

动物棕色脂肪组织非偶联蛋白的研究进展

侯建军 丁 莉

(湖北民族学院生化系 恩施 445000)

关键词 棕色脂肪组织 非偶联蛋白 产热

非偶联蛋白(uncoupling protein, UCP)是一种分子量为 3,200 道尔顿的蛋白质,它存在于动物棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)细胞线粒体内膜的外表面上,具有 BAT

的组织特异性。其含量一般随着动物对温度适应状态的改变而变化。UCP 作为一种质子通

第一作者介绍:侯建军,男,30岁,讲师,硕士;

收稿日期:1995-09-07,修回日期:1996-01-12。

道的介导,当动物受到冷刺激时,使 ATP 的合成解偶联。UCP 的解偶联呼吸是非颤抖性产热(nonshivering thermogenesis, NST)的主要组成部分,UCP 的量成为 BAT 非偶联呼吸的潜在因素,决定 BAT 的细胞产热水平;UCP 及其 mRNA 可以作为检验 BAT 存在与否的指标。UCP 的研究在揭示动物适应性产热的机制方面具有重要的意义。

1 UCP 的研究历史

有研究表明,BAT 线粒体内膜上存在一种具有核苷酸结合位点、其数量在冷驯化后迅速增加的特殊蛋白,并证明核苷酸结合位点的数量变化与线粒体内膜上一种分子量为 3,200 的多肽有关^[1-12]。有人在 BAT 线粒体的研究中建立了质子渗漏模型,揭示了产热的可能机制,并把质子渗漏机制归于线粒体内膜上这种 3,200 道尔顿多肽的作用^[1]。这种高纯度蛋白质从冷驯化仓鼠(*Citellus migratorius*) BAT 中分离出来,显示出与 GDP 高亲和性结合特征^[3]。这种具核苷酸结合位点蛋白质曾被命名为:“核苷酸结合蛋白”、“热素(thermogenin)”“32 KD 蛋白”和“解偶联蛋白(UCP)”。一般以“Uncoupling protein”或“Thermogenin”作为通用的名称。

2 UCP 的分子结构特点

在 Klingerberg 实验室以 UCP 纯化技术得到高纯度并具天然活力的 UCP 的基础上,学者们对 UCP 的分子结构进行了大量研究,表明仓鼠 UCP 的一级结构由 306 个氨基酸残基构成,其中极性氨基酸占 42% - 43.5%,由三个相似的区域构成,每个区域含有两个跨膜的螺旋结构^[4]。通过抗体与溶合蛋白文库确定的抗原位点结合法,可研究 BAT 线粒体的局部解剖结构,说明 UCP 在进化上是线粒体膜载体家族中的一个特殊的成员。ADP/ATP 转移酶、磷酸载体也包括于其中,并测到 UCP 的 8 段非重复序列和第一至第四 α 螺旋的方向。在分子结构上,UCP 与上述两种线粒体内膜蛋

白:ADP/ATP 转移酶和磷酸载体具有高度的相似性,它们大约有 100 个氨基酸残基相同,且蛋白序列也有很强的同源性,可能由同一段跨膜序列复制成三份,然后各自分化而来。虽然不同动物种的 UCP 和其前体的分子量大小不完全一样,氨基酸序列也有较大的差异,但其仍然具有较大的同源性,约有 90% 强的氨基酸残基相同^[5]。UCP 的三级结构目前尚不完全清楚。UCP 的结构特点也反应了其功能特征。UCP N-末端伸于线粒体内,C-末端位于内膜的外表面,并且具有一个核苷酸结合位点,当 UCP 和核苷酸结合时, H^+ 的传导功能受到抑制,而与自由脂肪酸(free fatty acids, FFA)结合时,则表现出很强的 H^+ 传导功能^[6]。通过 UCP 的重建实验,也表明 UCP 是质子载体而非质子通道。若进一步研究 UCP 上核苷酸结合位点的结构,可得到这样的结论,即 UCP 的核苷结合位点可能位于由 UCP 的分子构成的一个亲水通道上,结合核苷酸的区域还依赖于胱氨酸残基的存在,与赖氨酸 293 和苏氨酸 260 具有密切关系^[7]。

3 UCP 的功能特征

UCP 作为一种产热的功能蛋白,它是通过解偶联呼吸机制决定 BAT 的产热状态。UCP 在线粒体上的浓度及功能状态决定 BAT 产热潜能,并调节着动物产热的程度。UCP 的合成及解偶联呼吸受到体内、外很多因子的影响和调控。

