 23-1)。

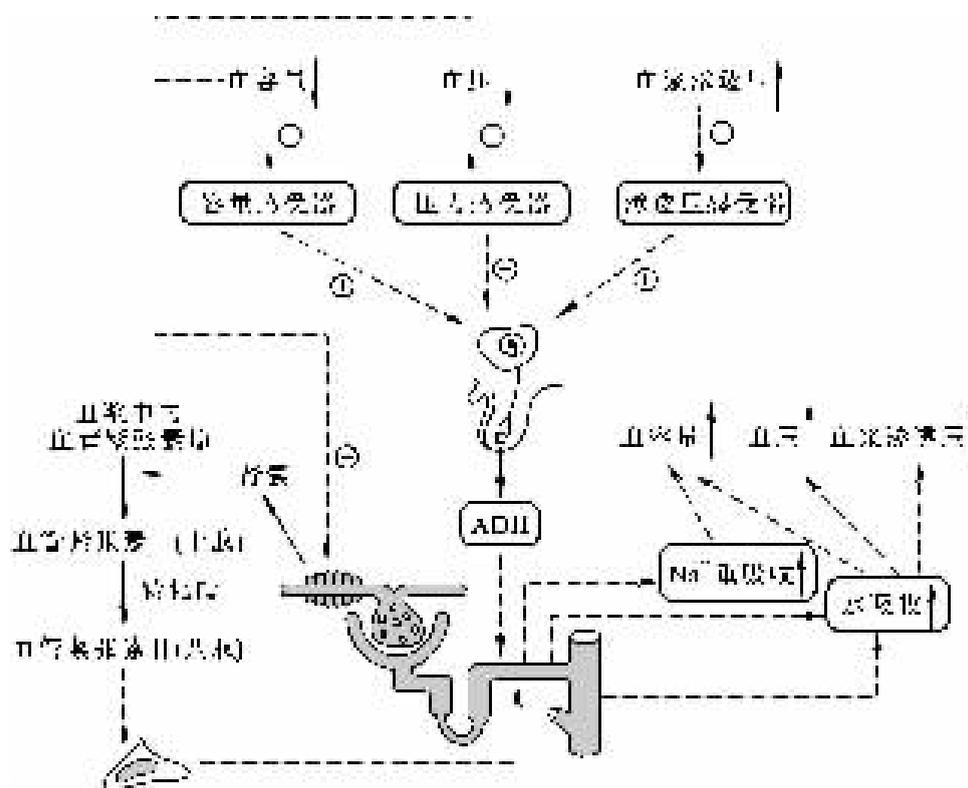


图 23-1 水和电解质代谢的调节

中枢神经系统对水的代谢首先是通过体液渗透压感受器和压力感受器进行调节的。体液渗透压升高,或血容量下降,将刺激丘脑下部的渴感中枢,产生口渴的生理要求。血容量下降还可以激活肾素—血管紧张素—醛固酮系统,通过血管紧张素 II 的分泌,作用于大脑皮质,引发上述效应。

在神经—体液调节系统中,主要的调节因素有抗利尿激素(antidiuretic hormone, ADH)及肾皮质分泌的醛固酮(aldosterone)等,它们主要的靶器官均为肾。

抗利尿激素的作用机制主要是促进肾远曲小管和收集管细胞内 cAMP 的生成。cAMP 活化蛋白激酶 A,后者促进膜蛋白磷酸化,增加肾小管膜对水的通透性,加速对水的重吸收,降低排尿量,以维持血容量。因 ADH 有升血压作用,故又名加压素。

醛固酮是肾皮质球状带分泌的一种类固醇激素,影响它分泌的主要因素有肾素—血管紧张素系统和血钾、血钠浓度。醛固酮能促进肾远曲小管和收集管上皮细胞分泌 H⁺ 和 Na⁺ 进行交换,同时也能促使排 K⁺ 以换回 Na⁺。总之,使 Na⁺ 重吸收增加,同时也增加了水的重吸收,从而调节血容量和细胞外液容量。

第三节 钙、磷和镁的代谢

一、钙、磷的代谢

(一) 钙、磷在体内动态分布和生理功能

钙 (calcium, Ca)、磷 (phosphorus, P) 是人体内含量最多的无机盐, 正常人钙含量约占体重的 1.5% ~ 2%, 磷占 0.8% ~ 1.2%, 其中 99% 的钙和 86% 的磷以羟磷灰石 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2]$ 的形式存在于骨和牙中, 其余以溶解状态的离子形式分布在体液与软组织中, 细胞外液的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 比细胞内液的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 约高 10 000 倍, 而细胞外液的磷则远低于细胞内液。虽然 $[\text{Ca}^{2+}]$ 仅占总钙的 1%, 但正是 $[\text{Ca}^{2+}]$ 在物质代谢、信号传导方面起着极其重要的作用。细胞内液的 Ca^{2+} 受细胞膜钙泵和细胞内膜系统 (内质网膜、线粒体膜) 上的钙泵的双重作用, 结果使细胞内膜系统的钙比胞质钙多数百倍, 它们往往以钙-磷酸复合物的形式存在, 是细胞内可迅速利用的钙库。细胞内液 $[\text{Ca}^{2+}]$ 虽然极低 (在 $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$ 水平), 但相当稳定。当受体被激活或在生物信号的刺激下, 胞膜钙离子通道将开放, 胞外 Ca^{2+} 内流, 瞬间增高的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 将进一步发挥生物放大效应。细胞也可以通过自身的调控功能, 使胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$ 恢复到静息水平。

钙和磷的生理功能除了构成骨骼和牙齿之外, 还具有以下功能:

(1) 钙是体内多种酶的激活剂, 体内许多重要的酶都受 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的调节。如蛋白激酶 C、腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶、磷酸二酯酶、NO 合酶、酪氨酸羧化酶和色氨酸羧化酶等。

(2) 钙调节细胞膜的通透性, 在细胞膜的表面结合着各种阴离子, 而在神经、肝、红细胞和心肌等的细胞膜上另有钙结合部位, 由于 Ca^{2+} 的分子大小适合于结合这些阴离子, 当 Ca^{2+} 从这些部位释放时, 膜的结构和功能发生变化, 导致有关信号的触发, 改变细胞膜对钾、钠等阳离子的通透性等等。钙在此处起电荷载体作用。

(3) Ca^{2+} 参与调节心和神经的正常活动, 维持肌肉一定的紧张力, 此外 $[\text{Ca}^{2+}]$ 还与神经递质的释放、神经冲动的传导、激素的分泌、血液的凝固、细胞黏附等的生理活动密切相关, 以 $[\text{Ca}^{2+}]$ 作为第二信使组成的这一复杂的调节系统被称为钙信使系统 (calcium messenger system), 目前公认为是细胞外的信使 (如激素等) 调节细胞功能的普遍机制之一 (详见第十九章 细胞信号传导)。

(4) 磷是核酸的组成成分, 磷帮助细胞分裂和增殖及核蛋白的合成, 将遗传特征从亲代传至子代, 磷是磷脂的组成成分, 磷脂是组成细胞膜的主要脂质成分, 与膜的通透性有关。磷脂更是脂蛋白的重要组成部分, 决定脂质的运载, 是三酰甘油、胆固醇在血浆中的载体成分; 有机磷酸盐如 ADP、ATP、磷酸肌酸等具有贮存和转移能量的作用, 是细胞内化学能的主要来源; 体内羟基化合物生化过程的第一步激活反应, 往往是磷酸化反应, 焦磷酸硫胺素、磷酸吡哆醛、辅酶 I 和 II 等往往以辅酶的形式参与生化反应而发挥作用, 磷能刺激神经肌肉, 使心肌和肌肉有规则地收缩。可见磷对细胞的生理功能极为重要。

(二) 钙、磷的吸收与排泄

1. 钙、磷的吸收

乳及乳制品含钙丰富, 且吸收率又高, 是最好的钙源, 水产品中小虾皮含钙最多, 其次是海带等。含磷较多的食物是谷类、豆类、硬壳果及肉、鱼、牛乳、乳酪等。

钙、磷的主要吸收部位在小肠, 其中十二指肠和空肠为最有效的吸收区。食物中钙虽然含量不少, 但大多以难溶的钙盐形式存在, 只有转变为游离 Ca^{2+} 后才被吸收。所以成人的吸收率通常只有 20%, 40 岁之后, 钙吸收率以每 10 年平均减少 5% ~ 10% 的速率直线下降, 所以老年人常因摄入钙不足而易患骨质疏松症。肠黏膜对钙的吸收机制较为复杂, 既有主动吸收, 又有被动扩散; 既有跨膜转运, 又有细胞内转运。已知肠黏膜细胞含有多种钙结合蛋白 (Calcium binding protein, CaBP), 它与 Ca^{2+} 有较强亲和力, 可促使钙的吸收。

影响钙吸收的主要因素有: 肠道的酸性环境使钙容易处于溶解状态, 胃酸、氨基酸、乳酸等因为与钙形成可溶性钙盐, 都增加它的溶解度而促进钙的吸收。而植物成分中的植酸盐、纤维素、糖醛酸、藻酸钠和草酸因与钙形成不溶性钙盐而降低钙的吸收。食物中的钙往往与磷同时存在, 当磷酸盐含量过高时可在肠道形成难溶的磷酸钙复合物, 抑制钙的吸收, 同时也抑制磷的吸收。目前虽仍有争论, 但较多学者认为, 食物中的钙/磷比在 1.5/1 时对于钙与磷都有最佳的吸收率。

食物中的磷大多以磷酸盐、磷蛋白、磷脂的形式存在, 后二者都需要水解成磷酸盐后才被吸收, 磷的吸收率约 70%, 在低磷时可达 90%, 因此缺磷在临床上极为罕见。凡影响钙吸收的因素也可影响磷的吸收。

2. 钙、磷的排泄

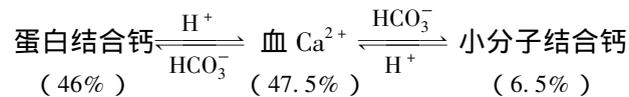
(1) 钙的排泄 正常成人摄入的钙中约 80% 从粪便排出 20% 由肾排出。粪便中的钙来自未被吸收的钙,其排出量视食物中钙含量和钙吸收状况而有很大波动。血浆钙每天约有 10 g 经肾小球滤过,但其中 95% 以上仍被肾小管重吸收,这种吸收主要受到甲状旁腺素的严格调控,使每日从尿中排出的钙量比较稳定。

(2) 磷的排泄 磷排泄与钙相反,粪便排出磷占总排出量的 20% ~ 40%,多以磷酸钙的形式排出。磷大部分由肾排出,尿磷排出量占总排出量的 60% ~ 80%。当血磷浓度降低时,肾小管对磷的重吸收增强。

(三) 血钙、血磷及其调节

血钙正常值为 2.2 ~ 2.7 mmol/L。血中钙可分为可扩散钙(diffusible calcium)和非扩散钙(nondiffusible calcium)。可扩散钙主要是游离 Ca^{2+} 以及少量与柠檬酸或其他酸结合的小分子可溶性钙盐;而与血浆蛋白(主要是清蛋白)结合的钙,因为不易透过血管壁,被称为非扩散钙。

血浆中发挥生理作用的主要是游离 Ca^{2+} ,它的浓度与蛋白结合钙以及其他小分子结合钙之间呈动态平衡状态。该平衡受血浆 pH 的影响,当血浆 pH 上升时,蛋白结合钙增多,游离 Ca^{2+} 浓度下降。因此,临床上在碱中毒时,常伴有低血钙造成的肌肉抽搐。



血磷主要指的是血浆中 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} (占绝大部分)中所含的磷,但实际上因测定不方便,常以无机磷酸代之。正常人血磷浓度为 1.0 ~ 1.6 mmol/L,其中 90% 是可扩散的磷酸盐。

血浆中钙、磷浓度的关系很密切,也很恒定,若以 mg/d 计,二者的乘积,即 $[\text{Ca}] \times [\text{P}]$ 约为 35 ~ 40,称为钙磷浓度积。当此值大于 40 时,骨组织中成骨作用加强,血中钙磷往往以骨盐形式沉积于骨组织,若此值小于 35,则溶骨作用加强,以补充血中钙磷的不足。该关系还提示我们,血钙磷中一种成分的上升将导致另一成分的下降。但应该指出,钙磷浓度积的概念是不确切的,因为血钙理应包括蛋白结合钙和柠檬酸钙等在内。但在临床上由于计算方便而仍然被使用着。

血钙、血磷浓度的相对稳定除依赖钙、磷的吸收及排世外,还取决于骨组织的钙化与脱钙作用(图 23-2)。这些平衡受到活性维生素 D_3 、甲状旁腺素(parathormone, PTH)与降钙素(calcitonin, CT)等激素的调节。骨、小肠和肾是这些激素进行调节活动的三个主要器官。

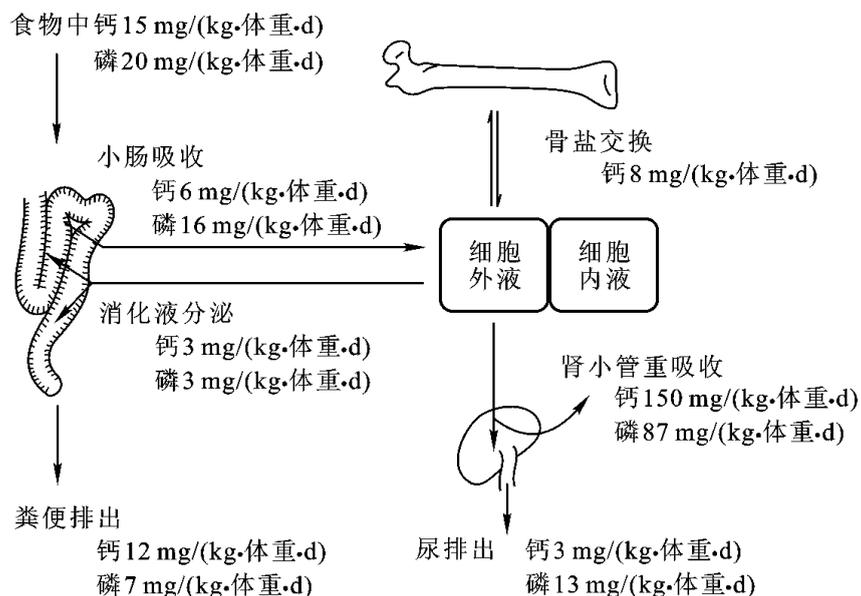


图 23-2 人体的钙、磷平衡

1. 维生素 D

维生素 D 的活性形式为 1,25-二羟维生素 D₃ [1,25-(OH)₂-D₃] ,它主要是由皮肤细胞的 7-脱氢胆固醇在阳光中紫外线 (UV) 照射下转变为维生素 D₃ ,再在肝、肾经过二次羟化而生成的(图 23-3) 。1,25-(OH)₂-D₃ 可与肠黏膜细胞的受体结合 ,进入细胞核 ,促进合成对钙具有强亲和力的钙结合蛋白 (CaBP) ,后者与钙离子结合而转运钙 ,从而促进了钙的吸收。同时 1,25-(OH)₂-D₃ 还能活化肠上皮细胞内的钙结合蛋白 ,更有利于钙的吸收。1,25-(OH)₂-D₃ 还能与 PTH 协同 ,促进骨钙溶解 ,释入血液。此外 ,它还可以增加肾小管对钙和磷的重吸收。总之 ,它使血钙和血磷升高。

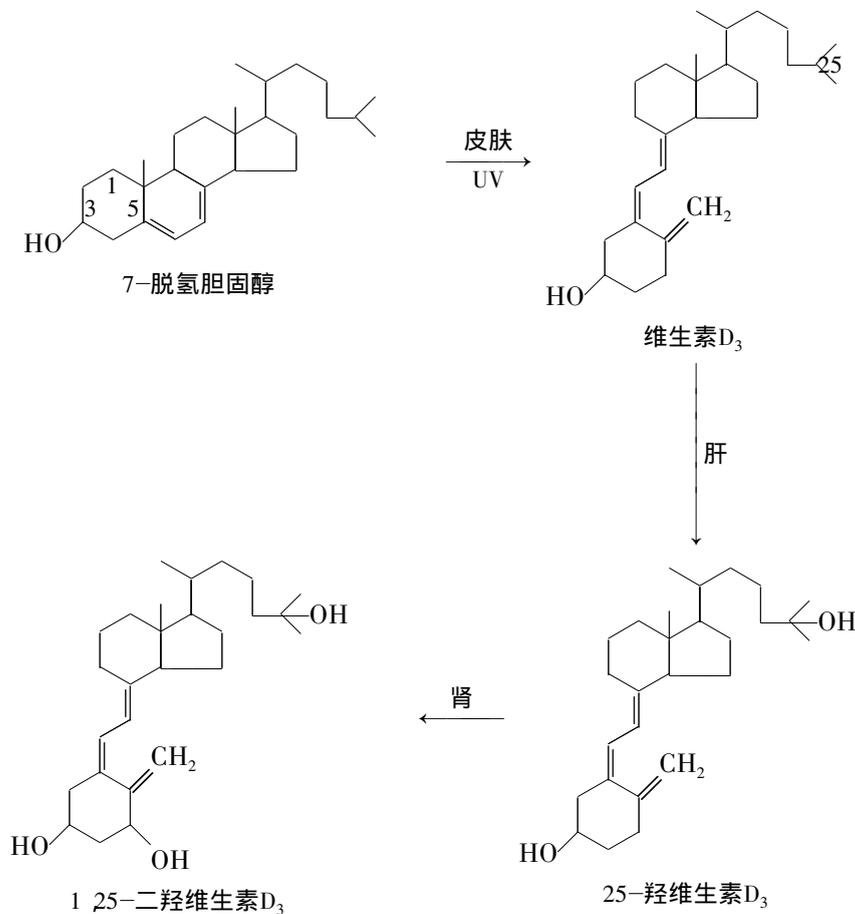


图 23-3 活性维生素的合成过程

2. 甲状旁腺素

甲状旁腺素 (PTH) 是由甲状旁腺的主细胞合成分泌的、由 84 个氨基酸残基组成的多肽激素。由于钙离子能抑制甲状旁腺主细胞的腺苷酸环化酶 ,使生成的 cAMP 浓度下降。而 cAMP 对 PTH 的分泌有促进作用。所以 ,低血钙是促使贮存的 PTH 立即分泌的信号。持续的低血钙 ,还能抑制 PTH 的降解。PTH 一方面作用于肾 ,促进钙的重吸收和磷的排出 ,同时 PTH 可在肾中激活 1- α -羟化酶的活性 ,使弱活性的 25-(OH)-D₃ 转变为 1,25-(OH)₂-D₃ ,也促进了小肠对钙的吸收。另一方面 ,PTH 在 1,25-(OH)₂-D₃ 的协同下 ,作用于骨 ,动员骨钙释放至血浆。总之 ,PTH 使血钙升高 ,而使血磷下降。

