

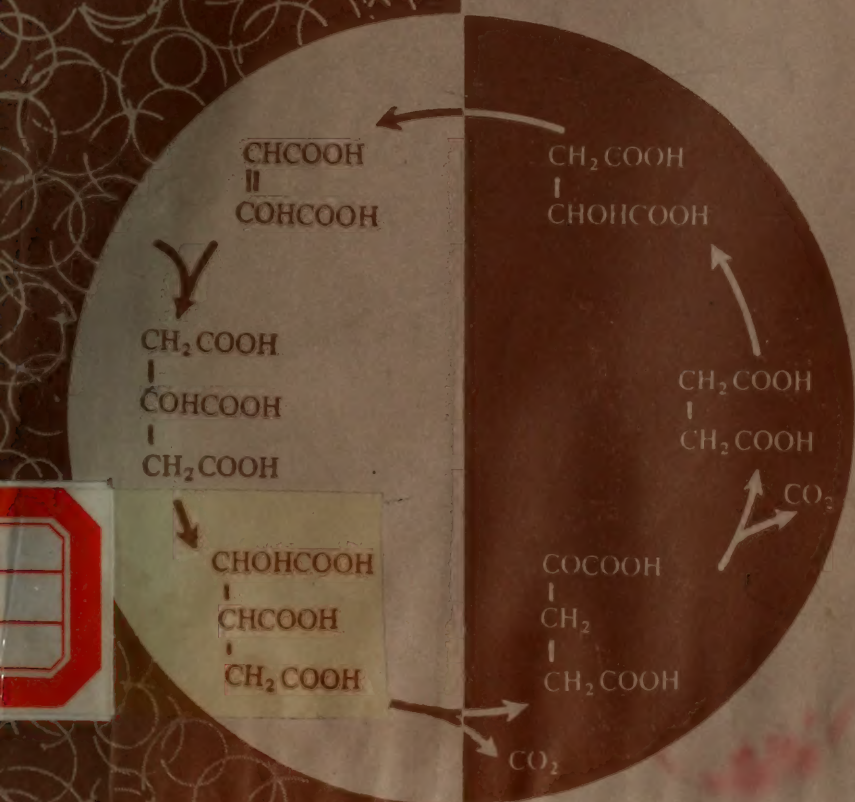
生物化学丛书

代 谢

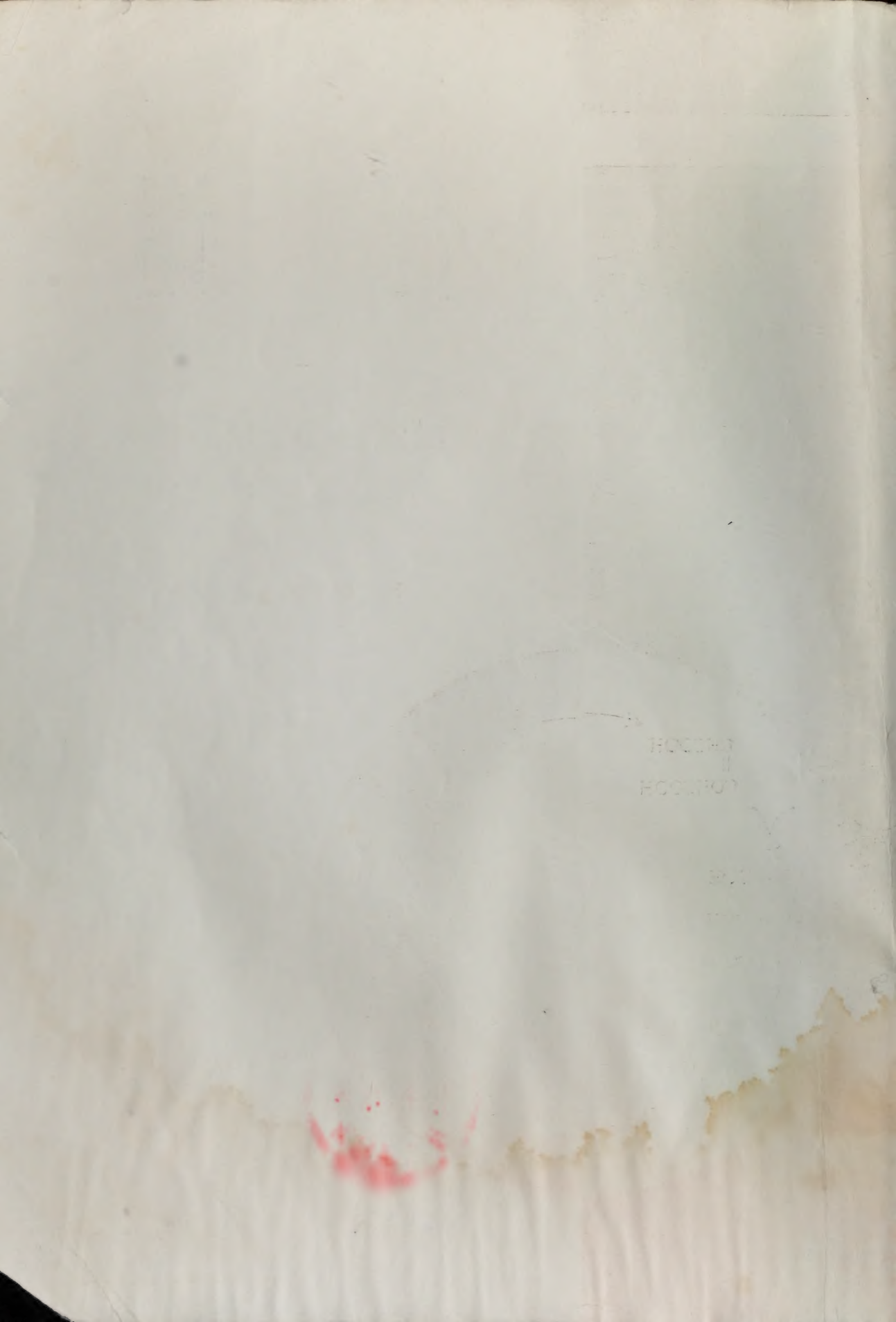
(二)

糖蛋白与蛋白聚糖
结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著



科学出版社



58.173
216

生物化学丛书

代 谢 (二)

糖蛋白与蛋白聚糖 结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著

中国科学院
(二) 册

糖蛋白与蛋白聚糖
结构、功能和代谢
孙册 莫汉庆 编著
科学出版社

中国科学院
图书馆藏
科学出版社
1988

24637

中科院植物所图书馆
S0014710

内 容 简 介

糖复合物(包括糖蛋白、蛋白聚糖、糖结合蛋白和糖脂)是近十几年来发展很快的一个领域,这类化合物在生物体中起着重要作用,受到生物科学和医学研究工作者的重视。

本书共分六章,第一至第五章介绍糖蛋白,包括糖蛋白研究概况;研究糖蛋白结构的方法,主要是寡糖的结构分析;糖蛋白的结构、生物合成和降解代谢;糖蛋白的功能以及结构和功能的关系,着重介绍糖类在生物的生命现象和各种生理、病理作用中作为识别的标记,以及它们的重要性。第六章介绍蛋白聚糖(包括糖胺聚糖)的结构、生物合成、降解代谢和功能。

本书可供生物学科的研究工作者,以及有关大专院校教师、研究生和高年级学生阅读参考。

生物化学丛书

代 谢 (二)

糖蛋白与蛋白聚糖
结构、功能和代谢

孙 册 莫汉庆 编著

责任编辑 赵甘泉

科学出版社出版

北京朝内大街137号

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1988年4月第 一 版 开本:787×1092 1/16

1988年4月第一次印刷 印张:10 1/4

印数:0001—7,000 字数:234,000

ISBN 7-03-000306-3/O·59

定价: 2.70 元

序 言

生物化学研究所举办的生化训练班始自 1950 年,开始时着重实验室训练,我们的目的是为了使青年生化工作者掌握这门学科研究的一些新方法、新技术。以后随着我所高研人员的增多,又添加了讲课内容,围绕当时的生化生长点,系统地讲述国际生化的新进展。课文内容逐渐发展充实,并结合在上海科技大学讲授高级生化课的需要,编写成高级生化训练班讲义。1960 年中国科学院在上海召开第一次全国生化学术会议,会议期间各地代表纷纷要求生化所举办一次大型高级生化训练班,为全国各有关单位培训生化人才。因此,生化所于 1961 年举办了一次有四百多学员参加的高级生化训练班,以系统介绍生化学科新知识为主,部分学员并参加了实验训练。十几年来,我们发现通过该次训练班学习的学员,大部分已成为各有关单位的生化科研或教学骨干。这个发现给予生化所同志以极大鼓舞。“文化大革命”中,高级生化训练班横遭批判,但 1972 年以后,各方面仍不断有呼声,要求生化所再次举办高级生化训练班。1976 年我们在所内作一次小型尝试,着重发挥部分中级科研人员在教学中的作用,从编写讲义到讲课。1979 年在中国科学院一局 的 催 促 和 支 持 下,为 克 服 住 宿 的 困 难,我 们 再 次 在 沪 杭 两 地 同 时 举 行 一 次 大 型 高 级 生 化 训 练 班,人 数 近 五 百 人,课 程 内 容 大 为 扩 充,包 括 十 余 年 来 进 展 最 迅 速 的 生 化 或 分 子 生 物 学 领 域,如 分 子 遗 传、DNA 重 组、生 物 膜、免 疫 生 化 等 等。为 适 应 国 内 广 大 生 化 工 作 者 的 需 要,特 将 上 述 讲 课 内 容 整 理 成 书,分 册 付 印,定 名 为“生 物 化 学 丛 书”。尚 望 国 内 同 行 对 本 书 内 容 不 吝 批 评 指 正,供 今 后 再 版 时 修 改 参 考。

王应睐

前 言

新陈代谢,简称代谢,是古老的科学,又是极为新颖的科学。它的大要早已为人们掌握,但是它的很多细节则有待逐步认识。

为学习上的方便起见,我们仍按习惯上使用的框架,将代谢归纳为糖代谢、蛋白质代谢、核酸代谢、脂质代谢等大标题。其中核酸和蛋白质的合成代谢(生物合成),则按已经形成的习惯列入本丛书之一《核酸,结构与功能与合成》。留下的糖代谢、核酸降解代谢和核酸的生物合成,合并成为一册,作为代谢(一)。蛋白质的降解代谢和氨基酸的代谢,将成为另一册,作为代谢(四),目前在着手撰写。糖结合物的研究,近十余年来才引人注目,进展较快,现将此部分另列一册,作为代谢(二),内容包括糖蛋白、蛋白聚糖和结合糖的蛋白质(最后部分尚未成稿,待再版时补入)。代谢(三)主要讨论脂质及其代谢,除甘油脂、磷脂、鞘脂外,也列入了糖脂和脂蛋白,并将类固醇、类胡萝卜素、类萜纳入脂质范畴。关于代谢的一般问题,则以代谢总论为题作简短的叙述,放在糖代谢的前面,作为整个代谢的引子。

以上这些,虽经各作者下了功夫,较满意地完成了编写工作,全部稿件、亦已由我审阅,但由于我们的知识有限,不足和错误在所难免,尚希读者勿吝指教,予以更正。

沈昭文

1986年9月

目 录

第一章 糖蛋白研究概况	1
第二章 研究糖蛋白结构的方法	7
一、糖蛋白的分离和纯化	7
二、物理化学性质的研究	10
三、糖链结构分析	11
第三章 糖蛋白的结构	28
一、糖链和肽链的连接方式	28
二、糖链结构	30
三、糖蛋白的全结构	51
四、立体构象	53
五、细胞膜糖蛋白的构造	57
第四章 生物合成与降解代谢	61
一、N-糖苷键型寡糖的生物合成	62
二、O-糖苷键型寡糖的生物合成	76
三、降解代谢	90
第五章 糖蛋白的功能以及结构和功能的关系	94
一、糖蛋白中糖链的功能	94
二、糖链结构与其功能的关系	115
第六章 蛋白聚糖	133
一、概论	133
二、糖胺聚糖	135
三、蛋白聚糖	147

目 录

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100



第一章 糖蛋白研究概况

长期以来,认为糖类主要是作为生物的能量来源和结构物质。对它的研究主要集中于单糖以及它们的代谢转化,和少数种类大分子物质如肝糖原、淀粉和纤维素。直到约二十年前,生物化学家和化学家才对长期忽视的糖复合物、特别是糖蛋白和糖脂发生了兴趣,开展了多方面的研究。认识到细胞表面的相互作用、分泌和摄取现象、变异和转化、以及细胞调节和识别的许多其它重要作用,都直接依赖糖复合物。

虽然现在知道,在有机体中许多具有生物活力的成分如酶、激素、毒素、载体蛋白等都是糖蛋白,这些糖蛋白的寡糖部分的功能,过去人们很少考虑。这是因为含糖和不含糖的同一物质在某些性质上相同或相似,如不含糖的核糖核酸酶 A 和糖基化的核糖核酸酶 B 显示完全相同的动力学性质。许多含糖基的酶,去除糖的部分后不影响它们的催化活性。然而在许多这些试验中,人们发现去糖基的酶的热稳定性较差,表明糖蛋白的糖基具有稳定作用。糖蛋白中糖基的理化效应在许多例子中是明显的。如动物粘膜表面覆盖的糖蛋白(粘蛋白),一般富含唾液酸或硫酸化的糖,整个分子形成粘弹性凝胶。去除唾液酸,导致粘蛋白溶液粘度的降低。从南极鱼分离到的一种糖蛋白,能使溶液的冰点下降,具有抗冻作用。这一糖蛋白含有许多 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 基,与由丙-丙-苏重复单位组成的肽链的苏氨酸基连接。经半乳糖苷酶水解,或半乳糖氧化酶氧化半乳糖基,抗冻性质即被破坏。以上例子表明糖蛋白的糖基在糖蛋白的物理性质中起重要作用。除在理化性质中的作用外,糖基还显示明显的生物学功能,如人的血型物质具有糖结构的决定簇,肿瘤细胞特有的抗原决定簇主要也是糖,高等动物血液循环中糖蛋白的存活时间受其糖链结构的控制,淋巴细胞和血细胞从循环中清除的时间与其细胞表面的糖密切相关。这些研究结果说明了糖蛋白中糖基的生物学功能。

糖蛋白研究的迅速发展,使长期被忽视的糖蛋白突然成为生化学科研究的中心。人们不再把它解释为松散的“蛋白质-糖复合物”,而是糖和蛋白质的共价结合物;并且相信糖蛋白是一类具有许多功能的重要的化合物。为此,它吸引着各学科,包括化学、生物学、生物化学、免疫学、细胞生物学、植物生理学等乃至医学及农学的工作者从事这一领域的研究。

糖蛋白在自然界广泛存在于动物、植物和某些微生物中。在生物体内它们以各种形式存在。在细胞中的糖蛋白既有可溶性的、又有膜结合的形式。糖蛋白也分别以可溶性和水不溶性的形式存在于细胞外液和细胞间质。几乎所有合成蛋白质的细胞都合成糖蛋白,它们中的一部分成为细胞膜的构成成分,从细胞质膜到细胞器膜,一切膜结构都含有糖蛋白。存在于质膜上的糖蛋白,其亲水的糖链总是位于细胞外侧。但对细胞器膜上糖蛋白糖链的分布是有不少争论的。根据用同位素标记的凝集素的研究,认为核膜向细胞质的表面,线粒体外膜和肾上腺细胞嗜铬颗粒膜(chromaffin granule membrane)向细胞质的表面,具有结合凝集素的部位。另一方面,用伴刀豆凝集素(简称 ConA)-过氧化物酶的实验,表明核膜向细胞质的和向腔的表面均有丰富的 ConA 受体,嗜铬颗粒膜仅在向腔

表 1 若干典型糖蛋白的分布及功能

糖 蛋 白	来 源	分 子 量	糖 含 量 (%)
酶			
碱性磷酸酯酶	小鼠肝	130 000	18
菠萝蛋白酶	菠萝杆	33 000	3.6
羧肽酶 Y	酵母	51 000	17
多巴胺 β-羟化酶	牛肾上腺	290 000	3.9
半乳糖苷转移酶	牛初乳	54 000	6.8
葡萄糖氧化酶	黑曲霉素	186 000	16
蔗糖酶	酵母	223 000	46
过氧化物酶 C	辣根	40 000	15-18
核糖核酸酶 B	牛胰	14 700	8
核糖核酸酶 C	牛胰	~15 000	18
核糖核酸酶 D	牛胰	~15 000	22
硫酸化酶	牛肝	107 000	9.4
激素			
绒毛膜促性腺激素	人	38 000	31
促红细胞生成素	人	34 000	29.4
促黄体生成素	人	28 000	17.3
促黄体生成素	猪	30 000	14.4
男性激素	<i>Volvox carteri</i>	27 500-30 000	45
凝集素			
利马豆		124 000	5
马铃薯		50 000	50
大豆		120 000	6
膜成分			
血型糖蛋白	人红细胞	31 000	60
E 糖蛋白	西门利启森林病毒	52 000	11.5
G 蛋白	泡疹口炎病毒	70 000	9-10
血凝素	流感病毒	210 000	25
视紫红质	牛视网膜	40 000	7
血清糖蛋白			
铜蓝蛋白	人	132 000	8
胎球蛋白	小牛(胎牛)	48 400	22.9
免疫球蛋白			
IgA	人	160 000	7
IgG	人	150 000	3
IgM	人	950 000	10
甲状腺球蛋白	小牛	670 000	7.9
凝血酶原	人	72 000	8.2
结构糖蛋白			
胶原	大鼠皮肤	~300 000	0.4
	鸡软骨	~300 000	4
毒素			
相思豆毒素	相思豆	65 000	3.2
蓖麻毒素	蓖麻豆	60 000	5.2
其它			
干扰素	人白细胞	26 000	~20
纤维粘连蛋白	人成纤维细胞	250 000	4.5

摘自 N. Sharon & H. Lis, Glycoproteins, in The Proteins, vol. V, 1982, Academic Press, New York.

的表面具有结合 ConA 的部位。高尔基体膜结合蓖麻凝集素(简称 RCA₁)的部位,仅存在于向腔的表面。

现在看来,大多数蛋白质是糖蛋白,它们包括酶、免疫球蛋白、载体蛋白、激素、毒素、凝集素和结构蛋白(表 1)。迄今从人血清分离到的 60 多种蛋白质,除白蛋白和前白蛋白外,都是糖蛋白,如血浆铜蓝蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白、触珠蛋白、乳铁蛋白、铁传递蛋白、各种免疫球蛋白等。鸡蛋清中仅约占蛋清总蛋白质量 3% 的溶菌酶不是糖蛋白。占人体总蛋白质的 1/4 到 1/3 的胶原蛋白,也都是糖蛋白。多肽激素中的绒毛膜促性腺激素(HCG)、促卵泡激素(FSH)、促黄体生成激素(LH)等也都是糖蛋白。原来一直认为是“纯”的多糖,如糖原和纤维素,亦含有极少量的共价结合的蛋白质。

在自然界中,已发现的单糖虽有 200 种左右,但通常在糖蛋白中出现的糖只有 11 种(表 2)。糖蛋白中的糖,有时可和其它基团结合,例如硫酸基团(在小肠粘蛋白和病毒的糖蛋白中)和磷酸基团(在溶酶体水解酶和酵母甘露聚糖中)。

表 2 生物体中糖蛋白的单糖成分

单 糖	真 核 生 物		原核生物 ^a
	动 物	植 物	细 菌
己糖			
半乳糖	+	+	+
葡萄糖	+	+	+
甘露糖	+	+	+
脱羟己糖			
L-岩藻糖	+	+	
己糖胺 ^b			
半乳糖胺	+	+	+
葡萄糖胺	+	+	+
戊糖			
木糖	+	+	+
L-阿拉伯糖	?	+	
唾液酸 ^c	+	-	
醛酸			
葡萄糖醛酸 ^d	+	-	+
L-艾杜糖醛酸	+	-	

^a 糖蛋白在原核细胞是罕见的。

^b 通常是 N-乙酰化的,在蛋白聚糖中肝素和乙酰肝素硫酸酯,葡萄糖胺可能是 N-硫酸化的。

^c 这类化合物中最通常存在的是 N-乙酰神经氨酸,在糖蛋白中已有 20 余种神经氨酸衍生物被发现。

^d 蛋白聚糖特有的。

出处见表 1。

绝大部分糖蛋白中的糖与多肽链通过 N-乙酰半乳糖胺 $\alpha 1$ -丝氨酸(或苏氨酸)(GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr) 键,或 N-乙酰葡萄糖胺 $\beta 1$ -天冬酰胺(GlcNAc $\beta 1$ -Asn) 连接,连接方式属于前者的称粘蛋白型,因为它们在粘蛋白中非常广泛地存在。

各种糖蛋白中糖链的长短和结构可以相差很大,有的糖链由一个或二个单糖组成,例如胶原蛋白的糖链;有的是由数十个单糖组成的、没有支链的、长的寡糖链,如结缔组织中的蛋白聚糖的糖链;或有分支的寡糖链,如血清糖蛋白中的寡糖链。各种糖蛋白所含的糖

表3 糖蛋白中糖链数和间距的变动

糖 蛋 白	每一分子的糖链数	糖链间距 (氨基酸/糖链)
血清糖蛋白		
α_1 -酸性糖蛋白	4	51
胎球蛋白	6	60
人触珠蛋白	13	113
人 α_2 -巨球蛋白	31	209
牛甲状腺球蛋白	19	296
人转铁蛋白	2	375
人 IgG	2	776
胰糖蛋白		
牛核糖核酸酶 B	1	124
脱氧核糖核酸酶	1	270
粘蛋白		
羊颌下腺粘蛋白	800	6
猪颌下腺粘蛋白	~500	8
胶原		
牛肾小球基底膜	—	58
兔角膜胶原	19	173
牛皮肤胶原	8	435
大鼠皮肤胶原	4	770
兔巩膜胶原	3	1 000

摘自 N. Sharon, in *Complex Carbohydrates. their Chemistry, Biosynthesis and Functions*, 1975, Addison-Wesley Publishing Company.

链数也十分不同，可以从每个分子中仅有一条糖链到多达几百条糖链。例如卵白蛋白和核糖核酸酶 B，每个分子中均只有一条糖链，而羊的颌下腺粘蛋白，每个分子中有 800 条寡糖链（表 3）。

由于在不同的糖蛋白中，寡糖链的长度和数目相差很大，糖蛋白的含糖量也有很大的差别，如胶原蛋白的含糖量不到 1%，而可溶性血型物质的含糖量高达 85%（图 1）。若以某些证据所表明的，原先以为是“纯”的多糖，如糖原也共价结合少量蛋白质，那末是一个含糖量高达 99% 以上的糖蛋白。

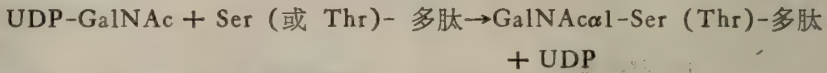
单糖是多功能团分子，通常具有 3 个或 4 个游离羟基。两个单糖通过糖苷键形成双糖时，糖苷键可以连接在第二个糖的不同位置的羟基上（例如 1→2, 1→3, 1→4 或 1→6），糖苷键的连接还可以有不同的异头构型， α -或 β -构型。三个以上的单糖形成寡糖时，情况更复杂。糖不仅有直链形式，还可以有分支结构。因此，糖链结构比蛋白质和核酸的结构复杂得多。相同单体数形成的寡糖比多肽具有更多的异构体（表 4）。

由于糖链结构的复杂性，使阐明一个寡糖结构比阐明同样大的肽的结构所需的数据多得多。阐明一个蛋白质的一级结构，只要弄清它的氨基酸组成和顺序就可以了。而阐明一个寡糖结构，不仅要弄清它的组成成分、糖的顺序，还必须弄清连接每个糖基的糖苷键的性质（是 1→2, 1→3, 1→4 或 1→6 糖苷键）， α -或 β -构型，以及糖链和肽链的连接方式。因此，直到 70 年代初期，寡糖的全结构分析还几乎是不可能的，远远落后于蛋白质和核酸结构的研究。各种专一性的内切和外切糖苷酶的相继纯化和应用，新技术的发展，

表 4 寡糖和寡肽异构体数的比较

单体组成	产 物	异 构 体 数 目	
		寡 肽	寡 糖
X ₂	二聚体	1	11
X ₃	三聚体	1	175
XY	二聚体	2	35
XYZ	三聚体	6	1 056

别是衣霉素 (tunicamycin) 的发现, 也大大促进这一领域的进展。糖蛋白中 O-糖苷键连接的糖链的形成, 在 Kornfeld、Robbins 和 Summers 几个实验室中首先阐明, 它们的起始阶段与天冬酰胺连接的寡糖的合成不同, 不需要中间体, 都是通过单一的途径, 即糖基转移酶的作用, 将单糖从核苷酸糖一个一个的转移到多肽链上去。因此, 所有粘蛋白型糖链生物合成的第一步是 GalNAc-Ser 或 GalNAc-Thr 基在多肽链上通过下列反应形成。



它们的糖基化作用不被衣霉素抑制。

随着人们对糖蛋白的分布、结构和生物合成的知识日渐增加, 更多的注意力集中到糖蛋白分子中糖基的功能。从某些情况看来, 它们的功能是已经清楚的, 如唾液粘蛋白的润滑功能与唾液酸的存在相关。其它一些糖蛋白中共价结合的糖起到稳定蛋白质、对抗变性剂和蛋白酶的作用。特别重要的功能是糖蛋白中特定的糖基可作为识别的标志, 它就非常有力地阐明了糖蛋白中的寡糖具有作为专一信息载体的能力。糖蛋白(和糖脂)的糖总是位于细胞的外表面, 这些糖作为某些病毒、细菌、激素、毒素和凝集素的受体起作用。此外, 膜糖蛋白(和糖脂)可能参与细胞的社交行为, 膜糖蛋白(和糖脂)的糖链可能影响细胞与细胞的相互作用。因此, 对生长、分化和恶变可能是重要的。细胞表面的糖蛋白(和糖脂)看来也和多种其它的生物现象有关, 例如细胞粘附和受精, 这些功能也都应归功于细胞表面糖蛋白(和糖脂)的寡糖部分。影响淋巴细胞的许多功能, 包括有机体中细胞有丝分裂原的激活作用, 细胞对毒素的反应和淋巴细胞归巢到靶器官, 也依赖某些细胞表面糖的存在。

现在人们认识到, 蛋白质非酶催化的糖基化作用在有机体内也存在, 这种糖基化的最有表征性的产物是血红蛋白 Alc, 它是在血红蛋白 A 的 β -链氨基末端缬氨酸上加上葡萄糖形成的。糖尿病患者的血红蛋白 Alc 和糖基化的血清白蛋白的水平有所升高, 提示对这些糖蛋白的定量测定, 可用来监视正常人和糖尿病患者的糖代谢。

第二章 研究糖蛋白结构的方法

一、糖蛋白的分离和纯化

总的说来,糖蛋白可用蛋白质化学中常用的一些技术来分离纯化,如盐析、离子交换层析、凝胶过滤、超离心等。然而,由于糖链是高度亲水的,糖蛋白(除组成膜的糖蛋白外)在水溶液中倾向于更易溶解,其结果是,用经典的蛋白质沉淀剂如硫酸铵等,并不总可以将含糖量丰富的糖蛋白沉淀。另一方面,糖蛋白的高度溶解性,在某些情况,对分离糖蛋白是有帮助的。例如 α_1 -酸性糖蛋白,它是血清糖蛋白中含糖量最丰富的(约45%),在三氯乙酸和高氯酸中是可溶解的。因此,很容易与其它大多数血清蛋白质和糖蛋白分开。某些糖蛋白中存在许多唾液酸、糖醛酸或硫酸基团,使它们带上高负电荷。这一特点,也被利用于分离糖蛋白,包括使用阴离子交换层析、电泳或用季铵盐与糖蛋白形成络合物,使其沉淀等方法。

除改变蛋白质的溶解度和电荷外,糖亦影响蛋白质的密度。因为糖分子比氨基酸重约15%,用氯化铯密度梯度离心,可使富含糖的糖蛋白与一般蛋白质分开。

(一) 用固定化凝集素为亲和吸附剂

近年来,根据凝集素能专一地、可逆地与游离的和复合糖类中的单糖或寡糖结合的性质,利用固定化凝集素亲和层析作为分离纯化糖蛋白的手段。这一方法,简单易行,在温和条件下进行,不破坏糖蛋白的活性,通常得率也高。

一个生物聚合物,能专一地与一个凝集素作用,可作为该聚合物含糖的证据。酵母转化酶是糖蛋白的证据,最初是用 ConA 获得的,人淋巴细胞 HL-A 抗原与固定化扁豆凝集素(简称 LCA) 柱的结合,证明 HL-A 是糖基化的,用同样方法,也获得了脯氨酰羟化酶是糖蛋白的最初证据。

凝集素亲和层析既可用于水溶性糖蛋白的分离纯化,也可用于细胞膜糖蛋白的分离纯化。ConA 与甘露糖核心专一作用,所有与天冬酰胺连接的寡糖都含有甘露糖基。因此,固定化的 ConA 是最普遍地应用的固定化凝集素。各种含糖的酶如 α -和 β -半乳糖苷酶等,含糖的多肽激素如 HCG、FSH 等,多种抗原如甲种胎儿蛋白(AFP)、乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的多肽片段等,凝集素如大豆凝集素(简称 SBA) 等,干扰素、血清蛋白等等,都可用固定化 ConA 分离纯化(表5)。

由于膜糖蛋白的穿膜部分的疏水性,使膜糖蛋白不溶于水,所以它们的纯化需要在去垢剂存在的情况下进行。去垢剂的选择必须考虑两个方面的因素。一方面,所使用的去垢剂,要尽可能将膜上的糖蛋白完全增溶下来;另一方面,又要不破坏糖蛋白的构象和生物活性,也要不降低或破坏凝集素的结合活性。十二烷基硫酸钠(简称 SDS) 是一种强极性的去垢剂,增溶效率很好,但并不适用于凝集素亲和层析,因为它能使凝集素分子解离

表 5 固定化伴刀豆凝集素纯化的水溶性糖蛋白

糖 蛋 白	来 源
α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶	猪肝
β -N-乙酰氨基已糖苷酶	人尿
α -抗胰蛋白酶	人血清
绒毛膜促性腺激素	人尿
多巴胺 β -羟化酶	牛肾上腺
α -胎儿蛋白	人脐带血
α -半乳糖苷酶	人胎盘
β -半乳糖苷酶	人肝
α -甘露糖苷酶	人肝
过氧化物酶	辣椒
核糖核酸酶 B	牛胰
大豆凝集素	大豆种子
HBsAg 表面抗原多肽	人血清
干扰素	人血清

表 6 去垢剂对固定化凝集素结合糖蛋白的影响

去垢剂(%)	相对结合效应(%)				
	RCA	PNA	SBA	ConA	WGA
Nonidet P-40					
0.1	100	103	100	88	95
1.0	98	87	100	78	90
2.5	100	92	102	80	92
Triton X-100					
0.1	105	92	100	85	90
1.0	105	90	100	76	76
2.5	100	90	99	74	79
二甲基十二烷基甘氨酸					
0.1	100	103	84	64	108
1.0	98	110	48	53	104
2.5	100	107	37	50	100
去氧胆酸盐					
0.1	100	90	53	60	85
1.0	102	85	34	46	39
2.5	105	37	10	20	10
十二烷基三甲基溴化铵					
0.1	100	107	78	63	104
1.0	100	105	67	59	107
2.5	100	93	36	45	98
十二烷基硫酸钠(SDS)					
0.05	100	82	22	70	89
0.1	70	64	11	26	13

摘自 Lotan, R. & Nicolson, G. L., 1979, *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, pp.329-376。

成亚基,或使之变性,或两者兼有之,从而降低或者完全破坏固定化凝集素的活性。非离子去垢剂,例如 Triton X-100、Nonidet P-40 (简称 NP-40)、Lubrol 等等,抽提膜

表 7 固定化凝集素纯化的膜糖蛋白

纯化的物质	膜的来源	固定化凝集素
血型糖蛋白	人红细胞	WGA
去唾液酸血型糖蛋白	唾液酸酶处理的人红细胞	PNA
去唾液酸 glycolicin	唾液酸酶处理的人血小板	PNA
多肽 3	人红细胞	ConA
多肽 3+血型糖蛋白	人红细胞	LCA
血型糖蛋白	人红细胞	WGA
癌胚抗原	人结肠腺癌	ConA, RCA WGA
主要表面糖蛋白	人血小板	ConA
人淋巴细胞抗原	人淋巴细胞株	LCA
人组织相容抗原	淋巴瘤细胞	LCA
5'-核苷酸酶	嗜淋巴细胞	LCA
层粘连蛋白 (Lamina)	小鼠肉瘤	BSL1
视紫红质	牛视网膜	ConA
Thy-1	小鼠胸腺	ConA
	人和猫脑	LCA
蓖麻毒素受体	小鼠 BW5147 淋巴瘤	RCA
乙酰胆碱受体	大鼠脑	LCA, RCA, WGA, 欧洲豚鼠凝
病毒糖蛋白	有荚膜的病毒(流感病毒, 仙台病毒)	LCA

糖蛋白的效率虽然稍差,但它们对固定化凝集素结合糖的活性没有显著影响。因此,绝大多数情况,都采用非极性去垢剂增溶膜糖蛋白。由于各种去垢剂对各种凝集素的影响不同(表 6),在选择去垢剂时,考虑增溶效率的同时,也应注意到采用哪一种固定化凝集素作亲和吸附剂。固定化凝集素纯化膜糖蛋白的例子见表 7。

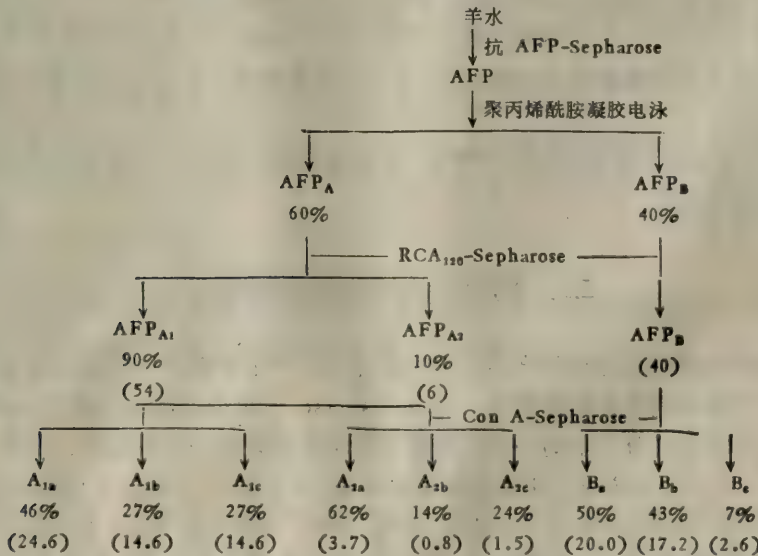


图 2 大鼠羊水 9 种 AFP 变种的分离及每一分离步骤各变种之间量的关系的图解。

(摘自 Bayard, B. & Kerchaert, J. P., 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77, 489)

凝集素亲和层析作为一种从非糖基化的生物大分子中分离糖蛋白(和糖脂)的手段,是很成功的,也是能普遍应用的。用于分离二种或几种仅在糖组成,或糖链结构有微小差别的糖蛋白或糖肽,虽也很有成效,但应用范围有限,不可能很普遍。以下几个例子,是用固定化凝集素亲和层析分离糖链结构有微小差别的糖蛋白。胎牛血清和大鼠羊水的 AFP 的分子变种,已经用 ConA-Sephrose 层析分开;亦可用蓖麻凝集素(简称 RCA₁ 或 RCA₁₂₀)-Sephrose 分离大鼠羊水的 AFP 变种(图 2)。用 ConA-Sephrose 层析,可将双花扁豆凝集素(简称 DBA)的两种同工凝集素分开。它们的糖专一性相同。固定化 ConA 亦用于分离西门利启森林病毒(Semliki forest virus)的穿膜糖蛋白 E₁ 和 E₂。胎球蛋白和铜蓝蛋白在固定化 RCA₁ 柱上层析,揭示这种制剂中存在小量的、但值得重视的失去唾液酸的部分糖蛋白。

(二) 应用预标记技术

分离纯化膜糖蛋白,采用的另一种技术,是选择性地标记细胞膜上的糖蛋白,称之为预标记。预标记技术是很有用的,能够对一个糖蛋白在细胞膜上的位置提供直接的证据,并能在分离纯化过程中,作为检测该糖蛋白的跟踪标记。一种预标记的方法,是用半乳糖氧化酶氧化糖链非还原末端的半乳糖基(和 N-乙酰氨基半乳糖基)上第 6 位碳(C-6)的游离羟基,使它变为醛基。然后用氚标记的硼氢化钠(NaB³H₄)还原,这一醛基,又立即还原为羟基。这时,第 6 位碳上就参入了氚。而且因为半乳糖氧化酶的分子量约为 75,000,它不能透过细胞质膜。因此,只有位于细胞质膜外表面的糖蛋白上的半乳糖基才能为氚标记。这就可以与细胞内的可溶性糖蛋白、细胞器膜上及细胞器内的糖蛋白区分开来。用这一方法标记的人红细胞膜,在聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示 20 条放射性带,而同样的凝胶用常规的过碘酸-Schiff 试剂(PAS)染色,只显示 5 条糖蛋白带(细胞上其它组分与 NaB³H₄ 作用导致的假象,先用非标记的 NaBH₄ 处理细胞可以避免)。

另一种方法是标记唾液酸,用过碘酸钠温和处理,使唾液酸 C-7, C-8, C-9 之间的键断裂,导致产生一个 C-7 位的醛,然后用氚标记的 NaB³H₄ 还原,这时 C-7 位参入放射性氚。也可先用唾液酸酶处理细胞,除去末端的唾液酸基,暴露出半乳糖,然后再用半乳糖氧化酶氧化。

另外,也有在细胞培养液里加入 [¹⁴C]L-岩藻糖来标记细胞,但是这种方法不是专一标记细胞表面糖蛋白的。

二、物理化学性质的研究

在对纯化的糖蛋白进行物理化学性质的研究中,分子的均一性问题是最先的和首要的。虽然蛋白质本身通常是单分散的(monodisperse),但是对糖蛋白来说,情况不总是这样。糖蛋白经常显示分子不均一性,典型的例子是富含糖的血型物质,它的分子量在 3×10^5 到 10×10^5 之间变化。天然的酵母转化酶,约含 50% 的糖,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上形成一条扩散的宽带,表观分子量在 90000—160000 之间,不可能确切地估计该酶的大小或亚基结构。人红细胞膜上的第三带蛋白是又一个例子,它在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示一条宽的带。有日益增多的证据表明,糖蛋白在电泳上显示扩散的带

是由于它所含寡糖的不均一性引起的。用蛋白水解酶将第三带蛋白上的糖基化肽段切去后,剩下的一个大的蛋白质片段,在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上显示一条边缘清晰的紧密的蛋白质带,而切下的那段糖基化的肽段在 SDS 凝胶电泳上的蛋白质带,比完整的第三带蛋白更扩散。用内切- β -半乳糖苷酶处理红细胞也能使第三带蛋白在凝胶电泳上显示一条紧密的染色带。由羊水细胞合成的纤维粘连蛋白在 SDS 凝胶电泳上也显示宽松的蛋白质带。用不同的方法分别标记多肽主链和糖链,结果清楚地表明不均一性存在于分子的糖链部分。

测定糖蛋白分子量经常遇到很大的困难,即使在不发生多分散性 (polydispersity) 的情况下也如此。含糖量高的糖蛋白在凝胶过滤和凝胶电泳时的行为都是反常的。对于绝大多数球状蛋白来说,它们在葡聚糖凝胶 (Sephadex) 柱上的洗脱体积和它们的分子量对数之间存在线性关系。而糖蛋白,例如胎球蛋白、卵粘蛋白和甲状腺球蛋白等,并不遵循这一关系。这是由于糖链的存在而引起的,由于糖的亲水性,在溶液中更大程度的水合作用,导致糖蛋白比相同分子量的一般蛋白质有更大膨胀的结构。

在 SDS 凝胶电泳时,含糖量高的糖蛋白的迁移率比根据它们的分子量所预算的要低,换言之,当用 SDS 凝胶测定未知糖蛋白的分子量时,其结果往往偏高。人红细胞质膜的主要唾液酸糖蛋白——血型糖蛋白,含 60% 的糖,包括 23% 唾液酸,它的表观分子量是 39000 (在 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳),除去唾液酸后的血型糖蛋白的表观分子量更大,为 41000。而实际分子量分别为 31000 和 24000。糖蛋白电泳迁移率低是由于它们结合的 SDS 的量比不含糖的同类蛋白质少。例如含糖 84% 的可溶性血型糖蛋白结合 SDS 的量是 1.0 克/1 克多肽,而不含糖的蛋白质结合 SDS 的量为 1.4 克/1 克多肽。再则,用凝胶电泳测得的糖蛋白的分子量,受凝胶浓度和交联度的影响。例如人红细胞质膜的一个主要糖蛋白的表观分子量,用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳测定时为 92000,而用 12.5% 的凝胶测定时为 55000。有人认为采用高浓度(至少 10%)和高交联度的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶,可获得较为正确的糖蛋白的表观分子量。在这种条件下测得的 α_1 -酸性糖蛋白(含糖量 41%)的表观分子量为 45,000,比较接近它的实际分子量 40000。

在测定含糖量高的糖蛋白的分子量时,另一个困难是往往发生非共价的相互作用。这种相互作用导致分子间复合物的形成。正如羊颌下腺粘蛋白所表现的那样,会形成大的凝聚体,分子量从 0.5×10^6 到 1.0×10^6 ,羊颌下腺蛋白含糖约 63%。

用超离心测定的糖蛋白分子量值,通常也是不正确的,这不仅是因为这种分子间的结合,而且还因为计算分子量所根据的微分比容 (partial specific volume) 没有实验测定数据。由于测定微分比容需要相当大量的样品,因此,常按氨基酸和糖组成估计糖蛋白的微分比容。但这种估计数值与实验测得的微分比容值有较大差异。

三、糖链结构分析

为在分子基础上阐明细胞表面的识别现象,糖蛋白(和糖脂)特别是糖链部分结构的信息是不可少的(表 8)。由于在这一领域技术上的不完备,1975 年以前,获得的糖蛋白的糖链结构信息是零散的和不完整的。

表 8 分析糖蛋白糖链结构的方法

方 法	获得的主要信息
酶的: 外切糖苷酶 内切糖苷酶 化学的: 过碘酸氧化和 Smith 降解 甲基化分析(与质谱连用) 酸部分水解 乙酰解 肼解和亚硝酸脱氨作用 物理的 核磁共振 免疫化学的 抗体 凝集素	顺序、异头 糖-肽键的性质(顺序、异头) 键的位置 键的位置 顺序 顺序(键的位置) N-乙酰葡萄糖胺周围的顺序 异头(键的位置) 异头、顺序 异头、顺序

出处同表 1。

绝大多数糖蛋白的寡糖部分，与多肽主干通过 GalNAc α 1-Ser (或 Thr) 键或 GlcNAc β 1-Asn 键连接 (图 3)。连接方式属于前者的称粘蛋白型，因为它们在粘蛋白中广泛存在。后者则在血清糖蛋白中更经常地发现，相应地称为血清型。然而，在研究纯化的糖蛋白时，表明许多糖蛋白在同一肽链上含有两种类型的糖链。因此，这些名称只作为区别两种类型的糖链而矣。近年来，已逐渐用天冬酰胺连接这一称法取代“血清型”。粘蛋白型与天冬酰胺连接的糖链具有十分不同的结构特征。迄今，粘蛋白型的糖链中含有甘露糖基的十分罕见，而天冬酰胺连接的糖链，总是含有甘露糖基的。

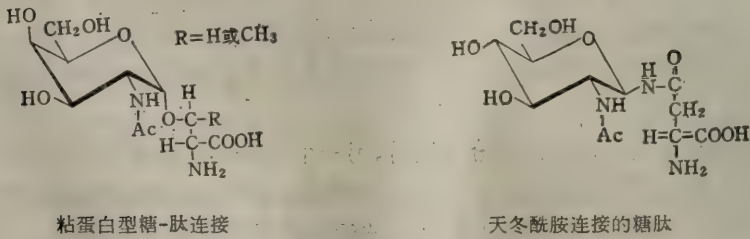


图 3 糖蛋白中存在的两种主要的糖-肽键。

在糖蛋白中，除 GalNAc α 1-Ser (或 Thr) 和 GlcNAc β 1-Asn 这两种糖链和肽链连接的方式外，还有其它方式，如阿拉伯糖-羟脯氨酸 (Ara-Hyp)，半乳糖-羟赖氨酸 (Gal-Hyl) 等(表 9)。但粘蛋白型和天冬酰胺连接的糖链是最常见的。

(一) 糖蛋白中糖链的释放和分离

绝大多数糖蛋白，在一个分子上有若干不同的糖链。甚至，在仅有单一糖链的糖蛋白，如鸡卵白蛋白和牛胰核糖核酸酶 B，也发现微观不均一性的现象。糖链合成中不利用样板，与蛋白质生物合成不同，一般认为糖蛋白的微观不均一性是糖蛋白的糖链引起的固有的特性。因此，在开始糖链结构研究以前，有必要将各种不同的糖链分离。

表 9 糖蛋白的糖-肽键

键	对碱的稳定性	存在于
N-糖苷键		
N-乙酰葡萄糖胺-天冬酰胺	±	多种动物或植物蛋白
O-糖苷键		
N-乙酰半乳糖胺-丝氨酸 或苏氨酸	-	粘蛋白、血型物质、膜糖蛋白、 免疫球蛋白、胎球蛋白、抗冻糖蛋白
木糖-丝氨酸	-	粘多糖(蛋白聚糖)
半乳糖-丝氨酸	-	地蚕表皮胶原、植物细胞壁
甘露糖-丝氨酸	-	酵母细胞壁甘露聚糖、酵母转化酶、黑麴 霉、葡萄糖淀粉酶
甘露糖-苏氨酸	-	地蚕表皮胶原、真菌的植物毒素糖肽
半乳糖-羟赖氨酸	+	胶原、基底膜
L-阿拉伯糖-羟脯氨酸	+	植物细胞壁和糖蛋白

出处同表 3。

1. 糖链的释放

与羟基氨基酸连接的 O-糖苷键,除羟赖氨酸外,在温和的碱性条件下,很容易被 β -消去反应解离,丝氨酸和苏氨酸分别转化为 2-氨基丙烯酸和 2-氨基-2-丁烯酸,同时糖链被释放。通过酸水解,丝氨酸和苏氨酸分别转化为丙酮酸和 α -丁酮酸。 α -酮酸可借乳酸脱氢酶测定。当有硼氢化钠存在时进行碱处理,2-氨基丙烯酸和 2-氨基-2-丁烯酸分别转化为 DL-丙氨酸和 DL-2-氨基丁酸的消旋混合物。DL-丙氨酸和 DL-2-氨基丁酸对酸水解是稳定的,并可用氨基酸分析方法测定。然而,由于 O-糖苷键连接的丝氨酸和苏氨酸转化为上述各种衍生物不是定量的。再者,假如 O-糖苷连接的是肽链末端的羟基氨基酸,则不发生 β -消去反应。因此,通过碱处理观察不到丝氨酸和苏氨酸的破坏,不能确切证明不存在这样的糖-肽键。尽管有这些限制, β -消去反应还是能为糖蛋白中有多少丝氨酸和苏氨酸与糖苷连接提供信息。

另一方面,在温和的碱性条件下,可从寡糖的还原末端将糖基一个一个的从寡糖分子上解离下来,即所谓的消去反应。这一反应进行得很快,特别是当还原末端的糖在它的 C-3 位置的羟基被取代。由于粘蛋白型的糖链富含 1 \rightarrow 3 键,因此,由 β -消去作用释放的寡糖很容易被破坏。在反应混合物中加入硼氢化钠,可使从多肽主干释放的寡糖,立即转为相应的、对碱稳定的糖醇。因此,粘蛋白型的糖链,能从碱性硼氢化钠溶液中,以寡糖醇的形式,几乎定量地回收。

从多肽主干释放天冬酰胺连接的糖链,曾经使用具有广泛专一性的蛋白水解酶,如链霉菌蛋白酶,充分消化糖蛋白。并用常规方法将释放的天冬酰胺连接的寡糖分离出来,得到纯的样品,进行结构分析。然而,这种方法,包含若干问题,常导致糖链结构分析的错误结论。首先,链霉菌蛋白酶的充分消化,可能由于糖的位阻效应,通常是不完全的,因此,这样得到的糖肽,在多数情况,是含有不均一寡糖和不均一肽的分子的混合物。从这样复杂的混合物中,分离每一个分子,是很不容易的。其次,将一个糖肽纯化,非常困难,甚至即使肽链的成分是相同的,它们含有的两种基团具有不同的物理特性。例如鸡卵白蛋白经链霉菌蛋白酶消化, Dowex 50 柱层析分离,得到五种天冬酰胺连接的寡糖,这五种寡糖都是具有相同单糖数的二或三种成分的混合物。由于这些问题,天冬酰胺连接的糖链

表 10 各种内切糖苷酶的底物结构专一性

酶	底物结构
内切-β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	
D和C ₁ 酶	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \end{array}$
H酶	$\begin{array}{c} R \quad R \\ \downarrow \quad \downarrow \\ 2 \quad 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 4 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 4 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \end{array}$
C ₁₁ 酶	$\begin{array}{c} R \quad RR \\ \downarrow \quad \downarrow \\ 2 \quad 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 4 \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \downarrow \\ 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \end{array}$
	$\begin{array}{c} R \\ \uparrow \\ 2 \\ \text{Man}\alpha 1 \end{array}$
L-酶	$\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}-\text{Asn}$
内切-α-N-乙酰氨基半乳糖苷酶	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 4 R_1$
内切-β-半乳糖苷酶(肺炎双球菌)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 R_1 \\ (\text{GalNAc}) \quad 2 \\ \uparrow \\ \text{Fuc}\alpha 1 \end{array}$
弗洛因德氏杆菌 产黄素角质溶解菌	$\text{---GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 R_1$

R = sugar or hydrogen; R₁ = GlcNAc-Asn, Fucα1-6GlcNAc-Asn, GlcNAc, Fucα1-6GlcNAc, GlcNAcOH, or Fucα1-6GlcNAcOH; R₂ = GlcNAc-Asn, GlcNAc, or GlcNAcOH, R₃ = Ser or Thr; R₄ = Glc or GlcNAc; R₅ = Glc, Glc-ceramide, or GlcNAc.

虚线表示酶分解糖链的位置。

摘自 Kobata, A. The carbohydrates of glycoproteins, in Biology of carbohydrates Vol. 2, 1984, Ed. Ginsburg, V and Robbins, P. W., John Wiley, New York.

结构的研究结果,比粘蛋白型的有更多的争议。

(1) 应用内切糖苷酶 内切糖苷酶作为释放天冬酰胺连接的糖链的新工具的引入,为研究天冬酰胺连接的寡糖结构开创了新纪元。内切β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶水解糖蛋白中天冬酰胺连接的N,N'-二乙酰甲壳双糖。

迄今已有五种内切-β-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶,它们是内切-β-N-乙酰氨基葡萄糖

苷酶 D、H、C_I、C_{II} 和 L, 其纯度已达到能应用于糖蛋白结构研究的要求。这些酶的底物专一性不同 (表 10)。D 酶和 C_I 酶具有完全相同的底物专一性, 需要 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 三糖作为它们专一的糖基 (glycon), 非还原末端的 α -甘露糖基是最重要的, 并且它的羟基必须不被其它糖取代。这些酶的糖苷配基专一性是相当广阔的, 与 N-乙酰葡萄糖胺连接的糖链, $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6\text{GlcNAc}$, GlcNAc-Asn (肽) 和 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6\text{GlcNAc-Asn}$ (肽) 都能被 D 和 C_I 酶解离。

H 酶需要 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 四糖作为它专一的糖基, 最重要的糖也是非还原末端位置的 α -甘露糖基。然而, 这一糖基并不必须在非还原末端, 其 C-2 羟基可由其它糖取代。此酶可水解与 N-乙酰葡萄糖胺连接的糖链, 亦水解 GlcNAc-Asn (肽)。

D 酶解离连接于 N-乙酰葡萄糖胺醇和 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6\text{GlcNAc}_{\text{OT}}$ 的糖链, 而 H 酶解离连接于 N-乙酰葡萄糖胺醇的糖链比连接于 N-乙酰葡萄糖胺的糖链的速度慢 2 至 3 个数量级。这些性质对检查从胼解得到的寡糖链结构是有用的。

C_{II} 酶需要有支链的五糖, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 作为它专一的糖基。两个末端 α -甘露糖基必须未被取代或仅一个糖基的 C-2 位被取代。酶的糖苷配基专一性与 H 酶相同。

L 酶解离 $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc-Asn}$; 也解离 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 成为 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 和 N-乙酰葡萄糖胺; 并水解一个分子 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 为两个分子 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, 且其解离速率为水解 $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc-Asn}$ 的二倍。因此, L 酶应归属壳多糖酶一类更为适当。然而, 迄今已检测的其它壳多糖酶, 没有一个能解离任何天冬酰胺连接的糖链, 所以目前仍列为内切糖苷酶。但 L 酶不作用于比较大的天冬酰胺连接的糖链。

表 10 中, 除内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶之外, 其它四种内切糖苷酶的底物专一性也被列入, 这些酶对研究糖蛋白糖链结构也是有效的工具。

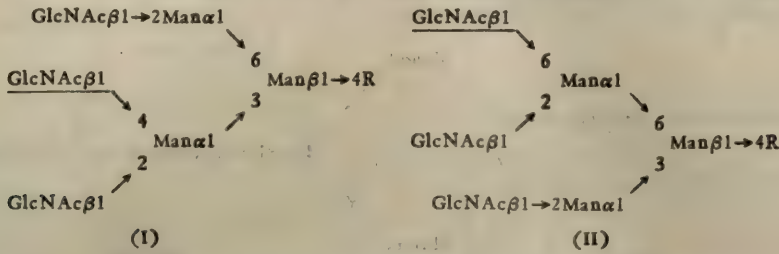
例如从肺炎双球菌的培养液中纯化的内切- α -N-乙酰氨基半乳糖苷酶, 专一地从糖蛋白解离 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 二糖。与其它恰当的外切糖苷酶配合在一起使用, 这个酶对研究粘蛋白型糖链的结构和功能是有效的工具。

(2) 化学方法 天冬酰胺连接的糖链在温和的碱性条件下, 如用于释放粘蛋白型糖链的条件, 是比较稳定的。在比较剧烈的条件下 (0.2mol/L NaOH, 1.0mol/L NaBH₄, 100°C, 1—20h) 可释放天冬酰胺连接的糖链 (表 11)。这一方法, 由于发生糖链的部分水解; 并且, 不能完全避免糖链的消去反应, 和不能定量回收寡糖。因此, 使用价值有限。

Svensson 根据三氟乙酰基能稳定连接糖基的糖苷键, 和随之由转酰胺基作用导致肽键的解离, 创立了三氟乙酸解的方法。经 O-和 N-去三氟乙酰化后, 可将糖链分离, 并可重新 N-乙酰化。这一方法既解离天冬酰胺连接的糖链, 又解离粘蛋白型糖链。然而, 在还原末端会有部分降解, 并且唾液酸被除去, 这是此方法的缺点。因而, 应用仍然是局限的。

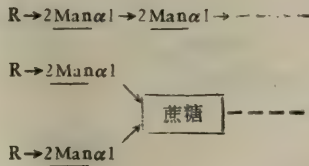
从天冬酰胺连接的糖链释放寡糖, 胼解法可能获得最好的结果。然而, 应用这一方法研究天冬酰胺连接的糖链结构, 尚不够成熟, 并且也存在不少问题, 最严重的是在释放的

结构中。但在多头天线的糖链结构中， β -N-乙酰葡萄糖胺基的有效体积减小。



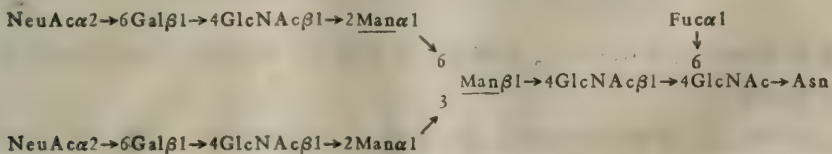
如在结构 I 中，一个 β -N-乙酰葡萄糖胺基(划线的)相当于 1.9 个葡萄糖基；在结构 II 中，一个 β -N-乙酰葡萄糖胺基(划线的)只相当于 1.5 个葡萄糖基。比较结构 I 和 II 中的 N-乙酰葡萄糖胺基的大小，说明在寡糖各异构体中 N-乙酰葡萄糖胺的大小亦不同。平分的 (bisect) β -N-乙酰葡萄糖胺基的有效体积更小，可能是因为这一糖基埋在其它单糖簇中的缘故。

凝集素-Sephacrose 的使用，给分离寡糖提供了一个新方法。分析已知结构的各种寡糖和糖肽在 ConA-Sephacrose 柱上的行为，Ogata 等报道，能与 ConA-Sephacrose 柱亲和的寡糖或糖肽分子中，必须至少有二个 α -甘露糖基，它们可以是未取代的或仅在 C-2 位取代：

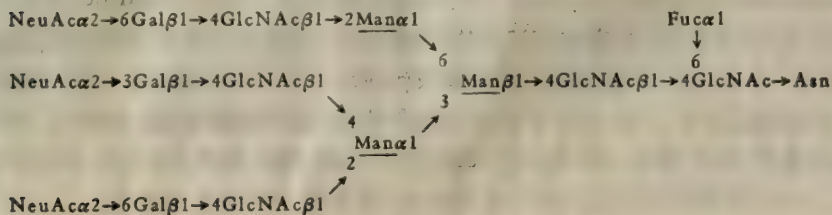


R 代表氢或糖，与 ConA 相互作用的甘露糖，在下面划线表示。根据 ConA 的这一性质，ConA-Sephacrose 柱可用于分离分支数和分支位置不同的，复杂型和杂交型的天冬酰胺连接的糖。如图 4 所示的三种不同分支数的天冬酰胺连接的寡糖链，与 ConA-Sephacrose 的亲水性不同。结构 (a) 吸附于 Con A-Sephacrose 柱，并可用 0.1mol/L 的 α -甲基-D-甘露糖解离；(b) 微弱地留于柱上，可用不含糖的缓冲液洗脱；(c) 完全不吸附于柱上。因此可用 Con A-Sephacrose 分离这三种结构不同的寡糖链。

a)



b)



c)

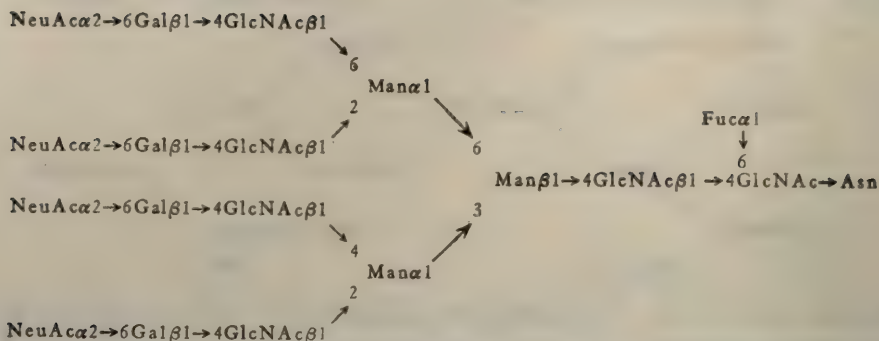
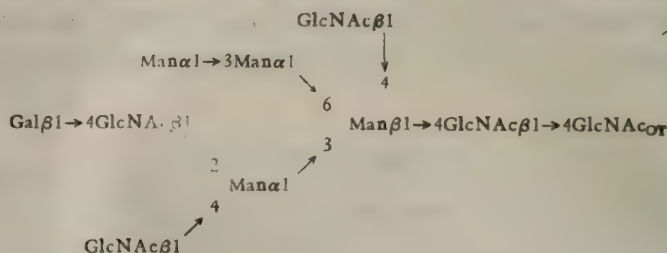


图4 典型的含岩藻糖的天冬酰胺连接的糖链。划线的是能与 ConA-Sepharose 作用的甘露糖基。

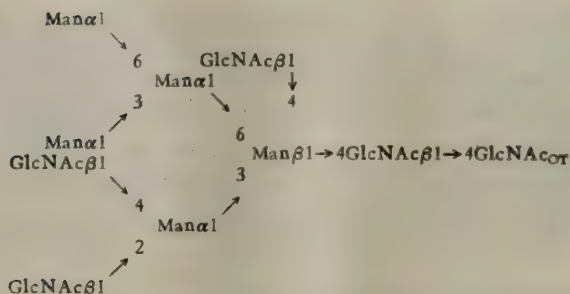
ConA-Sepharose 亦能有效地分离从卵白蛋白糖肽，用内切- β -N-乙酰葡萄糖苷酶 H, 消化所释放的二个寡糖。

(A)



和

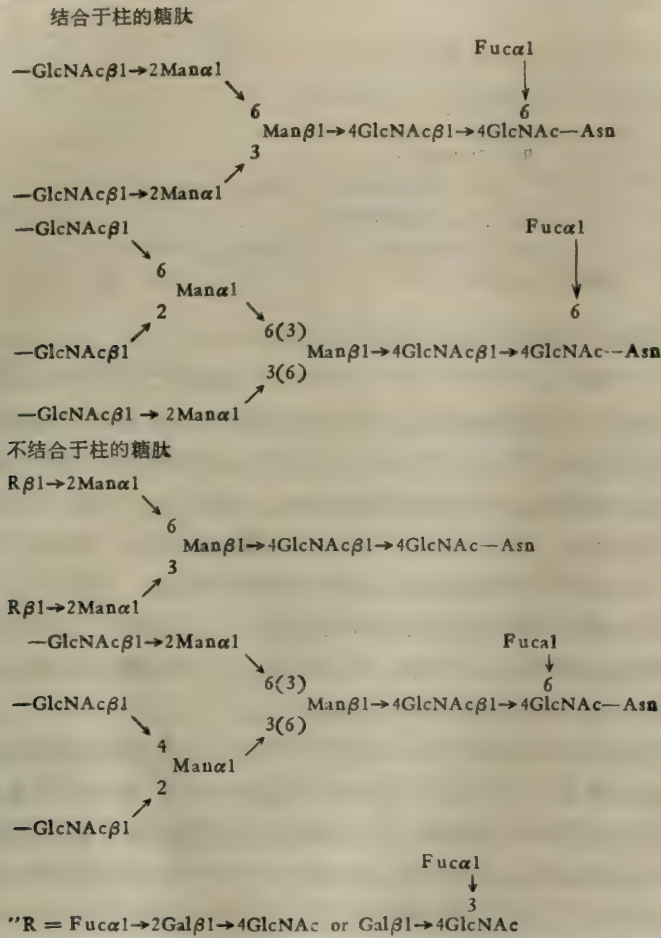
(B)



寡糖 A 不居于 ConA-Sepharose 柱，而寡糖 B 居于柱上，并可用 0.1mol/L α -甲基-D-甘露糖苷从柱上解离。

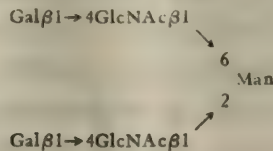
Kornfeld 等报道，各种天冬酰胺连接的寡糖，在豌豆凝集素（简称 PSL）-Sepharose 和 LCA-Sepharose 柱上的行为。如表 12 所示，与 PSL-和 LCA-Sepharose 结合很强，但可用 0.5mol/L α -甲基-D-甘露糖苷解离的糖链结构，必须包含连接于天冬酰胺的 N-乙酰葡萄糖胺基 C-6 位的 α -岩藻糖，和未被取代或仅在 C-2 位被取代的二个甘露糖基。在一个 α -甘露糖基的 C-4 位和 C-6 位均被取代时，将阻碍糖链与凝集素结合，但是在一个 α -甘露糖基的 C-2 位和 C-6 位的双取代，并不损害糖与凝集素结合。表明 PSL-和 LCA-Sepharose 与 ConA-Sepharose 对与之结合的寡糖结构的要求不同。