3.1 UCP 与解偶联呼吸 正常情况下,UCP 的高质子通透性受到内源嘌呤核苷酸的抑制,呼吸产能通过氧化磷酸化储存于 ATP 中,呼吸速率受到限制。当动物受到冷刺激时,支配 BAT 的交感神经末梢释放去甲肾上腺素(NE),作用于 BAT 细胞膜上的 α 、 β 受体,通过一系列的生理生化反应,使细胞内 pH 值升高、游离脂肪酸的浓度增大,到一定的程度时,将解除核苷酸对 UCP 介导的质子通道的结合抑制,使线粒体进入解偶联状态,质子跨膜梯度消失,电子运输加强,氧化加速^[1]。这种产热机

制是 BAT 线粒体特有的。对此,学者们曾提出许多模型解释之,例如以 UCP 为核心的非偶联模型^[6]。该模型提出;BAT 细胞受到 NE 的刺激时可产生大量的 FFA,引起 UCP 的构象发生变化,从而导致 H⁺的“泄漏”,把底物氧化形成的跨膜电位梯度释放,因此加快电子传递链的电子传递过程,进一步激活线粒体内各种脱氢酶的活性,为电子传递系统提供足够的还原型辅酶,加速了线粒体对底物的利用。UCP 的功能在于导致 ADP 磷酸化系统出现“短路”,将底物氧化产生的能量以热的形式释放出去^[6]。

3.2 UCP 与 (guanosine diphosphate, GDP) 结合的研究 UCP 的核苷酸结合位点是非偶联质子通路的主要调节部位。正因为每个 UCP 分子都有一个高亲和性的嘌呤核苷酸结合位点,这就为在完整线粒体上研究和测定 UCP 提供了一个有效而简便的方法。处于热中性区的动物在静息状态下,UCP 的结合位点被掩盖,急性冷刺激使结合位点迅速暴露,如用 [³H]-GDP 对冷暴露大鼠 (*Rattus norvegicus*) 的 BAT 线粒体进行结合实验,表明 GDP 的结合在冷暴露 1h 便明显增加,而长时间的冷刺激可导致 UCP 的合成,UCP 的浓度增加,使结合位点进一步增加^[6]。 [³H]-GDP 结合的方法目前已广泛地用于 BAT 产热的研究。酯酰 CoA 与 GDP 竞争结合 UCP 上同一个位点,而 FFA 作用另一个位点,FFA 与 GDP 之间是非竞争性的,FFA 只能增加已打开的 UCP 通道的质子通透性。GDP 与 H⁺对 UCP 的结合可能是同时的,并表现出协同作用,即 GDP 与 pH 值共同作用,从而控制 UCP 的质子通道。GDP 的结合作为线粒体功能的指标,只能代表有功能活性的 UCP,并不表示 UCP 的实际含量。已有证据表明 GDP 结合的数量很可能与 UCP 的含量无关^[8]。另一些有关测定 UCP 分子的 GDP 结合能力的实验则显示动物在急性冷暴露时,UCP 的结合配基并不发生变化,GDP 的结合数量仍可直接反应 UCP 的数量或浓度^[9]。以上研究的差异说明:研究 GDP 结

合与 UCP 的关系时,同时进行线粒体 UCP 的定量很重要,否则二者之间的数量关系便不明确;另外,若单独使用肾上腺能受体激动剂刺激产热,虽然 UCP 的数量不变,但 GDP 结合位点大增,出现对 GDP 敏感的质子传导增加,GDP 结合与 UCP 活性变化同步^[9]。通过对大鼠进行不同驯化条件冷暴露,计算其 UCP 与 GDP 结合位点的摩尔比,可反应不同蛋白浓度下,GDP 的结合与 UCP 功能活性的关系。GDP 的结合与 UCP 的功能之间可能存在一种掩蔽(常态下)与去掩蔽(冷刺激时)的机制,并与 UCP 分子的静止和激活状态相关^[6]。只有在测定 GDP 结合的同时,进行 UCP 的精确定量,才能比较准确和详细地了解动物适应性产热的动态变化过程。

