

·成果简介·

瞄准学科前沿、促进学科交叉、培养创新人才

——科学基金重大项目“生命科学中的单分子行为研究”取得进展

徐岩英 杜生明

(国家自然科学基金委员会生命科学部,北京 100085)

[关键词] 生物单分子,活细胞,实时检测,学科交叉

生物单分子行为研究是指在单分子水平对重要生命现象进行的实时动态研究,需要以生命科学问题为核心进行多学科、多角度交叉合作进行研究,国际上有关该领域的研究也开始不久。国家自然科学基金委员会2003年启动的由北京大学韩启德院士主持的重大交叉项目“生命科学中的单分子行为研究”(项目批准号30490170)经过4年多的研究和不懈努力,取得了重要进展,日前已通过结题验收。

该项目实施4年来,项目负责人和课题组成员结合生命科学中的重要科学问题,在单分子层次、纳米尺度进行了深入的研究,获得了单分子层面的一些重要数据和结果,为解决生命科学中的重大问题提供了新的线索,回答了一些非单分子研究不能回答的问题;通过实施该项目,课题组已在*PLoS Biol*, *Blood*, *JBC* 等发表杂志论文50篇(其中SCI收录论文38篇),出版单分子方面专著1部;同时促进了化学、医学、生物学和物理学的交叉研究,形成了联合攻关的研究群体,促进了跨学科人才的培养和基地建设,培养了一些复合型、交叉研究人才。以下简要介绍该项目的立项和主要研究成果:

1 “生命科学中的单分子行为研究”重大项目的立项及实施过程

在2002年初,国家自然科学基金委员会瞄准国际前沿学科发展方向,组织立项重大交叉项目“生命科学中的单分子行为研究”。经过反复研讨确定了4个研究方向,即:(1)单分子水平的蛋白质错误折叠与异常生命现象;(2)单分子水平的生物信号转导;(3)免疫调节中抗原抗体及其他配体-受体特异性分子识别的单分子机制;(4)生物单分子成像、检测、操纵的新技术和新手段。该重大项目指南发布后,共受理了来自全国35个大学及研究所的申请38

份。该项目的论证会于2003年1月在北京召开,共有8个单位的12位申请者参加了答辩,通过记名投票,评选出4个研究方向的课题负责人,分别是清华大学的罗永章教授、北京大学的韩启德院士、第二军医大学的陈宜张院士和中国科学院化学研究所的白春礼院士。再次经过记名投票确定韩启德作为本项目的主持人。为确保本项目的实施和学术管理,专家讨论决定,由贺福初院士等9人组成本项目的学术领导小组。该项目于2005、2006和2007年分别召开了年度课题进展情况交流会和中期检查会议,就项目实施过程中的进展及存在的问题等方面进行了交流,对整个项目的实施起到了重要促进作用。

2 4年来项目取得的重要成果

由于生命科学的单分子行为研究是崭新的研究领域,在项目主持人和学术领导小组的组织协调下,各课题组不断加强课题组之间的交叉与合作,积极努力克服困难潜心研究。在项目实施之初进行了研究方法学上的艰难探索,建立和完善了单分子研究技术平台,继而结合生命科学中的重要科学问题在单分子层次、纳米尺度进行了深入的研究,获得了一些重要的数据和结果。取得的进展主要有:结合分子生物学和已建立的单分子探测技术,完成了对活细胞内肾上腺素受体、VEGF、Mac-1等生物单分子动力学行为的定量研究;进行了活细胞内蛋白质与核酸适体、抗体、DNA元件间单分子水平的相互作用研究;阐明了单个二氢吡啶受体与Ryanodine受体分子耦联效率在心肌肥厚过程中的演变规律及其病理意义;对新生血管抑制剂Endostatin进行了系列研究,特别是探讨了Endostatin抑制肿瘤生长及其错误折叠再聚集形成纤维的分子机理。