3. 降钙素

降钙素 (CT) 是甲状腺滤泡旁细胞 (又称 C 细胞) 分泌的、由 32 个氨基酸残基组成的多肽激素。血钙升高是 CT 分泌的信号。CT 作用的主要靶器官是肾与骨 ,与 PTH 相反 ,它抑制骨盐溶解 ,对肾则抑制钙、磷的重吸收 ,从而降低血钙与血磷(表 23-1)。

表 23-1 维生素 D₃、PTH、CT 对钙磷代谢的调节

调节物	血钙	血磷	小肠钙吸收	成骨	溶骨	尿钙	尿磷
1,25-(OH) ₂ -D ₃	↑	↑	↑ ↑	↑	↑	↓	↓
PTH	↑	↓	间接 ↑	↓	↑	↓	↑
CT	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↑

三种激素对钙、磷代谢的调节见图 23-4。

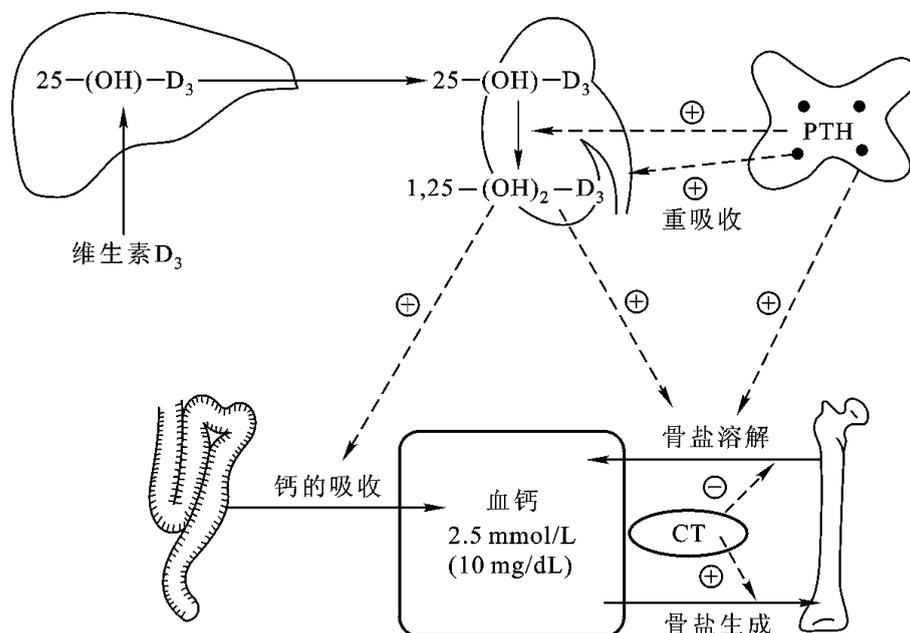


图 23-4 三种激素对钙、磷代谢的调节

二、镁的代谢

因镁 (magnesium) 位于叶绿素的结构中心, 所以绿叶植物是镁最丰富的来源。此外, 在动物内脏、谷类、豆类食物及蜂蜜中含镁量也较高。

体内镁主要存在于细胞内。血镁的浓度虽然仅在 0.8 ~ 1.2 mmol/L 范围内, 但相当恒定, 不因机体缺镁而下降。

1. 镁是众多酶的激活剂。如己糖激酶、Na⁺/K⁺-ATP 酶、羧化酶、丙酮酸脱氢酶、肽酶、胆碱酯酶等都以 Mg²⁺ 作为激活剂, 参与体内三大物质代谢反应、氧化磷酸化、还参与离子转运、神经冲动的产生和传递、肌肉收缩等过程; 甚至在维生素 C、E、B 族的利用和改造、核酸的结构完整、转录和翻译的保真性等许多方面都与 Mg²⁺ 的作用相关联。可以说, 在人体生命活动的各个环节中镁几乎无处不在。

2. 镁是维持骨细胞结构、促进骨骼生长和维持功能所必需的元素。

3. 镁对心血管系统的功能密切相关。镁主要作用于周围血管系统, 小剂量镁可引起血管扩张, 较大剂量则可降低血压, 在正常人尤为明显。镁缺乏使血管紧张肽和血管收缩因子增加, 引起动脉的突然收缩。镁还影响心肌的收缩, 在缺氧情况下, 心肌中镁很快丢失, 心肌纤维坏死, 而摄入镁盐后可使其逆转。死于心肌梗死者心肌镁含量减低, 而死于慢性心脏病者心肌镁含量却并不减少, 因此, 认为心肌含镁量降低是心肌梗死患者易发猝死的一个因素。Mg²⁺ 是肌细胞膜上 Na⁺/K⁺-ATP 酶必需的辅助因子, Mg²⁺-ATP 作为激活剂, 激活心肌中腺苷酸环化酶, 在心肌细胞线粒体内, 刺激氧化磷酸化而释能。Mg²⁺ 又参与肌质网对钙的释放和结合, 从而影响心肌的收缩过程。

4. 镁离子在肠腔中吸收缓慢, 促进水分在肠腔中的滞留, 因此镁具有导泻作用。低浓度镁可减少肠

壁张力和蠕动,有解痉作用。低渗硫酸镁溶液经十二指肠时,可使奥狄括约肌松弛,短期增加胆汁流出,促进胆囊排空,因此具有利胆作用。

Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 在肠道吸收时表现为相互竞争,因此在低镁血症时,其症状可因为摄入高钙食物而加重。在对神经肌肉应激性的作用方面,钙与镁虽然同样表现为抑制作用,但二者在作用过程中,又具有拮抗作用。 Mg^{2+} 对中枢神经系统的抑制作用可由于 Ca^{2+} 的存在而减弱, Mg^{2+} 所造成的肌神经信号传递阻滞,也可被钙所拮抗。而在对心肌应激性的作用方面,二者的表现却截然相反。镁能参与肌质网对钙的释放与结合,从而影响心肌的收缩过程。它们由于都能与某些酶或受体结合,而且这种结合具有竞争性,所以所起的作用往往相反。总之,镁、钙之间以竞争作用为多见。因此,镁中毒时,可以用钙来作为解毒手段之一。

镁与钾也具有协同作用。镁能兴奋细胞膜上 Na^+/K^+-ATP 酶,促使钠泵运转,使细胞外钾向细胞内移动。同时,镁能使细胞膜对 K^+ 的通透性下降,使 K^+ 难以逸出细胞外,减少 K^+ 的丢失。所以低血镁时,钠泵活动迟缓,细胞内钾外流增多,可能导致细胞内低钾。

镁代谢还受甲状腺素的影响。甲状腺素可使镁从尿排出增多,血镁降低,使总体处于缺镁(负平衡)状态。另外,甲状腺素本身对物质代谢的促进作用又增加机体对镁的需求量。所以甲亢病人经常出现低镁症状。

第四节 微量元素

含量占人体总重量万分之一以下,或每日需要量在 100 mg 以下的元素称为微量元素(trace element),如铁、铜、锌、碘等约 50 多种元素。微量元素的总量仅占总体重的 0.05% 左右。目前公认的人体必需微量元素有铁、铜、锌、碘、锰、硒、氟、钼、钴、铬、镍、钒、锶、锡等 14 种,绝大多数为金属元素。微量元素主要来自食物,动物性食物含量较高,种类也较植物性食物多。

微量元素在体内的作用是多种多样的,但主要还是通过与蛋白质、酶、激素和维生素等相结合而发挥作用的。微量元素的一般生理作用主要有以下方面(1)参与构成酶的活性中心或辅酶。金属酶和金属激活酶的发现确认了微量元素在酶促反应中的关键性作用,已知人体内有一半以上的酶其活性部位含有微量元素,甚至有些酶需要一种以上的微量元素才能发挥其最大活性;(2)参与体内物质运输;(3)参与激素和维生素的活性结构的形成。

随着对微量元素的认识的不断深入,其在人体中的作用日益受到人们的重视,人们发现许多微量元素在生化、生理、营养、肿瘤的发生及临床诊断中都具有极其重要的意义,并揭示了一些原来病因不明、不易防治的疾病的发病机制。如缺硒导致克山病、缺锌诱发侏儒症、缺碘导致地方性甲状腺肿等。

一、铁

(一) 铁在人体内的含量与分布

正常成年人体内含铁(iron)约 3~5 g,平均 4.5 g。女性稍低,与月经期失血失铁、怀孕期及哺乳期铁的消耗量增加有关。

铁是血红蛋白和肌红蛋白的重要组成成分,血红蛋白含铁占铁总量的 65%~80%,肌红蛋白约占 5%。此外,以铁卟啉为辅基的酶,如过氧化物酶、过氧化氢酶、细胞色素类、铁硫中心等结构中约占 1%,其余的 25% 为贮存铁。

体内铁的贮存主要是以铁蛋白(ferritin)和血铁黄素(hemosiderin)的形式沉积在肝、脾、骨髓、骨骼肌、肠黏膜、肾等组织中。

(二) 铁的来源

动物性食物,如血、肝、瘦肉,不仅含铁丰富而且吸收率很高。植物性食物中则以黄豆和小油菜、太古

菜等铁的含量较高。其中黄豆中的铁不仅含量较高且吸收率也较高,是铁的良好来源。用铁质炊具烹调食物可显著增加膳食中铁含量,用铝和不锈钢取代铁的烹调用具就会使膳食中铁的含量减少。

食物中的铁可分为血红素铁和非血红素铁两类,有机态的血红素铁吸收率较高,约为30%,而非血红素铁(一般为无机态铁)吸收率较低,仅5%。在我国国民的每日膳食中含铁约10~15 mg,基本能满足需求。

体内铁的来源,除上述来自食物外,还来自体内红细胞衰老破坏后所释放的血红蛋白铁,后者并不排出体外,而以铁蛋白的形式贮存体内,一旦需要可重新用于合成血红蛋白、肌红蛋白及其他含铁卟啉结构的物质。

(三) 铁的吸收与排泄

1. 铁的吸收

铁的吸收部位主要在胃、十二指肠和空肠。胃酸可促使铁成为离子态铁或成为结合疏松的有机态铁,有利于铁的吸收。在肠道 pH 条件下, Fe^{2+} 溶解度大于 Fe^{3+} ,所以 Fe^{2+} 的吸收率要比 Fe^{3+} 的高2~3倍。食物中的还原性物质,如维生素C、半胱氨酸、葡萄糖和果糖等都能使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 。蛋白质分解的产物氨基酸由于能与铁螯合成可溶性物质,也有利于铁的吸收。无机离子中, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{3+} 等有助于铁的吸收,而 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 、 Mg^{2+} 则不利于铁的吸收。由于磷和铁形成不溶性的磷酸铁,故含高磷酸的食物不利于铁的吸收,同时,植酸、草酸、茶叶中的鞣酸等也可干扰铁的吸收。

铁的吸收对于铁在机体内的平衡起着重要作用。铁的吸收是小肠上皮细胞的主动代谢过程,吸收过程在很大程度上受机体内当时的铁水平、铁贮存量、血红蛋白合成速率、造血功能、铁蛋白合成状态等诸多因素的影响。在小肠黏膜的绒毛基底部腺窝部位的柱状细胞可接受由运铁蛋白转来的铁,正是这些铁的数量、水平,作为黏膜细胞是否吸收铁的信号,决定肠道内的铁被吸收的速率。当铁的摄入达到人体需求量时,黏膜细胞已积累了较多的铁,其吸收受到限制。而当细胞脱落时,细胞的铁就被排出。

2. 铁的排泄

正常情况下,铁的吸收与排泄保持动态平衡,正常人每日经各种途径排出的铁约0.5~1 mg。人体大部分铁随粪便排出,也有一部分铁从泌尿生殖道脱落细胞中丢失,通常每日尿排出铁不超过0.5 mg。

(四) 铁的运输与贮存

1. 铁的运输

从小肠黏膜细胞吸收入血的 Fe^{2+} 由血浆铜蓝蛋白(同时具备血清亚铁氧化酶的活性)氧化成 Fe^{3+} , Fe^{3+} 与血浆中的运铁蛋白(transferrin)结合。运铁蛋白是由两条多肽链共678个氨基酸残基构成的糖蛋白,相对分子质量约80 000,主要在肝细胞合成。每条多肽链有一个铁的结合位点。运铁蛋白与 Fe^{3+} 的亲合力比与 Fe^{2+} 的大许多倍。结合铁后的运铁蛋白其结构发生变构,可以识别、并进而结合运铁蛋白受体。该受体是跨膜的糖蛋白,相对分子质量约180 000,与铁有极高的亲合力,每个受体分子可结合1~2分子运铁蛋白。

2. 铁的贮存

机体内超过需要量的铁以铁蛋白和血铁黄素两种形成贮存。铁蛋白是铁贮存的主要形式,铁在铁蛋白中以 Fe^{2+} 的形式存在。铁蛋白主要分布于肝实质细胞、骨髓、肝和脾的网状内皮细胞中,在正常情况下,贮存铁和血循环的铁交换量不多。当需要铁时,铁蛋白和血铁黄素中的铁都可动员出来合成血红蛋白。

铁蛋白是由一个蛋白质外壳和一个铁核心构成,其蛋白外壳是由24个化学结构相似的蛋白质亚基组成,内部则形成4组囊腔状结构,中心是一个较大的空腔,犹如一个核桃壳。这些囊腔即为铁核心所在。完全为铁所充满的铁蛋白分子的相对分子质量为900 000,每分子最多可以纳入约5 000个铁原子,足以生成1 250个血红蛋白分子。

(五) 铁的缺乏与过量

缺铁性贫血是铁缺乏最常见的疾病。WHO将其列为世界四大营养缺乏症之一,在我国铁也被归为严

重缺乏之列,尤其在女性和儿童、青少年人群中更为突出。除了缺铁性贫血外,缺铁可能对一系列组织内物质代谢产生影响,引起机能失调。如神经系统缺铁,将造成儿童智力下降、行动障碍;肌肉缺铁可能造成活动能力下降。另外缺铁对免疫力的下降,也可能是一个诱因。

过量的铁多半以血铁黄素的形式沉积在网状内皮细胞或者某些组织的实质性细胞中,当大量堆积时,可能将引起肝硬化、糖尿病及房性心律不齐等。

二、铜

成人体内含铜(copper, Cu)量约 100 mg ~ 150 mg,在肌肉、内脏及脑中含量较高,其中在肌肉中占 50%,肝中约占 10%。人体每日铜的需要量约 1.5 mg/kg 体重 ~ 2.0 mg/kg 体重。

血浆铜蓝蛋白(ceruloplasmin)是血浆中的含铜蛋白,因是蓝色而得名,在肝合成后释入血浆。血浆中几乎所有的铜都牢固地结合在铜蓝蛋白上。每 1 分子铜蓝蛋白结合有 8 个铜原子。铜蓝蛋白除了能将铜从肝输送到肝外组织外,它本身还具有亚铁氧化酶的活性,即可将 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ,既有利于铁的运输和贮存,又促进铁的吸收与利用。

体内铜参与多种酶的构成,如细胞色素 C 氧化酶、酪氨酸酶、赖氨酸氧化酶、多巴胺 β 羟化酶、单胺氧化酶、超氧化物歧化酶等。其中神经系统中的多巴胺 β 羟化酶是生成去甲肾上腺素、肾上腺素的重要酶。缺铜动物脑中儿茶酚胺水平降低,将造成神经系统的有关病症。在胶原蛋白与弹性蛋白的合成之后,需在其分子间进行交联而增加其强度,这种交联需含铜的 ϵ -氨基氧化酶的积极参与,它使赖氨酸或羟赖氨酸的衍生物 ϵ -醛基赖氨酸在醛基之间进行缩合(见第二章)。可见铜的缺乏将造成结缔组织中胶原蛋白的交联障碍、动脉壁弹性减弱等。含铜的酪氨酸酶能催化酪氨酸转为多巴,并进而合成黑色素。缺铜时,黑色素生成障碍,结果毛发脱色。含铜的巯基氧化酶还具有维护正常毛发结构及防止角化的作用,缺铜时毛发角化,出现具有钢丝样头发的卷发症。超氧化物歧化酶(SOD)是一类金属酶,铜组成它的活性中心,锌则稳定其结构,铁与锰也能与之结合分布于不同的脏器或细胞。

肝是调节体内铜代谢的主要器官。体内铜代谢异常的遗传病目前除 Wilson 病(肝豆状核变性病)外,还发现有 Menke 病,表现为铜的吸收障碍,导致肝、脑中铜含量降低,组织中含铜酶活力下降,机体代谢紊乱。

三、锌

成人体内含锌(zinc, Zn)约 2 ~ 3 g,遍布于全身许多组织中,有的组织含锌较多,如眼睛视网膜含锌达 0.5%。成人每日锌需要量为 15 ~ 20 mg,主要来自动物性的食物,如牡蛎、泥鳅、鲱鱼以及肉、蛋、内脏等。植物性食物含锌量以及吸收率均远不及动物性食物。