3.3 UCP 的合成与基因表达的调控 UCP 的合成与基因的表达和 UCP 的数量,直接关系到 BAT 的产热能力。冷暴露导致 mRNA 合成增加,翻译出的 UCP 由胞浆直接进入线粒体,迅速整合于线粒体膜上而发挥作用。正常大鼠冷暴露 15min 后,便可检测出细胞中 mRNA 水平提高。大鼠在 0℃ 环境中冷驯化 12h 后,其 BAT 中 5'-脱碘酶的活性及 UCP 的 mRNA 浓度大幅度上升。冷暴露通过交感神经 β-肾上腺能通路激活 UCP 的基因表达,其合成过程不经过大分子前体。脱碘酶活性上升会增加 T₃(三碘甲腺原氨酸)及 T₃与其受体的结合能力,从而导致 UCP 的合成和 BAT 产热的增加^[10]。BAT 局部 T₃的形成也提高 T₃受体的饱和度,可能通过直接作用于 UCP 的基因,或间接作用于其它因素,促进 UCP 的迅速转录。5'-脱碘酶及 T₃调控着 UCP 的合成。但 T₃不能单独改变 UCP 的 mRNA 水平,而只能促进 β 受体导致 UCP 的 mRNA 合成及表达。UCP 基因表达受 T₃和 NE 的双重调控^[11]。BAT 细胞核 T₃受体高饱和度是急性冷暴露中 UCP 最适表达的重要因素。如甲状腺素水平过低的动物,其在室温下 UCP 的基因表达下降;即使进行冷暴露或以 NE 处理,也不能使其表达增加。正常大鼠在上述情况下,BAT 中 UCP-mRNA

浓度可增加 2-3 倍。注射 T_3 后, 甲状腺功能低下的大鼠在冷刺激下, 其 UCP 的合成反应表现出与 T_3 的剂量相关性。在相当于致正常动物甲状腺机能亢进的 T_3 剂量下, 则 UCP 的合成恢复正常。如果切除支配一侧的 IBAT 神经, 外加 NE 可以恢复该侧下降的 UCP-mRNA 水平。故 UCP 最有效的表达需要 NE 与 T_3 的共同参与。刺激 UCP 基因转录的基本信号是 NE 依赖性的, 但其单独作用有限, T_3 -核受体复合物与由 NE 引发的信号在基因水平相互作用, 可放大 NE 刺激效果, 使转录速率提高 10 倍以上。以 T_4 (甲状腺素) 取代 T_3 处理甲状腺功能低下动物, 两天后 UCP 的冷刺激反应恢复正常化, 进一步说明了 T_4 -5'-脱碘酶对 UCP 基因表达的重要性^[7]。UCP 的基因表达尚与个体的发育阶段相关。如 24 月龄大鼠 BAT 中的 UCP-mRNA 水平虽比 3 月龄大鼠要高, 但它们的线粒体 UCP 数量相似, 说明大龄鼠总的产热能力下降, 提示随鼠龄增长, 有一种 UCP 翻译后水平的调节机制, 制止了 UCP 进一步增加, 可能是高水平的 UCP-mRNA 产生了补偿作用^[12]。

4 UCP 研究的方法及研究展望

UCP 的研究是随着方法学的不断改进和提高而得到发展的。70 年代出现了用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定蛋白质分子量的技术后, 学者们便将此法直接用于 UCP 的测定^[8]。有人使用光亲和标记法结合电泳分析证实 UCP 的功能特征^[13]。由于 UCP 的含量低, 加上其它膜蛋白的干扰, 使研究结果欠精确。当纯度很高的 UCP 被分离出来后, 关于 UCP 的研究方法才得以进一步提高。目前, 就 UCP 的测量精度来说, 已达到小于 1ng 的水平^[2]。将纯化的 UCP 重组于脂质体膜来研究其质子的通道问题是近年来常用的方法。在 UCP 被高度纯化的基础之上, 可制备出 UCP 的抗血清, 从而出现了 UCP 的放射免疫分析法, 如定量酶联放射免疫分析法 (ELISA)、固相放射免疫法、蛋白印迹法等。前面曾讨论过用

[^3H]-GDP 与线粒体的结合估计 UCP 含量方法的不足, 但 GDP 结合的数量仍不失为衡量 BAT 产热的较好的指标, 且该法在野外种群的研究中也取得了较满意的结果。在 UCP 的分子结构方面, 有人采用 ^{32}P 标记的叠氮 ATP 来研究 UCP 的分子变化情况^[14]。用免疫学的方法研究并检验 UCP 的存在^[2]。免疫手段结合核酸杂交技术对 UCP 的研究也表明: UCP 是线粒体膜载体家族中一个特殊成员, 不同 UCP-mRNA 具有一定同源性^[15]。不同动物种类的 UCP-cDNA 分子之间杂台比率较低, 但是它们的 mRNA 分子都含有一条相似程度非常高、且由 27 个寡聚核苷酸组成的链。这些研究结果提示: 可在核酸水平检测 UCP 的存在。今天的研究也证实: mRNA 可作为检验 UCP 存在的定量指标^[16]。可能是由于方法和技术的原由, 国内对非偶联蛋白的研究刚起步。我们实验室用常规的生化手段, 对布氏田鼠 (*Microtus brandti*) 的 UCP 进行了分离和纯化。结果表明, 布氏田鼠 UCP 的分子量也为 3, 200 道尔顿; 四周冷驯化能明显提高 UCP 的含量, 提示低温刺激 UCP 增生是布氏田鼠冷适应性产热的分子机制之一^[17]。今后我们仍将继续开展对 UCP 的研究, 从分子水平, 如 UCP 的合成和基因表达的调控等方面, 深入地研究 UCP 的功能特征, 以期进一步揭示动物的适应性产热机理。相信 UCP 的研究在我国将会迅速发展。