表 12 糖肽与豌豆和扁豆凝集素-Sepharose 的相互作用



出处同表 10。

Hammarisfröm 等用定量沉淀和定量抑制技术, 研究许多不同的糖肽和寡糖, 得到如下结论: 与 L-PHA 结合部位互补性最强的结构是下列的五糖:



Cumming 和 Kornfeld 研究各种已知结构的糖肽在 L-PHA-琼脂糖柱上的行为, 也得到同样的结论。此外, 他们发现, 含有平分型 N-乙酰氨基葡萄糖的二天线的复杂型糖链, 结合 E-PHA-琼脂糖柱的倾向性很强。

用胼解法得到的、天冬酰胺连接的糖链的十二种寡糖, 探查了在 E-PHA-琼脂糖柱上的行为, Yamashita 等阐明了结合 E-PHA 需要的最小寡糖结构单位 (图 5)。

氨基糖用离子交换层析在氨基酸分析仪上测定,中性糖的硼酸络合物在高效液相仪上用离子交换层析柱分析。气-液相层析的使用日益普遍,因为这一方法可同时分离和定量糖蛋白中通常出现的所有单糖。

由于包含在糖蛋白中的所有单糖在 C-1 位置具有醛基,假如有合适的方法,能将这一些单糖分开,任何单糖经 NaB^3H_4 还原后,可以测定它的放射性获得定量数值。Takasaki 和 Kobata 根据这一原理,发展了一个放射电泳方法。用硼酸盐缓冲系统,或吡啶-乙酸盐缓冲系统,进行高压电泳,都获得好的分离效果,由于 NaB^3H_4 的比放射性很高,0.5—1.0 μg 寡糖或复杂的糖混合物的样品足够作定量分析,因此是迄今测定复杂的糖混合物中的中性糖、氨基糖和 N-乙酰唾液酸的最灵敏的定量的方法。对已知结构的若干乳糖寡糖的分析,进一步证实了方法的灵敏度。

(三) 糖链顺序分析——糖苷酶法

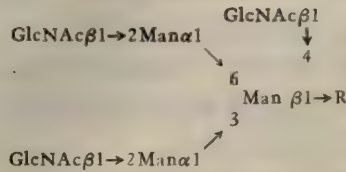
氘标记寡糖的还原末端,对测定寡糖通过顺次的外切糖苷酶消化释放的单糖顺序也是有用的。外切糖苷酶仅从糖链的非还原末端水解单糖基。另外,它们通常对末端单糖和单糖的异头构象显示强专一性。依此, α -甘露糖苷酶只能除去寡糖非还原末端的 α -甘露糖基, β -甘露糖苷酶除去 β -甘露糖基等。

由于这些性质,目前,外切糖苷酶已成为确定糖链顺序的有用工具。例如,在许多糖蛋白的复杂型糖链中广泛存在的九糖, $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 (\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3) \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$,通过外切糖苷酶消化和在 Bio-GelP-4 柱上层析,很容易获得它的顺序。一个九糖在 Bio-GelP-4 柱上的迁移率相当于 13.5 个葡萄糖单位,在各种外切糖苷酶中,仅 β -半乳糖苷酶能使它降解。降解后的放射性产物,在 Bio-Gel P-4 柱上的洗脱位置相当于 11.25 个葡萄糖单位。因为绝大多数已糖大约为一个葡萄糖单位,结果表明,九糖经 β -半乳糖苷酶消化除去了二个半乳糖。这个放射性产物,只被 β -N-乙酰氨基己糖苷酶消化,并转化为一个有 7.2 个葡萄糖单位的放射性产物。因为一个 N-乙酰葡萄糖胺相当于 2 个葡萄糖单位,表明通过 β -N-乙酰氨基己糖苷酶消化,有 2 个 N-乙酰葡萄糖胺被除去。然后,这个带放射性的寡糖,顺次与 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶和 β -N-乙酰氨基己糖苷酶保温,分别释放二个甘露糖、一个甘露糖和一个 N-乙酰葡萄糖胺。并最后转化为 [^3H]N-乙酰氨基葡萄糖醇。得到的系列结果表明,九糖的结构可写为: $(\text{Gal}\beta 1 \rightarrow \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \rightarrow)_2 \text{Man}\beta 1 \rightarrow \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow \text{GlcNAc}_{\text{OT}}$ 。由于氘标记位于寡糖的还原末端,消化产物通过 Bio-GelP-4 柱层析,仍可用于下一个酶的消化反应。因此,这一方法不仅节省样品,而且对在 Bio-GelP-4 柱上具有相同迁移率的混合寡糖的顺序分析也是有用的。

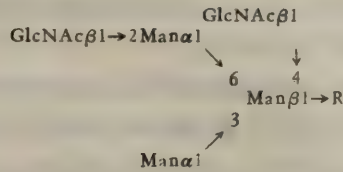
在用外切糖苷酶研究糖链顺序时,特别需要注意的是酶的糖苷配基专一性。例如,从一种霉菌 (*Aspergillus saitoi*) 纯化的 α -甘露糖苷酶能解离 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}$ 键,但不解离 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}$ 和 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}$ 键。由于酶的严格专一性,糖苷酶已成为鉴定天冬酰胺连接的高甘露糖型的糖链的有效工具。

从肺炎双球菌纯化的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶广泛地用于结构研究,和从糖蛋白除去 N-乙酰葡萄糖胺,因为它作用于糖蛋白和作用于糖肽一样。然而,研究这一酶与各种寡糖的作用,它具有非常复杂的糖苷配基专一性,这种性质对复杂的天冬酰胺连接的糖链

结构分析十分有用。这个酶解离 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}$, $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}$ 和 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Gal}$ 键,但不能解离 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Man}$ 和 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6\text{Man}$ 键。在 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}$ 中的 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 键被此酶解离,但在 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6(\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2)\text{Man}$ 中的 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 键则不能被解离,其原因可能在于 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6$ 基的位阻效应。在

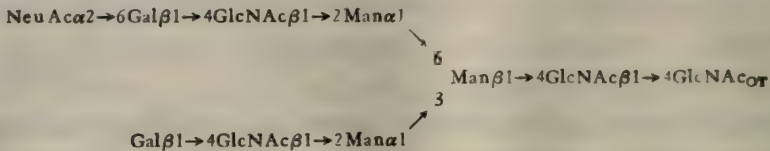


结构中亦观察到相似的位阻效应,酶不能解离 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Man}\beta$ -键,并且 N-乙酰葡萄糖胺基在空间关系上抑制 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ 一边的 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha$ -键的解离。因此酶从这一结构中只能释放一个 N-乙酰葡萄糖胺基,产生下列五糖。

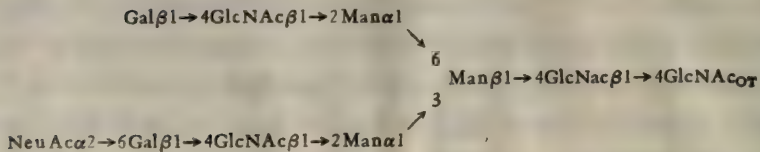


刀豆 (jack bean) α -甘露糖苷酶水解绝大多数的 α -甘露糖基,但各种甘露双糖苷基团的水解速度不同: $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}$ 和 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}$ 键的解离速度比 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}$ 快得多。另外,这个酶具有很有趣的糖苷配基专一性。它不能从 $\text{R} \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 解离 α -甘露糖苷键,但是它能解离 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{R} \rightarrow \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, R 代表糖链,这个专一性有效地用于确定某些寡糖是连接于 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ 一端还是 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ 一端。例如,下列二个十糖异构体,很难鉴别。

(I)

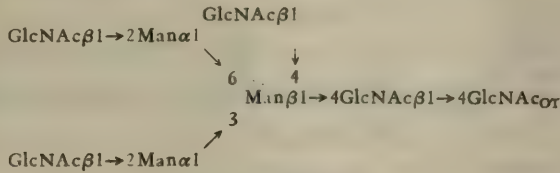


(II)

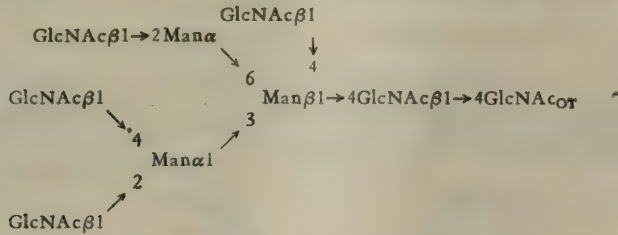


只能用外切糖苷酶顺次消化来辨别。通过 β -半乳糖苷酶, β -N-乙酰氨基己糖苷酶和唾液酸酶顺次消化 II 得到的带放射性的七糖,经刀豆 α -甘露糖苷酶消化成为六糖。相反,通过同样处理,从 I 得到的七糖不被刀豆 α -甘露糖苷酶消化。

糖苷酶的糖苷配基专一性与底物浓度有关。例如,在底物浓度低于 $14\mu\text{mol/L}$ 时,刀豆半乳糖苷酶解离 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 键的速度比 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GlcNAc}$ 键快 50 倍,但是,增加底物浓度使酶对这两种糖苷键的解离速度的差别缩小。不仅底物浓度,而且酶浓度也是重要的。因此,在 30 微升反应混合液中加入 0.036 单位的酶,温育 20 小时,只有 4.6% 的 $\text{Gal}\beta 1\rightarrow 3\text{GlcNAc}$ 键水解。当酶量增加到 0.15 单位,键被完全水解。肺炎双球菌 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的底物专一性与反应液的酶浓度亦有关。例如,具有 $\text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}_{\text{OT}}$ 末端的八糖

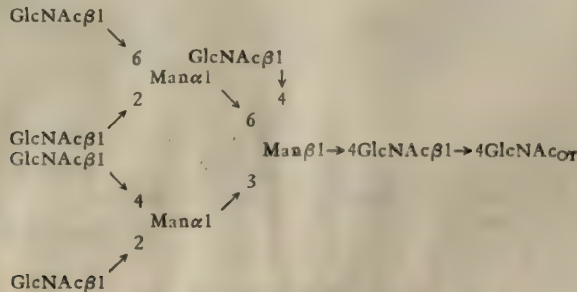


与不同浓度的酶温育 16 小时,当酶浓度在 0.5—15 毫单位/50 微升时,只释放八糖分子中的 1 个 N-乙酰葡萄糖胺基,当酶浓度增加到 25 毫单位/50 微升时,有 3 个 N-乙酰葡萄糖胺基被释放。具有相同末端的九糖



酶浓度为 0.5—15 毫单位/50 微升时,只释放 1 个 N-乙酰葡萄糖胺基,然而,当酶浓度增加到 40 毫单位/50 微升时,可从九糖释放 3 个 N-乙酰葡萄糖胺基。这些结果表明具有 $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}_{\text{OT}}$ 末端的寡糖中的平分型 N-乙酰葡萄糖胺基,要用高浓度的肺炎双球菌的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶解离。

寡糖



中的 $\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 3$ -基对酶作用的抗性比以上寡糖更强。 释放 1 个 N-乙酰

葡萄糖胺基需要大于 10 毫单位/50 微升的酶。因此，利用肺炎双球菌的 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的底物专一性研究寡糖结构，酶浓度必须保持在 10—15 毫单位/50 微升，寡糖浓度则为 2—5 毫摩尔/50 微升。

(四) 甲基化分析

一旦糖链的单糖顺序确定，最终一步是确定糖苷键的位置。为了这一目的，只有甲基

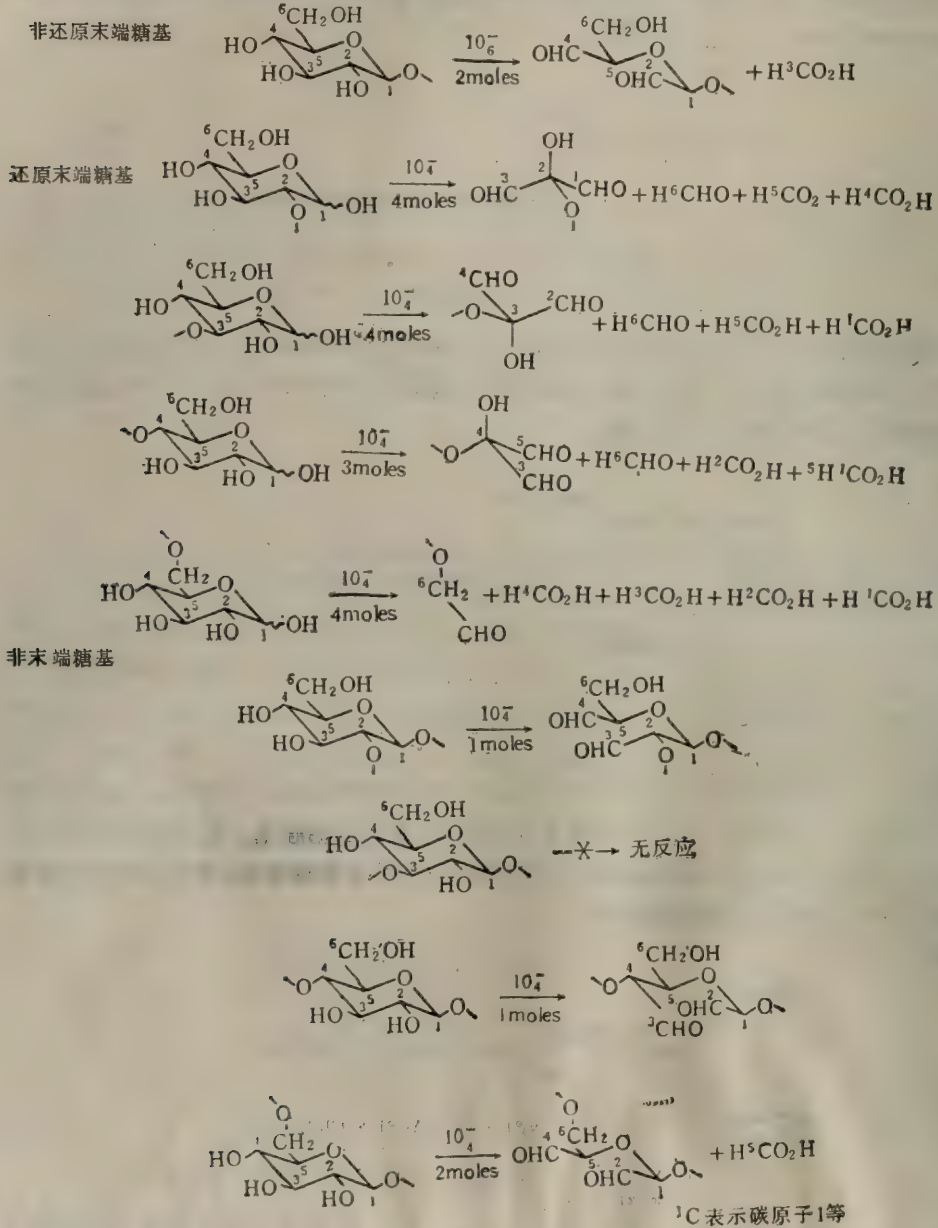


图 6 取代的己糖基的高碘酸氧化反应。

(摘自 Kennedy, J. F. & White, C. A; Bioactive Carbohydrates, 1983, P. 70, John Wiley New York)

化分析能给予可靠的信息。寡糖和糖肽中糖链的甲基化,可用 Hakomori 法,使游离羟基全部成为甲醚。经酸水解全甲基化寡糖,获得的各种各样的、部分 O-甲基化中性糖,在转化为它们的醛糖醇乙酸酯 (alditol acetate) 后,用 ECNSS-M, OV-225 或 OS-138 包被的 Gaschrom Q 柱,在气相层析上进行分离和定量测定。然而,用 Hakomori 的方法,转变为 N-甲基乙酰氨基衍生物的氨基糖,不能从 ECNSS-M 定量回收,虽然用这样的柱可以得到比较好的分离。这个问题,可用 OV-17-Gaschrom Q 柱解决,这种柱没有 N-甲基乙酰氨基衍生物的不可逆吸附。OV-225-Gaschrom Q 柱对定量分析甲基化氨基糖,也是有成效的。

这些新技术的发展,使分析甲基化寡糖样品的量,可少至 30nmol。然而,灵敏度的提高带来了新问题。一系列的酞酸烷酯 (alkyl esters of phthalic acid) 在塑料工业中广泛作为增塑剂,严重地污染实验环境。由于这些酯类具有与那些 O-甲基化的醛糖醇和氨基醛糖醇相同范围的 *T* 值,它们经常干扰层析谱的解析,和每一个糖成分的分析。气相层析和质谱连用可解决这个问题,因为糖峰确定可依赖它们的质量曲线。即使存在酞酸酯 (phthalic acid ester) 的污染,定量数据能用质量片段图谱 (mass fragmentography) 获得。最近,质谱分析已成为分析完整寡糖,甚至糖脂的有用工具。

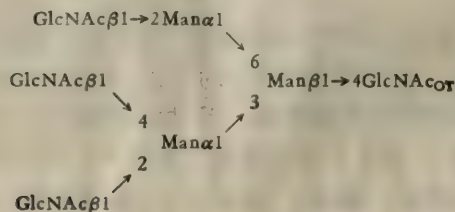
(五) 高碘酸氧化

高碘酸和它的盐在 pH3-5 的水溶液中氧化单糖是常用的方法。在 pH3-5 可以避免酸水解,和在高 pH 发生的无选择性的氧化。高碘酸和高碘酸盐与相邻的两个羟基作用,使它们之间的连接断裂。反应产物依赖单糖单位之间的连接,如在呋喃环结构中,与仲 (secondary) 羟基相邻的伯 (primary) 羟基的氧化,生成甲醛。而相邻的三醇基 (triol) 则产生甲酸。多糖与高碘酸的反应,可以试剂消耗的量与甲酸和甲醛的生成来衡量 (图 6)。高碘酸氧化能区别 1, 3-和 1, 6-双取代的残基,并能测定 1,2-和 1,4-双取代残基的量。

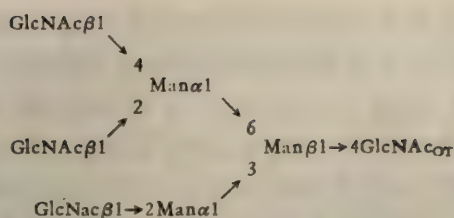
高碘酸氧化的双醛型产物在水中不稳定,因此需要在酸水解前将它们还原为醇,常用的还原剂是硼氢化钠。分析这些产物的组成是必需的,因为它提供区别 1, 2-和 1, 4-双取代残基的方法。可用气-液层析测水解物的三甲基硅烷醚衍生物。

虽然与甲基化相比,高碘酸氧化方法的价值有限,但对测定糖链结构,它仍是一个有用的方法。高碘酸氧化破坏糖链中具有相邻羟基的单糖。例如,下列两个异构七糖,单用甲基化分析,难以区别。

(I)



(II)



当高碘酸氧化时，寡糖 I 转变为 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{XylNAc}_{\text{OT}}$ ，寡糖 II 则转变为 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{XylNAc}_{\text{OT}}$ 。然后，在第二次高碘酸氧化时，这两个三糖异构体，分别转变为 $\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4\text{XylNAc}_{\text{OT}}$ 和 $\text{XylNAc}_{\text{OT}}$ 。这两个放射性产物，用纸层析，或用 Bio-Gel P-4 柱层析，很容易区别。Spiro 曾对高碘酸氧化的各种条件，和它们在糖蛋白的糖链结构研究中的应用，作了评述。

(六) Smith 降解

所谓 Smith 降解，首先是改良的高碘酸氧化，然后硼氢化钠还原，和完全水解。用温和条件（通常是室温，稀无机酸）水解硼氢化钠还原的产物，使其部分降解，生成具有专一糖苷的寡糖，这种寡糖保持原来多糖的特征。这取决于糖基（原来抗高碘酸盐的残基）与醛糖醇之间的糖苷键的相对稳定性。

(七) 质谱分析

质谱在多糖结构分析中的作用，不仅在于鉴定甲基化衍生物；并且当糖肽转化为挥发性衍生物时，质谱分析也适用于完整糖肽的结构研究，如人体转铁蛋白寡糖的质谱分析所表明的。用质谱亦可测定小的寡糖的分子量、单糖顺序和糖苷键的位置。虽然有关糖基的某些信息通常还是需要的。

质谱分析与其说包括电子撞击，不如说包括化学的离子化作用。比常规方法敏感。

近些年来，有人探讨用质谱对十个左右糖基的寡糖链，经全甲基化后直接分析。所采用的是化学解离等软离子源，从而可得到较大的离子峰（M. W. 约 2000），然后通过每个糖的断裂，可得到较多的结构信息。但由于要得到分子量越大的峰，其噪音也越大，导致图谱的混乱。因此，有待于进一步改进。

(八) 核磁共振能谱分析

高分辨的核磁共振（NMR）能谱可作为“指纹”法用于糖蛋白的糖链分析。通常是，分析分离得到的糖肽和寡糖。作 NMR 分析的化合物必须非常纯，因为 NMR 对杂质高度敏感。

NMR 最大的优点是能在不破坏样品的情况下分析寡糖结构，样品可再用于其它测定。另一个显著的优点是：只需要非常微量的样品，例如 25nmol，就可获得糖肽或寡糖的氢核磁能谱，能分辨五种特征性的共振：(i) 异头的质子，(ii) 非异头的环的质子，(iii) N-乙酰(基)甲基质子，(iv) L-岩藻糖的甲基质子，(v) 连接于唾液酸的 C-3 的二个质子。在大量的、结构相似的糖肽中，异头质子的偶联常数与化学位移比较，表明这些都取决于单糖的类型、取代模式和空间位置；亦取决于糖苷键的 α -或 β -构型，和糖-肽

键的 O-或 N-类型。糖环的非异头的质子的共振区域是高度复杂的,然而,其中的某些质子导致位于远离大多数的共振,例如甘露糖基的 H-2 质子的共振位置,使有可能鉴定连接的糖链(天线)数。

过去十多年,糖的 ^{13}C 核磁共振能谱,从奥秘的技术发展为常规的和结构研究有用的方法之一。化学位移表示出异头构型、环的类型、键的位置,取代基团和多聚体中单糖的顺序。 ^{13}C 和 ^1H 自旋-自旋的连接为异头构型的构象提供信息。

近些年来,由于运用了超导技术,使磁场频率不断提高,目前已达到 500 兆赫。大大地提高了 NMR 的分辨率。NMR 能谱分析将成为分析糖链的常规方法。

目前人们又在探索用 NOE (nuclear Overhauser enhancement) 测定糖链的空间立体结构,通过一级结构中相距较远,而在立体结构中相互作用的氢原子之间的关系,来确定糖链在空间的朝向。以得出糖链的完整的三维结构。

(九) 免疫化学反应

如今发现许多微生物的免疫专一决定簇,肿瘤相关抗原多数是多糖。专一的反应取决于多糖抗原和蛋白质抗体之间的多活性基团的相互作用。因此,可用于说明未知结构的寡糖与某一已知结构的相似性。

第三章 糖蛋白的结构

仅仅在十多年前,弄清楚寡糖链结构的糖蛋白屈指可数,现在,这个数字已很大,并且以指数速度增加。糖链可根据糖-肽连接的性质分类。这种分类方法是有益的,因为连接键在很大程度上决定糖链的整个结构,也因为单个糖蛋白分子可含有不止一种连接方式的寡糖(表 13)。一个极端的例子是人甲状腺球蛋白,它含有 N-糖苷键和二种类型的 O-糖苷键, GalNAc-Ser 和 Xyl-Ser, 后一种结构,过去仅在蛋白聚糖中见到。

表 13 含不止一种类型糖链和肽链连接方式的糖蛋白

糖 蛋 白	连 接 方 式							
	GlcNAc-Asn	GalNAc-Ser/Thr	Gal-Hyl	Xyl-Ser	Ara-Hyp	Gal-Ser	Man-Ser	Man-Thr
胎球蛋白	+	+						
血型蛋白	+	+						
人绒毛膜促性腺激素	+	+						
人免疫球蛋白 IgA ₁	+	+						
马铃薯凝集素					+	+		
溶胶原	+		+					
甲状腺球蛋白	+	+		+				
酵母甘露聚糖	+						+	
地蚕胶原						+		+

一、糖链和肽链的连接方式

糖链和肽链的连接方式,主要可分为两大类:一类是 β -构型的 N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺的酰胺基形成的糖苷键,称为 N-糖苷键。另一类,主要是由一个 α -构型的 N-乙酰半乳糖胺与丝氨酸或苏氨酸的羟基形成的 O-糖苷键。由 N-糖苷键连接的糖肽亦称为天冬酰胺连接的糖肽。由 O-糖苷键方式形成的糖肽亦称为粘蛋白型糖肽。

(一) 天冬酰胺连接的糖肽 (N-糖苷键连接的糖肽)

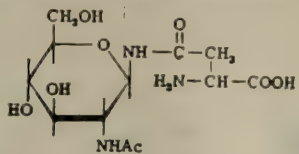
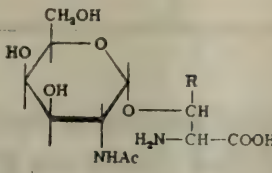
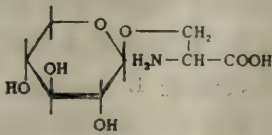
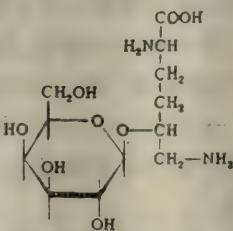
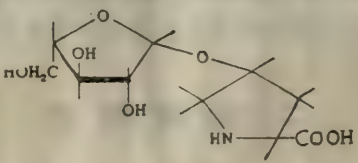
N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺连接的方式 GlcNAc-Asn 在动物糖蛋白中广泛分布。在植物、酵母糖蛋白中也有存在。在动物中,它存在于许多不同的分泌蛋白,如血浆糖蛋白、多肽激素、酶、免疫球蛋白及膜糖蛋白等。

大约在 50 年前, Neuberger 用蛋白水解酶水解结晶的鸡卵白蛋白时,从水解液中分离到一个肽,组成分析揭示:它含有天冬氨酸和甘露糖,葡萄糖胺等,当时没有可利用的技术作进一步结构分析。过了 20 年, Neuberger 及其共同工作者重新对这一问题进行了研究,这个糖肽是由 N-乙酰葡萄糖胺的异头碳原子和天冬酰胺上的酰胺基的氮原子连接

形成的一个糖苷键。差不多同时,在美国、日本、苏联的一些实验室里也都发现了N-乙酰葡萄糖胺基与天冬酰胺连接的N-糖苷键。以后,用人工合成了N-乙酰葡萄糖胺的异头碳原子与天冬酰胺的酰胺基连接的N-糖苷键的化合物,证明了卵白蛋白中分离到的糖肽是由GlcNAc-Asn连接的。

通过对糖蛋白氨基酸顺序的研究,发现携带糖链的天冬酰胺基总是出现在Asn-X-Ser或Asn-X-Thr顺序,X代表20个氨基酸中除脯氨酸以外的任一氨基酸,提示这两个三肽被催化形成天冬酰胺连接的糖链的酶所识别。用化学合成的不同链长的模型肽作为糖基接受体,和鼠肝微粒体制剂作为酶源,证明了这一三肽受体学说。Asn-X-羟基氨基酸顺序被证明是N-糖基化作用必要的先决条件,而在X位置为脯氨酸基的肽不能作为糖

表 14 糖蛋白中常见的糖-肽连接

糖-肽连接	结 构	存 在
N-糖苷键 β-N-乙酰葡萄糖胺基- 天冬酰胺 (GlcNAc-Asn)		广泛分布于动物, 植物和微生物
O-糖苷键 α-N-乙酰半乳糖胺基- 丝氨酸/苏氨酸 (GalNAc-Ser/Thr)		动物来源的糖蛋白
β-木糖基-丝氨酸 (Xyl-Ser)		蛋白多糖,人甲 状腺球蛋白
半乳糖基-羟赖氨酸 (Gal-Hyl)		胶原
α-L-阿拉伯糖基- 羟脯氨酸 (Ara-Hyl)		植物和海藻 糖蛋白

出处同表 1。

基化接受体。

(二) 粘蛋白型糖肽(O-糖苷键连接的糖肽)

GalNAc α 1-Ser (或 Thr) 是粘蛋白型糖-肽连接最常见的方式,存在于粘蛋白、血型活性糖蛋白、某些血浆糖蛋白和膜糖蛋白中。这类连接方式看来局限于动物,尚未在其它生物体中遇到。

表 15 罕见的糖链和肽链连接的方式

连接方式	存在
半乳糖基-羟脯氨酸 (Gal-Hyp)	阿拉伯半乳糖蛋白, 藻类细胞壁糖蛋白
半乳糖基-丝氨酸 (Gal-Ser)	马铃薯凝集素,藻类细胞壁 糖蛋白,地蚕表皮胶原
半乳糖基-半胱氨酸 (Gal-Cys)	尿糖肽
葡萄糖基-半胱氨酸 (Glc-Cys)	鳕变态反应原 M, 红细胞膜糖肽
甘露糖基-丝氨酸/苏氨酸 (Man-Ser/Thr)	酵母聚甘露糖真菌糖肽, Clamworm 表皮胶原
L-岩藻糖基-苏氨酸 (Fuc-Thr)	人尿糖肽,大鼠糖蛋白

出处同表 1。

粘蛋白型糖肽,与天冬酰胺连接的糖肽不同,除 GalNAc α 1-丝氨酸(或苏氨酸)的连接方式外,在糖蛋白中还发现其它的连接方式(表 14),虽然它们的分布是有限的,但却是常见的。例如, β -半乳糖与羟赖氨酸的 δ 羟基形成的 O-糖苷键,在胶原和第一补体的组成成分 C $_1$ 中存在。某些植物糖蛋白,例如,伸展蛋白和马铃薯凝集素(简称 STL)含有许多连接于羟脯氨酸的阿拉伯糖基,也就是 L-Ara-Hyp 的糖肽。

作为一些罕见的例子(表 15),低等动物如地蚕的胶原具有半乳糖-丝氨酸和甘露糖-苏氨酸的连接结构。组成酵母细胞壁的聚甘露糖中有甘露糖-丝氨酸的连接结构,这种连接方式也存在于某些细菌的酶中。人尿中有一种糖肽,其连接方式是 L-岩藻糖与苏氨酸的羟基形成 O-糖苷键,在某些酶中的糖肽通过糖与肽链的 β -羟基丙氨酸和 β -羟基酪氨酸的羟基相互连接形成 O-糖苷键。一种更特殊的例子是糖和肽链通过 S-糖苷键相互连接,如人尿中的糖肽,半乳糖基与半胱氨酸的巯基相连接,形成 S-糖苷键。红细胞膜上有葡萄糖基与半胱氨酸连接的糖肽结构。

比较研究各种胶原中,围绕携带糖链的羟赖氨酸的氨基酸顺序,发现总是出现 Gly-X-Hyl-Gly 结构。因此,推测这种四肽可能是糖基化受体的标志。

二、糖链结构

粘蛋白型(或 O-糖苷键型)的和天冬酰胺连接的(或 N-糖苷键型)糖链具有十分不同的结构特征。天冬酰胺连接的糖链中都有共同的五糖核心,并且都是通过 GlcNAc β 1-Asn

表 16 上皮粘蛋白的寡糖结构

结 构	来 源
<p>I. 绵羊颌下腺型 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O}$</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{Fuca}1 \rightarrow 2 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	绵羊、牛、乳猪颌下腺粘蛋白
<p>II. 猪颌下腺型</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Fuca}1 \rightarrow 2 \\ \diagdown \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	猪颌下腺 A ⁺ 粘蛋白
<p>III. 大鼠舌下腺型</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Fuca}1 \rightarrow 2 \\ \diagdown \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	猪颌下腺 A ⁻ 粘蛋白 狗颌下腺粘蛋白
<p>IV. 卵巢囊液型</p> <p>(a)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p> <p>(b)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	大鼠舌下腺和结肠粘蛋白
<p>(a)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p> <p>(b)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	卵巢囊液粘蛋白
<p>(a)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p> <p>(b)</p> <p> $\begin{array}{c} \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \\ \diagdown \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagup \\ \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \\ \diagdown \\ \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O} \end{array}$ </p>	绵羊胃粘蛋白

摘自 Sadler, J. E., Biosynthesis of glycoproteins: Formation of O-linked oligosaccharides in Biology of Carbohydrates Vol. 2, 1984, Ed. Ginsburg, V. & Robbins, P. W., John Wiley & Sons, New York.

4GlcNAc 或 Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc 双糖或分支,发生进一步延伸或分支形成。

表 18 粘蛋白寡糖的链终止键

糖或平常的名称	结 构
I. 血型决定簇	
H	Fuc α 1 \rightarrow 2Gal
A	GalNAc α 1 \rightarrow 3Gal Fuc α 1 \rightarrow 2Gal
B	Gal α 1 \rightarrow 3Gal Fuc α 1 \rightarrow 2Gal
Lewis a	Fuc α 1 \rightarrow 4GlcNAc Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc
Lewis b	Fuc α 1 \rightarrow 4GlcNAc Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc
II. 其它糖	
岩藻糖	Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc Fuc α 1 \rightarrow 3GlcNAc
半乳糖	Gal β 1 \rightarrow 3Gal
N-乙酰葡萄糖胺	GlcNAc α 1 \rightarrow 4Gal GlcNAc α 1 \rightarrow 4GlcNAc
N-乙酰半乳糖胺	GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc
唾液酸	Sia α 2 \rightarrow 6GalNAc Sia α 2 \rightarrow 6Gal Sia α 2 \rightarrow 4GlcNAc Sia α 2 \rightarrow 8Sia

出处同表 16。

复杂寡糖的分支点,可如表 17 所示图解分类。分支(用方框表示)与寡糖结构中另一位置的专一基团(如表 17 中间行所列)结合。分支 IV 和 V 往往连接于半乳糖基,而半乳糖基又是分支 III 结构的一部分。这些分支偶然也与 1 型 (Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc) 链或 2 型 (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc) 链中连接于 N-乙酰葡萄糖胺的半乳糖基连接。从这五种结构形成寡糖的种类是很多的。然而,由多于几个糖基建成的任何糖的可能的错综复杂性则更大,因为可能连接于各种分支的,终止链的键多样化。这些包括 ABH 和 Lewis 血型抗原决定簇(表 18), Fuc α 1 \rightarrow 3GlcNAc, 几种唾液酸键,以及其它不常见的半乳糖基-N-乙酰葡萄糖胺的连接。这样,半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺既存在于糖链内部,亦可作为非还原末端的糖基。

O-连接的寡糖结构的多样性受到一定的限制, 1 型链只存在于 I 或 V 类型的支链(表 17 I, V), 各种支链上都可出现 2 型链。除 II 类外的其它支链都能连接 ABH 血型

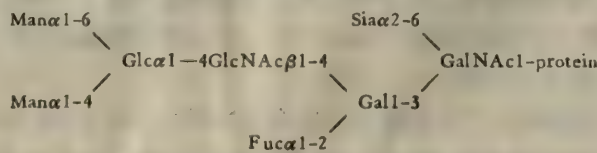


图 7 山羊颌下腺粘蛋白的一个寡糖结构。

(摘自 Dutta, B & Rao, C. V. N., 1982, *Biochim. Biophys. Acta*, 701, 72)

抗原和 Lewis 血型抗原(或 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$) 结构。二种 N-乙酰乳糖胺结构($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3/4\text{GlcNAc}$) 在线性顺序中出现, 它们间的连接键在 IV 和 V 支链中为 $\beta 1 \rightarrow 4$, II 类支链中为 $\beta 1 \rightarrow 3$, I 类支链中为 $\beta 1 \rightarrow 3$ 或 $\beta 1 \rightarrow 4$ 。在山羊额下腺粘蛋白中最近发现的结构(图 7), 在 O-连接的寡糖中存在甘露糖和葡萄糖, 以及 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Gal}$ 结构, 这种独有的结构, 难以包括在上述的分类中。

2. 血浆糖蛋白中的寡糖结构

已见报道的, 大约有十四种含 O-连接的寡糖的血浆糖蛋白分布于若干脊椎动物。几乎在每一种情况, O-连接的寡糖链总是与在肽链的另一区域的 N-连接的寡糖链相伴存在。

参与血浆凝结或血纤维蛋白溶解作用的若干因子含有 O-连接的寡糖, 如因子 X, 高分子量激肽原, 血纤维蛋白溶酶原和 von willebrand 因子。血浆蛋白中典型的寡糖结构由双唾液酸基化四糖(表 19 结构 I)组成。有的寡糖在 N-乙酰半乳糖胺的 6-位羟基缺少唾液酸基(表 19 结构 II)。

表 19 血浆蛋白的 O-连接的寡糖

结 构	来 源
I. $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6 \left\{ \begin{array}{l} \text{GalNAc}\alpha 1-\text{O} \\ \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \end{array} \right.$	牛因子 X 牛大分子量激肽原 人血纤维蛋白溶酶原 人免疫球蛋白(Sm-lambda) 人绒毛膜促性腺激素, β -链 牛胎球蛋白 人脱脂蛋白 C-III
II. $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}$	牛因子 X 牛大分子量激肽原 人血纤维蛋白溶酶原 人免疫球蛋白(Sm-lambda) 人胆碱酯酶 牛胎球蛋白 人脱脂蛋白 C-III
III. $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}$	人 IgA ₁ 鱼抗冻精蛋白
IV. $\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}$	人 IgA ₁ 兔 IgG
V. $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}$	人胆碱酯酶

出处同表 15。

牛的大分子激肽原经蛋白酶分解后获得的激肽原片段 1, 保留了激肽原分子的全部寡糖, 只含有两种 O-连接的寡糖, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ (90%) 和 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GalNAc}$ (10%)。

血纤维蛋白溶酶原, 在天冬酰胺-288 含有典型的二条天线的 N-连接的寡糖结构, 和 O-连接的寡糖连接于苏氨酸-345。其 O-连接的寡糖结构见表 19 结构 I 和 II。

至今研究的免疫球蛋白都是糖蛋白, 但含 O-连接的寡糖的免疫球蛋白很少。IgG 重

表 20 典型的 O 糖苷型糖链结构

结构	来源
I. $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$	羊、牛和犊颌下腺粘蛋白, 人胆碱酯酶
II. $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$	抗冻糖蛋白, 人 IgA ₁ , T _A -3 细胞表糖蛋白
III. $\text{NeuAc}\alpha 2 \downarrow \downarrow 6$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$	牛 X 因子, 牛大分子量激肽原, 牛胎球蛋白, 人血纤维蛋白溶酶原, 人免疫球蛋白 (Sm-λ), 人脱脂蛋白 C-III, 人绒毛膜促性腺激素 β 链, 血型蛋白, 狗颌下腺粘蛋白, 大鼠脑糖蛋白
IV. $\text{Fuca}1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$	猪颌下腺粘蛋白, 大鼠小肠糖蛋白
V. $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \downarrow \downarrow 6$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$	人卵巢囊液血型物质
VI. $\text{Fuca}1 \downarrow \downarrow 2$ $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \downarrow \downarrow 6$ $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc-Ser}(\text{Thr})$ $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}\beta 1 \downarrow \downarrow 6$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \downarrow \downarrow 6$	

出处同表 10。

从人卵巢囊液纯化的血型物质中发现特大的粘蛋白型的糖链, Lloyd 和 Kabat 提出了它的结构(表 20VI)。

β -半乳糖和羟赖氨酸形成的 O-糖苷键, 首先由 Butler 和 Cunningham 确定, 它几乎完全局限于胶原中, 包括牛肾小球基底膜。与羟赖氨酸连接的半乳糖, 经常被葡萄糖置换, 形成 $\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}$ 二糖。阿拉伯糖和羟脯氨酸之间的连接, L-Ara-Hyp, 只在植物和藻类蛋白中存在。通常, L-阿拉伯糖被阿拉伯二糖或三糖取代, 存在这种单糖的最初证据是从研究一种富含羟脯氨酸的细胞壁糖蛋白, 即伸展蛋白获得的。以后在 STL 的碱水解产物, 和从檀香木叶纯化的糖蛋白中, 分离到相似的寡糖。在 STL 和从培养的菸叶细胞壁制备的羟脯氨酸三-和四-阿拉伯糖苷中, L-阿拉伯糖苷以 β -呋喃糖苷形式存在。菸叶细胞中糖肽的糖链结构已确定, 是 $\text{L-Araf}^*\beta 1 \rightarrow 2\text{L-Araf}\beta 1 \rightarrow 2\text{L-Araf}\beta 1-5\text{Hyp}$ 和 $\text{L-Araf}\beta 1 \rightarrow 3\text{L-Araf}\beta 1 \rightarrow 2\text{L-Araf}\beta 1 \rightarrow 2\text{L-Araf}\beta 1-5\text{Hyp}$ 。

表 21 甘露糖-丝氨酸/苏氨酸连接的寡糖的结构

结 构	来 源
$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man-Ser/Thr}$	啤酒酵母甘露聚糖
$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man-Ser/Thr}$	啤酒酵母甘露聚糖
$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man-Ser/Thr}$	
\uparrow $\beta 1 \rightarrow 2$ Xyl	
$\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man-Ser/Thr}$	
$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man-Ser/Thr}$	
$\text{GlcUA}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man-Thr}$	Clamworm 表皮蛋白多糖
$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Man-Ser/Thr}$	大鼠脑蛋白多糖
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Man-Ser/Thr}$	大鼠脑蛋白多糖
\uparrow $\alpha 1 \rightarrow 3$ L-Fuc	

出处同表 1。

表 22 不常见的 O-连接的寡糖

结 构	来 源
I. $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6$ $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3$ } $\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$	Swarm 大鼠软骨肉瘤蛋白多糖 腹水肝癌 AH66 细胞质膜
II. $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O}$	牛 chromagranins, 大鼠脑糖肽
III. $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 8\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3$ } $\text{GalNAc}\beta 1\text{-O}$	牛 chromagranins, 大鼠脑糖肽
IV. $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{NeuGly}\alpha 2 \rightarrow 3$ } $\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3$ } GalNAc-O	鱒鱼卵
V. $\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Fuc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$	大鼠肝糖肽, 人尿糖肽
VI. $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3$ } $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Man-O}$	大鼠脑蛋白多糖

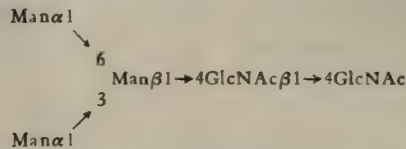
出处同表 16。

* Araf 指呋喃型阿拉伯糖。

除以上所列举的以外, O-糖苷型糖肽中还含有一些罕见的连接结构, 其中了解得比较清楚的是在酵母、真菌和 clamworm 表皮胶原中发现的 Man-Ser/Thr 连接的糖链(表 21)。大鼠腹水肝癌细胞膜含有 N-乙酰葡萄糖胺和 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}$ 的糖链结构(表 22, I)。TA3-Ha 小鼠乳腺癌的表糖癌蛋白(epiglycanin)的 O-连接的糖链中, 亦有在同一寡糖中存在这两种糖的结构。这些含有 N-乙酰葡萄糖胺的、小的酸性寡糖的存在、也许与恶变有关。从脑和肾上腺神经分泌颗粒(neurosecretory granule)分离的二糖, $\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1-\text{O}$ (表 22, II), 可能是神经组织专一的。酸性四糖(表 22, III)含有 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 8\text{Sia}$ 键。这个二糖通常被认为是神经节苷脂的典型的糖结构, 亦存在于猪颌下腺粘蛋白, 和在天冬酰胺连接的寡糖中出现。结构 IV 含有新的唾液酸键, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{GalNAc}$, 它能抵抗产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)和节杆菌属(*Arthrobacter*)的产脉节杆菌的神经氨酸苷酶的作用。

(二) N-糖苷键连接的糖链结构(天冬酰胺连接的糖链结构)

一般说来, 连接于天冬酰胺的寡糖, 都含有一个共同的五糖核心。



Dann 和 Spiro 根据对人血浆的 α_2 -巨球蛋白糖链的研究结果, 首先指出: 在 N-糖苷键型糖链的核心区, 有三个甘露糖和二 N-乙酰葡萄糖胺组成的核心结构。Tarentino 等在牛核糖核酸酶中发现 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ 顺序。Spinola 和 Jeanloz 用化学合成的化合物作比较研究, 证明了 $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn}$ 的结构。至于最里面的一个甘露糖, 是通过 β -键连接在 N-乙酰甲壳二糖($\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$)上, 这是由李玉德和李远川用高度纯化的 α -甘露糖苷酶、 β -甘露糖苷酶加以阐明的。1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6 分支点的存在, 主要是根据甲基化的研究获得的。Montreuil 根据当时了解的、为数不多的资料, 提出了在 N-糖苷键型糖链中, 都存在这一共同的五糖核心结构的假设。

以后在各种生物, 如酵母、高等植物、禽类(如鸡), 各种哺乳动物, 乃至人体内, 都发现了这个五糖核心结构。这一事实, 无论从生物合成和进化的观点来看, 无疑都是意味深长的。

在这一五糖核心上连接着一些其它附加的糖基, 导致形成三类不同的 N-糖苷键型的糖链: (1)高甘露糖型, 包含甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺二种单糖, 仅由甘露糖基组成的糖链连接在这一五糖核心上。甘露糖基的总数通常是 6 至 12 个, 而且通常是有分支的。这种糖链存在于动物、真菌的糖蛋白中, 也存在于高等植物的糖蛋白中。在酵母甘露聚糖中, 存在着更长更高度分支的寡甘露糖链(图 9)。利马豆凝集素(简称 PLA)和从菠萝茎分离的菠萝蛋白酶的寡糖结构中存在两种罕见的高甘露糖寡糖, 它们含有岩藻糖和木糖(图 10)。(2)复杂型或 N-乙酰乳糖型, 除甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺外, 还含有岩藻糖、半乳糖、唾液酸。半乳糖基上连接或未连接唾液酸的 N-乙酰乳糖胺($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$), 连接在核心结构上。N-乙酰乳糖胺的数目通常是 2 个或 3 个, 有时高达 4 个。相应的糖

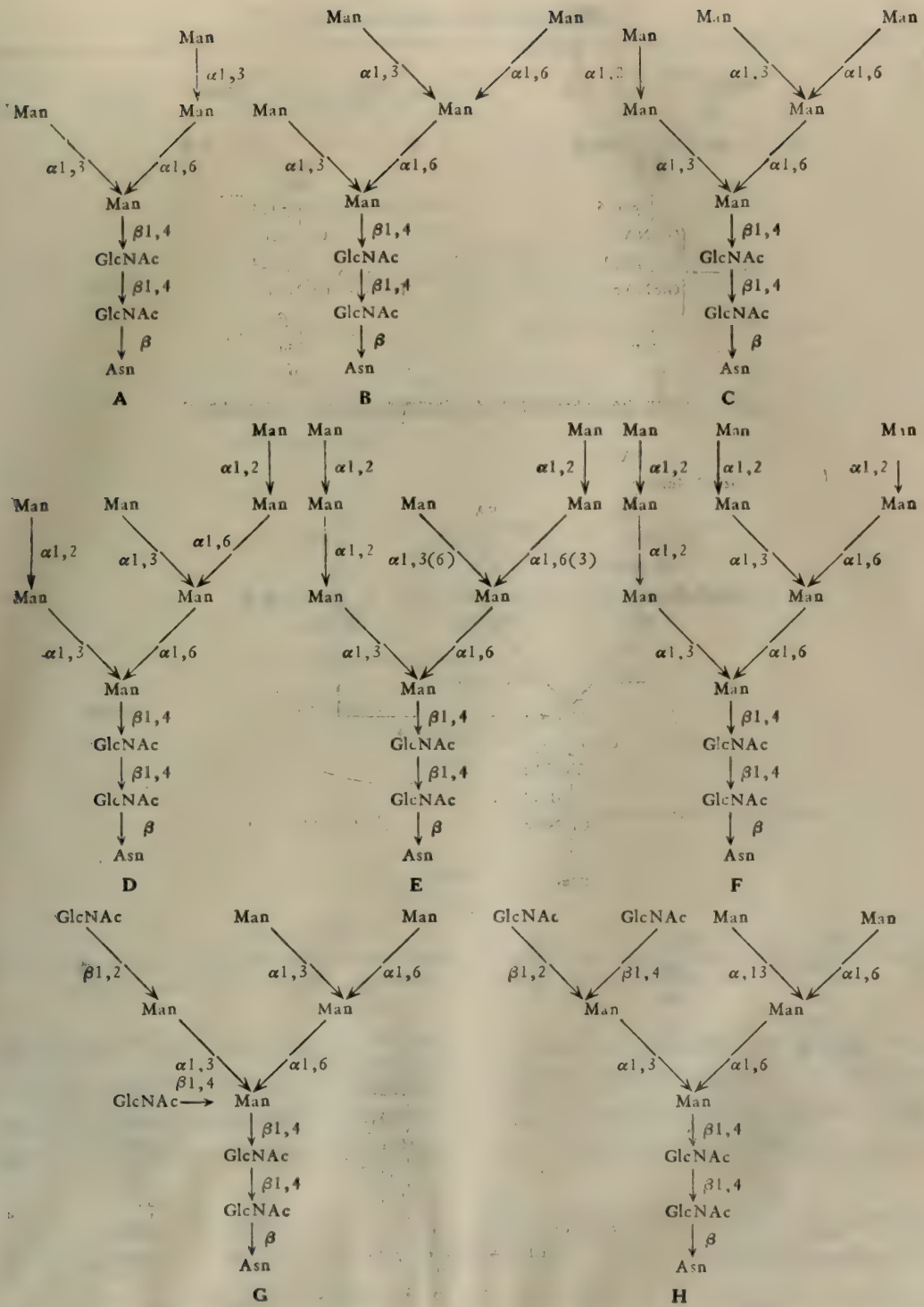


图9 高甘露糖型糖肽结构。A, B, C, D, G 和H 为卵白蛋白的糖肽；B, C, E 和F 从中国地鼠卵细胞膜获得的糖肽；F 亦是牛甲状腺球蛋白糖肽A。(摘自 Kornfeld, R. & Kornfeld, S., Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, 1980, Ed. Lennarz, W. L., Plenum Press, New York.)

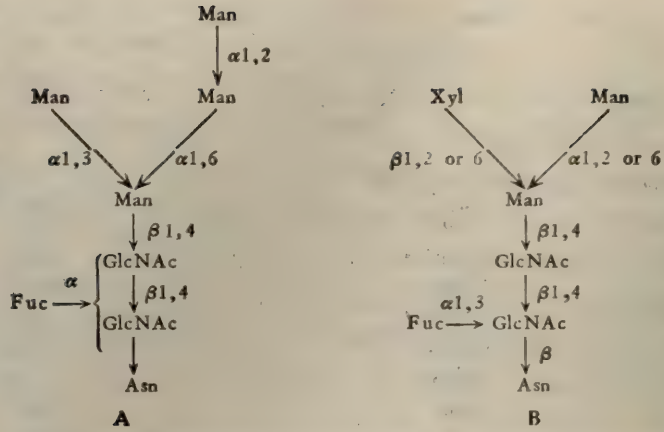


图 10 菠萝蛋白酶中的两种罕见的高甘露糖型寡糖结构。(出处同图 9)

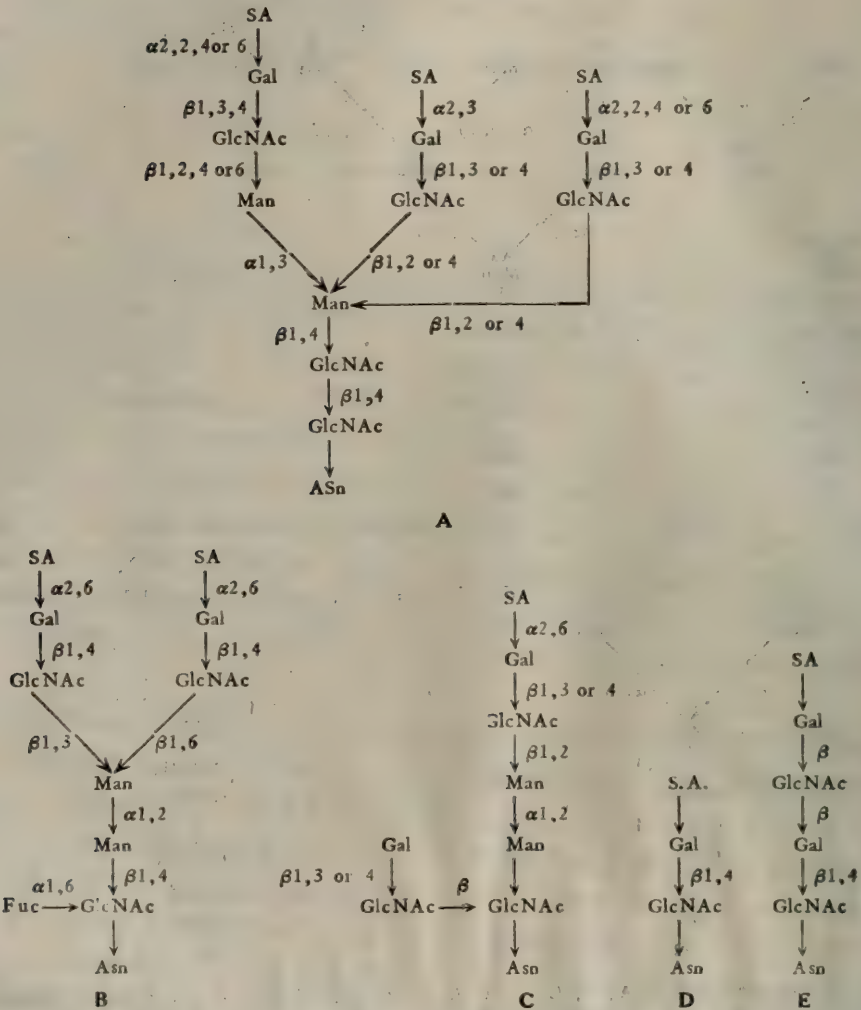
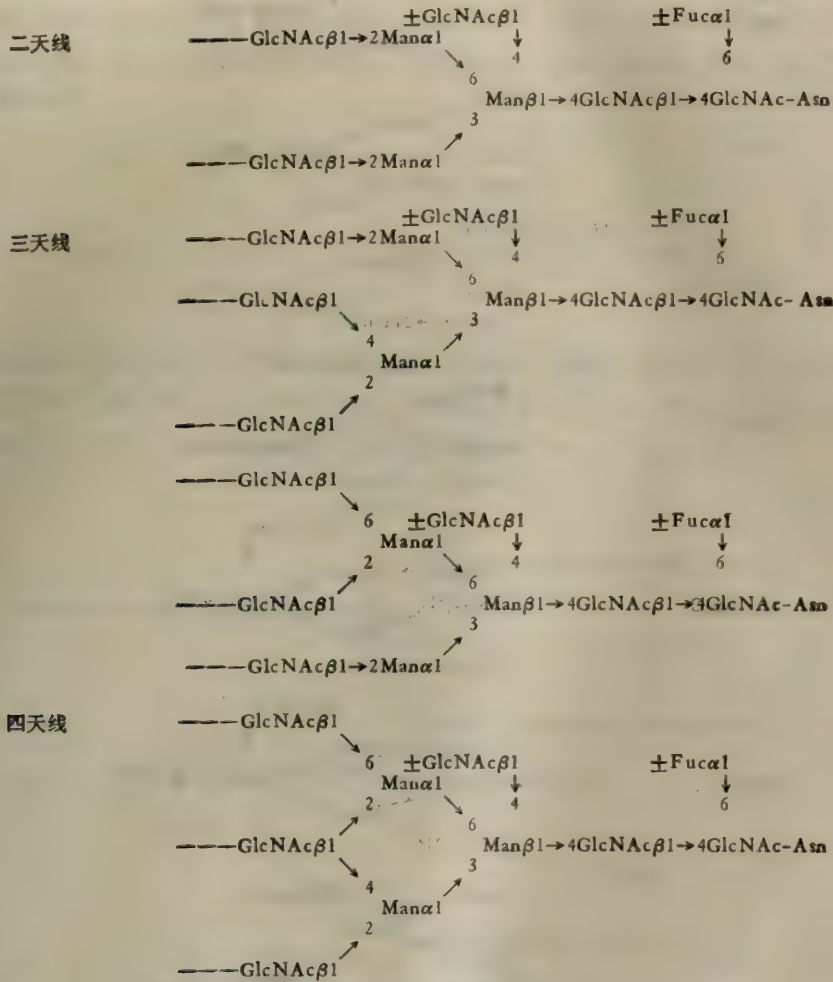


图 11 几种特殊的 N-连接寡糖的糖肽结构。A, 大鼠肝膜糖蛋白的糖肽 1; B, 人肺泡糖蛋白的糖肽; C, 人红细胞膜唾液酸糖蛋白的糖肽; D 和 E 从人尿中分离的糖肽。(出处同图 9)

表 23 具有不同数目外围链的复杂型糖链



GlcNAcβ1→代表 2 个 GlcNAcβ1→基,分别连接于 2Man 和 4Man (出处同表 10)。

链分别称为二天线 (biantennary), 三天线 (triantennary) 和四天线 (tetraantennary) (表 23)。某些糖肽具有不典型的复杂寡糖结构,如大鼠肝膜糖蛋白中的糖肽 I, 人肺泡糖蛋白和人红细胞膜唾液酸糖蛋白的糖肽等 (图 11)。(3) 杂交型或混合型(混合的高甘露糖型和 N-乙酰乳糖胺型),即有高甘露糖链,又有 N-乙酰乳糖胺的糖链连接在核心结构上。

Cunningham 等报道,鸡卵白蛋白结晶,经链霉蛋白酶充分消化,获得的天冬酰胺连接的寡糖混合物。在 Dowex 50 柱上分离为五个部分。对每一部分主要寡糖结构的研究,获得 8 个天冬酰胺连接的寡糖结构 (图 12)。GP III 的三个组分都是九糖。GP II 的两个组分都是十糖,虽然,它们的单糖组成不同。这些结果表明,用离子交换层析要得到纯的天冬酰胺连接的寡糖是困难的。图 12 所列的 8 个天冬酰胺连接的寡糖结构,表明鸡卵白蛋白的糖链有两种结构上不同的系列。GP-III B、GP-IV 和 GP-V 是高甘露糖型

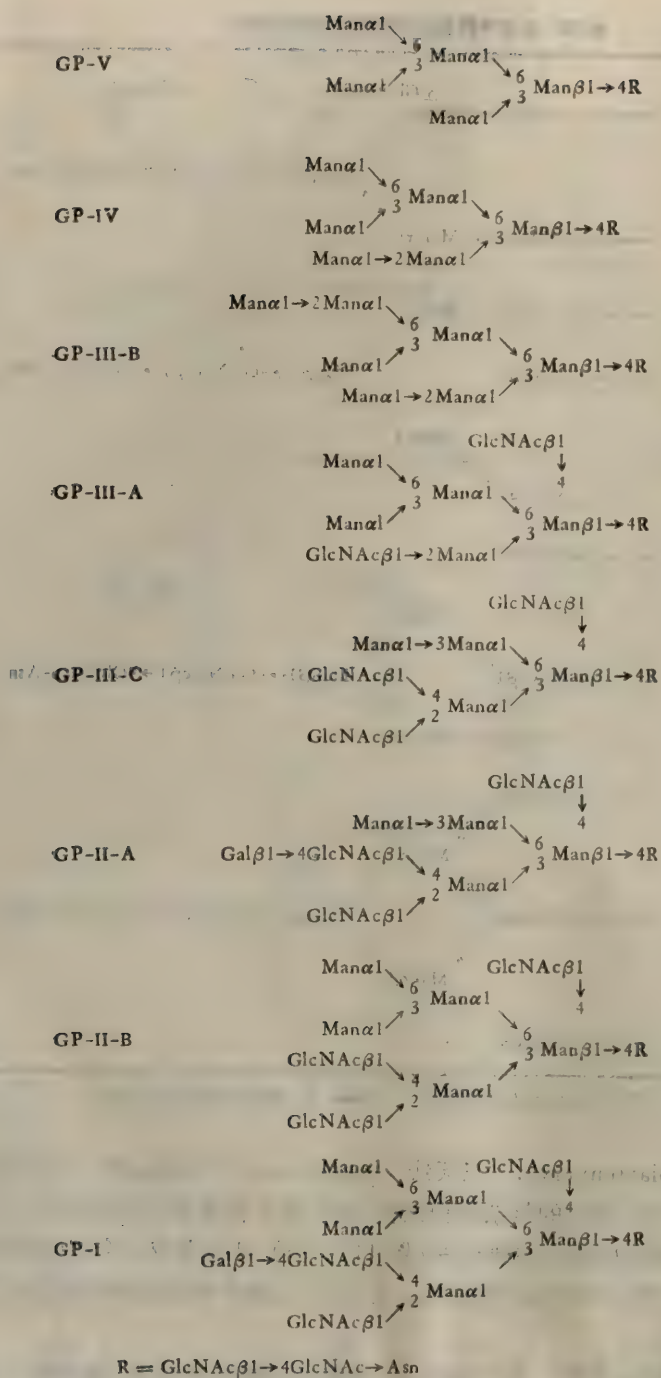
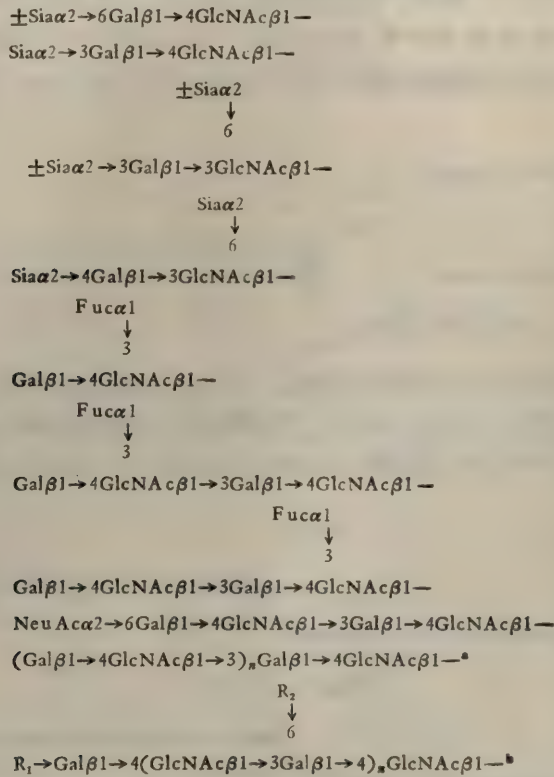


图 12 卵白蛋白中的天冬酰胺连接的糖链结构。(出处同表 10)

的一般结构 $(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow)_n \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$ 。而 GP-I, GP-IIA, GP-IIB, GP-IIIA 和 GP-IIIC 是杂交型,因为它们有高甘露糖型和复杂型共有的核心结构;以及如高甘露糖型那样,在核心的一个 α -甘露糖基上连接一个或二个 α -甘露糖;又在核心的

表 24 复杂型 N-连接的糖链的外围链结构



- a. 这些糖链的结构仍未确定。
 b. $R_1 = \text{H}$, $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2$, $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 3$ 或 6 。
 $R_2 = R_1 \rightarrow (\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3)_n \beta 1 -$ 。
 出处同表 10。

的不寻常的天冬酰胺连接的糖链。卵粘蛋白是鸡蛋白中主要的糖蛋白之一，卵粘蛋白的糖占整个分子的 25—30%，而且都是天冬酰胺连接的糖链。然而，卵粘蛋白的糖链绝大部分抵抗内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶的消化。因此，只能用胼解法研究它们的结构。鸡卵粘蛋白的全部天冬酰胺连接的寡糖都含有三甘露糖基的五糖 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}$ 为它们共有的核心。下列六种不同的 β -N-乙酰葡萄糖胺基直接连接到共有的三甘露糖核心。