锌的吸收部位在小肠。肠腔内有一种来自胰脏的与锌特异结合的小分子因子,能促进锌的吸收。锌在血中与白蛋白或运铁蛋白结合而运输。锌的吸收率可因食物中的植酸、钙而下降,因为它们容易生成溶解度很低的植酸-锌-钙复合物。纤维素亦可影响锌的吸收,这可能正是植物性食物锌的吸收率较低的原因之一。

锌主要随胰液、胆汁排泄入肠腔,最后由粪便排出。

锌的主要生理功能有(1)参与人体内许多金属酶的组成,是机体内六大酶类 200 多种酶的组成部分。如 DNA 聚合酶、碱性磷酸酶、碳酸酐酶、乳酸脱氢酶、谷氨酸脱氢酶、超氧化物歧化酶等,参与体内多种物质的代谢。锌还参与胰岛素合成。(2)促进机体的发育和组织再生。锌是调节 DNA 聚合酶的必需组成部分,锌不仅对于蛋白质和核酸的合成而且对于细胞的生长、分裂和分化的各个过程都是必需的。锌参与构成的锌指模体在基因调控中亦有重要作用。锌还对创伤的愈合修复的过程起明显的促进作用。(3)促进食欲。动物和人缺锌时,出现食欲减退。已知锌可以通过参加构成一种含锌的蛋白(唾液蛋白)

对味觉与食欲起促进作用。缺锌将可能出现“异食癖”。(4) 促进维生素 A 的正常代谢和生理功能。锌可参与视黄醇氧化酶和视黄醇结合蛋白的合成,促进视黄醛的合成与变构,促进肝中维生素 A 的动员。所以,锌在眼中含量较高绝不是偶然的。(5) 促进性器官与性机能的正常发育。人类缺乏锌时,性成熟推迟,性器官发育不全,性机能降低,精子减少,第二性征发育不全,性周期紊乱。锌能防治前列腺肥大,其疗效在目前的治疗药物中是最显著的。(6) 锌参与黏多糖的代谢,保护皮肤和软骨的健康。缺锌时皮肤出现粗糙、干燥、骨骼发育不正常等现象。(7) 参与免疫功能过程。人和动物缺锌时,T 细胞功能受损,引起细胞介导免疫改变,使免疫力降低。同时缺锌还可能使有免疫力的细胞增殖减少,胸腺因子活性降低,DNA 合成减少,细胞表面受体发生变化等。因此,机体缺锌可削弱免疫机制,降低抵抗力,使机体易受感染。

四、碘

正常成人体内碘(iodine, I)的含量为 25 mg ~ 50 mg,大部分集中于甲状腺中。成人每日需要量为 0.1 ~ 0.3 mg。

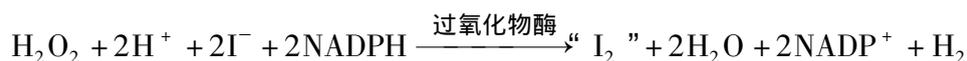
由于海洋植物(海带、紫菜等)具有从海水中聚集碘的功能,所以它们与海盐就是碘的最佳来源。食物中的碘只有在胃肠道被还原成 I^- 后,才能被吸收。碘的吸收快而且完全,吸收率可达 100%。进入肠道后膳食中的碘在 1 h 内可基本被吸收。进入血循环中的碘,广泛分布在细胞外液,并在一些特定组织中被进一步浓集,如肾、唾液腺、胃黏膜和甲状腺等,它们被称为碘库。但只有在甲状腺中被浓集的碘,才能合成甲状腺素。

甲状腺从血液中摄取与聚集碘的能力(称聚碘作用)是最强的,其含碘量占全身碘量的 1/3 到 1/5,碘浓度远高于血液。一般认为碘通过碘泵被摄入细胞的过程是需要 ATP 供能的主动转运过程,与细胞的生物氧化、呼吸链传递释能密切相关。所以抑制氧化磷酸化的一些因素,如 CN^- ,也可使碘的主动转运受阻。另外,钠泵也可能涉及这一过程,因为强心苷或哇巴因抑制钠泵,同时也抑制了甲状腺的聚碘作用。

体内碘的排出主要(90%)是由肾完成,近 10% 由粪便排出。哺乳期妇女通过乳汁能排出一定量的碘,部分哺乳期妇女的甲状腺肿可能与此有关。

碘在体内的主要去路是在甲状腺内合成甲状腺素。碘的生理功能正是通过甲状腺素的作用而发挥的。甲状腺素的合成部位是甲状腺泡上皮细胞中甲状腺球蛋白的分子上进行的。该蛋白质只能在甲状腺细胞中合成,它是一种相对分子质量为 670 000 的糖蛋白,其分子中含有 115 个酪氨酸残基,其中约有三分之一可被“活性碘”所碘化。

被聚集到甲状腺的碘离子要在过氧化物酶的作用下被迅速转化为“活性碘”(以“ I_2 ”表示)。活性碘的活性足以使酪氨酸进行碘化反应:



同样在过氧化物酶的催化下,活性碘与甲状腺球蛋白上的酪氨酸残基进行结合,生成一碘酪氨酸(MIT)或二碘酪氨酸(DIT)。二分子 DIT 进而可以缩合成四碘甲腺原氨酸(简称 T_4),而一分子 MIT 和一分子 DIT 则可以缩合成三碘甲腺原氨酸(简称 T_3) (图 23-5)。但体内 80% 的 T_3 是由 T_4 在外周血循环过程中脱碘而生成的。 T_3 、 T_4 统称为甲状腺素, T_4 虽然多于 T_3 ,但 T_3 的生理活性比 T_4 大 3 ~ 5 倍。它们以甲状腺球蛋白的形式排放到腺泡腔内贮存,在垂体分泌的促甲状腺素的作用下,甲状腺泡上皮细胞经吞噬、胞饮摄取甲状腺球蛋白,再经溶酶体中蛋白酶的水解,游离出甲状腺素。

甲状腺素的生理功能有:促进物质分解代谢,增加生物氧化的氧耗量,以彻底释放能量,称之为代谢性效应。促进蛋白质合成,协调蛋白质合成与分解,因此对人体的生长发育有重要生理意义。甲状腺素能促进神经系统的发育、组织的发育和分化、促使骨骼的钙化、蛋白质的合成。甲状腺素还有促进维生素的吸收与利用,参与调节组织中的水盐代谢等作用。

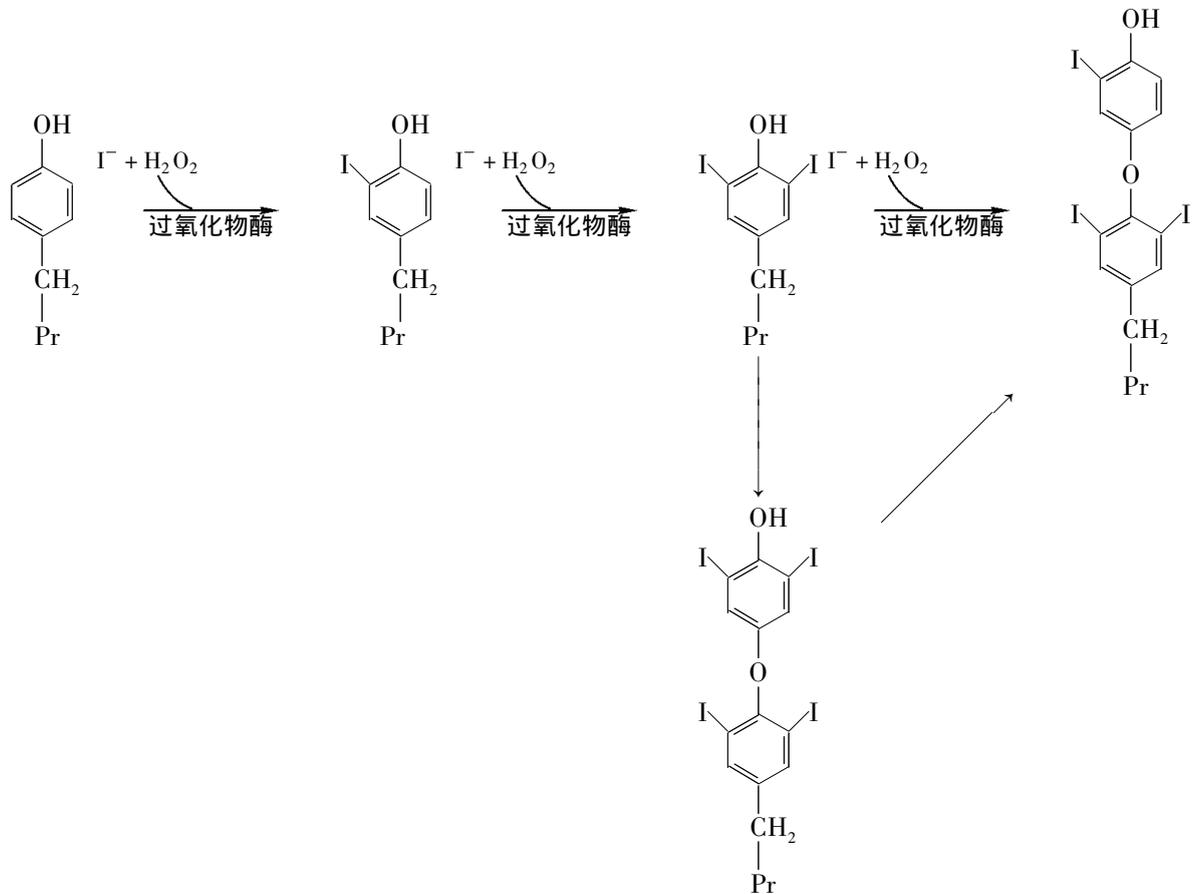


图 23-5 甲状腺素的合成过程

碘的缺乏与过量都将导致甲状腺的病变,成人缺碘可引起甲状腺肿大,称甲状腺肿。胎儿及新生儿缺碘则可引起呆小症(又称克汀病),表现为智力迟钝、体力不佳等严重发育不良。由于这些疾病往往源于环境的缺碘,就带有“地方性”的特点,冠名时也就有了“地甲”“地呆”等简称。为防治地方性碘缺乏症的发生,最简便有效的方法就是政策性地采用碘盐。

某些地区的外环境中碘含量过高,人体摄入过多的碘,反而抑制了甲状腺对碘的吸收和利用,也将造成甲状腺不同程度的肿大,称碘性甲状腺肿。另外,在一部分不缺碘人群中,碘盐、碘剂的使用可能诱发甲状腺机能亢进,称为碘性甲状腺毒症,其症状是心率加速、气短、代谢与食欲亢进等。因其常有眼球凸出,故又称为凸眼性甲状腺肿。据国外报道,甲状腺机能亢进的发病率在碘盐干预政策实施后的约四年内是升高的,但却是局部的、可预防的。

五、锰

锰(manganese, Mn)在肠道中吸收与铁吸收机制类似,吸收率较低,仅3%。锰参与一些酶的构成,如线粒体中丙酮酸羧化酶、精氨酸酶、RNA聚合酶等。不仅参加糖和脂质代谢,而且在蛋白质、DNA和RNA合成中起作用。锰对骨骼的生成发育、造血过程、维持正常的生殖功能都有很大作用。

锰在自然界分布广泛,以茶叶中含量最丰富。锰的缺乏较少见。若吸收过多可出现中毒症状,主要由于生产及生活中防护不善,锰以金属粉尘形式进入人体所致。锰是一种原浆毒,可引起慢性神经系统中毒,表现为锥体外系的功能障碍。并可引起眼球集合能力减弱,眼球震颤、睑裂扩大等。

六、硒

硒(selenium, Se)是人体必需的一种微量元素,体内含量约14 mg ~ 21 mg,硒是谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)及磷脂过氧化氢谷胱甘肽氧化酶(phospholipid hydrogen peroxide glutathi-

one peroxidase, PHGSH - Px)的组成成分。每分子 GSH - Px(四聚体)含有 4 原子硒,硒代半胱氨酸是酶的催化中心。该酶在人体内起抗氧化作用,能催化 GSH 与胞液中的过氧化物反应,防止过氧化物对机体的损伤。GSH - Px 活力下降,线粒体不可逆地失去容积控制和收缩能力并最后破裂。缺硒所致的肝坏死可能是过氧化物代谢受损的结果。PHGSH - Px 与 GSH - Px 不同,它存在于肝和心肌细胞线粒体内膜间隙中,作用是抗氧化、维持线粒体的完整,避免脂质过氧化物伤害,以防止心肌纤维坏死,防止心肌小动脉及毛细血管损伤。硒能激活巨噬细胞,缺硒将招致 T 细胞数量下降,从而导致免疫功能减弱。此外,在甲状腺素 T_4 向其活性更强的形式 T_3 转变的 5-脱碘过程中需要脱碘酶,而该酶的活性中心由硒和半胱氨酸组成。

近年来研究发现硒与多种疾病的发生有关。如克山病、心肌炎、扩张型心肌病、大骨节病及碘缺乏病均与缺硒有关。因为硒对自由基的良好清除能力,使它还具有抗癌作用,是肝癌、乳腺癌、皮肤癌、结肠癌、鼻咽癌及肺癌等的抑制物。硒还具有促进人体细胞内新陈代谢、核酸合成和抗体形成、对重金属离子如 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 的解毒、对黄曲霉毒素的清除、抗血栓及抗衰老等多方面的作用。硒被光激活将发出电流。已知硒在视觉细胞的感光过程中起重要作用。

维生素 E 可促进硒的吸收与作用,而维生素 C 则强化维生素 E 的这一作用。体内的硒大部分经尿排出。

硒主要来自整粒的谷类、海产品、肝、肾等食物。但是由于地质特点的原因,中国是世界上缺硒最严重的地区,全国约有 72% 的地区属低硒地区,应引起高度重视。

硒过多也会对人体产生毒性作用,如脱发、指甲脱落、周围性神经炎、疲乏无力、恶心呕吐、生长迟缓及生育力降低、呼出气有大蒜气味等。因此不可盲目补硒。推荐的补硒安全值为 40 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{d}$ 。

七、其他微量元素

(一) 氟

在人体内氟(fluorine, F)含量约为 2 ~ 6 g,其中 90% 积存于骨及牙中。氟主要经尿和粪便排出(其中尿中排出占 80%)。氟能与羟磷灰石吸附,取代其羟基形成氟磷灰石,能加强对龋齿的抵抗作用。此外,氟还可直接刺激细胞膜中 G 蛋白,激活腺苷酸环化酶或磷脂酶 C,启动细胞内 cAMP 或磷脂酰肌醇信号系统,引起广泛的生物效应。氟过多亦可对机体产生损伤,如长期饮用高氟($>2 \text{ mg}/\text{L}$)水,牙釉质将受损出现斑纹、牙变脆易破碎等。

(二) 钼

钼(molybdenum, Mo)为黄嘌呤氧化酶和醛氧化酶的成分。这些酶中的钼在完成细胞内电子传递的过程中起作用。黄嘌呤氧化酶对体内嘌呤化合物的氧化代谢及最后形成尿酸起主要的催化作用。它又与铁代谢有密切的关系,能加速肝中铁蛋白中铁的释放,加快铁进入血浆的过程,并能使所释放的 Fe^{2+} 在血浆内很快氧化成 Fe^{3+} ,从而迅速与球蛋白形成运铁蛋白,使铁能顺利地运送至肝、骨髓及其他细胞利用。醛氧化酶对解除体内形成的醛类物质的毒性有重要作用。人的牙釉质中含有丰富的钼,钼可增强氟的作用。在白血病时血钼增高,而在贫血患者钼则降低等,血钼的这种变化是否有因果关系目前仍不确定。

(三) 铬

已知铬(chromium, Cr)的最好来源是整粒的谷类、豆类、海藻类、肉和乳制品等。谷类经加工精制后铬的含量将大大减少。啤酒酵母及肝不仅含铬高而且其所含的铬活性也大。已知在糖代谢中铬作为一个辅助因子对启动胰岛素有作用。其作用方式可能是含铬的葡萄糖耐量因子(glucose tolerance factor, GTF),它促进在细胞膜受体蛋白的巯基和胰岛素分子 A 链的两个二硫键之间形成一个稳定的桥结构,使胰岛素能充分地发挥作用。

铬可能对血清胆固醇有稳定作用。动物实验都显示其能预防动脉硬化和冠心病。铬对蛋白质合成代谢和生长发育也是需要的,缺铬动物生长发育将停滞。

八、微量元素代谢异常的原因

1. 膳食和饮水中供应的微量元素不足

自然界的微量元素主要存在于土壤和水源中,即它的分布具有明显的地域性。若某地区缺乏某微量元素(如碘、氟、硒等),势必影响该地区的食物链质量,首先是植物性食物,而后累及动物性食物。因而造成不仅饮水而且食物也缺乏这些元素。如我国克山病流行地区居民的缺硒即属于此类。另外,食物越是加工精制,其所含的微量元素就越少。

2. 膳食中微量元素的吸收利用率降低

如膳食中的纤维素和植酸含量过高,将影响锌、铁等的吸收与利用。在胃肠道功能紊乱时或肠道手术后也将影响膳食中微量元素的吸收与利用。

3. 需要量增加

在一般情况下微量元素摄入量虽能满足正常需要,但需要量因某种情况明显增加时,亦可发生微量元素的缺少,如迅速生长、妊娠、哺乳、极繁重的劳动以及创伤、烧伤与手术等。

4. 排出过多

如肾脏疾病、肝硬化、肠道寄生虫病、溶血及在利尿、透析等情况下都会引起微量元素的丢失。

5. 遗传性缺陷病

Summary

The inorganic substances include water and inorganic salts. They are the main compositions of body fluid, which constitutes the internal environment of human bodies. In the process of a normal life activity, it is necessary to maintain their dynamic equilibrium of contents, constituents, and distributions. In vivo, the inorganic salts play a decisive role in the maintenance of the fluid volume, the osmotic pressure of the body fluid and the acid-base balance. It also maintains the excitability of nerves and muscles. In addition, inorganic salts, especially metal ions, usually participate in the processes of material metabolisms through the pattern of prosthetic group (coenzyme) or the activator of enzymes.

