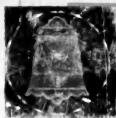


▷ 张树政 主编

糖生物学 与 糖生物工程

422

9



清华大学出版社

中科院植物所图书馆

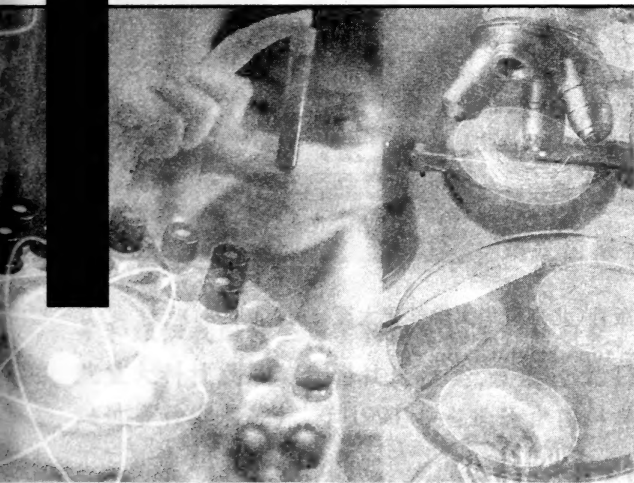


S0001634

▶ 张树政 主编

58.17422
549

糖生物学 与 糖生物工程



2759

清华大学出版社

(京)新登字 158 号

版权所有,翻印必究。

本书封面贴有清华大学出版社激光防伪标签,无标签者不得销售。

图书在版编目(CIP)数据

糖生物学与糖生物工程/张树政主编;王克夷等著. —北京:清华大学出版社,2002

ISBN 7-302-05711-7

I. 糖… II. ①张… ②王… III. ①碳水化合物—生物化学—普及读物
②碳水化合物—生物工程—普及读物 IV. Q53-49

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 057682 号

出版者:清华大学出版社(北京清华大学学研大厦,邮编 100084)

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

责任编辑:罗 健

版式设计:肖 米

印刷者:北京四季青印刷厂

发行者:新华书店总店北京发行所

开 本:850×1168 1/32 印张:5.875 字数:146 千字

版 次:2002 年 11 月第 1 版 2002 年 11 月第 1 次印刷

书 号:ISBN 7-302-05711-7/Q·24

印 数:0001~3000

定 价:15.60 元

◇ 主编简介



张树政 院士,中国科学院微生物研究所研究员,河北辛集市(前束鹿县)人,1922年出生。1945年毕业于北京大学理学院化学系。从事化学、微生物学、酶学、糖生物学和糖生物工程学研究五十多年,是我国微生物酶学研究的奠基人之一。年近80,仍积极倡

导和组织我国糖生物学和糖生物工程的研究。多次荣获中国科学院重大科技成果奖和科技进步奖,发表论文150余篇,并主编、合编过多种学术著作,于1991年当选为中国科学院院士。



新編新編新編
新編新編新編
新編新編新編

◇ 编者的话

糖生物学与糖生物工程是 20 世纪末才开始蓬勃发展而引起世人注意的一个学科领域。这门新兴的学科既有深远的理论意义,又和人类健康和动植物生产有着密切的关系。本书由我国著名的生物化学家张树政院士倡导和组织,汇集了我国在本学科多有建树的十几位专家的创作,是介绍该学科知识和最新进展的综述性著作。

本书尽可能简要地介绍了糖生物学与糖生物工程的兴起和发展过程、糖生物学的基本内容和糖链与人类健康,特别是与癌症发生的关系,还简介了寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用,以及目前正广泛受到关注的有广阔应用前景的多糖——甲壳素和壳聚糖。

本书可供具有一定生物化学和生理学知识的大学生、研究生作为课外读物,也可供具有相应程度的高级科研管理人员参考。为了方便读者进一步了解和学习有关知识,书中大部分章节都提供了或多或少的参考文献。这些文献集中在全书的最后。

参加本书编写工作的有王克夷教授(中国科学院上海生物化学研究所)、崔肇春教授(大连医科大学)、朱正美教授(大连医科大学)、李晋萍博士(瑞典乌普萨拉大学生物化学中心医学生化和微生物系)、田梦玉教授(西安医科大学)、陈惠黎教授(上海医科

大学)、周柔丽教授(北京大学医学院细胞生物学教研室)、李玉瑞教授(中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所)、徐桂云教授(中国科学院化学研究所)、许彩民教授(中国医学科学院基础医学研究所)、孔繁祚教授(中国科学院生态环境研究中心)和张惟杰教授(上海交大学生命科学技术学院);程光胜教授(中国科学院微生物研究所)协助张树政院士(中国科学院微生物研究所)进行了大量稿件的加工整理和统稿工作,清华大学出版社罗健先生为本书的出版付出了辛勤的劳动。

目 录

CONTENTS

1	导言	1
1.1	生物化学中新出现的广袤前沿——糖生物学与糖生物工程的兴起和发展	1
2	糖链的结构和功能	14
2.1	“乐谱”和“词典”——糖类作为信息分子的结构基础.....	14
2.2	“人小鬼大”的糖鞘脂——糖鞘脂与信息传递	20
2.3	生殖过程中的中介——糖链.....	37
2.4	糖分子与异种器官移植.....	50
2.5	备受关注的古老生物大分子——蛋白聚糖.....	56
3	糖链和疾病	73
3.1	免疫球蛋白分子糖链的异常与自身免疫疾病.....	73
3.2	糖蛋白中糖链结构异常和恶性肿瘤的诊断.....	80
3.3	糖链在癌症发生、发展中的意义及其在抗癌中的潜在价值	102
3.4	细胞外基质和疾病	116
3.5	糖链在流感病毒侵袭细胞中的作用	136

3.6	糖基磷脂酰肌醇 GPI 锚结合蛋白及其与疾病的关系	141
4	寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用	149
4.1	前言	149
4.2	植物的细胞壁	150
4.3	植物自卫系统的激活及其机制	151
4.4	植物自卫作用的应用	152
4.5	常见的寡糖激活剂	153
4.6	寡糖类植物生长调节剂	157
4.7	根瘤菌与宿主共生的信息分子——能促进固氮作用的寡糖	159
4.8	寡糖素	161
4.9	寡糖素的制备	162
4.10	寡糖的合成	163
4.11	寡糖素的前景	164
5	甲壳素/壳聚糖——有广阔应用前景的多糖	165
5.1	甲壳素在自然界中的分布	165
5.2	甲壳素/壳聚糖的性质	166
5.3	真菌来源的甲壳素/壳聚糖	169
5.4	甲壳素/壳聚糖的应用	171
	参考文献	175

1 导 言

1.1 生物化学中新出现的广袤前沿 ——糖生物学与糖生物工程的兴起和发展

糖生物学 (glycobiology) 是在以糖链为“生物信息分子”的水平上阐明多细胞生物的高层次生命现象的一门科学。它是 20 世纪 90 年代才发展起来的生物化学中最后一个广袤前沿。研究糖生物学的方法论和基本技术,以及把基础研究获得的知识进一步转化为生产技术等,称为“糖工程”(glycotechnology)。两者合起来则称为“糖科学与糖技术”(glycoscience and glycotechnology), 1998 年提出了“糖生物工程”(glycobiotechnology) 的概念。

1.1.1 糖链重大生理功能的揭示历程

1.1.1.1 糖决定了人的血型

众所周知,人的主要血型是 ABO 式血型,主要有 4 种:A 型、B 型、AB 型和 O 型,这是 1900 年兰德斯坦纳(K. Landsteiner)发现的。A 型、B 型血型的人的红细胞表面分别有 A 型抗原、B 型抗原,他们的血清中分别有 B 型抗体、A 型抗体。O 型血的人的红细胞上没有抗原,其血清中有 H 血型物质,所以常写作 ABO(H) 血型抗原,H 血型物质是 A 型抗原、B 型抗原的前体。血型的鉴定在输血,组织和器官移植,以及法医鉴定中是绝对必需的,尤其是在第一次世界大战中,为抢救伤员曾经发挥过巨大的作用。兰德斯坦纳曾获得 1930 年诺贝尔生理医学奖。至今在医院中各型血浆

仍是必不可缺之物。

经过不少免疫学家,包括兰德斯坦纳和瓦特金(W. M. Watkins)等,半个世纪的研究,1960年瓦特金终于确定了ABO(H)抗原的决定基的糖链结构。发现H抗原有I型和II型之分。主链二糖是半乳糖以 β -(1 \rightarrow 3)或 β -(1 \rightarrow 4)键与N-乙酰葡萄糖胺连接而成,前者又叫N-乙酰新乳糖胺,后者称为N-乙酰乳糖胺。在半乳糖上都接上 α -(1 \rightarrow 2)-岩藻糖就分别合成HI型和HII型三糖。再在H型三糖的半乳糖的3位上连接 α -(1 \rightarrow 3)-半乳糖即成B型糖抗原。在同一位置上改为连接 α -(1 \rightarrow 3)-N-乙酰半乳糖胺即成A型糖抗原。因此,A型和B型抗原仅有一个糖基的差别,仅差一个糖基就决定了血型。50年才解开了血型之谜,确定了永远不变的血型规律。除了ABO式血型外,还有路易斯(Lewis)血型Le。路易斯(Lewis)血型也有4种型别:Le^a、Le^x、Le^b和Le^y。前两种是在H形主链二糖的N-乙酰葡萄糖胺上连接 α -(1 \rightarrow 4)-岩藻糖成Le^a,连接 α -(1 \rightarrow 3)-岩藻糖成Le^x;后两种为在H型三糖的N-乙酰葡萄糖胺上连接 α -(1 \rightarrow 4)-岩藻糖成Le^b,连接 α -(1 \rightarrow 3)-岩藻糖成Le^y。仅仅连接糖的位置的不同即成了完全不同的血型。

1.1.1.2 一个血球细胞表面就有50万个糖蛋白分子

疾病的诊断一般先查血,最简单的是在显微镜下进行细胞计数。红细胞正常值为400万个/mm³~550万个/mm³,白细胞正常值为4000个/mm³~10000个/mm³。红细胞在显微镜下看上去像个光滑的小圆盘,其实不然。在红细胞表面含有大量的载糖蛋白A(glycophoirin A),含糖量为60%,它所含的唾液酸占红细胞总唾液酸的80%。推算每个红细胞细胞膜上有50万个糖蛋白分子。这种糖蛋白分子有131个氨基酸,是跨膜蛋白,羧基末端(C端)在细胞内,靠氨基末端(N端)92个氨基酸肽链上有15条~19条O-糖链。载糖蛋白A与MN血型有关。在白细胞细胞膜上也有

含糖量极高的糖蛋白,称为白唾液酸蛋白(leucosialin),它含有白细胞唾液酸的85%,推算也是每个细胞膜上有50万个这种糖蛋白。这种糖蛋白有381个氨基酸。膜外N端肽链上有80多个O-糖链。在粒细胞、单核细胞及T淋巴细胞上也都有这种糖蛋白。血球上具有多量唾液酸,提供高的负电荷,避免在血管中流动时相互粘附或与血管内皮细胞粘附。

1.1.1.3 糖分化抗原和癌发展抗原的提出

1975年迈尔斯坦(Milstein)等创建了杂交瘤技术生产单克隆抗体,对生物学很多领域作出了重大贡献,在免疫学领域尤为突出。费兹(Ten Feizi)等利用单克隆抗体技术在1981年提出了“糖分化抗原”的概念,即在发育过程中细胞的糖蛋白或糖脂的糖抗原性的改变是由于序列的增加或删除一个糖残基引起的。她在1985年发表了综述“用单克隆抗体确认糖蛋白和糖脂的糖链结构是癌发展抗原(onco-developmental antigens)”。

1.1.1.4 白细胞分化抗原CD的命名

《糖锁工程》一书中有一章“糖链的免疫工学”,主要讲了单克隆抗体(简称单抗)的应用领域:①过去ABO(H)和Lewis血型都是用多抗鉴定,现在用单抗判定的试剂已经普及;②各种自身免疫疾病和自身抗原,如自身免疫性甲状腺炎、糖尿病、SLE(红斑狼疮)等;③白细胞的标记物,作为淋巴系细胞标记物的CD57、CDw60、CD76、CD77,作为粒细胞和单核细胞标记物的CD15、CDw17、CDw65等都写出了糖脂链结构;④肿瘤标记物,已知的糖链性癌原有已知的I型糖链2-3唾液酸Le^a,主要是消化系统胰脏、肝脏、胃、大肠等的肿瘤,II型糖链2-3唾液酸Le^x是肺癌、卵巢癌等的糖抗原。国际癌发育生物学和医学学会(ISOBM)举办过多次组织分化(TD)研讨会。1997年在洛桑举行TD-6,主要研讨

对象是 Sle^a 的单抗。对成套的单抗加以定性,以便确定各自的相对价值,选出适用的单抗作为病人患胰脏、肝脏和胃肠癌的检测之用。用单抗技术确定的白细胞分化抗原统一称为分化簇(cluster of differentiation, CD)。

1.1.1.5 免疫球蛋白 G (IgG) 糖链与类风湿病 (RA)

免疫球蛋白是体液免疫的主力军。其中 IgG 占免疫球蛋白的 80%, IgG 的含糖量约大于 3%, IgG 的结构与功能早已知道,但它的糖链有什么作用却鲜为人知。直到 1981 年德森霍佛尔(J. Deisenhofer)才用 X 射线晶体分析确定了糖链的结构与 IgG 的结合位点。它是二天线的复合 N-糖链。1985 年木幡阳发现类风湿病人的 IgG 糖链中的半乳糖含量低于正常人的含量,由此提出了“糖病理学”的概念。糖病理学是研究糖链失常与疾病关系的学科。木幡阳与英国牛津大学著名糖生物学家缀克(Dwek)合作多年,终于确证了这种缺乏半乳糖的 IgG 引起构象的变化,使人体把它认为异物,在血管、关节等处发生免疫复合物的沉积,从而引发类风湿。它是病因而不是结果。

1.1.1.6 细胞外表面的模样

在日文中,细胞外表面被叫做“细胞之颜”,颜即脸的意思。前面说过,红细胞和白细胞的细胞表面都有 50 万条以上的糖蛋白。实际上多细胞生物的细胞外表面都布满了糖链,形象地讲,糖脂(glycolipid)像地面的草皮,脂质部分嵌在膜脂双层的外层,上面露出短的糖链;糖蛋白像大树,根深叶茂,主干为跨膜蛋白,主干上部可以有 1 条~5 条天线的 N-糖链和长短不等的 O-糖链。把这些糖链称之为天线是很恰当的,因为它们正是细胞间传递信息的收发者。它们还参与细胞之间的粘附,作为病原菌及毒素的受体和激素、酶、抗体和凝集素等的受体。细胞表面还有另一类更大

的分子叫做蛋白聚糖 (proteoglycan, PG), 它与糖蛋白的区别不在于含糖量的多少, 而是结构不同。PG 以蛋白质为主干, 侧链是糖氨聚糖 (glycosaminoglycan, GAG)。例如牛鼻软骨聚糖的主干蛋白质相对分子质量是 220kDa, 侧链 GAG 有 100 多个硫酸软骨素。每条糖链有 100 个 ~ 200 个单糖残基, 也有几条短链的硫酸软骨素。含糖量最少的 PG 要算 IX 型胶原蛋白, 它有 3 条肽链, 仅结合一个硫酸软骨素。糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖总称为糖缀合物 (glycoconjugate)。

1.1.1.7 多细胞生物的高层次生命现象

20 世纪 60 年代发展起来的分子生物学在核酸 (DNA 和 RNA) 及其直接产物蛋白质水平上来阐明生命现象, 取得了突出进展和重大成就。人类基因组和水稻基因组的研究已有重大进展, 原核生物和真核模式生物酿酒酵母以及美丽线虫基因组的测序工作已完成了上百个。然而用它们来阐明多细胞生物生命现象还是远远不够的。