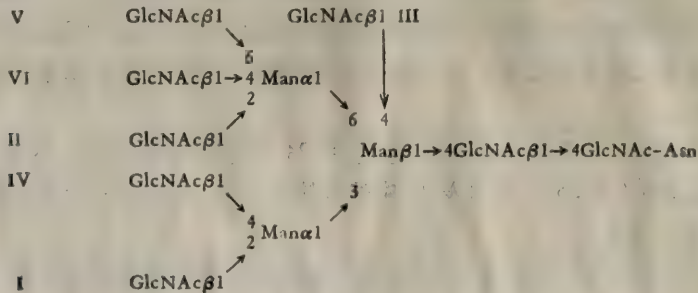


表 25 N 糖苷键连接的寡糖结构

$ \begin{array}{c} R_4 \\ \downarrow \\ R_3 \text{---} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta \text{---} A_{no} \\ \uparrow \\ R_2 \\ \downarrow \\ R_1 \text{---} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{---} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{---} \end{array} $		R ₃	R ₄	来 源
高甘露糖型	$ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ [\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2, 6, 1 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6} \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3} \end{array} $	$ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \\ [\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2]_{0,1} \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \end{array} $	$ \begin{array}{l} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} $	<p>淀粉酶</p> <p>Sindbis 病毒</p> <p>牛甲状腺球蛋白</p> <p>人 IgM</p> <p>大豆凝集素</p> <p>酵母甘露聚糖 (核心结构)</p> <p>人和兔血清转铁蛋白 人α_2-蛋白酶抑制剂 甲状腺素结合的球蛋白 人血纤维蛋白溶酶原 大鼠肝膜糖蛋白</p>
复杂 (N-乙酰乳糖胺) 型	$ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3} \end{array} $	$ \begin{array}{l} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{NeuNAc}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \end{array} $	$ \begin{array}{l} \text{---} \\ \text{---} \end{array} $	

$ \begin{array}{c} R_4 \\ \downarrow \\ R_1 - \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \swarrow \searrow \\ \text{Man}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta - \text{Asn} \\ \swarrow \searrow \\ R_3 \\ \downarrow \\ R_2 - \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array} $							来源
R_1	R_2	R_3	R_4				
$\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$ — —	$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$ — —	人 IgG 人 IgA ₁ 鸡卵转铁蛋白		
$[\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6]_{6,1} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 6$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Cnl}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 6 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{NeuNA}\alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$ — — — $[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6]_{6,1}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$	$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$ — — — $[\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6]_{6,1}$ $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 6$	猪甲状腺球蛋白 水泡性口炎病毒 胎儿蛋白 马核糖核酸酶 人绒毛膜促性腺激素 纤维粘连蛋白 ^a		
$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$ $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6$ $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \text{ or } \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{ or } \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3$	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	$\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$ $\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2$	— — —	— — —	卵粘蛋白 牛视紫红质		

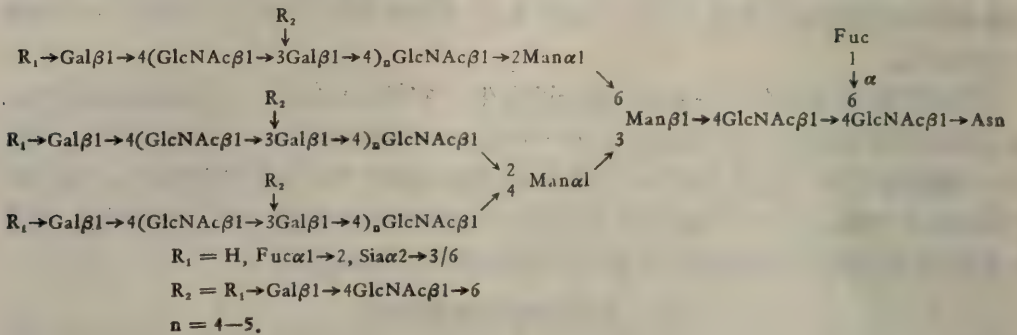
杂交型

^a 猪半乳糖蛋白 a。(出处同表 1)。

藻糖代谢异常的患者尿中分离到的天冬酰胺连接的寡糖，含有 L-Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 顺序。

在天冬酰胺连接的糖链中，还发现非糖的取代基。在短克勒克酵母 (*Kloeckera brevis*) 的甘露聚糖和 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶中，甘露糖的 C-6 位上存在磷酸根。在面包酵母 X180 的甘露聚糖中，磷酸根与一个甘露糖的 C-1 和另一个甘露糖的 C-6 形成磷酸二酯桥。在溶酶体酶 (都是糖苷酶) 中，发现甘露糖基的 C-6 磷酸化。从各种动物和病毒分离到硫酸化的糖蛋白，并证明其中某些在 N-糖苷位置取代，如副粘液病毒 (*paramyxovirus*) SV5 的糖蛋白中硫酸基替代 N-乙酰己糖胺中的乙酰基。

一类新的 N-连接的寡糖链从链霉菌蛋白酶水解的人红细胞膜中分离。这些糖肽含有 20—70 个糖基，由以 β 1 \rightarrow 3 键与 C-6 位有支点的半乳糖基连接的 N-乙酰乳糖胺重复单位组成。糖链终止在 N-乙酰葡萄糖胺基、半乳糖基、Sia α 2 \rightarrow 3 (和 6) Gal- α -岩藻糖基。人红细胞膜第 3 带的寡糖链结构



即属于这一类。

(三) 糖蛋白糖链的微观不均一性

即使是经过高度纯化的糖蛋白，仍往往显示出不均一性。另外，即使作为糖蛋白看来是均一的，但仔细研究它的糖链则可发现不均一的情况。

糖蛋白中的糖链是通过糖基转移酶，从核苷酸糖将单糖顺次加至已形成的糖链受体上形成的。因此，最终生成的糖链结构，决定于每个核苷酸糖的糖基转移酶的专一性，和独有的糖接受体，以及形成独有的异头键的能力。糖蛋白糖链的生物合成机制，可合理地解释糖蛋白的糖链中广泛出现的微观不均一性。

根据对内切型糖苷酶专一性的研究结果，发现卵白蛋白的几种不同长短、结构的糖链，能够严格地被识别。H酶分解五种组分(图 12)为寡糖和 GlcNAc β 1-Asn，D酶只作用于 GP-V，C₁₁酶完全水解 GP-IV 和 GP-V，和 GP-III 的一部分，但完全不能水解 GP-I 和 GP-II。C₁₁酶水解 GP-III 的一部分，证明 GP-III 不是纯的成分，而是天冬酰胺连接的寡糖的混合物。看来这种不均一性不是偶然的产物。这一点从血型决定簇的研究结果也得到证实。

在人血液中发现的 14 种血型中，ABO(H) 和 Lewis 血型是密切相关的，因为它们的抗原决定簇是由共同的前身糖链形成的。A、B 和 H 三种抗原包括在 ABO(H) 血型中，以及 Le^a 和 Le^b 在 Lewis 血型中，形成这五种抗原的生物合成途径见图 14 和图 15。

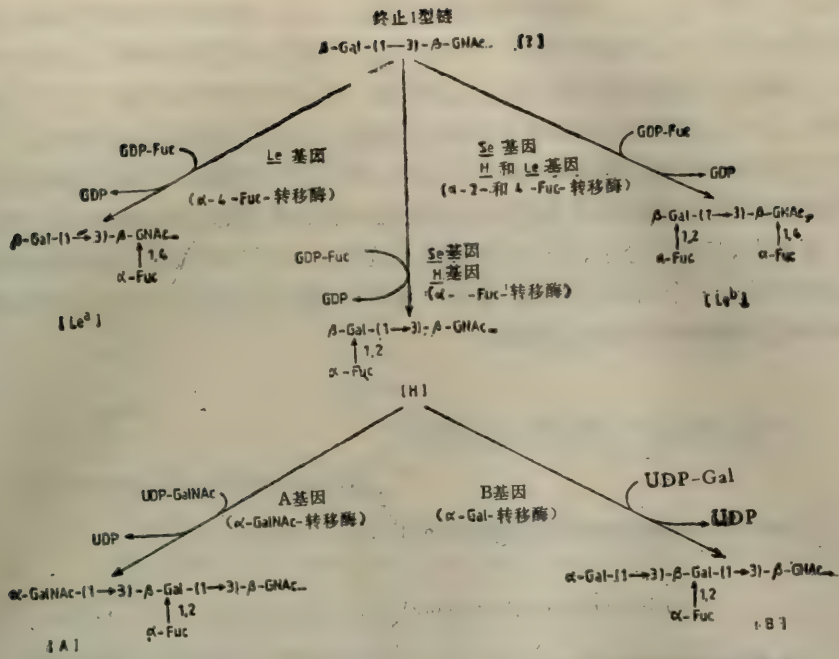


图 14 前身糖蛋白中终止 1 型链转化为 Le^a, Le^b, H, A 和 B 活性结构的生化途径。

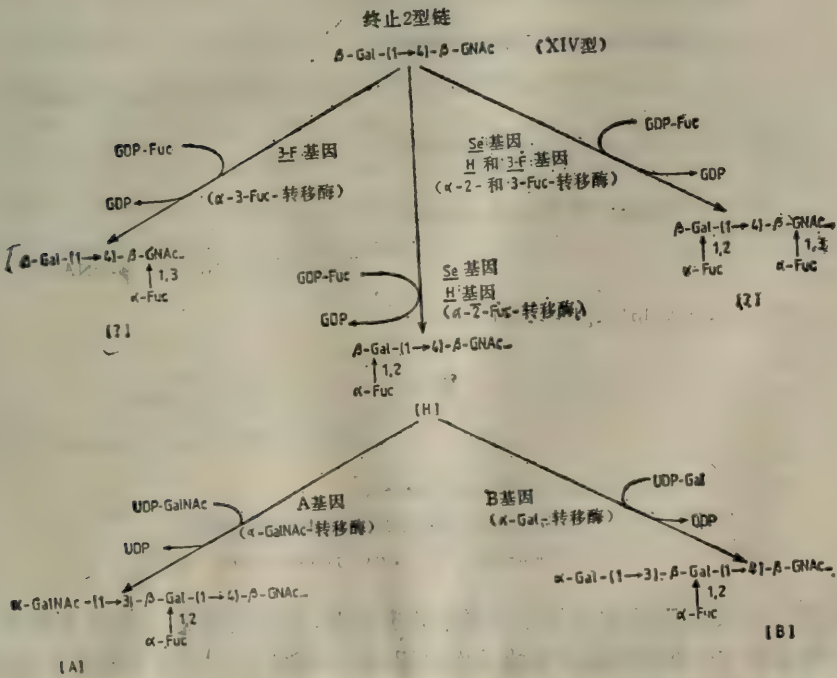


图 15 前身糖蛋白中终止 2 型链转化为 Le^a, Le^b, H, A 和 B 活性结构的生化途径。

由于H抗原是A、B和Le^b抗原的共同前身,每种抗原产生的量,依照组织中A、B和Le^e酶活力的相对比例而变化。这种情况的最好的说明是血型A的亚型现象。A型可分为两个主要的亚型, A₁和A₂。用专一的抗体进行研究,表明A₂亚型的红细胞有H抗原,而A₁

亚型通常没有这种抗原。这种现象的酶学背景是：从 A₁ 亚型血清纯化的 A 酶，对血型 H 决定簇的 K_m 值比从 A₂ 亚型血清纯化的酶要低。因此 A₂ 亚型保存了大部分 H 决定簇，未派生为 A 决定簇，更有可能转化成 Le^b 决定簇。糖基转移酶的相对活力水平，某些核苷酸糖的短缺，以及许多其它因素，理论上能导致糖蛋白的总的寡糖模式的变化。

虽然天冬酰胺连接的寡糖核心部分的形成，受着脂质中间体对寡糖的转移所控制，高甘露糖型糖链的装配过程，和复杂型以及杂交型糖链的侧链的延长步骤，均可产生不完全的糖链。事实上，在一个分子，即一条肽链上只连接一条天冬酰胺连接的糖链的鸡卵白蛋白，甚至即使是从一个鸡蛋制备的，仍属一系列生物合成的中间体与完全的糖链的混合物。牛胰核糖核酸酶的糖链也是如此。

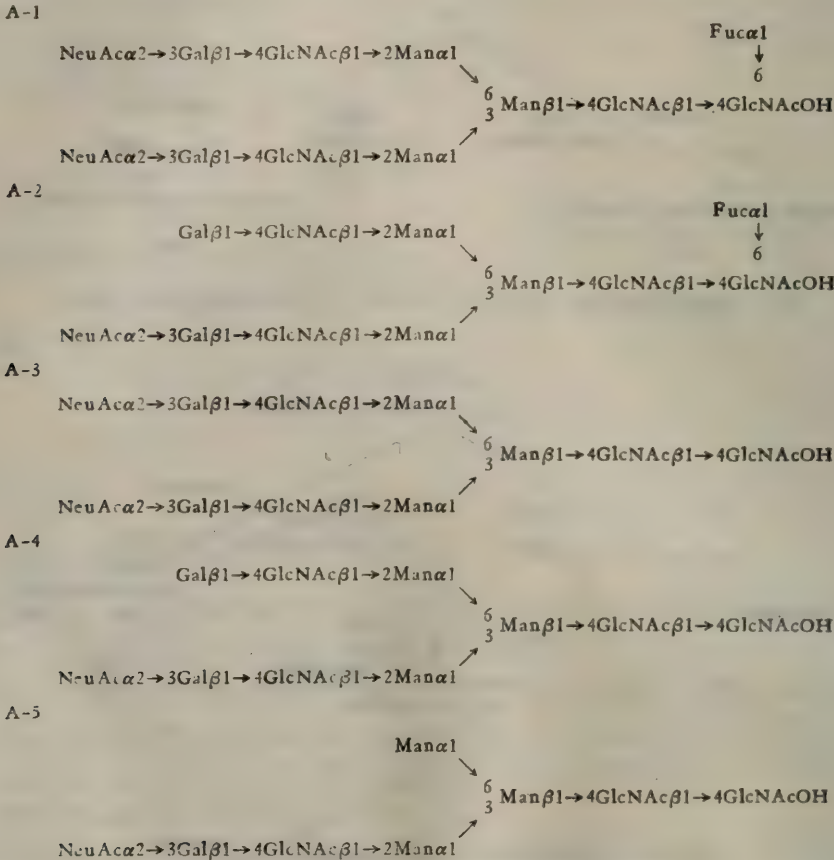


图 16 人绒毛膜促性腺激素的天冬酰胺连接的糖链。

(摘自 Harpaz, N. & Schachter, H., 1980, *J. Biol. Chem.* 255, 4894)

然而，对人 HCG 和血凝因子糖链的研究表明，在某些情况(可能在多数情况)对糖链明显的微观不均一性现象必须谨慎地作出解释。HCG 由二硫键连接的 α 和 β 两条肽链所组成，它含有一系列的酸性、复杂型天冬酰胺连接的糖链(图 16)。在结构上，A₂-A₁，可认为是 A₁ 糖链的一系列不完全合成的产物。然而，比较 α 链和 β 链的糖链模式，它们不是简单的不完全合成的产物，图 16 中所示五种酸性糖链，每一种糖链含图 17 所示的三条中性糖链中的一条。当 α 链和 β 链经胍解释放的寡糖，用唾液酸酶消化除去唾液酸后，

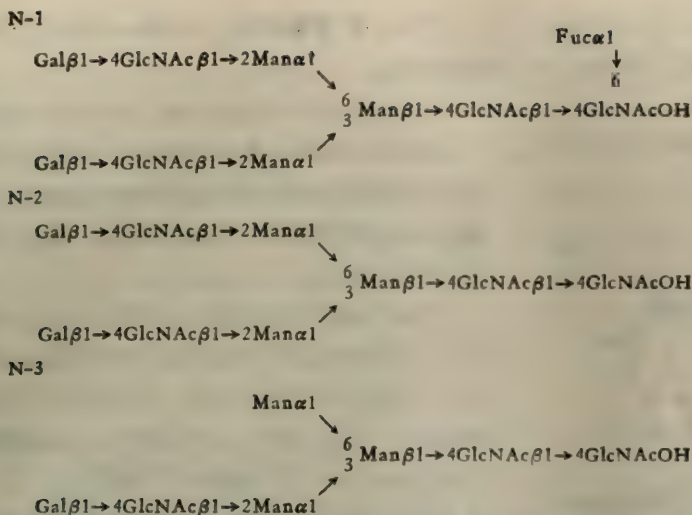


图 17 人绒毛膜促性腺激素的天冬酰胺连接的糖链经唾液酸酶消化获得的中性寡糖的结构。
(摘自 Elbein, A.D. et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 7393)

得到的中性糖在 Bio-GelP4 柱进行分析, α 链含有一分子的 N-2 和 N-3 (图 17), β 链含有一分子的 N-1 和 N-2 (图 17)。因为二条链都含有二种天冬酰胺连接的寡糖, 这一结果有力地表明糖链结构不同是依照它们位于 HCG 的两条肽链的。所以, 从孕妇尿和胎盘纯化的几批 HCG 释放的寡糖, 经唾液酸酶处理后有完全相同的寡糖模式。

在人乳铁蛋白中也观察到相似的去唾液酸寡糖模式的不变性。

血凝因子 II 和 IX 都是只含天冬酰胺连接的糖链的糖蛋白, 因子 II 含有糖链 A、B 和 C (图 18), 因子 IX 含有所有五条糖链 (图 18, A—E), 分析它们的氨基酸顺序揭示因子 II 和 IX 分别具有三条和四条天冬酰胺连接的糖链。比较从因子 II 和 IX 获得的, 只含一条天冬酰胺连接的糖链的糖肽片段的寡糖模式, 揭示糖链 C 只与因子 II 的 Asn-376 和因子 IX 的 Asn-261 连接。三天线的糖链 (图 18, D 和 E) 不与因子 IX 的 Asn-261 连接。

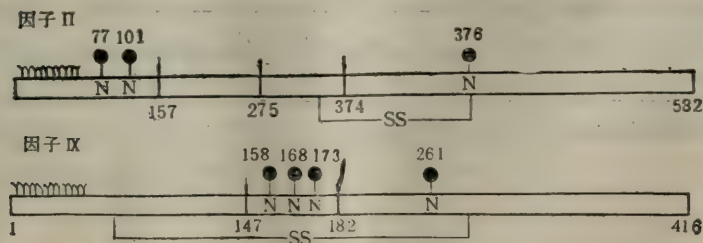


图 18 牛血液凝因子 II 和因子 IX 及其糖链结构黑点代表天冬酰胺连接的糖链, Y 表示 γ -羧基谷氨酸。 (摘自 Mizuochi, T. et al., in *Glycoconjugates. Vol. 6*, Eds. Yamakawa, T. et al., 1981, p.267, Japan Scientific Society Press, Tokyo)

三、糖蛋白的全结构

糖蛋白分子中的糖链, 在数目和类型上都有很大的出入。一个极端的例子, 如卵白蛋白

白和核糖核酸酶 B, 每个分子上只含一个单一的寡糖单位。而另一个极端, 如绵羊颌下腺粘蛋白, 每一个分子大约含 205 个双糖单位。

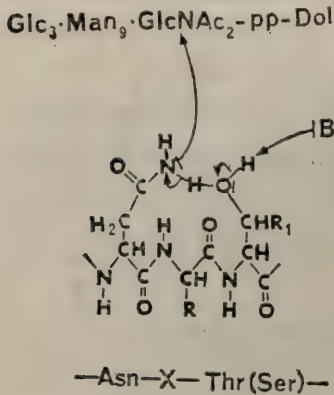


图 19 多肽链中天冬酰胺连接的糖链的形成所必需的三肽顺序。

天冬酰胺连接的糖蛋白, 大多是球状蛋白质。与一般蛋白质的氨基酸组成相比, 没有明显的特征。粘蛋白型糖蛋白的氨基酸组成中除丝氨酸、苏氨酸外, 脯氨酸、甘氨酸等的含量也相当高。糖链相当密集地结合在多肽链上。

Marshall 等首先提出, 糖基化的天冬酰胺基总是在 Asn-X-Ser/Thr 顺序中(称为“Sequon”), X 是蛋白质中通常存在的氨基酸, 可能的例外是天冬氨酸和脯氨酸。然而, 间接的证据说明, 在马胰核糖核酸酶中发现 Asn-Pro-Thr 顺序部分糖基化。在 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 顺序中, 天冬酰胺侧链的羰基和丝(苏)氨酸的羟基之间形成氢键, 这样形成了一个包含 13 个原子的、环状的活性构象(图 19), 这和多肽中 α -螺旋

一圈中的原子数相同。

这一氢键的形成, 使天冬酰胺基上的酰胺基的酸解离常数降低, 从而使此酰胺基中的一个氢原子容易为糖取代。

Asn-X-Ser/Thr 顺序的存在, 对糖基化而言, 是必需的条件, 但可能是不足的。糖蛋白中也发现 Asn-X-Ser/Thr 顺序中没有糖基化的天冬酰胺基。例如, 在不同种属的胰核糖核酸酶中存在的糖链, 总是连接于 21、34、62、76 位的天冬酰胺基(表 27)。这些部位是高变化顺序部分, 但它们总是存在于分子的暴露区, 远离酶的活性部位。如同在已探讨过的绝大多数其它糖蛋白那样, 糖链优先连接于肽链的 β -转角处。这一点已为 X-射线研究人体免疫球蛋白 IgG 晶体(图 20)(是测定三维结构的第一个糖蛋白)所证

表 27 核糖核酸酶中不连接糖的 Asn-X-Ser/Thr 顺序

种 属	位 置																	
	21	22	23	34	35	35	62	63	64	76	77	78	94	95	96	98	99	100
马	* -Asn-Pro-Thr-																	
牛、绵羊、山羊、 topi, 雌鹿				* -Asn-Leu-Thr-														
豚鼠(A)							* -Asn-Val-Ser-											
麝鼠							* -Asn-Val-Thr-											
鲸										* -Asn-Ser-Thr-								
栗鼠、河鼠、豚鼠													-Asn-Cys-Ser-					
大鼠													-Asn-Cys-Thr-			-Asn-Thr-Thr-		

* 部分肽链糖基化。

(摘自 Beintema et al., 1976, *Eur. J. Biochem.*, 63, 441-448.)

实。

糖基化的天冬酰胺基有共同的顺序,导致人们寻找 O-糖苷键附近是否也存在共同的氨基酸顺序。只有 Gal-Hyl 这种 O-糖苷键, Hyl 在 Gly-X-Hyl-Gly 顺序中, X 可以是丙氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸和脯氨酸等各种氨基酸中的一种。

在有一条以上天冬酰胺连接的糖链的糖蛋白中,两条糖链之间必须相隔几个氨基酸。相反, O-糖苷键的糖链可连接在相邻的两个氨基酸上(图 21)。因此,在血型糖蛋白中, 2—4 和 10—15 都是与糖基连接的羟基氨基酸。另外, O-糖基化的 Thr-25 与 N-糖基化的 Asn-26 相邻。人的绒毛膜促性腺激素 (HCG) 中,所有与丝氨酸连接的 4 个糖基,都连接于 HCG 的 β -亚基中 17 个氨基酸组成的片段内。



图 20 人免疫球蛋白的空间充实图象。大的黑色球形表示复杂糖的单个己糖单位。
(摘自 Silverton, E. W. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74, 5140)

最高密度的丝氨酸(苏氨酸)连接的糖链发现在抗冻糖蛋白中。这个糖蛋白的肽链,由丙-丙-苏 (Ala-Ala-Thr) 重复顺序组成,所有的苏氨酸基被 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 双糖糖基化。在绵羊颌下腺粘蛋白中也存在高密度的丝氨酸或苏氨酸连接的糖链,在这个蛋白质中,三分之一的氨基酸是丝氨酸和苏氨酸,每个丝氨酸基和苏氨酸基都与 Sia α 2 \rightarrow 6GalNAc 二糖连接。在绵羊颌下腺粘蛋白中, O-糖基化的丝氨酸和苏氨酸, 3 至 9 个氨基酸基形成簇,其中至少每隔一个残基是丝氨酸或苏氨酸,这样一簇一簇的丝氨酸和苏氨酸被 4 至 7 个含非羟基氨基酸的片段所隔开。

四、立体构象

(一) 糖蛋白分子中寡糖的三维结构

任何一个寡糖的三维结构由每一个糖苷键的键角、键长和扭转角的值所确定。键角和键长可从二糖或三糖的晶体结构获得,扭转角 ϕ 和 ψ 常规确定如图 22 所示,另一个扭转角 ω 必定是指 1 \rightarrow 6 连接键。 ϕ 和 ψ 值用核增强效应(nuclear overhauser effect, NOE)确定残基间的氢原子距离,和测弛缓时间 (relaxation-time) 长短获得。以空间充实立体

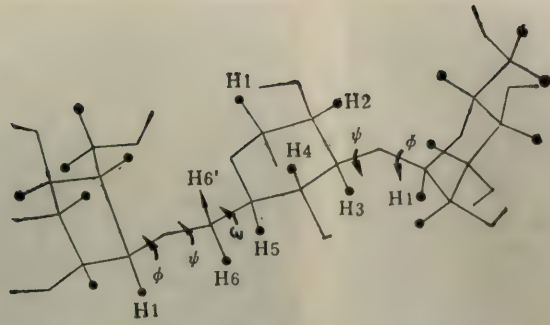
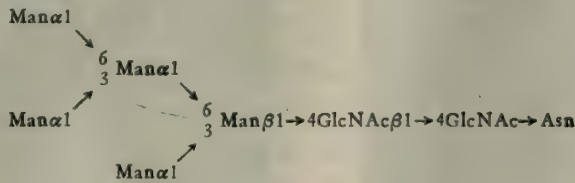


图 22 三甘露糖苷 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}\beta$ 所示扭转角 ϕ , ψ 和 ω 。
 (摘自 Carver, J.P. & Bryson, J.-R., The three-dimensional structure of N-linked Oligosaccharides, in Biology of Carbohydrates Vol. 2, 1984, Eds. Ginsburg V. & Robbins, P.W., John Wiley New York)

模式表示的 N-连接的寡糖的三维结构的绘制, 首先用结晶结构计算出每一个己糖的组成原子的坐标 (coordinates), 然后用实验测得的 ϕ , ψ 和 ω 值连接糖基, 最后, 从这些坐标在计算机上产生空间充实的三维结构图象。

根据这种计算获得的高甘露糖型、复杂型和杂交型的空间充实的三维结构图象中 Asn 总在右下角, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\beta 1$ -臂在左上角, $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta 1$ -臂在右上边或右下边。高甘露糖型寡糖



的空间充实的三维结构图象见图 23。复杂型二天线糖肽

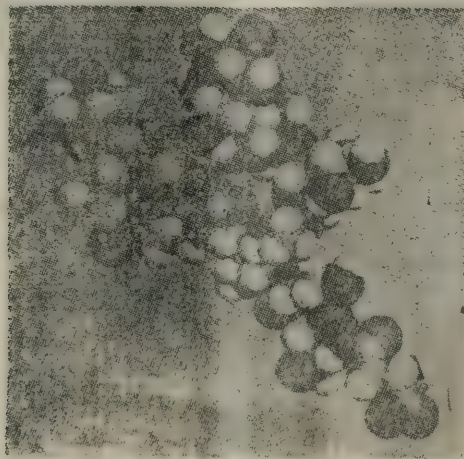


图 23 高甘露糖糖肽空间充实的三维结构图象。
 黑色球表示氮原子, 灰色表示氧原子, 白色表示氢原子。Asn 经常在右下角;
 $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Man}\beta 1$ -臂在左上角; $\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\beta 1$ -臂在右边, 上或下。
 (出处同图 22)

可能提供了一种穿过脂质双层的通信方式,或者是为了溶液和水的运送,或者为响应外界刺激,如激素、抗体或其它细胞,传递信号。

研究得最充分的膜糖蛋白是血型糖蛋白,已从人、马和猪的红细胞纯化并鉴定。人红细胞血型糖蛋白(A、B和C)由至少三组分开的基因翻译,是红细胞的主要糖蛋白,占总蛋白的2—4%,由于它的高唾液酸含量,红细胞所带负电荷的80%来自血型糖蛋白。主要的一种,血型糖蛋白A是多型性的。最普通的变种为A^M和A^N,均已纯化鉴定。血型糖蛋白A的分子量为31000,含60%的糖和40%的蛋白质。是由131个氨基酸组成的一条肽链,分成三个不同的域(图27)。

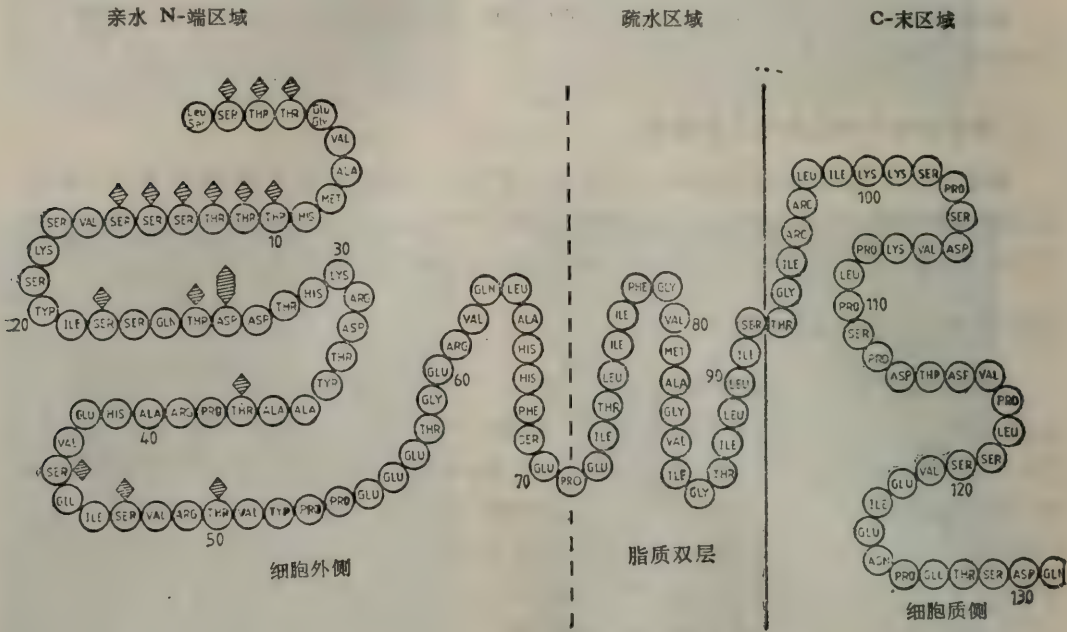


图27 血型糖蛋白A肽链的氨基酸顺序和肽链上寡糖的位置。
菱形表示O-连接的寡糖；六角形表示N-连接的寡糖。

在体内,血型糖蛋白A跨过红细胞膜。第一个域由高亲水的70个氨基酸组成的N-末端区,位于细胞膜的外侧。氨基末端区含有15条通过O-糖苷键连接于丝氨酸或苏氨酸的糖链,它们的大多数丛集在最邻近N-末端的15个氨基酸。还有一条位于Asn 26的由N-糖苷键连接的复杂型寡糖。

分子的第二个域,包括从71至92位氨基酸,穿过脂质双层,非极性氨基酸高度密集于这一肽段。81位的甲硫氨酸在血型糖蛋白的单体和二聚体之间的平衡,起主要作用。

血型糖蛋白的第三个域,由30个亲水氨基酸组成,在肽链的C-端,位于细胞膜面对细胞质的一边。用糖专一试剂,如凝集素、过碘酸和唾液酸酶,半乳糖氧化酶对完整细胞的研究,证明血型糖蛋白的糖都位于细胞的外表面(图28)。免疫细胞化学技术的应用为血型糖蛋白的穿膜定位提供了结论性证据。

血型糖蛋白A^M和A^N的肽链的氨基酸顺序中,第1位和第5位氨基酸不同,决定MN活力的关键残基是氨基末端的丝氨酸或亮氨酸(表28),所示小肽保留了M或N的全

B29 位的多型性氨基酸有关,当存在 S 基因时,甲硫氨酸占有 29 位,而 s 基因存在时,这个位置上是丝氨酸。血型糖蛋白 B 与 A^N 肽链在 N-端的前 26 个氨基酸顺序相同,但血型糖蛋白 B26 位的 Asn 未糖基化。糖成分分析揭示不含甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺,提示血型糖蛋白 B 不具有 N-糖苷键型寡糖,只含有 O-糖苷键型寡糖。

另一个研究得活跃的人红细胞膜糖蛋白是第 3 带(或称 3 号肽)。表观分子量为 90000,占红细胞总蛋白的 25—30%。以重量计,第 3 带糖蛋白大约含 5—8% 的糖。由甘露糖、半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成,它们的比例关系是 1:2:2。另外常有痕迹量的 L-岩藻糖和葡萄糖。最近的研究表明,第 3 带糖蛋白的糖链通过 N-糖苷键与肽链的天冬酰胺连接。

这一糖蛋白由三个不同的分子域组成,包括大约分子量为 35000 的膜外的 C-端片段,大约 17000 的膜内片段,和大约 40000 的细胞内的 N-端片段。根据对各种红细胞膜制剂,采用不同酶的消化和同位素技术的实验结果,提示第 3 带糖蛋白穿膜二或三次,并显示与其它膜蛋白相反的穿膜方位(图 28)。

除人红细胞外,关于细胞表面膜糖蛋白的结构和构造(organization)知道得很少。人的 HLA 抗原是用血清学方法可检测的、主要的细胞表面抗原,是分子量为 44000 的糖蛋白,与外源性多肽(β -微球蛋白)紧密地联结,但不是共价结合。每一个 HLA 分子有一个 N-糖苷键的寡糖单位(分子量约为 3000),位于距 N-端 100 个残基处。由唾液酸、甘露糖、L-岩藻糖、半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺,以 2:3:1:4:4 的比例组成。木瓜蛋白酶消化从淋巴细胞膜分离的糖蛋白,并对完整糖蛋白和经酶消化后的降解产物作氨基酸分

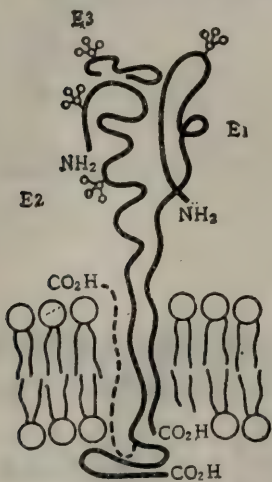


图 29 西门利启森林病毒膜糖蛋白拓扑图。(摘自 Garoff, H., 1979, *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 301)

析,和进行 N-端顺序测定,表明 HLA 是整合于膜的抗原。与血型糖蛋白相似,由亲水的 C 端和 N-端片段(相应分子量为 5000 和 34000)以及疏水片段(分子量大约为 5000)组成,N-末端伸展在细胞膜外侧。用放射性碘标记人的 B-淋巴瘤母细胞株 BRI8 完整细胞,和外翻空胞的质膜,并在膜溶解后,用免疫沉淀对标记产物进行分析,确定了以上的结果。

对病毒被膜的结构积累了一些证据,它具有其它生物膜的许多性质。研究得较多的是西门利启森林病毒(Semliki forest virus)。这一病毒是直径大约为 6.5nm 的球状病毒,它的膜上含有大约 240 个似穗状的糖蛋白突起。每一个穗的长度为 7—10nm,由三个糖蛋白组成: E₁(分子量为 49000)、E₂(分子量为 52000)和 E₃(分子量为 10000)组成。E₁和 E₃各含一条复杂型 N-糖苷键型寡糖链,而 E₂则含一条复杂型和一条(可能两条)寡甘露糖型的糖链。

蛋白水解酶处理森林病毒,分裂 E₁和 E₂,并从缺穗颗粒的被膜分离出 3 个残基片段。这些片段的氨基酸分析,表明它们含有高比例的非极性氨基酸。用蛋白质-蛋白质偶联剂,如二甲基辛二酰亚胺酯(dimethyl suberimidate),E₂的尾部片段与膜里面的病毒粒子蛋白偶联。这一结果和其它证据,表明 E₂,并且亦可能 E₁是穿膜糖蛋白(图 29)。

分在翻译过程中同时发生。而某些基团是翻译后加工装上的,所以糖基化可看作是蛋白质的许多修饰和加工的一个方面。天冬酰胺连接的糖链的生物合成机制与O-糖苷糖链不同。虽然,在这两类糖链的生物合成中,主要糖基的供体都是核苷酸糖,参与的酶都是糖基转移酶。

从葡萄糖和其它可代谢的单糖形成核苷酸糖的途径见图30。然而,糖蛋白的某些糖组成,如L-艾杜糖醛酸和N-乙酰神经氨酸衍生物的合成反应,与图30所显示的不同。这些反应不包含单体和活化单体,而是多聚体的修饰反应。

糖基转移酶非常准确地、从它们的活化供体底物(核苷酸糖或聚戊烯磷酸糖),将单糖,每次一个,转移到合适的接受体分子。糖基转移酶根据转移的糖分类、命名,例如唾液酸转移酶、葡萄糖基转移酶、半乳糖基转移酶等等。某些糖基转移酶,既作用于低分子量接受体,亦作用于高分子量接受体,而有些糖基转移酶更容易作用于高分子量的接受体。

糖基转移酶似乎牢固地连接于细胞的某些膜的区域,特别是内质网膜和高尔基体。寡糖链的延长由糖基转移酶顺次作用进行,一个酶的产物作为下一个酶的底物。糖基转移酶的专一性,决定寡糖链的一级结构。在这种合成方式中,寡糖顺序间接地受糖基转移酶的性质控制。糖基转移酶本身则是基因的一级产物。控制糖蛋白合成的其它因素,包括供体、接受体的有效性,以及阳离子(即 Mn^{++})等。都不是由模板控制的。因此,不能像基因信息的翻译,如肽链合成时发生的那样,严密地调控。

一、N-糖苷键型寡糖的生物合成

糖蛋白的N-糖苷键型(即天冬酰胺连接的)寡糖是以核苷酸糖为糖供体,分两个不同的阶段装配成的。第一阶段,在载体脂质上一个、一个地加上糖基,装配成寡糖-脂质中间体。然后,全部转移到新生的多肽上。这一过程在内质网(ER)中发生,寡糖-脂质中间体和合成酶均紧密地结合在内质网膜上。寡糖-脂质中间体由具有 $Glc_3Man_5GlcNAc_2$ 成分的寡糖,通过焦磷酸基,连接到聚异戊二烯醇(多萜醇)上组成(图31)。天冬酰胺连接的寡糖,这一部分的装配,几乎在所有的真核生物中都是相同的。脂质连接的前身寡糖的合成和转移,在鸟类和哺乳动物细胞中观察到,在昆虫、酵母和植物细胞中也观察到。

装配的第二阶段,蛋白质连接的寡糖前体,通过糖基的除去和加入,被广泛地修饰,得到最终产物。它们都有共同的特性,在还原末端有一个由 $Man_3GlcNAc_2$ 组成的“内核”,这个内核在寡糖前体中也存在。高甘露寡糖, $Man_{5-9}GlcNAc_2$ (图32a)有与寡糖前体非常相似的结构。复杂寡糖(图32b)有2至5条连接于内核的唾液酸-Gal-GlcNAc为末端的支链,和连接在最里面的GlcNAc上的一个岩藻糖。杂交寡糖既具有复杂型也具有高甘露糖型结构的特征,绝大多数杂交型寡糖含有以 $\beta 1 \rightarrow 4$ 键连接到最里面的甘露糖基的GlcNAc(图32c)。

分泌的和细胞表面的糖蛋白,是当寡糖前体通过内质网和高尔基体运送到最终目的地的过程中,在这些细胞器内加工完成的。寡糖的修饰由这些细胞器中的糖苷酶和糖基转移酶来实现。天冬酰胺连接的寡糖的加工,最初于1977至1978年在Kornfeld、Robbins和Summers几个实验室阐明。和天冬酰胺连接的寡糖合成的第一阶段不同,在

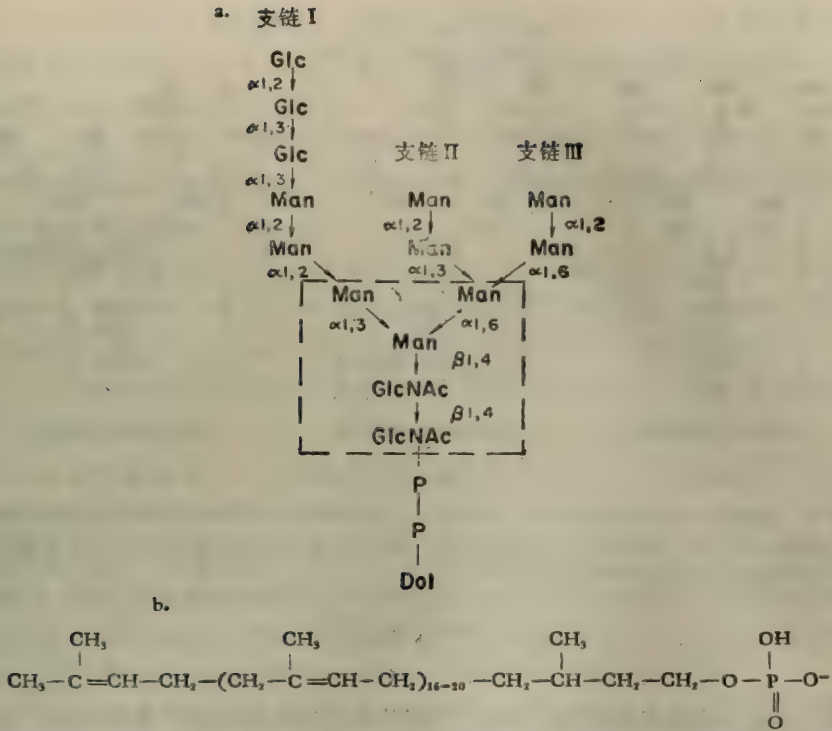


图 31 (a)前身寡糖-脂质。具有 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 内核(用方框表示)的, 14 糖单元组成的寡糖结构。寡糖连接于焦磷酸多萜醇 (Dol-P-P)。(b)载体脂质 Dol-P。脂质具有 18~22 个异戊烯和还原的 α -异戊烯。(摘自 Li, E. et al., 1978, *J. Biol. Chem.*, 253, 7762)

绝大多数真核细胞中通过单一途径进行, 第二阶段的加工方式是非常不同的, 不同种属之间, 和各个细胞合成的不同糖蛋白上的寡糖之间, 都表现出互异。在真核细胞中, 从共同的前体合成的寡糖种类, 可能有上千种。然而, 寡糖加工还是专一的, 在糖蛋白上, 各个糖基化部位持有一种类型(就是说复杂型或高甘露糖型)的特定寡糖, 位于单个部位的寡糖, 通常是结构密切相关的一族, 仅仅末端糖的数目不同, 提示成熟结构的合成是严密控制的。

(一) 寡糖-脂质中间体的装配

根据 60 年代后期确立的, 在细菌的脂多糖和细菌细胞壁的肽聚糖 (peptidoglycan) 的生物合成中, 有脂质(十一异戊二烯)连接的糖参加。Leloir 相信这是糖代谢方面的一个重大突破。他推测, 在较高等的生物中可能也存在相似的过程。Leloir 及其同工作者的领先工作指出, 肝匀浆合成了与细菌中相似的聚异戊二烯连接的糖, 它的疏水部分含有大约十九个异戊二烯单位, 证明为多萜醇, 为哺乳动物糖蛋白的生物合成中有一个多萜醇寡糖中间体, 提供了有力的证据。在哺乳动物中, 葡萄糖、甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺, 从它们各自的核苷酸化合物转移到磷酸多萜醇 (Dol-P), 1 个含有 14—21 个异戊二烯单位的磷酸化多萜醇, 它的 α -异戊烯单位是饱和的, 分别形成 $\text{Glc}\beta\text{-P-Dol}$, $\text{Man}\beta\text{-P-Dol}$, 和 GlcNAc-P-P-Dol , 磷酸多萜醇糖。Leloir 等并且发现多萜醇连接的寡糖转变为多萜醇-焦磷酸-寡糖。

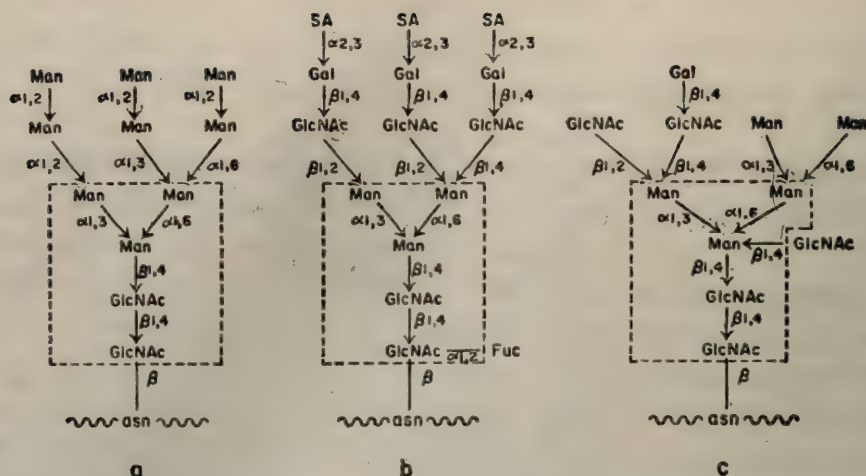
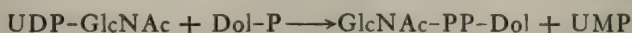


图 32 成熟的天冬酰胺连接的寡糖的三种类型。这些结构均具有 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 的内核(用方框表示)。(a) 高甘露糖型；(b) 复杂型；(c) 杂交型。平分型(bisecting) GlcNAc 连接于杂交型结构的最里面的甘露糖基。(摘自 Ito, S. et al., 1977, *J. Biochem., Tokyo*, **81**, 1621 Reading, C.L. et al., 1978, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5600 Yamashita, K. et al., 1978, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3862)



他们推测, 这些多萜醇寡糖在糖蛋白的 N-糖苷单位的生物合成中是中间体。这些报道, 引起了许多实验室对天冬酰胺连接的糖链的生物合成的兴趣, 并弄清了脂质连接的寡糖中间体的装配途径。根据用较高等的动物和植物, 以及昆虫、酵母和病毒感染的细胞制剂的实验结果, 提出了称为磷酸多萜醇循环的反应顺序(图 33), 应该指出, 循环中所有反应并不都是在同一生物体系中阐明的。

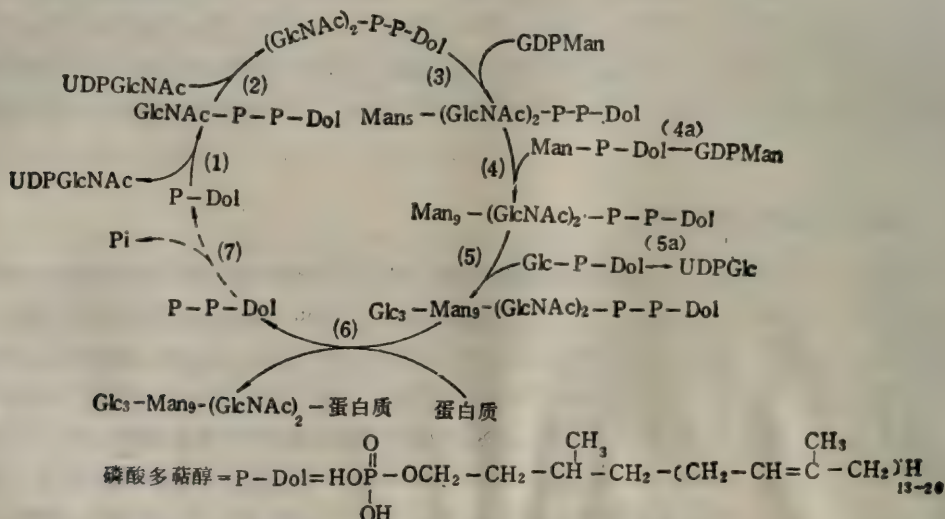


图 33 蛋白质糖基化的磷酸多萜醇循环。

Dol-P 是装配寡糖前体的脂质载体, 在合成 Dol-PP 连接的寡糖、 Dol-P-Man 、 Dol-P-Glc 中作为底物。细胞亦含游离多萜醇和其它两种多萜醇衍生物: 多萜醇的脂肪

酸酯和 Dol-PP, Dol-PP 是寡糖前体转移到蛋白质的中间产物。在某些类型的细胞中,几乎所有的多萜醇都以 Dol-P 存在,而另外一些细胞(即哺乳动物肝细胞)中,游离多萜醇和多萜醇酯占总多萜醇的 80%。

亚细胞分部研究指出,大鼠肝中多萜醇在内质网和/或高尔基体中合成。鼠肝的亚细胞分部亦揭示线粒体。溶酶体部分的 Dol-P 含量与内质网派生物质相似,溶酶体含有大量游离的和酯化的多萜醇化合物。

多萜醇代谢的若干酶已在细胞提取液中发现。这些酶的活力,在调控寡糖-脂质合成方面是重要的,因为 Dol-P 的水平是控制这一进程的关键因素。Dol-PP 磷酸酯酶将 Dol-PP 转化为 Dol-P,使 Dol-PP 能再被利用,Dol-PP 是寡糖前体转移到蛋白质的反应产物。这个酶已在培养的人淋巴细胞和大鼠肝提取液中找到。Dol-P 磷酸酯酶,转化 Dol-P 为游离的多萜醇,也已在上述两种来源中证明,细胞膜的酶活力最高。另外,依赖 CTP 的多萜醇激酶,在牛肝、猪脑和地鼠卵等若干组织中也相继发现。这个酶可能在游离多萜醇的再利用中起作用。

多萜醇的合成,多萜醇衍生物的相互转化和多萜醇的降解,对 Dol-P 水平的调控必须是协调的。虽然,调控的途径和关系尚不清楚。在海胆和小鼠中,多萜醇再合成的速度和多萜醇激酶水平的调控,不依赖于胆固醇合成的控制。然而,关于其它多萜醇代谢的酶和降解多萜醇的酶,就知道得很少。

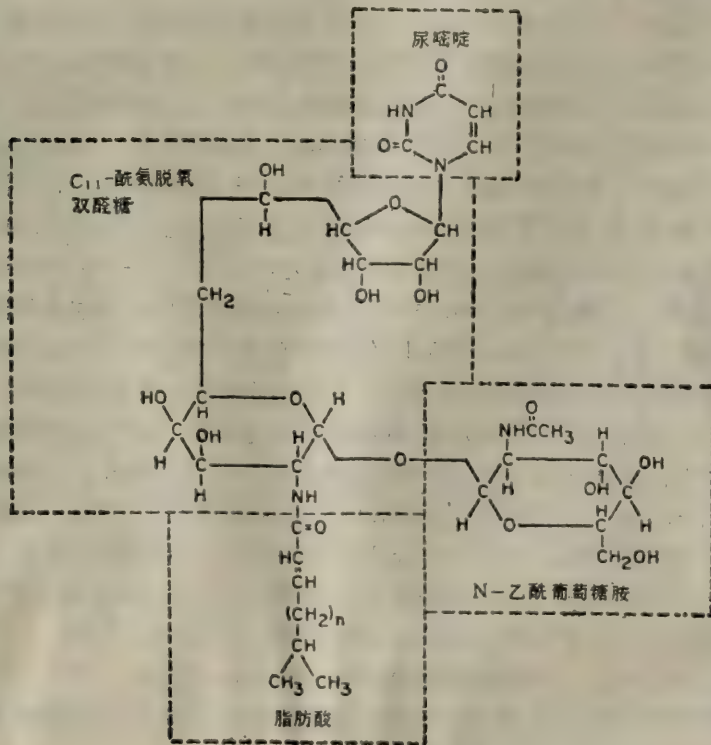


图 34 衣霉素结构。

(摘自 Ito, T. et al., 1977, *Agric. Biol. Chem.* 41, 2303; Takasuki, A. et al., 1977, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 2089)

1. 寡糖-脂质的合成

寡糖-脂质中间体由 Dol-P 和核苷酸糖, UDP-GlcNAc、GDP-Man 和 UDP-Glc, 在内质网中合成。装配途径已从各方面阐明。从有放射活性的前身合成的中间体, 对分析整体和离体的情况特别有用。用动物细胞株和酵母变种进行研究, 以及专一的抑制剂实验, 为装配过程提供了许多细节。

寡糖-脂质合成, 从 UDP-GlcNAc 将 GlcNAc 转移到 Dol-P, 使生成 GlcNAc-PP-Dol (图 33 反应 1) 开始。这一反应的结果是脂质和糖之间形成焦磷酸键。在许多生物体中, 都是通过这一途径合成 GlcNAc-PP-Dol 的。催化这个反应的酶已从主动脉、输卵管和酵母等若干来源中分离。用小牛肝或鸡胚微粒体的研究表明, 衣霉素 (图 34) 阻断 GlcNAc-PP-Dol 的合成。用酵母、病毒感染的细胞、培养成纤维细胞、培养的卵细胞、骨髓瘤细胞株、输卵管组织切片、原发性肝癌和鸡胚角膜的整体实验, 证明衣霉素阻止含 N-糖苷连接的糖的蛋白质糖基化。另外, 酵母细胞膜系统实验证明了衣霉素抑制磷酸多萜醇循环的第一步, 但不影响 GlcNAc-PP-Dol 延伸为二糖-和三糖-脂质, 和已生成的寡糖-脂质中间体作为糖供体转移到蛋白质; 并且对阻断糖的吸收和干扰 UDP-GlcNAc 或 GlcNAc-6-磷酸的合成不显示效应。鸡输卵管组织切片的研究证明在整体和离体情况 GlcNAc-PP-Dol 在寡糖-脂质合成中的重要性。由于衣霉素阻断寡糖-脂质中间体的装配, 这样, 就抑制了天冬酰胺连接的寡糖的合成。研究天冬酰胺连接的寡糖在蛋白质合成、细胞内转移和分泌中的作用, 衣霉素是重要的工具。

然后, 在 $\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ 上加上一个 β -连接的甘露糖基, 合成三糖-脂质。这个甘露糖基从 GDP-Man 直接转移到 $(\text{GlcNAc})_2\text{-PP-Dol}$ 。三糖-脂质通过加上 8 个 α 连接的甘露糖基, 形成高甘露糖型结构。在这个过程中, 使用了二个不同的供体, 前四个甘露糖基由 GDP-Man 直接转移到三糖-脂质, 生成与脂质连接的七糖, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (图 33 反应 3)。剩下的四个甘露糖基, 来自单糖-脂质, Man-P-Dol (图 33 反应 4)。

从 GDP-Man 和 Dol-P 合成 Man-P-Dol 的反应, 在许多生物体中进行了研究。催化这一反应的酶, 已从酵母纯化。在较高等的动物中, Man-P-Dol 只作为这四个甘露糖基的供体。虽然, 在酵母中, Man-P-Dol 亦参与蛋白质中丝氨酸基和苏氨酸基的直接糖基化。GDP-Man 和 Man-P-Dol 在寡糖-脂质合成中作为不同的甘露糖基供体, 是用变种的动物细胞株进行研究发现的。这些细胞无能力合成 Man-P-Dol , 细胞中 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 堆积。另外, 当有外源 Man-P-Dol 供应时, 这些细胞株内源的、脂质连接的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 就延长到 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, 提示后四个甘露糖基来自 Man-P-Dol 。最有力的证据来自 E. Thy-1 阴性的淋巴瘤细胞突变株, 这种突变株, 无能力合成 Man-P-Dol , 但能合成脂质连接的寡糖, $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ 。用抑制 Man-P-Dol 合成的双霉素 (amphotycin)、萤光标记的去氧葡萄糖和 EDTA, 在整体和离体的研究, 亦得到同样的结论。经过这些化合物作用, 导致脂质连接的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 堆积。

在肝脏离体系统中, 双霉素抑制 GlcNAc-PP-Dol 的合成。另外, 它阻止 Man-P-Dol 形成, 但不阻止甘露糖基从 GDP-Man 转移到 $\text{ManGlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, 结果是形成脂质连接的七糖, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ 。

去氧葡萄糖的作用是一个复杂的过程。在离体条件, 去氧葡萄糖转化为 UDP-dGlc 和 GDP-dGlc。GDP-dGlc 阻断 Man-P-Dol , Glc-P-Dol 和 $(\text{GlcNAc})_2\text{-PP-Dol}$ 的形

成，而以形成 dGlc-P-Dol 取代之。那样，GDP-dGlc 与 GDP-Man 竞争可利用的磷酸多萜醇。在含有 (GlcNAc)₂-PP-Dol 的膜制剂中，加入 GDP-dGlc，导致形成 dGlc-(GlcNAc)₂-PP-Dol 和 dGlc-Man-(GlcNAc)₂-PP-Dol，它们不能作为转移的糖基接受体，所以与其说竞争磷酸多萜醇，不如说形成流产的中间体似乎是造成 2-脱氧葡萄糖的抑制作用的主要原因。

像 2-脱氧葡萄糖，2-氟(代)葡萄糖和 2-氟(代)甘露糖在体内阻止脂质连接的寡糖的完成。氨基葡萄糖亦抑制脂质中间体的形成，虽然它们的作用模式尚不了解。

以上讨论了影响寡糖-脂质中间体的糖链生成的抑制剂。抑制糖基化的另一种可能性，是阻止再循环，或 Dol-P 的生成。按照反应程序(见图 33)，Dol-P 在糖基化的每一循环后由 Dol-P-P 再生，与细菌系统中十一异戊烯磷酸酯的糖基化循环相似。在细菌系统中，杆菌肽(bacitracin)与十一异戊烯磷酸酯形成复合物，因此阻止焦磷酸酯裂解，和磷酸脂质在第二个循环的再利用。虽然，在真核细胞制剂中，杆菌肽抑制脂质连接的糖中间体的合成，但它的作用点尚未肯定。

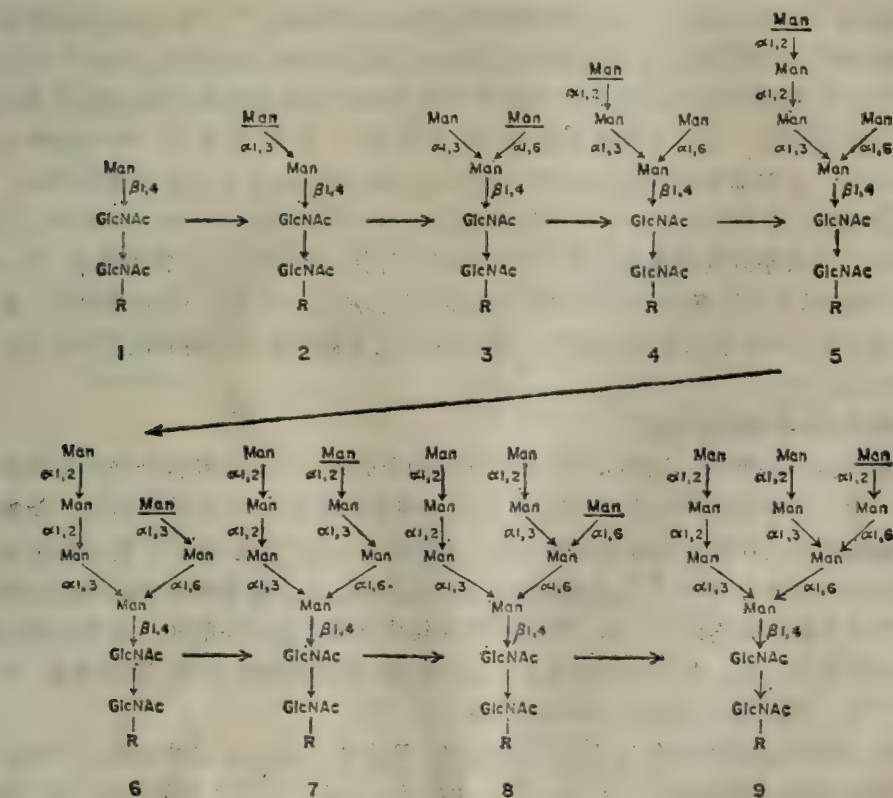


图 35 甘露糖基加至寡糖-脂质。

R 代表焦磷酸多萜醇。前 5 个中间体(上排)的合成包含 Man 基从 GDP-Man 加至寡糖-脂质后 4 个结构(下排)由 Man-P-Dol 转移 Man 生成。

(摘自 Snider, M. D., Biosynthesis of glycoproteins formation of N-linked Oligosaccharides in Biology of Carbohydrates, Vol. 2, 1984, Eds. Ginsburg, V. & Robbins, P. W., John Wiley, New York)

在离体和整体的情况,分析寡糖结构,研究甘露糖基加到脂质连接的寡糖前体的途径。在整体, α -连接的甘露糖基通过单一的途径加到寡糖上(图 35)。在培养的地鼠成纤维细胞中,发现每种大小的寡糖只有一种结构,表明在体内,甘露糖苷转移酶具有高度专一性。有趣的是,在糖蛋白的寡糖加工时,除去甘露糖基,寡糖生成沿不同的途径进行。

另一方面,在离体条件,从核苷酸糖合成脂质连接的寡糖,可能没有如此专一,尽管是在离体条件下,合成的基本途径和最终产物与在体内合成一样。例如,牛乳腺和培养的胸腺瘤细胞提取液合成多种结构。这种不均一性是由于合成酶专一性的降低,抑或是由于大寡糖的不专一性降解,产生某些异构体,尚不清楚。

虽然,在寡糖前体中,每个甘露糖基的供体已确定,而对转移这些糖基的甘露糖基转移酶则了解得很少。尚不清楚,8个甘露糖基的每个糖基的转移,由不同的糖基转移酶执行,抑或一种酶转移几个糖。二个甘露糖基的加入不会产生相同的键(即 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 由 1 \rightarrow 2 连接的甘露糖基转移到 1 \rightarrow 3 连接的糖基形成, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的合成则通过转移 1 \rightarrow 2 连接的甘露糖基到 1 \rightarrow 2 连接的糖基,见图 35),因此,有可能是不同的酶转移每一个糖基。

寡糖-脂质中间体在加了 3 个葡萄糖基到 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, 生成脂质连接的 $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 就完成了。葡萄糖基的供体, Glc-P-Dol 起相似于 Man-P-Dol 的作用,由 Dol-P 和 UDP-Glc 合成。 Glc-P-Dol 的合成以及葡萄糖基从 Glc-P-Dol 转移到脂质连接的寡糖,在许多离体系统中进行了研究。脂质连接的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 虽然都曾被推测为生理的糖基化底物。然而,具有完全支链的结构,能在体内葡萄糖基化是明确的。在堆积了脂质连接的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 和 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 的突变种细胞中,可观察到葡萄糖基也加到这两种脂质连接的寡糖上,正常细胞在 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 堆积的情况下,葡萄糖基可加到 $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 上。看来, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 是能够葡萄糖基化的最小的脂质连接的寡糖。关于转移三个葡萄糖基的酶的性质和数目,目前知道得很少。

2. 寡糖-脂质装配的调控

在寡糖脂质合成中,以 GlcNAc-PP-Dol 的合成为起点的寡糖链合成的起始步骤是限速的一步。寡糖起始的速度,必然也取决于可利用的载体脂质 Dol-P 的量。新物质的合成和载体脂质的释放,是寡糖转移到蛋白质的结果,同时也是 Dol-P 的主要来源。短期内(数小时)大部分 Dol-P 从寡糖-脂质中间体获得,所以新寡糖合成的速度与蛋白质糖基化的速度紧密地连结在一起。利用将寡糖转移到蛋白质有缺陷的、温度敏感的突变细胞株阐明了这一点。在不允许温度之下出现寡糖-脂质的转换减慢,和新寡糖-脂质装配速度下降。用抑制剂研究得到相同的结果。

调节、控制合成和降解的速度可以长期控制 Dol-P 的水平。这种调控,可能包含多萜醇的合成、磷酸化和降解,以及 Dol-P 的去磷酸化。迄今人们了解的调控过程,绝大部分是从对海胆卵的研究得来的。

在起始水平控制脂质连接的寡糖合成的第二种类型,是 Kean 在离体的研究中发现的。在离体条件下,他发现鸡视网膜提取液中, GlcNAc-PP-Dol 合成的速度,既被 Man-P-Dol 也被 GDP-Man 激活,而 Man-P-Dol 更为有效,激活的反应速度达 7—15 倍。这一效应,起调控寡糖-脂质水平的作用,也可能是调控载体脂质库的单糖脂质, Glc-P-