As the main cation of the extracellular fluid, the concentration of Na^+ in the blood is tightly regulated by the kidney. Potassium is the main cation of the intracellular fluid and it enters the cell at an extremely low rate. Although the kidney can eliminate K^+ , its function does not decelerate along with the lack of K^+ . The equilibrium of K^+ in blood is also affected by the metabolism of some substances and the pH of the plasma. The metabolism of K^+ , Na^+ and water is primarily regulated by the central nervous system.

The formation of the bones and teeth of the human bodies depends on Ca and P. Besides, Ca^{2+} also participates in the regulation of the normal activities of muscles, nerves and the heart. Ca^{2+} , as an important regulator of the calcium signal transduction system, is one of the general mechanisms to regulate the cell function. The equilibrium of the blood calcium and blood phosphorus is also regulated by active VitD_3 , PHT, and CT.

Mg^{2+} is the activator of numerous enzymes, and synergistic action exists among Mg^{2+} , Ca^{2+} , and K^+ .

Although the contents of the trace elements are minimum, only accounting for less than one ten thousandth of the total body weight, they are indispensable. Combined with proteins, enzymes, hor-

mones ,vitamins and others ,they either constitute the active center of enzymes or coenzymes ,or participate in the formation of the active structure of hormones or vitamins.

For example ,the Iron constitutes hemoglobin(Hb) ,myoglobin(Mb) ,and enzymes whose coenzymes are sidero-porphyrins. Lacking in iron will cause anemia ,which is one of the four greatest nutritional deficiency diseases in the world. Copper not only makes up the coenzyme of cytochrome oxidase and the dopamine β - hydroxylase ,but also constitutes the copper orchid protein and participates in the ferrous transportation. Zinc is not only involved in the constitution of many metal enzymes but also closely related to the growth of the human body ,the regeneration of the tissues ,the gustatory sensation ,the sexual function and the immune response. Iodine participates in the synthesis of thyroxin and proteins ,and promotes the catabolism and the growth and development of the human body. A lack of iodine will lead to struma and cretinism. Selenium ,the coenzyme of glutathione peroxidase , can prevent the body from peroxide damage. There is a synergism between selenium and VitE. As trace elements primarily exist in the soil and water ,the obviously uneven regional distribution is a main reason for their deficiency.

思 考 题

1. 水和一般无机盐对于人体有何生理意义？
2. 钠和钾的来源、分布、血钠与血钾的平衡有何特点？影响血钾的因素有哪些？
3. 钙、磷代谢的特点是什么？影响它们吸收的因素有哪些？二者有何关系？
4. 简述铁的来源、吸收影响因素及生理功能。
5. 简述碘的来源、生理功能及缺乏症。
6. 微量元素缺乏症的原因是什么？

(严 哲)

附 录 一

希腊字母表

大 写	小 写	名 称	相当拉丁字母	国际音标注音	中文译音
A	α	alpha	a	[ʔælfə]	阿尔法
B	β	beta	b	[bi:tə ʔbeitə]	贝塔
Γ	γ	gamma	g	[ɣæmə]	伽马
Δ	δ	delta	d	[ʔdeltə]	德耳塔
E	ε	epsilon	e	[epsailənʔepsilən]	艾普西隆
Z	ζ	zeta	z	[zi:tə]	截塔
H	η	eta	ě	[i:tə ʔeitə]	艾塔
Θ	θ	theta	th	[θi:tə]	西塔
I	ι	iota	i	[ai'jutə]	约塔
K	κ	kappa	k ɔ	[kæpə]	卡帕
Λ	λ	lambda	l	[læmdə]	兰布达
M	μ	mu	m	[mju:]	米尤
N	ν	nu	n	[nju:]	纽
Ξ	ξ	xi	x(ks)	[ksai ʔzai ʔgzai]	克西
O	ο	omicron	o	[əu'mθikrən]	奥密克戎
Π	π	pi	p	[pai]	派
P	ρ	rho	r	[rəu]	洛
Σ	σ	sigma	s	[sigmə]	西格马
T	τ	tau	t	[tɔ:]	陶
Υ	υ	upsilon	u	[jups'ailən]	宇普西隆
Φ	φ	phi	f ʔph	[fai]	斐
X	χ	chi	ch ʔkh	[kai]	喜
Ψ	ψ	psi	ps	[psai]	普西
Ω	ω	omega	o	[ʔumigə]	奥墨伽

附录二

一、系统国际单位制 (System International Units, SI) 单位的前缀

因数	前缀	中文符号	符号	因数	前缀	中文符号	符号
10^{-18}	atto	阿托]	a	10	deca	十	da
10^{-15}	femto	飞母托]	f	10^2	hecto	百	h
10^{-12}	pico	皮可]	p	10^3	kilo	千	k
10^{-9}	nano	纳诺]	n	10^6	mega	兆	M
10^{-6}	micro	微	μ	10^9	giga	吉咖]	G
10^{-3}	milli	毫	m	10^{12}	tera	太拉]	T
10^{-2}	centi	厘	c	10^{15}	peta	拍它]	P
10^{-1}	deci	分	d	10^{18}	exa	艾可萨]	E

二、化合物名词的数字前缀

数字	前缀	数字	前缀
1/2	hemi	21	heneicosa
1	mono	22	docosa
1 1/2	sesqui	23	tricoso
2	di bi	24	tetracoso
3	tri	25	pentacoso
4	tetra	26	hexacoso
5	penta	27	heptacoso
6	hexa	28	octacoso
7	hepta	29	nonacoso
8	octa	30	triconta
9	ennca	40	tetraconta
10	deca	50	pentaconta
11	hendeca undeca	60	hexaconta
12	dodeca	70	heptoconta
13	trideca	80	octaconta
14	tetradeca	90	nonaconta
15	pentadeca	100	hecta
16	hexadeca	101	henhecta
17	heptadeca	102	dohecta
18	octadeca	110	decahecta
19	nonadeca	120	eicosahecta
20	eicosa	200	dicta

附录三

本书常用英文词汇及缩写

A	adenine	腺嘌呤
	adenosine	腺嘌呤核苷
	albumin	清蛋白
	alanine	丙氨酸
ACP	acyl carrier protein	酰基载体蛋白
ACTH	adrenocorticotropic hormone	促肾上腺皮质激素
ADH	antidiuretic hormone	抗利尿激素
ADP	adenosine diphosphate	腺苷二磷酸
A/G	albumine-globulin ratio	清-球蛋白比
ALA	δ -aminolevulinic acid	δ -氨基 γ -酮基戊酸
Ala	alanine	丙氨酸
ALT	alanine aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AMP	adenosine monophosphate	腺苷一磷酸
	adenylic acid	腺苷酸
Arg	arginine	精氨酸
Asn	asparagine	天冬酰胺
Asp	aspartic acid	天冬氨酸
AST	aspartate aminotransferase	天冬氨酸氨基转移酶
ATP	adenosine triphosphate	腺苷三磷酸
ATPase	adenosine triphosphatase	ATP 酶, 腺苷三磷酸酶
2,3-BPG	2,3-bisphosphoglyceric acid	2,3-二磷酸甘油酸
C	cytosine	胞嘧啶
	cytidine	胞(嘧啶核)苷
cAMP	cyclic adenosine monophosphate	环腺苷酸(环腺一磷)
	3',5'-cyclic adenylic acid	
CAP	catabolite gene activation protein	分解代谢物基因激活蛋白
CDP	cytidine diphosphate	胞苷二磷酸
cGMP	cyclic guanosine monophosphate	环鸟苷酸(环鸟一磷)
	3',5'-cyclic guanylic acid	
Ch	cholesterol	胆固醇
ChE	cholesterol ester	胆固醇酯
	choline esterase	胆碱酯酶
CM	chylomicron	乳糜微粒
CMP	cytidine monophosphate	胞苷一磷酸
	cytidylic acid	胞苷酸

Co I	coenzyme I	辅酶 I
Co II	coenzyme II	辅酶 II
CoA ,CoASH	coenzyme A	辅酶 A
CoQ	coenzyme Q (ubiquinone)	辅酶 Q (泛醌)
CP(C ~ P)	creatine phosphate	磷酸肌酸
CTP	cytidine triphosphate	胞苷三磷酸
Cys	cysteine	半胱氨酸
Cys a α_3 b β c γ P ₄₅₀	Cytochrome a α_3 b β c γ P ₄₅₀	细胞色素 a α_3 b β c γ P ₄₅₀
D	aspartic acid	天冬氨酸
dATP	deoxyadenosine triphosphate	脱氧腺苷三磷酸
dCTP	deoxycytidine triphosphate	脱氧胞苷三磷酸
dGTP	deoxyguanosine triphosphate	脱氧鸟苷三磷酸
dTTP	deoxythymidine triphosphate	脱氧胸苷三磷酸
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	deoxyribonuclease	脱氧核糖核酸酶 ,DNA 酶
DOPA	3,4 - dihydroxyphenylalanine	3,4 - 二羟苯丙氨酸(多巴)
E	glutamic acid	谷氨酸
EF	elongation factor	延长因子
eIF	eukaryotic initiation factor	真核细胞起始因子
F	phenylalanine	苯丙氨酸
FA	fatty acid	脂(肪)酸
FAD	flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
(FADH ₂)	(reduced form)	(还原型)
FH ₂	dihydrofolic acid	二氢叶酸
FH ₄ (THFA)	tetrahydrofolic acid	四氢叶酸
H	histidine	组氨酸
HMG - CoA	β - hydroxy β - methyl glutaryl coenzyme A	β - 羟 β - 甲基戊二(酸单)酰 辅酶 A
FMN	flavin mononucleotide	黄素单核苷酸
Fp	flavoprotein	黄素蛋白
G	glycine	甘氨酸
	globulin	球蛋白
	guanine	鸟嘌呤
	guanosine	鸟(嘌呤核)苷
GABA	γ - aminobutyric acid	γ - 氨基丁酸
Gal	galactose	半乳糖
GDP	guanosine diphosphate	鸟苷二磷酸
Glc	glucose	葡萄糖
Gln	glutamine	谷氨酰胺
Glu	glutamic acid	谷氨酸
Gly	glycine	甘氨酸
GMP	guanosine monophosphate (guanylic acid)	鸟苷一磷酸 (鸟苷酸)
GOT	glutamic-oxaloacetic transaminase	谷草转氨酶
GPT	glutamic-pyruvic transaminase	谷丙转氨酶
GSH	glutathione (reduced form)	谷胱甘肽(还原型)
GSSG	glutathione (oxidized form)	谷胱甘肽(氧化型)

γ -GT	γ -glutamyl transpeptidase	γ -谷氨酰转肽酶
GTP	guanosine triphosphate	鸟苷三磷酸
H	histidine	组氨酸
Hb	hemoglobin	血红蛋白
HbO ₂	oxyhemoglobin	氧合血红蛋白
HDL	high density lipoprotein	高密度脂蛋白
His	histidine	组氨酸
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA	不均一核 RNA
5-HT	5-hydroxytryptamine	5-羟色胺
I	isoleucine	异亮氨酸
	inosine	次黄嘌呤核苷(肌苷)
IDL	intermediate density lipoprotein	中间密度脂蛋白
IgA	immunoglobulin A	免疫球蛋白 A
Ile	isoleucine	异亮氨酸
IMP	inosine monophosphate (inosinic acid)	次黄嘌呤核苷一磷酸 (次黄核苷 , 肌苷酸)
K	lysine	赖氨酸
K _m	Michaelis constant	米氏常数
L	leucine	亮氨酸
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LDL	low density lipoprotein	低密度脂蛋白
Leu	leucine	亮氨酸
LPL	lipoprotein lipase	脂蛋白脂(肪)酶
LT	leukotriene	白三烯
Lys	lysine	赖氨酸
M(Met)	methionine	蛋氨酸 , 甲硫氨酸
MAO	monoamine oxidase	单胺氧化酶
mRNA	messenger RNA	信使核糖核酸
MVA	mevalonic acid	甲羟戊酸
N	asparagine	天冬酰胺
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸
(NADH)	(reduced form)	(还原型)
NADP ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
(NADPH)	(reduced form)	(还原型)
NPN	non-protein nitrogen	非蛋白氮
Orn	ornithine	鸟氨酸
P	proline	脯氨酸
PAPS	3'-phosphoadenosine 5'-phos - phosulfate	3'-磷酸腺苷 5'-磷酸硫酸
Phe	phenylalanine	苯丙氨酸
PG	prostaglandin	前列腺素
pI	isoelectric point	等电点
Pi	inorganic phosphate	无机磷酸
PPi	inorganic pyrophosphate	无机焦磷酸
PRPP	5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate	5-磷酸核糖 1-焦磷酸
Pro	proline	脯氨酸
PTH	parathormone	甲状旁腺素

Q	glutamine	谷氨酰胺
R	arginine	精氨酸
RF	releasing factor (termination factor)	释放因子 (终止因子)
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
RNase	ribonuclease	核糖核酸酶
rRNA	ribosomal RNA	核糖体核糖核酸
S	serine	丝氨酸
SAM	S - adenosyl methionine	S - 腺苷蛋氨酸
Ser	serine	丝氨酸
T	threonine	苏氨酸
	thymine	胸(腺)嘧啶
	thymidine	胸嘧啶核苷 胸苷
T ₃	triiodothyronine	三碘甲腺原氨酸
T ₄	thyroxine (tetraiodothyronine)	甲状腺素
TAG	triacylglycerol (triglyceride)	三酰甘油(甘油三酯)
TCAC	tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
Thr	threonine	苏氨酸
TPP	thiamine pyrophosphate	焦磷酸硫胺素
tRNA	transfer RNA	转运核糖核酸
Trp	tryptophan	色氨酸
TTP	thymidine triphosphate	胸苷三磷酸
Tyr	tyrosine	酪氨酸
U	uracil	尿嘧啶
	uridine	尿(嘧啶核)苷
UDP	uridine diphosphate	尿苷二磷酸
UDPG	uridine diphosphate glucose	尿苷二磷酸葡萄糖
UDPGA	uridine diphosphate glucuronic acid	尿苷二磷酸葡糖酸
UMP	uridine monophosphate (uridylic acid)	尿苷一磷酸 (尿苷酸)
UTP	uridine triphosphate	尿苷三磷酸
V(Val)	valine	缬氨酸
VLDL	very low density lipoprotein	极低密度脂蛋白
W	tryptophan	色氨酸
Y	tyrosine	酪氨酸

附录四

一、汉英名词索引

A

- 癌基因 oncogene 305
Edman 降解法 Edman degradation 33
氨 ammonia 196
氨蝶呤 aminopterin 225
 δ -氨基 γ -酮基戊酸 δ -amino γ -levulinic acid ,ALA 382
 γ -氨基丁酸 γ -aminobutyric acid ,GABA 81 202 413
氨基甲酰磷酸合成酶 I carbamoyl phosphate synthetase I ,CPS - I 198
氨基甲酰磷酸合成酶 II carbamoyl phosphate synthetase II ,CPS - II 200 219
氨基酸 amino acid 28 ,192
氨基酸代谢 amino acid metabolism 192
氨基酸序列分析 amino acid sequencing 33
氨基酰-tRNA aminoacyl-tRNA 277
氨基酰位 aminoacyl site 281
胺 amine 190
胺氧化酶 amine oxidase 202

B

- 白化病 albinism 209
白介素 Interleukin 369
白三烯 leukotriene 167 ,169
白细胞 leukocyte 384
斑点印迹 dot blotting 303
半保留复制 semiconservative replication 243
半连续复制 semicontinuous replication 249
半胱氨酸 cysteine 29 31 84 206
半乳糖 galactose ,Gal 61
胞嘧啶 cytosine 9
被动转动 passive transport 346
苯丙氨酸 phenylalanine 29 31 207
别嘌呤醇 allopurinol 224
吡哆醇 pyridoxine 81
必需氨基酸 essential amino acid 188

- 必需基团 essential group 90
- 必需脂肪酸 essential fatty acid 167
- 编辑 editing 267, 302
- 编码链 coding strand 264
- 变构酶 allosteric enzyme 92, 93, 232
- 变构效应 allosteric effect 49, 92, 93, 232
- 变性 denaturation 19, 50
- 表达载体 expression vector 322
- 表皮生长因子 epidermal growth factor, EGF 307, 366
- 丙氨酸 alanine 29, 31
- 丙氨酸-葡萄糖循环 alanine-glucose cycle 197
- 丙氨酸转氨酶 alanine transaminase, ALT 194
- 丙二(酸单)酰 CoA malonyl CoA 163
- 丙酮酸 pyruvate 118
- 丙酮酸激酶 pyruvate kinase 117
- 丙酮酸羧化酶 pyruvate carboxylase 125
- 丙酮酸脱氢酶 pyruvate dehydrogenase 118
- 病毒癌基因 virus oncogene, v -onc 306
- 补救合成途径 salvage pathway 217, 221
- 不可逆性抑制作用 irreversible inhibition 104
- 不均一核 RNA heterogeneous nuclear RNA, hnRNA 302
- ## C
- 操纵基因 operator 296
- 操纵子 operon 296
- 超滤 ultrafiltration 54
- 层黏连蛋白 laminin 66
- 插入 insertion 309
- 长萜醇 dolichol 266
- 肠肝循环 enterohepatic circulation 395
- 超氧化物歧化酶 superoxide dismutase, SOD 153
- 沉默子 silencer 300
- 从头合成 de novo synthesis 214
- DNA 重复序列 DNA repeat sequence 22
- 重排 rearrangement 309
- 重组 recombination 254
- 重组 DNA recombinant DNA 317
- 重组修复 recombination repair 256
- 初级胆汁酸 primary bile acid 384
- 初速率 initial velocity 100
- 串联酶 tandem enzyme 90
- 锤头结构 hammerhead structure 20
- 次黄嘌呤核苷酸 inosine monophosphate, IMP 195, 215
- 次级胆汁酸 secondary bile acid 384
- 催化基团 catalytic group 90
- 错配修复 mismatch repair 255