原核单细胞生物大肠杆菌 1 分为 2, 2 分为 4, 4 分为 8, …… , 在对数生长期几个小时细胞数就可达到 $10^8 \sim 10^9$ 个/ml。而多细胞生物一个受精卵的二分分裂, 不但要互相结合, 还必须保持合理的空间配置和时间进程。糖链在其中的作用就非常重要。例如科学家发现, 在 8 ~ 16 细胞的胚胎期有叫做路易斯 X ($Le^x = CD15$) 的糖抗原表达, 所以把这种抗原称为阶段专一性胚抗原 (stage specific embryonic antigen, SSEA), 它可能与胚胎桑椹期的致密 (compaction of morula) 有关。我们人类有大约 4.0×10^9 个 ~ 5.0×10^9 个细胞集团, 每个集团的细胞相互粘附, 细胞与基质之间要相互识别和相互作用, 集团之间也要相互识别和相互作用、相互制约和调控, 沿空间配置和时间进程井然有序地发展, 其中的“生物信息”只能靠含有信息量比核酸和蛋白质高很多个数量级的糖链来承

担。于是就发展出“糖生物学”,而用于研究糖生物学的方法论和基本技术,以及把基础研究获得的知识转化为生产技术等则称为“糖生物工程”。两者合起来则称为“糖科学与糖技术”(glycoscience and glycotecchnology)。

1.1.2 糖生物学研究中的一场革命

1990年11月,3个不同的研究小组几乎同时发现血管内皮细胞-白细胞粘附分子1[ELAM-1,后改称E-选择素(E-selectin)],这种分子能识别白细胞表面的四聚糖唾液酸路易斯X(SLe^x,一种血型抗原)。当组织受到损伤或感染时,白细胞与内皮细胞粘附,它们沿壁滚动终至穿过血管壁进入受损组织以杀灭入侵病原物,而过多的白细胞渗出则会引起炎症及自身免疫疾病(如类风湿)等。这是真正第一次在人体中确证了糖结合蛋白E-选择素、P-选择素和L-选择素等家族成员与寡糖SLe^x(也包括SLe^a)之间的识别功能。更使人吃惊的,是发现肺癌和大肠癌细胞表面也存在SLe^x或SLe^a,进入血液循环的癌细胞可能也借类似机制渗出血管而实现转移过程中的一个重要环节。这些发现被称为糖生物学中的一场革命。

这场革命引发了一场制备抗炎和抗癌药物的大竞赛,许多以糖命名的药厂如雨后春笋应运而生,如Genetech公司和Glycomed公司就签订了1500万美元的合同生产抗炎药物。

美国Scripps研究所的华裔科学家王启辉(Chi-Huey Wong)在这场竞赛中有突出贡献。他首先用三种不同的糖基转移酶合成了SLe^x,当时推算该四聚糖价格为每千克20亿美元,由于王先生合成成功,并使生产产量达到100g的水平,所以价格可降低3个~4个数量级。这种产品已由Cytel公司生产。

1.1.3 发达国家政府对糖生物学研究的支持

1.1.3.1 英国

英国牛津大学生化系设有糖生物学研究机构,1992年改称糖生物学研究所,该所缀克(Raymond Dwek)教授曾在1988年《生化年评》上发表了题为《Glycobiology》的综述,并于同年创建了牛津糖系统(Oxford Glycosystem)公司,专门研制生产有关糖的试剂,特别是自动化糖链分析仪,牛津大学出版社1991年创刊了《Glycobiology》专业杂志。

1.1.3.2 日本

日本政府科学技术厅于1989年提出关于“糖生物工程基础与应用研究推进战略”,经过专家评议提出了详尽的推进战略方案,遂于1991年开始由科技厅、厚生省、农林水产省、通商产业省等四省厅联合实施“糖生物工程前沿计划”。该计划为投资数百亿日元的15年计划,内容包括“糖生物工程”和“糖生物学”,后者又分为“糖分子生物学”和“糖细胞生物学”。同时成立了“糖生物工程研究协议会”作为协调机构。该协议会编辑出版了680页的《糖锁工程》专著,并早在1989年就创刊了日英双语专门杂志《Trends in glycoscience and glycotecchnology, TIGG》。

1.1.3.3 美国

美国能源部资助佐治亚大学于1986年创建了复合糖研究中心(Complex Carbohydrate Research Center, CCRC),建立复合糖结构数据库CCSD。其计算机计划也称CarbBank Project。在1990年底即收集了糖结构数据6000个,1992年为9200个(包含在20000个记录中),1992年底记录达到22000个,到1996年已有记录42000多个。1996年一年增加的数量是1991年的4倍。到

2000年5月,已经超过5万个数据。

1.1.3.4 欧洲

欧洲各国也不甘落后。1994—1998年的研究计划中有一项“欧洲糖研究开发平台(European Carbohydrate Platform)”计划,目的是协调欧洲各国的糖研究与开发,以强化欧洲在糖的基础研究以及将研究成果转化为商品方面与美国和日本竞争的能力。

由于美、日、欧三大集团的重视,糖生物学研究近年来已取得了不少进展。现已确证糖链作为信息分子在受精、发生、发育、分化、神经系统、免疫系统恒态的维持方面起着重要作用,在炎症及自身免疫疾病、老化、癌细胞异常增殖及转移、病原体感染、植物与病原菌相互作用、豆科植物与根瘤菌共生过程中都涉及糖链的介导。在此基础上,新兴的糖生物学正处在蓬勃发展的起点,前程远大。糖生物学涉及生物学科的多个领域,如分子生物学、细胞生物学、病理学、免疫学、神经生物学等,而糖生物学研究的发展又会促进这些学科的发展。21世纪的生命科学研究将是对多细胞生物学过程的高层次生命现象的解释,因此对生物体内介导识别和调控生物学过程的信息分子——糖的研究是必不可少的。

1.1.4 近年来糖生物学的突飞猛进

从重大国际会议、期刊上和著名糖生物学家的言论中可以看出糖生物学突飞猛进的发展。

1.1.4.1 生物化学中最后一个广袤前沿

1993年5月在美国旧金山召开的首届“国际糖生物工程会议”上,大会主持人哈特(G. W. Hart)说:“生物化学中最后一个广袤前沿——糖生物学的时代正在加速来临!”同年9月美国国立卫生研究院召开首届糖生物学会议,题为“人类疾病的新前景”。

1994 年在美国召开的第二届糖生物工程会议仍由哈特主持,他说:“糖生物学是生物化学和生物医学交叉点的新前沿。”

1.1.4.2 糖基转移酶转基因细胞的出现

1995 年,由澳大利亚和美国科学家联合报道了一项糖基转移酶转基因细胞的研究工作。把猪器官移植到人体后,猪的主要抗原决定簇 Gal α -(1 \rightarrow 3)-Gal 会在几分钟内引起急性器官排斥反应(HAR)。人抗体 IgG 和 IgM 都与猪细胞表面的 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 发生反应。该研究将 α -(1 \rightarrow 2)-岩藻糖基转移酶基因转入猪肾细胞后稳定表达,使猪肾细胞表达人的 H 抗原,同时降低了 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 的表达,从而显著降低了人抗体与猪肾细胞的结合及补体介导的细胞裂解。这一研究表明,糖基转移酶转基因猪将可能成为人类器官移植的供体。

1.1.4.3 钙粘素 N-CD1 单晶三维结构的阐明

1995 年英国《自然》杂志突出报道了神经粘附分子 NCAM 中一类称作钙依赖粘附分子 N-钙粘素(cadherin)。鼠脑中的 N-钙粘素 N-CD1 的单晶的三维结构现已弄清。该糖蛋白的 N-端肽链在细胞内的一段与细胞骨架紧密相连,膜外肽段则与相邻细胞的相应肽链犬牙交错地形成拉锁状结构。

1.1.4.4 糖基化对糖蛋白作用的阐明

1996 年芬兰科学家嘎伯格(Gahmberg)等终于给糖基化对糖蛋白起什么作用给出了满意的回答。答案就是:没有正确折叠的肽链不能从内质网腔外逸并到达细胞外表面。N-糖基化与翻译同步的过程在内质网内腔发生,翻译后的修饰在高尔基体内腔进行。N-糖基化的高甘露糖型原始寡糖的最内部的一个葡萄糖,在内质网内腔中与两种细胞内凝集素钙粘蛋白(calnexin)和钙网蛋

白(calreticulin)结合。它们也被称为分子伴侣(molecular chaperones)。它们把糖蛋白阻留在内质网内,等糖基化完成后再从内质网出来并移到膜外。

1.1.4.5 血型抗原 LewisX 三糖结晶的分子结构的确定

1996年在《糖生物学》(Glycobiology)杂志上发表了与细胞粘附有关的组织-血型抗原 LewisX 三糖结晶的分子结构,这是国际首例。这项研究查明两个 Le^x - Le^x 之间存在氢键,指出两种糖介导细胞-细胞之间的相互作用,即糖与糖之间的相互作用。这进一步确证了箱守仙一郎早年发现的糖-糖相互作用的现象。

1.1.4.6 岩藻糖基化肽的成功合成

1996年8月美国化学会召开了“糖生物化学会议”。王启辉报道了用酶法将 Sialyl LewisX 接到 RNase 的 Asn-34 上。他的小组已合成了岩藻糖基化的肽,活力为 SLe^x 的 5 倍~10 倍。也报道了对 P-选择素抑制活力高 100 倍的模拟物。在这次会议上,约翰霍普金斯大学的李远川报道了在昆虫中表达鼠 IgG,当有 Bip 分子伴侣存在下可大大增加表达量。李远川与日本的高桥礼子合作,发现 IgG 的糖型在细胞内为两条高甘露糖糖链,而分泌在细胞外的则为正常的复合型糖链。

1.1.4.7 寡糖配体和糖结构数据库的时代已经来临

在《结构生物学当代见解》杂志 1996 年第 5 期中,主编《糖和糖缀合物》一书的费兹等特别在主标题之下加了一个副标题:寡糖配体和糖结构数据库的时代已经来临。从 1990 年开始的糖生物学革命算是 5 年,从哈特 1993 年的大会发言算是 3 年,便历经了两个时代,发展之快令人吃惊。而这两个时代有本质不同,前者是以选择素、细胞粘附分子(CAM)为主角,它们本身都是糖蛋白,

但担负主要识别功能的是蛋白质而不是它们分子上的糖链。每个新发现足以使蛋白质学家引以为自豪。可是,1996年提出的“寡糖配体”时代,则是寡糖登上舞台扮演主角了。

1.1.4.8 肝素抗凝血五糖模拟物的合成

1996年7月在米兰召开的第18届糖讨论会上,博克(C. von Boeck)等报告了肝素抗凝血五糖模拟物的合成,即把天然五糖中的N-和O-硫酸化的葡萄糖胺改变为O-硫酸和O-甲基化的葡萄糖。其活力是天然物的2倍,获得了威斯特尔(R. L. Whistler,糖化学先驱)奖。1997年9月在苏黎世召开了第16届国际糖缀合物讨论会,哈特获大会组织奖并报告了他自己的新发现,即在胞浆内以及核内独特的O-糖基化,仅由一个单糖N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)与肽链形成O-连接,广泛存在于多种蛋白质上,如核孔蛋白、RNA聚合酶、转录因子、染色体蛋白等,并动态地与磷酸化相交替,暗示它具有蛋白质磷酸化的重要功能,是大有前途的研究领域。本次大会上出现了“免疫糖生物学”、“神经糖生物学”、“植物糖生物学”等新学科前沿领域。

1.1.4.9 根据结构序列提出的糖苷酶分类法

在《结构生物学当代见解》杂志1997年第7期中发表了基于结构序列提出的糖苷酶分类法。传统的分类方法是以酶作用的底物或产物来命名的,如水解 β -D-半乳糖苷键的酶称为 β -D-半乳糖苷酶,水解 β -D-葡萄糖苷键的酶称为 β -D-葡萄糖苷酶,但这两种糖只是在第4位的碳原子构型不同,所以常常是同一种酶可以催化多种底物的水解,而许多在结构上不相关的酶却可以催化相似的底物。法国人昂里萨特(Henrissat)提出的新分类方法已被接受。按这种方法,到1997年已经报道了60个家族(family),在家族之上又设立了一个称为部族(clan)的等级,现已定出5个部族。

1.1.4.10 我国的糖生物学研究开始受到国际同行的注意

1999年欧洲第10次糖讨论会(EUROCARB)在爱尔兰哥威尔召开。会议主持人赛维治(Angola Savage)博士邀请我国金城博士参加了会议,并做了特邀报告,报告的题目是:唾液酸转移酶和岩藻糖转移酶的基因克隆和表达。报告受到会议好评,我国的糖生物学研究开始引起国际上的注意。

1.1.4.11 糖生物工程已经提上议事日程

1998年5月于德国召开的“98国际糖生物工程讨论会”将糖生物工程学写成“glycobiotechnology”,说明糖生物工程已经提到议事日程上。会议分成3个分支:

1. 糖生物学,内容包括糖蛋白和糖脂合成的分子生物学,糖基转移酶的分子生物学,细胞内的通路和交叉受体,发育、分化和基因治疗,免疫学和神经生物学,寄主与病原体相互作用,糖基化与疾病等。

2. 糖化学,内容包括化学合成,组合合成,酶法合成,分子相互作用和结构分析,数据库和网络等。

3. 糖生物工程,内容包括发展糖医药的重组工具,表达系统,宿主和载体,宿主细胞的糖基化工程,糖蛋白生产系统,生物工程工序,药理学和诊断等。

1.1.4.12 世界各国开始重视糖生物学

1997年9月在波兰华沙召开了关于糖鞘脂与鞘脂的结构、代谢和功能的国际讨论会,1999年1月在印度邦加箩尔(Bangalore)召开了第5届国际真核细胞表面生物大分子生物功能讨论会。说明其他国家开始重视糖生物学。

1.1.4.13 定期举行的最高水平的国际学术大会

在国际上有两个最高层次的有关糖的大会,一个是国际糖讨论会(International Carbohydrate Symposium, ICS),主要参加者为糖化学家,另一个是国际糖缀合物讨论会(International Glycoconjugate Symposium, Glyco),主要参加者是糖生物学家。都是两年举行一次,前者在双数年,后者在单数年。1998年8月在美国圣迭戈召开19届国际糖讨论会。1999年8月在东京召开的第15次国际糖缀合物讨论会上,费尔古逊(Michael A. J. Ferguson)获得IGO奖,他最先在病原动物中发现糖基磷脂酰肌醇锚(GPI)结合蛋白(glycosylphosphatidylinositol anchor)。

1.1.4.14 我国举办的第一次糖生物学与糖生物工程学术会议

1998年8月,我国在著名的香山科学会议中第一次以“糖生物学与糖生物工程的前景”为主题举行了学术讨论会,到会有专家数十人,发表论文20余篇。这次会议标志着我国糖生物学和糖生物工程研究进入了一个新阶段。1999年9月初,又召开了以“糖缀合物与人类健康”为题的香山国际学术讨论会,会议由惠永正、张树政、埃尔宾(Alan D. Elbein)和小川智也(Tomoya Ogawa)主持,到会的有糖生物学和糖化学两个领域的专家学者46名。其中有22位国际著名专家,发表报告34篇,我国的糖生物学正以自己的创新研究成果博得全世界同行们的注意。

1.1.4.15 我国能否申办未来的国际糖缀合物讨论会

2000年8月在德国汉堡召开第20届国际糖学术讨论会,2001年在荷兰海牙召开第16届国际糖缀合物讨论会。我国也可能像申办2008年奥运会一样,申办2007年第19届国际糖缀合物讨论会。

张树政

2 糖链的结构和功能

2.1 “乐谱”和“词典”

——糖类作为信息分子的结构基础

现在大家都知道,脱氧核糖核酸(DNA)中蕴藏着大量的遗传信息。由DNA中含有的4种碱基构成了遗传密码表,经翻译后成为20种不同的氨基酸,再由20氨基酸构成了上万种蛋白质,进而产生了形形色色的物种,在我们面前展示了绚丽多姿的生命世界。

在生物体内,除了核酸和蛋白质外,糖类是又一类信息分子。在过去的二十年中,人们越来越清楚地认识到糖类在生命科学中的重要性。和DNA不同,糖类的作用不是储存信息,而是通讯识别。例如,输血前要验血型,输错了血,会引起休克,甚至死亡;自然界中存在无数种细菌和病毒,有的大肠杆菌只感染人,而另一些大肠杆菌则专一地感染人以外的某些动物;流感病毒中有的引起鸡等家禽的瘟疫,而诱导是对人的。这是为什么?这些医学上的病理现象都和糖类参与的通讯识别有关。

糖类是什么?它们为何也可以成为生物体不能缺失的信息分子?这就要从糖类的结构谈起。

2.1.1 糖类是怎样一类有机分子?