(1) 肾上腺素受体和受体后信号转导的单分子研究

北京大学韩启德/张幼怡课题组(批准号30490172)以活细胞肾上腺素受体及受体后的信号分子为切入点,在单分子、单通道水平进行了纳米尺度的深入研究。他们搭建了单分子荧光共振能量转移成像、近场光学显微技术检测平台,组装成功可以在活细胞中同时用三色标记进行单分子成像的技术平台。进行了荧光标记和免疫金标记生物大分子的探索,使得对活细胞进行单个生物分子的示踪成为可能,在细胞模型和荧光标记方面摸索出了一套适用于活细胞的肾上腺素受体荧光标记方法。通过数学高斯拟合定位,使其对受体运动轨迹分析的定位精确度达到8 nm的水平,突破了光学极限。在活细胞内肾上腺素受体等生物单分子的动态行为研究中,他们分析得到了活细胞中肾上腺素受体沿微丝的“步进式”运动特点,其步长在35 nm左右。此项研究是继单个病毒入侵活细胞的发现之后,又一个活细胞内源性单个生物分子运动方式的重要发现。通过进一步双荧光标记共聚焦荧光显微镜检测和胶体金颗粒标记的电镜检测证实肾上腺素受体与细胞骨架微丝存在共定位(Biochem Biophys Res Commun 2007;353(2):231—237)。对 α_{1B} 肾上腺素受体在活细胞内的特征性运动轨迹进行了研究,发现活细胞内 α_{1B} 肾上腺素受体运动与细胞定位区域相关存在不均质的特点,胞浆区运动速率大于细胞膜附近的运动速率,得到了激动剂作用下肾上腺素受体运转的直接单分子证据,为活细胞内药物作用机制提供了新的线索(Solid State Phenomena Vols 2007;121—123:771—775; Biophysical Chemistry 2007;127:149—154)。钙信号是肾上腺素受体激动后的重要信号分子,北京大学韩启德/张幼怡课题组利用心衰动物模型研究心衰早期发病机理,首次发现在心肌细胞发生肥大但收缩功能尚正常时,与钙信号相关的二氢吡啶受体与 ryanodine 受体两分子耦联效率就已经明显降低,在心衰代偿期可以通过肾上腺素受体激动剂改善其耦联效率,耦联效率下降的分子机制在于锚定横管与肌浆网之间(间距在纳米尺度)的Junctophilin蛋白表达减少,这种变化是细胞钙瞬变降低从而导致收缩力下降的重要原因之一,从而为心衰病理发生提供了分子动力学机制。该研究结果已发表在 *PLoS Biol.* 2007 Feb;5(2):e21。2007年第4期《自然·评论·药物发现(*Nature Reviews Drug Discovery*)》在“研究亮点(*Research*

Highlight)”专栏发表了由该刊编辑 Charlotte Harrison 博士撰写的对该文的述评,指出该研究可能为早期发现、早期防治心衰提供了新的线索。

(2) 人表皮生长因子受体-2等信号蛋白的表征方面

中国科学院化学所白春礼/方晓红课题组(批准号30490174)发展了生物单分子相互作用原位实时检测的新技术,包括单分子荧光显微术和原子力显微镜单分子力谱,并在此基础上,建立了原子力显微镜/荧光显微镜/近场光学检测联用系统,实现了对细胞膜上原癌蛋白人表皮生长因子受体-2(HER2蛋白)等信号转导相关过程多种信息的实时检测,并为其他课题组从单分子水平上开展研究提供新的技术平台。

通过对转染方法和转染条件的优化,白春礼/方晓红课题组实现了绿色荧光蛋白(GFP)融合HER2受体以及与HER2异聚形成信号复合物的HER1和HER3等受体在细胞膜上的单分子成像,同时对HER2的非特异性配体EGF进行了单分子荧光标记,得到了与受体结合的染料标记和量子点标记的EGF活细胞单分子荧光图像。建立了HER2等膜上受体运动类型和扩散系数的定量分析方法,得到了活细胞HER2单分子运动速度的分布图,并发现HER2受体具有定向运动,简单扩散,受限运动和静止不动等不同类型,其中以受限运动为主。发现HER2激活后运动速度加快,为深入了解其信号转导机制提供了新的依据。通过对转化生长因子受体TGF β R的单分子运动速度的分析和荧光强度的分析,表明TGF β 1受体激活后,由于受体的自聚和异聚复合物的形成,使其受体运动速度变慢。在此基础上研究了T β RII和T β RI激活与其所处细胞微环境的关系,认为脂筏在信号转导过程中起重要作用。他们建立和改进了原子力显微镜单分子力谱的测定方法,研究了细胞外蛋白质-蛋白质,蛋白质-DNA的相互作用力和复合物的离解途径,以及单分子力谱的定量表征与蛋白质生物学功能的联系。他们利用光学显微镜和AFM的联用发展了配体受体结合的活细胞单分子力谱法并研究了膜蛋白配体受体信号复合物的形成。分别用TGF β II型受体偶联GFP的质粒转染细胞或TGF β I-RFP和TGF β II-GFP共转染细胞,从细胞的光学图像和荧光图像上选取大量表达TGF β II型受体或同时表达TGF β I型和II型受体的细胞,将修饰TGF β 1的AFM针尖移到所选细胞处进行力谱测定,通过一系列的对照实验,表

