

酶 ERK、JNK、p38MAPK 在 RA 滑膜组织中过度表达,使转录因子磷酸化,启动基因转录,产生一系列促炎性细胞因子、化学趋化因子、基质蛋白降解酶等,引起软骨和骨组织的破坏;促炎性细胞因子及化学趋化因子又能活化 Ras - MAPKs 路径,而引起持久的慢性滑膜炎。可见,Ras 的活化是信号途径启动的关键,MAPKs 级联反应是酶偶联受体 - Ras - MAPKs 信号转导路径的中间环节。

G 蛋白 - AC - cAMP 介导的信号转导在 RA 炎症反应和骨破坏中起重要作用。G 蛋白 - AC - cAMP 信号转导是多数细胞活动的主要信号通路。很多胞外信号包括细胞因子、炎性介质等都能直接或间接通过 G 蛋白在胞内传输,并进而通过第二信使 cAMP、cGMP、IP3 等激活 PKA、PKC 和钙调蛋白激酶等。同时 G 蛋白通过激活 MAPKs 或肌醇磷脂 - 3 激酶 (PI - 3K),将 G 蛋白 - AC - cAMP 信号传导通路和 Ras - MAPKs 信号传导路径有机联系起来。Gi 偶联受体激动剂 (溶血磷脂 A 等) 均可激活 MAPKs,且有 Gβγ 参与,Gβγ 还可诱导 Ras 活化,激活 MAPKs。另外,cAMP 使蛋白激酶 A (PKA) 磷酸化而活化,活化的 PKA 可以抑制 Raf - 1 的活化,而干扰 Ras 途径启动的细胞增殖,增强内源性核酸内切酶的活性,从而影响细胞生长,诱导细胞凋亡。可见,G 蛋白 - AC - cAMP 信号转导路径与酶偶联受体 - Ras - MAPKs 信号转导路径间可能存在交叉联系。

本课题组在成功建立大鼠佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 模型和胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 模型得基础上,以滑膜细胞为靶点,探讨了白芍总苷 (TGP) 和木瓜苷 (GCS) 对 G 蛋白 - AC - cAMP 信号转导和 Ras - MAPKs 信号转导影响,以揭示 TGP 和 GCS 的分子作用机制。

研究发现, TGP 可明显抑制 AA 大鼠滑膜组织中 ERK、JNK 和 p38 磷酸化;抑制成纤维样滑膜细胞 (FLS) 的 ERK、JNK 和 p38 磷酸化,降低 MMP - 1 和 MMP - 3 的表达和细胞过度增殖。提示,TGP 可以通过抑制 AA 大鼠滑膜组织 MAPKs 信号通路等抑制滑膜增生。

调节滑膜细胞 G 蛋白 - AC - cAMP 信号通路平衡是 TGP 和 GCS 发挥抗滑膜细胞增殖的重要分子机制。TGP 体外用药能明显抑制成纤维样滑膜细胞 Gi 1、Gi2、Gi3 表达,对 Gs 表达没有显著影响;可见 TGP 抑制滑膜细胞 Gi 表达可能是 TGP 发挥其药理作用的机制之一。GCS 可抑制细胞因子介导的信号转导,包括 TNF - α 和 IL - 1 等,这些细胞因子影响了 G 蛋白 - AC - cAMP 信号通路, GCS 体外用药可显著升高滑膜细胞 cAMP 水平,抑制 AA 大鼠 Gi mRNA 表达,促进 Gs mRNA 表达。调节 AA 大鼠滑膜细胞异常改变的 G 蛋白 - AC - cAMP 信号通路可能是 GCS 治疗大鼠 AA 的主要机制之一。

GCS 可降低 CIA 大鼠 IL - 2 水平,抑制滑膜细胞和腹腔巨噬细胞分泌 TNF - α 和 IL - 1; GCS 体外用药能升高 CIA 大鼠滑膜细胞 cAMP 水平,抑制滑膜细胞 Gi mRNA 和 TNF - α mRNA 的表达,促进 Gs mRNA 的表达,可见 GCS 对 CIA 的治疗作用与其抑制细胞因子信号路径引起的炎症反应、抑制骨破坏有关。另外,GCS 升高滑膜细胞 cAMP 水平与 GCS 抑制 Gi 蛋白表达有关,提示 Gi - AC - cAMP 介导的信号转导是 GCS 抗炎和免疫调节的重要作用机制。

研究滑膜细胞信号转导与药物作用靶点之间的关系,为深入探讨 RA 的病理机制、寻找新的药物作用靶点和扩大筛选新型治疗关节炎药物提供新思路。

星形胶质细胞内脑保护性蛋白:14 - 3 - 3γ 和脑红蛋白

于常海

北京大学神经科学研究所;教育部神经科学重点实验室;

北京大学医学部神经生物学系 北京 100083

缺血性脑损伤是中风的病理基础,90% 以上的中风是由脑缺血缺氧造成的神经细胞死亡所致。脑细胞在受损之后很难恢复,所以保护脑细胞使之在缺血缺氧时减轻或免于受到损伤,对治疗脑缺血性疾病、恢复大脑功能有重要意义。