在有机化学中,把带有羟基(-OH)的化合物称为醇类,带有羰基(C=O)的化合物则被称为醛类或酮类。而糖类是同时带有羰基和多个羟基,而不含有苯环的化合物,含有醛基和酮基的糖分别

被称为醛糖和酮糖。最早发现的这类化合物,它们的分子式可以用 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 表示,似乎它们是由碳和水构成,所以又称碳水化合物。这个译名稍长了些,因此,过去有一段时间这类化合物被译为醣。最近,又被统一命名为糖,但不是我们日常食用的糖和糖果。就目前所知,有些具有糖类结构的化合物,它们的甜味相差很大,有的还是苦的。顺便提一下,并不是所有有甜味的物质都是糖类。

最简单的糖类是含有醛基和酮基的三碳糖,分别称为甘油醛、二羟基丙酮。它们的分子式都是 $(\text{CH}_2\text{O})_3$,即通式中的 $n=3$,通常也称它们为三碳糖,或者丙糖。但是结构却不同。由于在甘油醛的3个碳原子中有1个碳原子上接有4个各不相同的基团,在立体化学中认为这个碳原子具有不对称性。在这个碳原子上连接的4个不同基团可以呈现2种排列方式,两者的排列方式犹如实物与其在镜子中的映像。它们分别被命名为*D*-型和*L*-型。这些分子式相同、立体结构不同的化合物被称为异构体。如果通式中的 $n=4,5,6,7,\dots,10$,则这些糖分别被称为四碳糖、五碳糖……十碳糖,或称为丁糖、戊糖……癸糖。这些糖还有醛糖和酮糖之分。醛糖中不对称碳原子的数目为 $n-2$ 。随着不对称碳原子数目的增加,异构体的数目明显增多。仅以醛糖为例,它们异构体的数目为 2^{n-2} 。在自然界中最广泛存在的是己醛糖(六碳糖)。它们都有4个不对称碳原子,因此,己醛糖有16种不同的异构体,*D*-葡萄糖只是其中最为普遍、最为人们熟悉的一种。在己醛糖中,常见的还有*D*-半乳糖、*D*-甘露糖等。属于己酮糖的有*D*-果糖。核酸中的核糖是戊醛糖。

随着研究的深入,发现一些化合物的结构和糖类很相似,也具有多个羟基和羰基,但是它们还具有氮、硫等其他原子,或者分子中C、H、O这3种元素的比例和 $(\text{CH}_2\text{O})_n$ 通式不符合。可是它们的很多化学特性和已知的糖类相似,因此,原来的碳水化合物的概念就有所扩大。最常见的含有氮原子的糖类是*N*-乙酰葡萄糖胺,

而且其中的氨基可以和乙酸发生反应,变成 N-乙酰葡萄糖胺。在一些藻类中发现的糖类常含有硫酸化的糖类,或是糖醛酸(羟基被氧化为羧基的糖类)。

有机化合物中的羰基(醛基或酮基)都可以和羟基反应,形成半缩醛。在糖类同一分子中的羰基和羟基也能形成半缩醛,结果产生环状的结构。在己醛糖中多个不同的羟基原则上都有可能参与半缩醛的形成,生成大小不同的环。根据张力学说,由 6 个原子组成的环最为稳定,因此,在自然界中一些己醛糖在绝大多数情况下,都是形成六元环。而且这些环并不是在同一平面中,通常是呈椅子样的立体结构,如图 2.1 所示。在椅式的结构中,较大的羟基平伏地向外伸展,则更有利于分子的稳定。而 D-葡萄糖中 5 个羟基都是处于平伏的状态,因此,它的结构比其他的己醛糖更稳定,这也是在自然界中,为什么 D-葡萄糖分布最为广泛的原因。在单糖形成环状结构的同时,原先羰基中的碳原子(C-1)形成了另一个羟基(通常也称为异头体羟基),同时 C-1 也变成了不对称中心。异头体羟基可以有两种不同的取向,即又增加了 2 个异构体。

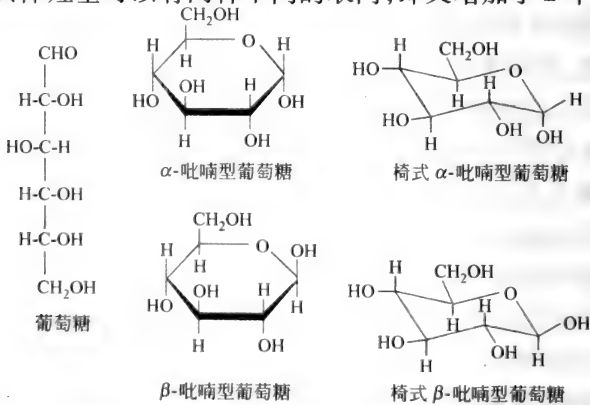


图 2.1 葡萄糖的环状结构和椅式结构

在六元环中,具有平伏取向的羟基称为 β 异构体;带有垂直取向的羟基则是 α 异构体。尽管 β 和 α 两种异构体的差异似乎不大,但是这一差别可以使得糖类的结构变得非常复杂。此外,一些糖类分子还可以形成 5 个原子组成的环状结构。核酸中的核糖,还有果糖等,都倾向于形成五元环。葡萄糖等己醛糖也可以形成五元环。

在成环的糖类中,异头体羟基比其他一些羟基更为活泼。这些羟基,可以和其他多种不同的化合物(R)发生反应,如反应式 1 所示,形成的产物,一般称为糖苷。以同样的方式,由 n 个糖基组成的糖,可以衍生得到 $n+1$ 个糖基组成的糖。最原始的 $n=1$ 的糖类被称为单糖, $n=2,3,4\cdots$ 则分别被称为二糖、三糖、四糖…… $1 < n < 20$ 的糖类被称为寡糖,或低聚糖; $n > 20$ 的糖类通常称为多糖,或高聚糖。最常见的二糖有蔗糖(葡萄糖和果糖组成)、乳糖(葡萄糖和半乳糖构成)。纤维素是由 β -葡萄糖构成的多糖。

2.1.2 从单糖到信息分子犹如用“音符”写成“乐谱”

我们对最基本的糖类——单糖有所了解后,就进一步看看,它们是如何构成种类繁多的信息分子。

在己醛糖成环后,C1 上的羟基有 α 和 β 2 种异构体,以它们为单体构成的化合物在性质上有很大的差异。直链淀粉和纤维素的结构十分相似,都是葡萄糖通过 1 \rightarrow 4 而成的多糖,但是两种异构体的许多物理和化学性质却明显不同,原因就在于,纤维素中的葡萄糖是 β 异构体,而淀粉中的葡萄糖是 α 异构体。除了最活泼的异头体羟基外,其他 4 个羟基也有不同程度的反应能力。例如纤维素中的许多 β 葡萄糖,就是通过异头体(C-1)上羟基和另一个葡萄糖的 C-4 上的羟基反应,而连成很长的大分子。习惯上用

1→4 这样的符号来表示多糖中 2 个单糖中的 2 个羟基的连接方式。在植物中另外一些由葡萄糖构成的多糖则是通过 C-1 和 C-3 上的羟基连接而成,是 1→3 连接方式。

由于同一个环上的这些都可以发生反应,因此,一个糖环可以和多个其他的羟基反应,这样,就造成了多糖能呈现分支状的结构。很多植物来源多糖具有分支结构。例如淀粉有直链淀粉和支链淀粉两类。而支链淀粉中所有的葡萄糖也是 α -葡萄糖,可是在 1→4 连接的葡萄糖链中的一些葡萄糖的 C-6 上再接上了较短的 α -(1→4)葡萄糖链,形成了分支结构。

综合上面的介绍,不难看出,寡糖和多糖的结构是非常复杂的。即使是 2 个己醛糖,例如葡萄糖,形成的二糖可以有许多的异构体。首先是单糖可以有 α 和 β 2 种异头体;其次是它们可以通过不同的方式连接,1→2、1→3、1→4、1→6。因此,同样 2 个葡萄糖至少可以形成 11 种不同的异构体,而同样是 2 个氨基酸或核苷酸都只能形成一种化合物。如果是 2 种不同的单糖、3 种或 4 种相同或不同的单糖形成的异构体的数目比同样数目和种类的氨基酸和核苷酸构成化合物的数目要多得多,而且随着形成的化合物中单体数目的增加,两者的差距就越来越大。在表 2.1 中列举了相同单体数目的单糖和氨基酸或核苷酸构成的化合物的异构体数目的比较。如果说一种异构体代表一种信息,则不难看出,单体数目不大的糖类化合物已经可以构成一个巨大的信息库。6 种不

表 2.1 单糖和氨基酸形成异构体数目的比较

单体种类和数目	糖类异构体数目	肽类异构体数目
XX	11	1
XY	36	2
XXX	176	1
XYZ	1056	6

同结构的单糖可形成 10^8 种的异构体。

如果说,核酸和蛋白质可以储存大量的生物信息,是以分子量大为基础,而糖类作为信息分子则是以其结构多样为特征。如果把由 20 种氨基酸到千变万化的蛋白质比拟为由 26 个“字母”的组合成为厚厚的一本“词典”;那么由不到 10 种常见的单糖到种类纷繁的多糖,则或许可比喻由 7 个“音符”到优美动听的“乐谱”。由字母到词典,每个字母是不变的,尽管一些元音字母有时发音不同;但是,音符在构成乐谱时,每个音符却可以有很大的变化。音符可以有高低音的不同,单糖可以有不同的环状结构以及不同的异头体(α 和 β);音符可以有不同的节拍,单糖连接时,可以有不同的连接方式;乐谱中有反复符号,在糖链中有重复结构。

2.1.3 糖缀合物及其不均一性

不同类型的单糖除了可以连接形成寡糖和多糖,还可以接到其他类型的分子上。例如接到肽链上,从而衍生为糖蛋白或糖肽,以及蛋白聚糖;接到脂质分子上成为糖脂;和许多不同类型的有机小分子连接成为糖苷,成为许多中草药中的有效成分。这些既有糖类又有其他组分的化合物被称为糖复合物。除了蛋白聚糖外,其他类型糖复合物中糖类绝大多数是寡糖。在自然界中众多的生物分子中,不论在种类还是总量上,糖复合物都占有重要地位。以蛋白质为例。在人类血清中发现的蛋白质已经有 100 多种,就种类而言,约有 85% 的蛋白质都是糖蛋白。就总量而言,在鸡蛋清中,糖蛋白占有 95% 以上。

在自然界中的糖蛋白中的糖链结构复杂多变,不仅是不同糖蛋白中的糖链结构不尽相同,即使是同一种糖蛋白中的糖链结构也可以有所不同,更为有趣的是,在不少糖蛋白中的糖链经常是不同结构糖链得到混合物。这种现象早年称为糖链结构的不均一性,近年来则称为糖型。糖类结构的不均一性,不仅在糖蛋白中

有,也存在于其他类型的糖复合物中。糖链结构的不均一性给糖链的结构和功能研究带来了许多麻烦。有人甚至认为既然糖链的结构不同,说明了它们并不重要。然而事物的存在都有其合理性。我认为糖蛋白的各种不同的糖型,以及其他糖复合物的糖类不均一性,可以看成是自然界中生物多样性的一个例证,它们是一个丰富信息库或是物质库,有可能成为糖类研究的一个新的生长点。这犹如一些埋藏在民间的已故著名音乐家的遗作,有待我们后人发掘整理。

王克夷

2.2 “人小鬼大”的糖鞘脂

——糖鞘脂与信息传递

2.2.1 糖鞘脂的发现

关于糖鞘脂的发现,要从 1874 年伦敦的一位名叫修迪坎穆 (Johann L. W. Thudichum) 的医生兼学者说起。他在病人的脑中首先发现了脑苷脂 (cerebroside) 及其分解物含有 18 个碳原子链的氨基醇。由于该种氨基醇分子中含有疏水的饱和烃长链和亲水的氨基醇,修迪坎穆把它命名为 *Sphingosine*。*Sphingosine* 一词源自拉丁语的斯芬克斯 (*Sphinx*),即人们所熟知的埃及的狮身人面像,象征着 *Sphingosine* 的亲水和疏水的两性性质。我国译作鞘氨醇。鞘氨醇的氨基以其酰胺键与长链脂肪酸结合成脑酰胺 (cereamide),而鞘氨醇的一级醇与半乳糖或葡萄糖等以糖苷键结合则成为脑苷脂 (cerebroside),总称为糖鞘脂 (glycosphingolipids*, GSLs)。我国把它译作糖鞘脂,是因为它在神经髓鞘上大量存在。但糖鞘脂最多的存在部位是大脑。大脑的功能是迄今已知

的最复杂的功能,即使最先进的电脑,其复杂程度也远不如大脑,而且计算机是人大脑的产物,也要由人去操作。糖鞘脂在大脑的功能中必然占有特殊的地位。对大脑功能的阐明将是 21 世纪面临的重要挑战之一。若未能阐明糖鞘脂功能,大脑功能的阐明将是不完整的,甚至是不可能的。

糖鞘脂的功能,除了它们作为血型物质已经确定外,人们还提出了很多其他功能,但都有待于进一步确证。在已经到来的新世纪,对它的研究应该获得实质性突破。除了神经系统外,糖鞘脂还广泛存在于所有的人体组织细胞中,特别是它主要存在于细胞膜脂双层的外层,这个拓扑学上的特点,为它参与信息传递的过程准备了有利条件。近年来发现糖鞘脂在信息传递中的作用,对它的研究又兴起了一个新的可喜的热潮。

糖鞘脂是一类双亲分子(Amphipathic molecule),也就是说,它的分子结构中既有亲水的糖链,又有亲脂的脑酰胺部分(图 2.2)。它广泛存在于所有真核细胞的细胞膜上,以其脑酰胺部分插入细胞膜脂双层的外层,而任其糖链伸出细胞膜之外。这种分布上的特点,为它感受外界的化学信息提供了拓扑学上的依据。在这方面,它的“大哥哥”糖蛋白也一样,其糖链也是伸出来的,所不同的是糖蛋白相对分子质量较大,而且一般都是跨越脂双层的(图 2.3)。换句话说,糖蛋白在膜上的“结合蛋白”定要牢得多,运动起来远不如分子较小的糖鞘脂那么方便。糖鞘脂“身轻如燕”,具备膜上“快速应变部队”的条件。从这个意义上说糖鞘脂是有能力去执行特殊功能的。所以我们可不要小看了“人小鬼大”的糖鞘脂的作用。

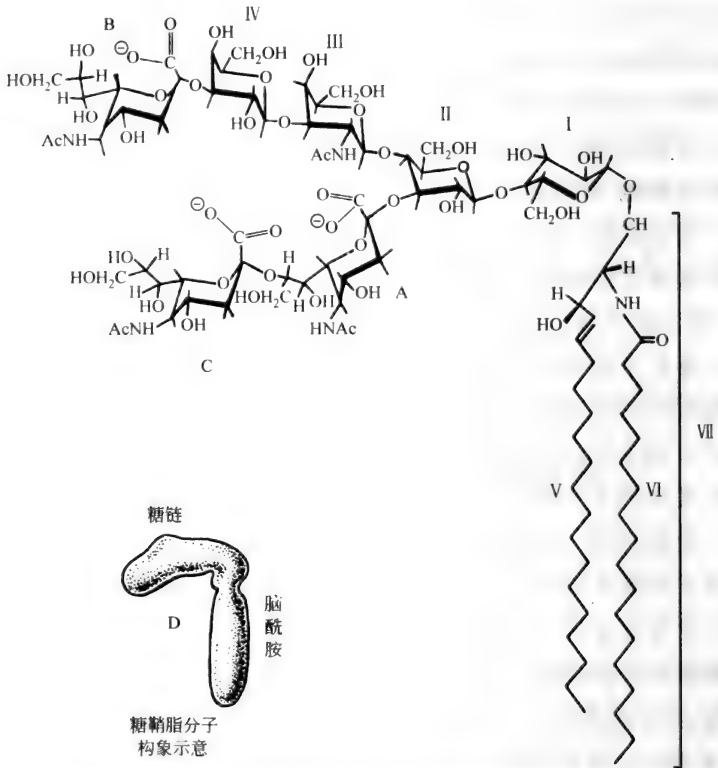


图 2.2 几种常见糖鞘脂的化学结构与构象示意图^[2,3]