明测得的 TGF β 1/TGFR β II 的相互作用力在表达 TGF β I 型受体条件下增大,活细胞上 TGF β I 型受体与 II 型受体与配体结合具有协同性,这是活细胞单分子力谱首次应用于信号转导通路中激活配体与受体作用力的研究。通过发展生物分子马达新技术,发展了活细胞水平原位实时单分子检测的新方法:建立了单细胞水平原位实时测定细胞外 ATP 浓度新方法,发展了基于 ATP 分子马达的小 MicroRNAs 测定新方法,设计了光驱动的 FoF1-ATPase 作为生物传感器检测 miRNAs 含量,快捷、简便、特异性高,现正将这种分子马达应用于活细胞中单分子水平 miRNAs 的检测。上述工作在 *J. Phy. Chem. B*, *Biochem Biophys Res Commun*, *ABB*, *Exp. Cell. Res* 等杂志已发表杂志论文 20 余篇。

(3) 新生血管抑制剂 endostatin 的研究

肿瘤新生血管抑制剂如 endostatin 以“饿死肿瘤疗法”来实现抑制肿瘤生长和转移的目的,但其具体的抑制过程及单分子机理还不清楚。清华大学罗永章课题组(批准号 30490171)通过检测 endostatin 在细胞内的单分子行为,首次发现了 endostatin 的新受体 nucleolin,并阐明了 nucleolin 通过介导 endostatin 内吞调节新生血管生成的分子机理,该发现解释了临床上 endostatin 的疗效差异,同时为筛选新的抗肿瘤新生血管生成的靶向药物提供了可能的理论依据。美国 *Blood* 期刊于 2007 年 10 月 15 日以封面文章发表了该项研究成果(*Blood (Cover Story)* 2007, 110, 2899—2906)。“饿死肿瘤疗法”理论奠基人、美国两院院士、哈佛大学 Judah Folkman 教授对该文在抗新生血管信号转导途径和机理方面的工作给予了高度评价,并应 *Blood* 期刊特邀为该文撰写了同刊评论(*Blood* 2007, 110, 2786—2787)。相关科研成果在 2007 年 9 月 17 日被英国 Lead Discovery 数据库收录为 Today's Headline Article。另一方面,在特定状态下 nucleolin 与胞内动力蛋白 MyH9 结合,从而影响内皮细胞迁移等与血管生成相关的细胞活性(*Blood* 2006, 107, 3564—3571)。以上研究阐明了 endostatin 的分子机理,对其细胞信号转导通路的研究具有较深远影响。该项研究为在单分子水平上动态研究受体介导配体内吞的分子机理提供了一个较好的模型,研究的进一步深入有望为肿瘤治疗提供新的思路。

(4) 不同结构类型的蛋白分子错误折叠形成蛋白纤维研究

近来,人们发现在许多严重的退化性疾病,包括

阿尔兹海默氏症(AD),可传播性海绵状脑病(TSE)等的病变组织里存在由错误折叠的蛋白聚集形成的淀粉样纤维(amyloid fibril)或斑块(plaque),进一步研究发现,这些疾病的发生与相关蛋白分子的错误折叠有关。清华大学罗永章课题组和中国预防医学科学院洪涛院士课题组以不同结构特征的蛋白分子,如 α -螺旋为主的鲸肌红蛋白, β -折叠结构为主的 endostatin 以及酵母朊病毒 Sup35 为模型,在单分子水平上检测了它们错误折叠形成纤维的能力。其中, α -螺旋为主的鲸肌红蛋白在正常生理条件下不易形成蛋白纤维,而将 Sup35 中的纤维决定序列取代了鲸肌红蛋白不同位置的柔性 loop 区,研究发现 Sup35 中的纤维决定序列对鲸肌红蛋白分子错误折叠形成纤维具有诱导加强作用,为进一步研究 Sup35 纤维生成的抑制提供基础(*FEBS Letters* 2005, 579, 1503—1508)。通过对 endostatin 的一系列理化性质研究发现锌离子和两对巢式二硫键在维持 endostatin 结构、稳定性和活性中担当着重要的作用(*FEBS Letters* 2007, 581, 3027—3032; *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 11303—11312)。以上研究结果为在单分子层面上阐明 endostatin 错误折叠再聚集形成纤维的机理提供了一定的理论依据。在研究 endostatin 二硫键对其错误折叠形成纤维的影响中,他们构建了二硫键缺失的突变体,发现二硫键缺失的突变体较野生型 endostatin 更易形成蛋白纤维,这主要由蛋白分子的疏水表面和稳定性决定。另外, endostatin 突变体单分子聚集形成纤维过程中,纤维颗粒有较大的细胞毒性,而成熟纤维几乎对细胞没有影响。这部分的实验结果不仅阐明了 endostatin 的二硫键对其稳定性及发挥生物学功能的重要作用,而且对阿尔兹海默氏病人脑中发现 endostatin 这一现象提供了新的解释(*J. Biol. Chem.* 2006, 281, 1048—1057)。Sup35 是酵母朊病毒,他们经研究发现 Sup35 分子形成纤维的能力是由其氨基酸组成决定的,特定的氨基酸序列在一定程度上调节纤维形成的速率,并且 Sup35 的聚集中间体对细胞具有毒性作用(*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 353, 139—146)。该项研究为今后研究蛋白错误折叠的单分子机理以及蛋白错误折叠导致疾病的预防和治疗提供支撑平台。