Dol 和 Man-P-Dol, 与寡糖脂质之间的分配。当 Man-P-Dol 和 GDP-Man 水平高时, 有利于寡糖链的起始, Man-P-Dol 水平低时, 链的起始速度也就下降。

(二) 前身寡糖转移到蛋白质

成熟的、脂质连接的寡糖, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, 在粗面内质网被寡糖转移酶转移到蛋白质(图 36)。转移发生在内质网膜向腔的表面。在体内, 绝大多数蛋白质的糖基化看来发生在新生多肽。同样地, 新生多肽也转位到粗面内质网向腔的一面, 似乎是当肽分泌到内质网腔时被糖基化。然而, 也有一些翻译后进行糖基化的例子。

用转移寡糖有缺陷的、对温度敏感的细胞株, 确定了寡糖转移酶所起的作用。这种细胞的寡糖-脂质的合成虽然是正常的, 但在不容许温度下, 蛋白质糖基化和天冬酰胺连接的寡糖的合成不能发生。目前在许多组织提取液中已经观察到寡糖转移酶活力, 并已从酵母及鸡输卵管纯化了这种酶。

转移寡糖-脂质底物的必需的关键结构是三个葡萄糖基。在正常细胞中, 只有在已经完成的寡甘露糖结构上可以加葡萄糖基。葡萄糖基在寡糖-脂质中间体中的作用, 是给予寡糖转移酶以寡糖已经完成的信号, 假如这种设想是正确的, 那末, 酶的活性部位无须识别所有三个寡甘露糖支链, 而只需识别葡萄糖基, 以保证成熟寡糖的转移。因为寡糖转移酶必须与底物肽链和脂质连接的寡糖的还原末端结合, 这种考虑可能是重要的。与葡萄

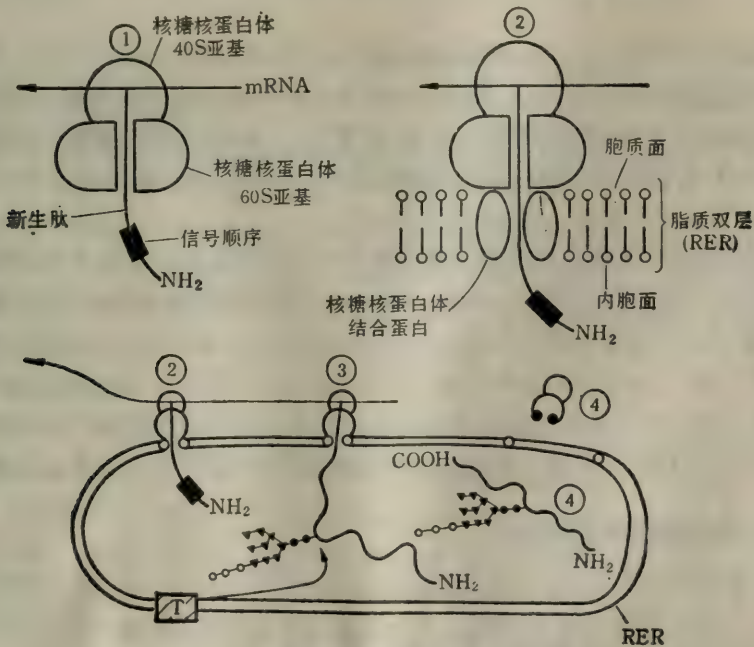


图 36 N-糖苷键型糖蛋白的生物合成示意图。

(1) 在游离的核糖核蛋白体开始翻译, 同时形成信号顺序, 指示游离的核糖核蛋白体到内质网膜; (2) 通过确定的结合核糖核蛋白体的蛋白质, 核糖核蛋白体连接到内质网膜, 结合核糖核蛋白体的蛋白质, 帮助新生肽在推移中通过膜进入内泡空间 (intravesicular space); (3) 核糖核蛋白体沿 mRNA 移动, 翻译继续, 更多的新生肽进入内泡空间。信号顺序可能在装配的某一阶段掉下; (4) 形成的前身寡糖。从它的多萜醇载体转移到生长的肽链。转移完成后, 核糖核蛋白体从内质网膜释放。前身寡糖的加工开始。(出处同表 1)

糖基的重要性相比,寡糖中的甘露糖基数,在寡糖转移上可能不是一个重要因素,离体实验证明,脂质连接的 $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 转移到蛋白质上的速度,比只具有 2 个葡萄糖基的快 10 倍,具有三个葡萄糖基的寡糖脂质,经 α -甘露糖苷酶处理后,从未葡萄糖基化的支链(图 31 支链 II 和 III)脱掉了甘露糖基后,与完全的寡糖前体以同样速度转移。整体的研究亦支持寡糖转移酶的这种专一性需要。无能力将葡萄糖基加至寡糖-脂质的突变种细胞株的蛋白质糖基化是有缺陷的。而能够合成脂质连接的 $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,或葡萄糖基化的具有 7 个甘露糖基的寡糖突变种,能将这些化合物转移到肽。

惊奇的是,在离体情况下,酵母的寡糖转移酶能利用脂质连接的 ManGlcNAc_2 和 GlcNAc_2 。

糖蛋白顺序分析确立了糖基化天冬酰胺基总是在 Asn-X-Ser/Thr 顺序出现。最近的工作表明,这一顺序对寡糖转移酶既必需亦是足够。在离体情况下,鸡输卵管寡糖转移酶能糖基化如 Asn-Leu-Thr 或 Asn-Gly-Ser 这样的小肽。然而,只有封闭肽链的 NH_2 -和 COOH -端,这些小肽方才是好的底物,提示糖基化不能在肽链末端附近发生。

三肽 Asn-X-Ser/Thr 顺序虽然对糖基转移酶而言已经足够,但若审视分泌蛋白的顺序,就发现只有 1/3 的潜在糖基化部位加上了糖基。可能的解释是,在离体条件,天然的蛋白质对寡糖转移酶而言不是良好的接受体,而变性的蛋白质则是良好接受体,这表明在天然蛋白质中许多潜在的糖基化部位被空间所阻,肽链折叠过程可能与糖基化过程竞争新生多肽。一旦蛋白质完成了它的天然构象,就不再被糖基化,因为糖基化顺序不再是暴露的。

寡糖-脂质中间体的水平会影响肽链接受体的哪些部位被糖基化。这一点在下列实验中阐明。在鸡输卵管切片中加入 Dol-P ,使蛋白质糖基化的速度增加 2 倍,而蛋白质合成的速度则未改变。可是输卵管的另一种蛋白质——卵白蛋白的糖基化不受影响,提示加入了 Dol-P 受影响的不是正常利用的糖基化部位。这些实验确立了 Dol-P 水平的重要性,和它在天冬酰胺寡糖合成中的调控作用。

天冬酰胺连接的寡糖合成的第一阶段是近乎无所不在的,在几乎所有的真核生物中发生,也是所有成熟结构合成的一部分。当与第二阶段的多样化相比,特别值得注意。加工的过程因种而异,而单细胞又能合成许多不同的产物。第一阶段合成途径的保守性,原因不知何在。然而,决定性的步骤可能在蛋白质的糖基化程度,因为在这个复杂反应中,寡糖转移酶必须找到正确的肽链的接受位置,也必须区别成熟的和不成熟的寡糖-脂质。另外,能对新合成肽进行糖基化的时间十分短暂,因为肽链折叠之后就无从进行了。

(三) 天冬酰胺连接的寡糖的加工

前身寡糖转移到蛋白质后,通过广泛修饰,合成成熟的天冬酰胺连接的寡糖。这种加工由一个一个移去和加上糖基来完成,产物从合成部位转移到细胞表面或其它最终位置。内质网和高尔基体中的膜结合的糖苷酶和糖基转移酶,在这些细胞器内完成对糖蛋白的修饰。这样,加工也包含作为供体的细胞质的核苷酸糖的吸收。寡糖在内质网中转移之后立即开始修饰,最后的很多反应大多数在高尔基体进行和完成(图 37)。

与寡糖-脂质的装配和转移不同(在所有真核生物中都以同一途径进行),寡糖的加工在不同种的生物中,可有许多不同的加工方式,产生各种各样的最终产物。这些途径由

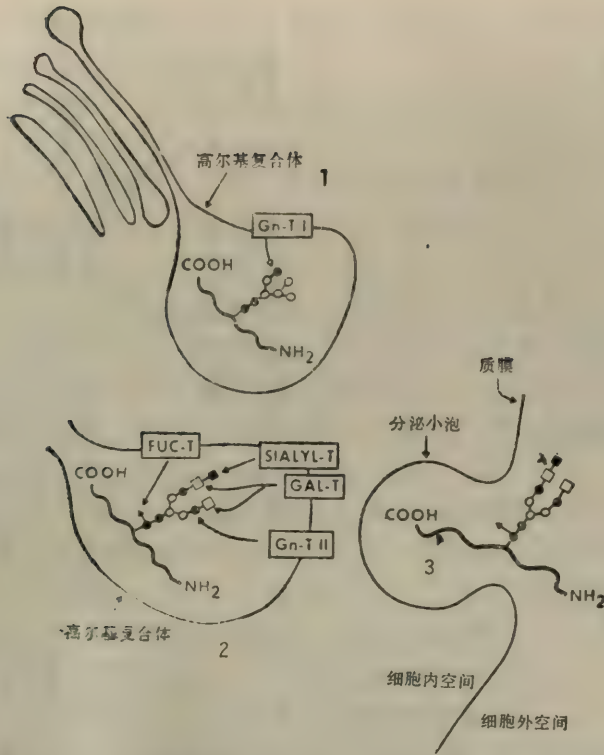


图 37 N-糖苷键型糖蛋白在高尔基体的加工和分泌示意图。

(1) 糖蛋白移往高尔基体。在那里经 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 I 的作用, N-乙酰葡萄糖胺基连接到 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连接的甘露糖; (2) 除去 2 个连接于 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 连接的甘露糖上的甘露糖基。N-乙酰葡萄糖基转移酶 II, 半乳糖基转移酶, 唾液酸基转移酶和 L-岩藻糖基转移酶完成链的延长; (3) 成熟的糖蛋白在分泌小泡中运送到质膜。(出处同表 1)

糖基转移酶和糖苷酶的专一性控制。酶对寡糖随机的作用看来不能发生。更确切地说, 这些酶只能作用于有限品种的中间体, 所以, 修饰进行得相当有序。另外, 虽然在单个细胞中寡糖合成可遵循许多途径, 但方法是十分专一的。修饰是受控制的, 所以在糖蛋白上每一个糖基化部位的寡糖只有一个或少数相似的结构。

1. 葡萄糖基的裂解

寡糖加工开始于粗内质网, 先除去 3 个葡萄糖基。用标记方法, 在整体和离体, 从许多种培养细胞和酵母的研究证明, 在新糖蛋白中葡萄糖基是一个一个除去的。在鸡胚成纤维细胞中, 用氘标记的甘露糖实验揭示, 最外边的葡萄糖基在寡糖转移到蛋白质的 2 分钟内移去。然后, 蛋白质连接的 $\text{Glc}_2\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ 转变为 $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}_2$, 转变的半时间 half time 大约为 5 分钟, 而最后一个葡萄糖基以更慢的速度移去。

2 种葡萄糖苷酶催化移去 3 个葡萄糖基。葡萄糖苷酶 I, 已从酵母和鸡输卵管部分纯化, 移去最外边的葡萄糖基。葡萄糖苷酶 II, 已从大鼠肝纯化到均一, 移去里面的 2 个 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连接的葡萄糖基。最近, 一个缺葡萄糖苷酶 II 的淋巴瘤细胞突变株的工作, 支持关于移去这二个葡萄糖基的是一个酶的结论。在整体内, 这些突变株细胞积累蛋白连接的 $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, 并且在无细胞抽提液中, 没有以 $\text{Glc}_2\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 或 $\text{GlcMan}_9\text{GlcNAc}$ 为底物的酶活力。存在葡萄糖苷酶 I 和 II 的更多的证据, 包括 2 个酶的物理的和动力学

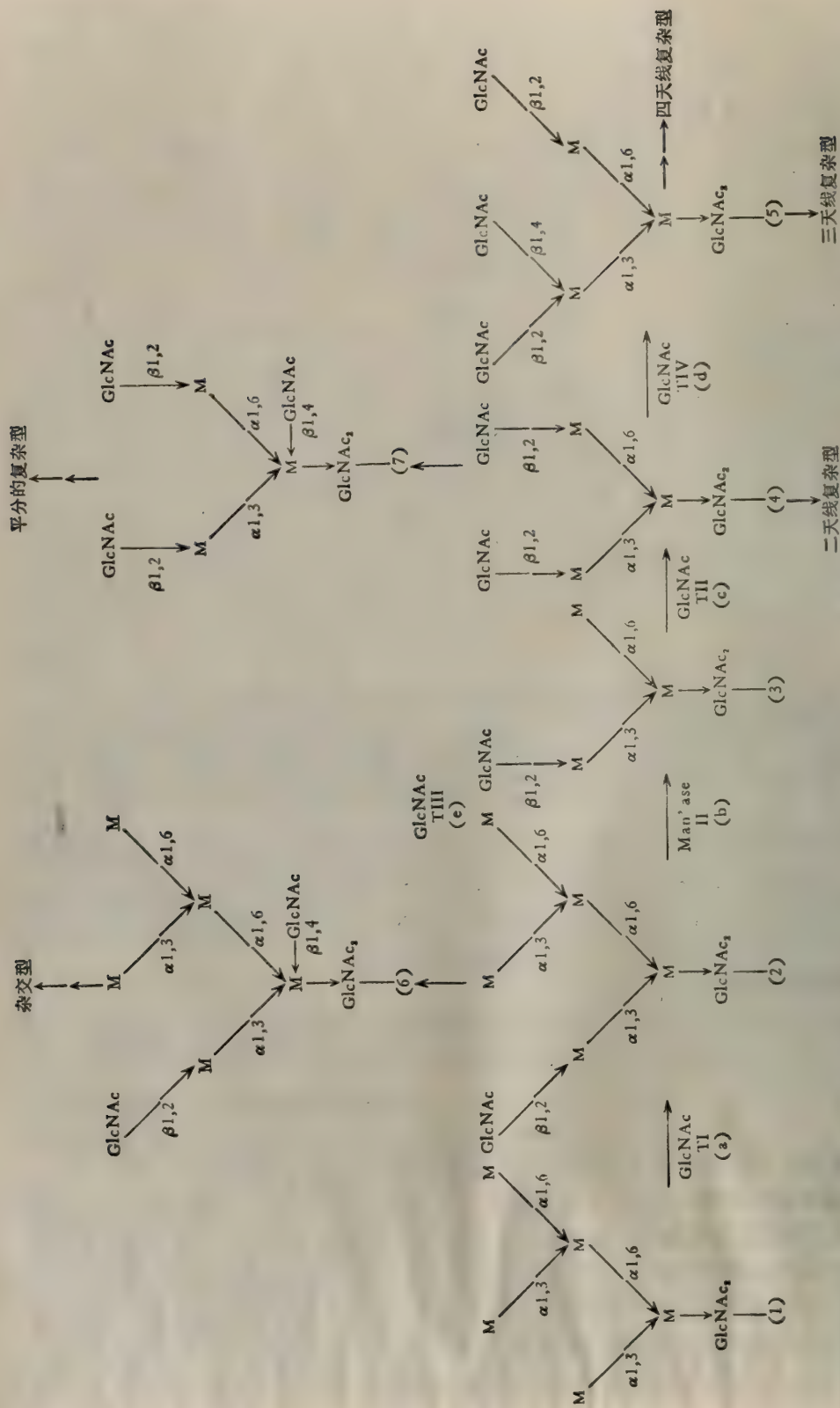


图 38 复杂型和杂交型寡糖的合成。首先，GlcNAc 转移酶 (GlcNAcT's) 和甘露糖苷酶 II (Man'ase II) 的作用，决定寡糖的基本形式。然后，经末端的半乳糖基-唾液酸基-和岩藻糖基转移酶的作用，完成二、三和四天线复杂型、杂交型和平分型的复杂型寡糖。(出处同图 35)

的性质,以及对抑制剂的不同敏感性。例如 $\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Glc}$ 和 $\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ 双糖只抑制葡萄糖苷酶 I,而 $\text{Glc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{Glc}$ 只抑制酶 II。

它们在寡糖加工中的作用,与所建议的一致,葡萄糖苷酶 I 和 II 对葡萄糖基化的高甘露寡糖专一。经 α -甘露糖苷酶处理,从支链 II 和 III (图 31) 除去末端甘露糖基,酶对这种底物的活力减低,提示二种酶的完全活性,都需要甘露糖基连接于 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 支链的寡糖。葡萄糖苷酶 II 则更敏感,移去 1 个甘露糖基,酶活力失去 80%。

2. 高甘露糖结构的完成

在高尔基体中,直到四个甘露糖基被移去,形成成熟的高甘露糖寡糖,在这一过程中只有 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 连接的糖基被移去,所以糖的裂解没有出现与糖基加到脂质连接的寡糖的逆顺序。2 种 α -甘露糖苷酶 I_a 和 I_b 已从大鼠肝部分纯化。这二种酶对寡糖中的 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 连接的甘露糖基有最高活力。第三种甘露糖苷酶,亦对 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 糖基有活性,已在大鼠肝中测定。这三种甘露糖苷酶之间的关系尚不清楚。

初步的证据也表明存在另一个甘露糖苷酶,在内质网内此酶从 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 移去 1 个甘露糖基。用氘标记的甘露糖的代谢研究指出,蛋白质在粗面内质网堆积的情况下,也有大量的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 堆积。另外, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 是粗面内质网膜糖蛋白的主要寡糖。因为甘露糖苷酶 I_a 和 I_b 存在于高尔基体,也因为这些酶对 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的活力比较小的寡糖低,很可能内质网中尚有一个不同的甘露糖苷酶,移去这一个糖基。这个酶看来可能和酵母在内质网中移去 1 个甘露糖基的酶相似或相同。

设想较大的寡糖是较小寡糖的前身,根据成熟的 IgM,加工不完全的泡状口炎病毒糖蛋白,以及游离的寡糖与甘露糖苷酶 I_a 在离体条件下经长时间温育得到的结构,推想分解 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 连接的甘露糖基可能有几条途径。有趣的是, IgM 的 2 个糖基化部位移去甘露糖基的次序看来不同,提示糖基部位周围的肽对修剪可能起控制作用。

3. 复杂型和杂交型寡糖的合成

在较高等的真核生物中,在复杂型和杂交型寡糖的合成中,小的高甘露寡糖, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, 作为直接的前身。利用突变种和离体条件,用特定的底物广泛研究糖基转移酶,阐明这一过程中寡糖分支的模式主要由至少 4 种 GlcNAc 转移酶的作用决定(图 38)。这些酶决定 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 是否再要进一步加工,产物是复杂型还是杂交型,以及一个复杂寡糖应有多少支链。

转化过程由 GlcNAc 转移酶 I 起始(图 38 反应 a),使 GlcNAc 基加到 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 。这一步的重要性,从缺少 GlcNAc 转移酶的突变株获得证据。这个突变株,不合成复杂寡糖,并积累大量的 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 。 GlcNAc_2 转移酶 I 已从地鼠卵细胞突变种、猪肝等几种来源纯化,在体外, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 是这个酶最好的底物。虽然,它也能利用较小的寡糖(例如 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$)。从一株缺少 Man-P-Dol 但是能转移 $\text{Glc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 到蛋白质的突变株细胞获得了 GlcNAc 转移酶 I 能在体内利用这些小寡糖的证据。在这些细胞中,复杂型寡糖是通过葡萄糖基化寡糖转化为 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$,随后经 GlcNAc 转移酶 I 对 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 作用合成的。

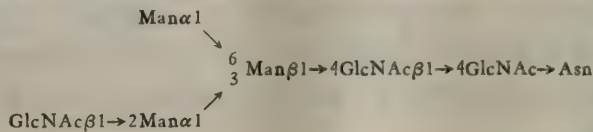
复杂寡糖装配的下一步是移去 2 个甘露糖基,产生 $\text{GlcNAc Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (图 38 化合物 3)。完成这些裂解的酶,甘露糖苷酶 II, 已从大鼠肝纯化得到均一产物。这个酶看来对 $\text{GlcNAc Man}_4\text{,}_5\text{GlcNAc}_2$ 高度专一,没有发现作用于 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 的活力。用

体外抑制甘露糖苷酶 II 的生物碱 (swainsonine) 确定了这个酶在体内的作用。这种生物碱,在体内阻断复合寡糖的合成,并导致 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 堆积。

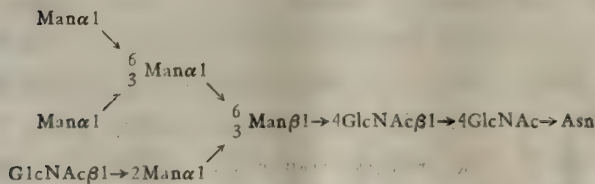
更多的支链,是通过 GlcNAc 基的转移,以 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 为接受体底物,由 GlcNAc 转移酶 II 催化,在 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 寡糖上加上第二个 GlcNAc 基(图38反应 c),产生二天线结构(见表 23)。这个酶已从猪肝和牛初乳,部分地纯化,并证明与 GlcNAc 转移酶 I 不同。最后,通过 GlcNAc 转移酶 IV,加第三个 GlcNAc 基到 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连接的甘露糖基(图 38 反应 d),开始第三条支链合成。 GlcNAc 转移酶 IV,已在鸡输卵管无细胞制剂中检定。第四条支链的合成,也发生在这一阶段,由 GlcNAc 转移酶 V 催化以 $\beta 1 \rightarrow 6$ 键连接到 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连接的甘露糖基。

发生在这一加工阶段的另一种修饰方式,是 α -岩藻糖基转移到内核的最里面的 GlcNAc (图 32b)。在体外,利用特定底物的研究表明,岩藻糖基转移酶,最容易作用于具有一个或多个外周 GlcNAc 基的寡糖。在杂交型结构,加上平分型 (bisecting) GlcNAc 或支链的 GlcNAc 被半乳糖基取代会阻断岩藻糖基化。这与岩藻糖基连接到复杂型寡糖内核的事实是一致的。然而,最近从人脾脏的 β -葡糖醛酸酶分离了 1 个岩藻糖基化的高甘露糖型的寡糖,提示在体内岩藻糖基转移酶可能有不同的性质。在链的外部存在的岩藻糖基,是由其它岩藻糖基转移酶在寡糖加工后加上的。

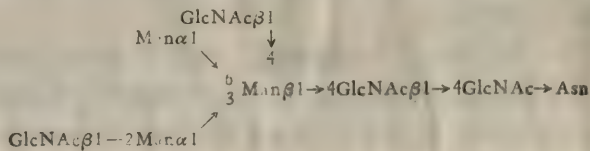
(1) 平分型 GlcNAc 基的增加 GlcNAc 转移酶 III 将 GlcNAc 基以 $\beta 1 \rightarrow 4$ 连接加到内核的 β -连接的甘露糖基。这一个糖基称为“平分型”的,是因为它连接在 2 个 α -连接的甘露糖支链之间(图 32c)。平分型 GlcNAc 发生在两种类型的结构中:(1) 杂交型寡糖,即除末端 GlcNAc 、半乳糖基和唾液酸基外,还有 3 个以上甘露糖基的结构;(2) 具有平分型糖基的复杂型结构。鸡输卵管抽提液中发现的 GlcNAc 转移酶 III 所具有的性质,可以解释平分型糖基只在 2 种类型寡糖中出现的事实。转移酶 III 既作用于 $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ 产生杂交型结构(图 38 化合物 6),也作用于 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 产生平分的复杂型结构(图 38 化合物 7)。Narashimhan 等发现在天冬酰胺连接



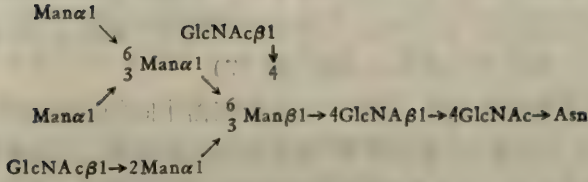
和



的寡糖加工的中间体加上平分型 N-乙酰葡萄糖胺基,阻止 α -甘露糖苷酶从这些结构移去连接的 α 甘露糖基,导致杂交型糖链的形成。



和



到目前,已研究的各种糖蛋白中,几乎所有的天冬酰胺连接的糖链,都依照这一结构规律合成。这与最近的发现,即加平分型 N-乙酰葡萄糖胺基改变内核的构象,是一致的。包括在复杂型寡糖合成中的若干活动,不能在具有平分型 N-乙酰葡萄糖胺基的结构中进行。这些包括甘露糖苷酶 II, GlcNAc 转移酶 II, 和岩藻糖基转移酶,特别是甘露糖苷酶 II, 对这样的底物缺乏活力,使杂交型结构不再进一步加工。

(2) 链的完成 半乳糖基、岩藻糖基和唾液酸基加到寡糖支链的非还原末端,是完成复杂型和杂交型糖链的过程(图 38)。但是,也有一些 N-连接的寡糖的合成,不遵循这一规律,如卵粘蛋白的某些糖链。在 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 内核上合成的结构,包括 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, 和 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3)\text{GlcNAc}$ 。所有这些结构都是复杂型寡糖的特征。基于半乳糖基转移酶和唾液酸基转移酶与早期作用的转移酶位于不同的高尔基体间隔区,确定了在寡糖加工过程中,这些糖基的转移在不同的阶段中进行。另外,半乳糖基化的寡糖,对加岩藻糖到还原末端的 GlcNAc, 和对加 GlcNAc 形成新的支链,都是不好的底物。

Hill 等通过广泛的研究,确认了在离体情况下,完成链的方式取决于糖基转移酶的性质。在离体情况,用特定的底物和高度纯化的糖基转移酶,他们阐明了末端糖基化的确切次序,并且证明若干酶的作用是互相排斥的。例如,加 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 连接的唾液酸到转铁蛋白的寡糖的 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 结构上,阻断 GlcNAc 基的岩藻糖基化,反之亦然(图 39)。用由不同种受体与酶组成的离体系统,如牛、猪和人的转移酶与人的糖蛋白接受体实验都获得相似结果,此点增强了这些结论的概括性。

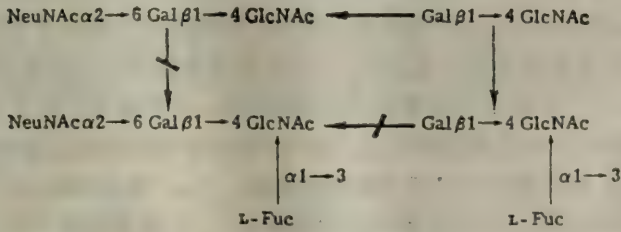


图 39 β -半乳糖苷 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 唾液酸基转移酶和 N-乙酰氨基葡萄糖苷 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 岩藻糖基转移酶对 N-糖苷键寡糖的相互排斥的糖基化。(摘自 Beyer et al., 1981, *Adv. Enzymol.*, 52, 23)

然而,重要的问题是复杂型和杂交型寡糖是如何完成的,糖加到 1 条链的二-、三-和四-天线,在同一寡糖中是如何影响对其它链的转移。更重要的是,为什么某些类型的键的合成,例如 $\alpha 2 \rightarrow 3$ 或 $\alpha 2 \rightarrow 6$ 连接的唾液酸和 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 3\text{GlcNAc}$, 在某些糖蛋白的寡糖中存在,而其它的糖蛋白的寡糖中则不存在。这些问题目前均未能阐明。

4. 时间进程和寡糖加工的亚细胞位置

天冬酰胺连接的寡糖的加工,发生在糖蛋白从它们装配的处所(即粗面内质网)通过

高尔基体运送到它们最终的目的地(包括细胞表面,细胞外空间和细胞器)的过程中。现在已清楚,寡糖转移到蛋白质上的时候,在粗面内质网中开始加工,除去葡萄糖基。大约在20—90分钟后,加工即在高尔基体中完成(图37)。

天冬酰胺连接的寡糖的合成中,其酶分布在细胞器中间的原因尚不清楚。然而,值得注意的是,内质网中发生的反应,包括寡糖-脂质的合成和转移,以及葡萄糖基的移去,几乎在所有真核生物中都发现,并且所有类型的结构的合成都需要。可是,明显不同的是,在高尔基体内发生的加工反应,各种属之间有显著的差异,而且在单一细胞中并不发生所有的寡糖合成,这些观察可能有助于了解这一途径的演变。

(a) 粗面内质网中的加工 第一个加工反应,从寡糖移去葡萄糖基,发生在粗面内质网。发现在离体情况,从内质网获得的部分中,葡萄糖苷酶I和II的活力最高。另外,葡萄糖基的裂解发生在寡糖转移到蛋白质的几分钟内。因为内质网是多肽移位和糖基化的场所,这一裂解很可能在这一细胞器中发生。

(b) 高尔基体中的加工反应 大量的寡糖加工反应在高尔基体中进行。当寡糖转移到蛋白质就开始寡糖加工, $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{Asn}$ -蛋白质可能到达高尔基体进行糖链伸长反应(图37),有几个方面的证据表明高尔基体是伸长反应的主要场所。

放射自显影技术第一个用于证明高尔基体是糖基化的主要场所。注射放射性糖,如氘标记的葡萄糖或半乳糖等,动物组织放射自显影的结果表明糖蛋白的糖基化主要在高尔基体进行。然而,绝大多数糖很快转变为其它己糖或己糖胺,没有明确的参入模式。与此不同,放射性岩藻糖不转变为其它糖。当氘标记岩藻糖作为前身时,通常获得简单、正确的参入模式。例如氘标记岩藻糖参入大鼠甲状腺的研究指出,给动物体注入标记岩藻糖后3—5分钟内,85%位于高尔基体,随后,移到小泡尖端,最后到胶质。氘标记岩藻糖的放射自显影表明不论是注射的早期或后期,标记岩藻糖参入粗面内质网的很少。在2—5分钟内,参入质膜的也很少。这些结果表明糖蛋白的岩藻糖基化主要在高尔基体。进行相似的动力学实验,在给予放射性标记的糖后,将组织作亚细胞分离,随后在不同时间作生化分析,又作标记葡萄糖胺、唾液酸和半乳糖的参入研究,均表明唾液酸、半乳糖和岩藻糖主要在高尔基体,某些N-乙酰葡萄糖胺亦在这一细胞器中与蛋白质结合。

糖基转移酶在亚细胞器中的定位研究,对高尔基体在糖链延伸反应中的作用,给予了强有力的、肯定的证据。5种不同的糖蛋白糖基转移酶,半乳糖基、N-乙酰葡萄糖胺基转移酶,作用于唾液酸酶、 β -半乳糖苷酶处理后的 α_1 -酸性糖蛋白的岩藻糖基转移酶,作用于唾液酸酶处理后的 α_1 酸性糖蛋白的唾液酸基转移酶, Ala_1 唾液酸酶,在大鼠高尔基体中比组织匀浆中高40—60倍。细胞质膜中这些酶不多。上述5种酶中的4种参与糖链延伸反应。在其它各种组织中,如睾丸、甲状腺,进行的相似研究,亦获得相似结果。几乎可以肯定高尔基体是糖链延伸反应的主要场所。然而,仍不能排除糖基化也在有限范围的其它细胞器,如质膜和线粒体中可以进行。

二、O-糖苷键型寡糖的生物合成

(一) 通过N-乙酰半乳糖胺基-丝氨酸(或苏氨酸)连接的寡糖

GalNAc-Ser/Thr 连接的寡糖的生物合成,是由正在生长的糖蛋白上按顺序每次加

上1个糖完成的(图40)。没有证据说明需要1个脂质中间体参与这个过程。已知的与GalNAc-Ser/Thr连接的糖蛋白的糖有30种不同的糖苷键,用合适的核苷酸糖为供体,外源寡糖或糖蛋白为受体,已能离体合成其中的13种。相应的13种糖基转移酶中已有12种高度纯化。

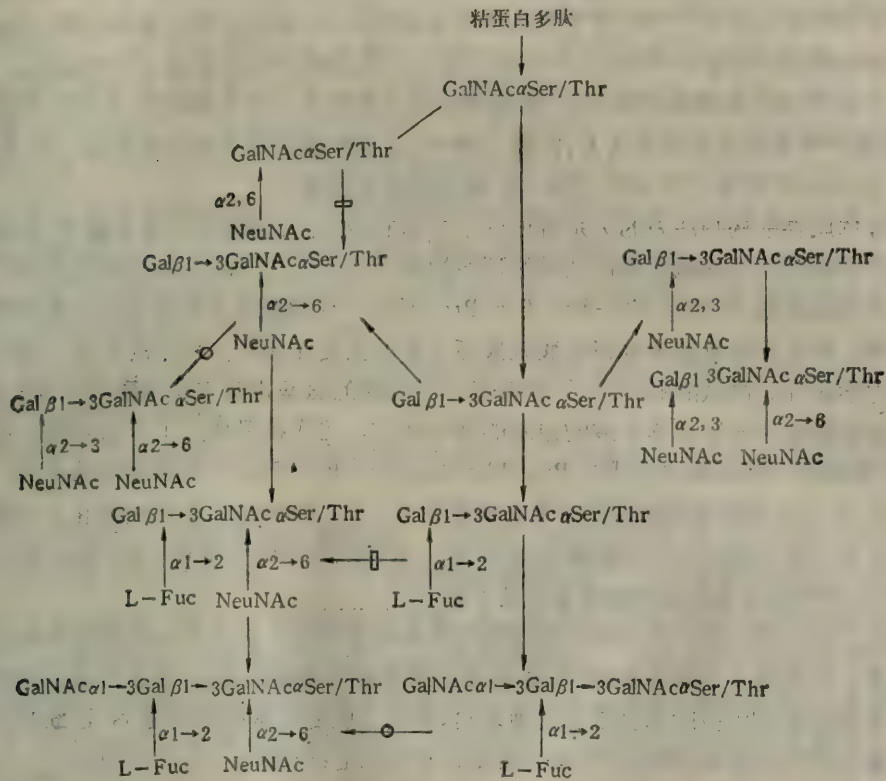
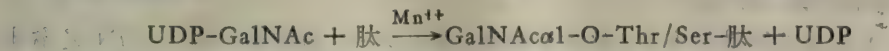


图40 O-糖苷键连接到丝氨酸(或苏氨酸)的寡糖链的生物合成途径示意图。空心棒表示反应不发生,圆圈表示反应进行很差。(出处同图39)

以唾液腺粘蛋白为例,绵羊和猪颌下腺粘蛋白中,连接GalNAc-Ser/Thr的寡糖的装配需要5种糖基转移酶。生物合成的第一步是N-乙酰半乳糖胺连接到肽链中的1个羟基氨基酸。

1. 链的起始



McGuire和Rosaman最先报道催化这个反应的酶,多肽($\alpha 1\text{-O-Thr/Ser}$)N-乙酰半乳糖胺基转移酶。存在于羊颌下腺微粒体,催化N-乙酰半乳糖从UDP-GalNAc转移到羊颌下腺脱辅基粘蛋白(apomucin)受体,与受体的丝氨酸或苏氨酸连接。此后,在牛、人和猪的颌下腺,人血清、大鼠脑、鸡输卵管等许多组织中发现这个酶,并已从大鼠AH66腹水肝癌的TritonX-100抽提液纯化到表观均一。纯化的糖基转移酶的分子量约为54,000—56,000,最适pH为7.5,需要二价金属离子, Mn^{2+} 最有效。纯化的酶对供体底物UDP-GalNAc十分专一。

已知的多肽($\alpha 1\text{-O-Thr/Ser}$)N-乙酰半乳糖胺基转移酶的多肽受体中,分子量较

大的多肽活力高,活性肽经蛋白酶水解,活力下降。牛颌下腺多肽-N-乙酰半乳糖胺基转移酶,作用于胰蛋白酶水解的肽段与完整的牛颌下腺脱辅基粘蛋白的速度相同,但链霉蛋白酶水解的肽段完全没有活性。猪颌下腺的这个酶,能同样地利用完整的羊颌下腺脱辅基粘蛋白和含 74 个氨基酸的胰蛋白酶水解的肽段。酶利用较小肽段的效率较差,虽然同样可观察到转移至有 16 个和 18 个氨基酸的多肽的活力,甚至经嗜热菌蛋白酶 (thermo-lysin) 消化脱辅基粘蛋白得到的、平均肽长为五个氨基酸的肽亦能显示一些活力。

N-乙酰氨基半乳糖转移酶对 O-糖基化的蛋白质的专一性是显著的,此与组织来源无关,测试数十种多肽的接受体活力,仅髓 (myelin) 碱性蛋白是有效的接受体。在 Thr-98 上糖基化,而天然的蛋白质中的 Thr-98 是未取代的残基。

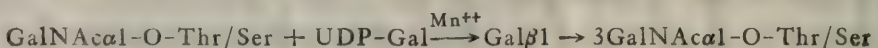
对受体底物结构与活力的关系曾进行了详细的研究。用猪或牛颌下腺 N-乙酰半乳糖胺基转移酶测试从髓碱性蛋白获得的顺序的接受体活性。对猪的酶明确地有接受体活力的最小的肽段是 L-Arg-Thr-Pro-Pro-Pro 五肽。它的糖基化的速度与天然的髓碱性蛋白相等。除去五肽氨基末端精氨酸就破坏了肽的接受体活性。用牛的系统,进行更详细的动力学研究。测试的顺序中,只有糖基化苏氨酸的氨基用其它氨基酸封闭或乙酰化,以及三脯氨酸顺序连接在苏氨酸的羧基的那些肽段,可作接受体。1 个氨基酸,如丙氨酸,插入苏氨酸与脯氨酸之间成为 Pro-Thr-Ala-Pro-Pro-Pro 可保留接受体活力。活性接受体中,包括天然的髓碱性蛋白,米氏常数在 0.4 至 2.0mmol/L 范围内变化。小活性肽的最高反应速度一律比天然的髓碱性蛋白高。报道的最小的接受体,Ac-Thr-Pro-Pro-Pro,糖基化的最高速度是髓碱性蛋白的 8 倍。

因此,可以设想,假如作为靶的苏氨酸的氨基是封闭的,在这个小的接受体中的三脯氨酸顺序,可能有 1 个允许多肽-N-乙酰半乳糖胺基转移酶的构象。而由于缺少这种结构的羊颌下腺粘蛋白的多肽顺序很容易糖基化,说明三脯氨酸基顺序不是 N-乙酰半乳糖胺基转移酶必需的接受体,即使这个酶的接受体有共同的结构特征,也尚未确定。

2. 延伸

糖肽连接起始后,通过依次地连接单糖,糖链进一步生长,N-乙酰半乳糖胺的加入,立即提供了 1 个重要的分支点。假如加入唾液酸形成 NeuNAc α 2 \rightarrow 6GalNAc 双糖(如存在于羊颌下腺粘蛋白中的),就不能再连接糖(图 8)。然而,假如加上半乳糖形成 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 双糖,各种寡糖的合成就能继续进行(如在羊颌下腺粘蛋白中)。在某些寡糖中,半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺在末端,但是它们通常位于糖链的中间,作为连接非还原末端的糖的主链(图 8)。

已知的 O-连接的寡糖结构中,除少数例外,都可找到半乳糖基 (β 1 \rightarrow 3)N-乙酰半乳糖胺键,绝大多数情况下,这种连接是在 O-连接的糖蛋白合成过程中形成的第二个糖苷键。催化这个糖苷键形成的 N-乙酰半乳糖胺 β 1 \rightarrow 3 半乳糖基转移酶,最初,在猪颌下腺的微粒体中发现;继后,在大鼠胃上皮、胰、肝、人血清等不同来源中发现。从几种不同来源初步纯化的半乳糖基转移酶的性质相似。需要二价金属离子,如 Mn⁺⁺。酶活力不受二硫苏糖醇的影响。Van den Eijnden 证明,猪颌下腺的半乳糖基转移酶与羊颌下腺去唾液酸粘蛋白接受体作用,生成的产物是 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc。



用人气管的酶产生相同结构的产物。

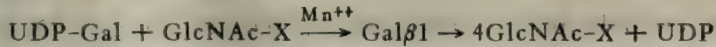
已较详细地研究了从猪颌下腺部分纯化的半乳糖基转移酶的底物专一性。对供体底物 UDP-Gal 的专一性是严格的,其它核苷酸糖, ADP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, GDP-Man, GDP-Fuc 和 UDP-Glc 均无活性。酶制剂能用去唾液酸粘蛋白,游离的 N-乙酰半乳糖胺以及 α -和 β -苯基-N-乙酰半乳糖苷作为接受体。

从猪气管粘膜用亲和层析纯化的半乳糖基转移酶,经凝胶电泳鉴定,为均一蛋白质。分子量大约为 82000。最适 pH 范围较广,在 5.5 和 7.5 之间, pH 6.9 时酶活性最高。纯化的酶肯定了不纯的半乳糖基转移酶的接受体底物专一性。纯化的酶可利用去唾液酸粘蛋白、N-乙酰半乳糖胺醇, N-乙酰半乳糖胺,对硝苯基- β -N-乙酰氨基半乳糖苷和少于 5 个氨基酸基的小的 α -N-乙酰半乳糖胺基肽,作为接受体底物。含有唾液酸基 ($\alpha 2 \rightarrow 6$)N-乙酰半乳糖胺键的天然粘蛋白,血型物质 A 和 O,缺少 N-乙酰半乳糖胺基 $\alpha 1$ -O-Thr/Ser 结构的糖蛋白,不能作为接受体。

UDP-Gal-GalNAc $\beta 1 \rightarrow 3$ -半乳糖基转移酶,紧密地结合于膜上,是控制合成 O-连接的寡糖进程的关键酶。

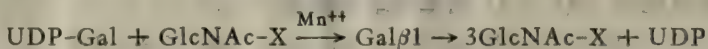
位于糖链中间位置的、已在离体系统合成的 N-乙酰葡萄糖胺连接的糖苷键有以下三种:

(1) **Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc 糖苷键** Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc 是 N-连接的复杂型寡糖的终了的糖基化顺序的特征。在 O-连接的寡糖结构中,虽然不那样普遍,但也存在 Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc 键,如大鼠结肠和舌下腺、人子宫和卵巢囊、猪和马的胃粘膜的粘液分泌物中,以及包括羊 K-酪蛋白和人乳 IgA 的乳糖蛋白。已经测试的每种类型的哺乳动物细胞中,基本上都存在相应的,催化形成 Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc 糖苷键的 N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\beta 1 \rightarrow 4$) 半乳糖基转移酶活性。McGuire 用各种大鼠组织作为酶源,外源糖蛋白为底物,首先离体合成了这个糖苷键。



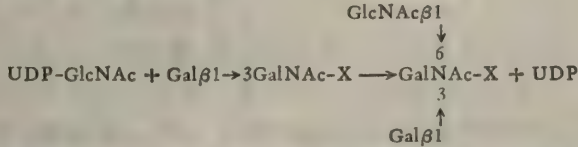
已从人乳和牛乳纯化了这一糖基转移酶,并得到均一的产物。半乳糖基转移酶是糖蛋白,可能含有 N-连接的和 O-连接的寡糖,由单一肽链组成。肿瘤患者特别是卵巢癌患者血清中存在半乳糖基转移酶同工酶 I 和 II,同工酶可以用结构和酶的性质加以区分。半乳糖基转移酶需存在二价金属离子才显示活性。酶分子具有 2 个结合金属的部位,一个与 Mn^{++} 结合,第二个部位与 Ca^{++} 结合。第一个部位是酶活力必需的,第二个可能对结合 UDP-Gal 是重要的。

(2) **Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc 糖苷键** 在大鼠结肠和人卵巢囊液粘蛋白的 O-连接的寡糖和乳的寡糖,以及牛凝血酶原的 N-连接的寡糖中含有 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc 键。最近,在猪气管微粒体膜和大鼠小肠粘膜中发现催化形成 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc 糖苷键的 N-乙酰葡萄糖胺 ($\beta 1 \rightarrow 3$) 半乳糖基转移酶。



(3) **GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ GalNAc 糖苷键** GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ GalNAc 键作为分支点,存在于各种粘蛋白的结构中,Williams 及其同工作者首先报道了在狗颌下腺的微粒体中形成这一键的酶, N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\beta 1 \rightarrow 6$)N-乙酰葡萄糖胺基转移酶。此酶对

热不稳定, 30°C 即失活, 最适 pH 为 7.0, EDTA 和 β -巯基乙醇使酶失去稳定性。低浓度的 Triton X-100 对酶有激活作用, 但浓度高于 0.125% 则稍有抑制。酶不需要金属离子。接受体底物专一性的研究表明, 含有 O-连接的 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, 如猪颌下腺粘蛋白和抗冻蛋白是良好的接受体底物。



而那些只含有 GalNAc α 1-O-Thr/Ser 链, 如羊颌下腺去唾液酸粘蛋白则不能作为接受体。Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 的简单的 α -和 β -糖苷, 如游离的双糖, 都是好的接受体 (表

表 29 N-乙酰氨基半乳糖苷 (β 1 \rightarrow 6)N-乙酰葡萄糖胺基转移酶的底物专一性^a

底物	K_m (mmol/L)	V_{max} [nmol/(mg/h)]
猪颌下腺粘蛋白	5.2	150
抗冻糖蛋白	23	344
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O- <i>p</i> -nitrophenyl	0.52	201
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1-O- <i>p</i> -nitrophenyl	0.92	233
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O- <i>o</i> -nitrophenyl	0.86	293
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-benzyl	0.77	221
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-methyl	4.2	198
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc	1.2	153

^a 无活性化合物包括羊颌下腺去唾液酸粘蛋白, 去唾液酸酸性糖蛋白。Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1-O-对硝基, Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc α 1-甲基, Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-ol 和 D-Fuc β 1 \rightarrow 3GalNAc-苄基。

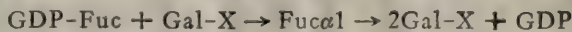
摘自 Williams et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255, 11253.

29)。Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 还原为醇则接受体活性被破坏, N-乙酰半乳糖胺基被 N-乙酰葡萄糖胺基取代, 亦破坏接受体活性。D-Fuc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow 苄基不能作为接受体, 说明 N-乙酰半乳糖胺的 3-位羟基上由半乳糖取代的重要性。半乳糖的 2-位羟基用岩藻糖取代, Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, 可能同样地抑制酶的作用。因此, 这个酶的已知的最好的接受体底物是 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 双糖。

3. 终止

存在于 O-连接的糖链非还原末端的特征糖苷键见表 18。岩藻糖和唾液酸是 O-连接的糖链主要的非还原末端。岩藻糖通常出现在 O-连接的寡糖的 3 种糖苷键中, Fuc α 1 \rightarrow 2Gal, Fuc α 1 \rightarrow 4GlcNAc 和 Fuc α 1 \rightarrow 3GlcNAc, 并且都在非还原末端。亦有岩藻糖在糖链中间位置的稀有结构, Glc β 1 \rightarrow 3Fuc α 1-O-Ser/Thr, 但相当于这种键的糖基转移酶尚未见报道。

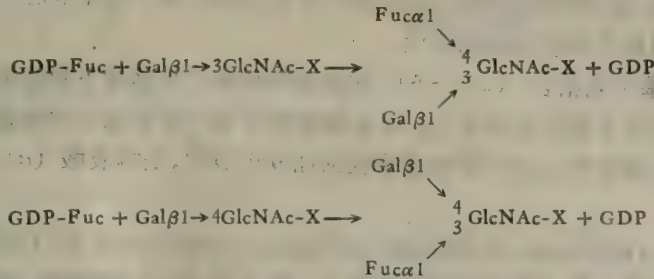
(1) β -半乳糖苷 (α 1 \rightarrow 2) 岩藻糖基转移酶



能合成 H 结构的酶活性首先在狗乳腺中发现。随后, 发现在许多动物和人的组织中都存在。对从许多来源部分纯化的酶的性质研究, 表明二价金属离子对酶有激活作用, 但不是酶活力必需的。1 型和 2 型顺序中的半乳糖基都可作为接受体。含有 Gal β 1 \rightarrow

3GalNAc 结构的糖蛋白、糖脂或游离寡糖亦可作为接受体。半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶已从猪颌下腺纯化到均一。用糖脂、寡糖和糖蛋白为接受体,详细研究了纯化的 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶的底物专一性。用小的寡糖为接受体阐明了此酶对紧邻半乳糖的亚末端糖基没有特殊的要求, N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、葡萄糖、阿拉伯糖和甘露糖的半乳糖苷都有接受体活力。并且亦不要求特定的糖苷键。但最好的接受体底物是 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc 二糖。此酶对糖蛋白受体的专一性比小的寡糖严格。最好的接受体是 O-连接的 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc $\alpha 1$ -O-Thr 二糖, 在 N-乙酰半乳糖胺的 6-位羟基唾液酸化,使 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc 二糖岩藻糖化的速度下降大约 50%, 当半乳糖的 3-位羟基唾液酸化则破坏接受体活性。

(2) N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖基转移酶和 N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 3$)岩藻糖基转移酶



N-乙酰氨基葡萄糖苷($\alpha 1 \rightarrow 4$)岩藻糖基转移酶存在于具有 Lewis(a+b-)或 Lewis (a - b +)表型的人乳中。人颌下腺和胃粘膜亦有此酶活力,但血清中则没有。以 N-乙酰葡萄糖胺为末端的结构不能作为酶的接受体底物。说明此酶需要完整的 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc 1 型链。

N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) 岩藻糖基转移酶已在人颌下腺和胃中测得。此酶与 ($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖转移酶相反,存在于人血清。

($\alpha 1 \rightarrow 4$) 和 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) 岩藻糖基转移酶一起从人乳纯化了 500,000 倍以上,在整个纯化过程中,这两种酶的相对比活保持不变,而且它们的性质酷似,如最适 pH、热失活速度、金属离子对酶活力的影响, N-乙酰顺丁烯二酰亚胺对酶的抑制模式等。用各种寡糖检查纯化的这两种岩藻糖基转移酶的底物专一性, Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc 双糖 (半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶最好的底物)无活力,肯定了纯化的这两种酶中确实不存在半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶。并且在 1 型接受体(含 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc) 中, N-乙酰半乳糖胺不能替代 N-乙酰葡萄糖胺。1 型和 2 型 (含 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc 或 Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc) 半乳糖苷是有效的接受体。用岩藻糖或半乳糖取代半乳糖上的羟基 (2'-岩藻糖基乳糖和乳糖基-N-岩藻五糖 I 或 6'-半乳糖基乳糖), 不抑制底物岩藻糖基化。然而, 3' 和 6' 唾液酸基乳糖没有接受体活性。

人乳 ($\alpha 1 \rightarrow 3/4$) 岩藻糖基转移酶可能是 1 个酶,产生两种不同的糖苷键。然而,在血清中测不到 ($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖基转移酶的活力,但存在 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) 岩藻糖基转移酶活性。归纳这些资料,可设想有两种人的 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) 岩藻糖基转移酶,一种亦具有($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖基转移酶活力,另一种不具有 ($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖基转移酶活力。另一种可能性是

($\alpha 1 \rightarrow 3$) 和 ($\alpha 1 \rightarrow 4$) 岩藻糖基转移酶的结构和性质都非常相似,以致现有的纯化和鉴定方法不能区分。

唾液酸以 5 种不同的键与其它糖基连接, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}$, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}$, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{Gal}$, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ 和 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 存在于 O-连接的寡糖。第六种糖苷键, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 8\text{Sia}$, 在某些糖蛋白,特别在脑中存在。

$\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}$ 糖苷键,在许多上皮粘蛋白、细胞表面糖蛋白和血浆蛋白中可以找到。Carlson 等首先报道在羊颌下腺抽提液中存在具有这种专一性的唾液酸转移酶,此酶利用 CMP-NeuAc 和 CMP-NeuGly 作为供体。接受体专一性测试,包括各种简单糖苷和游离糖,表明只有含 GalNAc $\alpha 1$ -O-Thr/Ser 结构的蛋白质是活性接受体,如猪、牛和羊的去唾液酸颌下腺粘蛋白、红细胞糖蛋白和牛胎球蛋白。其它的 N-乙酰半乳糖胺的 α -糖苷,以及 N-乙酰半乳糖胺和半乳糖胺均没有接受体活性。纵览酶在组织中的分布情况表明,猪、羊和狗的颌下腺粘蛋白中显示酶活性,而羊的心、肝、肾、十二指肠、胃、肺、脾和脑组织中没有此酶的活性。

N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸转移酶已从猪颌下腺粘蛋白纯化到表观均一。纯化的酶活性不需要金属离子。以去唾液酸羊颌下腺粘蛋白为接受体,酶催化形成的键,经组成、过碘酸氧化和外源糖苷酶敏感性分析表明,是唾液酸 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) N-乙酰半乳糖胺。

$\text{CMP-Sia} + \text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr/Ser} \rightarrow \text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr/Ser} + \text{CMP}$
用若干种可能的受体检查纯化的酶的底物专一性表明,测试过的寡糖、单糖、简单的糖苷、N-连接的糖蛋白,均不能作为接受体底物。含有 O-连接的 N-乙酰半乳糖胺的糖蛋白,包括猪和羊的去唾液酸颌下腺粘蛋白、去唾液酸胎球蛋白和抗冻糖蛋白均可作接受体底物。用抗冻糖蛋白糖基化衍生物(表 30)的研究表明远离 N-乙酰半乳糖胺基的糖蛋白结构特征,能影响唾液酸转移酶的活力。比较接受体结构, $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$ 唾液酸化比 $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$ 快五倍。而唾液酸化 $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$ 结构则非常慢,并且不完全。

唾液酸基 ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 半乳糖苷键存在于各种质膜和糖蛋白的 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 顺序中,通常地,如在胎球蛋白、血型糖蛋白 A 和许多其它蛋白质中是 $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3(\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 6)\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O}$ 四糖结构的一部分。催化形成这个键的相应的酶,半乳糖基 ($\beta 1 \rightarrow 3$)N-乙酰半乳糖胺 ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 唾液酸基转移酶,已从猪颌下腺纯化到均一。用模型糖蛋白底物(表 31)研究了半乳糖苷($\alpha 2 \rightarrow 3$)唾液酸转移酶的活性,已知的

表 30 猪颌下腺 N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶对模型糖蛋白接受体的活力

结 构	唾液酸化程度 (%)	相对速度 (%)
$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$	86	20
$\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$	88	100
$\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$	19	<1
$\left. \begin{array}{l} \text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow 3 \\ \text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2 \end{array} \right\} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Thr}$	0	-

摘自 Beyer, T. A. et al., 1979, J. Biol. Chem., 254, 12531.

最好的接受体是含 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O 双糖的糖蛋白。倒数第二位的 N-乙酰半乳糖胺基的唾液酸化减慢反应速度。当半乳糖的 2-位羟基岩藻糖基化, 酶活力就完全消失。含末端 Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 顺序的 2 型的 O-连接的糖蛋白无接受体活性。因此, 这个酶不能形成在某些 N-和 O-连接的糖蛋白寡糖中的 Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 顺序。

Sia2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3/4 GlcNAc 顺序中的唾液酸基 (α 2 \rightarrow 3) 半乳糖键。唾液酸基 (α 2 \rightarrow 3) 半乳糖键, 除在 Sia α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 顺序外, 存在于 N-连接的糖蛋白的 1 型和 2 型链中和 O-连接的糖蛋白的 2 型链中, 唾液酸连接于半乳糖的 3-位羟基。van den Eijnden 和 Schiphorst 最先用 2 型链为底物和从胎牛肝制备的微粒体酶, 在离体条件合成了这种键。后来, 在其它动物的各种组织中亦发现了半乳糖基 (β 1 \rightarrow 3/4)N-

表 31 半乳糖基(β 1 \rightarrow 3)-N-乙酰半乳糖胺(α 2 \rightarrow 3)唾液酸基转移酶对模型糖蛋白接受体的活力

结 构	唾液酸化程度 (%)	相对速度 (%)
Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O-Thr	87	100
NeuAc α 2 \rightarrow 6 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc α 1-O-Thr	80	17
Fuca1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1-O-Thr	2	0
Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β ...	0	0

出处同表 30。

表 32 半乳糖苷(α 2 \rightarrow 6)唾液酸基转移酶对模型糖蛋白接受体的活力

结 构	唾液酸化程度 (%)	相对速度 (%)
Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β ...	89	100
Gal β 1 \rightarrow 4 Fuca α 3 GlcNAc β ...	1	0
Fuca1 \rightarrow 2Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β ...	46	<1
GalNAc α 1 \rightarrow 3 Fuca1 \rightarrow 2 Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β ...	2	0
Gai β 1 \rightarrow 3GlcNAc β ...	0	0

摘自 Beyer, T. A. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 12531; 和 Paulson, J. C. et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, 4034.