神经节苷脂: GM1 = I + II + III + IV + A + VII; GM2 = I + II + III + A + VII; GM3 = I + II + A + VII
 GD1a = I + II + III + IV + A + B + VII; GD1b = I + II + III + IV + A + C + VII;
 GT1b = I + II + III + IV + A + B + C + VII; GQ1b = I + II + III + IV + A + B + C + B 位再联一个 B
 中性糖鞘脂: CMH = (脑酰胺单己糖苷) = I + VII; CDH = (脑酰胺二己糖苷) = I + II + VII;
 CTH = (脑酰胺三己糖苷) = I + II + III + VII; CQH = (脑酰胺四己糖苷) = I + II + III + IV + VII; I = 葡萄糖;
 II, IV = 半乳糖; III = N-乙酰氨基半乳糖;
 A, B, C = 唾液酸; 鞘氨醇 = V; 脂肪酸 = VI; 脑酰胺 = VII = V + VI;
 D = 糖鞘脂分子构象

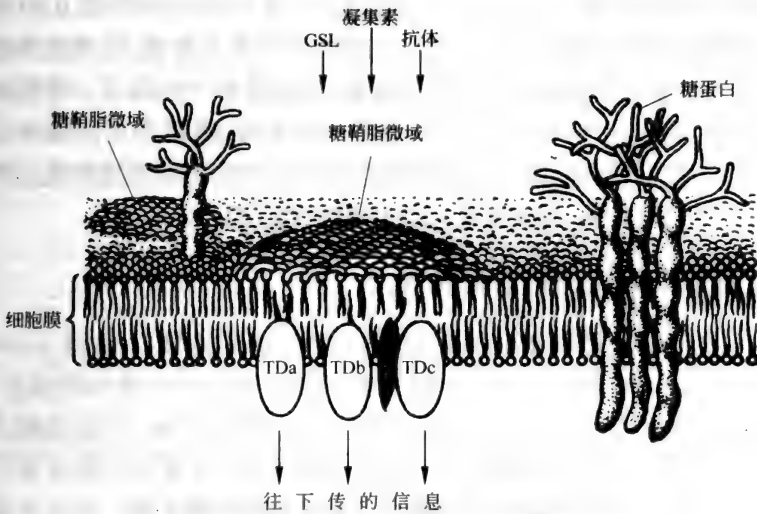


图 2.3 糖鞘脂与糖蛋白在细胞膜上的分布示意图^[3]

糖鞘脂分酸性和碱性两类。酸性糖鞘脂含有酸性基团,酸性基团包括唾液酸和/或硫酸。含唾液酸的叫“神经节苷脂”,含硫酸的叫“硫脂”,二种酸都含有的叫“硫酸神经节苷脂”,不含唾液酸的糖鞘脂叫做“中性糖鞘脂”。图 2.2 中我们列出了几种常见糖鞘脂的结构和组成。图中所列的神经节苷脂和中性糖鞘脂除了 GQ1b 外,其余 GM1、GM2、GM3、GD1a、GD1b、GT1b、CDH、CTH、CQH 的结构都开列了出来。GQ1b 的结构是在 GT1b 的基础上,在 b 位的唾液酸上再连上一个唾液酸。糖鞘脂在细胞膜上的含量不多,一般不超过脂类总量的 3%。它在总体上虽是少数,但在局部它可以簇集,形成高浓度的小片区(图 2.3),完成任务时实行“人海战术”。这个看法在 1990 年就由 Rock 等人^[1]提出了,直到 1997 年才有了直接的实验根据^[4]。因为有人发现在小鼠黑色素瘤 B16 细胞的细胞膜中存在有 GM3 的富含区。在图 2.3 中,

糖鞘脂的构象像一个“7”字,也就是说,其糖链与脑酰胺互为垂直,糖链与细胞膜的表面平行。从热力学的角度来看,这种构象最稳定,而且糖链也能最大限度的暴露,来感受外界的信息。糖鞘脂的含量虽少,少也有少的好处,就是一般来说,微量存在的物质在量上只要有一点变化,就会显得很大,就有资格对别的物质或过程产生较大的影响,也就是说可以对别人实行调控。

2.2.2 细胞的信息传递

我们在这里说明的信息传递(也叫“信号转导”,signal transduction 或 signalling),研究的是外界的化学信息如何被细胞接受、细胞又如何对其作出应答。最早狭义上的信息传递,是指那些水溶性的化学物质在细胞膜上与其受体结合后,信息如何跨过膜而进入胞浆。现在许多人都同意这个狭义定义需要扩展。信息传递过程应包括:1. 受体环节;2. 受体后的膜上环节(有些信息有受体直接进入胞浆,无此环节);3. 胞浆环节;4. 核内环节;5. 传出环节。上述2~5都是属于“受体后”环节。有些信息传递到胞浆后,无须核内基因的参与,应答出现很快,快的可在几秒钟出现;有些传到了胞浆,还要进入核内,要影响基因的表达(即蛋白质的合成),因而需时较长,一般多在数十分钟,或者更长,甚至可达数日。以上信息传递的每一个环节都能发生异常而导致疾病,而这些异常又都是与基因的先天或后天异常相关的。因此,不仅生命科学和医务工作者应对信息传递及其异常有更多的了解,作为21世纪的普通人,如果有一个概括的了解,就更能使自己成为生活的主人,提高生活的质量。

信息传递包括许多途径,每一条途径都有许多成员参与,而且各途径之间又相互联系与沟通,形成一个复杂的网络。从已有的基因库存看来,参与信息传递的基因约占基因总数的12%^[5](表2.2)。表2.2提示,参与信息传递的基因不如控制代谢的多

(17%),但是代谢的过程可以说现在已经基本阐明,即便有新的基因发现,为数也不会太多;相反,与信息传递有关基因的研究还处于方兴未艾的阶段,随着时间的推移,还会有新的发现,它的总数看来至少不会比参与代谢过程的少,甚至还可能会更多。信息传递通路和经典的代谢通路有许多不同点,其比较见表 2.3。

表 2.2 参与主要过程的基因分布百分比^[5]

过 程	%	过 程	%
代谢	17	RNA 及蛋白质合成	22
信息传递	12	细胞分裂	12
防卫	12	未知	17
结构组分	8	共计	100

表 2.3 信息传递通路与经典代谢通路的比较

项 目	经典代谢通路	信息传递通路
组成	酶和底物(多为非蛋白底物)	酶多为蛋白激酶,底物多为蛋白 + 第二信使有些成员是蛋白但不是酶
改变的化学键	各种共价键	共价键(主要为可逆磷酸化) + 非共价键
能量改变	分解代谢-产能 合成代谢-耗能	耗能(蛋白激酶消耗 ATP)
底物量	大	小
产物量	大	快速反应无量的变化 有活性的变化 慢反应有少量蛋白质合成
放大与否	多数无放大	有瀑布效应,可放大
反应持续否	可持续	一般较短暂(瞬间完成)(肿瘤时某些过程可持续)
相互影响否	可被对方调节	代谢通路提供 ATP

2.2.3 信息传递的“总策略”

在由多条通路组成的信息网络中,各条通路都由许多成员组成,这些成员的绝大多数是蛋白质。受体是信息传递的第一个环节。最早发现糖鞘脂对信息传递的影响是它对生长因子受体的影响。为什么糖鞘脂会影响生长因子受体的功能呢?生长因子受体通常与其对应的生长因子结合后,就发生构象上的改变,从而改变其功能(见图 2.4)。蛋白质的空间构象有一定的柔性,生长因子和生长因子受体的结合也诱发后者的变构。变构了的生长因子受体,在它的胞浆面的段落大都可获得酪氨酸蛋白激酶的活性,后者可使受体的胞浆区发生自身磷酸化。也就是说,受体的胞浆区中的一些特定的酪氨酸残基要发生磷酸化,即加上磷酸根,又可以使酪氨酸蛋白激酶发生变构。含有磷酸根的酪氨酸基团是下一个信息传递成员的接头部位。借此可以把生长的信息一步一步地传递

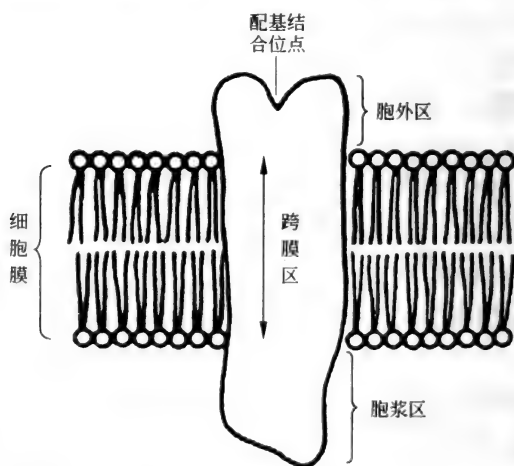


图 2.4 受体的排布

下去。传下去的方式也多半是通过蛋白质的磷酸化,即上一个信息传递的成员在被激活后就获得了蛋白激酶的活性,它使下一个成员发生磷酸化而被激活,然后它又使下一个成员激活。这样一连串的磷酸化,会产生一个把信息放大特别效应。这种放大,我们称之为“瀑布效应”(cascade effect)(又称级联效应)。糖鞘脂的作用就是抑制激活受体的磷酸化反应。

磷酸化是化学修饰最常见的方式,是信息传递主要化学基础之一。发现可逆磷酸化的两位学者 Krebs 与 Fischer 1992 年被授予诺贝尔医学奖,以表彰他们发现的重大生物学贡献。糖鞘脂影响受体功能的第二种方式是它能改变受体与其特异的生长因子(通称“配基”)的亲合力。这也是以受体构象的改变为基础的,改变了构象的受体,其与生长因子的结合所要求的分子构象的互补程度减少,也就是说其亲合力减少了。

2.2.4 糖鞘脂对受体的调节

糖鞘脂作为受体的配基,即第一信使的报道不多。但有一点应该提及,那就是神经节苷脂 GQ1b(图 2.2)。这是一个含有 4 个唾液酸的四糖基的神经节苷脂。有报道说 GQ1b 对某些神经母细胞瘤细胞具有类神经生长因子的作用^[6]。这个信息提示 GQ1b 具有修复损伤神经的作用。事实上,牛脑神经节苷脂的制品(主要含 GM1、GD1a、GD1b、GT1b 四种)就具有很好的神经修复作用。我们所喜爱的女子体操运动员桑兰在治疗她的神经损伤时,医生就使用过大剂量的 GM1。下面我们的讨论主要集中在神经节苷脂的非配基的作用上,也就是它对受体的调节上。

在研究糖鞘脂对受体的作用时,研究者常用外加糖鞘脂的办法观察其作用。这种糖鞘脂叫“外源性”糖鞘脂,它能给我们提供一些重要的信息,但也有其缺陷,就是只要一外加糖鞘脂,其浓度就容易超过生理量,人们怀疑所得到的功能是否能代表生理功能。

因此人们又想办法了解内源性的糖鞘脂的作用。为此目的,目前所使用的一个重要手段,就是把内源性的糖鞘脂封闭(用糖鞘脂的抗体即可)或切断它的合成(用参与合成糖鞘脂的酶的特异抑制剂,或用分子生物学的办法将有关基因剔除),再观察有关功能的变化,以此来了解糖鞘脂的生理功能。下面的讨论如果不特别说明是针对内源性糖鞘脂的,都是用外源性的做的。

2.2.4.1 外源性糖鞘脂及其降解产物或衍生物对受体的作用

用外源性糖鞘脂在离体条件下用培养细胞所做的研究结果表明^[3,7]:1. 抑制血小板衍生生长因子受体(PDGF-R)自身磷酸化的糖鞘脂有 GM1 和 GM3;2. 抑制表皮生长因子受体(EGF-R)自身磷酸化的有 GM3 及去脂酰基-GM3(图 2.2);3. 抑制胰岛素受体(Ins-R)自身磷酸化的有 GD1a、GD1b、GM1、GM3、去脂酰基-GM3(又叫“溶血-GM3”)、2→3 唾液酸副红细胞糖苷脂(2,3-sialylparagloboside; 2,3-SPG;其糖基与图 2.2 上所示的略有不同,但也是 4 个糖基,大致相当于 GM1、2,6-SPG 等);4. 激活表皮生长因子受体自身磷酸化的有 N-去乙酰基 GM3、N,N-二甲基-D-赤藓糖基-二氢鞘氨醇(N,N-dimethyl-D-erythro-sphingene, DMS)、鞘氨醇等。

2.2.4.2 内源性糖鞘脂对受体的作用

Weis FMB 与 Davis RJ 对内源性糖鞘脂的作用也进行了研究^[8]。他们用中国仓鼠卵巢细胞系(chinese hamster ovary, CHO)的一个突变体,这个突变体细胞不含半乳糖-4-差向异构酶(galactose-4-epimerase-less mutant),缺少这个基因的细胞不能合成表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)的受体,也不能合成和 GM3 相应的中性糖鞘脂,即乳糖-脑酰胺(lactosylceramide, Lac-Cer),因而也就不能合成 GM3。但是若在培养介质中加入半乳糖,

细胞又获得了合成乳糖-脑酰胺的能力,因而只要再加上一个唾液酸,就又能合成 GM3。当把 EGF 受体转入这种细胞并使之表达,再使之在不含半乳糖的介质中生长以使无 GM3 的合成,结果表明其生长较快,而且其生长具有 EGF 依赖性;但是当加入半乳糖以诱发 GM3 的合成时,就观察到依赖 EGF 的生长受到抑制。在这个实验中,GM3 抑制了生长因子生长信号的传递。这里,内源性 GM3 与外源性 GM3 所得的结果是一致的。另一个例子是:Swiss 3T3 细胞的生长完全依赖于 PDGF,其生长和其 PDGF 受体的酪氨酸磷酸化都特异地受 GM1 的抑制^[9]。和 GM3 不同的是,PDGF 受体未与 GM1 直接作用,后者没有改变 PDGF 与 PDGF 受体结合的 Kd 值,也未改变细胞表面受体的数目。

还可以用神经节苷脂的抗体去封闭内源性神经节苷脂来观察神经节苷脂的作用。Stephan V 等人用对抗 GD1b 的单克隆抗体 AA4 去封闭大鼠嗜硷性白血病细胞表面上的 GD1b。原来该细胞在受到 IgE 的刺激后,会释放组织胺,但在用抗 GD1b 封闭后该细胞就不再对 IgE 的刺激作出反应,也就是不再分泌组织胺了。这说明抗 GD1b 的抗体抑制了 IgE 受体的作用,也就是说 GD1b 是与受体结合的,是受体激活的必要条件^[10]。

2.2.5 糖鞘脂对受体后环节的影响

2.2.5.1 糖鞘脂对第二信使 cAMP 和蛋白激酶 A 的影响

我们说过,信息传递通路大都是由蛋白质成员组成,但有时也出现一个或数个小分子物质。为区别这些小分子,把它们称之为“第二信使”。常见的第二信使有:环腺苷酸(cAMP)、环鸟苷酸(cGMP)、Ca²⁺、二脂酰甘油(DAG)、肌醇三磷酸(IP₃)、脑酰胺、一氧化氮等。Rodrig N 等人^[11]用各种神经节苷脂观察它们对狗肾脏上皮细胞中 cAMP 水平的影响,结果发现大部分使用的外源

性神经节苷脂都能使胞内 cAMP 的水平大幅度的升高 3 倍~4 倍(表 2.4),而且升高的持续时间可达 70 小时。从表 2.4 可见,作用不明显的是 GQ1b 和中性糖鞘脂 CDH, 略显抑制作用的是岩藻糖化的 GM1。作用最强的是猪肾总神经节苷脂,但牛脑总神经节苷脂则仅使胞内 cAMP 略有升高,几种含唾液酸的非神经节苷脂化合物都有不同程度的升高。看来唾液酸是提高胞内 cAMP 的关键组分,单岩藻糖似乎和唾液酸有相反的作用。cAMP 是其信息传递通路直接下游成员蛋白激酶 A(PKA)的激活物,其水平的升高,蛋白激酶 A 的活性就应升高。Yates AL 等人^[12]用纯化的 PKA,观察 GM1、GD1a、GT1b 等神经节苷脂对其活性的影响,结果表明上述神经节苷脂能抑制 PKA 的活性,也就是说 PKA 对其相关蛋白质的磷酸化减弱。综上所述,神经节苷脂一方面能增加 cAMP 的含量,一方面又能抑制 PKA 的活性,二者貌似矛盾。这说明 PKA 活性的调节是一个比较复杂的问题,有待深入研究。