D

- 代谢分解物基因激活蛋白
 单胺氧化酶
 单加氧酶
 胆固醇
 胆红素
 胆碱
 胆碱酯酶
 胆绿素
 胆色素
 胆素原
 胆酸
 胆汁酸
 单纯酶
 单链构象多态性
 单链 DNA 结合蛋白
 单顺反子
 蛋氨酸,甲硫氨酸
 蛋氨酸循环
 蛋白 C
 蛋白 S
 蛋白激酶 A
 cAMP-蛋白激酶 A 信号途径
 蛋白激酶 C
 蛋白激酶 G
 蛋白聚糖
 蛋白酶
 蛋白酶体
 G 蛋白偶联型受体
 ρ (rho) 蛋白因子
 蛋白质
 蛋白质组
 蛋白质组学
 氮平衡
 低密度脂蛋白
 低血糖
 底物
 底物循环
 第二信使
 颠换
 碘
 电压门控通道
 电泳
 等电点
 等电聚焦
- catabolite gene activator protein 296
 monoamine oxidase, MAO 389
 monooxygenase 151, 389
 cholesterol 80, 85, 175, 178
 bilirubin 397
 choline 171
 choline esterase 390
 biliverdin 397
 bile pigment 397
 bilinogen 382, 397
 cholic acid 394
 bile acid 177, 394
 simple enzyme 88
 single-strand conformation
 polymorphism, SSCP 331
 single-stranded DNA binding protein 246
 monocistron 295
 methionine 30, 31, 83, 203
 methionine cycle 205
 protein C 379
 protein S 379
 protein kinase A 92, 360
 cAMP-protein kinase A signaling pathway 134, 360
 protein kinase C 364
 protein kinase G 363
 proteoglycan 68 ~ 70
 protease 94
 proteasome 192
 G protein coupled receptor 357
 ρ (rho) protein factor 272
 protein 28, 187, 275
 proteome 56
 proteomics 25, 57
 nitrogen balance 187, 188
 low density lipoprotein 179, 182
 hypoglycemia 134
 substrate 97
 substrate cycle 125, 231
 second messenger 356
 transversion 255
 iodine 427
 voltage gated channel 347
 electrophoresis 55
 isoelectric point 30, 50
 isoelectric focusing 55

- 点突变 point mutation 308
- 电子传递链 electron transfer chain 146
- 凋亡 apoptosis 305
- 端粒 telomere 249
- 端粒酶 telomerase 249
- 多胺 polyamine 202
- 多巴胺 dopamine 208
- 多功能酶 multifunctional enzyme 230, 90
- 多酶体系 multienzyme system 90, 230
- 多顺反子 polycistron 275
- 多态性 polymorphism 332
- 多肽 polypeptide 33, 202
- E**
- 鹅脱氧胆酸 chenodeoxycholic acid 394
- 儿茶酚胺 catecholamine 413
- 二级结构 secondary structure 11, 36, 42
- 2,3-二磷酸甘油酸 2,3-bisphosphoglycerate 380
- 1,25-二羟维生素 D₃ 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 76, 422
- 二酰甘油 diacylglycerol 157, 166
- 二酰甘油-PKC 信号途径 diacylglycerol-PKC signaling pathway 364
- F**
- 翻译 translation 275
- 翻译后加工 post-translational processing 284
- 反竞争性抑制作用 uncompetitive inhibition 107
- 反馈抑制 feedback inhibition 231
- 反密码子 anticodon 17, 276
- 反式作用因子 trans-acting factor 294
- 反向重复序列 inverted repeat sequence 22
- 反义核酸 antisense nucleic acid 333
- 反(意)义链 antisense strand 264
- 泛醌 ubiquinone 141
- 泛醌-细胞色素氧化还原酶 ubiquinone-cytochrome oxidoreductase 142
- NADH-泛醌氧化还原酶 NADH-ubiquinone oxidoreductase 141
- 泛素 ubiquitin 192
- 泛酸 pantothenic acid 81
- 芳香族氨基酸 aromatic amino acids 85
- 非竞争性抑制作用 noncompetitive inhibition 106, 107
- 分支酶 branching enzyme 123
- 分子伴侣 chaperon 286
- 分子克隆 molecular cloning 317
- 分子生物学 molecular biology 1
- 分子杂交 molecular hybridization 323
- 粪胆素原 stercobilinogen 400
- 疯牛病 mad cow disease 49
- 佛波酯 phorbol ester 265

- 氟 fluorine F 429
 脯氨酸 proline 29 31 141 142
 复合体 I complex I 140 141
 复合体 II complex II 142
 复合体 III complex III 142
 复合体 IV complex IV 144
 复性 renaturation 19 50
 复制 replication 242
 复制叉 replication fork 247
 复制泡 replication bubble 248
 复制子 replicon 247
 辅基 prosthetic group 89
 辅酶 coenzyme 89
 辅酶 A coenzyme A 81 89
 辅酶 Q coenzyme Q 141
 辅因子 cofactor 88
 腐败作用 putrefaction 190
- G**
- 钙 calcium 420
 Ca²⁺-钙调蛋白激酶信号途径 Ca²⁺-calmodulin kinase signaling pathway 363
 钙黏素 cadherin 409
 钙调蛋白 calmodulin 128 364
 干扰素 interferon IFN 290
 甘氨酸 glycocholic acid 394
 甘油 glycine 29 31 42 203 382 414
 甘油 glycerol 158
 甘油磷脂 glycerophospholipid 407
 肝素 heparin 68 69 70
 感受态细胞 competence cell 322
 冈崎片段 Okazaki fragment 248
 高密度脂蛋白 High-density lipoprotein 179 183
 高效液相色谱 high performance liquid chromatography , HPLC 34 57
 高血糖 hyperglycemia 134
 高脂蛋白血症 hyperlipoproteinemia 184
 给位 donor site 281
 共价修饰 covalent modification 93 233
 共有序列(一致性序列) consensus sequence 270
 构象改变 conformational change 36 92 232
 谷氨酸 glutamic acid 30 31 32 193 377 414
 谷氨酸脱氢酶 glutamate dehydrogenase 193 195
 谷氨酰胺 glutamine 30 31 196 413
 谷胱甘肽 glutathione 32 84 207
 钴胺素 cobalamin 83
 固定化酶 immobilized enzyme 110
 瓜氨酸 citrulline 198

- 寡聚酶 oligoenzyme 90
- 持家基因 housekeeping gene 306
- 光激活 photoreactivation 256
- 果糖 fructose 132
- 过渡态 transition state 99 ,110
- 过氧(化)物酶 peroxidase 139 ,153
- 过氧化氢酶 catalase 139 ,153
- H**
- 含硫氨基酸 sulfur amino acids 205
- 合成酶类 synthetase 96
- ATP 合酶 ATP synthase 148
- 核磁共振 nuclear magnetic resonance ,NMR 41
- 核苷酸 nucleotide 78 ,213
- 核黄素 riboflavin 79 ,89
- 核酶 ribozyme 20 ,89
- 核仁组织者 nucleolar organizer 266
- 核酸 nucleic acid 7
- 核受体 nuclear receptor 369
- 核糖体循环 ribosomal cycle 281
- 核糖核酸 ribonucleic acid 14
- 核糖体 ribosome 275
- 核糖体 RNA ribosomal RNA 17 ,279
- 核小体 nucleosome 13 ,299
- 核心酶 core enzyme 270
- 核转录因子 NF κ B nuclear factor-kappa B ,NF κ B 368
- Pribnow 盒 Pribnow box 271
- TATA 盒子 TATA box 264
- 红细胞 red blood cell 351 ,384
- 后随链 lagging strand 249
- 呼吸链 respiratory chain 140
- 琥珀酸-泛醌氧化还原酶 succinate-ubiquinone oxidoreductase 142
- 琥珀酰 CoA succinyl CoA 113
- 互补 DNA complementary DNA ,cDNA 23 ,36 ,253
- 花生四烯酸 arachidonic acid 168
- 滑动夹子 sliding clamp 247
- 滑动夹子装载蛋白 clamp loading factor 247
- 化学修饰 chemical modification 93 ,127 ,233
- HMG-CoA 还原酶 HMG-CoA reductase 176
- 黄疸 jaundice 402
- 黄嘌呤 xanthine 218
- 黄素单核苷酸 flavin mononucleotide ,FMN 79 ,89 ,141
- 黄素腺嘌呤二核苷酸 flavin adenine dinucleotide ,FAD 79 ,89 ,142
- 混合功能氧化酶 mixed-function oxidase 151
- 活化能 activation energy 97
- 活性部位 ,活性中心 active site 90
- 活性氧 active oxygen species 152

J

- 饥饿 237
- 肌红蛋白 46
- 肌酸 206
- 肌酸激酶 95 206
- 激素反应元件 369
- 激素敏感脂肪酶 ,HSL 157
- 基因 7
- Rb 基因 310
- 基因表达 293
- 基因多态性 332
- 基因工程 317
- 基因矫正 333
- 基因克隆 317
- 基因剔除 330
- 基因失活 333
- 基因芯片 324
- 基因增补 333
- 基因诊断 331
- 基因治疗 333
- 基因置换 333
- 基因重组 317
- 基因转移 334
- 基因组 22
- 基因组学 22
- 基因文库 320
- 极低密度脂蛋白 ,VLDL 179 ,181
- 急性时相蛋白 ,APP 376
- 己糖激酶 116
- 加工过程 267
- 钾 418
- 甲基化作用 309
- 甲羟戊酸 176
- 甲状旁腺激素 421
- 假神经递质 209
- 兼性离子
- 剪接酶 267
- 剪接体 267
- 简并性 276
- 降钙素 421
- 焦磷酸硫胺素 ,TPP 78 89
- 解偶联剂 150
- 解旋酶 246
- 金属激活酶 89
- 金属酶 89
- 胶原 41 ~44

- 胶质原纤维酸性蛋白
 校读
 结构基因
 结构域
 结合胆汁酸
 结合反应
 结合基团
 结合酶
 DNA 结合域
 茎-环结构
 精氨酸
 精胺
 竞争性抑制作用
 聚丙烯酰胺凝胶电泳
 DNA 聚合酶
 RNA 聚合酶
 聚合酶链反应
 矩形双曲线
 绝对特异性
- K**
- 开放阅读框
 抗癌剂
 抗代谢物
 抗凝血因子
 抗凝血酶Ⅲ
 抗生素
 抗体酶
 抗氧化剂
 可逆性抑制作用
 克隆动物
 克隆载体
 跨膜结构域
 矿物质
- L**
- 赖氨酸
 卵磷脂
 卵磷脂:胆固醇酰基转移酶
 类二十碳化合物
 离子交换层析
 离心
 立体异构特异性
 立早基因
 镰刀红细胞贫血
 连接酶
 DNA 连接酶
- glia fibrillary acidic protein ,GFAP 407
 proofreading 249 ,252
 structure gene 296
 domain 39 ,301
 conjugated bile acid 394
 conjugation reaction 391
 binding group 90
 conjugated enzyme 88
 DNA binding domain 301
 stem-loop structure 272
 arginine 30 ,31 ,198
 spermine 203
 competitive inhibition 105
 polyacrylamide gel electrophoresis 54
 DNA polymerase 245
 RNA polymerase 262
 polymerase chain reaction ,PCR 325
 rectangular hyperbola 100 ,101
 absolute specificity 98
- open reading frame ,ORF 275
 anticancer agent 226
 antimetabolite 224
 anticoagulant factor 379
 antithrombin Ⅲ 379
 antibiotics 290
 abzyme 110
 antioxidant 77 ,153
 reversible inhibition 105
 cloning animal 329
 cloning vector 319
 transmembrane domain 349
 mineral 416
- lysine 30 ,31 ,42 ,43
 lecithin 170 ,340
 lecithin :cholesterol acyltransferase 176
 eicosanoids 167
 ion-exchange chromatography 54 ,55
 centrifugation 52 ,53
 stereospecificity 98
 immediate-early gene 364
 sickle cell anemia 45
 ligase 96 ,246
 DNA ligase 246 ,318

- 连接物蛋白 adaptor protein 356
- 亮氨酸 leucine 30 31 209
- 亮氨酸拉链模体 leucine zipper motif 301
- 裂解酶(裂合酶) lyase 96
- 林-贝氏作图法 Lineweaver-Burk plot 103
- 磷 phosphorus P 420
- 磷酸吡哆醛 pyridoxal phosphate 81 194 202
- 磷酸二酯酶 phosphodiesterase 116 360
- α -磷酸甘油穿梭 glycerophosphate shuttle 140
- 磷酸果糖激酶 phosphofructokinase 116 231
- 磷酸核糖焦磷酸 5'-phosphoribosyl-1-pyrophosphate PRPP 215
- 磷酸化酶 phosphorylase 81 123 234
- 磷酸肌酸 phosphocreatine 150
- 磷酸戊糖途径 pentose phosphate pathway 130
- 磷酸烯醇式丙酮酸 phosphoenolpyruvate 117 125
- 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 phosphoenolpyruvate carboxykinase 125
- 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 3'-phospho adenosine 5'-phosphosulfate , PAPS 207
- 磷/氧比 P/O ratio 147
- 磷脂 phospholipid 170
- 磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate 363
- 磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C , PI-PLC 363
- 硫解 thiolysis 159 162
- 硫酸角质素 keratan sulfate 69
- 硫酸类肝素 heparan sulfate 69
- 硫酸皮肤素 dermatan sulfate 69
- 硫酸软骨素 chondroitin sulfate 69
- 硫辛酸 lipoic acid 86 118
- α 螺旋 α -helix 37
- 螺旋-转角-螺旋模体 helix-turn-helix motif 38 301
- 铬 chromium Cr 429
- 酪氨酸 tyrosine 29 31 207
- 酪氨酸蛋白激酶 tyrosine-protein kinase ,TPK 358
- ## M
- 帽子结合蛋白 cap-site binding protein ,CBP 303
- 酶 enzyme 88
- 酶促反应动力学 kinetics of enzymatic reactions 100 ~ 108
- 酶蛋白 apoenzyme 88
- 酶的活性中心 active center of enzyme 90
- 酶的特异性 enzyme specificity 97
- 酶工程 enzyme engineering 111
- 酶联免疫测定法 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 110
- 酶原 zymogen 93
- 镁 Magnesium 423

- 米-曼氏方程式 Michaelis-Menten equation 101
- 米氏常数 michaelis constant 101
- 嘧啶 pyrimidine 8
- 嘧啶核苷酸分解 pyrimidine nucleotide metabolism 218 ~ 221
- 密码子 codon 275
- 免疫球蛋白 immunoglobulin 375
- 模板 template 265
- 模板链 template strand 265
- 模体, 模序 motif 38
- 锰 manganese 428
- 钼 molybdenum 429
- N**
- 钠 sodium 418
- 钠-钾 ATP 酶 $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ -ATPase 116, 348
- 钠-葡萄糖转运蛋白 Na^{2+} -glucose transporter 115, 349
- 脑生物化学 brain biochemistry 407
- 内分泌 endocrine 313, 356
- 内含子 intron 267
- 内肽酶 endopeptidase 189
- 内源途径 intrinsic pathway 377
- 内在蛋白 intrinsic protein 342
- 尼克酸, 烟酸 nicotinic acid 79
- 尼克酰胺-腺嘌呤二核苷酸 nicotinamide adenine dinucleotide 80, 89, 141
- 尼克酰胺-腺嘌呤二核苷酸磷酸 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate 80, 89, 130
- 逆转录 reverse transcription 253
- 逆转录酶 reverse transcriptase 253, 318
- 黏多糖 mucopolysaccharide 70
- 鸟氨酸循环 ornithine cycle 198
- 鸟苷酸环化酶 guanylate cyclase, GC 359, 363
- 鸟苷酸结合蛋白 guanylate binding protein, G-protein 358
- 鸟苷酸交换因子 guanine nucleotide exchange factor, GEF 366
- 鸟嘌呤 guanine 8
- 尿胆素原 urobilinogen 400
- 尿苷 uridine 9
- 尿苷二磷酸葡萄糖 uridine diphosphate glucose 123
- 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸 uridine diphosphate glucuronic acid 391
- 尿嘧啶 uracil 8
- 尿卟啉原 uroporphyrinogen 382
- 尿素 urea 197
- 尿素循环 urea cycle 198
- 尿酸 uric acid 217
- 柠檬酸 citrate 118
- 柠檬酸-丙酮酸循环 citrate-pyruvate cycle 163
- 凝胶过滤 gel filtration 54
- 凝血酶 thrombin 40, 70, 377
- 凝血因子 coagulation factor 376

- 牛磺酸 taurine 206
牛磺胆酸 taurocholic acid 394
- P**
- D 襻复制 D-loop replication 251
旁分泌 paracrine 313, 356
旁路合成 bypass synthesis 258
胞吞作用 endocytosis 346, 350
胞饮作用 pinocytosis 346, 350
胞吐作用 exocytosis 350
配体 ligand 357
配体蛋白 ligandin 399
配体门控通道 ligand-gated channels 347
匹配媒体 matchmaker protein 252
Klenow 片段 Klenow fragment 318
苹果酸-天冬氨酸穿梭 malate-aspartate shuttle 140
嘌呤 purine 8
嘌呤核苷酸代谢 purine ribonucleotide metabolism 214 ~ 218
嘌呤核苷酸循环 purine nucleotide cycle 195
葡糖醛酸 glucuronic acid 391
葡糖醛酸胆红素 bilirubin glucuronide 399
葡糖激酶 glucokinase 116
葡糖异生 gluconeogenesis 124
葡萄糖 glucose 61, 116
葡萄糖转运蛋白 glucose transporter 116, 134, 347, 349
- Q**
- 前导链 leading strand 249
前导肽(信号肽) leader peptide(signal peptide) 288
前激肽释放酶 prekallikrein 376
前列环素 prostacyclin 168
前列腺素 prostaglandin 167
前起始复合物 pre-initiation complex, PIC 266, 280
启动子 promoter 26, 300
起始复合物 initiation complex 279
起始因子 initiation factor 279
 β -羟丁酸 β -hydroxybutyric acid 161
羟化酶 hydroxylase 151, 389
羟脯氨酸 hydroxyproline 42
5-羟色胺 5-hydroxytryptamine 202
切除修复 excision repair 256
清蛋白 albumin 374
氢键 hydrogen bond 12, 39, 408
鞘磷脂 sphingomyelin 174, 408
鞘糖脂 sphingoglycolipid 70, 71, 175, 408
鞘脂质 sphingolipid 172, 174
球蛋白 globulin 374