乙酰葡萄糖胺 (α 2 \rightarrow 3) 唾液酸基转移酶。大鼠肝的这种唾液酸基转移酶已纯化到均一。对纯化的酶, 通常 1 型受体活力比 2 型高, 含有相同键的较大的寡糖比二糖活力高。

Sia α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 顺序中的唾液酸基 (α 2 \rightarrow 6) 半乳糖键, 存在于 N-连接的和某些 O-连接的寡糖中。这种键在离体条件的合成, 用山羊、牛或人的结肠的酶和乳糖为接受体获得成功。纯化的唾液酸基转移酶的接受体底物专一性表明绝对需要 N-连接的寡糖的 2 型链中的半乳糖。抗冻糖蛋白和颌下腺粘蛋白的 O-连接的链没有活力。对较大寡糖的专一性, 看来同样严格, 因为乳糖基-N-新四糖是好的底物, 而乳糖基-N-

四糖完全没有活力(表 32)。

半乳糖、N-乙酰半乳糖胺和 N-乙酰葡萄糖胺,既位于 O-连接的寡糖的末端,亦位于糖链的中间。然而,以这些糖基为末端的键,与这些糖基占中间位置的键完全不同。由于以唾液酸终止寡糖链,往往干扰以中性糖终止糖链,终止链的糖苷转移酶如前所述,可分为两组:(a)血型糖基转移酶,催化人红细胞和有血型活性的粘蛋白的 ABH 和 Lewis 结构的形成;(b)唾液酸基转移酶。

(二) 通过甘露糖基-丝氨酸(或苏氨酸)连接的寡糖

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 蛋白质糖基化中, Man-P-Dol 是唯一的直接连接丝氨酸或苏氨酸的糖基前身,而 GDP-Man 则是其它甘露糖基的供体。2-去氧葡萄糖抑制第一个甘露糖基的连接。去氧葡萄糖参入到蛋白质中取代甘露糖,并且不能作为结合另外甘露糖基的受体。由于从 GDP-Man 转移 Man 的酶严格需要 Mn^{++} ,使阐明甘露糖基-丝氨酸不同阶段的合成变得更为容易了。因此,当在反应混合物中, Mg^{++} 是唯一存在的金属离子时,只能获得单甘露糖产物。

甘露糖基转移到丝氨酸或苏氨酸,是否需要氨基酸专一顺序,不得而知。甘露糖转移酶的活力,包括丝氨酸结合的甘露糖,以及寡甘露糖基侧链的延伸,均不依赖肽链结构。

蛋白质甘露糖基化包括多萜醇,在另一种酵母 (*Hansenula holsii*) 和真菌,粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*), 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 和腐皮镰孢 (*Fusarium solani pisi*) 中亦已阐明。而在酵母和真菌以外的其它生物中则未发现。

(三) 通过半乳糖基-羟基赖氨酸连接的寡糖

胶原糖基化需要的结合部位,必须在糖基化前,赖氨酸进行翻译后羟基化而形成。这样得到的某些羟基赖氨酸,通过半乳糖基转移酶,糖基化形成 Gal-Hyl。半乳糖基可作为特异的葡萄糖基转移酶的接受体,形成 $Glc_{a1} \rightarrow 2Gal$ 。这两个酶分别利用 UDP-Gal 和 UDP-Glc 为供体,并且每种酶需要锰或另外的二价阳离子。胶原羟基赖氨酸的糖基化与赖氨酸的羟基化,均在内质网同时发生,当胶原链褶叠成为三股螺旋 (triple helix) 时,糖基化即停止。

尽管半乳糖基转移酶不作用于游离的羟基氨基酸,而葡萄糖基转移酶能利用 Gal-Hyl 作为受体。然而,某些 Gal-Hyl 存在于胶原中的事实,提示周围的氨基酸顺序影响这一反应。同样地,在胶原中有许多未取代的羟基赖氨酸,表明半乳糖基转移酶的活力亦受周围氨基酸顺序的影响。结果是,不同的胶原类型糖基化的程度不同。

(四) 通过木糖基-丝氨酸连接的寡糖

木糖基-丝氨酸连接的寡糖在糖蛋白中很少见,至今只在人甲状腺球蛋白中发现。而在蛋白聚糖中则是糖-肽连接的一种主要方式。将于第六章蛋白聚糖的结构和生物合成中阐明。

(五) 糖蛋白合成的亚细胞定域

1. 起始

蛋白质合成过程糖基化的时间和糖基化起始的亚细胞位置,已被广泛地研究。N-糖基化,至少在某些情况,是在翻译过程中开始。然而,起始O-糖基化反应的亚细胞位置,尚未最后确定。

经离心技术,分级分离亚细胞,并对分离的各部分进行分析,表明多肽-N-乙酰半乳糖基转移酶,在多种组织如大鼠脑、小肠粘膜、鸡输卵管、羊乳腺和艾氏细胞中,主要位于高尔基体膜。用大鼠小肠粘膜或脑微粒体作为酶源的实验表明,这个酶的内源肽接受体主要局限在粗面内质网,提示在体内N-乙酰半乳糖胺基转移酶在这些膜中不存在或很不活跃。作用于加入的外源蛋白质受体的酶,也主要集中在高尔基体或光面内质网膜。Hanover等用合成的八肽证实鸡输卵管富含高尔基体膜的成分所含的酶的比活比粗面内质网膜高8至14倍。然而,内质网膜每个细胞含的酶蛋白是高尔基体膜的30—40倍。因此,即使鸡输卵管的N-乙酰半乳糖胺基转移酶在高尔基体膜浓缩8—14倍,仍少于总的内质网细胞转移酶的30%。

O-糖基化发生在高尔基体的另一种证据,是从研究完整细胞中糖基化的时间进程与翻译过程中同位素氨基酸参入的关系获得的。在人绒毛膜癌细胞株系统,外源N-乙酰葡萄糖胺迅速转化为UDP-GlcNAc和UDP-GalNAc。这样,可以用 $[^3\text{H}]$ N-乙酰葡萄糖胺作为O-连接的N-乙酰半乳糖胺的前身,标记绒毛膜促性腺激素(HCG)的 β -亚基的4个O-连接的寡糖。比较N-乙酰葡萄糖胺和氨基酸参入的时间进程,显示分明的差异,大部分O-糖基化在HCG生物合成过程的后期起始和在分泌前的即刻之间,并可能在高尔基体。然而,由于没有分泌颗粒,和细胞内没有成熟的HCG,这种滋养层细胞株的分泌过程可能与其它组织不同。

另一些结果表明,至少上皮粘蛋白的O-糖基化,在翻译过程中,在粗面内质网起始。由于热处理的内质网含有酶的内源接受体,以及糖基转移酶相对地集中于高尔基体,某些起始反应可能在粗面内质网的外部发生。另外,若干已知特性的蛋白质,如牛的X因子,糖基化羟氨基酸发生在羧基末端的几个残基内。不存在翻译后蛋白质水解,这些氨基酸可能在肽链从核糖核蛋白体释放后糖基化。膜结合的转移酶可作用于可溶性肽,所以翻译后的糖基化与酶的已知性质一致。在粗面内质网或高尔基体起始O-糖基化的相对重要性依然未能确定。

2. 延长和终止

O-糖基化起始后,糖链的延长是通过从核苷酸糖供体底物一个一个地加上单个糖基进行的。几乎所有中性的O-连接的结构都比Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc双糖大。形成这些键的半乳糖基转移酶的所在部位,用亚细胞分级分离方法、凝集素结合的糖基转移酶作用的产物的原位组织化学染色、跟踪与蛋白质结合的放射性标记的前身半乳糖的参入,以及细胞内移动的时间进程进行了研究。

对猪气管粘膜进行的亚细胞分级分离,表明(β 1 \rightarrow 3)半乳糖基转移酶在高尔基体以及光面内质网和粗面内质网分别比组织匀浆高24、8和3倍。虽然高尔基体酶的比活比粗面内质网高8倍,但后者的更大得多的容量说明酶主要位于粗面内质网。根据形态定位和生化标记定位,估计粗面内质网和高尔基体中蛋白质的相对量,以及对亚细胞分级分离的各部分的分析,均支持大鼠肝的半乳糖基转移酶位于高尔基体和粗面内质网(表33)。

相反,用相似的方法,提示N-乙酰葡萄糖胺(β 1 \rightarrow 4)半乳糖基转移酶主要限于高

表 33 大鼠肝中N-乙酰半乳糖胺 ($\beta 1 \rightarrow 3$) 半乳糖基转移酶的亚细胞分布

组 分	总活力 ($\mu\text{U/g}$ 肝)	比 活 ($\mu\text{U/mg}$ 蛋白质)	蛋 白 质 (mg/g 肝)	肝中酶的分布 (%)
匀浆	7.68 \pm 5.1	0.38 \pm 0.02	~200	100
总的颗粒体		0.48 \pm 0.03	~160	98
微粒体		1.20 \pm 0.05	~60	50
粗		0.62 \pm 0.04		
光		1.33 \pm 0.08		
高尔基体		11.2 \pm 1.7	~20	30

摘自 Anderson, G. N. & Eriksson, L. C., 1981, *J. Biol. Chem.*, 256, 9633。

尔基体。大鼠肝和牛肝高尔基体中浓集 100 倍的酶。大鼠肝半乳糖基 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶亦集中于高尔基体。用离心方法分离大鼠肝高尔基体亚成分, 表明半乳糖基转移酶和 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶, 位于高尔基体的凹面 [trans face, 亦称成熟面 (maturing face)], 半乳糖基转移酶的内源接受体, 则在高尔基体的凸面 [cis face, 亦称形成面 (forming face), 靠近核被膜或内质网]。在完整的高尔基小泡中, 半乳糖基转移酶和唾液酸基转移酶, 均对蛋白水解酶有抗性, 但当存在去垢剂时则表现敏感, 与这些酶位于高尔基体腔的表面是一致的。

用结合抗体和结合凝集素技术检查糖基转移酶及其反应物在高尔基体内和其膜系统的定位。如辣根过氧化物酶偶联的蓖麻凝集素结合于高尔基小泡和囊向腔表面。肯定了 β -半乳糖苷结构存在于高尔基膜向腔表面。

糖蛋白糖的放射性前身参入的时间进程的研究, 确定了绝大多数 O-连接的糖基化发生在高尔基体, 并且亦阐明了糖基化蛋白质从合成到分泌, 或参入到质膜, 在细胞内移动的时间进程。氚标记葡萄糖静脉注射入大鼠体内, 单次注射即可使结肠杯状细胞很快标记。注射后 5 分钟, 放射自显影显示参入到高尔基体囊。20 分钟后, 与高尔基体毗连的粘蛋白原颗粒被标记。40 分钟后, 基本上全部标记物在粘蛋白原颗粒。再过 4 小时, 颗粒移至细胞顶端。 $[^3\text{H}]$ 半乳糖和 $[^3\text{H}]$ 岩藻糖的参入时间进程的研究, 得到与 $[^3\text{H}]$ 葡萄糖相似的结果。表明底物和糖基转移酶均位于高尔基体。

以上结果均说明大多数蛋白质的糖基化, 特别是寡糖链的延长和终止, 是在高尔基体起始并完成的。

(六) O-连接的糖蛋白合成的调控

已知的 O-连接的寡糖结构的多样化是令人瞩目的。但不是无序的。在不同类型的糖蛋白中, 占优势的寡糖结构各种各样, 提示存在专一糖结构的合成和终止的调控机制。糖基在糖蛋白糖基化途中经过的许多代谢相互作用, 给调控提供许多可能的部位。能影响糖基化的翻译后因素, 包括核苷酸糖供体合成的速度、供体底物在细胞内的转运、接受体底物的易接近性和结构、抑制剂浓度、其它糖基转移酶的交叉专一性竞争等。

1. 供体底物和代谢物的利用

糖基转移酶反应利用的所有供体核苷酸糖, 包括在 O-连接的寡糖合成中的供体核苷酸糖, 都在远离糖基转移酶作用的场所生成。UDP-半乳糖、UDP-N-乙酰葡萄糖胺、

UDP-N-乙酰半乳糖胺和 GDP-岩藻糖看来是在细胞质中合成, CMP-唾液酸可能在细胞核中合成,一旦形成,核苷酸糖转入高尔基体,在那里,用于合成糖蛋白。糖基转移酶作用的产物, 5'-核苷酸,不仅是核苷酸糖转运的强抑制剂,而且也抑制糖基转移酶活力。除非这些产物从高尔基体移去,它们将积聚,并且阻止再合成糖蛋白。体内其它核苷酸浓度,可能已足够抑制核苷酸糖转移和糖基转移酶活力,因此,这些抑制剂水平的变化,可能调节糖蛋白合成。

2. 多肽结构和 O-糖基化

O-连接的糖蛋白中糖链的定位,不像 N-连接的糖蛋白,由三肽控制。因此,注意力从 O-连接的糖蛋白的一级结构,转向可能影响糖基化的较高级的蛋白质结构。

用 Chou 和 Fasman 方法,从糖基化的丝氨酸基和苏氨酸基的氨基酸顺序预测二级结构。检查的 8 个顺序中,每个顺序中糖基化的氨基酸基都位于预测的 β -转角。这 8 个例子中的 4 个取自人绒毛膜促性腺激素, 2 个取自免疫球蛋白的转折区, 2 个取自牛颌下腺粘蛋白的部分顺序。Loucheux-Lefebvre 等将同样的方法用于牛和羊的 K-酪蛋白,并推断在每个蛋白中,糖基化苏氨酸可能是 β -转角的第一个残基。

用这个方法预测的 β -HCG、兔 IgG 和人 IgG₃ 的构象,与 Aubert 等预测的有较大的差异。Chou 推测的 β -HCG 的四个 β -转角,Aubert 等预测是无规的,因为没有提供稳定性的毗连的 α 和 β 区。同样,亦预测人 IgG₃ 和兔 IgG 的转折区有无规结构。

尚不了解添加的寡糖对蛋白质二级结构的效应。不幸的是,可能揭示糖基氨基酸周围独有的结构特征的结晶学数据,对任何一个 O-糖基化蛋白质无用。目前没有专一的一级或二级结构能说是 O-连接的寡糖合成所需要的。

3. 效应分子

Seudder 等提出,哺乳动物体内结合糖的凝集素可能修饰糖基转移酶活性,他们发现牛心的低浓度的 (0.5mg/ml) 结合 β -半乳糖的凝集素,激活从牛初乳分离的半乳糖基 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶。各种结合半乳糖的凝集素亦产生相似的效应。这种效应的机制尚未阐明。从这些数据提出了所谓动物凝集素的另一种可能的作用:通过调控糖基转移酶活性来调节糖蛋白合成。

4. 糖基转移酶作用的顺序

目前了解最清楚的糖蛋白结构的决定因素,是糖基转移酶的底物专一性。适用于这些酶的连锁限制,将那些可能合成的寡糖结构限于少数。再者,各种糖基转移酶之间对底物要求的的关系,提示这些酶的活性相对的改变可解释在不同组织的糖蛋白中观察到的糖基化模式。足够的信息可用于表达某些颌下腺粘蛋白的合成的代谢途径,并解释为何在羊和猪颌下腺的粘蛋白中某些结构占优势。对 ABO 和 Lewis 血型活性结构的合成,以及对质膜和血糖蛋白的共同的 O-连接的结构的一些限制,也是显然的。

(1) 粘蛋白寡糖的合成 已知的粘蛋白的生物合成中,糖基转移酶之间底物专一性的关系如图 41 所示。

糖基化由多肽-N-半乳糖胺基转移酶起始形成结构 a,然后,两个糖基转移酶中的一个作用于它。6-位羟基唾液酸化产生结构 c。这一结构不能作为任一已知糖基转移酶的底物,因为唾液酸化终止链生长。然而,在 3-位羟基加上半乳糖,产生的结构 d 具有几种可能的命运。或者是唾液酸化和链终止,或者半乳糖基化,发生链再生长,何者占优势,部

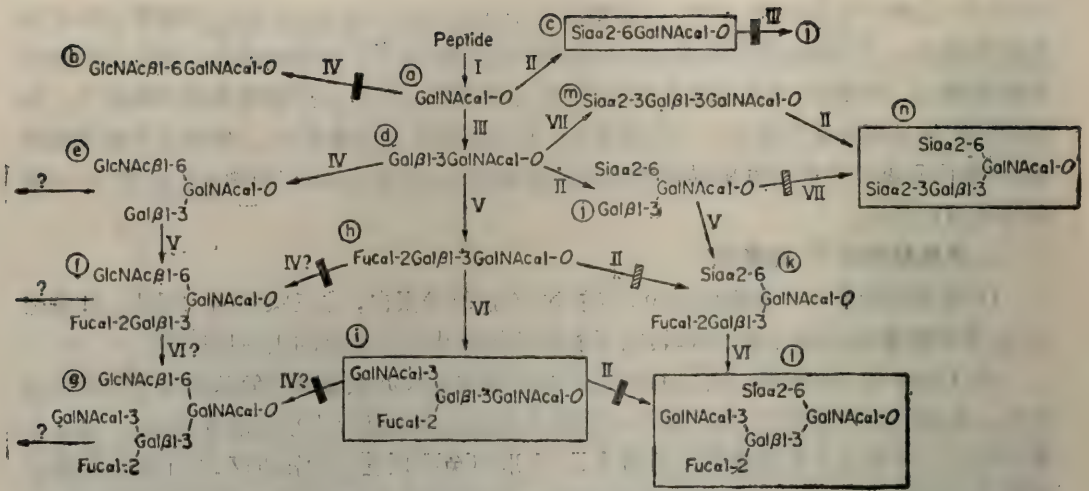


图 41 O-连接的粘蛋白寡糖的生物合成途径。

- I = 多肽 ($\alpha 1-O$)N-乙酰半乳糖胺基转移酶;
 - II = α -N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶;
 - III = α -N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\beta 1 \rightarrow 3$) 半乳糖基转移酶;
 - IV = α -N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\beta 1 \rightarrow 6$) N-乙酰葡萄糖胺基转移酶;
 - V = β -半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶;
 - VI = (岩藻糖基 $\alpha 1 \rightarrow 2$) β -半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) N-乙酰半乳糖基转移酶;
 - VII = 半乳糖基 ($\beta 1 \rightarrow 3$) N-乙酰氨基半乳糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 唾液酸基转移酶。
- (出处同表 16)

分由相应的唾液酸基转移酶和半乳糖基转移酶的相对活力决定。在羊颌下腺中，唾液酸基转移酶(II)有足够的活力影响几乎所有的寡糖合成，导致形成具有结构 c 的二糖。在羊颌下腺粘蛋白中，寡糖链比结构 c 长的不超过 3%。相反，猪颌下腺的半乳糖基转移酶(III)的活力大约比羊颌下腺的大 30 倍。在猪颌下腺 A⁺ 粘蛋白中，具有结构 c 的寡糖链大大地少于 20%。

从 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc-O 合成猪颌下腺粘蛋白特有的较大的寡糖，由 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酸基转移酶 II 起始，通过图 41 右边的途径引出结构 j。假如岩藻糖取代唾液酸，加到正在生长的链上的第三个糖基，沿中路形成中性寡糖。可能连接居中路的中途物作为与右边中间物的反应或很慢或受阻。因此 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ GalNAc (结构 d) 的岩藻糖基化，导致缺 N-乙酰葡萄糖胺的中性寡糖堆积，而唾液酸化则引出酸性寡糖。由于天然的猪颌下腺粘蛋白中存在结构 i 和 l，岩藻糖基转移酶和唾液酸基转移酶可能不是强制以特定的次序作用着，天然粘蛋白中这些结构的比例，可能反映这些酶对共同受体结构 d 竞争的相对活力。

由 ($\beta 1 \rightarrow 6$)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 (IV) 起始进入左边的途径(图 41)，在 N-乙酰半乳糖胺的 6-位羟基加上 N-乙酰葡萄糖胺，产生结构 e。含 N-乙酰乳糖胺的 O-连接的糖蛋白，如存在于卵巢囊液、胃和结肠粘膜的那些结构的合成，从左路开始。这个酶底物专一性的初步表征，提示中路的各个结构不能参与含 N-乙酰葡萄糖胺结构的寡糖的合成。因此，结构 d 在 O-连接的糖合成中处在分支点上。酶 II、IV 或 V 的反应，付予中间物如图 41 所示的三条途径之一进行进一步的修饰。

(2) 1型和2型糖链生长的终止 在卵巢囊液和胃肠粘膜的O-连接的寡糖中,存在具有多达4个不同非还原末端的N-乙酰乳糖胺分支的、各种长短不一的1型和2型链,1型和2型的每个双糖可被1至3个外加的糖基取代,即使不是全部。很多2型链可能由N-乙酰葡萄糖胺($\beta 1 \rightarrow 4$)半乳糖基转移酶合成。根据已了解的底物专一性,近期发现的N-乙酰葡萄糖胺($\beta 1 \rightarrow 3$)半乳糖基转移酶能形成某些,也许全部O-连接的糖蛋白的1型键。这两种糖基转移酶的专一性有交叉,因此,在O-连接的糖合成的途径中,它们限定分支点。这两种酶的最小的可能的O-连接的底物是具有下列结构的三糖:GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 6$ (Gal $\beta 1 \rightarrow 3$)GalNAc $\alpha 1$ -O(图41结构e),两种半乳糖基转移酶均可能糖基化这一三糖(图42)。两种产物的结构能在人卵巢囊液糖蛋白的寡糖中检测到。

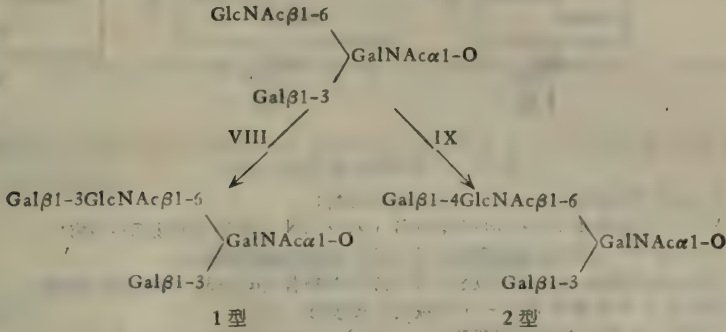


图42 粘蛋白寡糖的1型和2型-N-乙酰乳糖胺结构的生物合成。

VIII = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷($\beta 1 \rightarrow 3$)半乳糖基转移酶;

IX = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷($\beta 1 \rightarrow 4$)半乳糖基转移酶。

(出处同表16)

1型和2型键一旦形成,随后的糖基转移酶的作用使之延长,或由三种糖基转移酶中的一种终止链生长(图43,44)。

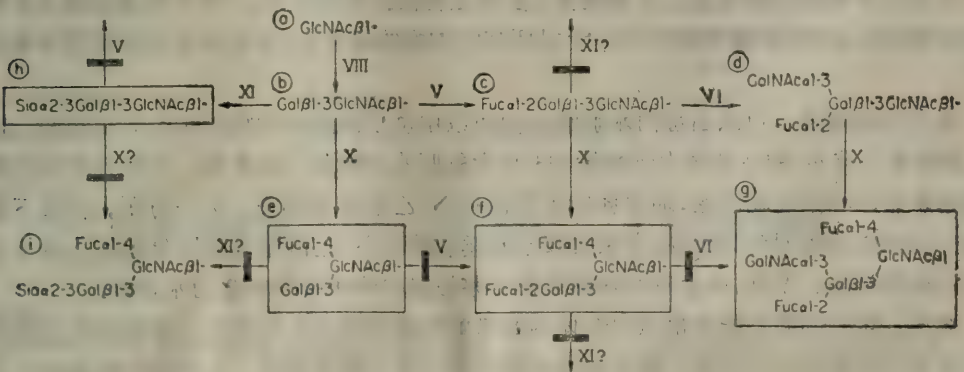


图43 1型寡糖合成的终止途径。

V = β -半乳糖苷($\alpha 1 \rightarrow 2$)岩藻糖基转移酶; VI = (岩藻糖基 $\alpha 1 \rightarrow 2$) β -半乳糖苷($\alpha 1 \rightarrow 3$)N-乙酰半乳糖基转移酶; VIII = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷($\beta 1 \rightarrow 3$)半乳糖基转移酶; X = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷($\alpha 1 \rightarrow 4$)岩藻糖基转移酶; XI = 半乳糖基($\beta 1 \rightarrow 3/4$)N-乙酰氨基葡萄糖苷($\alpha 2 \rightarrow 3$)唾液酸基转移酶。(出处同表16)

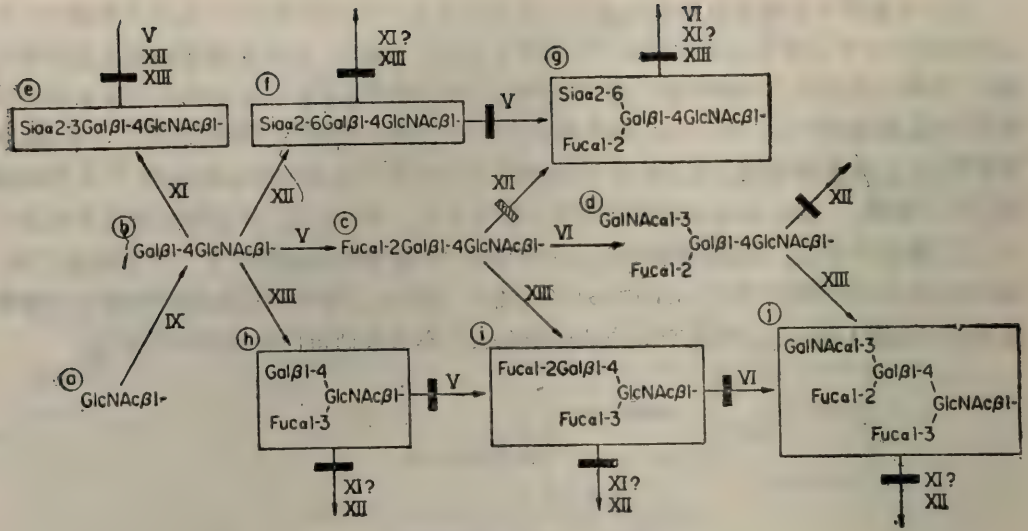


图 44 2 型寡糖合成的终止途径。

- V = β -半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 2$) 岩藻糖基转移酶;
 VI = (岩藻糖基 $\alpha 1 \rightarrow 2$) β -半乳糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 3$)N-乙酰半乳糖胺基转移酶;
 IX = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\beta 1 \rightarrow 4$) 半乳糖基转移酶;
 XI = 半乳糖基 ($\beta 1 \rightarrow 3/4$)N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 3$) 唾液酸基转移酶;
 XII = β -半乳糖苷 ($\alpha 2 \rightarrow 6$) 唾液酶基转移酶;
 XIII = β -N-乙酰氨基葡萄糖苷 ($\alpha 1 \rightarrow 3$) 岩藻糖基转移酶。
 (出处同表 16)

三、降解代谢

能够切断糖蛋白中各种类型键的酶遍布于自然界,包括各种糖苷酶和蛋白酶。在动物中,这些酶主要位于溶酶体。植物和微生物也产生很多种类的糖苷酶。在植物中,这些酶主要担任多糖的降解代谢。在植物界,多糖比糖蛋白丰富得多。因为细菌看来几乎完全缺乏糖蛋白,细菌的糖苷酶作用在于损坏其它细胞的成分,主要是多糖和含有营养物的糖。

糖蛋白的降解,可以由蛋白水解酶,也可以由位于溶酶体的糖苷酶的作用起始。这样,胎球蛋白或 α_1 -酸性糖蛋白于酸性 pH 与大鼠肝的溶酶体一起温育,导致几乎同时释放游离氨基酸和游离唾液酸,随后释出半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺。另一方面,当颌下腺粘蛋白与同样的酶混合物保温,在相当部分的唾液酸和 N-乙酰半乳糖胺除去前,不发生蛋白主链的降解。无疑,高含量的唾液酸使完整粘蛋白分子能抵御蛋白水解酶。

然而,这些实验不能为糖蛋白在体内的降解代谢提供更多的信息。糖蛋白糖链的降解代谢途径的绝大部分知识,是从对人遗传疾病的代谢研究获得。这些遗传疾病由于缺乏专一的溶酶体水解酶造成。

由于参与分解代谢的绝大多数糖苷酶是外切酶,糖链降解是一个一个地将糖基从非还原末端降解下来。以典型的天冬酰胺连接的二头天线的复杂型糖链为例(图 45)。这样的降解机制,必需存在降解糖链的全部单糖所需要的全套外切糖苷酶。假如缺失其中

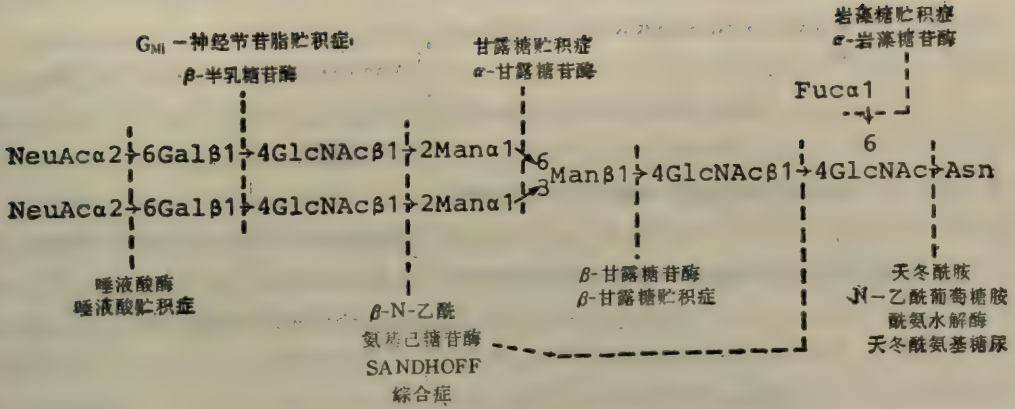


图 45 天冬酰胺连接的糖链降解代谢有关的酶及先天性酶缺失导致的疾病。(出处同表 10)

的一个酶，糖链的分解代谢将在那一个酶作用的地方停止。几乎所有外切糖苷酶都有先天性缺少或不足的病例。

表 34 糖复合物代谢异常者的酶缺失情况

酶缺失	积贮(和/或分泌)物质	疾病名称
糖苷酶		
α-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	硫酸乙酰肝素	粘多糖贮积症 IIIB (Sanfilippo B)
β-N-乙酰氨基己糖苷酶 A	GM ₁ -神经节苷脂	Tay Sachs
β-N-乙酰氨基己糖苷酶 A 和 B	GM ₂ -神经节苷脂, 红细胞糖苷脂寡糖	Sandhoff
α-L-岩藻糖苷酶	岩藻寡糖, 糖肽, H 同种抗原脂	岩藻糖贮积症
α-半乳糖苷酶	脂酰鞘氨醇己三糖	Fabry
β-半乳糖苷酶	GM ₁ -神经节苷脂和寡糖	GM ₁ -神经节苷脂贮积症
半乳糖脑苷脂酶(β-半乳糖苷酶)	半乳糖脑苷脂	Krabe
葡萄糖脑苷脂酶(β-葡萄糖苷酶)	葡萄糖脑苷脂	Gaucher
β-葡萄糖醛酸酶	皮肤素, 硫酸乙酰肝素, 硫酸软骨素	粘多糖贮积症 VII
α-艾杜糖醛酸酶	硫酸乙酰肝素硫酸皮肤素	粘多糖贮积症 IH 和 IS (Hurler 和 Scheie)
α-甘露糖苷酶	甘露糖苷	甘露糖贮积症
唾液酸酶	唾液酸寡糖, 有时亦有糖胺多糖和鞘糖脂	粘脂贮积症 (Mucopolipidosis) I
其它水解酶		
天冬酰胺 N-乙酰葡萄糖胺酰氨基水解酶	天冬酰胺 N-乙酰葡萄糖胺 天冬酰胺寡糖	天冬酰氨基葡萄糖尿
转移酶		
乙酰辅酶 A ₁ : α-氨基葡萄糖苷 N-乙酰转移酶	硫酸乙酰肝素硫酸盐	粘多糖贮积症 IIIC(Sanfilippo C)
N-乙酰葡萄糖胺 1-磷酸转移酶	唾液酸寡糖, 有时也有糖胺多糖和鞘糖脂	粘脂贮积症 II (I 细胞)

摘自 Dawson, G., 1979, In "Complex carbohydrates of nervous tissues", Eds. Margole's, R. V. & Margole's, R. K., Plenum Press, New York; Brady, R. O., 1978, *Ann. Rev. Biochemistry*, 47, 687; Klein et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 75, 5158.

经组织中亦观察到这一寡糖，以及红细胞糖苷脂和去唾液酸-GM₂神经节苷脂的大量积贮。各种类型的 GM₁-神经节苷脂贮积症患者，缺乏 β -半乳糖苷酶，造成在肝脏中硫酸角质素类物质和在脑中 GM₁-神经节苷脂的积贮，以及在肝脏和其它组织，包括脑，从受损害的糖蛋白代谢获得的半乳糖寡糖的积贮。

从对各种复合糖类代谢疾患者的分泌物，和积贮物的分析结果看来，内切和外切糖苷酶二者都参与糖蛋白的降解代谢。唾液酸糖蛋白的降解，一般由唾液酸酶的作用起始，唾液酸酶将含唾液酸的糖蛋白转变成一个更容易受蛋白水解酶作用的形式。其它外切糖苷酶的活力，需要先经蛋白水解酶将糖蛋白降解成糖肽，或者先由内切糖苷酶将糖蛋白转变为寡糖，因为许多外切糖苷酶对完整的糖蛋白作用很差。两种情况的不论哪一种，外切糖苷酶的缺失，会阻止下一个酶的作用。这不仅适用于 N-糖苷键糖链的降解，亦适用于 O-糖苷键的糖链。失去外切糖苷酶中的 1 个酶，糖链的降解被抑制，寡糖以不完全降解产物积贮，并分泌到尿中。

先天性糖代谢有缺陷的患者，主要分泌寡糖而不是糖肽，以及 N-乙酰葡萄糖胺是积贮的寡糖的还原末端，支持内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶在糖蛋白的 N-糖苷键寡糖的降解代谢中起关键作用。在动物中存在内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶，至今只有很少的直接证据。唾液酸贮积症患者的尿和组织中存在还原末端具有一个 N-乙酰葡萄糖胺的唾液酸寡糖，示意内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶可以作用于唾液酸化了的糖蛋白和糖脂。

Nishigaki 等首先报道哺乳动物组织中，含有水解天冬酰胺糖链的 N, N'-二乙酰甲壳双糖的内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶。不象各种外切糖苷酶，这个酶不位于溶酶体，而是在细胞质和质膜。对酶的底物专一性的研究表明，假若糖链最邻近氨基酸的 N-乙酰葡萄糖胺基未被岩藻糖基取代，它既水解高甘露糖型糖链，亦水解复杂型糖链。由于高甘露糖型糖链不包含岩藻糖，很容易被内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶水解。没有岩藻糖的复杂型糖链亦被此酶分解，但是有岩藻糖的糖链必须经 α -岩藻糖苷酶除去岩藻糖后，才能被降解(图 46)。

第五章 糖蛋白的功能以及结构和功能的关系

糖蛋白在生命系统中执行着许多重要的任务(表1)。尽管糖蛋白的结构和代谢的知识有惊人的发展,但糖对糖蛋白的功能所作出的贡献知道得不多。糖蛋白寡糖部分的功能是当代细胞生物学的中心问题之一。作用于大分子底物和细胞的糖苷酶和糖基转移酶,以及专一抑制蛋白质糖基化的药物如衣霉素等的应用,为糖蛋白的功能提供了很多的信息。另一个潜在的、有用的信息来源,是对遗传性糖蛋白代谢紊乱的分子基础的研究,和糖基化有缺陷的突变株细胞,特别是抗凝集素细胞的研究。

一、糖蛋白中糖链的功能

虽然糖蛋白的寡糖链很少影响糖蛋白的生物学活性,无论是酶、激素、载体蛋白、凝集素等。但是糖可通过改变蛋白质的疏水性、电荷、溶解度、粘度、质量和大小,修饰蛋白质的理化性质。另外,与早期设想的不同,通常糖基化对分泌不是必需的。绝大多数糖蛋白的糖是没有免疫原性的;明显的例外是血型物质,在血型物质中,糖链的非还原末端糖的顺序是免疫专一性的抗原决定簇。特别重要的是糖蛋白(和糖脂)的糖在溶液中和细胞表面是重要的识别标记。

常用的研究糖蛋白的寡糖功能的方法有四种:(1)用高碘酸或糖苷酶或糖基转移酶破坏或改变糖链结构,(2)在合成过程中用抑制剂阻止蛋白质糖基化,(3)分离合成寡糖中间体有缺陷的变异细胞,(4)用蛋白质加工的抑制剂修饰寡糖结构。

(一) 对糖蛋白性质的影响及生物学活力

1. 寡糖对糖蛋白理化性质的影响

动物体内的粘液蛋白的一个极重要的作用是作为润滑剂。如眼内的粘液蛋白,使眼球转动,防止角膜干燥。口腔和胃肠道的粘液蛋白,起润滑食物,保护胃肠道粘膜的作用。呼吸道上皮不断往外输送的粘蛋白层,为进入的空气提供湿度,捕获细菌和空气中的杂质,从而保护肺部,使其清洁无菌。子宫颈管有一个极粘滞的粘蛋白栓,它使细菌不能进入子宫腔。有趣的是只有在排卵期,这一屏障粘度降低,允许精子进入。

粘液蛋白的粘稠,可能与其分子所含的唾液酸有关,对富含唾液酸的唾液腺糖蛋白(即牛和羊的颌下腺粘蛋白)的研究表明,唾液酸使粘液高度粘稠,由于唾液酸的低pK值,在生理pH,它们的羧基完全解离,粘蛋白分子上存在的负电荷,赋予粘蛋白分子一种伸展的、棒状的多电解质结构。这些分子的空间是充满的,导致形成粘弹性的凝胶。然而,唾液酸在唾液腺粘液功能中的作用的概念,不适用于子宫颈的和气管的粘液。因为用酶催化的方法,除去牛子宫颈粘蛋白的唾液酸并不影响它的切变模量(shear modulus)。同样地,用酶除去狗气管粘蛋白的唾液酸,粘蛋白的粘弹性基本上没有改变。去唾液酸对各种粘蛋白流变性质的不同效应的可能解释,是子宫颈和气管粘蛋白寡糖链的结构和分

布与唾液腺粘蛋白显著不同。因此,去唾液酸对它们的效应亦不同。

除去芳香基硫酸酯酶和 α -半乳糖苷酶的唾液酸,导致它们最适 pH 的改变。

Waldenström 巨球蛋白(冷凝集素, MKV)是一个有趣的物质,它是对唾液酸专一的,而本身又含有唾液酸的凝集素,在冷的情况下沉淀,而在 37°C 溶解的冷球蛋白。若经酶的作用去除唾液酸,去唾液酸的蛋白质,即使凝集活性未变,在冷的情况下不再沉淀。据此推测,在冷的情况下,冷球蛋白可形成低溶解度的分子间复合物,除去唾液酸影响分子间的结合,使不能沉淀,但不影响糖的结合部位。

除了去除唾液酸之外,亦测试过若干糖蛋白去糖基之后的效应。糖蛋白分子中的寡糖起着稳定糖蛋白,使能抵抗变性的作用,但通常不影响生物学活性(表 35)。例如去糖基(除去 90% 的糖)的酵母转化酶,保留其生物学活性,但对热、酸和冻溶的敏感性增强,比未修饰的糖蛋白容易变性。热失活率随蛋白质与糖的比而变化,糖含量减少,失活率升高。水泡性口炎病毒的未糖基化 G 蛋白不溶于含 Triton X-100 的缓冲液,糖基化的蛋白质则溶解于这种缓冲液。虽然未糖基化的干扰素保留了它的抗病毒活力,但对热变性较敏感,而且与抗天然干扰素抗体的亲和性亦不同于糖基化的干扰素。牛胰核糖核酸酶 A 和 B(A 不含糖基, B 含糖 9.4%) 的热变性研究表明,核糖核酸酶 B 的稳定作用的自由能每摩尔比核糖核酸酶 A 大数百卡。

表 35 糖修饰对糖蛋白的稳定性和生物学活性的效应

糖蛋白	含糖量 (%)	处 理	保留的糖 (%)	效 应		
				对变性的稳定性	可消化性	生物学活性
酶						
菠萝蛋白酶	3.6	高碘酸氧化	0.72			0
葡萄糖淀粉酶 I		同上		↓		
葡萄糖氧化酶	12	同上	4.8	↓		0
绿豆核酸酶	29	内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	2.9			0
猪胰核糖核酸酶	38	外切糖苷酶	9.5		↑	
酵母表面的核酸酶 (external)	50	内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	5	↓	↑	
凝集素						
双花菘豆	4	α -甘露糖苷酶	2.4			0
大豆	6	过碘酸氧化	3			0
其它						
人干扰素		外切糖苷酶				0
鼠干扰素		衣霉素存在时形成	(0)	↓ ^b		0
凝血酶原	10	外切糖苷酶	3			0

a. 不纯的制剂。

b. 仅存在变性剂的情况下。

符号说明: ↓, 下降; ↑, 上升; 0, 没有影响。

出处同表 1。

用化学方法将葡聚糖连接到溶菌酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶,可增加这些酶的稳定性。

除去或修饰(化学的或酶催化的)南极鱼抗冻蛋白的 Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc 双糖,糖蛋白即失去降低水的冰点的能力,双糖的作用看来是与水分子形成氢键,因此阻止冰晶的形

成。

以上研究表明,在某些情况,糖对维持正常的蛋白质的理化性质是重要的。

2. 对蛋白质构象的影响

核糖核酸酶 A 和 B 的旋光色散,圆二色性和差光谱测量,提示两种酶的多肽主链的构象,以及在自然状态暴露的酪氨酸基数目是相同的。比较未糖基化和糖基化(含 38% 糖)的猪核糖核酸酶的圆二色光谱,也表明糖的存在不影响多肽主链的构象。再者, α_1 -酸性糖蛋白的构象研究亦表明糖对多肽不产生构象的任何扰乱。

然而有的研究表明,糖可能起稳定蛋白质构象的作用。人 IgG Fc 补体结合的片段的 X 射线晶体分析表明糖遮盖了蛋白质的疏水区,提示这种分子构造主要为了稳定糖蛋白的构象和增加溶解度。用内切 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶从酵母转化酶除去 90% 的糖。经盐酸胍变性后,去糖基的酶重新获得活性的速度,比完全糖基化的酶明显地慢得多。另外,复性后的两种形式的酶的荧光和圆二色性揭示它们的构象不同,从变性-复性实验表明酵母转化酶的寡糖部分,促使酶蛋白褶皱为更稳定和更有抗性的构象。

3. 增强抗蛋白水解酶的作用

很久已知道,糖蛋白,特别是含糖丰富的蛋白质,对蛋白水解酶具有相当的抵御能力。这可能是由于糖位于蛋白质的 β -转折处,起局部庇护作用,阻止蛋白水解酶到达肽链。流感病毒凝集素三聚体,糖覆盖了 17—20% 的有效表面,被覆盖的细胞外氨基酸大约有 60% 是亲水的,这些氨基酸中有不少是胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶分解的潜在部位。

用抑制蛋白质糖基化的抑制剂衣霉素处理体外培养的细胞,降低细胞表面的糖蛋白,如鸡胚成纤维细胞的纤维粘连蛋白,鸡胚肌肉的乙酰胆碱受体和成肌细胞融合蛋白,当加入蛋白酶抑制剂如 leupeptin 和 pepstatin,可部分恢复细胞表面这些蛋白质的水平,提示细胞表面糖蛋白的降低是由于蛋白水解酶的降解作用。链霉蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶分解未糖基化的纤维粘连蛋白比糖基化的快得多。纤维粘连蛋白中结合胶原的片段(含糖丰富)对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的水解作用有抗性,而未糖基化的纤维粘连蛋白的相应的片段被这两种酶完全水解。人胎盘纤维粘连蛋白比血浆的这一蛋白质的抗蛋白酶的水解作用强,归因于胎盘纤维粘连蛋白比血浆纤维粘连蛋白含大约多二倍量的糖,因为它们的多肽结构是一样的。

从各种糖蛋白如 DNase、RNase B、转化酶、羧肽酶 Y、绿豆核酸酶 I、青霉素核酸酶 P 或牛颌下腺粘蛋白除去寡糖部分后,它们对蛋白水解酶的敏感性增加。

寡糖的大小和在肽链中的位置影响蛋白水解酶分解肽链的能力。牛胰核糖核酸酶 A 和 B 的差别是 RNase B 肽链的第 34 个氨基酸——天冬酰胺上连接 1 条高甘露糖型的糖链,比较 RNase A 和含不同长短糖链的 3 种 RNase B 对胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的敏感性,结果表明,完全糖基化的 RNase B 对胰蛋白酶的抗性比 RNase A 大 6—10 倍,具有寡糖链的 RNase 的酶解速度与糖链所含甘露糖基的数目成反比。保护效应与寡糖在肽链的位置和肽链上胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶起始的或主要的分解部位的距离成反比。

4. 在蛋白水解酶加工前身糖蛋白时的作用

许多蛋白质和糖蛋白在细胞中合成时,往往先合成 1 个较大的蛋白质。翻译的原始产物,经过一步或多步有控制的蛋白酶解,得到有活性的最终产物。与肽链结合的寡糖能

限制前身蛋白质酶解的位置,因此在前身蛋白质转化为有活性的多肽时,前身蛋白质分子中的寡糖可能对分解模式的专一性起作用。抑制前身蛋白质糖基化对不同的糖蛋白酶解的影响各异。流感病毒的主要被膜蛋白 HA,经蛋白酶分解加工产生两个较小的糖蛋白 HA₁ 和 HA₂。当用糖基化抑制剂,2-氨基-3-脱氧葡萄糖,2-脱氧阿拉伯己糖或衣霉素处理流感病毒 A 感染的鸡胚成纤维细胞,导致形成非糖基化的凝集素蛋白 HA。以及它的分解产物 HA₀₁ 和 HA₀₂ (相应的糖基化的蛋白质命名为 HA、HA₁ 和 HA₂)。它们是不均一的,很可能是由于前身蛋白 HA₀ 缺乏糖的保护,蛋白酶分解时失去专一性控制。

Semliki 森林病毒和 Sindbis 病毒的被膜糖蛋白亦是前身糖蛋白的加工产物, Semliki 森林病毒被膜糖蛋白,称为 E₁、E₂ 和 E₃,是分子量为 130000 的糖蛋白的分解产物。第一次经蛋白酶水解,分离为核心蛋白 C 和分子量为 97000 的前身蛋白,它再分解为 E₁ 和分子量为 62000 的前身蛋白经第三次分解这一前身蛋白转化为 E₂ 和 E₃。然而,糖基化抑制剂对它们产生的影响与流感病毒的不同,在有糖基化抑制剂存在时, Semliki 病毒和 Sindbis 病毒的被膜糖蛋白的非糖基化形式,在细胞内代谢稳定并正确地加工。

糖蛋白的寡糖影响加工的另一个例子是垂体激素的合成。ACTH、 β -脂蛋白、 α -促黑激素和 β -内啡肽均从它们共同的前身蛋白分解产生。在经衣霉素处理的非洲蛙 (*Xenopus laevis*) 的神经间质部分合成的前身蛋白,在细胞内不专一地降解为异常的、无生物学活力的肽。

5. 对糖蛋白分泌的影响

糖基化抑制剂,2-脱氧-D-阿拉伯己糖或衣霉素,对免疫球蛋白分泌的影响已广泛地研究过。结果是十分矛盾的,这种矛盾可能是由于采用的系统不同。例如在一类细胞中分泌所需的构象,在另一类细胞中可能对分泌是不合适的。由小鼠黑色素瘤 (46-B) 生成的未糖基化的轻链的分泌不被 2-脱氧-D-阿拉伯己糖阻止。衣霉素抑制 IgM 和 IgA 的分泌分别为 81 和 64%,而抑制 IgG 的分泌为 28%。未糖基化的 IgA α -链从 MOPC 315 细胞的分泌被衣霉素抑制,但用胰蛋白酶处理细胞表面后,未糖基化 IgA 受体重新出现,换句话说,即 IgA 的分泌被阻止,但在细胞质膜上的插入和正确暴露未受阻。然而,Williamson 及其同工作者的报道,未糖基化的 IgA 和 IgG 的分泌没有明显改变。

对有衣霉素存在时,未糖基化大分子在许多其它细胞中的分泌也进行了研究(表36)。衣霉素不抑制大鼠肝细胞分泌白蛋白(不含糖的蛋白质),转移铁蛋白和 α_1 -酸性糖蛋白。卵粘蛋白从鸡输卵管的分泌不被衣霉素阻断。鸡肝细胞输铁蛋白和非常低密度脂蛋白的脱辅基蛋白的分泌,衣霉素存在时仅减少 10—15%。衣霉素抑制糖化酶的分泌,但不由此导致积聚,可能是未糖基化的 α -糖化酶比天然的酶降解得快,但也可能阻止糖基化抑制糖蛋白的更新合成。

以上少数例子表明糖基化对糖蛋白的分泌并非必需。

泡状口炎病毒突变种 (orsay) 的未糖基化被膜蛋白的装配发生在 30°C 而不是在 38°C,提示非糖基化蛋白仅在较低温度保持其构型,在较高温度则需糖基化来稳定分子。另一方面,虽然衣霉素存在下合成的未糖基化的泡状口炎病毒和 Sindbis 病毒蛋白的代谢是稳定的。然而,在感染过程的任何阶段,不能在宿主细胞表面测到病毒蛋白。

6. 生物学活性

绝大多数糖蛋白的生物活性不需其寡糖部分。未糖基化的纤维粘连蛋白在促使细胞

表 36 抑制糖基化对糖蛋白在细胞内转移和分泌的影响

系 统	糖蛋白	抑 制	
		细胞内移动	质膜沉积或分泌
IR 162 浆细胞	IgE		+
MOPC 21 细胞	IgG	+	±
MOPC 315 细胞	IgA		+
MPC 11 黑色素瘤	IgG 重链	-	-
小鼠浆细胞瘤细胞	IgM		85% 抑制
	IgA		64% 抑制
	IgG		28% 抑制
鸡胚成纤维细胞	酸溶胶原蛋白		-
	纤维粘连蛋白		-
鸡腱成纤维细胞 3 T3 细胞	纤维粘连蛋白		-
Semliki 森林病毒感染的 BHK 细胞	病毒糖蛋白		-
水泡性口炎病毒感染的中国地鼠细胞	病毒糖蛋白	+	-
流感病毒感染的 MDBK 细胞	病毒血凝素	-	-
新城鸡瘟病毒感染的 L 细胞	干扰素		-
输卵管	卵白蛋白		-
酵母	转化酶和酸性磷酸酯酶		+

出处同表 1。

铺开,介导细胞粘着于胶原基质方面,如同天然的那样有效。人 HCG 与受体的结合、干扰素的抗病毒作用等,都不需要糖蛋白分子中的寡糖参加。与这些发现相反,对少数糖蛋白的生物学活性,寡糖是重要的。例如,缺乏糖的半抗原专一的小鼠 IgG 2b 单克隆抗体失去激活补体和与 Fc 受体结合的能力,以及诱导细胞毒的能力。含糖量显著不同的啤酒

酵母羧肽酶的两种分子形式,显示水解 4-硝基苯三甲基乙酸的某些动力学参数明显不同。

通常除去唾液酸不影响糖蛋白的生物学活性,但也有例外,观察到去除糖蛋白糖链末端唾液酸发生显著的生物学活性的改变。在整体测试时,去唾液酸糖蛋白激素,如促滤泡激素、人绒毛膜促性腺激素和红细胞生成素等,完全失去活性,是它们很快从循环系统消失的结果。当在体外测试时,即使去唾液酸后,激素的活力仍能保留。观察到的、肝的结合糖的蛋白质,去除唾液酸导致结合活性消失,看来是由于一个蛋白质分子的结合部位,

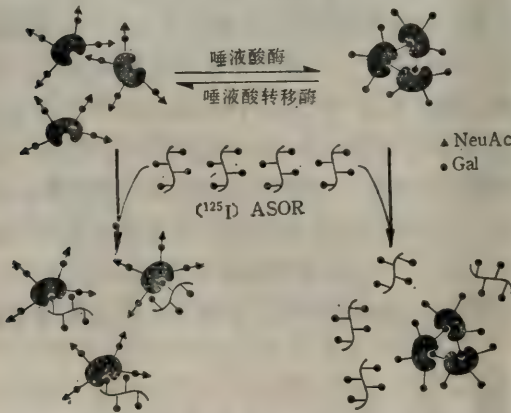


图 47 唾液酸酶抑制肝脏的糖结合蛋白的活性和重新唾液酸化恢复结合活性的机理。装饰了糖链的实心图表示去唾液酸糖蛋白专一的糖结合蛋白。(摘自 Paulson et al., 1977, *J. Biol. Chem.*, 252, 8624)

与另一个分子上因去唾液酸暴露出来的半乳糖基间的相互作用,形成稳定的分子间复合物(图 47)。用半乳糖苷酶从去唾液酸糖蛋白去除半乳糖,可恢复结合活力。

(二) 识别

识别是重要的生命现象。多细胞生物的细胞有多样的识别机制,识别体液中的某些溶解成分,如激素、酶、载体蛋白等;识别细胞间质,如胶原和蛋白聚糖;以及识别其它细胞的质膜成分。识别由细胞外分子与位于细胞质膜的受体专一结合起始;也可以是从不同细胞质膜上的两种成分的专一结合起始。这种结合可能作为诱导细胞生理和代谢状态改变的板机。用这样的机制,每个细胞能作为细胞社会的一员正确地工作。

生物的识别过程中,也包含细胞表面糖基转移酶和糖苷酶的作用。早在1970年Roseman提出,细胞表面糖基转移酶结合于相邻细胞上的底物分子,可能在细胞间的识别与通讯中起作用(表37)。在结肠、胰腺和胃癌患者的血清中,以及在地鼠的病毒变异的BHK细胞的表面,测到半乳糖基转移酶的同工酶,对从人的恶性渗出液纯化的接受体糖肽具有高亲和性。将这一糖肽加至培养细胞的基质中,显著抑制变异细胞的生长和附着。整体实验亦表明糖肽抑制接种的多瘤病毒变异的BHK细胞在地鼠体内发生和发展

表 37 细胞表面的糖基转移酶和糖苷酶

来 源	酶活力专一性
糖基转移酶	
鸡视网膜神经细胞	UDP-Gal, UDP-GalNAc
鸡前视网膜细胞,前顶盖细胞	UDP-Gal:G _{M2}
形成原肠胚的鸡胚	UDP-Gal, UDP-GalNAc, GDP-Fuc, CMP-NeuNAc
血小板	UDP-Glc: 胶原, CMP-NeuNAc: 糖蛋白
Balb/C 3T3 细胞, 3T12 细胞	UDP-Gal
SV40 3T3 细胞	UDP-Gal
病毒变异的 3T3 细胞	CMP-NeuNAc: 去唾液酸糖肽
恶变的大鼠皮肤成纤维细胞	UDP-Gal, CMP-NeuNAc
	UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, CMP-NeuNAc, GMP-Fuc, GMP-Man
小鼠精子	CMP-NeuNAc: 去唾液酸糖蛋白, UDP-Gal, UDP-Gal: 聚-N-乙酰乳糖胺
胚胎瘤细胞	UDP-Gal: 聚-N-乙酰乳糖胺
新生大鼠胸腺细胞和脾淋巴细胞	UDP-Gal
大鼠脾淋巴细胞	CMP-NeuNAc: 糖蛋白
小鼠胸腺细胞和脾淋巴细胞	UDP-Gal
致毒淋巴细胞(CIL)	UDP-Gal
糖苷酶	
牛脑突触体膜	神经节苷脂唾液酸酶
血小板	糖蛋白唾液酸酶
大鼠肝质膜	神经节苷脂唾液酸酶
病毒变异的地鼠细胞株	神经节苷脂唾液酸酶
HSV-变异的细胞	唾液酸酶
3T3 细胞	唾液酸酶
人皮肤成纤维细胞	N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶, N-乙酰-α-D-葡萄糖苷酶, α-D-甘露糖苷酶, β-D-葡萄糖醛酸酶
NIL 细胞	α-D-甘露糖苷酶

摘自 Reading, C. L. Carbohydrate structure, biological recognition, and Immune Function, in The Biology of Glycoproteins, 1984, Ed. Ivatt, R. J., Plenum Press, New York.

肿瘤。另外,小鼠精子获能和在受精过程中与卵透明带结合,都有精子表面的 UDP-Gal 转移酶参与,这种酶作用于具有末端 N-乙酰葡萄糖胺的聚-N-乙酰乳糖胺。在胚胎瘤细胞与聚-N-乙酰乳糖胺复合糖类的结合亦有相似的表面半乳糖基转移酶参与。在牛脑、血小板、大鼠肝质膜、病毒变异的和正常的细胞中,细胞表面唾液酸酶的活力已有报道。Bosman 提出了血小板表面唾液酸酶在细胞粘着中的作用。在细胞与细胞的粘附作用中,亦已提出表面甘露糖苷酶的生物学作用。

糖作为识别标记的概念,主要根据单糖与氨基酸和核苷酸相似,能形成具有非常多样的、专一结构的多聚糖链。然而,由有限数的单糖形成的多样结构,在糖链中比在肽链和核苷酸中多得多。这是因为单糖有 3 至 4 个不同的部位可被下一个糖取代;而氨基酸和核苷酸,都只有一个部位与下一个单体连接。单糖的两种异头结构, α 和 β ,更增加了糖链结构的多样性。糖作为细胞表面识别的专一标记的概念,则是通过糖抗原,如细菌细胞壁和人红细胞的结构研究获得的信息。在这些抗原中,糖链的细微结构变化,可生成显然被专一抗体区别的不同抗原。

任何识别现象都包含两类分子,一类具有识别能力的识别分子,另一类是识别的标记。根据细胞相互作用的许多研究,其中若干作用可能依赖结合糖的蛋白质和细胞表面复杂糖类结构间的互补作用。以糖为识别标记的系统中,与糖专一结合的蛋白质,多数具有凝集素活性(在糖结合蛋白专题中讨论)。通过糖为识别标记的生命活动,在生物体中广泛存在。精子与卵细胞的结合,具有非常强的专一性,受精卵发育过程中细胞的相互作用,分裂细胞的移动、装配并分化形成各种器官和组织,其基本机制可能是细胞与细胞,细胞与其基底膜的识别,糖参与这些识别。肿瘤相关抗原已证明是糖,肿瘤细胞的去接触抑制、浸润与转移,都可能是癌细胞表面糖链结构和构造的细微变化导致的。细胞与细胞间的粘着,如酵母菌的有性生殖、粘菌凝聚、海绵细胞再团聚,都是以糖为识别标记的。寄生物与宿主的作用,如细菌和病毒感染宿主,宿主粘膜细胞表面的糖是细菌和病毒识别的标记。血清糖蛋白在循环系统中的“寿命”,也取决于糖蛋白糖链的结构。

1. 可溶性糖蛋白的糖

(1) 参与组织亲和抗原 糖参与组织亲和免疫应答抗原是争论了若干年的问题。近来,积累的证据表明在这些“多态”系统中的某些抗体,既识别蛋白质抗原也识别糖抗原。人的某些抗-HLA 专一性有糖参与。HLA 抗原经链霉菌蛋白酶消化产生含少量氨基酸和完整寡糖的糖肽,这些糖肽与完整的 HLA 一样专一地抑制抗-HLA 抗血清的作用。再者,5mmol/L 高碘酸于 pH 5 和 4°C,在暗处与 HLA 反应 30 分钟,70% 以上的 HLA-2 抗原活性被破坏。若干种抗-HLA 抗血清被某些细菌的去酯化的脂质多糖抑制,也被某些糖蛋白和多糖抑制。

小鼠 H-2 异抗原 (alloantigens) 实验表明,糖蛋白的糖部分对抗原专一性起重要作用。利用对 H-2K^K 专一的单克隆抗体的专一性,检测了淋巴细胞表面两种抗原性不同的 H-2K^K 亚群,抗 H-2K^K 异抗血清与 H-2K^K 亚群都结合。可设想 H-2 分子的不同形式是翻译后经修饰才出现的,如糖基化,可导致 H-2 糖蛋白三级结构的改变。识别 H-2K^K 专一的 2 种单克隆抗体的活性,对链霉菌蛋白酶的作用不敏感,但对糖苷酶和糖抑制剂敏感。

人、小鼠、大鼠、豚鼠、羊和猫的似 Ia 的糖抗原已经研究确定。小鼠 Ia 专一性存在于

其寡糖的观点是由 Mckenzie 等首先提出。除 B 细胞、巨噬细胞、表皮细胞、精细胞和 T 细胞外,在小鼠血清和其它组织液中也发现 Ia 抗原物质。

Ia 糖抗原的纯化表明, Ia 有二种形式——细胞表面糖蛋白和糖脂,在血清中和脾细胞上均存在。Parish 等报道唾液酸酶消化鼠脾细胞,破坏老的 Ia 抗原,并显示不是脾细胞正常表达的新的 Ia 专一性。支持脾细胞上存在 Ia 的寡糖决定簇的看法。人血清的低分子量的似 Ia 抗原也已分离,经确定是糖脂。它们的抗原性被高碘酸处理,以及唾液酸酶和混合糖苷酶消化所破坏。最近用凝集素亲和柱阐明, Ia 糖蛋白的寡糖不均一,含有高甘露糖结构和具有三天线的复杂型 N-连接的寡糖。

(2) 糖介导的吸收系统 (表 38) Ashwell 和 Morell 发现血浆糖蛋白经唾液酸酶处理,使它从循环中被清除的速度戏剧性地增加 (图 48)。这是第一个例子表明糖作为细胞表面识别糖蛋白的标记。

表 38 糖介导的吸收系统

来 源	专 一 性
Sandhoff 症的成纤维细胞 综合的神经节脂脂沉积症的皮肤成纤维细胞 成纤维细胞 哺乳动物肝细胞	高碘酸盐敏感的寡糖和糖复合物 α -Man, β -Man, 含甘露糖的睾丸糖蛋白 甘露糖磷酸酯 去唾液酸糖蛋白的末端半乳糖 IgG 免疫复合物的末端半乳糖 人乳铁蛋白的 Gal β 1 \rightarrow GlcNAc 3 ↑ L-Fuca 1
禽类肝细胞 哺乳动物网状内皮细胞	去半乳糖糖蛋白的末端 GlcNAc 末端的 Man, GlcNAc, L-Fuc IgM 免疫复合物的末端 Man

出处同表 37。

每一个铜蓝蛋白,只要除去二个唾液酸基(一个铜蓝蛋白分子大约有 10 个唾液酸基),已足够使这一糖蛋白在血液循环中的半衰期从 54 小时减到 3—5 分钟。去唾液酸的糖蛋白很快被肝脏吸收。去唾液酸糖蛋白经 β -半乳糖苷酶或半乳糖氧化酶处理,就能破坏这一识别作用,相应地延长了它们留在循环系统中的时间。借唾液酸基转移酶将失去的唾液酸重新装上,也可恢复糖蛋白在循环中滞留的时间(关于肝细胞上的识别蛋白不在此讨论)(图 49)。

表 39 不同动物的各种糖识别系统

标 记	动 物	分离的糖结合蛋白
半乳糖	兔、大鼠、人	+
甘露糖/N-乙酰葡萄糖胺	鸡、兔、大鼠	+
L-岩藻糖	小鼠	+

除半乳糖作为决定簇的糖以外亦已发现其它的清除系统 (表 39)。从鸡血清分离的 α_1 -酸性糖蛋白,当注射入兔体时,不能正常地生存,指出禽类和爬行类的系统可能与哺乳动物不同,研究结果揭示在这两类动物中存在意外高滴度的、循环的去唾液酸糖蛋白。与此发现一致的是,禽类肝中缺少对半乳糖专一的糖结合蛋白。而含有另一种对 N-乙酰葡

葡萄糖胺专一的糖结合蛋白。

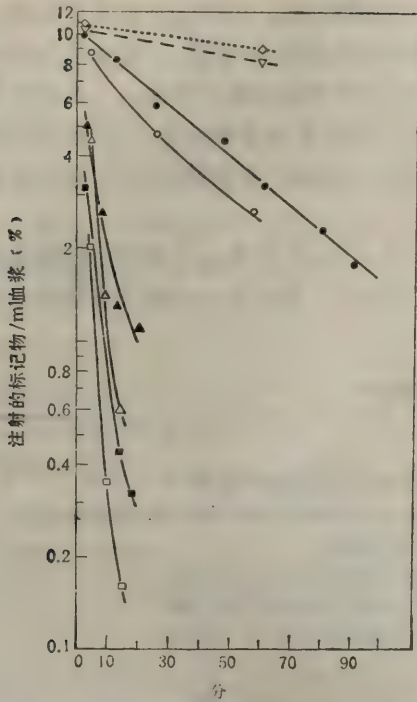


图 48 $[^3\text{H}]$ 标记的去唾液酸血清糖蛋白在大鼠血浆中的留存时间。
 ◇---◇, 去唾液酸转铁蛋白; ▽---▽, $[^{64}\text{Cu}]$ 铜蓝蛋白; ●—●, 去唾液酸甲状腺球蛋白; ○—○, 去唾液酸 α_2 -巨球蛋白; ▲—▲, 去唾液酸触珠蛋白; △—△, 去唾液酸铜蓝蛋白; ■—■, 去唾液酸胎球蛋白; □—□, 去唾液酸 α_1 -酸性糖蛋白。

(摘自 Morell, A. G. et al., 1971, *J. Biol. Chem.*, 246, 1461)

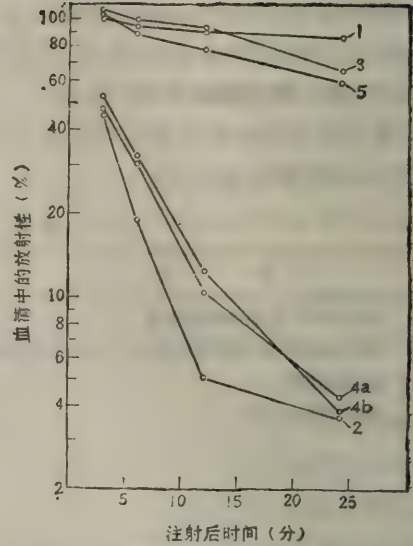


图 49 $[^{64}\text{Cu}]$ 标记的天然的和修饰的家兔血清铜蓝蛋白从血循环消失的速度。1, 铜蓝蛋白; 2, 去唾液酸铜蓝蛋白; 3, 氧化的铜蓝蛋白; 4, 双标记去唾液酸铜蓝蛋白 (4a, ^3H ; 4b, ^{64}Cu); 5, 去唾液酸、去半乳糖铜蓝蛋白。

(摘自 Morell, A. G. et al., 1968, *J. Biol. Chem.*, 243, 155)

N-乙酰葡萄糖胺专一的识别系统, 也在注射的溶酶体酶从大鼠循环系统清除的实验中发现。用人 β 葡(萄)糖醛酸酶对这一系统的更多的研究, 揭示这一酶的迅速清除, 被同时注射的下列物质之一强烈地抑制, 非还原末端含有 N-乙酰葡萄糖胺的糖蛋白, 非还原末端为甘露糖的糖蛋白, 或简单的糖如甘露糖或 α -甲基甘露糖苷。另一个实验表明去唾液酸去半乳糖的 α_1 -酸性糖蛋白和酵母甘露聚糖对上述清除有交叉竞争, 提示可能同一个系统识别含有甘露糖或 N-乙酰葡萄糖胺决定簇的糖蛋白。事实上, 从大鼠肝细胞膜和大鼠其它组织已分离得到与这两种糖专一结合的蛋白质。

另外, 在小鼠体内发现识别非还原末端为 L-岩藻糖的系统。给小鼠静脉注射含有 Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ (L-Fuc $\alpha 1 \rightarrow 3$) GlcNAc 结构的乳铁蛋白, 很快从血液中清除。以下事实表明乳铁蛋白的被清除, 通过识别它的 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 连接的岩藻糖基。转铁蛋白 (transferrin) 和去唾液酸转铁蛋白的寡糖部分, 与乳铁蛋白的寡糖在结构上相似(图 50), 仅缺少 L-岩藻糖, 静脉注射后并不很快从血液中清除。另外, 当 L-岩藻糖经 $\alpha 1 \rightarrow 3$ N-乙酰葡萄糖

胺-L-岩藻糖基转移酶作用于去唾液酸转铁蛋白，生成的岩藻糖基化衍生物很快从循环中清除。岩藻素 (fucoidin) 和多聚岩藻糖抑制乳铁蛋白的清除。但甘露糖和含有半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺或非还原末端为甘露糖的 α_1 -酸性糖蛋白衍生物均无抑制作用。再者，含有以 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 连接到半乳糖，或以 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 连接到 N-乙酰葡萄糖胺的 L-岩藻糖，亦不抑制乳铁蛋白的清除。

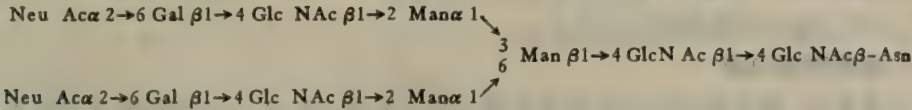


图 50 人转移铁蛋白的寡糖结构。(摘自 Prieds, J. P. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 2215)

可溶性糖蛋白上的糖作为识别决定簇的另一个不同的吸收系统是：细胞内的和分离的某些溶酶体的糖苷酶被成纤维细胞选择性地胞饮。从 I-细胞病患者的成纤维细胞分泌的几种水解酶(都是糖蛋白)不被选择性地胞饮。解释这种缺陷的分子基础，设想是正常溶酶体水解酶具有共同的识别标记，是它们被成纤维细胞吸收所必需的，而这一标记在 I-细胞病患者没有或是掩蔽的。由于高碘酸处理破坏正常酶被细胞吸收的能力，进一步设想，识别的标记是糖。现已确定，甘露糖-6-磷酸是识别的标记。最初提出甘露糖-6-磷酸是识别标记的设想，是根据对葡糖醛酸酶的研究，低浓度的甘露糖-6-磷酸和含这一糖的酵母聚甘露糖，竞争抑制葡糖醛酸酶的吸收。另外，经碱性磷酸酯酶处理，降低成纤维细胞对葡糖醛酸酶的吸收，而酶的催化活力保持不变。对若干种其它糖苷水解酶的研究，获得相似结果(表 40)。

近期的工作证明：正常成纤维细胞产生的 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶是磷酸化的，而由 I-细胞合成的同一个酶则不是磷酸化的，并且 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和 β -葡糖醛酸酶的甘露糖-6-磷酸基是在高甘露糖型的 N-糖苷的侧链上。再者，经离子交换层析分离的 β -葡糖醛酸酶的各种形式的吸收速度，直接随它们的甘露糖-6-磷酸的含量变化。牛睾丸糖蛋白中亦发现有甘露糖-6-磷酸，牛睾丸糖蛋白是 I-细胞病患者皮肤成纤维细胞吸收半乳糖苷酶的强抑制剂。

原先，假设甘露糖-6-磷酸专一的识别系统的生物学作用，是指示溶酶体酶从它们在

表 40 成纤维细胞分泌和吸收溶酶体酶

酶	由 I 细胞分泌	抑制吸收			酶分子中 Man-6-P 的存在
		高碘酸盐	碱性磷酸酯酶	Man-6-P	
α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶			+	+	+
β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶	+	+	+	+	
芳香基硫酸酯酶 A	+		+	+	
β -半乳糖苷酶	+			+	+
β -葡糖醛酸酶	+		+	+	+
α -L-艾杜糖苷	+		+	+	
α -甘露糖苷酶	+		+	+	