(5) 利用 FRET 探测 Mac-1 哑基之间组成性的异源二聚化及 Mac-1 受体配体结合能力的研究

Mac-1 属于 β_2 整合素亚家族,介导重要的细胞之间以及细胞与细胞外基质之间的相互作用。生化

方法的离体研究已经提示 Mac-1 是组成性的异源二聚体。中国人民解放军第二军医大学陈宜张/何成课题组(批准号 30490173)利用 FRET 技术(包括 FRET 显微术和 FRET 光谱技术)在体探测了 Mac-1 亚基之间的组成性的异源二聚化,进一步,他们利用 FRET 成像的方法可视化了 Mac-1 在细胞内的分布,利用数学模拟的方法,推算了 Mac-1 亚基之间的距离,果提示不同的细胞环境可能会影响 Mac-1 在细胞膜上的构象(*Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 847—852)。在此基础上,该课题组利用 FRET 显微术和 FRET 光谱技术在活细胞内探测到了 Mac-1 亚基之间的同源相互作用(*Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 346: 986—991)。

Mac-1 的主要配体为 ICAM-1。到目前为止,关于 Mac-1 配体结合能力改变的结论都是建立在全细

胞水平上的,对于其本质和更进一步的分子基础并无所知。第二军医大学陈宜张/何成课题组与中科院化学所白春礼/方晓红实验室合作,通过原子力显微镜对 Mac-1 和 ICAM-1 之间的相互作用进行单分子水平的测量,获得了两者结合的内在特性,推断 $\alpha 7$ 螺旋的移动是 Mac-1 活化的关键部位(*Exp Cell Res* 2007; 313: 3497—3504)。

总之,在单分子层面研究主要的生命现象,具有前沿性、复杂性和挑战性,需要运用多学科的理论与方法。承担该项目的研究人员发挥了各自的优势,勇于创新,敢于探索,在此方面做出了开创性的研究,建立了单分子研究的技术平台,取得了一些突破性的研究进展,在国际上产生了一定影响。但有关此领域的研究还处于起步阶段,建议基金委继续关注并资助这一重要的多学科的交叉研究。

AIMING AT SCIENCE FRONT EDGE, PROMOTING INTERDISCIPLINARY RESEARCH, FOSTER SCIENTIFIC TALENTS

— advancement of “Studies on single molecule interaction in living cell”
supported by NSFC major program

Xu Yanying Du Shengming

(Department of Life Science, NSFC, Beijing 100085)

Key words single bio-molecule, living cell, real-time detection, interdisciplinary research

(上接 84 页)

DEVELOPMENT OF PEER REVIEW SYSTEM AND PROTECTION OF SCIENTIFIC CREATION

Li Yan

(Ocean University of China, Qingdao, 266003)

Abstract Peer review is the name given to the judgment of scientific merit by other scientists working in or close to the field in question. The peer review system is the appraisal method for academic standard which is applied all over the world. At present, many people propose question of the constitution of peer review. In this article, the main five deficiencies were summed up, the question about whether peer review could be substitutable was discussed and six methods for consummating peer review were proposed. By now, before the peer review is replaced by a new appraisal method, it is still the most valuable method. So the peer review system should be developed deeply to contribute to scientific creation.

Key words peer review, deficiency, no-substitutable, consummation