- 去甲肾上腺素 norepinephrine 209
 全酶 holoenzyme 88, 270
 缺失突变 deletion mutation 255
- R**
- 染色体 chromosome 13
 染色质 chromatin 13
 人类基因组计划 human genome project ,HGP 23
 热休克蛋白 heat shock protein 286
 肉碱 carnitine 158
 乳糜微粒 chylomicron 157, 179, 181
 乳酸 lactic acid 120, 126
 乳酸脱氢酶 lactate dehydrogenase 94, 95, 120, 126
 乳酸循环 lactate cycle 126
 乳糖操纵子 lac operon 296
 软脂酸, 棕榈酸 palmitic acid 163
- S**
- 三碘甲腺原氨酸 triiodothyronine 209, 427
 三级结构 tertiary structure 39
 三联体密码 triplet code 17, 276
 三羧酸循环 tricarboxylic acid cycle 118
 三酰甘油 triacylglycerols 156, 157, 162, 165
 色氨酸 tryptophan 29, 31, 203, 209
 色氨酸操纵子 trp operon 297
 蛇形受体 serpentine receptor 357
 神经递质 neurotransmitter 356
 神经节苷脂 ganglioside 71, 174, 408
 神经酰胺 ceramide 71, 174, 408
 神经元 neuron 406
 肾上腺素 epinephrine 134, 157, 166
 生糖氨基酸 glucogenic amino acid 201
 生糖兼生酮氨基酸 glucogenic and ketogenic amino acid 201
 生酮氨基酸 ketogenic amino acid 201
 生物化学 biochemistry 1
 生物活性肽 biologic active peptide 32
 生物膜 biomembrane 339
 生物素 biotin 81
 生物信息学 bioinformatics 24
 生物氧化 biological oxidation 137
 生物转化 biotransformation 388
 生育酚 tocopherol 77
 生长因子 growth factor 307
 视黄醇结合蛋白 retinol binding protein ,RBP 75
 视黄醛 retinal 75
 释放因子 release factor 283
 噬菌体 bacteriophage 319

- 受体 receptor 357
- 受体酪氨酸蛋白激酶 receptor tyrosine protein kinase ,RTPK 358 ,365
- 受位 acceptor site 281
- 疏水键 hydrophobic bond 39
- 衰减子 attenuator 297
- 双倒数作图 double reciprocal plot 103 ,106 ,107
- 双向电泳 two dimensional electrophoresis 56
- 双向复制 bidirectional replication 252
- 水 water 416
- 水解酶类 hydrolase 96
- 水溶性维生素 water soluble vitamin 78 ~ 85
- 羧基谷氨酸 γ - carboxyglutamate 77 ,377
- 顺反子 cistron 296
- 顺式作用元件 cis-acting element 294
- 丝氨酸 serine 29 ,31 ,44 ,203
- 丝氨酸蛋白酶 serine protease 44
- 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 serine/threonine protein kinase 234 ,307
- 四级结构 Quaternary structure 40
- 四氢生物蝶呤 tetrahydrobiopterin 207
- 四氢叶酸 tetrahydrofolate 83 ,203
- 苏氨酸 threonine 30 ,31
- DNA 损伤 DNA damage 256
- T**
- 肽 peptide 31
- 肽单元 peptide unit 36
- 肽位 peptidyl site 281
- 探针 probe 323
- 糖胺聚糖 glycosaminoglycan 68 ,69
- 糖生物学 glycobiology 60
- 糖蛋白 glycoprotein 62 ~ 68 ,76
- 糖代谢 carbohydrate metabolism 115
- 糖复合物 glycoconjugate 60
- 糖基化作用 glycosylation 285
- 糖基转移酶 glycosyl transferase 67 ,68
- 糖磷脂酰肌醇 glycophosphoinositol ,GPI 651
- 糖酵解 glycolysis 120
- 糖尿病 diabetes mellitus 134 ,238
- 糖异生 gluconeogenesis 124
- 糖原 glycogen 122
- 糖原生成 glycogenesis 123
- 糖原分解 glycogenolysis 123
- 糖原合酶 glycogen synthase 123
- 糖脂 glycolipid 70 ~ 72
- 糖组学 glycomics 60
- 天冬酰胺 asparagine 30 ,31 ,197
- 天冬氨酸转氨酶 aspartate transaminase ,AST 194

天冬氨酸	aspartic acid 30 31 44
SOS 调节子	SOS regulon 259
铁	iron 424
铁蛋白	ferritin 289 424
铁硫蛋白	iron-sulfur protein 141
停泊蛋白	docking protein 366
铜	copper 426
同工酶	isoenzyme isozyme 94 230
同型半胱氨酸	homocysteine 205
同源重组	homologous recombination 254
酮体	ketone body 161 237
α -酮戊二酸	α -ketoglutarate 193
透明质酸	hyaluronic acid 68 69
透析	dialysis 54
突变	mutation 254
突触分泌信号	synaptic secreted signal 355
拓扑异构酶	topoisomerase 245
脱氨基作用	deamination 193
脱羧基作用	decarboxylation 202
脱氧胆酸	deoxycholic acid 394
脱氧核酶	deoxyribozyme 21 89
脱氧核糖核酸	deoxyribonucleic acid 11 243
脱支酶	debranching enzyme 123
W	
外显子	exon 267
外源途径	extrinsic pathway 378
外周蛋白	peripheral (extrinsic) protein 342
微管伴随蛋白	microtubule associated protein ,MAP 408
微量元素	trace element 424
维生素 A	vitamin A 74
维生素 B ₁	vitamin B ₁ 78
维生素 B ₂	vitamin B ₂ 79
维生素 B ₆	vitamin B ₆ 81
维生素 B ₁₂	vitamin B ₁₂ 83
维生素 C	vitamin C 83
维生素 D	vitamin D 76 422
维生素 E	vitamin E 77
维生素 K	vitamin K 77
胃蛋白酶原	pepsinogen 189
cDNA 文库	cDNA library 321
稳态	steady state 101
无规卷曲	random coil 38
无机物生物化学	inorganic biochemistry 416
无义突变	nonsense mutation 255
X	
硒	selenium 428

稀有碱基	rare base 8
细胞癌基因	cellular-oncogene ρ - onc 306
细胞内受体	intracellular receptor 359
细胞色素 c	cytochrome c 144
细胞色素 c 氧化酶	cytochrome c oxidase 144
细胞色素 P450	cytochrome P450 389
细胞外基质	extracellular matrix 355
细胞因子	cytokine 313 356
细胞周期	cell cycle 310
纤连蛋白	fibronectin 66 76
纤维蛋白溶解	fibrinolysis 380
纤维蛋白溶酶原	plasminogen 380
纤维蛋白原	fibrinogen 376
酰基载体蛋白	acyl carrier protein 81 164
X 射线晶体分析	X - ray crystallography 40
线粒体	mitochondria 139
线粒体 DNA	mitochondrial DNA 14
限速酶	rate limiting enzyme 230
限制性内切核酸酶	restriction endonuclease 317
限制性长度多态性	restriction fragment length polymorphism ,RFLP 331
腺(嘌呤核)苷	adenosine 8
S - 腺苷蛋氨酸	S - adenosyl methionine 205
腺苷三磷酸	adenosine triphosphate ,ATP 150
腺苷酸环化酶	adenylate cyclase 128 157 177 358
腺嘌呤	adenine 8
相对特异性	relative specificity 98
消化作用	digestion 115 156
小 G 蛋白	small G protein 306 366
小核 RNA	small nuclear RNA 267
小核核蛋白	small nuclear ribonucleoprotein , snRNP 267
小染色体维系蛋白	mini chromosome maintenance protein ,MCM 248
缬氨酸	valine 30 31 209
协同效应	cooperativity 47 92
心磷脂	cardiolipin 170
锌	zinc 426
锌指模体	zinc finger motif 38 301
信号肽	signal peptide 288
信号肽识别颗粒	signal recognition particle ,SRP 288
cGMP - PKG 信号途径	cGMP-protein kinase G signaling pathway 363
信号转导	signal transduction 355
信号转导物及转录活化因子	signal transducer and activator of transcription ,STAT 314 368
信使 RNA	messenger RNA ,mRNA 15 265
兴奋性氨基酸	excitatory amino acid ,EAA 414
胸腺嘧啶	thymine 8
DNA 修复	DNA repairing 256
DNA 序列分析	DNA sequencing 327

选择素	selectin 66
血红蛋白	hemoglobin 40 45 47 ~49 382
血红素	heme 46 - 48 81 382
血红素加氧酶	heme oxygenase 397
血浆蛋白	plasma protein 373
血栓 烷	thromboxane 167
血液凝固	blood coagulation 376
血液生物化学	blood biochemistry 373
Y	
亚精胺	spermidine 203
亚麻酸	linolenic acid 167
亚油酸	linoleic acid 167
盐键	salt bond 48
盐析	salting out 52
延长因子	elongation factor ,EF 281
氧饱和曲线	saturation curve 47
β -氧化	β -oxidation 159
氧化还原酶类	oxidoreductases 96
氧化磷酸化	oxidative phosphorylation 146
液态镶嵌模型	fluid mosaic model 345
叶酸	folic acid 82 203
一级结构	primary structure 11 33 42 44 62
一碳单位	one-carbon unit 83 203
一氧化氮	nitric oxide 200 363 414
一氧化碳	carbon monoxide 363
移码突变	frame shift mutation 255
依赖 cAMP 的蛋白激酶	cAMP dependent protein kinase 360
胰蛋白酶	trypsin 35 44 90 91 93 98 189
胰岛素	insulin 33 44 134 157 164 166 177 236
胰高血糖素	glucagon 127 134 157 164 166 177 236
胰凝乳蛋白酶	chymotrypsin 35 44 90 91 93 189
乙酰胆碱	acetylcholine 411
乙酰辅酶 A ,乙酰 CoA	acetyl CoA 119 159 163 176
乙酰 CoA 羧化酶	acetyl CoA carboxylase 163
<i>N</i> -乙酰谷氨酸	<i>N</i> -Acetylglutamate 198
乙酰乙酸	acetoacetate 161 162
异构酶	isomerase 96
异亮氨酸	isoleucine 30 31 209
异乳糖	allolactose 296
有氧氧化	aerobic oxidation 116
有(意)义链	sence strand 264
易化扩散	facilitated diffusion 347
抑癌基因	anti-oncogene ,Tumor suppressor gene 305 309
抑制剂	inhibitor 104
引发酶	primase 245
引物	primer 245

- Northern 印迹 Northern blotting 325
- Southern 印迹 Southern blotting 324
- Western 印迹 Western blotting 325
- 应激 stress 236
- 融合蛋白 fusion protein 309
- 融解温度 melting temperature 19
- 溶酶体酶 lysosomal enzymes 65, 191
- 有丝分裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase, MAPK 366
- 诱导, 诱导作用 induction 235
- 诱导契合假说 Induced fit hypothesis 99
- 原癌基因 protooncogene, pro-onc 306
- 原核生物 prokaryote 13, 250, 271, 279, 296
- 原胶原 tropocollagen 41
- 原卟啉 protoporphyrin 382
- 原位杂交 *In situ* hybridization 324
- 朊病毒蛋白 prion protein 49
- 运铁蛋白 transferrin 65, 375, 425
- Z**
- 杂交 hybridization 19, 323
- 载体 vector 319
- 载脂蛋白 apolipoprotein, Apo 180
- 真核生物 eukaryote 13
- 支链氨基酸 branched-chain amino acid 209
- 质粒 plasmid 13, 319
- 增强子 enhancer 300
- 增色效应 hyperchromic effect 19
- 增殖 proliferation 305
- 增殖细胞核抗原 proliferating cell nuclear antigen, PCNA 247
- 整合蛋白 integrin 66
- β 折叠 β -pleated sheet 37
- 中间密度脂蛋白 Intermediate density lipoprotein 181
- 中心法则 central dogma 242
- 主动运输 active transport 346
- 转氨基作用 transamination 193, 145
- 转氨酶 transaminase 193
- 转谷氨酰胺酶 transglutaminase 379
- 转化 transformation 307, 321
- 转换 transition 254
- 转换数 turnover number 102
- 转基因动物 transgenic animal 328
- β 转角 β -turn 38
- 转录 transcription 242, 262
- 转录后修饰 post-transcriptional modification 270
- 转录因子 transcription factor 263
- 转染 transfection 321
- 转位 translocation 309

转移酶	transferase 96
转运 RNA	transfer RNA 16 269 277
转运蛋白	transporter 109
转座	transposition 254
终止重复顺序	terminal repeat sequence 272
终止密码	termination codon 276
阻遏作用	repression 235 294
组胺	histamine 202
组氨酸	histidine 30 31 44 202 203
组蛋白	histone 14
组织纤溶酶原激活物	tissue plasminogen activator t-PA 380
组织因子	tissue factor 379
最大速率	maximum velocity 101
最适温度	optimum temperature 104
脂蛋白	lipoprotein 178 ~ 185
脂质代谢	lipid metabolism 156
脂肪	fat 156 157
脂肪动员	fat mobilization 157
脂肪酸	fatty acid 158
脂肪酸 β -氧化	fatty acid β -oxidation 159
脂肪酸合成	fatty acid synthesis 163
脂酶	lipase 157 390
脂溶性维生素	lipid-soluble vitamin 74 ~ 78
脂质体	liposome 335
DNA 指导的 DNA 聚合酶	DNA directed DNA polymerase, DDDP 245
DNA 指导的 RNA 聚合酶	DNA directed RNA polymerase, DDRP 262
RNA 指导的 RNA 聚合酶	RNA directed RNA polymerase, RDRP 273
自分泌	autocrine 307
自由基	free radical 77 152

二、英汉名词索引

A

absolute specificity	绝对特异性 98
abzyme	抗体酶 110
acceptor site	受位 281
acetoacetate	乙酰乙酸 161 162
acetylcholine	乙酰胆碱 411
acetyl CoA	乙酰辅酶 A 119 159 163 176
acetyl CoA carboxylase	乙酰 CoA 羧化酶 163
activation energy	活化能 97
active oxygen species	活性氧 152
acute phase protein, APP	急性时相蛋白 376
active site	活性部位 90
active transport	主动运输 346
adaptor protein	连接物蛋白 356

acyl carrier protein (ACP)	酰基载体蛋白 81 ,164
adenine	腺嘌呤 8
adenosine	腺(嘌呤核)苷 8
adenosine triphosphate	腺苷三磷酸 150
s-adenosylmethionine	s-腺苷蛋氨酸 205
adenylate cyclase	腺苷酸环化酶 128 ,157 ,177 ,358
aerobic oxidation	有氧氧化 116
albumin	清蛋白 374
albinism	白化病 209
alanine	丙氨酸 29 ,31
alanine-glucose cycle	丙氨酸-葡萄糖循环 197
alanine transaminase ,ALT	丙氨酸转氨酶 194
allolactose	异乳糖 296
allopurinol	别嘌呤醇 224
allosteric enzyme	变构酶 92 ,93 ,232
amine	胺 190
amino acid	氨基酸 28 ,192
amino acid metabolism	氨基酸代谢 192
amino acid sequencing	氨基酸序列分析 33
aminoacyl site	氨基酰位 281
aminoacyl-tRNA	氨基酰-tRNA 277
γ -aminobutyric acid	γ -氨基丁酸 81 ,202 ,413
δ -aminoy-levulinic acid ,ALA	δ -氨基 γ -酮基戊酸 382
aminotransferase	氨基转移酶 193
ammonia	氨 196
antibiotics	抗生素 290
anticancer agent	抗癌剂 226
anticoagulant factor	抗凝血因子 379
anticodon	反密码子 17 ,276
antimetabolite	抗代谢物 224
anti-oncogene	抑癌基因 305 ,309
antioxidant	抗氧化剂 77 ,153
antisense strand	反(意)义链 264
antisense nucleic acid	反义核酸 333
antithrombin III	抗凝血酶III 379
apoenzyme	酶蛋白 88
apolipoprotein	载脂蛋白 180
apoptosis	凋亡 305
arachidonic acid	花生四烯酸 168
arginine	精氨酸 30 ,31 ,198
aromatic amino acid	芳香族氨基酸 85
asparagine	天冬酰胺 30 ,31 ,197
aspartate	天冬氨酸 30 ,31 ,44
aspartate transaminase ,AST	天冬氨酸转氨酶 194
ATP synthase	ATP合酶 147
attenuator	衰减子 297
autocrine	自分泌 307

B

- bacteriophage
bidirectional replication
bile acid
bile pigment
bilinogen
bilirubin
biliverdin
binding group
bioinformatics
biological oxidation
biologically active peptide
biomembrane
biotin
biotransformation
2,3-bisphosphoglycerate
blood biochemistry
blood coagulation
brain biochemistry
branched-chain amino acid
branching enzyme
bypass synthesis
- 噬菌体 319
双向复制 252
胆汁酸 177, 394
胆色素 397
胆素原 382, 397
胆红素 397
胆绿素 397
结合基团 90
生物信息学 24
生物氧化 137
生物活性肽 32
生物膜 339
生物素 81
生物转化 388
2,3-二磷酸甘油酸 380
血液生物化学 373
血液凝固 376
脑生物化学 407
支链氨基酸 209
分支酶 123
旁路合成 258