出处同表 1。

内质网中合成的场所转移到细胞外,然后由专一的胞饮吸收,再进入细胞,或进入同一细胞,或进入邻近细胞。现在看来,这一分泌-再捕获途径在溶酶体酶的生命周期中是次要的。因为,进行干扰这一途径的尝试,例如,加甘露糖-6-磷酸,或抗 α -或 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶抗体至正常的成纤维细胞,并不能使细胞用尽它们的溶酶体酶,也不导致细胞外溶酶体酶的堆积。而且,当人皮肤成纤维细胞在有衣霉素存在时培养,观察到溶酶体酶的分泌速度增加。因此,看来这一识别标记的主要作用更象是细胞内运输的标记,阻止酶分泌,并指示酸性水解酶进入溶酶体。

2. 细胞表面的糖

以重量计,糖只是细胞表面膜成分很小的一部分。例如,人红细胞膜含大约8—10%的糖。红细胞膜与其它已研究的膜一样,所有的糖以糖蛋白或糖脂的形式存在。寡糖链是不对称分布的,只存在于细胞的外表面。

研究细胞表面的糖在识别现象中的作用(包括细胞与分子、细胞与病毒或细胞与细胞间的相互作用)方法有多种:(a)用简单的或复杂的糖抑制各种物质与细胞的结合;(b)用专一的糖苷酶除去细胞表面的糖,以及借糖基转移酶将除去的糖再连接到细胞表面,观察对结合的影响;(c)物质与细胞膜的糖复合物(glycoconjugates)的糖的结合;(d)用糖专一试剂,包括糖苷酶、高碘酸和半乳糖氧化酶,使细胞表面的糖发生变化,导致改变细胞的活力;(e)观察细胞分化、生长与恶变的不同阶段,与细胞表面糖的变化的相互关系。

目前,细胞表面糖的任一功能,无疑地很难归属于一个专一的膜糖蛋白。一个主要的原因,是我们对膜糖蛋白的知识仍然不足。另一个困难是确定细胞表面糖决定簇载体分子的性质,是膜的糖蛋白部分,抑或是糖脂部分,特别是因为许多末端的寡糖顺序,为这两种类型的分子所共有。绝大多数糖苷酶、糖基转移酶和其它修饰糖的试剂,如半乳糖氧化酶和高碘酸,都不能区分这两种类型的糖复合物。能区分的试剂是罕见的。能阐明细胞表面决定簇是属于糖蛋白部分,或是属于糖脂部分的一个有用的方法,是用蛋白质糖基化的专一抑制剂,如衣霉素或2-脱氧葡萄糖,和糖基化有缺陷的突变种细胞。

(1) 细胞与分子相互作用

血型决定簇 几方面的证据,包括用凝集素、糖苷酶、糖基转移酶以及分离的膜成分的研究,证明糖无疑是人红细胞上各种血型的专一抗原的决定簇。血型结构和识别它的抗体,是最早了解的糖的识别系统之一。基因的和酶学的研究表明,这些血型结构由特有的糖基转移酶的存在与否所决定。在血型结构中增加或删除一个单糖,将改变其抗原性,因而改变血型。

血型 I/i, ABH 和 Lewis (Le) 决定簇见表 41。i 决定簇含有重复的直链聚 N-乙酰乳糖胺结构,而 I 决定簇则含有支链结构。ABH 和 Le 结构在 I/i 结构上形成。I 结构首先在缺乏 A、B、H、Le^a 和 Le^b 专一性的卵巢囊液糖蛋白中阐明。这一结构称为“无活力物质”,与抗肺炎球菌 XIV 型多糖抗血清有交叉反应。罕见的“孟买 (Bombay)” (Oh) 表型红细胞具有这种结构。这些具有孟买表型红细胞者,假如有 Le 基因的拷贝,积聚 Le 物质。血型 I/i 抗体不如 ABO 抗体普遍,而且常与疾病状态有关。网状细胞肉瘤、网状红细胞增多症和溶血性贫血患者时常产生抗 I/i 抗体。

在 1 型和 2 型链末端的 β -连接的半乳糖基的 C-2 上加上 α -L-岩藻糖基,形成 H

表 41 ABH 和 Lewis 血型糖蛋白的糖链结构

专一性	链型	糖 链 结 构
A	1 或 2	GalNAc α (1 \rightarrow 3)Gal- β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸 \uparrow α 1,2 L-Fuc
B	1 或 2	Gal α (1 \rightarrow 3)Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸 \uparrow α 1,2 L-Fuc
H	1 或 2	Gal β (1 \rightarrow 3,4)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸 \uparrow α 1,2 L-Fuc
Le ^a	1	Gal β (1 \rightarrow 3)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸 \uparrow α 1,4 L-Fuc
Le ^b	1	Gal β (1 \rightarrow 3)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸 \uparrow α 1,2 \uparrow α 1,4 L-Fuc L-Fuc
Type Pn XIV	2	Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc β ...GalNAc α -O-丝氨酸或苏氨酸

决定簇,并引出血型 O。在 1 型链上加这种键产生乳糖-N-岩藻五糖 I 结构。这一转移酶 (α -2-岩藻糖基转移酶)受更多的基因的限制, Se/se 基因控制分泌的非红细胞的 H 决定簇的表达。H 决定簇是 A 和 B 血型酶的底物,没有 H 决定簇就没有 ABH 血型抗原的表达,无论在红细胞或在分泌物中都是如此。

Le 基因的产物,第二个岩藻糖基转移酶 (α -4-岩藻糖基转移酶), 将 α -L-岩藻糖基加到倒数第二位的 N-乙酰葡萄糖胺的 C-4 上,这个酶仅作用于 1 型链,因为 2 型链的 N-乙酰葡萄糖胺的 C-4 已被半乳糖占领,产物在具有 hh 基因者的红细胞上或 Se/se 基因者的分泌物上是 Le^a 结构,在具有 H 基因者的红细胞上,或具有 H 和 Se 基因者的分泌物中是 Le^b。由 α -3-岩藻糖基转移酶在 2 型链上加上 L-岩藻糖衍生的结构,除 H 抗原外,尚未能用人的抗体确定。

A 血型决定簇是第一个被阐明的血型决定簇,含有 N-乙酰- α -D-半乳糖胺基,连接于 H 决定簇末端 D-半乳糖的 C-3 上,有两种 A 酶, A₁ 和 A₂。A₁ (N-乙酰半乳糖胺基转移酶) 作用于 1 型和 2 型链;但 A₂ 酶只作用于 2 型链。B 血型决定簇含 α -D-半乳糖,连接于 H 决定簇的 D-半乳糖的 C-3。B 型红细胞经 α -半乳糖苷酶处理,导致 B 型活性的丢失。

除 A、B、H、Le 和 I/i 抗原外,至少还有 2 类其它的血型系统: M、N、S 和 Pr 与 P。这两类系统的决定簇都含复杂糖。M、N、S 和 Pr 决定簇在红细胞的血型糖蛋白上。唾液酸酶破坏 M 和 N 抗原决定簇。经唾液酸基转移酶将唾液酸重新连接到红细胞上,可使原来的活性恢复。然而,在这一系统中,看来不可能使 M 型红细胞转化为 N 型,反之亦然。这些,与血型糖蛋白 A 携带 M 和 N 决定簇,以及 M 和 N 决定簇的人血型糖蛋白的氨基酸顺序,在 1 位和 5 位不同,由 M 基因编码的血型糖蛋白 N-末端的氨基酸顺序为丝-苏-苏-苏-谷,由 N 基因产生的为亮-苏-苏-苏-甘。然而,抗 M 和抗 N 抗体对包含连接于分子的四糖抗原决定簇专一。两者一起考虑,证实了早期的设想,即 M 和 N 的专一性既取决于糖,亦取决于血型糖蛋白的多肽。新加入到这一族的一个决定簇是 Cad,含有在半乳糖基的 C-4 位以 β -连接的 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc β 1 \rightarrow 4 Gal)。

表 42 与半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺相关的免疫化学专一性

半乳糖为免疫显性的糖		N-乙酰半乳糖胺为免疫显性的糖	
专一性	结 构	专一性	结 构
B	Gal α (1 \rightarrow 3)[L-Fuc- α (1 \rightarrow 2)]Gal-R	A	GalNAc α (1 \rightarrow 3)[L-Fuc- α (1 \rightarrow 2)]Gal-R
PnXIV	Gal β (1 \rightarrow 4)GlcNAc-R	Förssman	GalNAc α (1 \rightarrow 3)GalNAc-R
T	Gal β (1 \rightarrow 3)GalNAc-R	P	GalNAc β (1 \rightarrow 3)Gal-R
P ₁ , P ^K	Gal α (1 \rightarrow 4)Gal-R	Tn	GalNAc-O-Ser(Thr)
		Sd ^a (and Cad)	GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal

以上血型决定簇按其免疫显性的糖可分为两类(表 42), B、PnXIV、T、P₁、P^K 的免疫显性的糖是半乳糖, A、T、P、Tn、Sd^a 和 Cad 是 N-乙酰半乳糖胺。

表 43 可溶性免疫介质识别的糖

免疫介质	抑 制 剂
豚鼠巨噬细胞游走抑制因子 (MIF)	糖蛋白, α -L-岩藻糖, GalNAc, 血型物质, 牛颌下腺粘蛋白, 结合岩藻糖的凝集素, 含岩藻糖的寡糖, L-鼠李糖, 6-脱氧-D-葡萄糖, 含岩藻糖的巨噬细胞酸性糖脂, 胰凝乳蛋白酶消化的巨噬细胞, 胰蛋白酶消化的巨噬细胞
豚鼠和大鼠 MIF	牛脑神经节苷脂
人 MIF	α -L-岩藻糖, L-鼠李糖, 6-脱氧-D-葡萄糖
豚鼠巨噬细胞激活因子 (MAF)	牛脑神经节苷脂, 巨噬细胞糖脂
小鼠 MAF	Man, Me- α -D-甘露糖苷, L-Fuc, L-Rha, GlcNAc, 凝集素, α -D-, 甘露糖苷酶, 神经氨酸酶, 蛋白水解酶消化的巨噬细胞
豚鼠巨噬细胞游走激活因子 (MSF)	GalNAc
豚鼠巨噬细胞向化因子, 嗜中性细胞向化因子	L-鼠李糖, L-岩藻糖
人白细胞抑制因子 (LIF)	GlcNAc
小鼠淋巴毒素 (LT)	GalNAc, Gal, 猪甲状腺球蛋白糖肽
豚鼠 LT	L 细胞糖肽
人 LT	Me- α -D-甘露糖苷, GlcNAc
鼠和人干扰素 (IF)	神经节苷脂 G _{M1} , G _{M2} , G _{D1a} , GT ₁ , 唾液酸乳糖
T 细胞的可溶性免疫抑制因子 (SISS-T)	GlcNAc
B 细胞的可溶性免疫抑制因子 (SISS-B)	L-鼠李糖
对次级的 I _g G 应答的 T 细胞辅助因子	GalNAc, Gal, Fuc, ManNAc

出处同表 37。

血型 P 抗原存在于糖脂。

可溶性免疫介质受体 最近的证据表明, 若干溶解的免疫介质(淋巴细胞活素, 单核细胞活素, 辅助、抑制、激活、向化的和致毒的因子)与它们的靶细胞表面的复杂糖结构结合(表 43)。巨噬细胞表面的糖基, 形成巨噬细胞游走抑制因子/巨噬细胞激活因子(MIF/MAF)的部分受体。豚鼠、人和大鼠巨噬细胞 MIF 受体涉及含有 α -L-岩藻糖的糖复合物。Yamamoto 和 Tokunaga 提出了鼠巨噬细胞上不同的 MAF 受体可能含有甘露糖和唾液酸的证据。胎牛血清的巨噬细胞游走激活因子 (MSF) 被 N-乙酰半乳糖胺, 但不被 L-岩藻糖抑制。巨噬细胞和亲神经的向化因子, 被鼠李糖和岩藻糖抑制。白细胞抑制因子 (LIF) 被 N-乙酰葡萄糖胺阻断。

除在体外甘露糖苷抑制淋巴细胞活素反应, Baba 等报道这些反应在体内的抑制。

L-岩藻糖和L-鼠李糖抑制含有淋巴细胞活素的上清部分的活性：(1)诱导皮肤迟缓型超敏反应(DTH)，(2)导致腹腔渗出液巨噬细胞的减少。L-岩藻糖亦抑制在免疫的豚鼠体内由抗原诱导的DTH和周围的巨噬细胞消失反应。

淋巴细胞毒素(LT)，是由抗原和细胞分裂原激活的淋巴细胞释放的可溶性致毒因子，亦与细胞表面的糖结合。豚鼠的LT被猪甲状腺球蛋白的糖肽抑制。含 β -D-半乳糖基和N-乙酰-D-半乳糖胺基的糖抑制LT与靶细胞的结合。Kobayashi分离并部分鉴定了从LT敏感的L细胞表面的糖肽，它抑制在这些细胞上豚鼠LT的活性，经 α -D-半乳糖苷酶处理的糖肽对LT的抑制明显地下降。从人细胞释放的可溶解的LT分子的专一性，与同类的天然杀伤细胞活力相关。人LT抗体和人免疫球蛋白阻断杀伤细胞(NK)溶解(lysis)NK敏感细胞。NK-和LT-介导的溶解，均被甲基 α -D-甘露糖苷和N-乙酰-D-葡萄糖胺抑制。提示LT可能作用在NK细胞表面，影响靶细胞溶解。

干扰素(IF)也与靶细胞表面的糖复合物结合。牛脑神经节苷脂能抑制IF的结合，固定化的神经节苷脂能从溶液中除去IF。然而，若干种唾液酸糖蛋白无能力干扰IF-Sepharose活力。霍乱毒素抑制IF作用，提示它们可能有相同的受体。神经节苷脂抑制小鼠I型(成纤维细胞)IF，而不是II型(免疫)IF的抗病毒和抗生长活力。I型IF与神经节苷脂亲和柱结合，并可用唾液酸基乳糖洗脱。小鼠II型IF经过这样的柱，不滞留于柱上。人成纤维细胞和白细胞干扰素均被神经节苷脂抑制。

可溶性抑制因子，抑制细胞的或体液的免疫反应，看来也与靶细胞表面的糖结合。Con A活化的人外周血单核细胞产生可溶解的免疫抑制上清液(SISS)活力，至少含有两种不同的抑制因子。SISS-T抑制分裂原和抗原激活的T细胞增生，N-乙酰-D-葡萄糖胺的存在，使其失去活性，而其活力滞留在N-乙酰-D-葡萄糖胺亲和柱上。SISS-T与麦胚和蘑菇凝集素识别的细胞表面糖蛋白结合。这两种凝集素对分裂原或抗原激活的淋巴细胞增生有相似的抑制作用。SISS-B抑制多克隆B细胞免疫球蛋白的产生，L-鼠李糖抑制其活性。

综合以上研究，表明细胞表面糖复合物可作为MIF、LIF、LT、IF、亲神经向化因子、巨噬细胞向化因子、T细胞辅助因子、SISS-T和SISS-B的受体。其它可溶性免疫介质，如白细胞溶菌素(interleukins)I和II、B细胞生长因子、B细胞分化因子或抗原专一的T细胞抑制因子，尚未有数据可利用来阐明。从以上研究，提示若干可溶性免疫介质与靶细胞的起始接触，可能通过与细胞表面不同部位的糖复合物结合。

凝集素受体 低浓度专一的单糖，抑制凝集素对细胞的各种效应(主要是凝集作用和激活淋巴细胞)，唾液酸酶、葡萄糖氧化酶和 β -半乳糖苷酶处理淋巴细胞，影响它对专一凝集素的反应，为细胞表面的糖作为凝集素受体提供最好的证据，进一步证实了细胞表面的凝集素受体是糖。凝集素受体可以是糖蛋白或糖脂，或两者(表44)。此外，蛋白酶部分水解人红细胞表面，显著降低它与某些凝集素的相互作用。糖蛋白或糖脂是凝集素的主要受体，取决于凝集素，也取决于细胞。

一个有趣的例子，冷凝集素(MKV)，是一种具有似凝集素性质的免疫球蛋白，对唾液酸专一。MKV凝集人和狗的红细胞，但细胞经无花果蛋白酶处理后，仅人红细胞的凝集反应减弱，狗红细胞的凝集反应不受影响，提示人红细胞上的凝集素受体是唾液酸糖蛋

表 44 凝集素识别的糖

凝 集 素 来 源	抑 制 剂
植物	各种单糖和寡糖
大肠杆菌	α -D-Man
衣滴虫 (<i>Chlamydomonas</i>)	α -D-Man
棘变形虫 (<i>Acanthamoebae</i>)	Me- α -D-Man, Man, Fru, 酵母聚甘露糖
粘菌	乳糖, D-Gal
电鳗, 鸡骨骼肌, 鸡胚骨骼肌培养物, 成神经细胞瘤细胞	β -D-Gal
小牛心和肺	β -D-Gal
鸡胸肌和鸡胚股肌	乳糖
鸡肝、胰、小肠	乳糖
鸡肝、鸡胚胸肌	肝素, GalNAc
牛肝细胞	GlcNAc, 二-N-乙酰甲壳二糖, 三-N-乙酰甲壳三糖
BHK 细胞	L-Fuc, GalNAc, 巯基-二-半乳糖苷
血小板	GalNAc, GlcNH ₂ , ManNH ₂
螭	GalNAc, GlcNAc, Gal
软体动物	血型物质
蜗牛	血型物质 A
龙虾	NeuNAc, 粘蛋白, GalNAc
蟹	NeuNAc, 血型物质 M 和 N, CEA
鲨鱼清	果聚糖, 裸麦果聚糖 α -(1 \rightarrow 3) 葡聚糖
人血清	肺炎球菌 C 聚糖
鳗血清	血型物质 H
大鼠胸腺和脾淋巴细胞	Gal, GalNAc, Man, 去唾液酸糖蛋白
鼠淋巴细胞	胎球蛋白, 牛颌下腺粘蛋白
激活的人淋巴结细胞	胎球蛋白, 甲状腺球蛋白, N-连接的胎球蛋白糖肽

出处同表 37。

白,而狗红细胞上的受体是含唾液酸的糖脂。另一个例子是唾液糖蛋白,它是口腔中的一些细菌表面凝集素的受体。唾液通过其糖蛋白的寡糖与细菌结合,发挥它的保护性功能。唾液润滑口腔表面,调节口腔细菌的菌落形成。没有唾液将导致口腔溃疡发病增加,牙齿磨损,以及细菌媒介的齿龋和龈炎发病增加,这已为人们所熟知,但对这种作用的分子基础并不清楚。最近,对从人腮腺液和舌下腺液纯化的糖蛋白的寡糖进行结构分析,表明 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc, Sia α 2 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc, Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 是唾液糖蛋白的主要糖单位。用血凝抑制试验揭示口腔血链球菌 (*Streptococcus sanguis*) 表面存在识别 Sia α 2 \rightarrow 3 Gal β 1 \rightarrow 3 GalNAc 顺序的凝集素。以上的研究提示唾液糖蛋白能通过专一的识别作用,包被口腔链球菌,有利于细菌的清除。

(2) 细胞与病毒相互作用 唾液酸酶处理细胞,破坏流感病毒对人红细胞的凝集作用,是第一个阐明的细胞表面的糖作为病毒的粘着部位(表 45)。另外,也是第一次表明细胞表面的糖具有生物功能。流感病毒凝集人红细胞的作用,被非常低浓度的唾液酸糖蛋白抑制,以及去唾液酸后糖蛋白失去抑制活性,加强了唾液酸是流感病毒受体的证据。利用酶催化将唾液酸连接到没有唾液酸的红细胞,可恢复它们被流感病毒和其它对唾液酸专一的病毒凝集的能力,进一步肯定了唾液酸是流感病毒受体的结论。

表 45 糖介导的病毒与细胞的作用

作用	糖复合物
粘液病毒-副粘液病毒-腺病毒-多瘤病毒-细胞 呼吸道和肠道滤过性病毒-细胞 脑炎病毒-细胞 肠性病毒-脑脊髓炎病毒-皮肤疫苗-levite 神经 病毒-脑及心肌炎病毒-哥萨克病毒-单纯疱疹 病毒-纤维瘤病毒-细胞 风疹病毒-细胞 仙台病毒-细胞 流感病毒-细胞	唾液酸受体 GlcNAc 受体 α -D-Man 受体 各种糖 糖脂 Sia α 2 \rightarrow 3, Sia α 2 \rightarrow 8 唾液酸

(3) 细胞与细胞相互作用 细胞间的粘附,不论是同型的还是异型的,都是细胞相互作用中起决定性的一步。例如:受精、细胞分化和组织形成等,是一方面;宿主和寄生的相互关系,是另一方面。其它细胞间的相互作用亦起始于细胞的相互粘附。对于细胞表面的糖在诸如此类的反应中的作用,有许多事实和证据(表 46,47)。

表 46 参与细胞间相互粘附和识别的细胞表面的糖

细胞	系 统	糖	凝 集 素
细菌	粘附到动物细胞	Man, L-Fuc	+
褐藻	受精	Man, L-Fuc	
海胆	受精		+
海胆卵	凝聚	Gal	
粘菌	粘菌的凝聚	Gal, GalNAc	+
海绵	凝聚	GlcUA	+
畸胎瘤	细胞间的粘附	(Man) _n	
酵母	交配	Man?	+

出处同表 1。

淋巴细胞归巢 在免疫反应中最复杂和最有趣的一种细胞间的相互作用是淋巴细胞的通行、归巢和再循环。在组织发生的早期,鸡的原始的淋巴细胞归巢到上皮的胚胎发育期中的胸腺和法氏囊。

用从产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 制备的糖苷酶,处理移注的大鼠胸导管淋巴细胞 (TDL),显示改变细胞在器官的定域。未经酶处理的细胞归巢到脾和淋巴结,而酶处理的淋巴细胞,当再注射人体内时则移往肝脏。酶的效应被 L-岩藻糖和 N-乙酰-D-半乳糖胺专一抑制。唾液酸酶处理的大鼠 TDL,或用 0.1mol/L 高碘酸处理的细胞,注射入大鼠体内,分布于肝脏的细胞增加,而定位于淋巴结和脾的细胞减少。胰蛋白酶处理的细胞留在循环中,不在肝或淋巴结积储,但定位在脾的骨髓。

经唾液酸酶处理,但未经胰蛋白酶消化,亦改变大鼠胸腺细胞的循环模式。用凝集素处理的小鼠 T 淋巴细胞或淋巴结细胞,静脉注射后,细胞在体内的分布明显改变。这些实验难以解释,凝集素包被的细胞相互间可以凝聚,在循环中可与其它细胞和糖蛋白结合,或导致细胞粘附于器官毛细床。另外,凝集素可导致细胞表面凝集素受体移动,形成帽状,或遮蔽受体,以及导致其它细胞表面成分的位阻现象。

静脉注射接种新城鸡瘟病毒 (NDV),改变小淋巴细胞的再循环库的性质。在小鼠

表 47 细胞相互作用中识别的糖和糖复合物

相互作用的细胞	糖或复合糖类
巨噬细胞-细菌	细胞壁糖类
支原体-细胞	糖受体
支原体 <i>gallisepticum</i> -红细胞	唾液酸受体
肠道细菌-细胞	D-Man 受体
酵母株专一的交配反应	聚甘露糖因子
大肠杆菌 K12 交配	高碘酸盐敏感的结构
哺乳动物受精	凝集素受体
人牙斑中粘性放线菌和 <i>naeslundii</i> 放线菌与链球菌的粘附,粘性放线菌与经神经氨酸酶处理的红细胞凝集	似乳糖受体
HeLa 细胞凝聚	透明质酸
鸡胚视网膜神经细胞的凝聚	GalNAc
鸡胚大脑叶细胞的凝聚	Man
未分化畸胎瘤细胞的粘着	Man 受体
分化的畸胎瘤细胞 (PYS) 的粘着	似粘蛋白受体
BHK 和 HeLa 细胞的粘附	似粘蛋白受体
SV40-3T3 细胞的粘着	Gal 受体
NIL, BHK, HeLa 和 MDCK 细胞粘附	糖脂
细菌-淋巴细胞	各种糖类受体
细菌-巨噬细胞和细菌-PMNL	Man 受体
细菌-腹腔巨噬细胞	细胞壁糖受体
人 T 细胞-SRBC	N-连接的糖肽
巨噬细胞粘着	GM ₂ , GD _{1a}
糖苷酶消化的腹腔渗出细胞的凝聚	Fuc, GalNAc 受体
天然的细胞毒性	Man
自发的细胞介导的细胞毒性	核糖、龙胆二糖, GalNAc, 纤维二糖, α -乳糖
NK 细胞溶解	胎球蛋白, GalNH ₂ , GlcNH ₂ , Ara, Xyl, Gal, Man, Me- α -D-Man, GlcNAc
人单核细胞-靶细胞	唾液酸, 各种糖
单核细胞-T 细胞	各种糖
淋巴细胞-HEV	Fuc, Man 受体

和大鼠 NDV 感染过程中,观察到的小淋巴球减少,可能由于 TDL 表面的修饰,阻止它们与内皮细胞作用,因此损害淋巴细胞归巢。

在离体的灌注组织中,唾液酸酶处理的淋巴细胞与未经处理的相比,迁移入肝组织的淋巴细胞不增加,提示去除唾液酸仅在体内导致细胞定位于肝脏,可能是由于肝脏的对半乳糖专一的结合蛋白从循环中吸收去唾液酸的淋巴细胞。

在大鼠 TDL 粘附到富含内皮的小静脉(HEV)的内皮的实验中,观察到 TDL 决定簇对胰蛋白酶敏感,但唾液酸对这一反应并不是必需的。TDL-HEV 的结合被胰蛋白酶处理的 TDL 上清部分抑制,提示酶释放具有结合 HEV 的多肽。最近,淋巴细胞-HEV 在离体情况的研究表明,淋巴细胞可能结合于 HEV 上皮细胞的糖复合物。L-岩藻糖、D-甘露糖和富含硫酸基的 L-岩藻聚糖,专一地抑制细胞的粘附。

用羊红细胞免疫的小鼠的腹腔渗出液 T 淋巴细胞的继承性转移阐明, T 淋巴细胞表面的糖结构经过修饰,由这些细胞导致的迟缓超敏反应 DTH 减低。唾液酸酶消化 T 细胞,使在同基因在接受者中引起 DTH 的短暂减低。唾液酸酶消化后,继之以半乳糖氨

化酶处理,则 DTH 显著减低。与高碘酸保温,导致永久失去 DTH 转移能力。硼氢化物还原,可逆转继唾液酸酶消化后半乳糖氧化酶和高碘酸氧化的效应。减低的 DTH 反应与减低的细胞进入抗原沉淀部位的移动是平行的。细胞在肝中的捕获,可解释唾液酸酶处理的细胞和高碘酸氧化的细胞的失去,但不能解释唾液酸酶、半乳糖氧化酶先后处理的细胞的失去,因为这些细胞在肝中定位的数未增加。由于半乳糖氧化酶处理的去唾液酸糖蛋白抑制它们的结合和硼氢化物还原逆转这一抑制作用,其效应不只与肝的去唾液酸糖蛋白吸收系统有关。

最近,对小鼠淋巴细胞归巢的研究表明,纯化的淋巴细胞亚群,根据它们具有的、专一的细胞表面糖结合蛋白(膜凝集素),显示不同的归巢模式。当细胞表面的糖受体被相应的糖蛋白饱和时,这种特征性的定域被扰乱,提示决定淋巴细胞归巢的第一步,淋巴细胞-内皮细胞识别的选择性,膜凝集素起重要的作用。

老化细胞的清除 与糖对糖蛋白在循环系统中存活的作用相似,细胞表面的糖对循环细胞的生命持续时间和它们在体内专一器官中的分布是重要的。

唾液酸含量下降、电泳迁移率和红细胞在循环系统的寿命之间的相互关系,推导出唾液酸下降与红细胞衰老的生理机理相关和唾液酸下降作为老化红细胞从循环中清除的信号假说。在体外,用酶从红细胞除去唾液酸,再注射到体内,致使红细胞的生命持续时间显著缩短,而在体外,被外周巨噬细胞吞噬则增强,进一步证实了这一假说。人红细胞在循环系统中正常持续时间为 120 天,唾液酸酶处理的红细胞 1 小时内被吸收,并且被肝柯氏细胞和脾巨噬细胞吞噬。然而,已知在红细胞衰老过程中,血型糖蛋白的唾液酸含量几乎保持不变,由此推断,在老化红细胞中,唾液酸含量下降是由于丢失了完整的血型糖蛋白分子,比说它仅丢失唾液酸更为确切。这个结论与衰老红细胞逐渐丢失的不仅是唾液酸,而且也失去等分子的其它糖的发现是一致的。另外,去唾液酸红细胞经半乳糖氧化酶处理,未能延长它在循环系统中的持续时间。再者,与去唾液酸红细胞作用的花生凝集素,不与老化红细胞结合。因此,看来亚末端半乳糖基的暴露,不像是从循环系统除去衰老红细胞的主要生理因子。

细菌感染宿主和被巨噬细胞吞噬 根据用简单的糖的抑制研究结果积累的证据表明,细菌如大肠杆菌和伤寒沙门氏菌,通过动物细胞表面的甘露糖基与动物细胞相互作用。这种糖专一的相互作用,看来是由存在于细菌表面的甘露糖专一的凝集素介导的。同样,霍乱弧菌识别 L-岩藻糖,它与动物细胞粘附的分子基础,可能是由细菌表面对 L-岩藻糖专一的凝集素介导的。

细菌粘着于淋巴细胞,看来与其它宿主细胞一样,依赖于细菌与淋巴细胞表面的糖结合。和用凝集素、酶或高碘酸处理淋巴细胞那样,一些单糖抑制细菌与淋巴细胞的结合。细菌亦通过甘露糖抑制的机理,结合于小鼠腹腔巨噬细胞和人的多形核白细胞 (polymorphonuclear leucocyte, PMNL)。大肠杆菌和伤寒沙门氏菌的表面出现结合甘露糖的成分。事实表明,细菌粘附于小鼠腹腔巨噬细胞的机理,与粘附于淋巴细胞的不同,是基于巨噬细胞上专一识别细菌细胞壁的糖,并与之结合的成分。

淋巴细胞与红细胞的结合 人 T 淋巴细胞与羊红细胞表面结合。唾液酸酶处理淋巴细胞或羊红细胞,可增强两种细胞间的结合。未经处理的急性淋巴性白血病人的母细胞 (blast cell) 和胸腺细胞形成较稳定的玫瑰花。专一的糖肽抑制人淋巴细胞-羊红

细胞玫瑰花形成。胰蛋白酶处理羊红细胞减少玫瑰花形成,以及释放的糖肽抑制未经胰蛋白酶处理的红细胞的玫瑰花形成,提示通过羊红细胞上的糖复合物,与人T细胞上的受体结合,形成玫瑰花。用天冬酰胺连接的,富含唾液酸、半乳糖、N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖的模型糖肽,也观察到抑制作用。胎球蛋白糖肽、人转铁蛋白糖肽和人红细胞糖肽,抑制玫瑰花形成。胎球蛋白糖肽的分级降解,确定了暴露的半乳糖基是抑制活力的重要决定簇。唾液酸酶处理羊红细胞增加玫瑰花形成,大概是通过糖蛋白上暴露的半乳糖基。人T淋巴细胞在混合淋巴细胞(MLR)反应中激活后,与羊红细胞形成玫瑰花,比未激活的淋巴细胞形成的玫瑰花更稳定。T细胞与同种其它细胞的“自然粘附”看来包含了相似的受体。这种发育调节的受体存在于胸腺细胞,但只有从T细胞膜或靶细胞除去唾液酸后,在外周T细胞上能证明,提示天然粘附可能有助于发生专一免疫粘附后的细胞相互作用的亲和性。

胸腺细胞和自体红细胞间形成玫瑰花,是由主要识别自体红细胞上H-2L分子的胸腺细胞上的受体所介导。根据糖抑制研究和受体对蛋白水解酶的敏感性,以及糖苷酶的处理,看来是胸腺细胞上的蛋白质受体识别红细胞上糖蛋白的糖。胸腺细胞受体识别红细胞上支链糖结构的末端半乳糖、甘露糖和唾液酸。

在粘菌生命周期中的作用 盘状网柄菌是常用于研究的一种粘菌,对其生命周期已完全了解。AX₂和AX₃是野生型NC+的变异株,能在蛋白胨、酵母浸膏和盐的无菌培养液中生长。戊二醛固定的AX₃细胞的Con A受体,在粘菌生命周期的早期均匀分布于细胞表面,鼻涕虫状(slugs)细胞呈补钉状分布,某些区域密集,某些区域稀疏。WGA受体在生命周期的全过程中,整个细胞表面均显示密集分布。

Hoffman和McMahon用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和PAS染色的方法,分析高度纯化的AX₃细胞质膜,从营养期到鼻涕虫期,测定的25种中的24种糖蛋白受不同程度的发育调节,从出现/消失的期专一性到定量调节。West和McMahon用FITC-Con A染色纯化的质膜,显示所含41种受体中,有31种或是期专一的(不是所有期都存在),或从营养期到终极前(鼻涕虫期)发育的全过程中相对含量的改变。用这一方法测定其它凝集素受体,测不到对半乳糖/N-乙酰半乳糖胺专一的蓖麻凝集素和蓖麻毒素或大豆凝集素受体,亦测不到对岩藻糖专一的荆豆凝集素I的受体。然而,FITC-WGA染色的SDS-电泳凝胶揭示25种WGA受体,多数受发育的调节;再则,绝大多数的WGA受体和Con A受体是不同的。

Burridge和Jordan用放射性碘标记凝集素染凝胶,与West等的结果相反,结合Con A的蛋白质的调节相当有限。他们并且测到了与岩藻糖结合的蛋白质(FBPs)的受体,营养细胞的FBP受体在发育的早期消失,终极时出现4条较浅的染色带,这些带可能与岩藻糖基化的孢子外壳蛋白有关。他们并且注意到,测不到PHA(对N-乙酰半乳糖胺专一)和盘状网柄菌凝集素,网柄菌素(discoidin) I和II(与半乳糖和N-乙酰半乳糖胺高度亲和)的受体。

最近,Toda等研究盘状网柄菌NC4株糖蛋白的变化。用高碘酸氧化和氚标记硼氢化物还原,标记从营养期到凝聚期细胞表面的糖,细胞质膜大约纯化8倍,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。温和条件下高碘酸氧化唾液酸,随后氚标记硼氢化物还原,没有放射性标记参入,支持用直接的化学方法在这种生物中测不到唾液酸的结果。他们也观察到,半乳

糖氧化酶不能作为氧化剂,支持不存在或仅有非常有限的半乳糖和半乳糖胺的报道。

以上结果表明,利用 PAS 或凝集素染凝胶,或放射性标记细胞表面的糖,均肯定了从营养期到终极期细胞表面糖蛋白的剧烈变化。这些具调节性能的糖蛋白,在发育上具有重要功能。

精卵结合与胚胎发育中的功能 哺乳动物胚胎形成的早期,个别的、细胞表面的糖参与细胞的识别。哺乳动物受精,最初发生的过程是:精子与包在卵质膜周围的透明带的糖蛋白相互作用。精子通过附睾的过程,脱落某些称为“包被”或“脱获能 (decapacitation)”因子。精子表面 WGA 受体在精子与精浆接触后被广泛地修饰。精子的其它凝集素如 ConA、RCA 的受体,在附睾中精子的成熟过程和射精都有变化。比较附睾头部和尾部精子,显示这些凝集素受体的分布变化是不相互依赖的。例如铁蛋白-WGA 密集地标记附睾头部精子的顶体区,而附睾尾部精子除顶体区的顶端外很少标记,射出精子在顶体区顶端亦不标记;精子头部与铁蛋白-RCA 的结合,在附睾内成熟过程中减少,而尾部的结合不受影响;精子的 ConA 受体的分布,在附睾内成熟过程中没有改变。家兔精子表面的主要成分,在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示,8 条主要的蛋白质带,1 条表观分子量为 86K 的带,在附睾尾部精子是非常主要的,并在附睾内成熟过程中减少;而表观分子量为 35K、39K、50K 和 78K 的 4 条带显著增加。这些细胞表面变化产生的作用后果,尚在研究中。

透明带是糖蛋白,包被在卵的质膜周围,作为精子受体和阻断多精受精。小鼠卵母细胞和卵的透明带中有三种主要的糖蛋白,称为 ZP_1 、 ZP_2 和 ZP_3 ,这些糖蛋白的表观分子量分别为 200、120 和 83K。透明带含有精子受体的最有说服力的证据是 Bleil 和 Wasserman 提出的。他们用纯化的透明带的 3 种糖蛋白作竞争抑制试验,评价它们对精子与卵的结合效应。发现只有 ZP_3 在离体情况干扰精子与卵的结合,而且只有从未受精卵制备的 ZP_3 有效。从两个细胞的胚胎制备的 ZP_3 对精子与卵的结合没有影响。这些结果表明 ZP_3 是精子受体,并提示在顶体反应中 ZP_3 被修饰,因此,不能再作为精子受体。

精子上的透明带受体尚未鉴定。然而,精子表面的半乳糖基转移酶促成精子与透明带的结合。半乳糖基转移酶的抑制剂抑制精子与透明带的相互作用。从透明带获得的糖肽抑制精子与透明带的相互作用,并当有外源 UDP-Gal 存在时能半乳糖基化。用去除 GlcNAc 的酶预处理卵 (GlcNAc 是半乳糖基转移酶的底物),精子与卵的结合减少 86%,当用去除半乳糖的酶预处理卵(增加半乳糖基转移酶潜在受体的数目),精子与卵的结合增加 55%。 ZP_3 是否是精子半乳糖基转移酶的受体,尚未确定。

完全阻断 N-糖基化的衣霉素,阻止海胆卵胚胎形成和原肠形成,以及发育的其它阶段。齿缘墨角藻, (*Fucus serratus*) 的受精,被含有甘露糖基或 L-岩藻糖基的多糖与精子的结合所抑制,或被用 α -甘露糖苷酶,或 α -L-岩藻糖苷酶预处理卵所抑制。这样,这种生物的受精,明显地依赖卵表面的甘露糖基和岩藻糖基,与精子表面的专一的结合糖的配体相结合。

除上述这些系统外,研究得比较清楚的细胞与细胞间的识别系统是匹配酵母的有性交配。相对类型 (5 型和 21 型) 的温奇汉逊酵母 (*Hansenula wingeei*) 单倍体细胞,被在细胞混合后立即使细胞凝聚的物质所包被。这些物质经蛋白酶水解,从细胞表面释放。5 型因子是糖蛋白,含 85% 甘露糖,10% 蛋白质,5% 磷酸盐,含有专一结合 21 型因子的部

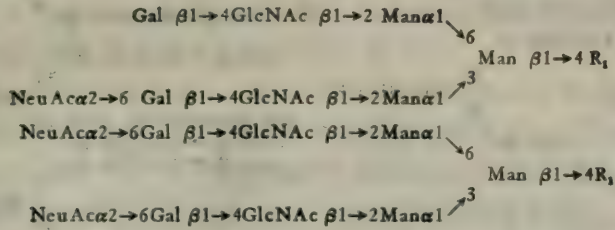
位。21 型因子是一个小的酸性糖蛋白,含有 5% 的糖,具有典型的 N-连接的寡糖链的核心结构。

另外,如豆科植物的共生固氮,亦可能是植物根须细胞的凝集素与根瘤菌细胞壁上的糖的识别起始的。花柱受粉,海绵细胞的团聚、血小板的相互粘着等,都有糖蛋白参与。看来,在许多识别系统中,都依赖细胞表面的糖和相对应细胞上的糖结合蛋白的相互作用。

二、糖链结构与其功能的关系

近些年来,由于更多的例子揭开了糖蛋白的糖链与各种生物现象的重要关系,人们对糖蛋白糖链的结构和功能的关系的兴趣,大大地提高了。

人血清



牛血清

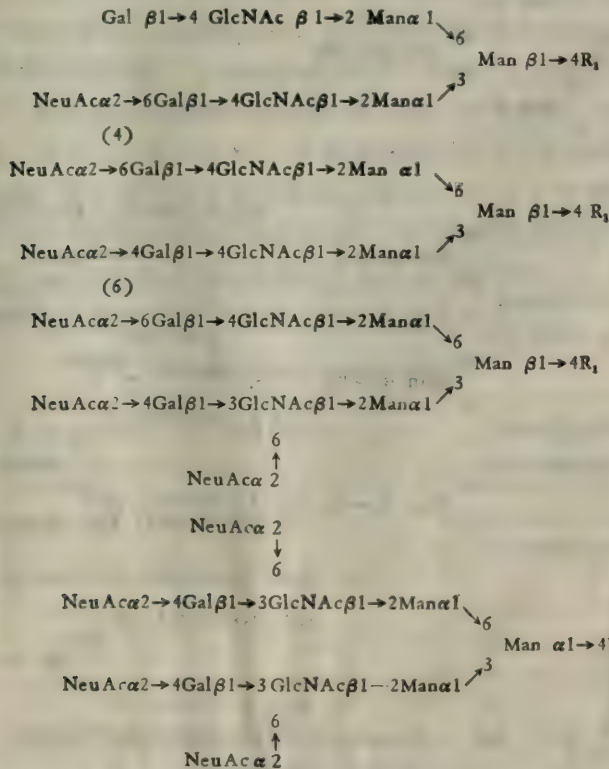


图 51 人血清和牛血清纤维粘连蛋白寡糖结构。R₁=GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc_{OT}。(出处同表 10)

(一) 糖链结构的种属专一性和器官专一性

要真正了解糖链的功能，种属专一的和器官专一的糖链结构的差别的信息是必不可少的。

在牛和大鼠的糖蛋白中，存在外部具有 Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc 和 Gal β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc 基团的复杂型天冬酰胺连接的糖链，而在人的糖蛋白中不存在这样的结构。与种族相关的糖蛋白糖链的差异，已在多种糖蛋白中证明。

从牛血清纯化的纤维粘连蛋白 (fibronectin) 含有四种不同的、天冬酰胺连接的糖链，而从人血清分离的这种蛋白质，只有两种类型的二天线的复杂型糖链 (图 51)。从牛和人血清纯化的血凝固因子 II 的糖链，也有相似的结构差别。

大鼠和人的 α_1 -酸性糖蛋白的糖链也显示十分显著的结构差别。在人 α_1 -酸性糖蛋白的糖链中，没有在最接近天冬酰胺的 N-乙酰葡萄糖胺基上连接 α -岩藻糖的结构，而在有些糖链的外周部分含有 1 个或 2 个 α -岩藻糖基。大鼠 α_1 -酸性糖蛋白的有些糖链的外周部分，含有 Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc 基团。大约 80% 的大鼠 α_1 -酸性糖蛋白糖链是二天线的复杂型，而人的糖链，90% 以上是 3 或 4 天线的 (图 52)。

C_{1q} 是补体的第一个成分的亚成分，是由 18 个多肽组成的非常复杂的分子。对人和牛 C_{1q} 分子结构的充分研究表明，它们有非常相似的氨基酸组成和三维结构。尽管它们在肽链部分如此相似，两种 C_{1q} 分子的糖链的外周部分是不同的 (图 53)。这些明显的不同，可能是由两个不同种属的高尔基膜上的一套糖基转移酶造成的。

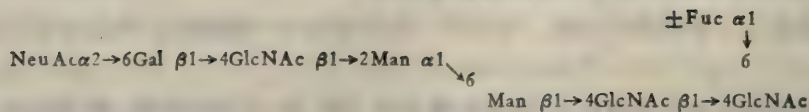
血蓝蛋白是无血红素、含铜的大分子糖蛋白。在一些软体动物和节肢动物中，起运输氧的作用。比较它们的血蓝蛋白的糖链结构，显示明显的种属差异。属软体动物的蜗牛 (*Helix pomatia*) 和静水椎实螺 (*Lymnaca stagnalis*) 与属节肢动物的龙虾的一个品种 (*Panulirus interruptus*) 血蓝蛋白的寡糖分析结果 (表 48)：用 Bio-Gel P-4 分级分离，蜗牛血蓝蛋白的中性糖，显示二个相当于 8—9 个葡萄糖单位的较小寡糖和 3 个大于 16 个葡萄糖单位的较大寡糖。椎实螺血蓝蛋白的寡糖，主要是大于 16 个葡萄糖单位的较大寡糖，而龙虾只有相当于 9 个葡萄糖单位的较小寡糖。它们的糖链结构也有非常显著的差别 (图 54)，蜗牛血蓝蛋白的寡糖是含有岩藻糖和木糖的复杂型糖链。而 *P. interruptus* 血蓝蛋白的寡糖结构是不含岩藻糖、亦不含木糖的高甘露糖型和杂交型。

表 48 不同种属血蓝蛋白的糖的分析数据

种属	分子量 (Da)	糖含量 (%)	糖分析 (摩尔比)
蜗牛	9 × 10 ⁶	9	Fuc 0.9 Man 3.0 Xyl 0.9 Gal 0.5 3-OMe-Gal 2.6 GalNAc 1.0 GlcNAc 1.5
静水椎实螺	9 × 10 ⁶	3	Fuc 0.9 Man 3.0 Xyl 1.0 Gal 0.9 3-OMe-Gal 0.6 GalNAc 1.0 3-OMe-Man 0.9 GlcNAc 1.0
龙虾	4.5 × 10 ⁶	1	Man 2.4 GlcNAc 1.0

摘自 van Kuik, J. A. et al., 1985, Glycoconjugates, Proceedings of the VIII th international symposium, Vol. 1, p. 122, Eds. Davidson, E. A. et al., Praeger Scientific, New York.

人



牛

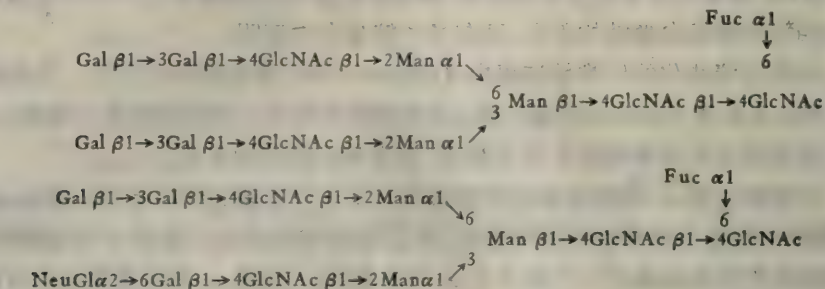
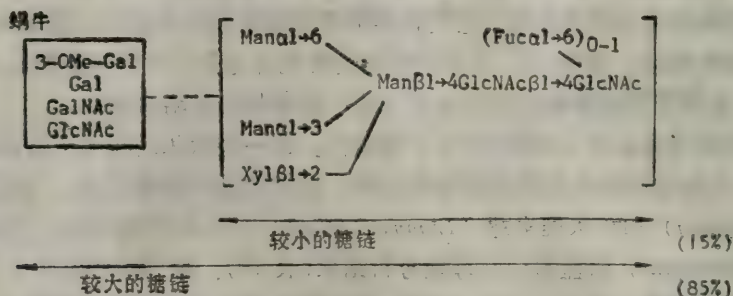


图 53 人和牛补体 C_{1q} 的寡糖链结构。(摘自 Mizuochi, T. et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253, 7404)



龙虾

- Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ (GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man $\alpha 1 \rightarrow 3$) Man $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc (5%)
- Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ (GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 2$ Man $\alpha 1 \rightarrow 3$) Man $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc (45%)
- Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Man $\alpha 1 \rightarrow 3$) Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Man $\alpha 1 \rightarrow 3$) Man $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc (45%)
- Man $\alpha 1 \rightarrow 3$ Man $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Man $\alpha 1 \rightarrow 3$) Man $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc (5%)

图 54 不同种属无脊椎动物的血蓝蛋白的糖链结构。(出处同表 48)

γ -谷氨酰转肽酶的糖链的研究揭示,糖蛋白的糖链不仅存在种属差异,也存在器官差异。 γ -谷氨酰转肽酶是膜结合糖蛋白,广泛分布于各个器官,如肝、肾、小肠、胰、脑。酶蛋白由大的和小的亚单位组成,通过大亚单位的 N-末端部分,酶埋在细胞质膜中。从各种动物的肾和肝纯化的 γ -谷氨酰转肽酶的主要糖链结构见图 55。虽然酶的糖链结构显示随动物种属而变化,但 1 个显著的特征是:在所有种属的肾的 γ -谷氨酰转肽酶的糖链中,都有平分型的 (bisecting) N-乙酰葡萄糖胺基,而在 3 种动物(大鼠、牛、小鼠)的肝中 γ -谷氨酰转肽酶的糖链,都没有平分型 N-乙酰葡萄糖胺。这一结果表明,催化平分型 N-乙酰葡萄糖胺连接到寡糖链的酶, Gn-TIII 的活力虽然在肾中很强,而在哺乳动物的肝中未显示。支持这一推论的另一证据是迄今研究的,在许多动物的肝中合成的糖蛋白,不含平分型 N-乙酰葡萄糖胺的糖链结构。

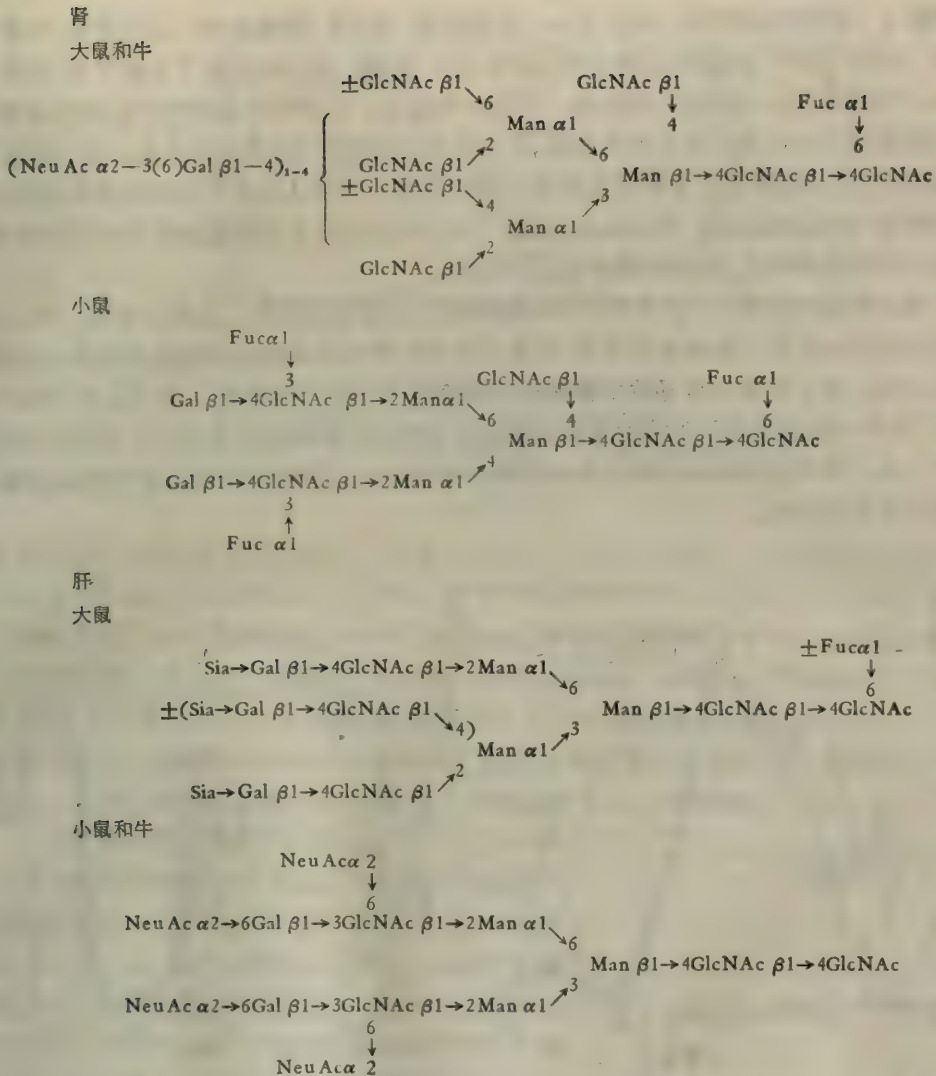


图 55 不同动物的肾和肝的 γ 谷氨酰转肽酶的主要糖链结构。(出处同表 10)

(二) 恶变细胞的糖链结构

正常细胞社会普遍存在生长调节现象,在细胞恶变后就失去这种调节,表明细胞恶变后,它被识别的标志变了。许多恶变细胞的另一个不正常特性是恶变细胞能在体内转移。为了了解这些特性的本质,关于恶性细胞表面的详细信息是必需的。

至今最广泛地观察到的与细胞恶变有关的现象,是含有岩藻糖的大分子量的糖肽的出现和增加。这一现象是由 Meezan 等通过对小鼠成纤维细胞与它的病毒变异细胞的研究发现的。用放射性葡萄糖胺代谢标记小鼠 3T3 成纤维细胞,和它们的猴病毒变异的细胞 SV-3T3。充分消化未变异的和变异的两种细胞的亚细胞成分,获得放射性糖肽,然后进行凝胶过滤分析,发现 SV-3T3 细胞含有更多的大糖肽(图 56)。这一结果,激励了许多工作者对其它细胞与其恶变细胞的糖肽的比较研究。Warren 等比较了 BHK₂₁/

C₁₃ 细胞（一株地鼠细胞株）和经 Rous 肉瘤病毒（RNA 肿瘤病毒）以及多瘤病毒和 SV 40（两种 DNA 肿瘤病毒）变异的 BHK/C₁₃ 细胞。他们也分析了小鼠 3T3 细胞和经 Rous 肉瘤变异的鸡胚成纤维细胞。在每一种情况，变异细胞表面的大的糖肽数增加了。在细胞培养液中加入放射性岩藻糖，使细胞标记，观察到的差异更显著。这一现象不仅在病毒变异细胞，亦在化学和自发变异细胞中发现。可以认为是变异细胞表型的表达。在非成纤维细胞，包括大鼠 Novikoff 肝癌 NISI-67 细胞、人白血病细胞和淋巴瘤细胞、以及人神经纤维瘤细胞，也同样观察到这种差异。

经唾液酸酶充分消化，正常和变异细胞糖肽大小的差异消失。从这一现象，Warren 提出变异细胞和正常细胞糖肽的差异，可能只是它们糖链所含唾液酸基数目的多少所致。他并且推测，唾液酸化是导致变异细胞表面糖链变化的关键步骤。为了证实 Warren 的假设，许多实验室比较了正常和变异细胞的唾液酸基转移酶的活力水平。然而，得到的结果不一致。有些变异细胞的酶活力水平比正常细胞高，而其它的结果，变异细胞的酶活力水平比正常细胞低。

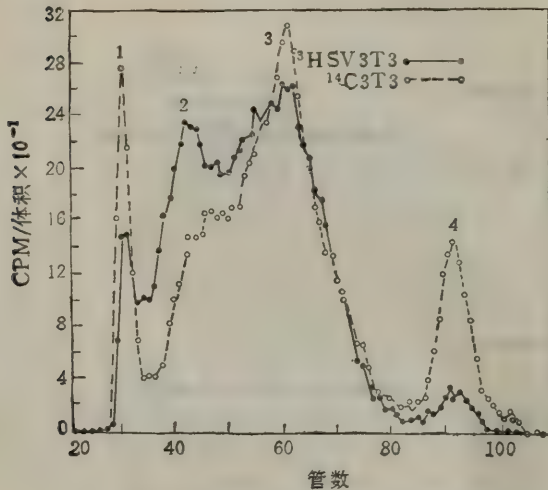


图 56 $[^3\text{H}]$ 葡萄糖胺标记的 SV-40-3T3 和 $[^{14}\text{C}]$ 葡萄糖胺标记的 3T3 细胞膜的糖肽在 Sephadex G-50 柱的层析图谱。

(摘自 Meezan, E. et al., 1969, *Biochemistry* 8, 2518)

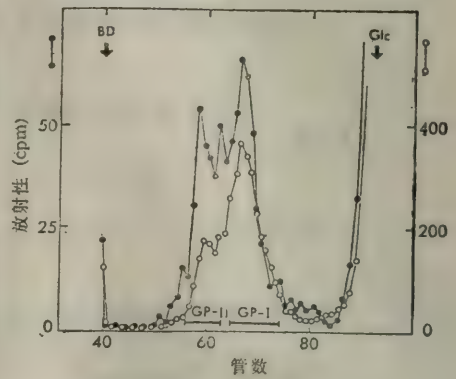


图 57 岩藻糖标记的细胞表面的糖在 Sephadex G-50 柱上层析。

○表示 ^{14}C -标记的 BHK 细胞
●表示 ^3H -标记的 Py-BHK 细胞
(摘自 Ogata, S. et al., 1976, *Nature*, 259, 580)

Ogata 等利用 Con A-Sepharose 柱的结合专一性，研究正常细胞和变异细胞大糖肽和小糖肽的差异，得到了不同的结论。以 GPI 表示小糖肽，GPII 表示大糖肽（图 57）。从正常和变异细胞得到的 GPI 和 GPII 加至 Con A-Sepharose 柱（图 58），GPI 通常结合于柱上，并可用 0.1 mol/L α -甲基甘露糖洗脱，而几乎所有的 GPII 都从柱上流出，即使用唾液酸酶充分消化，亦不改变 GPII 在 Con A-Sepharose 柱上的行为，表明 GPI 和 GPII 的差别，不能单用它们不同的唾液酸量来解释。当去唾液酸的 GPII 进一步用刀豆（jack bean）的 β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶消化，然后加到 Con A-Sepharose 柱上，绝大多数的糖肽结合于柱上。用内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶

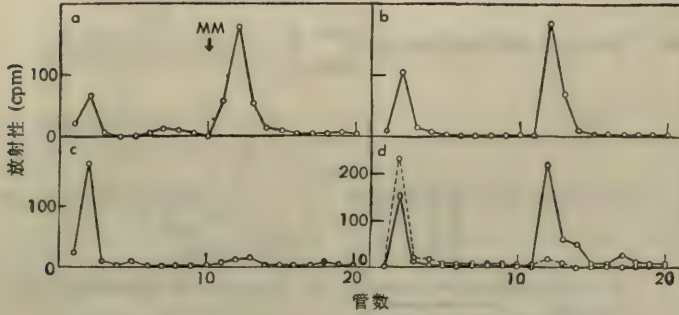


图 58 ConA-Sepharose 柱层析。

a, BHK 细胞的 GP-I; b, Py-BHK 细胞的 GP-I; c, Py-BHK 细胞的 GP-II; d, 经唾液酸酶处理(----)或经唾液酸酶, β -半乳糖苷酶和 β -N-乙酰己糖苷酶处理的(——) Py-BHK 细胞。
(出处同图 57)

D 消化, 这一糖肽转化为 $\text{Fuc } \alpha 1 \rightarrow 6\text{GlcNAc-Asn}$ 。由此确定, 内切糖苷酶消化前的糖肽结构是 $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 6(\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 4(\text{Fuc} \alpha 1 \rightarrow 6)\text{GlcNAc-Asn}$ 。用唾液酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -N-乙酰氨基己糖苷酶和内切- β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 D, 顺次消化 GP I, 亦得到同样的片段。这些结果表明 GPI 和 GPII 都是复杂型寡糖。在前面(第二章三(一)2 节)已讨论, 糖链中 2 个 α -甘露糖基, 游离的或只在 C-2 位由其它糖基取代, 对糖链与 Con A-Sepharose 的结合是必需的。因此, 以上结果表明 GPI 是具有二天线的复杂型寡糖, 而 GPII 绝大多数是多于二天线的糖链。

大的和小的糖肽结构的差别, 亦在 BHK 和 Py-BHK 细胞的糖肽中阐明。从这两种细胞获得的混合糖肽, 用 $[^3\text{H}]$ 岩藻糖标记、胼解、释放的糖肽, 在 pH 5.4 进行高压电泳, 两种不同来源的糖肽的电泳图谱相似, 但不相同。两种糖肽都大约有 80% 唾液酸化, 表明导致糖链结构变化的关键不是在唾液酸化。当样品经唾液酸酶充分消化, 然后在 BiO-Gel P-4 柱上层析, BHK 和 Py-BHK 糖链的差别变得更明显。BHK 细胞的去唾液酸寡糖分为 3 个组分, 而 Py-BHK 的去唾液酸寡糖, 除这三个组分外, 还有另外两个组分(图 59)。此外, Py-BHK 细胞中较大的寡糖的比例增加。用外切糖苷酶顺次消化, 和对寡糖结构的研究, 揭示它们是具有 2 至 6 个 $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow$ 基团的复杂型糖链(图 60)。

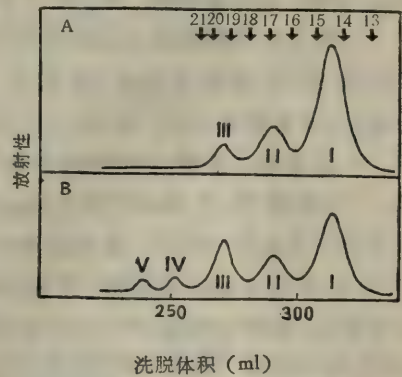


图 59 $[^3\text{H}]$ 岩藻糖标记的 BHK 和 Py-BHK 细胞的去唾液酸寡糖的 Bio-Gel P-4 柱层析。A, BHK 细胞; B, Py-BHK 细胞。(出处同表 10)

最近, Pierce 对 BHK 成纤维细胞和 Rous 肉瘤-和多瘤-病毒变异的 BHK 成纤维细胞 (Rs BHK 和 Py-BHK) 的糖肽的研究, 亦得到相似的结果。用 $[2\text{-}^3\text{H}]$ 甘露糖代谢标记 BHK 和病毒变异的 BHK 细胞, 标记细胞的天冬酰胺连接的糖肽, 用固定化的 ConA、扁豆凝集素(简称 LCA)和 L-PHA 的系列亲和层析分级分离。参入 Rs BHK 和 Py-BHK 细胞糖肽的总放射性有 17% 滞留在 L-PHA 柱上, 而滞留于柱上的亲代

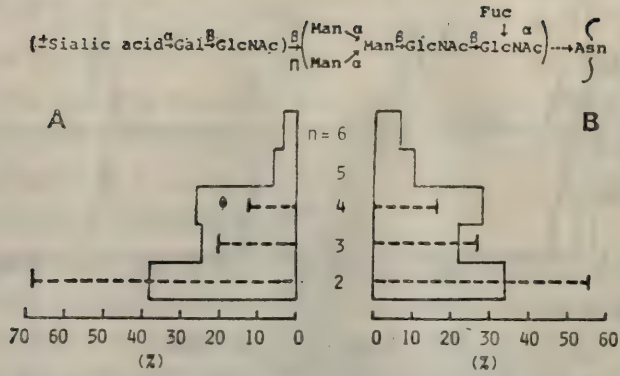


图 60 具有不同外围链数的寡糖的比例。

A, 细胞表面糖肽的寡糖; B, 细胞糖肽的寡糖。|----| 正常细胞; □, 变异细胞。

(摘自 Takasaki, S. et al., 1980, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92, 735)

BHK 细胞糖肽的放射性低于 10%。固定化的 L-PHA 对含甘露糖基的 C-6 被 GlcNAc-Gal 取代的寡糖 Gal → GlcNAc → 6Man 具有专一的亲和性, 这种取代模式, 由下列事实确认, 滞留于柱上的放射性标记糖肽, 经甲基化、水解、还原后, 存在放射性标记的 3,4-二-O-甲基甘露醇。另外, 观察到 Py-BHK 细胞的放射性标记的糖肽中, 具有甘露糖 C-6 支链的 3 和 4 天线的寡糖量增加。以上结果, 表明不论是 Rous 肉瘤病毒或多瘤病毒变异的 BHK 成纤维细胞, 均显示了含有 GlcNAc β1 → 6Man α1 → 结构的寡糖量的增加。