我们实验室一直致力于缺血缺氧损伤后脑细胞的保护性研究。利用原代培养星形胶质细胞体外缺血缺氧模型和基因差异显示法,我们首次发现原本被认为是神经元特异性的 14 - 3 - 3γ 蛋白在缺氧缺血损伤时的星形胶质细胞内表达显著增高,Northern blot、Western blot、免疫荧光双标法都对此结果加以证实。在对 14 - 3 - 3γ 的研究中我们发现,14 - 3 - 3γ 基因和蛋白的表达在缺血培养早期 (? 小时) 的星形胶质细胞即显著增高,其表达随缺血培养时间延长 (2 - 4 小时) 继续升高 3 - 4 倍。在细胞死亡的主要阶段 (5 - 6 小时),14 - 3 - 3γ 的表达下降。转染了

14-3-3 γ 反义核苷酸的星形胶质细胞在缺血培养时细胞凋亡明显高于对照组,而转染 14-3-3 γ 全长的星形胶质细胞的凋亡显著降低,因此我们首次明确了 14-3-3 γ 在缺血性损伤的星形胶质细胞内表达增加是保护细胞免于凋亡。通过免疫共沉淀(Co-Ip)的方法我们发现星形胶质细胞内 14-3-3 γ 蛋白能与 Bad、Raf、肌动蛋白(actin)结合。而在缺血缺氧损伤时,14-3-3 γ 蛋白主要是通过 p-Bad112 结合来抑制细胞的凋亡。同时我们在缺血缺氧时对原代培养星形胶质细胞与 14-3-3 γ 同源性很高的其它六个同工蛋白($\beta, \zeta, \epsilon, \eta, \tau, \delta$)进行了检测,发现它们在基因水平表达没有变化。这些都揭示了 14-3-3 γ 在缺血缺氧损伤的星形胶质细胞内的特异性保护作用。

缺血缺氧损伤中氧代谢障碍也是非常重要的损伤因子之一。我们在原代培养的星形胶质细胞内的研究首次证实了脑红蛋白并非是神经元特异性表达的,用反转录 PCR(RT-PCR)和实时定量 PCR(Real-Time PCR)检测了星形胶质细胞内脑红蛋白基因的表达,但其含量低于神经元。免疫荧光染色技术也证实原代培养的星形胶质细胞表达脑红蛋白,而且其蛋白分布与星形胶质细胞分裂周期有关。在急性分离的星形胶质细胞也可以检测到它的蛋白表达。缺血缺氧时,脑红蛋白的基因和蛋白表达均会上调,过表达脑红蛋白可以促进星形胶质细胞的存活,而用反义核苷酸抑制其基因表达,则可以加重星形胶质细胞损伤和死亡。提示脑红蛋白在缺血缺氧损伤过程中的保护作用。

综合以上结果我们推测,星形胶质细胞凭借其优势的数量和分布,最可能成为研究缺血缺氧形脑损伤的重要因素,而 14-3-3 γ 蛋白和 Ng2 在对抗损伤中发挥了重要的作用。

甲型伽马氨基丁酸受体的结构功能研究

薛红

香港科技大学生化系及应用基因组实验室

研究表明,甲型伽马氨基丁酸受体蛋白是人类主要的抑制性神经受体。该受体结构对于阐述抑制性神经传导的机理以及神经药物开发具有决定性的作用。为此,本研究组进行了十多年深入细致的研究,先后克服了受体膜蛋白表达、纯化的技术难点,为相关研究课题和协作实验室提供了大量高纯度、高浓度的重组人甲型伽马氨基丁酸受体蛋白。在此基础上,利用蛋白杂交技术生产和制备了多种甲型伽马氨基丁酸受体蛋白及蛋白突变体的单克隆和多克隆抗体,从而提供了该研究领域中的重要蛋白检测手段。经我组研究表明,甲型伽马氨基丁酸受体 α_1 亚基的氨基端由两个独立折叠的结构域构成。其中一个结构域由氨基酸 C139 至 I269 组成,并有富含 β -片层的二级结构。此受体片段 α_1 C139-I269 的三级结构稳定,而四级结构上则能形成玫瑰型的五聚体。此外,将高表达重组蛋白结晶的实验获得了初步的成果,而其晶体结构的成功解析将能最终在原子水平上解开 GABA 受体蛋白的结构奥秘。

此外,我研究组从传统中药中筛选了作用于甲型伽马氨基丁酸受体的药效成分。以受体蛋白为探针,发现和确证出十多种传统中药中所含有的作用于中枢甲型伽马氨基丁酸神经受体新的药用化合物组分,并在分子、细胞、体液和整体动物水平上探讨和观察了各类新发现的药用成分的药效,从而将其发展为新型中枢神经调节新药和抗焦虑症新药问世。至今已从黄芩中分离到具有抗焦虑作用,而无导致肌肉松弛,抑郁等副作用的重要药效组分 wogonin, baicalin 等。

最近我组的研究还发现了甲型伽马氨基丁酸受体 α_2 亚基基因的单核苷酸多态性(SNP)和单倍型(haplotype)与精神分裂症的关联。这是第一个关于甲型伽马氨基丁酸受体基因的单核苷酸多态性与疾病相关联的报道。

钾离子通道在神经元凋亡中的重要作用

王晓良

中国医学科学院药物研究所 北京 100050

多种神经退行性疾病及缺血性脑损伤均与神经元的凋亡有关,引起神经细胞的程序性死亡,进而引起脑萎缩。细胞凋亡发生可与多种凋亡信号及其传导通路有关。近来的研究发现某些凋亡信号可引起钾离子通道的改变。钾通道活性的变化对神经元凋亡过程有重要的影响。我们用 β -淀粉样蛋白和谷氨酸作为诱导剂,研究了钾离子通道在神经元凋亡中的作用。