参 考 文 献

- 1 Nicholls, D. G. and R. Locke. Thermogenic mechanism in brown adipose tissue. *Physiol. Rev.*, 1984, **64**: 1-64.
- 2 Trayhurn, P. M. Species distribution of brown adipose tissue: Characterization of brown adipose tissue from uncoupling and its mRNA. In: Carey, C. et al. (eds). *Life in the cold.*, 1993, 361-368
- 3 Cannon, B. and J. Nedergaard. The biochemistry of an inefficient tissue: Brown adipose tissue. *Essays Biochem.*, 1985, **20**: 110-164.
- 4 Aquila, H., T. A. Link and M. Klingenberg. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. Analysis of sequence homologues

- and of folding of the protein in the membrane. *EMBO J.*, 1985, 4: 2369 - 2376.
- 5 Bouilland, F., J. Weissenbach and D. Ricquier. Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown adipose tissue uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261: 1487 - 1490.
- 6 Himms-Hagen, J. Brown adipose tissue thermogenesis: Role in thermoregulation, energy regulation and obesity. In: *Thermoregulation Physiology and Biochemistry*. Schon Baum, E. and P. Lomax eds. Pergamon Press, Inc, USA, 1990, 327 - 414.
- 7 Klingenberg, M. and E. Winkler. Reconstitution of an H⁺ translocator, the "uncoupling protein" from adipose tissue mitochondria in phospholipid vesicles. *Methods in Enzymology*, 1986, 127: 772 - 779.
- 8 Desautels, M., G. Zaror-Behrens and J. Himms-Hagen. Increase purine nucleotide binding altered polypeptide composition and thermogenesis in brown adipose tissue mitochondria of cold-acclimated rats. *Can. J. Biochem.*, 1978, 56: 378 - 383.
- 9 Rial, E. and D. G. Nicholls. The mitochondrial uncoupling protein from guinea-pig brown adipose tissue: Synchronous increase in structural and functional parameters during cold-adaptation. *Biochem. J.*, 1984, 222: 685 - 693.
- 10 Reiter, E., S. Klaus and C. Ebbinghaus *et al.* Inhibition of 5'-deiodination of thyroxine suppresses the cold-induced increase in brown adipose messenger ribonucleic acid for mitochondrial uncoupling protein without influencing lipoprotein lipase activity. *Endocrinology*, 1990, 126: 2550 - 2554.
- 11 Bianco, A. C. and J. E. Silva. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T₃ receptors. *Am. J. Physiol.*, 1988, 255: E496 - E503.
- 12 Yamashita, H., M. Yamamoto and T. Ookawara *et al.* Discordance between thermogenic activity and expression of uncoupling protein in brown adipose tissue of old cat. *J. Gerontol.*, 1994, 49(2): B54 - B59.
- 13 Heaton, G. M., R. J. Wagenvoort and A. Kemp *et al.* Brown adipose tissue mitochondria photo affinity labelling of the regulatory sites of the dissipation. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 82: 515 - 521.
- 14 Heaton, G. M. and D. G. Nicholls. The structural specificity of the nucleotide binding site and the reversible nature of the inhibition of proton conductance induced by bound nucleotides in brown adipose tissue mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.*, 1977, 5: 210 - 212.
- 15 Trayhurn, P. and J. S. Duncan. Rapid chemiluminescent detection of the mRNA for uncoupling protein in brown adipose tissue by 32-merlonucleotide end-labelled with digoxigenin. *Int. J. Obes.*, 1994, 18(6): 449 - 452.
- 16 Nedergaard, J. and L. Unelius, A. Jacobsson *et al.* Why are brown-fat cells from cold-acclimated animals not better? In: Carey, C. *et al.* (eds): *Life in the cold*, 1993, 119 - 130.
- 17 刘小团, 李庆芬. 布氏田鼠棕色脂肪组织非耦联蛋白的初步研究. 中国兽类生物学研究. 北京: 中国林业出版社, 1995. 286 - 289.