比较从绒毛膜癌患者尿中纯化的绒毛膜促性腺激素 (HCG) 与正常孕妇尿的 HCG 和胎盘 HCG 的糖链结构 (图 61)。正常孕妇尿和胎盘 HCG 去唾液酸的天冬酰胺连接的糖肽, 含有寡糖 E、F 和 H, 它们的摩尔比为 1:2:1, α-亚基含有大约等量的 F 和 H 寡糖, β-亚基则含等量的 E 和 F。由于两个亚基的多肽链都具有 2 个糖基化的天冬酰胺基, 3 种寡糖 E、F 和 H 可特定地连接在 HCG 的 4 个天冬酰胺所在处。而从绒毛膜癌患者尿中分离的 HCG, 显示各种与正常 HCG 寡糖不同的寡糖模式, 有些绒毛膜癌 HCG 的糖链中没有唾液酸, 而另一些绒毛膜癌 HCG 的糖链则高度唾液酸化。虽然有这些变化, 经唾液酸酶消化后的绒毛膜癌 HCG, 在 Bio-Gel P-4 柱上的层析模式非常相似, 而与正常 HCG 的层析模式则完全不同。对每一个寡糖的结构研究, 揭示所有绒毛膜癌 HCG 都包含图 60 所列的 8 种寡糖。这些寡糖的结构表明: Gal β1 → 4GlcNAc β1 → 4Man α1 → 基团的存在, 即在三甘露糖核心的同-α-甘露糖基的 C-2 和 C-4 上各连接一条外围链, 和岩藻糖基化的增加, 是绒毛膜癌 HCG 寡糖的特征。绒毛膜癌 HCG 的总的岩藻糖基化糖链占 50%, 是正常 HCG 的二倍, 在正常 HCG 或从葡萄胎 (hydatidiform mole) 患者尿中纯化的 HCG 中未发现这些结构。因此, 这种变化有希望作为诊断绒毛膜癌的有用标志。再则, 因为在健康人组织的糖蛋白中, 未发现寡糖 C 和 D 的结构, 这种变化给人们指出了一条有效的、免疫治疗绒毛膜癌的可能的途径。

比较正常人的和慢性白血病患者的白细胞的糖肽, 白细胞表面的天冬酰胺连接的糖蛋白, 经链霉蛋白酶水解、离子交换层析, Bio-Gel P-10 凝胶过滤, 获得中性糖肽。白血

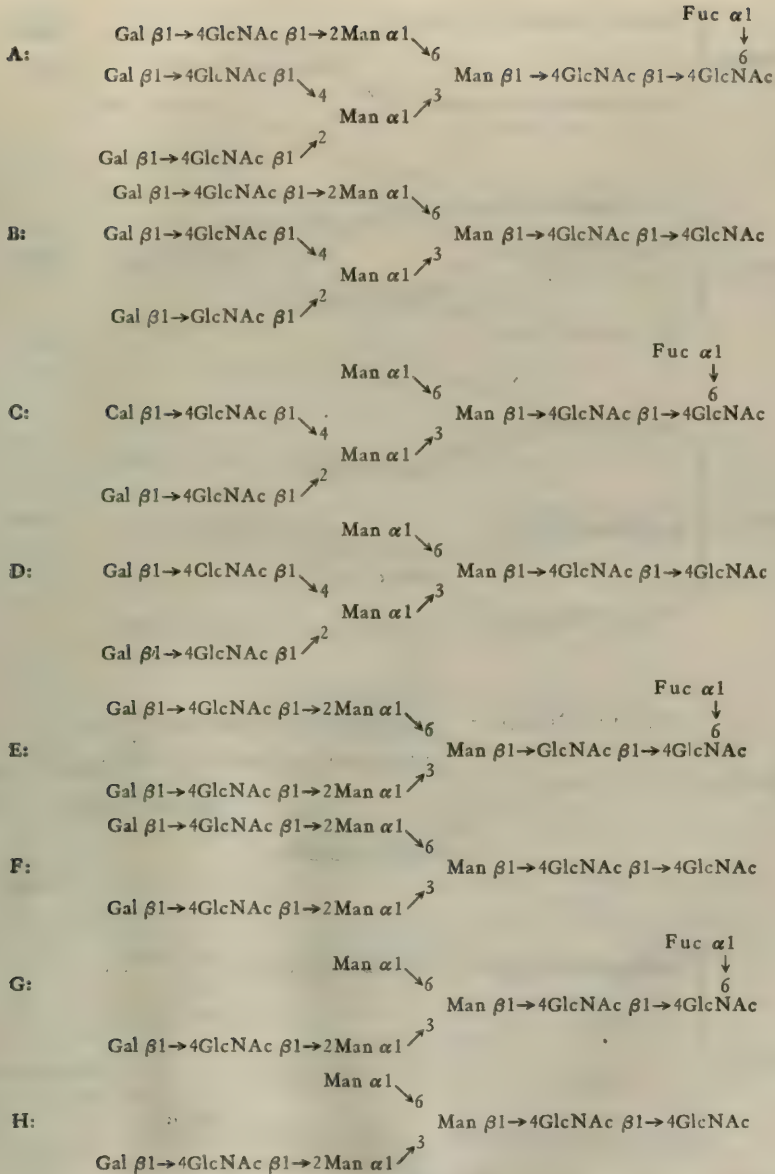


图 61 绒毛膜促性腺激素去唾液酸寡糖 E. F. H 存在于正常孕妇尿及胎盘的 hCG。绒毛膜癌患者尿中包含上列 8 种结构。

(摘自 Kobata, A. et al., 1985, *Glycoconjugates, Proceedings of the VIIIth international Symposium*, Vol. 1, p. 56, eds. Davidson, E. A. et al., Praeger Scientific, New York)

病患者的白细胞糖肽中,唾液酸与己糖的比值比正常白细胞的显著地低。将¹⁴C] 乙酸酐标记获得的糖肽,进行凝集素层析分离。与 Con A-Sepharose 结合的糖肽,用不同浓度的甲基葡萄糖和甲基甘露糖洗脱,白血病患者白细胞的糖肽,显示大约相等量的二天线结构(II_A)和高甘露糖型/杂交型糖肽(III),正常白细胞糖肽 II_A 与 III 之比大约为 4:1。III 经 WGA-Sepharose 柱层析,滞留于柱上的放射性少于 1%,表明样品中几乎完全不存在具有平分型 GlcNAc 的杂交型结构。与 Con A 不结合的糖肽(I),在 PSL-

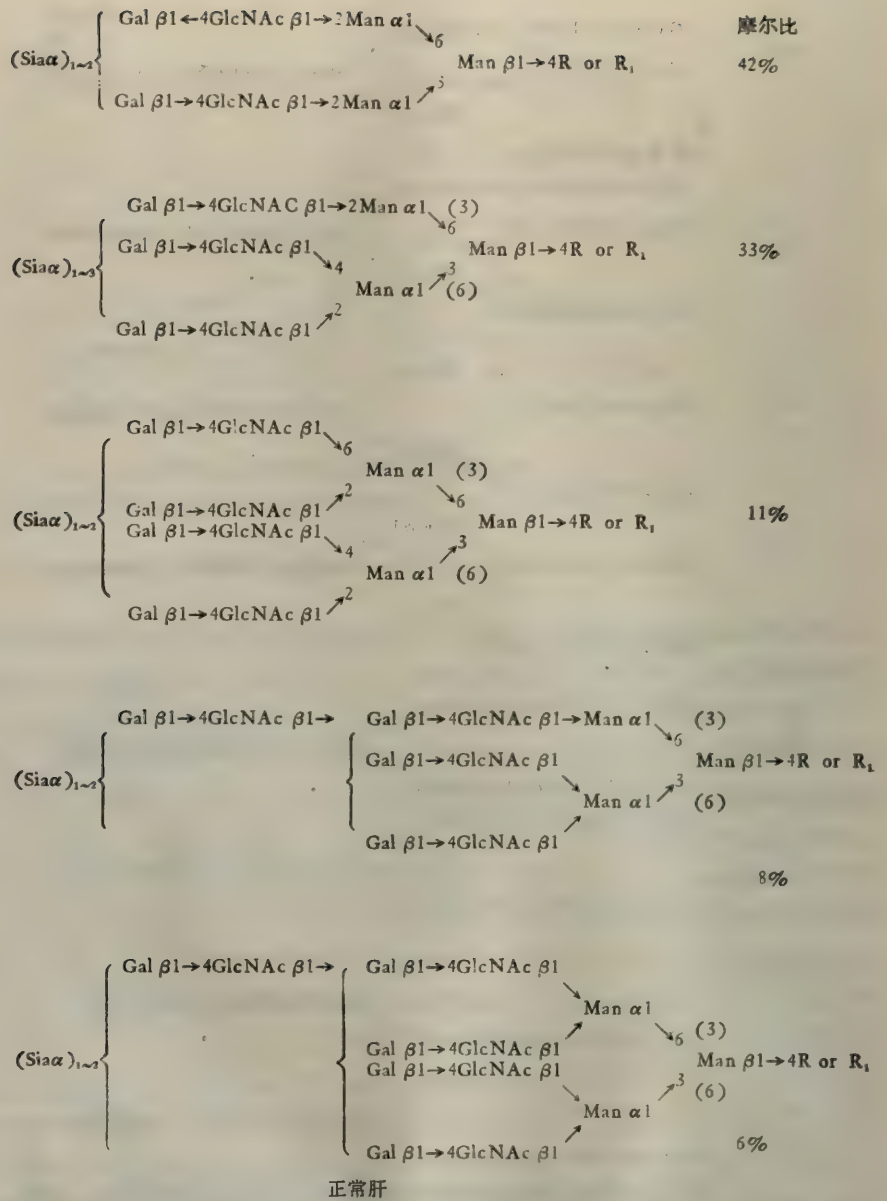


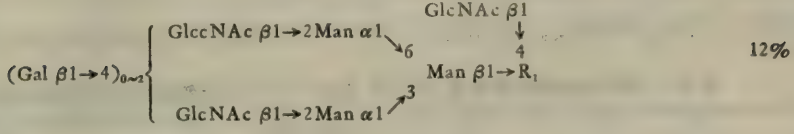
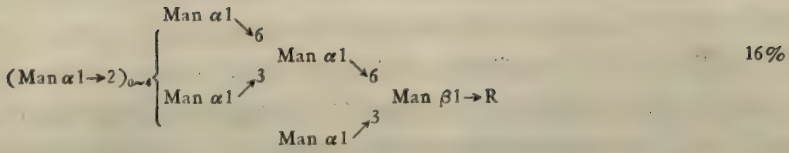
图 62 大鼠肝和大鼠肝癌 AH66 细胞 γ -GT 的糖链结构。

和L-PHA-Sepharose柱上分离,结合于柱上的糖肽,白血病白细胞的比正常白细胞的高得多。已知这些凝集素与三和四天线的寡糖结合,由此表明,相对于产生最高水平的二天线糖肽的正常白细胞,慢性白血病患者的白细胞糖肽,显示趋向于大量合成三和四天线的天冬酰胺连接的结构。提示在白血病白细胞中,支链的 N-乙酰葡萄糖基转移酶的水平增加。

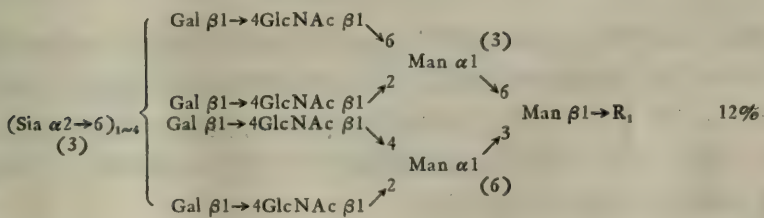
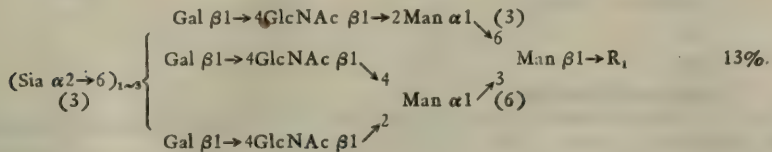
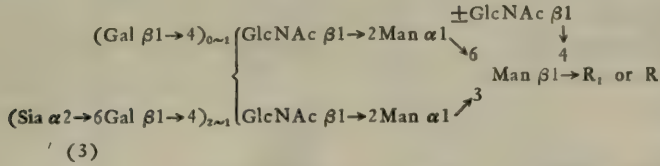
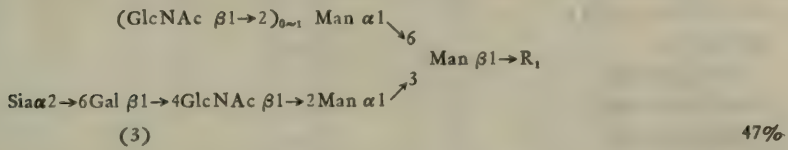
比较正常人膀胱上皮细胞株 HCV-29 和它的恶性变种 HCV-29T 的糖肽,亦得到相似结果。HCV-29 是起源于人正常上皮、不浸润、不生成癌。它的恶性变种 (HCV-29T) 是在体外从 HCV-29 “自发”变异的变种亚株。在离体情况,它浸润鸡胚心

中性

摩尔比



酸性



$R = 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$, $R_1 = 4\text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$

肝癌 AH66

(摘自 Yamashita, K. et al., 1983 *Cancer Res.* **43**, 5059)

组织,并在裸鼠体内生成瘤。 [¹⁴C]-或 [³H]-葡萄糖胺标记的这两种细胞株的糖肽,经凝胶过滤,随后在 Con A-Sepharose 和 LCA-Sepharose 柱上分离。获得的结果揭示,生成瘤的 HCV-29T 细胞的糖肽与不生成瘤的亲代细胞的糖肽相比,恶变细胞的糖肽中,存在更多支链的三和四天线的寡糖的同时,二天线的寡糖减少。正常和变异细胞,从多支链寡糖的差异看来,仅是量的差别。多支链寡糖的增加,可能是 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶失控的反映。

从大鼠腹水肝癌 AH 66 纯化的 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 的 N-连接的寡糖,与正常大鼠肝的 γ -GT 的寡糖相比,有非常明显的不同。从肝癌纯化的 γ -GT 的糖链数明

显增加,大约是正常肝的4倍,正常大鼠肝 γ -GT 的糖链都是酸性糖链,而肝癌细胞 γ -GT 的糖链中有28%为中性,由高甘露糖型和复杂型糖链组成(表49)。它们的酸性糖链的主要结构差别是:(1)正常肝的酶具有完全的外围链, $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow$,而肝癌的酶,多数是不含半乳糖的不完全外围链;(2)肝脏酶的糖链中有 $\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow$ 二糖重复结构,而肝癌酶的糖链中则没有这种结构;(3)肝癌酶的糖链中40%以上含有平分型 N-乙酰葡萄糖胺,而正常肝的 γ -GT 的糖链中则没有这种结构(图62)。

表49 正常大鼠肝和大鼠肝癌 AH-66 细胞 γ -GT 的天冬酰胺连接的寡糖的特征

	肝癌 AH-66	正常肝
糖链数 (mol/mol 酶)	14.0	3.7
酸性糖链(%)	72.0	100
单唾液酸衍生物	27	41
双唾液酸衍生物	30	46
三唾液酸衍生物	8	13
四唾液酸衍生物	7	0
唾液酸含量 (mol/mol 酶)	19.5	6.0
糖链类型(%摩尔比)		
高甘露糖型	16	0
复杂型	84	100
二天线(平分的二天线)	59(39)	42(0)
三天线	13	33
四天线	12	11
含重复结构的三和四天线	0	14

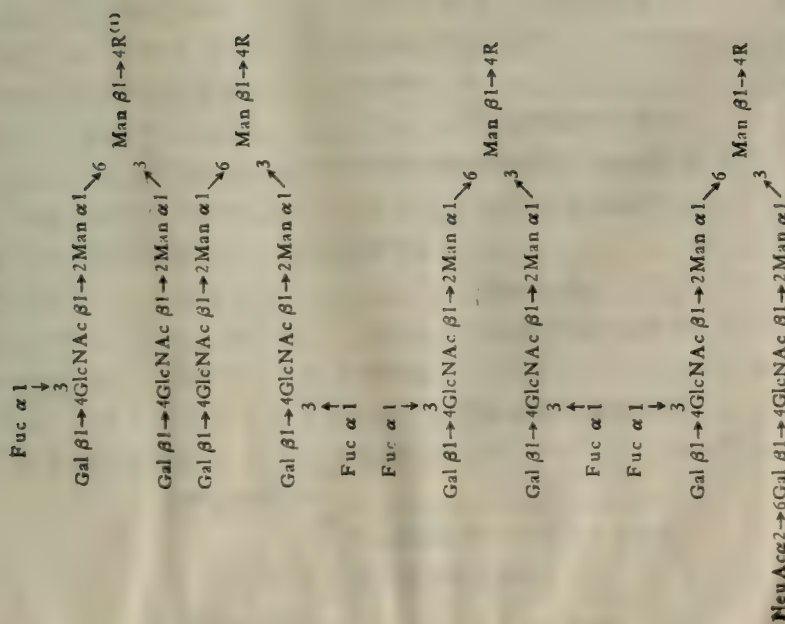
摘自 Yamashita, R. et al., 1983, *Cancer Res.* 43, 5059。

虽然,大鼠肝癌 γ -谷氨酰转肽酶是一种细胞质膜糖蛋白,但它的寡糖结构有相当多数是不含半乳糖的不完全外围糖链。绝大多数质膜糖蛋白是接近 C-端区的肽链固定在膜中。而 γ -GT 则相反,它们与质膜的结合部位,是酶的大亚基通过它的 N-末端固定于膜中,因此, γ -GT 可能不是真正的膜糖蛋白,而是分泌糖蛋白。分泌糖蛋白是通过其位于 N-末端的疏水部分固定于膜。

有趣的是恶变细胞的分泌糖蛋白的糖链减少,这种与膜糖蛋白相反的趋向,是在比较从腮腺和各种肿瘤组织纯化的 α -淀粉酶的研究中发现的。 α -淀粉酶如同碱性磷酸酯酶一样,是已知的、在肿瘤组织中异位产生的、少数几种酶中的一种。Weiss 报道一例支气管癌患者血清淀粉酶活力增加。自此以后,许多实验室报道了与肿瘤(如卵巢肿瘤、肺肿瘤)相关的高淀粉酶血症。这些淀粉酶在凝胶电泳和 DEAE 柱层析的行为与腮腺淀粉酶相似,而与胰淀粉酶不同。

对从人腮腺和产生淀粉酶的两种肿瘤(卵巢乳头状囊腺瘤和肺支气管腺瘤)纯化的 α -淀粉酶的研究,揭示正常的和肿瘤的酶的糖链结构(图63)不同。腮腺淀粉酶中有4种寡糖结构,从卵巢和肺肿瘤纯化的淀粉酶则有6种不同的糖链。这些糖链结构(包括腮腺 α -淀粉酶)的结构特性如下:(1)它们都是具有在还原端的 N-乙酰葡萄糖胺的 C-6 位连接一个 α -岩藻糖基的二天线的复杂型糖链;(2)酸性糖链仅以单唾液酸化形式出现,这种结构在其它糖蛋白中是罕见的;(3)糖链中的单个唾液酸基,只连接在外围链的 $\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 3$ 侧链。虽然腮腺和肿瘤淀粉酶的糖链结构有这些相似性,但在肿瘤淀粉酶的糖链中,

正常腮腺



肿瘤

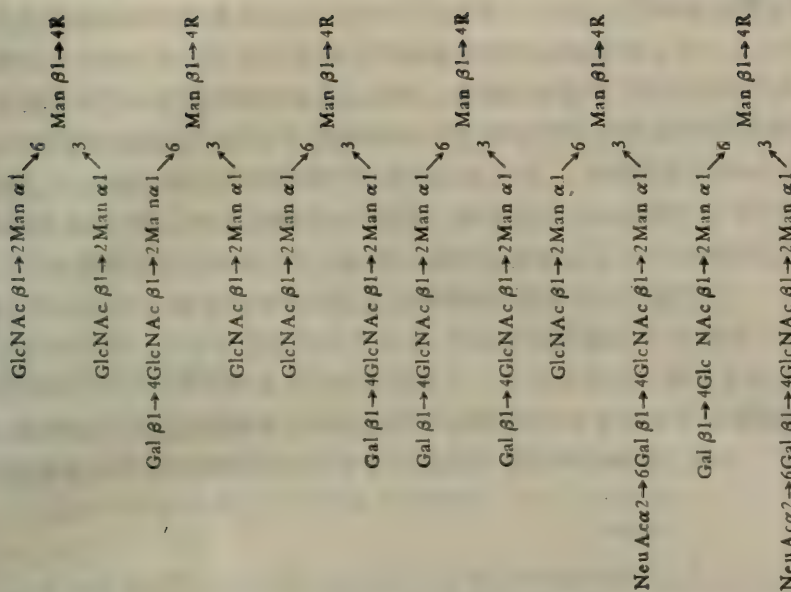


图 63 正常腮腺及卵巢癌、乳腺癌和肺癌、食管癌、胃癌、肝癌的糖链结构。

R = GlcNAc β 1 \rightarrow 4(Fuc α 1 \rightarrow 6) GlcNAc

(摘自 I'akasaki, S. et al., 1983, *Gann monograph on cancer research* 29, 129)

完全不存在连接于外围链的岩藻糖基。再则，肿瘤淀粉酶的许多糖链含有不完全的外围链。这些结果表明，与腮腺的酶相比，肿瘤酶的糖链形成是不完全的。

对甲状腺球蛋白的研究。用胼解、离子交换层析、Con A-Sepharose 和 RCA-Sepharose 柱层析分离糖肽；内切和外切糖苷酶消化，以及甲基化和核磁共振技术分析寡糖结构。正常组织的甲状腺球蛋白含高甘露糖型和复杂型寡糖。所有的复杂型寡糖链有 1 个或 2 个唾液酸基连接于末端半乳糖基。相反，从恶变的甲状腺组织制备的甲状腺球蛋白，具有几条去唾液酸的复杂型糖链，提示在恶性变甲状腺中唾液酸转移酶活力降低。用 Con A-Sepharose 亲和层析，亦发现从恶性组织得到的甲状腺球蛋白，比来自正常组织的，含有更多的三天线的复杂型寡糖，提示 α -甘露糖基- β 1,4N-乙酰葡萄糖基转移酶活力，在恶性组织中比在正常组织中高。再者，恶变组织的甲状腺球蛋白，含具有 Gal \rightarrow GlcNAc 二糖重复结构和外周 α -岩藻糖基的大分子量寡糖 (6000—8000)，这些大分子量寡糖对内切 β -半乳糖苷酶有抗性，表示它们是高度分支的。亦发现恶性组织的甲状腺球蛋白，含有磷酸二酯键形式的一个磷酸基团的复杂型寡糖。从以上结果，恶变组织甲状腺球蛋白寡糖结构的变化，可归纳为下列几点：(1) 磷酸化的高甘露糖型、杂交型和复杂型寡糖，仅在恶变组织的甲状腺球蛋白中存在；(2) 恶变组织的甲状腺球蛋白中，含

	(%)
1. GalNAc-ol	8.2
2. Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-ol	2.7
3. $\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1 \searrow 6 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 3 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	11.0
4. $\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1 \searrow 3 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 6 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	1.0
5. Neu Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc-ol	4.5
6. $\begin{array}{l} \text{Neu Ac } \alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal } \beta 1 \searrow 3 \\ \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 6 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	13.2
7. $\begin{array}{l} \text{Neu Ac } \alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal } \beta 1 \searrow 6 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 3 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	3.3
8. $\begin{array}{l} \text{Gal } \beta 1 \searrow 3 \\ \text{Neu Ac } \alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 6 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	10.3
9. $\begin{array}{l} \text{Neu Ac } \alpha 2 \rightarrow 3 \text{Gal } \beta 1 \searrow 3 \\ \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \nearrow 6 \end{array} \text{GalNAc-ol}$	36.0

图 64 腹水肝癌 AH 66 细胞质膜的 O-糖苷键型的寡糖结构。

(摘自 Yamashina, I. et al., 1983, *Gann monograph on cancer research*, 29, 149)

有生物合成未完全的、去唾液酸糖链结构;(3)恶变组织的甲状腺球蛋白中,存在具有重复 Gal → GlcNAc 二糖,和外围有 α-岩藻糖基的较大分子量的糖链。

几种腹水肝癌细胞株的质膜的糖肽和糖胺聚糖,与大鼠正常的和再生的肝的质膜的糖肽和糖胺聚糖相比,肝癌细胞质膜存在 O-糖苷键连接的糖肽和硫酸类肝素,而正常大鼠肝和再生肝质膜,不存在 O-糖苷键连接的糖肽和硫酸类肝素。

小鼠腹水乳腺癌细胞,和培养的乳腺癌细胞的糖蛋白中,发现存在含有 N-乙酰葡萄糖胺的 O-糖苷键连接的糖链。Yamashina 报道腹水肝癌 AH 66 细胞质膜的、含有唾液的 O-连接的寡糖,含有 N-乙酰葡萄糖胺(图 64)。除腹水肝癌外,其它癌细胞如 TA3-Ha 腹水乳腺癌细胞、人乳腺癌细胞 MAD、MB-231、MCF-7 和大鼠软组织肉瘤细胞都有这类寡糖结构,但在相应的正常组织中测不到。虽然,在许多糖蛋白中,存在含 N-乙酰葡萄糖胺的 O-糖苷键型寡糖,但它们不含唾液酸。

(三) 细胞发育与糖链结构

生物发育和分化的过程是高度复杂的,这些过程的调节不仅是个别蛋白表达的结果,亦是同类细胞和不同类细胞中这类分子之间的相互作用的结果。因此,为了解生物发育分化,了解细胞与细胞的相互作用是至关重要的。这样,研究细胞表面的糖复合物的变化是必不可少了。

细胞表面糖蛋白在发育过程中的变化,有许多有趣的事实。小鼠和人淋巴细胞成熟过程中,有些糖蛋白与花生凝集素(简称 PNA)结合的变化,不成熟的淋巴细胞与 PNA 结合,而成熟的淋巴细胞不结合。应用代谢标记技术,发现胚胎性瘤细胞具有不寻常的大分子糖肽。在这些细胞中大糖肽的存在,亦被用半乳糖氧化酶-NaB³H₄ 还原标记细胞表面的方法证实。特别有趣的发现是胚胎瘤细胞具有与正常早期胚胎多潜能性细胞共同的许多生物学性质,胚胎瘤细胞在离体的分化过程中较大的糖肽消失。这些糖肽的详细结构的阐明,可能了解哺乳动物胚胎发育的早期识别活动是有用的。

发育决定的细胞表面糖的变化,在红细胞分化的这一领域中研究得十分活跃。出生后红细胞中的血红蛋白含量和红细胞表面抗原发生显著的变化,出生后的第一年,成人血红蛋白取代胎儿血红蛋白,胎儿抗原(i)变为成人抗原(I)。成人红细胞的大多数属于 I-抗原阳性,胎儿或新生儿红细胞与抗-i 抗体反应强,而与抗-I 抗体仅有弱反应。因此,设想多数人在发育过程获得 I 抗原和失去 i 抗原。Marcus 和 Kabat 最先确定 I 抗原决定簇是 Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 6Gal。第三带是 I 和 i 抗原的主要载体,化学组成分析表明, I-带 3 比 i-带 3 具有更多的半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺,全甲基化分析表明 i-带 3 是直链乳糖胺结构 (Galβ1 → 4GlcNAcβ1 → 3)_n, 而 I-带 3 则是具有高度分支的

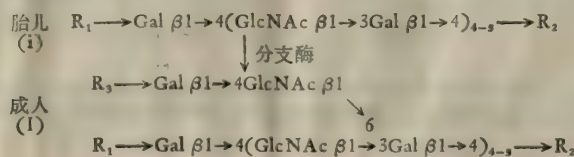


图 65 从胎儿到成人发育过程带 3 糖链的结构变化。

$R_1 = \text{H}$, $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2$; $\text{Sia}\alpha 2 \rightarrow 3/6$; $R_2 = (\text{Man})_3 (\text{GlcNAc})_{4-5}$, $R_3 = R_1$ 。

(摘自 Fukuda, M. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 3700)

聚乳糖胺结构 (R-Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3 (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6) Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc \rightarrow R'。测定两者的核心结构, 没有显著差异。这些结果清楚地表明, 从 i 到 I 变化的主要结果是直链聚乳糖胺结构转化为分支的聚乳糖胺结构(图 65)。最近, Fukuda 等证明胎儿乳糖胺聚糖含有 Sia α 2 \rightarrow 8Sia α 2 \rightarrow 3Gal 结构, 而在成人乳糖胺聚糖中不存在这种结构。

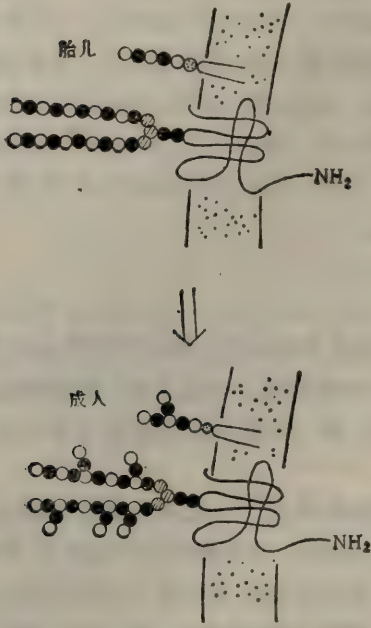


图 66 红细胞膜上糖脂(红细胞糖苷脂)和糖蛋白(带 3)上乳糖胺聚糖的结构变化。胎儿红细胞上是没有分支的直链聚乳糖胺 (Gal \rightarrow GlcNAc)。连接于 Gal \rightarrow Glc \rightarrow Cer 或带 3 的 (Man)₂(GlcNAc)₂ 核心。当胎儿红细胞发育为成人红细胞, 直链转变为具有 Gal \rightarrow GlcNAc 支链的结构。(出处同图 28)

与 i 和 I 抗原决定簇的研究相平行, 亦研究了胎儿和成人红细胞的结构, 当从表面标记细胞释放的寡糖经 Sephadex G-50 凝胶过滤, 从 I 和 i 红细胞得到完全不同的模式: 成人 I 细胞释放大小不同的若干寡糖, 而胎儿 i 细胞产生的是较小分子量的寡糖, 与从 I 或 i 带 3 释放的寡糖相似。因此, 这一结果清楚地表明, 从胎儿到成人的发育过程, 细胞表面复合糖类的寡糖结构, 从直链的聚乳糖胺变到有分支的聚乳糖胺(图 66)。

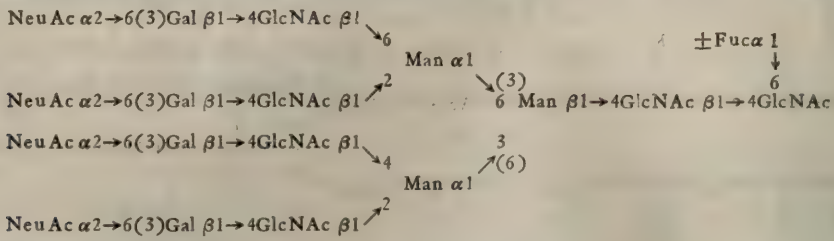
人红细胞的分化和成熟过程, 细胞表面糖蛋白的变化, 可归纳如下: (1) 前母红细胞 (proerythroblast) 期几乎不存在第 3 带和第 4, 5 带, 但母红细胞 (erythroblast) 成熟的后期明显出现第 3 带和第 4, 5 带, 并且到接近红细胞成熟期更有增加。(2) 血型糖蛋白在血红蛋白合成开始前已存在于前母红细胞, 在细胞成熟过程中, 它们的量亦有增加。(3) 105K 和 95K 分子量的糖蛋白在前母红细胞期是红细胞主要糖蛋白, 母红细胞期则为次要糖蛋白, 继续成熟则更下降。(4) 乳糖胺聚糖的量在前母红细胞中最低, 在母红细胞期亦是少的, 然后, 当细胞成熟时大幅度增加。(5) 成人红细胞成熟过程分支结构显著增加(表 50)。

表 50 成年人红细胞样细胞成熟过程细胞表面糖蛋白的变化

	前母红细胞	母红细胞	红细胞
带 3	-	+	+++
血型糖蛋白	+	++	+++
GP 105	+++	+	-
GP 95	+++	+	-
乳糖胺聚糖	+(i)*	+(ii)	+++
血红蛋白	-	++	+++

* 成年人细胞的成熟过程中乳糖胺聚糖的支链增加, 但胎儿红细胞样细胞成熟过程未观察到支链增加。出处同图 28。

K562 细胞是从慢性髓性白血病患者血中分离的细胞, 与前母红细胞近似, 基本不存在第 3 带和第 4, 5 带, 只有少数糖蛋白被半乳糖氧化酶/ NaB^3H 标记, 血型糖蛋白是次要



$$R_1 = \text{H or Fuc}, R_2 = R_1 \rightarrow 2 \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4(\text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4)_n \cdot \text{GlcNAc}$$

出处同表 10。

糖蛋白成分, 105K 和 95K 糖蛋白是主要糖蛋白, 有最少量的乳糖胺聚糖, 细胞表面乳糖胺聚糖的结构是不分支的链, 胎儿型 (i) 抗原。用胼解法研究 K562 细胞和成年人红细胞质膜释放的寡糖结构, 表明 K562 细胞的中性寡糖都是高甘露糖型, 而成人红细胞的中性寡糖则是大的复杂型结构 (表 51)。另一个有趣的发现是 K562 细胞的糖链不含平分型 N-乙酰葡萄糖胺, 而成人红细胞的极大多数酸性寡糖中存在平分型 N-乙酰葡萄糖胺。表明 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 GnT III 在 K562 细胞中不表现。

由于血细胞是从生血细胞的干细胞派生的, 并可得到各个成熟阶段的若干白血病细胞株, 它们的表面糖蛋白和糖链结构的比较研究是非常有趣的研究课题。

对粒性单核白细胞分化过程的研究, 亦得到相似的结果, 粒性白细胞成熟的早期和晚期, 细胞表面结构完全不同。在分化和成熟过程, 这些表达如何调节, 在良性或恶性的血液病中, 这些表达是否不正常, 这些都是颇有意义的问题。

第六章 蛋白聚糖

一、概 论

蛋白聚糖 (proteoglycan, 简称 PG) 是一类非常复杂的大分子, 具有形形色色的结构和各种各样的功能。现在给与它的定义是: 含有共价连接的一条或数条糖胺聚糖链的核心蛋白大分子。这一类化合物可以含有不同的核心蛋白, 不同种类、不同数目以及不同长短的糖胺聚糖链。各种组织中的蛋白聚糖都含有除透明质酸外的糖胺聚糖。糖胺聚糖的定义是: 由重复二糖单位组成的各种长短的多阴离子聚糖, 每一个二糖单位含有 1 个己糖胺分子, 和通常是带阴离子的己糖硫酸酯和(或)羧基。

虽然几乎所有的哺乳动物组织中都存在蛋白聚糖(如细胞间质、细胞质膜等), 但是, 在结缔组织中, 蛋白聚糖占特别重要的地位。在那里, 蛋白聚糖是构成细胞外基质的成分, 并且对它们的物理性质有重要影响。另外, 软管的正常发育和生长, 依赖它们基质中的聚糖。缺乏软骨-基质的小鼠的胚胎骨架。与同年龄正常小鼠胚胎相比, 明显不同(图 67), 四肢显著缩短和变形。缺乏软骨-基质的小鼠软骨中几乎没有蛋白聚糖, 细胞之间的细胞外基质体积也大大地减少。另一方面, 具有软骨细胞形态异常和基质中异常基因的软骨, 如软骨 II 形胶原的动物的软骨, 看来, 软管的发育却是正常的。这样, 很清楚, 软管的正常生长和发育, 关键在于它们的基质中蛋白聚糖的存在。

在许多方面, 蛋白聚糖和蛋白质结合的其它复合糖类相似。蛋白聚糖与某些类型的



图 67 新生正常小鼠(左)和新生的缺乏软骨基质的小鼠(右)。

(摘自 Hascall, V. C., *Proteoglycans: Structure and Function in Biology of Carbohydrates*, Vol. 1, 1981, Eds. Ginsburg, V. & Robbins, P., John Wiley, New York)

糖蛋白在多糖成分本身没有明显的区别。例如血型物质,含有由大量单糖组成的、糖含量相当高的寡糖。根据蛋白聚糖的某些专一的特性,它分属于另一类目。蛋白聚糖的特征可归纳为以下几方面:(1)每一聚糖(polysaccharide)由重复二糖组成,二糖中总有己糖胺(D-葡萄糖胺或D-半乳糖胺)存在;(2)除角质素外,所有结缔组织的聚糖都含有糖醛酸(D-葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸,或两者都有),(3)除透明质酸外,所有聚糖中都含有硫酸基团。另外,肝素和硫酸类肝素(或称硫酸乙酰肝素)中有N-硫酸基。最近确定,甲状腺球蛋白的组成成分中,有由硫酸化的葡萄糖醛酸-N-乙酰半乳糖胺二糖组成的糖单位。然而,由于二糖以单一单位存在,甲状腺球蛋白未考虑纳入蛋白聚糖。

蛋白聚糖中的糖胺聚糖与核心蛋白间的连接有三种类型:(1)D-木糖与丝氨酸羟基之间的O-糖苷键;(2)N-乙酰半乳糖胺与苏氨酸或丝氨酸之间的O-糖苷键;(3)N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺之间的N-糖苷键(图68)。木糖-丝氨酸键是结缔组织蛋白聚糖独有的,在任何其它哺乳动物的糖复合物中,除人甲状腺球蛋白外,尚未发现有这种结构。“键合片段(linkage fragment)”,O-β-D-木糖-L-丝氨酸最初从肝素中分离,以后也在4-和

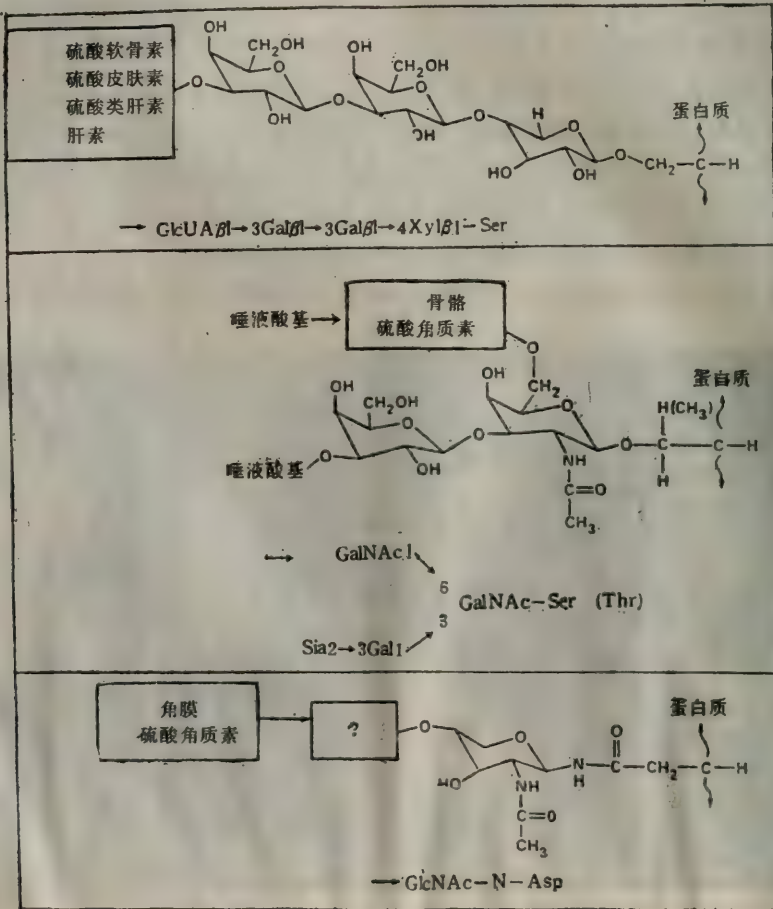


图68 蛋白聚糖的糖胺聚糖链与核心蛋白之间键合区的结构。
(出处同图67)

6-硫酸软骨素、硫酸皮肤素和硫酸类肝素中确定了这种结构。角膜中的硫酸角质素(硫酸角质素 I),通过 N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺之间的键合连接到蛋白质,这种键合在糖蛋白中是极为普遍的。惊奇的是硫酸角质素也可能通过 N-乙酰半乳糖胺与苏氨酸或丝氨酸的羟基,连接到蛋白质。第二种连接方式在骨骼硫酸角质素(硫酸角质素 II)中见到,骨骼硫酸角质素总是硫酸软骨素的一部分。

蛋白聚糖的生物合成与糖蛋白相似,第一步合成核心蛋白;随后,在核心蛋白上连接糖链。糖复合物的单糖成分来自相应的核苷酸糖。合成的一般模式,包括糖基转移到正在生长的分子中的适合的接受体。已知的一个例外是肝素、硫酸类肝素和硫酸皮肤素中的 L-艾杜糖醛酸,它是通过已参入在生长的聚糖中的 D-葡萄糖醛酸的表异构化作用形成的。

关于蛋白聚糖核心蛋白的形成,与糖基的添加之间的确切时间关系的细节不清楚。蛋白聚糖的聚糖链的起始,有两种不同的方式。木糖与丝氨酸之间的键(类型 1)连接的聚糖,其链的起始,由木糖从 UDP-木糖直接转移到核心蛋白的丝氨酸的羟基。同样地,假定第 2 类键基本上以同样的方式起始, N-乙酰半乳糖胺从 UDP-N-乙酰半乳糖胺转移到骨骼蛋白聚糖的核心蛋白的丝氨酸和苏氨酸基。这一过程的直接证据尚未获得,仅从具有同样糖-肽连接方式的糖蛋白的生物合成中取得参考的知识。

一旦聚糖链的形成起始,链的继续生长,是由专一的糖基转移酶,从相应的核苷酸糖,将单糖一个一个地转移到已起始的链进行的。顺序主要由糖基转移酶的底物专一性控制。简言之,即“一个酶一个键”的概念,意指特定的糖基转移酶,对供体(核苷酸糖)、接受体、异头构象和形成键的位置是专一的。具有重复二糖单位的聚糖生长终止的原因不很清楚。硫酸软骨素的 N-乙酰半乳糖胺 4 位引入硫酸基,可能是这种糖链终止的机理,因为在这以后,再加葡萄糖醛酸基就被阻止。然而,6 位的硫酸基没有这种效应,因此,观察到的现象,不能认为是硫酸化聚糖链终止的一般的确定机理。

糖蛋白中以第 2 类键连接的寡糖,其侧链的形成过程中,发生初始结构的相当的修饰。由各种糖苷酶导致的这种加工,只适用于硫酸角质素 I,然而,这种加工,如应用于硫酸角质素 I 的专一研究,尚未进行。另一方面,必须考虑结缔组织蛋白聚糖的一系列的专一修饰,如硫酸软骨素和硫酸皮肤素的 N-乙酰半乳糖胺的 4 或 6 位上,引入硫酸基团。特别有趣的是在肝素生物合成中观察到的 5 次修饰,其中 D-葡萄糖醛酸基到 L-艾杜糖醛酸基的表异构化作用,发生在起始的、生物合成的产物去乙酰化和 N-硫酸基化之后。

结缔组织蛋白聚糖的糖链的正常代谢,是与合成过程反向的一系列反应进行的。一组外切酶,从分子的非还原末端开始,以一步一步的方式移去糖基和取代的硫酸基。另外,不同专一性的内切糖苷酶亦包括在内,如透明质酸酶,分解透明质酸和硫酸软骨素分子内部的 N-乙酰己糖胺键。

二、糖胺聚糖

糖胺聚糖(glycosaminoglycan,简称 GAG)过去亦称粘多糖(mucopolysaccharide)。糖胺聚糖按其组成不同,通常大致分为 5 种,软骨素和硫酸软骨素(chondroitin sulfate,简称 CS)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate,简称 DS)、硫酸角质素(keratan sulfate,简

称 KS)、肝素 (heparin) 和硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, 简称 HS) 和透明质酸 (hyaluronic acid, 简称 HA)。它们包含的重复二糖结构和与蛋白质的连接区见表 52。

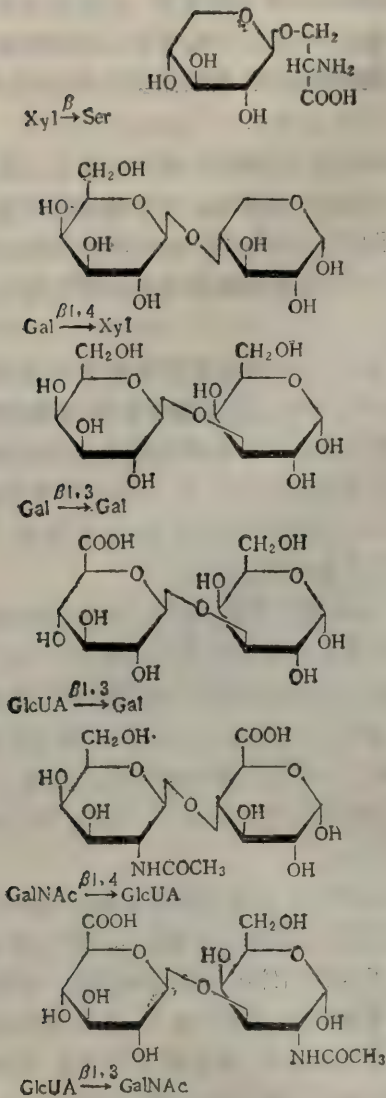


图 69 硫酸软骨素糖链主干的六种不同连接单位。

(一) 硫酸软骨素

硫酸软骨素广泛分布于动物软骨中,动脉壁、角膜、脐带和皮肤中亦有硫酸软骨素。

1. 结构

硫酸软骨素在组织中作为蛋白聚糖的组成成分存在。其糖的主干有 6 种不同的连接单位(图 69)。糖与蛋白质的连接方式为 1 型(木糖-丝氨酸),连接区含有典型的四糖, $\text{GlcUA } \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Xyl}$, 硫酸软骨素的重复二糖结构为 $\text{GlcUA } \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$ 和 $\text{GalNAc } \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcUA}$ 。N-乙酰半乳糖胺基的 4-或 6-位羟基被硫酸基取代,按硫酸基取代的位置,聚糖相应地称为软骨素 4-硫酸酯或软骨素 6-硫酸酯。作为规律,在同一聚糖分子(但在不同的氨基半乳糖基)中存在含有 4-和 6-硫酸基的杂交分子。仅少数聚糖分子中的氨基己糖基在同一部位硫酸化。硫酸软骨素经睾丸透明质酸酶消化,生成杂交四糖,是证明杂交结构存在的有力证据。另一个支持杂交结构的证据是:用不具有转糖基化作用的细菌软骨素酶,部分消化硫酸软骨素,从消化产物中分离到含有 1 个 4-硫酸化的、和 1 个 6-硫酸化的半乳糖胺基的四糖

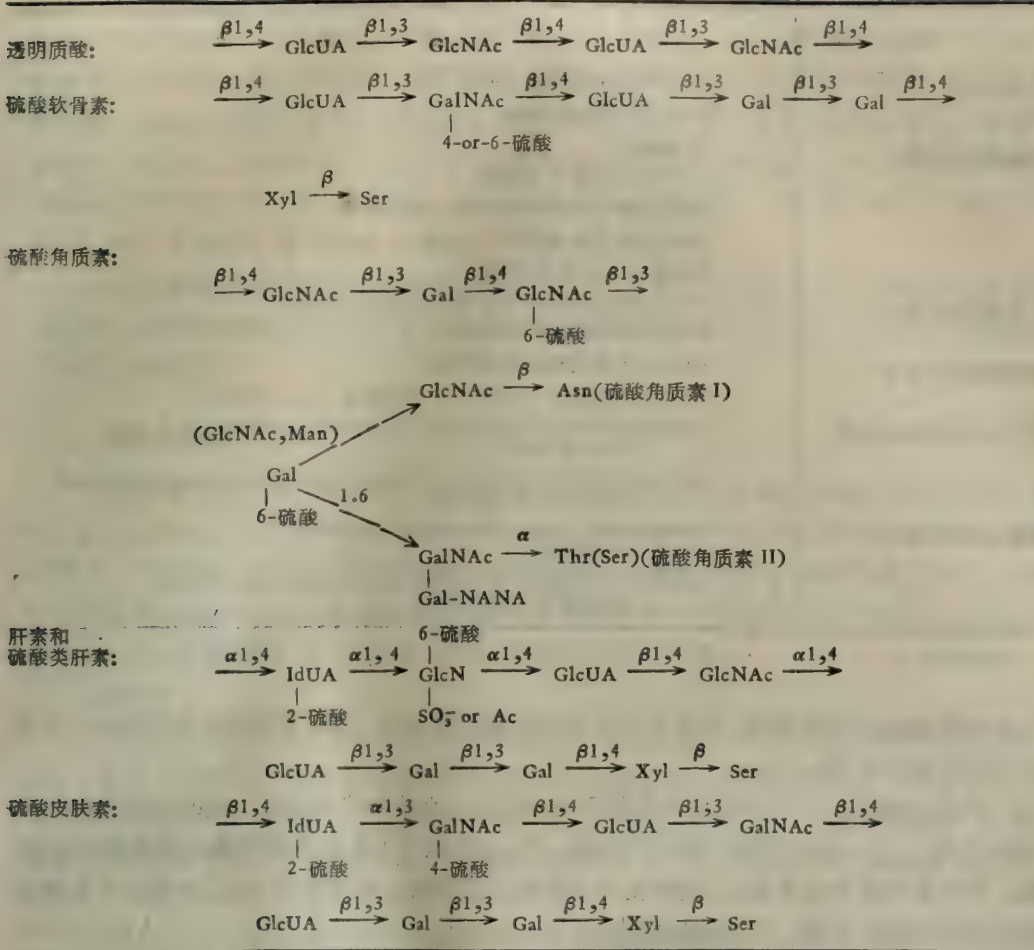
2. 生物合成

从硫酸软骨素的结构估计,聚糖链由六种不同的糖基转移酶装配。

若干结缔组织多糖合成的第一个糖基转移反应,是木糖从 UDP-木糖转移到核心蛋白的丝氨酸的羟基。这一反应首先在鸡输卵管中观察到,具有催化木糖转移的鸡输卵管的粗酶制剂中,存在它的内源接受体。同样类型的反应,继后,在小鼠肥大细胞瘤 (mastocytoma)、鸡胚软骨、脑和其它组织中发现。由于所有这些组织合成不止一种类型的聚糖,不可能确定,那一种细胞类型含有对某一聚糖专一的木糖转移酶。例如,软骨细胞虽以产生硫酸软骨素占优势,但也合成硫酸乙酰肝素。确实,很象就是一种相同的木糖转移酶,参与各种木糖连接的聚糖的形成。木糖转移酶已从鸡胚软骨和大鼠软骨肉瘤纯化到均一。

糖-蛋白质连接区的完成,由另外三种糖基转移酶,即二种半乳糖基转移酶和一种葡糖醛酸转移酶承担。第一个半乳糖基转移反应在鸡胚软骨中发现,鸡胚软骨酶制剂催化

表 52 糖胺聚糖的糖-蛋白键合区和重复二糖结构



摘自 Roden, L., Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans, 1980, Ed. Lennarz, W. J., Plenum Press, New York.

半乳糖基转移到内源接受体——木糖。产物是经碱性硼氢化钠处理后,分离到半乳糖基-木糖醇所确定。催化这一反应的酶称半乳糖基转移酶 I。若干化合物可作为由半乳糖基转移酶 I 催化的,从 UDP-Gal 转移的半乳糖的外源接受体(表 53)。包括木糖单体和它的 β -糖苷,如 β -木糖-丝氨酸、甲基木糖吡喃糖苷,和对硝基酚 β -木糖吡喃糖苷。

第二个半乳糖基的转移,由从鸡胚软骨酶制剂的部分酸水解物,分离到标记的 3-O- β -D-Gal-D-Gal 所证明。在连接区的形成中,催化第二个半乳糖基转移的半乳糖基转移酶 II,比半乳糖基转移酶 I 有较强的底物专一性,这个酶需要 4-O- β -D-半乳糖-D-木糖 (Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ Xyl) 二糖结构,作为接受体;半乳糖或其它含半乳糖的二糖,如 Gal $\beta 1 \rightarrow 3$ Gal, 不能作为这个酶的接受体底物。显然,酶不仅识别末端单糖,而且也识别倒数第二位糖。半乳糖基转移酶 II 的高度专一性,使这个酶不可能加一个以上半乳糖到半乳糖-木糖二糖,可能体现了限制加同一糖的共同机理。半乳糖基转移酶 II 已纯化大约 40 倍。

糖-蛋白质连接区形成的最终一步,由葡糖醛酸转移酶催化葡糖醛酸转移到第二个半乳糖基,形成 $\beta 1 \rightarrow 3$ 键。这个酶与形成重复二糖的葡糖醛酸转移酶不同。它的专一性

表 53 硫酸软骨素糖基转移酶和若干它们的外源底物

酶	外 源 受 体
木糖转移酶	Smith 降解的软骨蛋白聚糖
半乳糖基转移酶 I	L-丝氨酸甘氨酸甘氨酸 D-木糖 O-β-D-木糖基-L-丝氨酸 甲基、乙基、丁基和辛基 β-D-吡喃木糖苷 苄基 β-D-吡喃木糖苷 对硝基 β-D-吡喃木糖苷
半乳糖基转移酶 II	4-O-β-D-半乳糖基-O-β-D-木糖基-L-丝氨酸 4-O-β-D-半乳糖基-D-木糖
葡糖醛酸基转移酶 I	3-O-β-D-半乳糖基-D-半乳糖 O-β-D-半乳糖基 1→3O-β-D-半乳糖基 1→4D-木糖
N-乙酰半乳糖基转移酶	GlcUA→GalNAc→GlcUA→GalNAc→GlcUA→GulNAc (软骨素六糖) GlcUA→(GalNAc-4S)→GlcUA→(GalNAc-4s)→GlcUA→(GalNAc-4s) (软骨素4-硫酸酯六糖)
葡糖醛酸转移酶 II	GalNAc→GlcUA→GalNAc→GlcUA→GalNAc (软骨素五糖) (GalNAc-6s)→GlcUA→(GalNAc-6s)→GlcUA→(GalNAc-6s) (软骨素 6-硫酸酯五糖)

出处同表 52。

不如半乳糖基转移酶 II 强,若干具有非还原末端半乳糖的二糖,可作为接受体底物,但各种二糖的效率不同。

重复二糖,由 N-乙酰氨基半乳糖和葡糖醛酸,交替转移到正在生长的糖链的非还原末端形成。这一进程需要二种不同的酶, N-乙酰氨基半乳糖基转移酶和葡糖醛酸转移酶。具有葡糖醛酸为末端的、硫酸化和未硫酸化的寡糖,都可作为 N-乙酰氨基半乳糖基转移酶的接受体底物。用透明质酸己糖, $GlcUA \beta 1 \rightarrow 3GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcUA \beta 1 \rightarrow 3GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcUA \beta 1 \rightarrow 3GlcNAc$ 作为接受体底物,发现转移酶显示简单的底物专一性。只需要正确的末端单糖,对倒数第二位糖基没有绝对的要求。葡糖醛酸转移酶 II 催化转移葡糖醛酸,到软骨素和 6-硫酸软骨素的寡糖的、非还原末端的、N-乙酰氨基半乳糖基。然而,4-硫酸化的五糖不能作为接受体底物,表明体内硫酸化作用必须发生在加上葡糖醛酸基之后。由于使链延伸的葡糖醛酸转移酶 II 的这种专一性,提示非还原末端 N-乙酰半乳糖胺 4-位的硫酸化,可作为链终止的机理。

已经发现专一的硫酸基转移酶,催化硫酸基从 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(简称 PAPS)到硫酸软骨素的 N-乙酰氨基半乳糖基的 4-和 6-位的转移。小的寡糖(特别是具有非还原末端的 N-乙酰半乳糖胺的化合物)和集聚的软骨素,可作为接受体底物。

3. 降解代谢

可能有两种类型的酶作用于硫酸软骨素:(1)透明质酸酶,可能分解链内的键,因为硫酸软骨素含氨基己糖苷键,对透明质酸酶的作用敏感;(2)外切酶(糖苷酶或硫酸酯酶)从非还原末端,一步一步地降解硫酸软骨素分子。目前已有的证据表明两种类型的酶在体内作用。各种组织或细胞的硫酸软骨素的酶解模式不同,虽然,在人软骨中未能检测到透明质酸酶的活力,但在鸡软骨细胞中,发现作用于硫酸软骨素寡糖的、类似透明质酸酶

的内切聚糖酶和硫酸酯酶。培养的鸡胚软骨细胞中存在降解硫酸软骨素的完整的酶系,包括外切酶,它们的作用是释放分子的重复二糖和硫酸基团。当 β -葡糖醛酸酶和 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的相应抑制剂,葡糖-1,4-二酸单内酯和2-乙酰氨基-2-脱氧-D-半乳糖酸内酯,加到培养液中,多聚的硫酸软骨素降解为有10—15个单糖的寡糖,这些结果表明硫酸软骨素的正常降解代谢,是由透明质酸酶和从非还原末端起始作用的一组适当的外切酶联合作用进行的。在全过程中,除去4-硫酸基是限速的一步,因为经过一定时间消化后,绝大多数非还原末端是4-硫酸N-乙酰半乳糖胺。

决定降解模式的重要因素是细胞对底物的识别和吸收。各种细胞类型显示它特有的选择性,如透明质酸被培养的大鼠肝细胞和人滑膜细胞吸收,但不被人皮肤或纤维细胞和平滑肌细胞吸收。

(二) 硫酸皮肤素

硫酸皮肤素最初从猪皮分离,虽然皮肤素多糖的组成与软骨的硫酸软骨素相似。然而,某些性质如高比旋(specific rotation),使它成为与软骨素不同的物质,不归属于硫酸软骨素。硫酸皮肤素被认为与硫酸软骨素密切相关,最初命名为“硫酸软骨素B”。还由于从牛肺肝素副产品中分离到硫酸皮肤素,曾被命名为“ β -肝素(β -heparin)”。以后从其它组织,包括猪胃粘膜、腱、心瓣膜、脐带,分离到硫酸皮肤素。

1. 结构

己糖胺和糖醛酸是硫酸皮肤素的组成成分。硫酸皮肤素所含的糖醛酸与葡糖醛酸不同。后由Hoffman等确定硫酸皮肤素的主要糖醛酸是L-艾杜糖醛酸。详细结构分析表明糖苷键的位置与硫酸软骨素的相似(图70),(必须注意,L-艾杜糖醛酸的 α -键与硫酸软骨素中葡糖醛酸的 β -键相似)。硫酸皮肤素中L-艾杜糖醛酸与己糖胺之间的键为 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 。硫酸基团位于半乳糖胺基的C-4位。

早年,Meyer及其同工作者的研究指出,甚至经过彻底的分离后,硫酸皮肤素中仍存在少量的葡糖醛酸,提示这部分葡糖醛酸可能也是硫酸皮肤素完整分子的组成部分。这一推想由下列研究结果证实。硫酸皮肤素经睾丸透明质酸酶分解,并从酶消化产物分离到含有艾杜糖醛酸和葡糖醛酸的杂交四糖。正如从已知的透明质酸酶的底物专一性所料想的,这一四糖中,葡糖醛酸位于非还原末端,艾杜糖醛酸则在链内。因此,硫酸皮肤素可视为含有艾杜糖醛酸和葡糖醛酸二糖的共聚体。这些结果可引伸到猪皮以外的其它来源的硫酸皮肤素,即脐带、小肠粘膜、主动脉、巩膜、关节囊、纤维软骨。在所有的例子中,葡糖醛酸都以多糖分子的组成部分存在,它们可以是不同的比例,从一条糖链中含几个葡糖醛酸基到占总糖醛酸的半数以上。

与硫酸软骨素相似,硫酸皮肤素以含木糖-丝氨酸键的蛋白聚糖存在于组织中。

2. 生物合成

硫酸皮肤素的生物合成遵循硫酸软骨素的相同模式。再则,艾杜糖醛酸基的形成,是由已参入在生长的聚糖中的葡糖醛酸转化而成。5-表异构化紧密地偶联于硫酸化过程,如在成纤维细胞的无细胞系统中所表明的,假如让硫酸化同时进行,发生明显地增多的葡糖醛酸转化。

催化形成重复二糖的酶,尚未有任何详细的研究。可以设想,存在二种糖基转移酶,葡

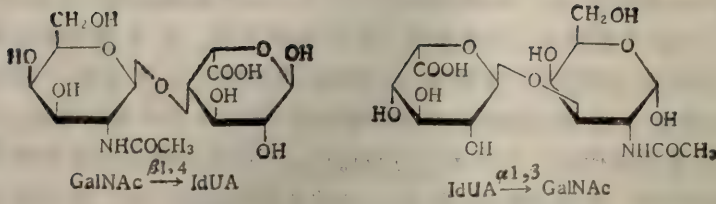


图 70 硫酸皮肤素重复二糖单位。

糖醛酸基转移酶和 N-乙酰氨基半乳糖基转移酶。Malmström 和 Fransson 证明,从 UDP-N-乙酰半乳糖胺转移 N-乙酰半乳糖胺,发生在具有艾杜糖醛酸为非还原末端的硫酸皮肤素多糖。Malmström 的发现与 Halting 和 Lindahl 的结果相反, Halting 等观察到在肝素生物合成过程中, N-乙酰葡萄糖胺基的类似转移,只发生在葡糖醛酸而不发生在艾杜糖醛酸。

3. 降解代谢

在硫酸皮肤素中,有限数的葡糖醛酸基的存在,使硫酸皮肤素分子具有一定的对透明质酸酶敏感的己糖胺键。因此,硫酸皮肤素可在体内或体外,降解到与分子中葡糖醛酸基相称的程度。从非还原末端继续一步一步降解,需要 β -葡糖醛酸酶、N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶、 β -N-乙酰氨基己糖苷酶、艾杜糖醛酸硫酸酯酶和 α -L-艾杜糖醛酸酶。另外,为完成糖-蛋白质连接区降解到木糖基丝氨酸,需要 β -半乳糖苷酶的作用。

(三) 硫酸角质素

硫酸角质素有二种不同的类型,来自不同的组织。一种广泛存在于角膜的称硫酸角质素 I,是角膜蛋白聚糖唯一的的多糖成分。另一种,存在于若干骨架组织[髓核 (nucleus pulposus), 软骨, 骨], 称硫酸角质素 II,总是与硫酸软骨素一起存在于骨骼蛋白聚糖中。

1. 结构

糖蛋白中通常存在的二糖成分, N-乙酰乳糖胺是硫酸角质素的重复二糖单位。硫酸基团位于葡萄糖胺的 C-6 位,在某些半乳糖基上亦含有硫酸基团(图 71)。硫酸角质素 I 和 II 之间的主要差异,在于它们与蛋白质的连接。硫酸角质素 I 与蛋白质的结合,通过 N-乙酰葡萄糖胺与天冬酰胺的酰胺基之间的 N-糖胺键;硫酸角质素 II 含有 N-乙酰半乳糖胺与苏氨酸或丝氨酸之间的 O-糖苷键。由于它们由许多重复二糖单位组成,并含有硫酸酯,因此,硫酸角质素的某些性质与其它结缔组织多糖相似。在另一方面,硫酸角质素在许多方面更类似糖蛋白,例如不存在糖醛酸,以及重复二糖与在许多糖蛋白中存在的相似;另外,二种类型的硫酸角质素都含有唾液酸、岩藻糖和甘露糖。硫酸角质素 I 含有甘露糖是在意料中的,因为这一聚糖与蛋白质的连接方式——N-糖胺键,是含有甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺为核心的糖蛋白所具有的特征性结构。Hopwood 和 Robinson 的研究表明唾液酸在糖链中的位置, N-乙酰神经氨酸基半乳糖二糖连接于与蛋白质连接的 N-乙酰半乳糖胺基的 C-3 位上。硫酸角质素的主体与同一残基的 C-6 位连接。再有,必须注意到硫酸角质素半乳糖成分常常超过重复二糖单位所需的。估计超量的半