表 2.4 几种神经节苷脂和相关化合物对
狗肾细胞内 cAMP 含量的影响^[11]

处 理	浓度/ μM	来 源	胞内 cAMP 含量 (实验组/对照组) ($\text{pmol}/\text{mg}\cdot\text{pr}^*$)
对照	25		24.6
GM3	25	猪肾	85.3(3.47)
GM3	25	狗红细胞	99.3(4.04)
GM3	25	人红细胞	102.0(4.10)
GM2	25	牛脑	103.0(4.19)
GM1	25	人脑	114.9(4.67)
GD3	25	猪肾	86.5(3.51)
GD1a	25	人脑	84.8(3.45)
GD1b	25	狗肾	87.6(3.56)

续表

处 理	浓度/ μM	来 源	胞内 cAMP 含量 (实验组/对照组) ($\text{pmol}/\text{mg. pr}^*$)
GQ1b	25	牛脑	25.8(1.05)
总 Gls**	25	猪肾	1775.0(77.2)
总 Gls	25	牛脑	50.0(2.04)
CDH*	25	猪肾	26.7(1.08)
唾液酸	25		70.8(2.88)
唾液酰基乳糖	25		73.6(2.99)
多聚唾液酸	25		98.7(4.00)
岩藻糖化 GM1	25	猪肾	14.3(0.58)

* pmol = 皮摩尔; 皮 = $\text{pico} = 10^{-12}$; mg. pr. = 毫克蛋白质; ** Gls = 神经节苷脂; # (见图 2.2)

2.2.5.2 对一氧化氮的影响

一氧化氮(NO)是新近发现的一个第二信使,它的合成前体是精氨酸,在一氧化氮合酶的作用下合成之。我们的工作表明,神经节苷脂 GM3 能诱导 NO 的生成^[13],而且它极可能是通过诱导一氧化氮合酶的生成来介导 NO 的生成。现已知 NO 是可溶性鸟苷酸环化酶的激动物,后者催化 cGMP 的生成,并继而活化蛋白激酶 G(PKG)。NO 是体内的巨噬细胞杀伤外来的病原体时的效应分子,也就是说 NO 是我们体内的“防卫战士”巨噬细胞手上的一把“利箭”,以之可消灭“入侵的敌人”。NO 是比神经节苷脂更小的分子,其作用在近年受到学界极大地重视。1998 年的诺贝尔生理学医学奖就是授予发现 NO 有信息分子作用的 3 位美国学者——Robert Furchgott, Louis Ignarro 及 Ferid Murad。有趣的是,他们 3 位都是药理学家。

2.2.5.3 对蛋白激酶 C 活性的影响

蛋白激酶 C 是信息传递通路中的一个重要的成员,是一个重要的生长促进的组分。神经节苷脂对蛋白激酶的影响,以蛋白激酶 C(PKC)研究的最多。绝大部分的报告都表明,糖鞘脂及其降解产物对蛋白激酶 C 都显示抑制作用^[7]。我们的研究表明神经节苷脂 GM3 除能诱导人白血病 J6-2 细胞发生分化外,还能影响该细胞的磷脂代谢^[14,15],而磷脂代谢的一些降解产物则是一些第二信使(见前),众所周知,其中的二脂酰甘油(DAG)是蛋白激酶 C 的激活物。现将糖鞘脂及磷脂对蛋白激酶 C 活性的调节列于图 2.5^[16]。有趣的是,糖鞘脂及其降解产物都对 PKC 有抑制作用,而磷脂及其降解产物则有激活作用。这提示糖鞘脂与磷脂二者的平衡对于 PKC 活性的调节可能是有意义的。这种调节作用可用图 2.5 来表示。

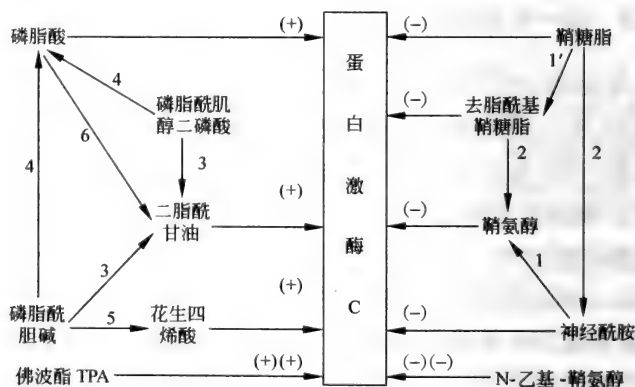


图 2.5 糖鞘脂及磷脂对蛋白激酶 C 的调节

1: 脑酰胺酶; 1': 一种脂酰基水解酶; 2: 一种糖苷酶; 3: 磷脂酶 C;
4: 磷脂酶 D; 5: 磷脂酶 A2; 6: 磷酸酶 (+) 激活; (-) 抑制

2.2.5.4 糖鞘脂对胞内钙离子的影响

钙离子是一个重要的第二信使,它具有调节肌肉收缩、神经传导、细胞增殖、受精等生物学功能。在分子水平上,它激活多种酶,尤其是它对钙调蛋白的激活,然后由钙调蛋白/ Ca^{2+} 二元复合物去激活钙调蛋白/ Ca^{2+} -依赖的蛋白激酶,使生长的信息得以传递下去。已发现神经节苷脂对 Ca^{2+} 在细胞内外的流动是有影响的。例如,已知神经节苷脂可以使神经母细胞瘤 Neuro-2a 细胞的钙内流增加,同时促进细胞的突触生长,如果把培养液中的 Ca^{2+} 除去,上述效应都消失。在不同的培养液中,上述细胞钙的外流也受神经节苷脂促进。这种神经节苷脂对 Ca^{2+} 流动的双向调控说明 Ca^{2+} 在细胞质膜上的循环可能是构成“钙振荡”的一个基础。在大鼠脑缺血所造成的脑细胞内 Ca^{2+} 的升高,可以被 GM1 明显地降低。

人们早已知道霍乱毒素可以特异地结合神经节苷脂 GM1,所以我们可以用霍乱毒素去封闭 GM1,来观察内源性 GM1 的作用。当用霍乱毒素处理胸腺细胞时,能观察到胞内钙的含量明显升高,而且伴有有丝分裂,说明内源性神经节苷脂 GM1 或抑制钙的外流,或促进钙的内流。

我们的工作表明存在于兔横纹肌细胞肌质网上的神经节苷脂 GM3,可以激活该肌质网钙泵的活性^[17],而其上的 GM1 则相反,能抑制该泵的活性^[18]。众所周知,当肌细胞内的自由 Ca^{2+} 浓度升高后,肌肉则收缩,此时肌浆网上的钙泵即开始活动,把细胞浆内的 Ca^{2+} 泵入肌浆网内,使胞浆内的 Ca^{2+} 降低,肌肉恢复松弛。GM3 与 GM1 对肌质网钙泵的相反调节,提示它们可能是活体内的一种调节方式。

Ledeer RW 的研究组报告^[24],用神经氨酸酶处理神经母细胞瘤 Neuro-2a 细胞,可以诱导该细胞的终末分化,此时有大量的

Ca^{2+} 内流,尤其突出的是,其核膜上的 GM1 升高 5 倍。神经氨酸酶能水解细胞膜糖复合物上的唾液酸,当然也包括 GM1 上的唾液酸,提示细胞膜上的 GM1 可能抑制 Ca^{2+} 的内流。在 Neuro-2a 细胞分化的过程中,核膜上的 GM1 的作用尚有待研究。

2.2.5.5 酸性糖鞘脂及硫脂抑制 DNA 聚合酶

由于 GM3 能诱导一些细胞生长抑制、形态变化和分化,Taki T 等观察了 GM3、脑酰胺、鞘氨醇等对 DNA 聚合酶活性的影响,他们发现只有 GM3、SPG(见前)与脑硫脂对该酶的活性有抑制作用,而其他中性糖鞘脂、脑酰胺、及鞘氨醇都没有抑制作用^[19]。GM3 及 SPG 分子中 N-乙酰神经氨酸基团上的 N-乙酰基是抑制作用所必需的,若把它换为 N-羟乙酰基则抑制作用消失。鞘氨醇对引物酶有强烈的抑制作用,而二氢鞘氨醇、脑酰胺糖鞘脂及鞘磷脂则无作用。鞘氨醇对 DNA 复制的抑制作用可能和外源性鞘氨醇诱发的细胞凋亡有关。

2.2.5.6 细胞凋亡与神经节苷脂及其降解产物

“细胞凋亡”(Apoptosis,简称“凋亡”)是细胞死亡的一种特殊形式,在大多数情况下,它和“程序性(细胞)死亡”(programmed cell death)是同义语。细胞凋亡是在特定基因参与下细胞主动的死亡,它不同于细胞被动的坏死。有些肿瘤可以自发消退,就是机体以某种形式使肿瘤细胞发生了凋亡。现在学界研究细胞凋亡的机制已形成热点,反映了人们迫切希望能够人工诱发细胞凋亡去作为治疗肿瘤的一种手段。

细胞凋亡是死亡信号和特定细胞膜受体结合后所引发的信息传递过程。“幸运”的是,“人小鬼大”的神经节苷脂(酸性糖鞘脂及其降解产物)在细胞凋亡中又找到了它们的位置。

在诱发细胞凋亡的受体中,研究的最多的是细胞表面上的

Fas(又叫 CD95 或 Apo-1),它是一个跨膜蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的一个成员,它存在于多种细胞上。Fas 受体的配基(FasL)和 Fas 的抗体都可以激活受体。Fas 受体在它的细胞膜的胞浆面有一个大约 80 个氨基酸长的段落,又叫“死亡微区”(death domain),当 Fas 受体被激活后,此死亡微区就成为一个称作 FADD/MORT1 的接头蛋白的结合位点,然后这个接头蛋白的另一个叫做“死亡效应微区”(death effector domain),又把死亡信号传给卡死蛋白酶-8(caspase-8),后者始动卡死蛋白酶的瀑布,最后导致胞浆和核内一些化合物如蛋白质、核酸、生物膜等的水解,最终导致凋亡^[20,21]。

在淋巴样肿瘤细胞(HuT78)和髓样肿瘤细胞(U937)中,当 Fas 受体因其抗体的结合而聚合成寡聚体时,可以观察到神经节苷脂 GD3 的大量短暂积累,也就是说这是 GD3 合酶被激活的结果。脑酰胺(神经节苷脂的疏水部分,已知是一个第二信使)是细胞凋亡的强诱导剂,它同时也诱导 GD3 的合成。GD3 合酶的短暂过表达也直接诱发凋亡。加上 GD3 合成的抑制剂,或用反意脱氧寡核苷酸封闭 GD3 合酶基因,都将抑制凋亡的发生^[22]。这一切都表明,GD3 至少在造血细胞中参与凋亡信号的传递。脑酰胺的代谢产物(也是糖鞘脂的代谢产物)鞘氨醇和鞘氨醇-1-磷酸则相反,诱发细胞的增殖。它们在 PDGF 和血清因子所诱发的细胞增殖中都是第二信使。脑酰胺能诱发细胞核小体中 DNA 的断裂和形态学上的凋亡典型变化,但鞘氨醇-1-磷酸则抑制凋亡的发生^[23]。同样,激活鞘氨醇激酶(生成鞘氨醇-1-磷酸的酶)也能抑制由脑酰胺诱发的细胞凋亡。鞘氨醇-1-磷酸不仅激活胞外信号调节的激酶(ERK)通路,它还对抗脑酰胺对“应急激活的蛋白激酶”(SAPK/JNK)的激活。所以脑酰胺和鞘氨醇-1-磷酸的比值和

二者对有丝分裂原激活的蛋白激酶家族不同成员调控作用的平衡将决定细胞的命运。

2.2.6 小结与展望

神经节苷脂从多个环节影响信息传递的过程。由于神经节苷脂主要存在于细胞的质膜(也就是细胞的最外层的膜)上,目前的研究以质膜环节的居多,胞浆环节的次之,核内环节的较少。但是胞内亚细胞结构上也存在糖鞘脂,例如我们讨论过的肌细胞的肌质网,和神经母细胞瘤细胞的核膜都是突出的例子。在神经母细胞瘤细胞发生分化时,其神经节苷脂 GM1 增加 5 倍这一事实,表明 GM1 是积极参与分化的过程的。今后的研究有待于以外源性神经节苷脂实验所得的结果为线索,配合内源性的观察,来确定其功能。尤其是利用分子生物学手段,将有关神经节苷脂合成酶的基因转染给选定的细胞,形成内源性神经节苷脂的细胞模型,这将给神经节苷脂功能的研究提供有力的信息。

上面提到的几个发现具有特殊重要的意义,这些发现是:鞘脂(包括鞘磷脂与神经节苷脂)的降解产物脑酰胺和 GD3 合酶可诱导细胞凋亡,而鞘氨醇-1-磷酸又抑制凋亡;质膜主要组分的磷脂可产生多种第二信使;糖鞘脂在质膜上的簇集成片区,以及受体的聚体化。这些发现的提示,细胞间的信息传递很可能不是单个分子之间的作用,而是质膜上的簇集的片区的相互作用。在这个片区中,有磷脂、糖鞘脂、鞘磷脂、受体、配基等。若沿着这条思路进行工作,可能会把鞘脂功能的研究,当然包括信息传递的研究,真正带入一个崭新的世纪。

崔肇春

2.3 生殖过程中的中介

——糖链

20世纪60年代初,生物学家曾对生命发生的瞬间做过生动的描述:“我们每个人的生命,在一个不知不觉、没有感到荣幸的时刻,在一个纤小的游动着的精子闯入一个成熟的卵子的时候就开始了。”卵子受精,尤其在受精后早期所发生的一系列迅速而复杂的变化,数十年来一直是生命科学中最吸引人、最神秘的部分。

自然受精往往在卵子进入输卵管后几小时内发生。数以亿计的精子从阴道经子宫进入输卵管,在输卵管中部与卵子迎面相遇。卵子在大群精子冲击下,被其中的一个精子闯入,即受精(图2.6A)。卵受精后,就把其他的精子拒之卵外,最后这些精子都分散死去。这时,在受精卵的内部开始了一系列不寻常的事件。首先,精子脱去尾部,其头部中来自父体的23个染色体,与卵子核内来自母体的23个染色体合并,形成了单细胞的胚胎,大约过了36小时,新细胞分裂成两个。此后分裂加速,由2个分裂为4个,4个分裂为8个……受精后一周它进入子宫,这时的受精卵已经发育成为有64个到128个细胞,形成了一个空心的胚囊,称为胚泡(图2.6B-F)。随后胚泡在子宫腔内定位,粘附于子宫内膜上皮细胞的表面,再逐渐种植到子宫内膜中,即着床。此后,胚泡在子宫中发育成胎儿。

近年越来越多的证据表明,细胞表面的糖链(我们所说的糖,并不是日常所吃的糖,而指的是与蛋白质或脂类分子连接的、由多个糖分子连成的短糖链,即寡糖)在细胞和细胞、细胞和周围的物质之间的相互识别和粘着中起中介作用。下面我们通过受精和着床来看看寡糖是如何体现它们的这种功能的。

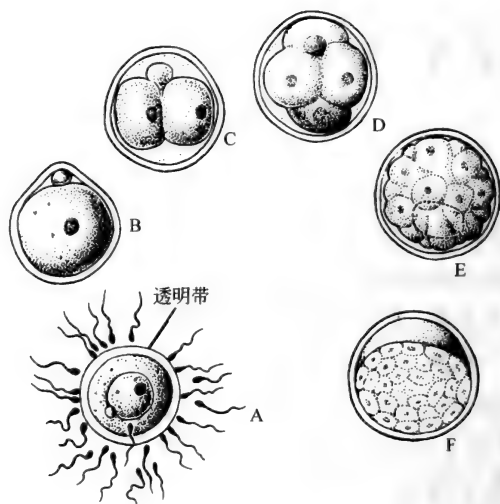


图 2.6 卵子受精和受精卵发育 I

- A: 卵子受精(只有一个精子穿过透明带进入卵子); B: 受精卵;
C: 二细胞胚胎; D: 四细胞胚胎; E、F: 胚泡(有中空的胚囊)