C

- Ca²⁺-calmodulin kinase signal transduction pathway
cadherin
calcitonin
calcium
calmodulin
cAMP-dependent protein kinase
cAMP phosphodiesterase
cAMP-protein kinase A signal transduction pathway
cap-site binding protein, CBP
carbamoyl phosphate synthetase I
carbamoyl phosphate synthetase II
carbohydrate metabolism
carbon monoxide
γ-carboxyglutamate
carboxypeptidase
cardiolipin
carnitine
catabolite gene activator protein
catalase
catalytic group
catecholamine
cDNA library
- Ca²⁺-钙调蛋白激酶信号途径 363
钙黏着蛋白 409
降钙素 421
钙 420
钙调蛋白 128, 364
cAMP-依赖的蛋白激酶 360
cAMP 磷酸二酯酶 116
cAMP-蛋白激酶 A 信号转导途径 134, 360
帽子结合蛋白 303
氨基甲酰磷酸合成酶 I 198
氨基甲酰磷酸合成酶 II 200, 219
糖代谢 115
一氧化碳 363
γ-羧基谷氨酸 77, 377
羧基肽酶 98, 189
心磷脂 170
肉碱 158
代谢分解物基因激活蛋白 296
过氧化氢酶 139, 153
催化基团 90
儿茶酚胺 413
cDNA 文库 321

cell cycle	细胞周期 310
cellular oncogene ρ -onc	细胞癌基因 306
central dogma	中心法则 242
centrifugation	离心 52, 53
ceramide	神经酰胺 71, 174, 408
cGMP-protein kinase G signal transduction pathway	cGMP-PKG 信号途径 363
chaperonin	伴侣蛋白 286
chemical modification	化学修饰 93, 127, 233
chenodeoxycholic acid	鹅脱氧胆酸 394
cholesterol	胆固醇 80, 85, 175 ~ 178
cholic acid	胆酸 194
choline	胆碱 171
choline esterase	胆碱酯酶 190
chondroitin sulfate	硫酸软骨素 69
chromatin	染色质 13
chromium	铬 429
chromosome	染色体 13
chylomicron	乳糜微粒 157, 179, 181
chymotrypsin	胰凝乳蛋白酶 35, 44, 90, 93, 189
cis-acting element	顺式作用元件 294
citrate	柠檬酸 118
citrate-pyruvate cycle	柠檬酸-丙酮酸循环 163
citrulline	瓜氨酸 198
clamp loading factor	滑动夹子的装载因子 247
cloning vector	克隆载体 319
cloning animal	克隆动物 329
coagulation factor	凝血因子 376
cobalamine	钴胺素 83
coding strand	编码链 264
codon	密码子 275
coenzyme	辅酶 89
coenzyme A	辅酶 A 81, 89
coenzyme Q	辅酶 Q 141
collagen	胶原 40 ~ 41
competence cell	感受态细胞 322
competitive inhibition	竞争性抑制作用 105
complementary DNA ρ cDNA	互补 DNA 23, 36, 253
complex I	复合体 I 140, 141
complex II	复合体 II 142
complex III	复合体 III 142
complex IV	复合体 IV 144
conformational change	构象改变 36, 92, 232
conjugated bile acid	结合胆汁酸 394
conjugated enzyme	结合酶 88
conjugation reaction	结合反应 391
consensus sequence	共有序列, 一致性序列 270

- cooperativity 协同效应 47 92
- copper 铜 426
- core enzyme 核心酶 270
- Cori cycle 乳酸循环 126
- covalent modification 共价修饰 93 233
- creatine 肌酸 206
- creatine kinase 肌酸激酶 95 206
- cysteine 半胱氨酸 29 31 84 206
- cytochrome C 细胞色素 C 144
- cytochrome c oxidase 细胞色素 C 氧化酶 144
- cytochrome P450 细胞色素 P450 389
- cytokine 细胞因子 313 356
- cytosine 胞嘧啶 9
- D**
- DNA damage DNA 损伤 256
- deamination 脱氨基作用 193
- debranching enzyme 脱支酶 123
- decarboxylation 脱羧基作用 202
- degeneracy 简并性 276
- deletion mutation 缺失突变 255
- D - loop replication D 攀复制 251
- denaturation 变性 19 50
- de novo synthesis 从头合成 214
- deoxycholic acid 脱氧胆酸 394
- deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸 11 243
- deoxyribozyme 脱氧核酶 21 89
- dermatan sulfate 硫酸皮肤素 69
- diabetes mellitus 糖尿病 134 238
- diacylglycerol 二酰甘油 157 166
- diacylglycerol - protein kinase C signal transduction pathway 二酰甘油-PKC 信号转导途径 364
- dialysis 透析 54
- digestion 消化作用 115 156
- 1,25 - dihydroxy vitamin D₃ 1,25 -二羟维生素 D₃ , 76 422
- DNA directed DNA polymerase ,DDDP DNA 指导的 DNA 聚合酶 245
- DNA directed RNA polymerase ,DDRP DNA 指导的 RNA 聚合酶 262
- docking protein 停泊蛋白 366
- dolichol 长萜醇 266
- domain 结构域 39 301
- donor site 给位 281
- dopamine 多巴胺 208
- dot blot hybridization 斑点杂交 303
- double reciprocal plot 双倒数作用 103 106 107
- E**
- editing 编辑 267 302

Edman degradation	Edman 降解法 33
eicosanoid	类二十碳化合物 167
electron transport chain	电子传递链 146
electrophoresis	电泳 55
elongation factor ,EF	延长因子 281
endocrine	内分泌 313 ,356
endocytosis	胞吞作用 346 ,350
enhancer	增强子 300
enterohepatic circulation	肠肝循环 395
enzyme	酶 88
enzyme engineering	酶工程 111
enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	酶联免疫测定法 110
epidermal growth factor ,EGF	表皮生长因子 307 ,366
epinephrine	肾上腺素 134 ,157 ,166
essential amino acid	必需氨基酸 188
essential fatty acid	必需脂肪酸 167
essential group	必需基团 90
eukaryotic cell	真核细胞 13
excision repair	切除修复 256
excitatory amino acid ,EAA	兴奋性氨基酸 414
exocytosis	胞吐作用 350
exon	外显子 267
expression vector	表达载体 322
extracellular matrix	细胞外基质 66 ,355
extrinsic pathway	外源途径 378
F	
facilitated diffusion	易化扩散 347
false neurotransmitter	假神经递质 209
fat	脂肪 156 ,157
fat mobilization	脂肪动员 157
fatty acid	脂肪酸 158
fatty acid β - oxidation	脂肪酸 β -氧化 159
fatty acid synthesis	脂肪酸合成 163
feedback inhibition	反馈抑制 231
ferritin	铁蛋白 289 ,424
fibrinogen	纤维蛋白原 376
fibrinolysis	纤维蛋白溶解 380
fibronectin	纤连蛋白 66 ,76
flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸 79 ,89 ,142
flavin mononucleotide	黄素单核苷酸 79 ,89 ,141
fluid mosaic model	液态镶嵌模型 345
fluorine ,F	氟 429
folic acid	叶酸 82 ,203
frame shift mutation	移码突变 255
free radical	自由基 77 ,152
fructose	果糖 132

fusion protein	融合蛋白 309
G	
galactose	半乳糖 61
gangliosides	神经节苷脂 71 ,174 ,408
gel filtration	凝胶过滤 54
gene	基因 7
gene augmentation	基因增补 333
gene chips	基因芯片 324
gene cloning	基因克隆 317
gene correct	基因纠正 333
gene diagnosis	基因诊断 331
gene expression	基因表达 293
gene inactivation	基因失活 333
gene knock-out	基因剔除 ,基因敲除 330
gene polymorphism	基因多态性 332
gene replacement	基因置换 333
gene therapy	基因治疗 333
gene transfer	基因转移 334
genetic engineering	基因工程 317
genetic recombination	基因重组 317
genome	基因组 22
genomic library	基因组文库 320
genomics	基因组学 22
glia fibrillary acidic protein ,GFAP	胶质原纤维酸性蛋白 407
globulin	球蛋白 374
glucagon	胰高血糖素 127 ,134 ,157 ,164 ,166 ,177 ,236
glucogenic amino acid	生糖氨基酸 201
glucogenic and ketogenic amino acid	生糖兼生酮氨基酸 201
glucokinase	葡糖激酶 116
gluconeogenesis	葡糖异生 124
glucose	葡萄糖 61 ,116
glucose transporter	葡萄糖转运蛋白 116 ,134 ,347 ,349
glucuronic acid	葡糖醛酸 391
glutamate	谷氨酸 30 ,31 ,193 ,377 ,414
glutamate dehydrogenase	谷氨酸脱氢酶 193 ,195
glutamine	谷氨酰胺 30 ,31 ,196 ,413
glutathione	谷胱甘肽 32 ,84 ,207
glycerophosphate shuttle	磷酸甘油穿梭 140
glycerol	甘油 158
glycerophospholipid	甘油磷脂 407
glycine	甘氨酸 29 ,31 ,42 ,203 ,382 ,414
glycobiology	糖生物学 60
glycocholic acid	甘氨酸胆酸 394
glycoconjugate	糖复合物 60
glycogen	糖原 122
glycogen synthase	糖原合酶 123

glycogenesis	糖原生成 123
glycogenolysis	糖原分解 123
glycolipid	糖脂 70 ~ 72
glycolysis	糖酵解 120
glycomics	糖组学 60
glycophosphatidylinositol ,GPI	糖磷脂酰肌醇 65
glycoprotein	糖蛋白 62 ~ 68 ,76
glycosaminoglycan	糖胺聚糖 68 ,69
glycosylation	糖基化作用 285
glycosyl transferase	糖基转移酶 67 ,68
growth factor ,GF	生长因子 307
guanine	鸟嘌呤 8
guanine nucleotide exchange factor ,GEF	鸟苷酸交换因子 366
guanylate binding protein ,G - protein	鸟苷酸结合蛋白 ,G 蛋白 358
guanylate cyclase ,GC	鸟苷酸环化酶 359 ,363
H	
hammerhead structure	锤头结构 20
heat shock protein	热休克蛋白 286
helicase	解(螺)旋酶 246
α - helix	α -螺旋 37
helix - turn - helix motif	螺旋—转角—螺旋模体 38 ,301
heme	血红素 46 ~ 48 ,81 ,382
heme oxygenase	血红素加氧酶 397
hemoglobin	血红蛋白 40 ,45 ,47 ~ 49 ,382
heparin	肝素 68 ,69 ,70
heterogeneous nuclear RNA ,hnRNA	不均一核 RNA 302
hexokinase	己糖激酶 116
high-density lipoprotein	高密度脂蛋白 179 ,183
high performance liquid chromatography ,HPLC	高效液相色谱法 34 ,57
hyperlipoproteinemia	高脂蛋白血症 184
histamine	组胺 202
histidine	组氨酸 30 ,31 ,44 ,202 ,203
histone	组蛋白 14
HMG CoA reductase	HMG CoA 还原酶 176
holoenzyme	全酶 88 ,270
homocysteine	同型半胱氨酸 205
homologous recombination	同源重组 254
hormone response element ,HRE	激素反应元件 369
hormone-sensitive lipase	激素敏感脂肪酶 157
housekeeping gene	持家基因 306
human genome project	人类基因组计划 23
hybridization	杂交 19 ,323
hyperchromic effect	增色效应 19
hydrogen bond	氢键 12 ,39 ,408
hydrolase	水解酶 96
hydrophobic bond	疏水键 39

β -hydroxybutyrate	β -羟丁酸 161
hydroxyproline	羟脯氨酸 42
5-hydroxytryptamine 5-HT	5-羟色胺 202
hyperglycemia	高血糖 134
hyperlipoproteinemia	高脂蛋白血症 184
hypoglycemia	低血糖 134
I	
immediate-early gene	立早基因 364
immobilized enzyme	固定化酶 110
immunoglobulin	免疫球蛋白 375
induced fit hypothesis	诱导契合假说 99
inhibitor	抑制剂 104
initial velocity	初速率 100
initiation complex	起始复合物 279
initiation factor	起始因子 279
inorganic biochemistry	无机物生物化学 416
inosine monophosphate	次黄嘌呤核苷酸 195, 215
<i>in situ</i> hybridization	原位杂交 324
insulin	胰岛素 33, 44, 134, 157, 164, 166, 177, 236
integrin	整合蛋白 66
interferon β IFN	干扰素 290
interleukin	白介素 369
intermediate density lipoprotein	中间密度脂蛋白 181
intracellular receptor	细胞内受体 359
intrinsic pathway	内源途径 377
intrinsic protein	内在蛋白 342
inverted repeat sequence	反向重复序列 22
intron	内含子 267
iodine	碘 427
ion exchange chromatography	离子交换层析 54, 55
iron	铁 424
iron-sulfur protein	铁-硫蛋白 54, 55
irreversible inhibition	不可逆性抑制作用 424
isoelectric focusing	等电聚焦 55
isoelectric point	等电点 30, 50
isoenzyme β isozyme	同工酶 94, 230
isoleucine	异亮氨酸 30, 31, 209
isomerase	异构酶 96
J	
jaundice	黄疸 402
K	
keratan sulfate	硫酸角质素 69
ketogenic amino acid	生酮氨基酸 201
α -ketoglutarate	α -酮戊二酸 193

ketone bodies	酮体 161 237
kinetics of enzyme-catalyzed reaction	酶促反应动力学 100 ~ 108
Klenow fragment	Klenow 片段 318
L	
<i>lac</i> operon	乳糖操纵子 296
lactate	乳酸 120 ,126
lactate dehydrogenase (LDH)	乳酸脱氢酶 94 ,95 ,120 ,126
leader peptide	前导肽 288
leading strand	前导链 249
lecithin	卵磷脂 170 ,340
lecithin :cholesterol acyltransferase	卵磷脂 :胆固醇酰基转移酶 176
leucine	亮氨酸 30 ,31 ,209
leucine zipper motif	亮氨酸拉链模体 301
leukocyte	白细胞 384
leukotriene	白三烯 167 ,169
ligand	配体 357
ligand-gated channel	配体门控通道 347
ligandin	配体蛋白 399
ligases	连接酶 96 ,246
DNA ligase	DNA 连接酶 246
Lineweaver-Burk plot	林-贝氏作图 103
linoleic acid	亚油酸 167
linolenic acid	亚麻酸 167
lipase	脂酶 157 ,390
lipid metabolism	脂质代谢 156
lipid soluble vitamin	脂溶性维生素 74 ~ 78
lipoic acid	硫辛酸 86 ,118
lipoproteins	脂蛋白 178 ~ 185
liposome	脂质体 335
low density lipoprotein	低密度脂蛋白 179 ,182
lyase	裂合酶 96
lysine	赖氨酸 30 ,31 ,42 ,43
lysosomal enzyme	溶酶体酶 65 ,191
M	
mad cow disease	疯牛病 49
magnesium ,Mg	镁 423
malate-aspartate shuttle	苹果酸-天冬氨酸穿梭 140
malonyl CoA	丙二(酸单)酰辅酶 A 163
manganese	锰 428
matchmaker protein	匹配媒体 252
maximum velocity	最大速率 101
melting temperature	融解温度 19
messenger RNA ,mRNA	信使 RNA 15 ,265
metalloenzyme	金属酶 89
metal activated enzyme	金属激活酶 89

methionine	蛋氨酸,甲硫氨酸 30 31 83 203
methylation	甲基化作用 309
Mevalonic acid	甲羟戊酸 176
Michaelis constant	米氏常数 101
Michaelis-Menten equation	米-曼氏方程式 101
microtubule associated protein ,MAP	微管伴随蛋白 408
mineral	矿物质 416
mini chromosome maintenance protein ,MCM	小染色体维系蛋白 248
mismatch repair	错配修复 255
mitochondria	线粒体 139
mitochondrial DNA	线粒体 DNA 14
mitogen-activated protein kinase ,MAPK	有丝分裂原活化蛋白激酶 366
mixed function oxidase	混合功能氧化酶 151
molecular biology	分子生物学 1
molecular cloning	分子克隆 317
molecular hybridization	分子杂交 323
molybdenum	钼 429
monoamine oxidase	单胺氧化酶 389
monocistron	单顺反子 295
monooxygenase	单加氧酶 151 389
motif	模体 模序 30
mucopolysaccharide	黏多糖 70
multienzyme system	多酶体系 90 230
multifunctional enzyme	多功能酶 90 230
mutation	突变 254
myelin	鞘磷脂 174 407
myoglobin	肌红蛋白 46
N	
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Na ⁺ /K ⁺ -ATP 酶 116 348
NADH - ubiquinone oxidoreductase	NADH - 泛醌氧化还原酶 140
neuron	神经元 406
neurotransmitter	神经递质 356
nicotinamide adenine dinucleotide ,NAD ⁺	尼克酰胺-腺嘌呤二核苷酸 80 89 141
nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ,NADP ⁺	尼克酰胺-腺嘌呤二核苷酸磷酸 80 89 130
nicotinic acid	尼克酸,烟酸 79
nitric oxide	一氧化氮 200 363 414
nitrogen balance	氮平衡 187 188
noncompetitive inhibition	非竞争性抑制作用 106 107
nonsense mutation	无义突变 255
norepinephrine	去甲肾上腺素 209
Northern blotting	Northern 印迹 325
nuclear factor-kappa B ,NF κ B	核转录因子 NF κ B 368
nuclear magnetic resonance ,NMR	核磁共振 41
Nuclear receptor	核受体 369
nucleic acid	核酸 7
nucleolar organizer	核仁组织者 266
nucleosome	核小体 13 299