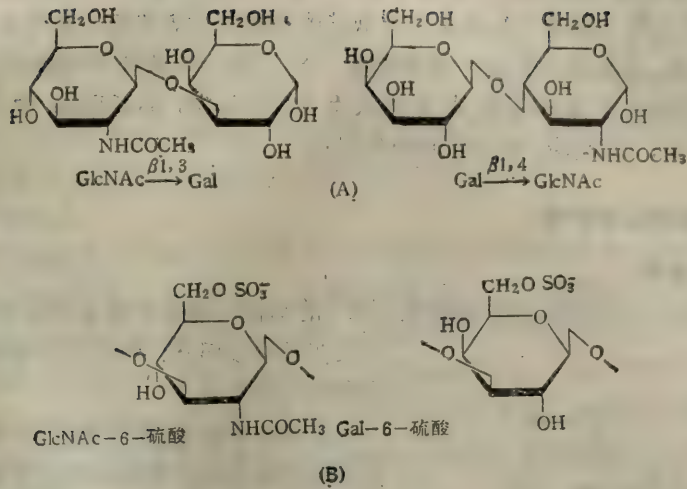


图 71 (A) 硫酸角质素的重复二糖单位；
(B) 糖基上连接硫酸基团的位置。

乳糖基的若干连接,存在于支链,甲基化测定表明多数非还原末端是半乳糖。然而,这些半乳糖基的确切位置尚不了解。

虽然报道的各种硫酸角质素制剂的分子量在 10000—15000,但也常遇到仅有几个重复二糖单位的较短的链。

2. 生物合成

硫酸角质素 I 多糖的生物合成与 N-糖苷连接的糖蛋白的合成相似。衣霉素为催化 N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸转移到多萜醇磷酸酯的酶的抑制剂,当离体与角膜一起温育时,硫酸角质素合成的速度会急剧地下降。

硫酸角质素-蛋白质连接区形成的其它方面,如甘露糖基转移反应,和连接区中更多的 N-乙酰葡萄糖胺的引入,尚未见确切的报道。硫酸角质素 II 糖链合成的起始过程,设想是 N-乙酰半乳糖胺基转移到苏氨酸和丝氨酸,亦未获得任何确证的资料。

设想硫酸角质素生物合成中,半乳糖基转移反应由乳糖合成酶催化,这一酶涉及许多糖蛋白的 N-乙酰乳糖胺单位的合成。然而,至今在硫酸角质素生物合成中,有关这一反应的直接数据,尚未有报道。

3. 降解代谢

硫酸角质素多糖完全降解到它的单糖组分,需要许多糖苷酶。另外,移去半乳糖和 N-乙酰葡萄糖胺基上的硫酸基团,需要二种硫酸酯酶。降解分子中重复二糖单位的酶包含: β -D-N-乙酰氨基己糖苷酶和 β -半乳糖苷酶。移去硫酸基的酶有 N-乙酰葡萄糖胺 6-硫酸酯酶和半乳糖 6-硫酸酯酶 (N-乙酰半乳糖胺 6-硫酸酯酶)。

可以设想,硫酸角质素中 β -D-N-乙酰葡萄糖胺基由 β -D-N-乙酰氨基己糖苷酶 A 除去。已知这一酶分解以 β 1,3 连接到半乳糖的 β -D-N-乙酰葡萄糖胺。然而,关于硫酸角质素降解的确切资料尚未获得。不难想像,若 β -N-乙酰氨基己糖苷酶 A 或 A 和 B 缺失硫酸角质素如同糖蛋白片段那样,将在 Tay-Sachs 和 Sandhoff 综合征患者体内积贮。

关于硫酸角质素代谢的知识多数来自对聚糖和蛋白聚糖降解有遗传缺陷的患者的研究。目前,已知有三种遗传缺陷是由有缺陷的硫酸角质素降解代谢导致的:(1)典型的 Morquio 综合征,由缺乏半乳糖 6-硫酸酯酶(N-乙酰半乳糖胺 6-硫酸酯酶)导致,(2)缺乏 N-乙酰葡萄糖胺 6-硫酸酯酶,临床症状为 Morquio 和 Sanfilippo 综合征的特性,(3)缺乏半乳糖苷酶, Morquio 综合征的轻微型。

(四) 肝素和硫酸乙酰肝素

1. 肝素的结构

肝素和硫酸乙酰肝素(亦称硫酸类肝素)的结构与硫酸软骨素和硫酸皮肤素的差异,不仅在己糖胺部分,而且也在重复二糖单位的连接键的性质方面。

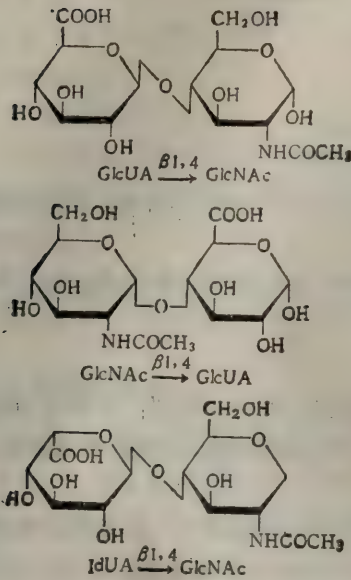


图 72 肝素和硫酸类肝素的重复二糖单位。

肝素的聚糖链,由交替的 1—4 连接的葡萄糖胺和糖醛酸组成,糖醛酸或为艾杜糖醛酸或为葡糖醛酸。艾杜糖醛酸是主要的糖醛酸成分,占总糖醛酸的 70—90%,其余的为葡糖醛酸。大多数葡萄糖胺(基)的氨基是硫酸化的。这是肝素和硫酸乙酰肝素独有的结构。少数葡萄糖胺的氨基乙酰化,还有少数未被取代。绝大多数,可能全部葡糖醛酸基为 $\beta 1 \rightarrow 4$ 连接,葡萄糖胺和艾杜糖醛酸为 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 连接(图 72)。在葡萄糖胺的 C-6 位,或许有的在 C-3 位(罕见),硫酸化。在艾杜糖醛酸上多数但不是全部 C-2 位硫酸化。从肝素的七糖片段(图 73)可说明肝素糖链的特征结构。L-艾杜糖醛酸与葡糖醛酸之比,通常随硫酸基含量的增加而增加。含低硫酸基、多葡糖醛酸的聚糖可归到硫酸乙酰肝素;多硫酸基、多艾杜糖醛酸的一类称为肝素。然而,有些具有居中性质。因此,把两类多聚体都视为似肝素聚糖的同一族成员较为恰当。

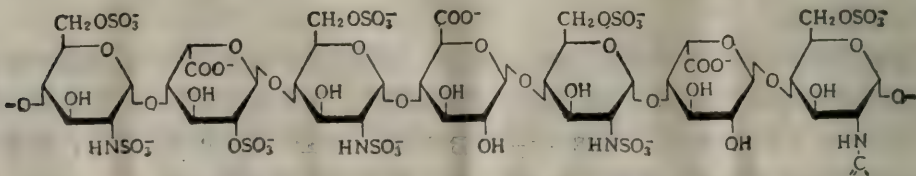


图 73 肝素的七糖片段。说明某些特有的结构特征。(出处同表 52)

肝素链的不同片段连接于丝氨酸或小肽,并含有专一的糖-蛋白质连接区($\rightarrow \text{GlcUA} \beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{Xyl} \beta \text{-Ser}$),与若干结缔组织聚糖相同。这种连接区的存在,提示在体内肝素合成如同蛋白聚糖一样。在研究的多数组织中,肝素主要以具有分子量 5 000 到 15 000 的单聚糖链存在。在某些链中有整套的糖-蛋白质连接区(丝氨酸

或含丝氨酸的肽，木糖和半乳糖)，另一些链则缺少这种组成，并在还原末端含葡萄糖醛基。除单链型外，从蛋白水解后的大鼠皮分离到分子量大约为 1×10^6 的肝素的大分子形式，并在小鼠肥大细胞瘤中发现一组相似的但较小的化合物。现在证明大分子肝素是大肝素链(分子量 60 000—100 000) 连接于由等分子的丝氨酸和甘氨酸组成的核心蛋白形成的蛋白聚糖。正常大鼠和小鼠的小肠，人脾脏，小鼠肥大细胞瘤等组织中存在的内切葡萄糖醛酶，可分解大分子肝素，生成的产物分子量大约为 14.500。

2. 肝素的生物合成

目前对肝素生物合成的兴趣，主要集中在形成聚糖链的酶和多聚体形成后发生的修饰。肥大细胞瘤的微粒体与 UDP-N-乙酰葡萄糖胺和 UDP-葡萄糖醛一起温育，形成聚糖链的事实，给生物合成提供了基本数据。形成的聚糖具有与透明质酸相同的电荷密度，但与透明质酸明显地不同，它不被睾丸透明质酸酶降解。它被产黄素菌属的肝素黄杆菌 (*Flavobacterium heparinum*) 的肝素酶分解为小分子寡糖，说明这种聚糖与肝素关联。有 PAPS 存在时，形成具有肝素质质的硫酸化多聚体，多聚体中大约半数硫酸基是 N-硫酸。在 N-硫酸化过程中，N-乙酰基相应地失去。当聚合过程中存在 PAPS 和在聚合作用之后加入 PAPS，均发生这种 N-去乙酰化。

从已获得的关于生物合成和结构的资料，肝素合成的主要步骤是：(1)核心蛋白的形成。(2)聚糖链的合成，包含下列过程：(a)木糖基转移酶起始链，(b)由另外三种糖基转移酶(二种半乳糖基转移酶和一种葡萄糖醛基转移酶)完成糖-蛋白质连接区，(c)由一种 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶和一种葡萄糖醛基转移酶(与完成连接区的葡萄糖醛基转移酶不同)的交替作用，形成重复二糖单位。(3)多聚体的修饰，包括 N-去乙酰化作用，葡萄糖胺的 N-硫酸化，D-葡萄糖醛基转为 L-艾杜糖醛酸的表异构化，以及 L-艾杜糖醛酸的 C-2 位和葡萄糖胺的 C-6 位，分别 O-硫酸化。(4)核心蛋白的降解修饰。(5)专一的内切葡萄糖醛酶对大分子产物的修饰。

目前尚未获得关于肝素蛋白聚糖的核心蛋白生物合成的资料。设想催化硫酸软骨素合成的酶，亦与肝素的糖-蛋白质连接区的形成有关。

根据“一个酶一个键”的概念，可推想存在两种不同的糖基转移酶催化的反应：(1)N-乙酰葡萄糖胺转移到非还原末端的葡萄糖醛基，和(2)葡萄糖醛到末端 N-乙酰葡萄糖胺基的转移。

聚糖主链合成以后，完成具有完整的肝素分子的典型结构，需要某些修饰，包括去乙酰化，N-硫酸化，葡萄糖醛基到艾杜糖醛酸的表异构化，艾杜糖醛基 C-2 位和葡萄糖胺 C-6 位的 O-硫酸化。修饰反应不是任意的，而是按严格有序的方式进行的。

3. 硫酸乙酰肝素

从结构的观点，硫酸乙酰肝素与肝素密切相关。硫酸乙酰肝素是一族去乙酰化的程度比典型的肝素低得多的分子，因此，硫酸乙酰肝素的特点，在于 N-乙酰基的含量比肝素高，而且 N-硫酸基相应地比较低。在糖醛酸中，葡萄糖醛酸比艾杜糖醛酸占优势。艾杜糖醛酸含量与 N-硫酸基含量近乎相等。O-硫酸化的程度比较低，大致相当于艾杜糖醛酸或 N-硫酸基的量。

从生物学的观点，肝素与硫酸乙酰肝素应视为不同的物质。肝素以储存在肥大细胞的颗粒中为特征，为响应某些刺激，肝素从颗粒释放，事实上它可能在那里执行重要的细

胞内作用。硫酸乙酰肝素是许多或所有类型的细胞表面普遍存在的成分,并以蛋白聚糖形式存在。

由于肝素保存在细胞内,而硫酸乙酰肝素运送到细胞表面,可以设想,它们由多酶系统在细胞内不同的部位合成。

4. 肝素与硫酸乙酰肝素的降解代谢

对结缔组织降解方式的概念主要根据是定性的。若干聚糖的降解是内切糖苷酶(透

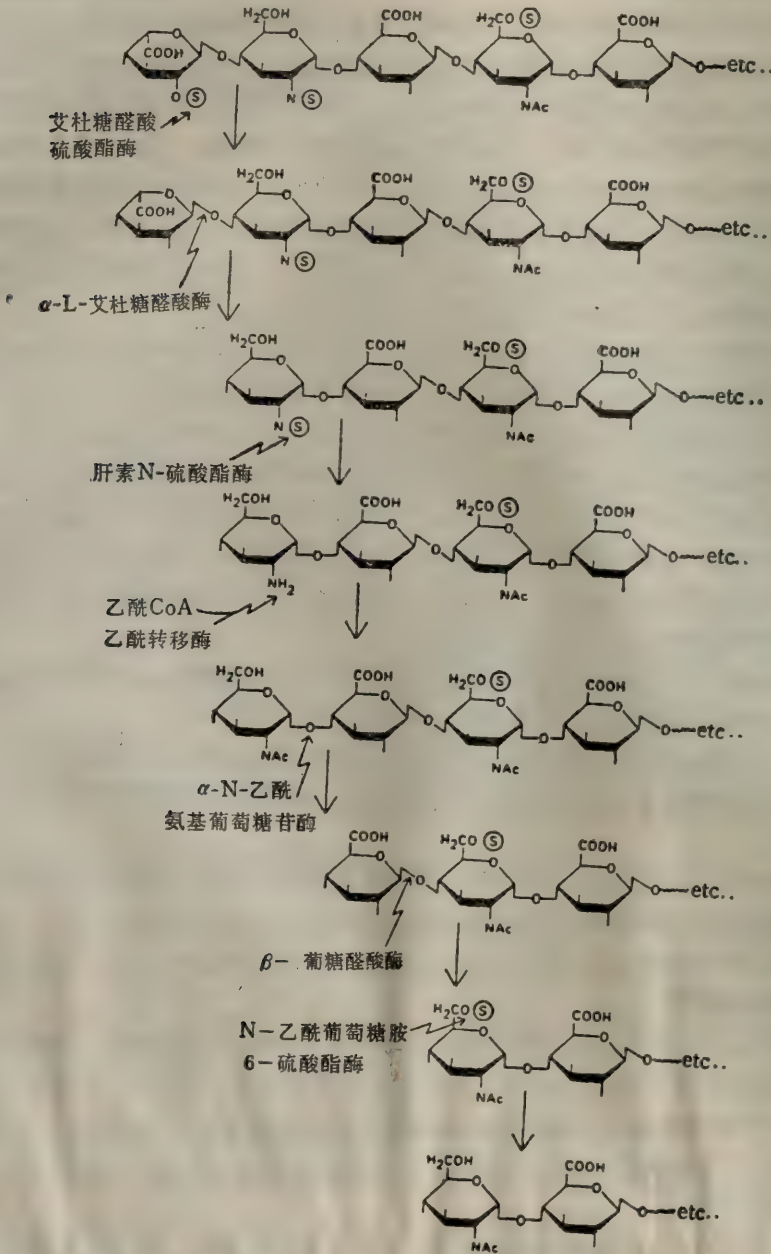


图74 肝素和硫酸乙酰肝素的降解图解。(出处同表52)

明质酸酶),和从非还原末端分解底物的外切酶协同作用的结果。肝素和硫酸乙酰肝素聚糖的降解,也是由天然存在的内切和外切糖苷酶的作用所完成的。

许多年前已知肝脏中存在肝素酶。对从 Hurler 综合征患者肝脏分离的硫酸乙酰肝素结构的研究,也证明存在能在体内部分降解肝素一类聚糖的内切糖苷酶活力。以后,Horner 报道小肠粘膜存在降解大分子肝素的酶。从小鼠肥大细胞瘤分离到性质与小肠粘膜的酶相似的酶,并已鉴定,是内切葡糖醛酸酶。血小板中存在以裂解内部键降解硫酸乙酰肝素的酶,最小的产物,大致与硫酸软骨素六糖的大小相似。当这种酶用于消化内皮细胞和神经胶质细胞表面的聚糖,细胞表面存在的硫酸乙酰肝素几乎全部被除去。然而,这种酶不作用于硫酸软骨素和硫酸皮肤素。事实上,这一酶亦降解肝素。

一系列的酶,从硫酸乙酰肝素分子的非还原末端作用,能将聚糖降解为它的单糖组分。一步一步的降解,需要下列酶的作用:艾杜糖醛酸硫酸酯酶, α -L-艾杜糖醛酸酶,肝素 N-硫酸酶,乙酰转移酶(催化乙酰基转移到游离氨基), α -D-N-氨基葡萄糖苷酶, β -葡糖醛酸酶,N-乙酰葡萄糖胺 6-硫酸酶(图 74)。必须指出,为了便于说明,图中结构和降解顺序多少有点人为的选择。还必须指出,图中未显示硫酸乙酰肝素的糖-蛋白质连接区,但可以设想,包含在降解硫酸乙酰肝素分子的这一区域的整组酶,可能与硫酸软骨素的降解酶相似。

(五) 透明质酸

透明质酸广泛分布于哺乳动物的器官和组织中,作为滑液分布在各个部位,眼睛玻璃体、关节液、脐带、皮肤、软骨以及鸡冠等。即使只有低浓度的透明质酸,亦能发挥极大的生理效应。在软骨中,透明质酸的浓度不超过硫酸软骨素的 0.5%,但在形成蛋白聚糖集集体中起主要作用。透明质酸不仅限于动物组织,A 型链球菌和其它细菌亦产生透明质酸。

1. 结构

透明质酸的分子结构,经化学分析和电子显微镜观察,均表明没有支链,是由重复二糖单位(图 75)组成的直链分子,不含硫酸基。对部分酸水解和酶消化生成的降解产物的研究,确立了透明质酸的结构。酸水解使 N-乙酰氨基葡萄糖苷键优先裂解;因此,主要产物是 N-乙酰葡萄糖胺为还原末端,以 $\beta 1 \rightarrow 3$ 键连接的葡糖醛酸为非还原末端的二糖单位(GlcUA $\beta 1 \rightarrow 3$ GlcNAc)。睾丸的透明质酸酶专一地分解 N-乙酰氨基己糖苷键,产物包含一系列具有 N-乙酰葡萄糖胺为还原末端的寡糖;经这一酶充分消化后的产物主要是四糖,六糖次之,二糖仅占很小的比例。用水蛭透明质酸酶处理透明质酸,则专一地作用于透明质酸的葡糖醛酸键,不分解任何其它聚糖。

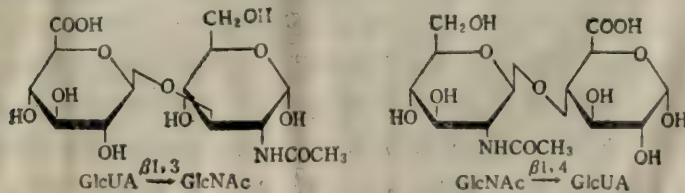


图 75 透明质酸重复二糖单位。

2 生物合成

关于透明质酸的生物合成,至今仍不很了解。30年前, Glasser 和 Brown 首先用酶合成透明质酸获得成功,在 Rous 肉瘤无细胞制剂中,从 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc 形成透明质酸的寡糖。继后 Markovitz 等用 A 型链球菌的颗粒酶制剂,获得了大分子透明质酸。此后,观察到若干种哺乳动物组织的制剂,催化从 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc 两种核苷酸糖,合成大分子量的透明质酸。然而,透明质酸链装配的详细机理,仍了解得很少。

存在 UDP-GlcUA 和 UDP-GlcNAc 两种核苷酸糖时,链霉菌系统合成大分子透明质酸(分子量为 24 000)。当这种酶制剂只与 UDP-GlcUA 温育,能在糖链上加上单个葡糖醛酸基。用 β -葡糖醛酸酶处理透明质酸,释放的标记物中大约有 40% 是游离的葡糖醛酸,证明了上述反应。而用链霉菌透明质酸酶处理后有 25% 结合的放射性,以 N-乙酰透明质二醛酸(N-acetylhyalobiuronic acid)存在,提示某些链的延伸以加上单个葡糖醛酸基的方式进行。

假如说关于透明质酸的葡糖醛酸基的信息甚为缺乏,那末,关于 N-乙酰葡糖胺基的合成的确实证据则更少。由于用小寡糖作为引物合成透明质酸的失败,使人们想到,这一聚糖的合成可能像细菌肽聚糖、沙门氏菌的 O-抗原和其它细菌聚糖合成的方式,要通过脂质作为中间体。另一个可能性是透明质酸重复二糖的形式,通过焦磷酸多萜醇中间体。从 SV-40 变异的人肺成纤维细胞分离得一种二糖-脂质,葡糖醛酸基 N-乙酰葡糖胺(基)焦磷酸多萜醇。然而,从实验表明这种二糖由 1 \rightarrow 4 糖苷键连接,这样的结构很明显,不能参与透明质酸的 1 \rightarrow 3 连接单位的形成。

概括而言,从细菌和动物细胞生物合成透明质酸,需要核苷酸糖的参与,但是链起始和链延长的机理尚不了解。在透明质酸合成系统中,未曾测得天然的内源接受体,看来接受体可能是与蛋白质结合的寡糖,寡糖链可能在核心蛋白上生长。然而,抑制蛋白质合成的嘌呤霉素和氯霉素,几乎完全不影响透明质酸的形成。

3. 降解代谢

从理论上, β -葡糖醛酸酶和 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶同时作用,能将透明质酸降解为组成它们的单糖。但在结构上,并非如此,由于 N-乙酰透明质二糖醛酸(GlcUA β 1 \rightarrow 3GlcNAc)抵抗 β -葡糖醛酸酶的消化,若聚糖的还原末端是 N-乙酰葡萄糖胺,两种糖苷酶一起与透明质酸温育,不能将它分解为单糖。反之,“逆向(reverse)”二糖,GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcUA,很快被 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶分解。

另一种降解方式,或更确切地说,一种补充的降解方式,依赖于存在于许多组织中的内源 β -N-乙酰氨基己糖苷酶,“睾丸”透明质酸酶的作用。注意,这种酶在主要产生透明质酸的培养的人皮肤成纤维细胞中不存在,但存在于鸡胚皮肤成纤维细胞中。经睾丸透明质酸酶充分消化,所得主要产物为下列四糖:GlcUA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcUA β 1 \rightarrow 3GlcNAc,并有少量的己糖,以及较大的寡糖和 N-乙酰透明质二糖醛酸。由于尿中正常地含有不同大小的寡糖和聚糖,这样,聚糖完全降解为单糖从机体排出;显然不是先决条件。然而,尿中存在的结合的糖醛酸的量,不足以说明人体糖醛酸正常代谢的变化。因此,必须假定由透明质酸酶产生的寡糖,经两种外切酶, β -葡糖醛酸酶和 β -N-乙酰氨基己糖苷酶的作用,进一步降解为单糖。用芳香基糖苷为底物,测得皮肤和某些其它组织中

两种酶的水平大致相等。然而，用片段透明质酸为底物，限速的一步是 N-乙酰葡萄糖胺基的分解，只有当葡糖醛酸酶与 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶之比真正降低，协同降解为单糖的速度方才显著减慢。

三、蛋白聚糖

至今研究得较为详尽的是从软骨分离的蛋白聚糖。

(一) 软骨蛋白聚糖的结构

软骨蛋白聚糖由许多糖胺聚糖链连接到核心蛋白形成。软骨蛋白聚糖中所含糖胺聚糖为硫酸软骨素、硫酸角质素和透明质酸。蛋白聚糖分子是多分散的 (polydisperse)，分子量从数十万到大于 400 万，平均为 $2-2.5 \times 10^6$ 。在某些情况，看来分子量的多分散度，与每一个核心蛋白连接的硫酸软骨素链数目的变化相关，必然也与核心蛋白的硫酸软骨素连接区的长度，以及蛋白聚糖单体的长度相关。然而，在另一些情况，蛋白聚糖分子上硫酸软骨素链的平均分子量的变化，直接影响多分散度的程度。

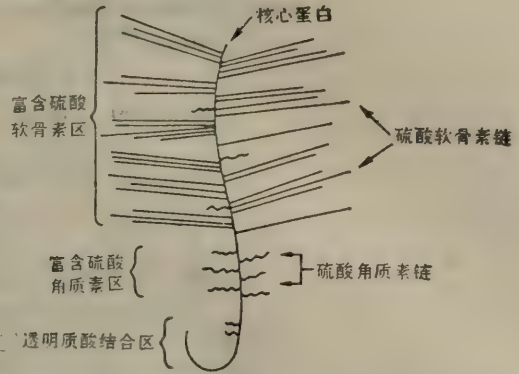


图 76 蛋白聚糖单体结构的图解模型。(出处同表 1)

经过许多工作者 30 年的研究，得出的透明软骨 (hyaline cartilages) 中主要蛋白聚糖的结构模型 (图 76)，展示了蛋白聚糖单体的结构。单体含有一个平均分子量超过 200000 的核心蛋白，许多硫酸软骨素链 (通常有 80—100 条链，每条链的分子量大约是 20000)，沿核心蛋白的硫酸软骨素连接区，通过糖苷键共价连接到丝氨酸基。硫酸角质素链主要位于核心蛋白的另一部位，硫酸角质素连接区，紧邻透明质酸结合区。绝大多数蛋白聚糖分子通常有 75—90% 能通过高度专一的结合部位，与透明质酸相互作用。这一部位位于核心蛋白中近多肽链的末端，称为透明质酸结合区。蛋白聚糖与透明质酸的相互作用，以及那些连接蛋白，对存在于细胞外基质的蛋白聚糖聚合体的形成和稳定是重要的。

虽然，某些蛋白聚糖显然以单分子形式存在于软骨的细胞外间质，但是大多数 (60—85%) 以很大的集聚体存在于绝大多数软骨组织 (图 77)。每一集聚体的中心丝由各种长度 (400—4000 Å) 的透明质酸“线”构成。借核心蛋白的透明质酸结合区介导的、高度专一的相互作用，在相距至少 80—120 单糖的部位，蛋白聚糖单体结合于透明质酸，结合部位与透明质酸的十糖片段互补。结构中的两个小的糖蛋白 (分子量为 40500 和 46000)，分别称为连接蛋白 (link protein) a 和 b。不存在蛋白聚糖时，它们能与透明质酸相互作用，并且它们可能以某种方式与核心蛋白的透明质酸结合区直接作用。集聚体的大小，看来依赖于透明质酸“线”的长度，随不同的软骨而变化。在电镜下观察到超过 100 个单体的集聚体。

牛鼻软骨是一种透明软骨，具有透明软骨的结构特征。核心蛋白 (分子量 200000) 带有平均分子量为 20000 的大约 100 条硫酸软骨素链，和分子量为 4000—8000 的 30—60 条

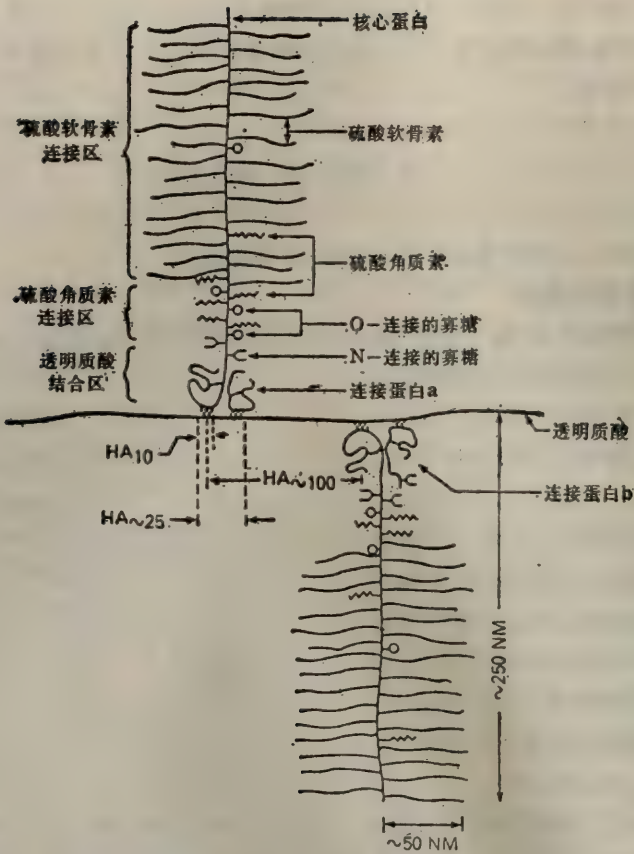


图 77 软骨蛋白聚糖集体结构的图解模型。(出处同图 67)

硫酸角质素链。大约 12 个氨基酸基有一条糖胺聚糖链。大约 2/3 的硫酸角质素链位于紧邻透明质酸结合区的、核心蛋白链的硫酸角质素富集区。90% 以上的硫酸软骨素连接于硫酸软骨素富集区。

某些生物合成的证据提示硫酸软骨素富集区在氨基末端区，透明质酸结合区位于羧基末端区。另一方面，初步的化学分析表明缬氨酸是各种大小的蛋白聚糖分子，和纯化的透明质酸结合区段的氨基末端。这表明透明质酸结合区，可能实际位于核心蛋白的氨基末端区。确定证据尚有待建立。

对培养的鸡翅芽体软骨细胞中蛋白聚糖的研究，揭示了蛋白聚糖更为详尽的化学结构。在培养皿中培养 7—8 天后形成的软骨小结 (nodules)，与经过相同时间在体内形成的小结非常相似。由这些软骨小结的软骨细胞合成的，和在细胞外基质积聚的蛋白聚糖，与在哺乳动物中，它们的对应蛋白聚糖非常相似。它们含有结合于核心蛋白的硫酸软骨素和硫酸角质素链。它们形成集体。在这种组织培养中加入 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸盐和 $2-[^3\text{H}]$ 甘露糖作为标记前体，加 $2-[^3\text{H}]$ 甘露糖是因为前人的工作提示甘露糖基位于骨骼硫酸角质素连接区的某些位置。从培养组织纯化的、标记的蛋白聚糖，经 Sepharose CL-2B 层析的洗脱图谱见图 78。得到的大分子经硫酸软骨素酶 ABC 消化，解聚硫酸软骨素链。随后用碱性硼氢化钠还原，从核心蛋白释放硫酸角质素链。样品在 Sephadex G-75

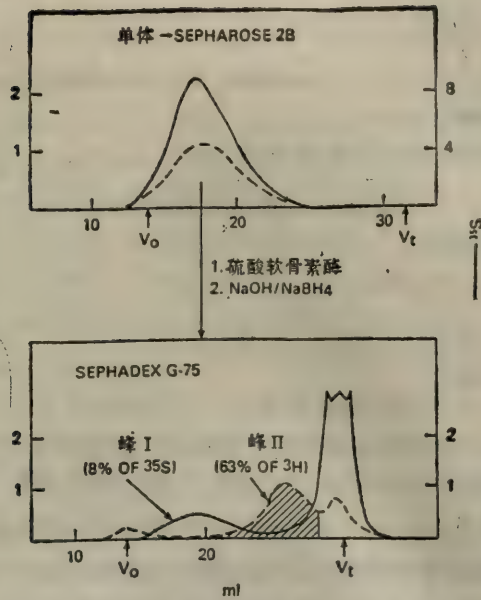


图 78 从培养的鸡翅软骨细胞分离的蛋白聚糖。

上图: 纯化的单体在 Sepharose 2B 柱的洗脱模式;

下图: 样品经软骨素酶消化和硼氢化钠还原后, 在 Sephadex G-75 柱上层析。排出峰的 ^3H 主要在肝糖原中, 而总体积的 ^3H 主要在硫酸软骨素的消化产物二糖中。

(摘自 Luca, S. De. et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255, 6077)

柱上层析, 大约 8% 参入的 ^{35}S 存在于硫酸角质素中(图 78 峰 I)。然而, 只有非常少的 ^3H 活力与硫酸角质素一起洗脱, 绝大部分在峰 II 中。由于峰 II 的 ^3H 活力几乎只存在于甘露糖基, 所以蛋白聚糖单体中大多数的甘露糖基存在于与硫酸角质素不同的寡糖中。

从移植的 Swarm 大鼠软骨瘤分离的蛋白聚糖单体的实验, 部分解决了结构和这些寡糖的关系。这种肿瘤的蛋白聚糖不含硫酸角质素, 但存在 N-连接的富于甘露糖的寡糖部分, 大约 80% 的 N-连接的寡糖存在于核心蛋白上透明质酸结合区的、分子量为 67 000 的区域中。O-连接的寡糖主要位于硫酸软骨素肽段。它们可分解为 3 个主要成分 (A、B 和 C), 这三个成分的结构(图 79)由甲基化和质谱分析测定。三糖 (C) 和四糖 (B) 均含有半乳糖基 1→3 N-乙酰半乳糖胺醇, 这种结构是经碱性硼氢化钠处理后, 分离的大多数 O-连接的寡糖的连接区中的通常结构。最大的寡糖 (A) 的结构, 经 α -N-乙酰神经氨酸酶除去唾液酸基后, 用直接探针质量片段分析确定。半乳糖连接在 N-乙酰氨基半乳糖醇的 C-3 位, 半乳糖基-N-乙酰葡萄糖胺二糖连接在 C-6 位。甲基化分析表明在完整的寡糖分子中, 二个半乳糖的 C-3 位均被 N-乙酰神经氨酸取代。

在寡糖 A 中, 半乳糖基与 N-乙酰葡萄糖胺的连接键与硫酸角质素的重复二糖中的半乳糖基相同。然而, 在硫酸角质素中可延伸的位置, 在寡糖 A 中被唾液酸阻断。这些粘蛋白型寡糖, 无疑在结构上与连接核心蛋白的硫酸角质素的连接区相关, 如图 79 所示。在骨骼组织中, 硫酸角质素最可能在“粘蛋白型”的引物寡糖上合成。这与角膜硫酸角质素

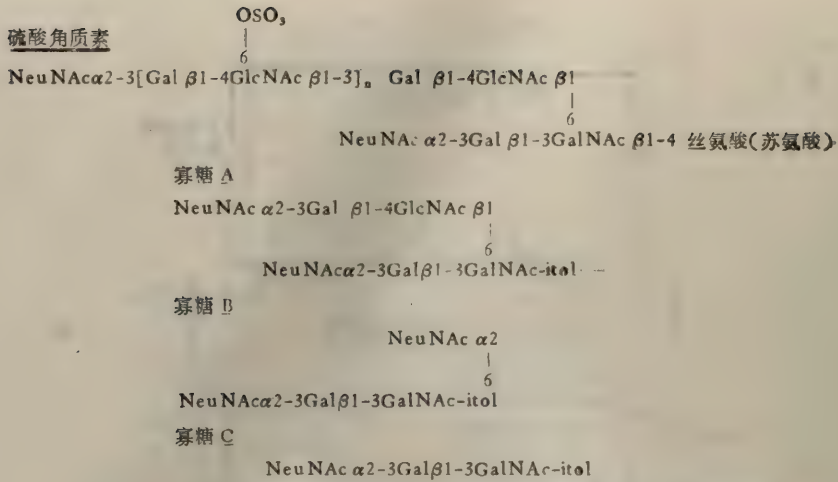


图 79 从 Swarm 大鼠软骨瘤蛋白聚糖分离纯化的寡糖 A, B, C 的结构。
(摘自 Lohmander, L. S., 1980, *J. Biol. Chem.*, **255**, 6084)

相反,角膜硫酸角质素是在结构上与“糖蛋白型”寡糖相关的引物寡糖上进行装配的。硫酸角质素的合成可能被在要害位置引入唾液酸基而阻断,如图 79 寡糖 A 和 B,或由 UDP-N-乙酰葡萄糖胺转移酶(可将 N-乙酰葡萄糖胺基转移到正在生长的链的半乳糖基的 4-位)所控制。

图 76 是一个假设的软骨蛋白聚糖图解模型,包括这些新确定的寡糖结构。看来如果 O-连接的寡糖代表硫酸角质素的连接点,那么 O-连接的寡糖加上硫酸角质素链的总平均数,以及它们在核心蛋白上的分布,很可能在不同的蛋白聚糖中是相似的。初步迹象提示这一假设是正确的。在从大鼠软骨瘤、培养的鸡翅芽体软骨细胞和成年牛鼻软骨分离的蛋白聚糖中,O-连接的寡糖加硫酸角质素链与硫酸软骨素链之比在 1.0 和 1.4 之间,即使软骨瘤蛋白聚糖不含硫酸角质素,鸡蛋白聚糖含大约每 4 或 5 个 O-连接的寡糖就含 1 条硫酸角质素链,牛的蛋白聚糖含每一个 O-连接的寡糖对多于 5 条硫酸角质素链。绝大多数硫酸角质素链(和 O-连接的寡糖)集中在硫酸角质素富集区,比多数的硫酸软骨素链更接近结合透明质酸的部位。绝大多数 N-连接的富含甘露糖的寡糖位于更接近结合透明质酸的部位。通常一个具有 2.5×10^6 分子量的蛋白聚糖,含大约 80—100 条硫酸软骨素链,100—120 条硫酸角质素链加 O-连接的寡糖,和 10—15 个富含甘露糖的寡糖。

硫酸角质素合成时,核心蛋白上存在“引物”寡糖,提示在蛋白聚糖结构的演变中,硫酸角质素加到大分子上可能是后来发生的,利用较先存在的寡糖(引物寡糖)内的部位作为起始点,胚胎软骨的蛋白聚糖通常比从同一组织发育后期分离的蛋白聚糖含有少得多的硫酸角质素,这与前面的假设一致。实际上,近几年的研究表明从胚胎和未成年小牛软骨分离的蛋白聚糖,含有高比例的 O-连接的寡糖和低比例的硫酸角质素。相反地,从成年牛的关节软骨分离的蛋白聚糖中,O-连接的寡糖对硫酸角质素链的比,大为减少。再者,从人软骨肉瘤分离的蛋白聚糖的初步数据表明存在 O-连接的寡糖,而不存在硫酸角质素。因此,大鼠和人的软骨肉瘤的蛋白聚糖,可能代表发育的、较年幼的或更原始的软骨蛋白聚糖,而那些具有较大量硫酸角质素的成年软骨蛋白聚糖,可能代表更成熟的或高度分化的蛋白聚糖。

(二) 软骨蛋白聚糖的集聚

七十年代初,由于新技术的发展,从软骨分离到未降解和高产率的蛋白聚糖。基本方法是用“解离”溶剂, 4mol/L 胍或 3mol/L $MgCl_2$, 可破坏天然集聚体内的相互作用, 使能抽提出高达 85% 的牛鼻软骨的蛋白聚糖。假如抽提液保留在解离介质内, 并进行密度梯度离心(通常用氯化铯), 蛋白聚糖单体与抽提物的其它成分分开, 蛋白聚糖沉于离心管底的最高密度部分。天然聚糖集聚体的解离显然是一可逆作用。分离的单体与梯度离心位于顶部的物质合并, 产生集聚体, 可用超离心分析测定。这种集聚体的形成, 自然需要除去解离剂或显著降低解离剂浓度。另一个方法: 最初的组织抽提液经透析使胍的浓度降低到 0.4 mol/L, 密度梯度离心, 然后产生集聚形式的蛋白聚糖, 接着集聚体在解离条件下离心, 使蛋白聚糖单体与集聚体的其它专一的成分分开(图 80)。透明质酸与蛋白聚糖特异地相互作用是形成大集聚体的关键。天然集聚体的形成中, 首要的是连接蛋白的参与, 连接蛋白稳定透明质酸与蛋白聚糖间的相互作用。集聚体内的三种相互作用: (1) 单体与透明质酸之间, (2) 单体与连接蛋白之间, (3) 透明质酸与连接蛋白之间, 提示集聚体的三种组成成分都具有两个结合部位。

连接蛋白具有强疏水性, 不溶于水, 只在存在去垢剂时, 或于分子内引入较多的亲水基团, 才能分离得到。

Kimura 等用 [^{35}S] 硫酸盐和起源于大鼠软骨肉瘤的、培养的软骨细胞, 研究蛋白聚糖的集聚过程。测定不同长度的透明质酸寡糖与分泌的蛋白聚糖的作用, 阐明了透明质酸寡糖链的长度与蛋白聚糖集聚体形成的关系。

软骨中某些蛋白聚糖不能集聚, 这些不集聚的蛋白聚糖的核心结构, 看来缺少透明质酸结合区, 但含有与硫酸软骨素连接区中的多肽相似另外的蛋白质。

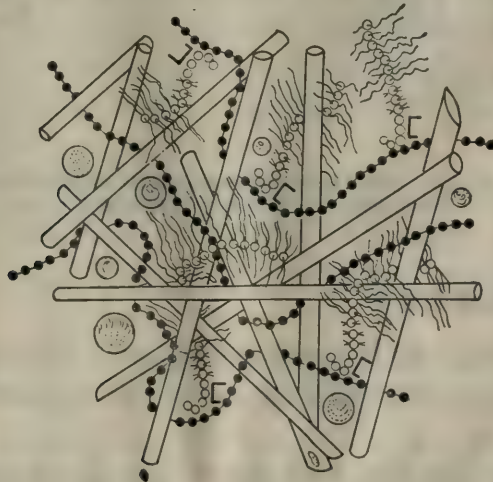


图 80 A 在胶原网络中蛋白聚糖集聚体图解模型。

(摘自 Muir, H. & Hardingham, T. E., Structure of proteoglycan, in Biochemistry of Carbohydrates, MTP International Review of Science, Biochemistry Series One, Vol 5, p. 153, Ed. Whelan, W. J., Butterworths, London)

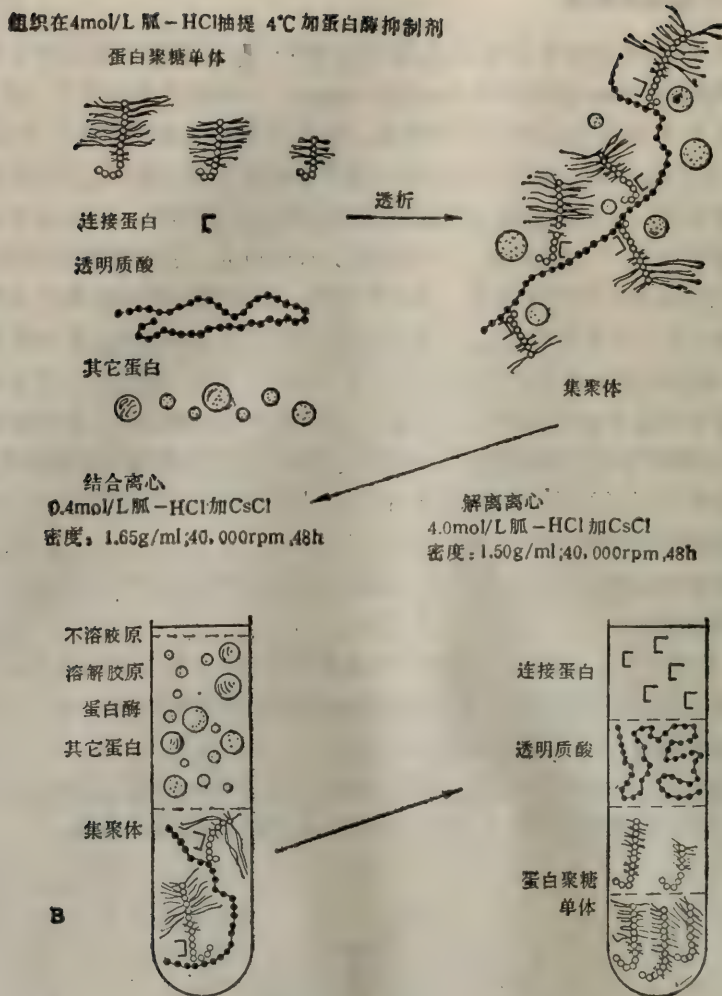


图 80 B 用胍提取和密度梯度离心分离蛋白聚糖集集体和它们的组成成分(单体、连接蛋白和透明质酸)。(出处同图 80 A)

(三) 软骨蛋白聚糖的生物合成

蛋白聚糖中糖链的合成, 由专一的木糖转移酶催化木糖连接肽到链上丝氨酸的羟基上起始, 然后, 经另外三种糖基转移酶的作用, 形成糖-蛋白质连接区(已在糖胺聚糖一节中讨论)。

体内木糖的内源接受体的性质了解得不多。设想接受体是被称为蛋白聚糖分子的多肽骨架, 或“核心蛋白”。核心蛋白合成的起始, 发生在粗面内质网。Upholt 曾报道从鸡软骨细胞分离 RNA 以及它在无细胞系统中的翻译。通过免疫方法检定产物中蛋白聚糖的核心蛋白的合成, 发现翻译产物的分子量大约为 340 000。RNA 经溴脱氧尿嘧啶核苷(抑制软骨细胞分化和阻止软骨蛋白聚糖合成的试剂)处理, 就不再促进蛋白聚糖的核

心蛋白的合成。这些结果提示新合成的核心蛋白是很大的多肽。至于木糖转移发生于核心蛋白在多核糖核蛋白体上完成之前(如糖基化的情况),还是蛋白质释放到内质网腔是在木糖连接之前,尚不了解。软骨素链是沿肽链核心以无规方式起始,或是从分子的一端到另一端顺次进行,也不清楚。对核心蛋白合成的方向,从N-端起始还是从C-端起始的确切证据,亦有待确定。

多肽合成过程中或多肽合成后不久,N-连接的富含甘露糖的寡糖,可能通过多萜醇中间体的路线转移到核心蛋白上。

完成蛋白聚糖分子合成的最终一步,糖胺聚糖的延伸和硫酸化在高尔基体进行,糖胺聚糖链在核心蛋白上的装配是非常快的(其作用过程,在糖胺聚糖一节中已讨论)。

(四) 软骨蛋白聚糖的功能

主要有两方面:

(1) 可逆地抗压缩力 由于许多糖胺聚糖链结合于共同的核心蛋白,每一蛋白聚糖分子占有很大的水压域(hydrodynamic domain)。在溶液中,这些大分子的伸展结构包含的溶剂容量比它们的干质量大50倍或超过50倍。对牛透明软骨蛋白聚糖的光散射测定,表明具有平均分子量 2.5×10^6 ,和平均旋转(gyration)半径, R_g , 大约为60nm。这类大分子可逆地抗压缩力。若在离心力压缩下,例如,随着力的增加,每一个大分子占有的体积减小,但当力减小时可再扩张到它原来的体积。当分子域缩小,分子域中糖胺聚糖链的电荷密度和流动性的约束增加,因而能抗压缩力。软骨中如牛鼻隔膜,干重的一半和湿重的10%是蛋白聚糖,蛋白聚糖在胶原网络的空隙中占有的总体积,少于它们伸展结构的20%,表明蛋白聚糖在这一组织中,从软骨细胞以密集的方式挤压入细胞外间质,无疑地增强它们抗压缩负荷的效能。

在溶剂中,当周围小分子浓度增加,透明质酸和蛋白聚糖的水压体积可减少到它们伸展体积的20%以下。这类小分子如葡聚糖,与蛋白聚糖有效地竞争溶剂。同样,在高浓度蛋白聚糖时,蛋白聚糖分子间的自身排斥和分子间的竞争溶剂,使大分子的水压体积减小。在软骨组织中,新合成的蛋白聚糖分泌到含有高浓度蛋白聚糖的细胞外间质,蛋白聚糖分子的自身排斥决定分子最终的平衡体积。

在细胞外间质中,蛋白聚糖在胶原网络内组建成复杂的集聚结构,于是细胞外的软骨基质的全部结构,依赖胶原网络和散布在胶原网络内的蛋白聚糖的混合性质。微丝为组织维持形状和提供抗拉强度,而水合的蛋白聚糖提供膨胀压,和为有效的组织功能提供必需的抗压负荷(图81)。

(2) 维持软骨体积和形状 蛋白聚糖大分子结构的另一重要特征是:具有以截留周围溶剂划定空间体积的能力。这是正常发育的骨骼结构的关键性质。长骨建造在由骨骺(长形骨的顶端)生长板结构所确定的软骨样板上。在很大程度上,这些软骨的容量和形状将确定骨骼的最终形状和结构。缺乏软骨基质的小鼠,或短肢畸形的鸡的软骨中没有蛋白聚糖,导致严重的骨骼畸形。

另一种反常地生长,发生在小鼠的另一种变种,身材短小的(brachymorphic)小鼠。长骨不成比例地缩小,这种病明显地与软骨蛋白聚糖相关。在生长板(growth plates)中硫酸软骨素链硫酸化不足,导致生长板显著地短。原初的分子损伤,与变种细胞合成硫酸

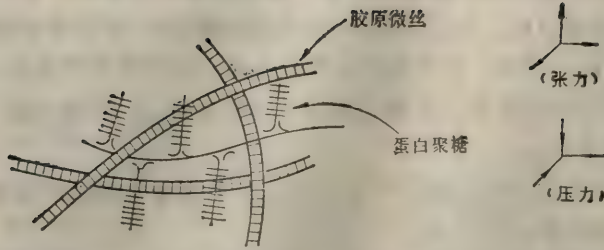
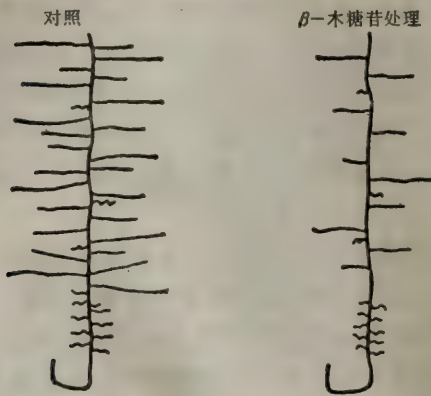


图 81 软骨基质中结构元素图解。胶原微丝在三个方向抗张力,蛋白聚糖逆向地吸收压力负荷。(出处同图 67)

化因子 (sulfation factor), 磷酸腺苷磷酸硫酸酯 (phosphoadenosine phosphosulfate, PAPS) 的能力减小相关。蛋白聚糖生物合成高的细胞,如快速生长的骨顶端上的骺板的软骨细胞, PAPS 成为限制因素, 并且蛋白聚糖上的糖胺聚糖链的低硫酸化达到 15%。这样生成的蛋白聚糖分子,在相同的环境条件下维持相同的体积的效能,比正常硫酸化的分子差。这样,这种变种的细胞外间质的每一个蛋白聚糖分子的平均体积减少,以致大分子能实现最终电荷密度和分子的“弹性”与充分硫酸化的蛋白聚糖相似。这种较小的体积

可能是在这种动物中骺板缩小, 并因此形成短肢的原因。

用鸡翅芽体软骨细胞系统研究 β -木糖苷对蛋白聚糖功能的影响。这些化合物能进入细胞, 并与内源核心蛋白上作为半乳糖基转移酶的底物的木糖基化丝氨酸竞争半乳糖。正常地加在木糖基化核心蛋白上的第一个半乳糖基, 将转移到竞争的外源底物。这样加工和分泌的蛋白聚糖分子, 含高浓度 β -木糖基和少得多的硫酸软骨素链(图 82), 每一个核心蛋白分子上的硫酸角质素链与未经 β -木糖基处理的相同, 硫酸软骨素链和硫酸角质素链的长度均减少 15%, 或许是因为糖胺聚糖净合成比正常的高, 而核苷酸糖前身成为限制因素。当鸡翅芽体在含木糖基的培养液中培养 8 天, 细胞外间质的形态明显改变, 体积减少, 软骨细胞相互靠得很近, 间质中的这种差异与蛋白聚糖的改变了的结构和物理性质一致。可用解释蛋白聚糖缺乏对身材



CS链数	100	40
CSMW	30 000	23 000
KS链数	50	50
KSMW	6 000	4 500

图 82 正常条件下培养的和培养基中加 β -木糖苷培养的八天的软骨小结的基质中蛋白聚糖结构的模式图。

(摘自 Lohmander, L. S. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 10551)

短小的小鼠软骨的影响的同样原理解释木糖基实验的结果。

(五) 其它组织中的蛋白聚糖

虽然其它组织中的蛋白聚糖可具有与软骨蛋白聚糖相似的功能,它们也可能有完全不同的结构和功能。通常其它组织中的蛋白聚糖浓度比软骨中的低得多。下面将讨论不同组织中几种蛋白聚糖的例子。

(1) 主动脉蛋白聚糖 主动脉的形态研究表明,与存在于软骨的基质颗粒群相似的基质颗粒群存在于细胞外间质,与胶原微丝结合。

对猴主动脉平滑肌细胞蛋白聚糖合成的研究,根据它们在分子筛柱上水压大小的不同,观察到两种类型的蛋白聚糖。较大的一类,当与载体软骨蛋白聚糖组建集集体时,大约50%的标记蛋白聚糖能形成集集体。从这些研究说明主动脉含结构上与软骨蛋白聚糖相似,但又不同的蛋白聚糖群。

这些蛋白聚糖与主动脉中存在的其它类型的蛋白聚糖,尚可具有其它功能,如(a)通过基质成分之间的相互交叉连结和与细胞的交叉连结,维持组织的结构完整,(b)维持组织的粘弹性和水化作用,(c)调节动脉壁的渗透性,(d)影响动脉中脂质的捕获和清除,(e)调节血液成分与血管组织的相互作用。

(2) 卵巢滤胞液中的蛋白聚糖 在子宫腔的发育和卵巢滤胞生长过程中,滤胞的体积增加,滤胞膨胀。在这一过程中,整体试验表明吸收到糖胺聚糖中的 $[^{35}\text{S}]$ 硫酸基增加,提示蛋白聚糖合成是这一生理过程的一个重要方面。

对分离的猪滤胞液中的主要蛋白聚糖的研究,虽然滤胞液中的蛋白聚糖与软骨蛋白聚糖有几乎相同的水压大小的分布,但它们的分子结构非常不同。滤胞蛋白聚糖的核心蛋白较大,分子量为 $300-400 \times 10^3$,并且没有透明质酸结合区(图83)。含艾杜糖醛酸的糖胺聚糖链要大得多,分子量大约为 55×10^3 ,每一个大分子具有比较少的糖胺聚糖链,10至20条。另外,核心蛋白上载有200—400个寡糖链,大多数寡糖通过N-乙酰半乳糖胺与丝氨酸或苏氨酸的羟基之间的糖苷键,连接到核心蛋白。经碱性硼氢化物处理,分离得主要的五糖,含有2个半乳糖,1个唾液酸,1个N-乙酰葡萄糖胺,和1个N-乙酰半乳糖胺醇。这种五糖占总寡糖的大约75%。这一组成与存在于软骨蛋白聚糖的最大的O-连接的寡糖相似。分子的全结构提示比软骨蛋白聚糖具有更为开放的结构。它对占有大溶剂体积是非常有效的,并助长滤胞液的粘度,但对抗压负荷就不那么有效。

(3) 角膜的蛋白聚糖 角膜蛋白聚糖与软骨蛋白聚糖相似,含有硫酸软骨素(硫酸皮肤素)和硫酸角质素,除此以外,两者没有相似性。角膜硫酸角质素以与骨骼硫酸角质素不同的键共价连接于蛋白质。连接区含有N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖基。连接包含天冬酰胺的支链和N-乙酰葡萄糖胺基之间的N-糖苷键。因此,这一连接,与通过多肽

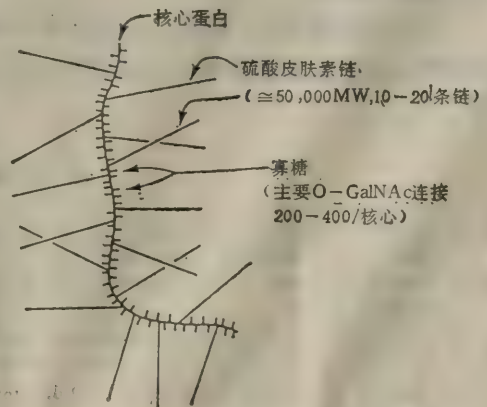


图83 猪滤胞液中主要蛋白聚糖的结构图解。
(摘自 Yanagishita, M. et al., 1979, *J. Biol. Chem.*, 254, 911)

醇脂质中间体合成的寡糖连接到蛋白质形成糖蛋白的连接相同,提示在角膜中,作为合成硫酸角质素的“引物”寡糖,来自“糖蛋白型”寡糖。衣霉素阻断培养的角膜合成硫酸角质素,支持了这一设想。

在角膜中,不像软骨,硫酸软骨素链含艾杜糖醛酸,因此,应列为硫酸皮肤素。再者,糖链硫酸化较少。角膜蛋白聚糖分子的完整结构,亦与软骨蛋白聚糖的结构十分不同。角膜蛋白聚糖分子比软骨蛋白聚糖小得多,分子量小于 $2-3 \times 10^5$,并且浮力密度亦较低,所以蛋白质的比例较高。选择性的乙醇沉淀可将分子群分为富含硫酸皮肤素和富含硫酸角质素的两部分。结果表明两种糖胺聚糖可能连接在不同的核心蛋白上,估计硫酸角质素蛋白聚糖分子量大约为75 000。

培养恒河猴角膜研究角膜蛋白聚糖的生物合成, [^{35}S]-硫酸基参入二个部分,一个部分含硫酸皮肤素,另一部分含硫酸角质素。酶的、化学的和物理化学的分析表明,两类蛋白聚糖分子均由大约70%蛋白质和糖胺聚糖以及寡糖构成。

硫酸角质素蛋白在正常角膜功能中起重要作用,它们对基质的构造和维持是重要的,这样的构造对可见到光的透明性质是必需的。

(4) 肝膜的蛋白聚糖 研究与细胞膜结合的蛋白聚糖,具有许多不同于前面讨论的蛋白聚糖的问题。细胞膜上蛋白聚糖的含量低,抽提困难。有效地溶解这些膜蛋白聚糖,需要去垢剂和离子,如脱氧胆碱,或 NaCl 加 Triton X-100。

肝膜蛋白聚糖含硫酸乙酰肝素。硫酸乙酰肝素聚糖普遍存在于各种类型的细胞表面。由于溶解这种蛋白聚糖需要去垢剂,提示核心蛋白可能有疏水区,能固定在膜中的大分子上。从大鼠肝膜纯化的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,分子量大约为80000,估计含有平均分子量为14 000的4条硫酸乙酰肝素链。核心蛋白的大小未能确切地测定,但是从不同的方法得到的下限值为17 000,上限值为40 000。显然,这一蛋白聚糖在性质上与肝素聚糖明显不同。肝素聚糖的分子量超过900 000,含有分子量大约为80 000的10—15条肝素链。再者,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖含有正常的氨基酸成分,而肝素蛋白聚糖只由丝氨酸和甘氨酸组成。

已有的证据表明,肝细胞质膜含有与硫酸乙酰肝素相互作用的受体。提示细胞膜中的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,在膜结构以及在细胞与细胞和细胞与基质的相互作用中起主要作用。

主要参考资料

- [1] Sharon, N. & Lis, H. Glycoproteins in *The Proteins*, Vol. 5, pp. 1—144, 1982, Ed. Neurath, H. & Hill, R. L., Academic Press, New York.
- [2] *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Ed. Lennarz, W. L., 1980, Plenum Press, New York.
- [3] Hascall, V. C. Proteoglycans: Structure and function in *Biology of Carbohydrates*, Vol. 1, pp. 1—49, 1981, Ed. Ginsburg, V. & Robbins, P. W., John Wiley & Sons, New York.
- [4] *Biology of Carbohydrates*, Vol. 2, Ed. Ginsburg, V. & Robbins, P. W., 1984, John Wiley & Sons, New York.
- [5] Damsky, C. H. et al. Integral membrane glycoproteins in cell-cell and cell substratum adhesion. in *The Biology of Glycoproteins*, pp. 95—181, 1984, Ed. Ivatt, R. J., Plenum Press, New York.
- [6] Fukuda, M. & Fukuda, M. N. The surface glycoproteins and carbohydrate antigens in development and differentiation of human erythroid cells. in *The Biology of Glycoproteins*, pp. 183—234, 1984, Ed. Ivatt, R. J., Plenum Press, New York.

- [7] Reading, C. L. Carbohydrate structure, biological recognition and immune function. in *The Biology of Glycoproteins*, pp. 235—320, 1984, Ed. Ivatt, R. J., Plenum Press, New York.
- [8] Henderson, E. J. The role of glycoproteins in the life cycle of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. in *The Biology of Glycoproteins*, pp. 371—443, 1984, Ed. Ivatt, R. J., Plenum Press, New York.
- [9] Glycoconjugates, *Proceedings of the VIIIth international symposium. Vol. 1 & Vol. 2, 1985*, Ed. Davidson E. A. et al., Praeger Scientific, New York.



缩 写 表

按简写字母顺序排列

- ACTH** 促肾上腺皮质激素
AFP 甲种胎儿蛋白
Araf 呋喃型阿拉伯糖
BHK 幼地鼠肾细胞
ConA 伴刀豆凝集素
CS 硫酸软骨素
CTP 胞嘧啶核苷三磷酸
DBA 双花扁豆凝集素
Dol 异戊二烯醇(多萜醇)
Dol-P 磷酸多萜醇
Dol-P-P 多萜醇焦磷酸
DS 硫酸皮肤素
DTH 皮肤迟缓型超敏反应
ER 内质网
FBP 岩藻糖结合的蛋白质
FITC 异硫氰酸荧光素
FSH 促卵泡激素
Fuc 岩藻糖
GAG 糖胺聚糖
Gal 半乳糖
GDP-dGlc 鸟嘌呤核苷二磷酸-d-脱氧葡萄糖
GDP-Man 鸟嘌呤核苷二磷酸-甘露糖
GDP-Fuc 鸟嘌呤核苷二磷酸-岩藻糖
Glc 葡萄糖
GlcNAc N-乙酰葡萄糖胺(N-乙酰氨基葡萄糖)
 γ -GT γ -谷氨酰转肽酶
HA 透明质酸
HBsAg 乙型肝炎表面抗原
HCG (hCG) 绒毛膜促性腺激素
HEV 内皮小静脉
HLA 组织亲和抗原
HPLC 高效液相层析
HS 硫酸乙酰肝素(硫酸类肝素)
Hyl 羧基赖氨酸
Hyp 羧基脯氨酸
IdUA 艾杜糖醛酸
IF 干扰素
IgG 免疫球蛋白 G
KS 硫酸角质素
LCA 扁豆凝集素
LH 促黄体生成素
LIF 白细胞抑制因子
LT 淋巴细胞毒素
MAF 巨噬细胞激活因子
Man 甘露糖
MIF 巨噬细胞游走抑制因子
MKV 冷凝集素(Waldenström 球蛋白)
MLR 混合淋巴细胞反应
MSF 巨噬细胞游走激活因子
NDV 新城鸡瘟病毒
NK 杀伤细胞
NMR 核磁共振
PAPS 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸
PAS 高碘酸-Schiff 试剂
PG 蛋白聚糖
PHA 植物凝集素
PLA 利马豆凝集素
PMNL 多形核白细胞
PNA 花生凝集素
Py-BHK 多瘤病毒变异的幼地鼠肾细胞
PSL 豌豆凝集素
RCA 蓖麻凝集素
Rs-BHK 肉瘤病毒变异的幼地鼠细胞
SBA 大豆凝集素
SDS 十二烷基硫酸钠
Sia 唾液酸
SISS 免疫抑制上清液
STL 马铃薯凝集素
SV-3T3 猴病毒变异的小鼠 3T3 成纤维细胞
SV-40 猴病毒
TDL 胸导管淋巴细胞
TH 糖蛋白 Tamn 和 Horfall 糖蛋白
UDP-Gal 尿嘧啶核苷二磷酸-半乳糖
UDP-GalNAc 尿嘧啶核苷二磷酸-N-乙酰半乳糖胺
UDP-Glc 尿嘧啶核苷二磷酸-葡萄糖
UDP-dGlc 尿嘧啶核苷二磷酸-脱氧葡萄糖
UDP-GlcNAc 尿嘧啶核苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺
UDP-Man 尿嘧啶核苷二磷酸-甘露糖
WGA 麦胚凝集素
Xyl 木糖
XylNAcOT N-乙酰氨基木糖醇

收到日期	1988.9.8
来源	西单书
书价	2.70元
单据号	150699
开票日期	88.9.8

24637		58.173 216	
代谢(二) 糖蛋白与蛋白聚糖			
结构、功能和代谢			
借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
白 田		88.9.26	
		020	
		10	

58.173
216

24637

注 意

- 1 借书到期请即送还。
- 2 请勿在书上批改圈点，折角。
- 3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

京卡0701

ISBN 7-03-000306-3

Q · 59

定 价： 2.70 元

科技新书目： 166-094