2.3.1 糖链是精-卵结合的“牵线人”

2.3.1.1 卵子受精是一个新生命的开始

卵子是动物体内最大的细胞。成熟的卵子有卵丘细胞包绕,卵细胞膜外还有一层胶冻状的“卵壳”,在显微镜下这层卵壳是透明的,人们形象化地叫它为透明带(图 2.6A)。当卵在卵巢中发育成熟后,就突破卵巢壁落入输卵管的伞状的入口“输卵管微”中,通过输卵管表面绒毛的摆动和管壁肌肉的蠕动,把卵向子宫方向推进。在输卵管的中段,卵和迎面游动而来的精子群相遇(图 2.7A)。精子进入雌性生殖道以后,经过修饰获得能量,沿一条弯弯曲曲的小径游动,最后被卵子吸引,穿过卵丘细胞到达透明带表面,通常其中只有一个强壮的、幸运的捷足先登者,首先与透明带

粘着,开始了精子与卵子结合的复杂过程。此过程包括精子与透明带结合、顶体反应、穿入透明带,再与卵细胞膜融合等多步反应(图 2.8)。精子与卵细胞的膜结合后卵被激活,精子进入卵细胞,形成受精卵。一个新的生命就这样开始了。

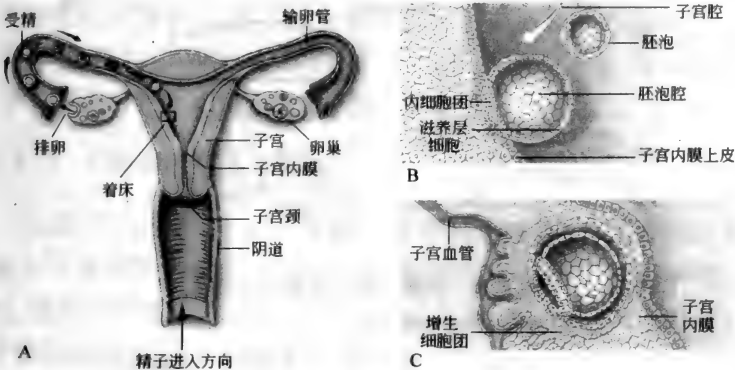


图 2.7 卵子受精和受精卵发育 II

A: 卵子受精和受精卵发育过程示意图;

B: 胚泡附着于子宫内膜; C: 胚泡植入子宫内膜

2.3.1.2 透明带糖蛋白 ZP3 决定了卵子与精子的结合

人们都知道只有同种或一定种属相近的动物的精子与卵子才能结合,例如马生马、驴生驴,或马和驴可以生出骡子,但猫和狗之间却不能繁殖。也就是说精、卵结合是有种属特异性的。那么是什么成分决定了精子和卵子相识,然后进入卵子而使之受精呢?科学家们经过一系列的实验,正在揭示这个生命最早期的谜。不论海胆、海鞘,还是两栖类,或小鼠以及人类,都是通过其卵子透明带糖蛋白中的寡糖和精子表面蛋白质的相互作用使精子与卵子识别、粘着的,这是决定受精种族特异性的分子基础。人们还通过基因突变使小鼠产生没有透明带的卵,这种卵要么不能受精,要么

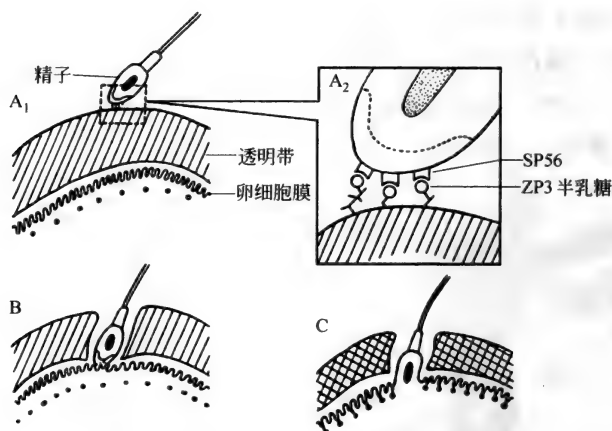


图 2.8 受精过程不同阶段示意图

A₁: 精子与卵透明带接触

A₂: 局部放大显示精子 SP56 与卵 ZP3 的半乳糖结合

B: 精子穿过透明带(精子顶体膜与卵子膜接触)

C: 精子膜与卵子膜融合

就是受了精,受精卵也很快死亡。这个实验向人们充分说明了透明带的重要性。它不仅是决定受精种属特异性的物质,也是卵子正常受精和受精卵正常发育所必需的成分。人们进一步对透明带的成分进行分析,结果发现它主要是由少数几种糖蛋白组成的,如小鼠的透明带中含有三种糖蛋白成分,分别叫做 ZP1、ZP2 和 ZP3。应用对这三种糖蛋白特异反应的不同抗体试验发现,只有糖蛋白 ZP3 才能与精子结合,并可诱发精子顶体反应。当一个精子进入卵子后,ZP3 立即发生变化,使透明带固缩,迟到的精子就不能再和它反应,而被拒之卵外,保证了卵子受精的正常进行。在体外的精子和卵子中加入纯化的 ZP3 它也会与精子反应,而阻止了精子与卵子的结合。后来证明在人卵及猪卵的透明带中,也是 ZP3 成分对精子和卵子的结合起主要作用。因而,人们把 ZP3 叫

做卵子与精子结合的受体。意思是 ZP3 是卵子接受精子并最先和它结合的分子。人们又用带有同位素标记的 ZP3 糖蛋白做探针,使它和精子表面物质结合,再根据同位素的示踪找到了精子和 ZP3 结合的成分,是精子顶体表面一种的蛋白质 SP56。其后,应用荧光标记的 SP56 蛋白直接观察到这种蛋白质和透明带结合,就把 SP56 蛋白叫做 ZP3 结合蛋白^[1]。也就是说精子的 SP56 蛋白和 ZP3 糖蛋白之间的结合是精-卵结合的桥梁。

2.3.1.3 ZP3 糖蛋白中的糖链对精子结合起关键作用

在 80 年代中期,哈佛医学院生化系的瓦兹曼(Wassarman)教授等人^[2]对 ZP3 糖蛋白分子的结构和成分进行了多方面的深入研究,证明 ZP3 糖蛋白分子中大约一半是糖链。我们知道糖蛋白分子由肽链和糖链两部分组成,那么人们不禁要问究竟是分子中的哪一部分起作用呢?实验证明,如果把 ZP3 糖蛋白中的肽链切断,但保留完整的糖链,所得到的小分子糖肽仍然和 ZP3 糖蛋白一样能和精子结合。如果通过化学方法除去分子中的糖链,ZP3 就失去了与精子结合的能力。这些结果第一次让人们认识到是 ZP3 分子中的糖链部分起着与精子结合的受体作用。我们知道一个糖蛋白分子中可能含有多个不同的糖链,而且,每条糖链又可由多个糖基连成。如果把每个糖基比喻成一个小珠,一条寡糖链就好像一条珠链,只不过这条链有时还带着分支。糖蛋白中究竟是什么糖链起作用、糖链中是否每个糖基都同样重要呢?通过多种实验,如经温和的碱水解,选择性地除去 ZP3 分子中多种糖链中的 O-糖链(糖链通过氧原子和蛋白结合,叫做 O-糖链),ZP3 就失去与精子结合的能力;用特异的糖苷酶处理小鼠卵子,发现除去糖链末端的一个特定的糖基如半乳糖基或岩藻糖基可明显地降低卵子和精子的结合能力。如果改变 ZP3 糖蛋白中的半乳糖基的结构也能够消除它对精子的结合能力,而恢复半乳糖的结构则结合

能力又可恢复。近年来,人们还观察到精子的 SP56 蛋白还可直接与固相化的半乳糖结合。因此,这些实验结果逐步回答了人们的问题:是 ZP3 分子的糖链中的 O-糖链末端的半乳糖基在卵子与精子结合中起关键作用。最近,科学家已证明 SP56 是通过其单体分子内的双硫键连接形成八聚体(图 2.9),此八聚体的一端连着精子头部的表面膜,另一端和 ZP3 的寡糖链结合,结合后精子发生顶体反应,再由顶体蛋白酶的作用,精子穿过透明带使卵受精^[3],进一步明确糖在受精中的作用方式,从分子水平阐明了受精的机理。

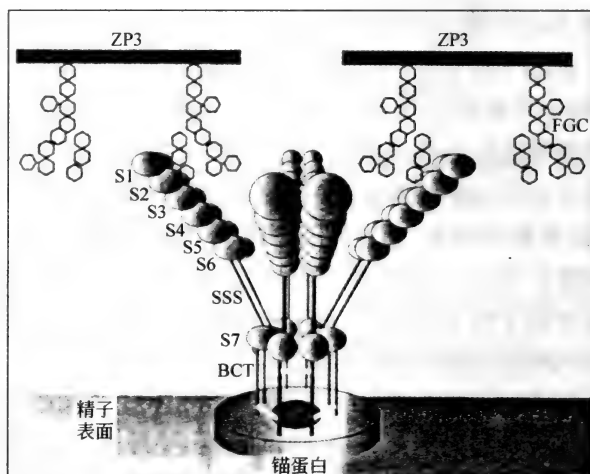


图 2.9 小鼠识别蛋白(mERP)的结构示意图

2.3.1.4 还有其他糖链成分可参与受精

人们发现在精子中还有其他可能与卵子结合的成分,如精子表面的一种 β -(1 \rightarrow 4)-半乳糖基转移酶,它与透明带 ZP3 的糖蛋白糖链末端的 N-乙酰葡萄糖胺结合,从而参与精卵识别的介导,但对 ZP1 或 ZP2 就不起作用^[4]。最近人们对不同的寡糖作用进

行了分析比较,发现无论是从体内提取的还是由人工合成的,都是一些有分支结构的寡糖才表现出对精卵结合有很强的抑制作用(图 2.10 是两种分支寡糖结构举例),所以认为在体内可能寡糖主要是通过多个糖结合键共同来起作用的。这使人们开始重视对体内某些复杂的寡糖链的研究。还发现了一些新的更复杂的成分,也更进一步表明糖参与受精分子机制的复杂性^[4]。

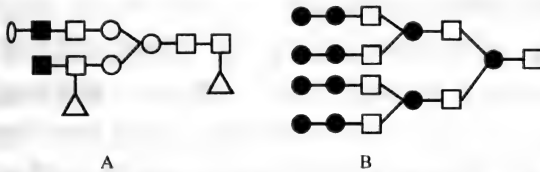


图 2.10 对受精有强抑制作用的分支寡糖结构示意图

- : 甘露糖; 0: 唾液酸; □: N-乙酰氨基葡萄糖
●: 半乳糖; △: 岩藻糖; ■: N-乙酰氨基半乳糖

由于取材的困难和伦理问题,对人卵 ZP3 与精子结合有关的糖结构的了解很少。通过糖对人精卵结合的抑制作用,初步观察到多聚岩藻糖与高浓度的甘露糖可防止 ZP3 与精子的结合。对人卵的透明带分析发现,其中有四糖抗原 Le^a (Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-Gal- β -(1 \rightarrow 3)-Fuc- α -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc), 这种抗原中有岩藻糖,它的抗体可抑制精子与透明带的结合,此现象受到人们的重视。但在人精子也好,小鼠精子也好,究竟精子和 ZP3 结合的糖(人们称之为糖配体)的结构如何,都期待着更多的研究和进一步的证实。

2.3.2 糖链是胚泡着床的“媒介物”

2.3.2.1 着床是生殖的关键环节

胚泡着床是生殖过程中的关键环节和限速步骤。在畜牧业和生殖医学的实践中,人们观察到受精率明显高于生育率,这主要是由于受精卵没有成功地着床造成的。1978 年第一例试管婴儿路

易斯·布朗在英国诞生,是医学史中的一大奇迹。这是在华裔生物学家张明觉 1959 年成功地完成了兔的体外受精、1969 年完成人卵体外受精的基础上,各国胚胎学家和妇产科专家多年共同努力,应用体外受精-胚胎移植技术所取得的成果。尽管当时的体外受精率已高达 90%,但着床率却低于 20%。又经过 20 年的努力,现在试管婴儿有关技术已不断提高,但着床率还徘徊在 30% 左右,仍然是亟待解决的关键问题。

卵受精后逐渐从输卵管移向子宫,移动同时进行着细胞分裂和增殖,形成致密、实心的细胞团叫做桑葚胚。桑葚胚进入子宫后继续分裂、分化,形成中间有空腔的胚泡。胚泡的外层细胞叫做滋养层细胞、在内部成团的细胞则叫做内细胞团(这部分以后发育成胎儿)。经过一定的时间后,胚泡从透明带中孵化脱出。孵化了的胚泡即在子宫内膜表面一定的部位粘着、向子宫壁植入,开始着床。小鼠的卵子从受精到开始着床大约要经过 100 个小时。着床包括胚泡与子宫内膜上皮细胞的靠近、定位、接触,进而穿过基底膜植入到子宫内膜(图 2.7B,C)的变化过程。在胚泡与内膜上皮接触后的 24 小时,它就牢固地植入子宫壁中了。

胚泡着床这一复杂的过程,需要卵巢激素、细胞因子和生长因子等许多因素的共同调节,使胚泡(子体)与子宫(母体)双方发生一系列同步的变化,以达到相互协调、相互适应才能完成。人们通过体外和体内着床模型,分别对胚泡和子宫进行了观察,分析各种因素对着床的影响,来窥视在生命的早期母-子双方如何相互接受、相互容纳的现象,以探讨着床的机理。我们主要谈谈有关寡糖在着床中的作用。

2.3.2.2 胚泡发育中寡糖的变化和功能

20 世纪 80 年代初期,科学家们应用专门与特定寡糖反应的单克隆抗体作为探针,应用荧光技术来观察。当在细胞表面有特

定结构的寡糖存在时,就会和它的抗体反应而带上荧光标记,显微镜下就会看到有荧光出现。而没有寡糖的细胞或部位就不会有荧光。并可根据荧光分布的部位和强度,来判断寡糖的存在和估计它的含量。实验结果发现了一些很有趣的现象,在不同发育阶段胚卵的表面有不同的寡糖抗原出现(或叫做表达)^[5]。如从单细胞开始就有阶段特异抗原 SSEA-3 和 SSEA-4 的表达,这些抗原到桑葚胚形成时下降;8 细胞到 32 细胞期表面主要为含岩藻糖的寡糖 Le^x (又称为阶段特异抗原 SSEA-1),这种抗原的出现时,正是胚卵分裂形成桑葚胚的时期。实验还发现 Le^x 寡糖抗原可促使胚卵分裂时各个单个细胞间的相互粘连,对桑葚胚的形成有重要作用。然而,随着胚胎发育到胚泡形成时, Le^x 骤然下降,却出现了另一种的寡糖—— Le^y (它的结构仅比 Le^x 多一个岩藻糖基),而且它一直到胚泡着床时都保持着高水平(图 2.11)。那么这种在 Le^x 消失后出现的 Le^y 寡糖有什么功能呢?