nucleotide	核苷酸 7 8 213
O	
Okazaki fragment	冈崎片段 248
oligomeric enzyme	寡聚酶 90
oncogene	癌基因 305
one-carbon unit	一碳单位 83 203
open reading frame ,ORF	开放阅读框 275
operator	操纵基因 296
operon	操纵子 296
optimum temperature	最适温度 104
ornithine cycle	鸟氨酸循环 198
β -oxidation	β -氧化 159
oxidative phosphorylation	氧化磷酸化 146
oxidoreductase	氧化还原酶类 96
P	
P53	P53 311
palmitate	软脂酸 棕榈酸 163
pantothenic acid	泛酸 81
paracrine	旁分泌 313 356
parathyroid hormone	甲状旁腺激素 421
passive transport	被动转运 346
pentose phosphate pathway	磷酸戊糖途径 130
pepsinogen	胃蛋白酶原 189
peptide	肽 31
peptide unit	肽单元 36
peptidyl site	肽位 281
peripheral (extrinsic) protein	外周蛋白 342
peroxidase	过氧化物酶 139 153
pH	pH 103
phenylalanine	苯丙氨酸 29 31 207
phorbol ester	佛波脂 365
phosphatidyl inositol 4 5 - bisphosphate	磷脂酰肌醇 4 5 -二磷酸 363
phosphatidylinositol-specific	磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C 363
phospholipase C ,PI-PLC	
3'-phospho-adenosine 5'-phosphosulfate ,PAPS	3'-磷酸腺苷 5'-磷酸硫酸 207
phosphocreatine	磷酸肌酸 150
phosphodiesterase	磷酸二酯酶 116 360
phosphoenolpyruvate	磷酸烯醇式丙酮酸 117 125
phosphoenolpyruvate carboxykinase	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 125
phosphofructokinase	磷酸果糖激酶 116 231
phospholipid	磷脂 170
5'-phosphoribosyl - 1 - pyrophosphate ,PRPP	磷酸核糖焦磷酸 215
phosphorus ,P	磷 420
phosphorylase	磷酸化酶 81 123 234
photoreactivation	光激活 256
pinocytosis	胞饮作用 346 350
plasma protein	血浆蛋白 373

plasmid	质粒 13 319
plasminogen	纤溶酶原 380
β -pleated sheet	β 折叠 β 片层 37
point mutation	点突变 308
polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳 54
polyamine	多胺 202
polycistron	多顺反子 275
DNA polymerase	DNA 聚合酶 245
RNA polymerase	RNA 聚合酶 262
polymerase chain reaction	聚合酶链反应 325
polymorphism	多态性 332
polypeptide	多肽 33 202
P/O ratio	磷/氧比 147
porphobilinogen	胆色素原 400
post-transcriptional modification	转录后修饰 270
post-translation processing	翻译后加工 284
potassium	钾 418
prekallikrein	前激肽释放酶 376
pre-initiation complex ,PIC	前起始复合物 260 280
primary bile acid	初级胆汁酸 384
primary structure	一级结构 11 33 42 44 62
primase	引发酶 245
primer	引物 245
prion protein	朊病毒蛋白 49
probe	探针 323
processive process	加工过程 267
prokaryote	原核生物 13 250 271 279 296
proliferating cell nuclear antigen ,PCNA	增殖细胞核抗原 247
proliferation	增殖 305
proline	脯氨酸 29 31 141 142
promoter	启动子 264 300
proofreading	校读 249 252
prostacyclin	前列环素 168
prostaglandin	前列腺素 167
prosthetic group	辅基 89
protease	蛋白酶 194
proteosome	蛋白酶体 192
protein	蛋白质 28 187 275
protein C	蛋白 C 379
G - protein - coupled receptor ,GPCR	G 蛋白偶联型受体 357
protein kinase A	蛋白激酶 A 92 360
protein kinase C	蛋白激酶 C 364
protein kinase G	蛋白激酶 G 363
protein S	蛋白 S 379
proteoglycan	蛋白聚糖 68 ~ 70
proteome	蛋白质组 56
proteomics	蛋白质组学 25 ~ 57
protooncogene	原癌基因 306
protoporphyrin	原卟啉 382

P site ,ribosomal	核糖体 P 位 281
purine	嘌呤 8
purine nucleotide cycle	嘌呤核苷酸循环 195
purine ribonucleotide metabolism	嘌呤核苷酸代谢 214 ~ 218
putrefaction	腐败作用 190
pyridoxal phosphate	磷酸吡哆醛 81 ,194 ,202
pyridoxine	吡哆醇 81
pyrimidine	嘧啶 8
pyrimidine nucleotide metabolism	嘧啶核苷酸代谢 218 ~ 221
pyruvate	丙酮酸 118
pyruvate carboxylase	丙酮酸羧化酶 125
pyruvate dehydrogenase	丙酮酸脱氢酶 118
pyruvate kinase	丙酮酸激酶 117
Q	
quaternary structure	四级结构 40
R	
random coil	无规卷曲 38
rare base	稀有碱基 8
rate limiting enzyme	限速酶 230
X - ray crystallography	X 射线晶体分析 40
Rb gene	Rb 基因 310
reactive oxygen species	活性氧 152
receptor	受体 357
receptor tyrosine protein kinase ,RTPK	受体酪氨酸蛋白激酶 358 ,365
recombinant DNA	重组 DNA 317
rectangular hyperbola	矩形双曲线 100 ,101
red blood cell	红细胞 351 ,384
relative specificity	相对特异性 98
release factor	释放因子 283
renaturation	复性 19 ,50
DNA repairing	DNA 修复 256
replication	复制 242
replication bubble	复制泡 248
replication fork	复制叉 247
replicon	复制子 247
repression	阻遏作用 235 ,294
respiratory chain	呼吸链 140
restriction endonuclease	限制性内切核酸酶 317
restriction fragment length	限制性片段长度多态性 331
polymorphism ,RFLP	
retinal	视黄醛 75
retinol binding protein ,RBP	视黄醇结合蛋白 75
reverse transcriptase	逆转录酶 253 ,318
reverse transcription	逆转录 253
reversible inhibition	可逆性抑制 105
ρ (rho)protein factor	ρ (rho)蛋白因子 272
riboflavin	核黄素 79 ,89

- ribonucleic acid 核糖核酸 14
- ribosomal cycle 核糖体循环 281
- ribosomal RNA 核糖体 RNA 17, 279
- ribosome 核糖体, 核蛋白体 275
- ribozyme 核酶 20, 89
- RNA directed RNA polymerase RNA 指导的 RNA 聚合酶 272
- RNA processing RNA 加工 267, 269
- S**
- salt linkage 盐键 48
- salting out 盐析 52
- salvage pathway 补救合成 217, 221
- saturation curve oxygen hemoglobin 氧合血红蛋白氧饱和曲线 47
- secondary bile acid 次级胆汁酸 384
- secondary structure 二级结构 11, 36, 42
- second messenger 第二信使 356
- selectin 选择素 66
- selenium 硒 428
- semiconservative replication 半保留复制 243
- semicontinuous replication 半连续复制 249
- sense strand 有(意)义链 264
- DNA sequencing DNA 序列分析 327
- serine 丝氨酸 29, 31, 44, 203
- serine protease 丝氨酸蛋白酶 44
- serine/threonine protein kinase 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 234, 307
- serpentine receptor 蛇型受体 357
- sickle cell anemia 镰刀红细胞贫血 45
- signal peptide 信号肽 288
- signal recognition particle, SRP 信号识别颗粒 288
- signal transducer and activator of transcription, STAT 信号转导物及转录活化因子 314, 288
- signal transduction 信号转导 355
- silencer 沉默子 300
- simple enzyme 单纯酶 88
- single strand conformation polymorphism, SSCP 单链构象多态性 331
- single-stranded DNA binding protein 单链 DNA 结合蛋白 246
- sliding clamp 滑动夹子 247
- small nuclear ribonucleoprotein, snRNP 小核核蛋白 267
- small G protein 小 G 蛋白 306, 366
- small nuclear RNA 小核 RNA 267
- sodium 钠 418
- sodium glucose transporter 钠-葡萄糖转运蛋白 115, 349
- sodium potassium (Na⁺/K⁺)ATPase 钠/钾 ATP 酶 116, 348
- SOS regulon SOS 调节子 259
- Southern blot Southern 印迹 324
- specificity enzyme 酶的特异性 97
- spermidine 亚精胺 203
- spermine 精胺 203
- sphingoglycolipid 鞘糖脂 70, 71, 175, 408

sphingolipid	鞘脂质 172, 174
sphingomyelin	鞘磷脂 174, 408
spliceosome	剪接体 267
splicing enzyme	剪接酶 267
starvation	饥饿 237
steady state	稳态 101
stem-loop structure	茎-环结构 272
stereospecificity	立体异构特异性 98
stress	应激 236
structure gene	结构基因 296
substrate	底物 97
substrate cycle	底物循环 125, 231
succinate - ubiquinone oxidoreductase	琥珀酸-泛醌氧化还原酶 142
succinyl CoA	琥珀酰辅酶 A 113
sulfur amino acid	含硫氨基酸 205
superoxide dismutase	超氧化物歧化酶 153
synthetase	合成酶 96
T	
tandem enzyme	串联酶 90
TATA box	TATA 盒子 264
taurine	牛磺酸 206
taurocholic acid	牛磺胆酸 394
telomerase	端粒酶 249
telomere	端粒 249
template	模板 265
template strand	模板链 265
terminal repeat sequence	终止重复顺序 272
termination codon	终止密码 276
tertiary structure	三级结构 39
tetrahydrobiopterin	四氢生物蝶呤 207
tetrahydrofolate	四氢叶酸 83, 203
thiamine pyrophosphate (TPP)	焦磷酸硫胺素 78, 89
thiolysis	硫解 159, 162
threonine	苏氨酸 30, 31
thrombin	凝血酶 44, 70, 377
thromboxane	血栓烷 167
thymine	胸腺嘧啶 8
tissue factor	组织因子 379
tissue plasminogen activator μ - PA	组织纤溶酶原激活物 380
tocopherol	生育酚 77
topoisomerase	拓扑异构酶 245
trace mineral	微量元素 424
trans-acting factor	反式作用因子 294
transaminase	转氨酶 193, 195
transcription	转录 242, 262
transcription factor	转录因子 263
transfection	转染 321
transferase	转移酶 96

transferrin	运铁蛋白 65, 375, 425
transfer RNA	转移 RNA 16, 269, 277
transformation	转化 307, 321
transgenic animal	转基因动物 328
transglutaminase	转谷氨酰胺酶 379
transition	转换 254
transition state	过渡态 99, 110
translation	翻译 275
translocation	转位, 易位 309
transmembrane domain	跨膜结构域 349
transporter	转运蛋白 109
transposition	转座 254
transversion	颠换 255
triacylglycerol	三酰甘油 156, 157, 162, 165
tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环 118
triiodothyronine	三碘甲腺原氨酸 209, 427
triplet code	三联体密码 17, 276
tropocollagen	原胶原 41
trypsin	胰蛋白酶 35, 44, 90, 98, 189
trp operon	色氨酸操纵子 297
tryptophan	色氨酸 29, 31, 203, 209
tumor suppressor gene	抑癌基因 305, 309
β -turn	β 转角 38
turnover number	转换数 102
two dimensional electrophoresis	双相电泳 56
tyrosine	酪氨酸 29, 31, 207
tyrosine-specific protein kinase, TPK	酪氨酸蛋白激酶 358
U	
ubiquinone	泛醌 141
ubiquinone-cytochrome oxidoreductase	泛醌-细胞色素氧化还原酶 142
ubiquitin	泛素 192
ultrafiltration	超滤 54
uncompetitive inhibition	反竞争性抑制 107
uncoupler	解偶联剂 150
uracil	尿嘧啶 8
urea	尿素 197
urea cycle	尿素循环, 鸟氨酸循环 198
uric acid	尿酸 217
uridine	尿苷 9
uridine diphosphate glucose	尿苷二磷酸葡萄糖 123
uridine diphosphate glucuronic acid	尿苷二磷酸葡糖醛酸 391
urobilinogen	尿胆素原 400
uroporphyrinogen	尿卟啉原 382
V	
valine	缬氨酸 30, 31, 209
vector	载体 39
very low density lipoprotein	极低密度脂蛋白 179, 181

viral oncogene <i>v - onc</i>	病毒癌基因 306
vitamin A	维生素 A 74
vitamin B ₁	维生素 B ₁ 78
vitamin B ₂	维生素 B ₂ 79
vitamin B ₆	维生素 B ₆ 81
vitamin B ₁₂	维生素 B ₁₂ 83
vitamin C	维生素 C 83
vitamin D	维生素 D 76, 422
vitamin E	维生素 E 77
vitamin K	维生素 K 77
voltage gated channel	电压门控通道 347
W	
water	水 416
water soluble vitamin	水溶性维生素 78 ~ 85
Western blot	Western 印迹 325
X	
xanthine	黄嘌呤 218
Z	
zinc	锌 426
zinc finger motif	锌指模体 38, 301
zwitterions ion	兼性离子 50
zymogen	酶原 93

附录五

主要参考文献

1. 陈惠黎,李茂森,朱运松. 生物大分子的结构和功能. 上海:上海医科大学出版社,1999
2. 陈石根,周润琦. 酶学. 上海:复旦大学出版社,2001
3. 陈媛,周玫,主编. 自由基医学基础与病理生理. 北京:人民卫生出版社,2002
4. 冯作化. 医学分子生物学. 第一版. 北京:人民卫生出版社,2001
5. 高天祥,田竟生. 医学分子生物学. 第一版. 北京:科学出版社,1999
6. 谷志远,赵亚力. 现代医学分子生物学. 第一版. 北京:人民军医出版社,1998
7. 韩济生. 神经科学原理. 第二版. 北京:北京医科大学出版社,1999
8. 何志谦. 人类营养学. 第二版. 北京:人民卫生出版社,2000
9. 静国忠. 基因工程及其分子生物学基础. 第一版. 北京:北京大学出版社,1999
10. 康格非. 临床生物化学和生物化学检验. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1998
11. 李璞,主编. 医学遗传学. 北京:中国协和医科大学出版社,1999
12. 林钧材,杨康成. 生物化学. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1996
13. 贲长恩,牛建昭主编. 分子细胞学与疾病. 北京:人民卫生出版社,2001
14. 任邦哲,蒋中俊. 生物化学与临床医学. 长沙:湖南科学技术出版社,1993
15. 沈同,王镜岩主编. 生物化学(上册). 第二版. 北京:高等教育出版社,1991
16. 沈翊,方福德. 真核基因表达调控. 第1版. 北京:高等教育出版社,1996
17. 王镜岩,朱圣庚,徐长法. 生物化学. 第3版. 北京:高等教育出版社,2002
18. 王克勤. 脂蛋白与动脉粥样硬化. 北京:人民卫生出版社,1995
19. 王琳芳,杨克恭. 医学分子生物学原理. 北京:高等教育出版社,2001
20. 王尧,杜子威. 神经生物化学与分子生物学. 北京:人民卫生出版社,1997
21. 魏涌. 医学生物化学. 第3版. 北京:世界图书出版公司,1998
22. 徐晓利,马润泉. 医学生物化学. 北京:人民卫生出版社,1998
23. 杨惠玲,潘景轩,吴伟康. 高级病理生理学. 北京:科学技术出版社,1998
24. 约翰. 海纳曼(美). 维生素矿物质营养百科. 北京:中国友谊出版公司,2001
25. 查锡良. 生物化学. 北京:人民卫生出版社,2001
26. 张蘅. 生物化学. 第三版. 北京:北京医科大学出版社,1999
27. 张潭沐. 抗肿瘤药物的药理与临床应用. 郑州:河南医科大学出版社,1999
28. 赵学信,李萍. 生物化学. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1997
29. 中国营养学会. 中国居民膳食指南及平衡膳食宝塔. 中国保健食品,2002,15(10):5-7
30. 周爱儒主编. 生物化学. 第五版. 北京:人民卫生出版社,2000
31. 朱世能,陆世伦. 肿瘤基础理论. 第二版. 上海:上海医科大学出版社,2000
32. Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland publishing, 2002
33. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L. Biochemistry. 5th Edition. New York: W. H. Freeman Publishers, 2002
34. Chytil F, McCormick D B. Vitamins and coenzymes. New York: New York Halsted Press, 1986
35. Devlin T M. . Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, New York: Wiley-Liss, 2002

36. Garrett R H ,Grisham C M. Biochemistry. 2nd ed . Orlando :Harcourt ,1999
37. Lehninger A L ,Nelson D L ,Cox M M. Principles of biochemistry. 2nd ed. New York :Worth publishers ,1998
38. Lodish H ,Baltimore D ,Berk A ,Zipursky S. L ,Matsudaira P ,Darnell J. Molecular Cell Biology. 3rd edition. New York : W. H. Freeman and Company , 1995
39. Mckee T ,Mckee JR. Biochemistry :An introduction. second edition. Beijing :China Science Press ,1999
40. Nelson D L. Cox M M. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd ed. New York :Worth Publishers 2000
41. Pennington SR ,Dunn MJ ,Proteomics from Protein Sequence to Function (钱小红译 ,蛋白质组学 :从序列到功能) ,北京 科学出版社 2002
42. Prusiner SB. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA ,1998 95 :13363 – 13383
43. Rex M. Thomas W C. Artgur A S. etal. Biochemistry. 6th ed. Mosby-year Book Inc ,1996
44. Robert K. Murray ,Daryl K. Granner ,Peter A. Mayes ,et al. Harper's Biochemistry. 25th Edition. Stamford McGraw-Hill 2000
45. Trudy M ,James R M. Biochemistry. 2nd ed. McGraw-Hill Companies ,1999
46. Voet D ,Voet J G. Biochemistry 2nd ed. New York :John Wiley & Sons ,Inc. ,1995
47. Rober F. Weaver ,Molecular Biology First Edition McGraw-Hill Companies Inc.
48. Zubay G. Biochemistry. 3rd Edition. Dubuque :Wm. C. Brown Publishers ,1993