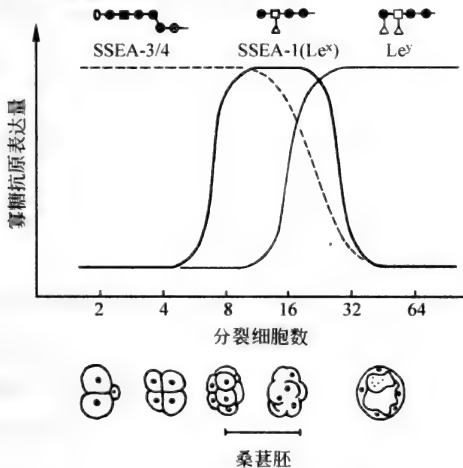


图 2.11 胚胎寡糖抗原的阶段表达

- ⊗: 葡萄糖; △: 岩藻糖; □: N-乙酰氨基葡萄糖
 •: 半乳糖; 0: 唾液酸; ■: N-乙酰氨基半乳糖

2.3.2.3 子宫内膜表面的寡糖对着床起中介作用

在母体子宫内膜表面的寡糖抗原与胚泡一样,表 2.5 列出了某些寡糖抗原的阶段变化。

表 2.5 不同功能期小鼠子宫内膜的糖抗原表达

抗体名称	抗原命名	糖链结构	表达强度		
			动情前期	动情期	着床前
FE-J1	GlcNAc	GlcNAc β -6Gal	-	-	-
FE-A5	Lacto[II型]	Gal β -4GlcNAc β -3Gal	-	-	-
MNH-1	H[1型]	Fuc α -2 Gal β -3GlcNAc β -3Gal	+++	++	+
BE-2	H[2型]	Fuc α -2 Gal β -4GlcNAc β -3Gal	-	-	-
MC-480	Le ^x	Gal β -3GlcNAc β -3Gal 3 Fuc α	+	+	+
AH-6	Le ^y	Fuc α -2 Gal β -3GlcNAc β -3Gal 3 Fuc α	+++	+++**	+++

* 抗原成簇分布

** 在子宫腔中也见到有抗原分布

在着床这个复杂的过程中,还有其他寡糖及粘连分子参与。在此,我们仅集中介绍对寡糖抗原 H1 和 Le^y 的研究。H1 也和 Le^x 寡糖的结构相似,只是其分子中的岩藻糖基的连接方式不同。H1 和 Le^y 这两种寡糖在小鼠子宫内膜的不同时期都有表达,但在交配前和胚泡着床前表达增强。它们在胚泡着床中起什么作用,这也是人们注意的问题。

目前人们一般是通过模型来观察研究胚胎是如何着床的。胚

泡移植模型。是先从一个母体(供体)取出受精卵,将其移入另一母体(受体)子宫内着床、生育。在胚泡移植之前,如先经不同因子或条件处理,然后观察着床率的变化,可分析各种因素通过胚泡对着床的影响;体外共培养模型。将胚泡和子宫内膜上皮细胞在体外一起培养,通过胚泡在上皮表面发生粘附,及随后在其表面扩展生长的现象,来模拟胚泡着床。此模型可以分别用不同因素处理胚泡或上皮,分别研究它们对着床的影响,以及分析影响因素是通过胚泡或子宫,或母胎双方面发挥作用;近年还建立了体内模型(后述)。

20世纪80年代后期以来,英国曼彻斯特大学生命科学院的金倍尔(Kimber)教授研究组^[6]对子宫内膜表面的H1寡糖在胚泡着床中的作用进行了大量研究。他们用荧光标记实验观察到在小鼠子宫内膜表面从未受孕和一直到早孕着床前都有H1抗原存在;体外实验,加入含有H1结构的寡糖后,胚泡和外加的寡糖结合而不能和内膜上皮细胞的H1结合,或加入对H1特异反应的抗体和内膜表面的H1反应后,都可明显地抑制了胚泡与内膜的粘着,结果说明H1寡糖在胚泡着床中非常重要。他们还现在胚泡表面虽然没能检测到H1寡糖,但却具有和H1寡糖结合的位点,而且这些位点的出现和胚泡孵化的时间一致。由此她提出了一种学说,认为这些位点是胚泡滋养层细胞表面与H1寡糖结合的“受体”。通过胚泡表面的“受体”与内膜表面的H1(配体)结合,从而介导着床时胚泡和内膜上皮细胞之间粘连。

我们实验室与美国以及国内有关实验室合作,近十年以来,对Le^x寡糖在着床中的作用也得到了令人感兴趣的结果。把对Le^x寡糖特异反应的抗体注射到小鼠的一侧子宫腔内(小鼠具有双侧子宫,实验时可以用另侧子宫为对照,可以对同一个体进行比较)。待怀孕第十天,取小鼠子宫,由其中的胚胎数目,计算着床率,与另一侧比较。结果发现,当子宫内膜表面的Le^x寡糖被其抗

体遮盖后, 胚泡的着床明显被抑制。这种抑制作用不仅与抗体的用量有关, 而且还有明确的时间性, 即只在胚泡着床前的一定时间内才起作用。并且, 只有注入对 Le^y 特异的抗体才对着床起抑制作用, 改用其他抗体则没有影响。首次用小鼠体内模型说明内膜的 Le^y 寡糖成分和小鼠胚泡正常着床关系密切, 并说明了 Le^y 寡糖是在胚泡着床的起始阶段起介导作用^[7]。其后, 我们还应用小鼠胚泡移植模型观察到, 如果将胚泡先和 Le^y 寡糖的抗体孵育后再植入到子宫内, 着床也被明显抑制, 说明胚泡表面的 Le^y 寡糖对正常着床也非常重要。此外, 在体外分别用抗体单独处理胚泡或是内膜上皮, 当抗体与细胞表面的 Le^y 寡糖反应后, 胚泡在上皮细胞表面发生粘附及扩展生长的体外“着床”现象都明显延迟。可见在胚泡和内膜上皮细胞表面的 Le^y 寡糖对着床都很重要^[8]。可能两面的 Le^y 寡糖同时与对应的受体反应, 从而对着床起中介作用(图 2.12)。母-胎两方面的 Le^y 寡糖如何相互作用以体现对着床的介导作用, 什么是与 Le^y 结合的受体成分, 是我们正在研究的课题。

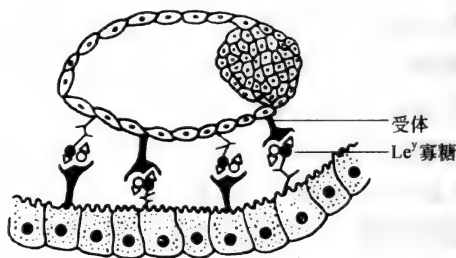


图 2.12 Le^y 寡糖介导的胚胎着床示意图

为了解 Le^y 寡糖在着床中的作用是否有普遍意义, 对灵长类动物恒河猴(和人类一样也有月经)进行了研究。发现恒河猴的子宫内膜表面 Le^y 的表达在月经周期中也有阶段性变化; 应用抗着床的紧急避孕药咪啡斯酮(使早孕时的胚泡不能着床)后可见

到 Le^y的表达明显下降。说明 Le^y寡糖可能在灵长类动物的正常胚泡着床中也起重要作用。最近,通过人子宫手术样品,也初步观察到类似的结果。这进一步说明了最古老、最保守的,关系着生物繁衍命脉的生殖过程中糖的作用具有一定的共性。

2.3.2.4 有的寡糖对胚胎还有免疫保护作用

我们知道,受精卵的一半来自母体,一半来自父体。胚泡植入子宫后如何不被母体的免疫系统排斥,而能在其中正常生长、发育,一直是有待探讨的问题。近年发现,在生殖系统中存在的某些具有分支的寡糖链糖蛋白(如由妊娠的子宫蜕膜分泌的 Glycodelin A 及甲胎蛋白等),具有明显的免疫抑制作用。这些糖蛋白在不同的妊娠期间出现,因而有人提出它们是对不同发育时期的胚胎起免疫保护作用。这个新的发现和学说,受到人们的高度重视,已成为目前研究的一个热点^[9]。

2.3.3 糖在生殖医学中的应用前景与展望

如前所述,糖在精-卵和胎-母之间的识别和粘着起中介作用,保证了受精和着床的正常进行。此外,一些寡糖对胚胎有免疫学保护作用,这对保证胚泡的着床成功,及胎儿在母体中能正常发育而不受侵害都十分重要。糖在生殖过程中作用的研究进展,使人们对糖在生殖医学中的应用前景充满希望。

首先,人们希望利用寡糖对受精过程的抑制作用,来制造更满意的避孕药物。在着手通过人工合成的方法,来筛选对受精有很强抑制力的寡糖中,发现有的分支寡糖仅在千分之一克的浓度下,就能达到明显抑制精子和卵子结合的效果。和目前所用的避孕药不同,寡糖仅作用在精卵相互识别、粘着的受精起始阶段,即在精子和卵子都正常发育,性生活也正常进行的情况下,仅在精子和卵子相遇时,使它们互不相识、擦肩而过,失去受精的机会,从而达到

避孕的目的。寡糖对激素的合成和分泌毫无影响,加之寡糖性质温和、稳定,用量又小,使用方便,而且没有副作用,这些突出的优点,显示出有很强的实用前景。目前的问题是这类寡糖的提取和合成困难,价格惊人的昂贵,无法实际应用。通过改进合成方法以降低成本费用,将其推向实际应用,是糖化学家和糖生物学家们正在共同努力奋斗的目标。

此外,寡糖促进着床和免疫保护的作用,可保证受精卵的正常植入,及保护胚胎在母体中正常生长发育。这不仅可望用于受精卵发育不良,尤其是用于由免疫排斥引起的不孕症的治疗,而且可望受精卵在体外通过某些特殊的寡糖的孵育,促进着床,以提高“试管婴儿”和转基因动物的成功率,为人类生活造福,为社会创造财富。相信随着糖生物学研究的深入,糖生物工程技术的进一步发展,糖在生殖医学中会展示出更广泛的应用前景。

朱正美

2.4 糖分子与异种器官移植

2.4.1 什么是异种器官移植?

1992年6月28日,全世界的各大新闻媒体相继以最快的速度报道了这样一则消息:在美国匹茨堡大学器官移植中心,医疗专家们将取自狒狒(一种灵长类动物)的肝脏成功地植入在一位名叫布赖恩的男性患者的体内。植入后,狒狒的肝脏在布赖恩体内功能正常,布赖恩35岁的生命重现曙光。由于大量地使用免疫抑制剂,布赖恩在手术后第70天,遗憾地死于由真菌感染引起的脑出血等病。但布赖恩受到了全世界的关注,因为他所经历的手术非同寻常,被称为异种器官移植。

我们将某一个体的器官用手术或其他措施移植到自己体内或另一个体的某一部位的技术,叫做器官移植术。献出器官的个体,叫做供体;接受移植器官的个体叫做受体。如供体和受体属于同一种属但不是同一个体,如人与人,狗与狗之间的移植,叫做同种移植或同种异体移植;而不同种属之间,如猪与羊,猪与猴,人与猪之间的移植,叫做异种移植。如此说来,将狒狒肝脏植入布赖恩体内的手术就该称为异种器官移植手术。

2.4.2 异种器官移植的意义

那么,为什么将狒狒肝脏植入布赖恩体内的异种器官移植手术,引起人们如此广泛地注意呢?当人的器官,特别是人生命必需器官如心、肝、肺、肾发生严重病变以致功能衰竭,而应用药物及一般手术又不能治疗时,更换器官,即器官移植就成为挽救生命唯一的希望。近年来,随着外科手术技术、离体器官保存方法、免疫抑制和诱导免疫耐受手段的进步和发展,人体器官移植已成为日常医疗活动的一部分,特别是治疗慢性器官衰竭的肾、心、肝和肺移植获得了相当的成功。器官移植被誉为21世纪“医学之巅”。但随之而来的是,一方面,全球性的器官移植需求日益增长;而另一方面,可供移植器官来源严重不足,这一矛盾亟待解决。例如在美国像布赖恩这样需要移植治疗的患者中,只有5%的人能够得到所需的器官。于是,利用非人类器官,通过异种移植补充人供体器官的不足,近年来成了器官移植研究领域极富挑战和争议的问题之一,因而引起人们的广泛注意。

2.4.3 异种器官移植成功的关键

异种器官移植是将非人类动物器官植入人体内的过程。那么,选择什么动物作为供体合适呢?人们首先自然地想到与人类比较接近的灵长类动物,比如猴、猩猩以及前面提到的狒狒。但事

实是,提供器官的动物越低等、与人类亲缘关系距离越远,其器官移植到人体的效果越好。此外,异种器官移植还要求供体动物体内不能存在能感染人类的病毒。经过反复地比较后,人们选择了猪。猪的数量大,其器官易得,而且器官形状大小与成年人最接近。另一方面,几千年来,猪一直是人类的朋友。与狒狒等灵长类动物相比,猪体内能感染人类的病毒是较少的。因此,猪是人类最合适的器官供体。虽然选择猪作为器官供体,最大限度地减少了潜在的病毒感染等危险因素,但并不意味人—猪异种器官移植就一定成功。异种器官移植成功的关键还在于如何抑制人对供体器官的免疫排斥反应。

我们知道,当细菌、病毒等外来物质侵入人体时,体内的免疫系统就能识别、结合它们,并产生免疫排斥反应,最终将其排出体外。参与这一免疫过程的有抗体、补体以及天然杀伤细胞等。其中特异地识别并结合这些外来物质的蛋白质分子,叫做抗体;促使机体产生抗体的外来物质叫做抗原,如蛋白质、糖分子等。在抗原分子中,起决定性作用的那部分结构,叫做抗原决定簇。抗原、抗体的种类繁多,但一种抗原分子只特异地与一种抗体结合。抗原—抗体这种的关系,就好像一把钥匙开一把锁。

当猪的器官作为移植物植入人体内时,也就是抗原侵入了人体内,人的抗体就马上识别、结合它们,并进一步动员补体系统、天然杀伤细胞等,攻击猪器官,造成其坏死。这一过程就是免疫排斥反应。如果免疫排斥反应发生在移植术后几分钟至几小时内,就叫做超急性排斥。超急性排斥是已知的免疫排斥反应中最猛烈的一种,是异种器官移植的主要障碍。

2.4.4 异种器官移植与糖分子

那么,引起超急性排斥发生的是哪些物质呢?目前普遍认为,超急性排斥是由人体内天然存在的抗体与糖抗原分子结合引起

的。这种糖分子存在于猪血管内皮细胞表面,主要为 $\text{Gal}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}$,其结构为: $\text{Gal}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc-R}$ 。

如图 2.13 所示, $\text{Gal}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}$ 是在细胞内,由 $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-半乳糖基转移酶}(\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-GT})$ 催化, $\text{Gal}\beta\text{-(1}\rightarrow\text{4)-GlcNAc-R}$ 经末端 $\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-半乳糖基化}$ 合成而来的。这种糖分子,存在于某些微生物病原体和哺乳动物(如猪)组织的表面;而在人体内没有合成它所需要的酶,故不存在 $\text{Gal}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}$ 糖分子。但人很容易感染含有这种糖分子的微生物,这样人体内就产生了识别 $\text{Gal}\alpha\text{-(1}\rightarrow\text{3)-Gal}$ 的天然抗体。1993 年尤里·噶理利(Uri Galili)提出,人体内天然抗体与糖分子的结合,是人—猪异种器官移植的主要障碍。



图 2.13 Gal1,3Gal 糖抗原与 H 抗原之间的转化

2.4.5 如何抑制天然抗体与糖抗原分子的结合?

既然人体内天然抗体与糖分子的结合,是人—猪异种器官移植的主要障碍。那么,抑制这种结合就可能使人类跨越异种器官移植的主要障碍,从而实现利用异种器官移植挽救生命的目的。但是,如何抑制天然抗体与糖分子的结合?至少应从天然抗体和糖分子两方面着手。图 2.14 是人天然抗体的排除与转基因技术在异种移植中应用的简单图示。

首先,人们曾试图除去人体内的天然抗体。由于天然抗体存在于人的血液中,于是,将血液从将要接受异种器官移植的患者体内取出。再将血液通过一个特殊的过滤仪器。在仪器中装有糖抗原分子,天然抗体与糖分子结合从而留在仪器中,余下的血液再输回患者体内,相当于天然抗体被从血液中过滤掉。经如此反复多

次后,进行的异种器官移植,在一定程度上延长了移植体的存活时间。但在人体内循环的天然抗体含量恢复较快,因此完全除掉它非常困难。

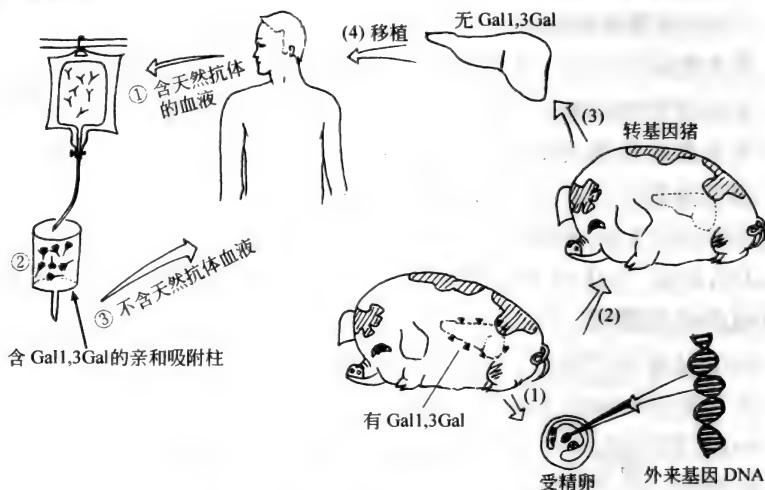


图 2.14 人天然抗体的排除与转基因技术在异种移植中的应用

▲ :Gal1,3Gal; ①~③:天然抗体的排除; (1)~(4):转基因技术制造 Gal1,3Gal 阴性猪肝

此外,近年来,人们采用转基因技术,改造猪血管内皮细胞表面糖分子的结构,以求抑制和消除 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的生成、进一步抑制天然抗体与糖分子结合。

这种转基因技术的基本技术路线是:首先将特定的外来基因 DNA 分子,通过微注射注入猪的受精卵中,然后将这个受精卵送回猪体内,得到转基因猪。在转基因猪体内,被注入的外来基因发挥作用,由它决定的蛋白质(也就是酶分子)的数量发生了变化。如果转入的外来基因使与 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子生成有关的酶在数量上发生改变,则 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的生成就受影响。当转基因猪体内 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的生成停止或被抑制时,转基因猪的器官就没有了 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖抗原分

子。如果进一步将这样的转基因猪器官植入人体内,就可以避免超急性排斥,从而克服人-猪异种移植的最主要障碍。

那么,利用转基因技术,抑制和消除 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的生成有哪些途径呢?

1. 抑制 α -(1 \rightarrow 3)-半乳糖基转移酶活性 α -(1 \rightarrow 3)-半乳糖基转移酶是 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 合成的关键酶。采用基因工程技术,如反义核酸技术、催化性 RNA 技术,可抑制该酶的产生,从而能消除 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 的合成。

2. 利用 α -半乳糖苷酶降解作用。 α -半乳糖苷酶可水解 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 末端的半乳糖基,改变糖分子的结构,除去与天然抗体结合的糖分子。在猪内皮细胞过量合成 α -半乳糖苷酶,可使该细胞表面糖抗原的量减少到原来的 1/30,使这些细胞与天然抗体的反应降低 90%。

3. 利用 α -(1 \rightarrow 2)-岩藻糖基转移酶竞争。前面提到, Gal- β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc-R 在 α -(1 \rightarrow 3)-GT 催化下可合成 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子,但在 α -(1 \rightarrow 2)-岩藻糖基转移酶(α -(1 \rightarrow 2)-FT)催化下,经末端 α -(1 \rightarrow 2)-岩藻糖基化,也可转化成 H 抗原(Fuc- α -(1 \rightarrow 2)-Gal β -(1 \rightarrow 4)-GlcNAc-R)。人体内存在 H 抗原,人天然抗体不能与 H 抗原结合。利用基因技术使猪内皮细胞大量产生 α -(1 \rightarrow 2)-FT 酶,利用 α -(1 \rightarrow 3)-GT 和 α -(1 \rightarrow 2)-FT 两酶的竞争,使细胞表面 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的量减少(最多可减少 90%),而 H 抗原增加,结果便显著降低了人天然抗体与转基因猪内皮细胞的结合,降低了天然抗体引起的杀伤性细胞对转基因猪内皮细胞的攻击。

此外,还可同时利用 α -半乳糖苷酶降解 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子末端的半乳糖基,以及 α -(1 \rightarrow 2)-FT 竞争催化合成 H 抗原的两方面作用。当使 COS 细胞(哺乳动物的一种细胞)同时过量合成上述两种酶后, Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的生成量就会减少到

忽略不计的程度。虽然至今未见报道将此法应用于猪细胞,但此法给人以信心,即采用转基因手段可以制备完全没有 Gal- α -(1 \rightarrow 3)-Gal 糖分子的猪细胞。

异种器官移植是人类自古以来的梦想,目前还存在许多问题有待解决,它的广泛应用尚需时日。糖分子在这里扮演着重要的角色。现有的实验结果说明,糖生物工程技术有可能为人类异种器官移植提供合适的材料,因此,它可能是解决异种器官移植超急性排斥反应最有希望的手段。

朱正美

2.5 备受关注的古老生物大分子

——蛋白聚糖

2.5.1 蛋白聚糖的结构和功能

2.5.1.1 蛋白聚糖的基本结构

蛋白聚糖(proteoglycan,简称PGs)是生命起源之后较早出现的化合物,在生物进化上是一种古老而复杂的生物大分子。它广泛存在于所有贴壁生长的细胞膜、胞外基质和某些细胞器中。在人和动物的组织中,蛋白聚糖分布广泛,它既存在于胞外基质中,也存在于细胞表面和细胞内。

蛋白聚糖由蛋白质和聚糖两部分组成。前者一般称为核心蛋白,后者则为一条到上百条糖胺聚糖链(glycosaminoglycan,GAG)。两者以共价键连接,构成完整的蛋白聚糖(图2.15)。GAG链是蛋白聚糖的分子标志,凡是联有此种糖链的蛋白质或糖蛋白都可称为蛋白聚糖。

这些糖链可长可短,短的只有20个糖基,长的可由200个糖

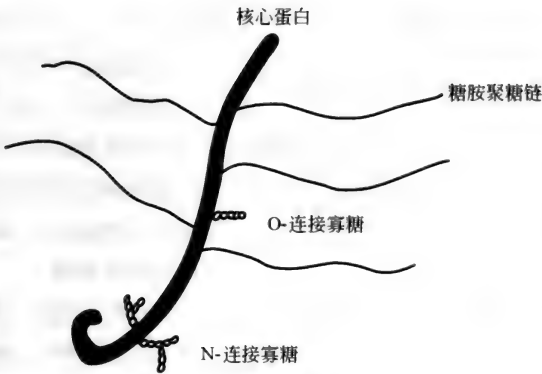


图 2.15 蛋白聚糖模式图

基组成。由于在这样一个六碳糖的多聚体上的氨基和羟基不同程度地被硫酸基取代,因而使糖链的结构进一步复杂化。图 2.18 是这 3 类糖胺聚糖的基本结构。尽管不同蛋白聚糖的核心蛋白部分和糖链部分都有其特征,但它们的生物合成都遵循同一途径。即先合成核心蛋白,继之第一个糖基与核心蛋白的一个丝氨酸残基或天冬氨酸形成 O-或 N-糖苷键,然后单糖分子以 UDP-糖的形式在糖基转移酶的催化下,一个一个地按顺序通过共价键连接起来。糖链的合成起始和聚合以及修饰反应都是由不同的酶催化。已知仅参与肝素和硫酸类肝素合成的酶就有 11 种之多,其中大部分酶的基因已经克隆。

许多蛋白聚糖含有两种不同的糖胺聚糖链,如聚集蛋白聚糖既含有硫酸软骨素,又含有硫酸角质素。

根据组成和结构的差异,可把 GAG 分为 6 种:透明质酸(hyaluronic acid,简称 HA)、硫酸软骨素(chondroitin sulfate,简称 CS)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate,简称 DS)、硫酸类肝素(heparan sulfate,简称 HS)、肝素(heparin,简称 Hep)及硫酸角质素(keratan sulfate,简称 KS)(表 2.6 和图 2.16)。肝素和硫酸类肝素由己糖

表 2.6 GAG 的主要构成成分

GAG	己糖胺	己糖醛酸 (半乳糖)	硫酸基
透明质酸	<i>D</i> -N-乙酰葡萄糖胺	<i>D</i> -葡萄糖醛酸	
硫酸软骨素	<i>D</i> -氨基半乳糖	<i>D</i> -葡萄糖醛酸	O-硫酸基
硫酸皮肤素	<i>D</i> -氨基半乳糖	<i>L</i> -艾杜糖醛酸	O-硫酸基
		<i>D</i> -葡萄糖醛酸	
肝素及硫酸类肝素	<i>D</i> -N-乙酰葡萄糖胺	<i>L</i> -艾杜糖醛酸	N-硫酸基
		<i>D</i> -葡萄糖醛酸	O-硫酸基
硫酸角质素	<i>D</i> -N-乙酰葡萄糖胺	<i>D</i> -半乳糖	O-硫酸基

O-硫酸基是指与氨基己糖及己糖醛酸的羟基相结合的硫酸酯；

N-硫酸基是指与氨基结合的硫酸酯。

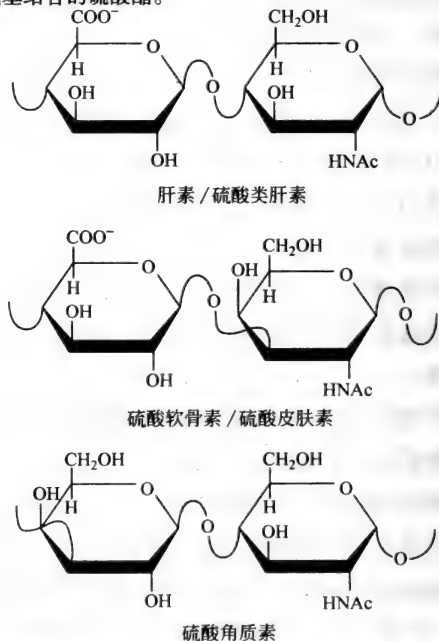


图 2.16 组成糖胺聚糖的二糖基本糖单位

醛酸(hexuronic acid, 简称 UA)和乙酰葡萄糖胺(glucosamine)组成,硫酸软骨素和硫酸皮肤素由己糖醛酸和乙酰半乳糖胺(galactosamine)组成,而硫酸角质素由半乳糖和乙酰葡萄糖胺组成。这些 GAG,除透明质酸外,均含有硫酸基,而且可与特定的核心蛋白共价连接构成不同的蛋白聚糖。透明质酸虽不以蛋白聚糖的形式存在,但可与一些蛋白聚糖非共价结合,形成大的蛋白聚糖聚集体。

除 GAG 链外,多数蛋白聚糖还含有一定数量的 N-连接及 O-连接寡糖链。由于核心蛋白分子大小和结构的不同,糖链特别是 GAG 链的种类、数量、长度及硫酸化的部位和程度等的差异,使蛋白聚糖分子不仅组成复杂,而且具有结构多样性的特征。

与糖蛋白不同,蛋白聚糖的糖组分在含量上可以大大多于蛋白质组分,而且糖苷只形成直链。现在已知至少有 100 多个成员属于蛋白聚糖的家族,并且还在不断发现新的成员。

经过数十年的研究,蛋白聚糖的生物学作用正在逐渐受到关注,因为蛋白聚糖与细胞识别和分化,生长因子的调节有关,也和脂蛋白代谢、病毒感染和维持胞外基质的形态有关。

蛋白聚糖通过其 GAG 链或核心蛋白可与其他生物大分子结合或相互作用,进而参与许多生理过程的调节,具有重要的生物功能。因此,蛋白聚糖已成为当今糖生物学和分子生物学的一个很活跃的研究领域。

2.5.1.2 蛋白聚糖的分类

蛋白聚糖存在于所有哺乳动物组织,以及果蝇等昆虫和蚯蚓等软体动物中。根据蛋白聚糖在细胞中的分布,可以分成 3 类:

第一类 膜结合型,典型代表是粘结聚糖(syndecan)和磷脂酰肌醇聚糖(glypican);

第二类 细胞基质型,如聚集聚糖(aggrecan)和多能聚糖

(versican);

第三类 细胞内型,迄今只发现一种,即丝甘聚糖(serglycin)。

表 2.7 列出了主要的蛋白聚糖种类。图 2.17 是几种常见的蛋白聚糖的结构示意图。蛋白聚糖的核心蛋白,分子大小很不

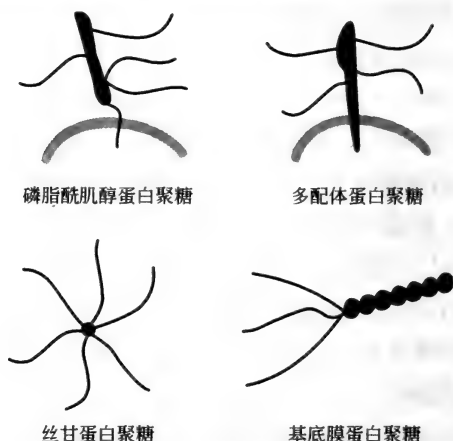


图 2.17 几种常见的蛋白聚糖的结构示意图

相同,小的只由 100 个氨基酸组成,如丝甘聚糖;大的分子的分子量可以达到 467 kDa,如基底膜蛋白聚糖,又称串珠聚糖(perlecan)。然而,蛋白聚糖的分子量取决于分子中糖链的多少,如核心蛋白聚糖,又称饰胶聚糖(decorin),它只有一条由约 50 个糖基组成的糖胺聚糖链,而聚集聚糖则可含 100 多条 GAG 的糖链。

表 2.7 蛋白聚糖一览

蛋白聚糖	糖胺聚糖种类	糖链数量	功能
聚集聚糖(aggrecan)	CS/KS	120	与软骨组织的 HA 结合
多能聚糖(versican)	CS/DS	10~30	与细胞基质的 HA 结合
粘结聚糖(syndecan)	HS/CS	1~6	与生长因子结合

续表

蛋白聚糖	糖胺聚糖种类	糖链数量	功能
β -聚糖 (betaglycin)	HS/CS	0~4	与生长因子结合
光聚糖 (lumican)	KS	3~4	与胶原结合
乙酰胆碱受体聚集因子 (agrin)	HS	3	诱导乙酰胆碱释放
神经聚糖 (newrocan)	HS	3	神经组织特异蛋白聚糖
Bamcan	CS	3	胚胎期调节细胞分化
串珠聚糖 (perlecan)	HS/CS	3	与基底膜的胶原结合
双链聚糖 (biglycan)	CS/DS	2	细胞内结构蛋白聚糖

2.5.1.3 蛋白聚糖的基本功能

1. 结合在细胞膜上的蛋白聚糖

研究最多的膜结合蛋白聚糖是多配体蛋白聚糖。从1989年从小鼠上皮细胞得到第一个核心蛋白基因的克隆之后,现在已知它有4种亚型,被命名为多配体蛋白聚糖1-4。这4种亚型的核心蛋白的基因都已克隆,它们都是贯穿细胞外区域(ecto-domain)、细胞膜区域(transmembrane domain)和细胞内区域(cytoplasmic domain)的一条肽链。4种亚型的核心蛋白在细胞膜区域和细胞内区域的结构都很相似,主要区别在细胞外区域,即糖胺聚糖附着的区域。4种亚型在组织中的分布有所不同。多配体蛋白聚糖型-1存在于大部分组织,现在已经证明这个亚型与多种生理功能和病理变化有关,如免疫组化实验显示,早在胚胎发育的4细胞期。胚胎表面就能发现有多配体蛋白聚糖-1表达,说明它和胚胎的发育有关。还发现在一些肿瘤细胞,如乳腺癌细胞(shionogi115)中,多配体蛋白聚糖亚型-1的表达就比正常细胞偏低。多配体蛋白聚糖亚型-1还可以促进创伤愈合,尽管作用机理还不清楚,但它确

实能刺激细胞再生。

其他 3 型多配体蛋白聚糖的研究也已经相当深入。多配体蛋白聚糖-3 主要在神经和心血管系统表达,估计它的功能主要是和这两个系统有关;多配体蛋白聚糖-4 和多配体蛋白聚糖-1 在组织中的分布情况类似,因此估计它们的功能也近似。多配体蛋白聚糖-2 几乎在所有的组织中都有表达,但尚未发现它的确切功能。

2. 胞外基质蛋白聚糖

许多已知的蛋白聚糖都属于这一类。其主要功能之一是维持胞外基质的结构。胞外基质蛋白聚糖中研究最多的是聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖和神经蛋白聚糖。它们共同特点是核心蛋白分子量最大,并且都与透明质酸(hyaluronic acid,简称 HA)和凝集素(lectin)结合。

聚集蛋白聚糖是软骨中的主要成分,含有约 100 条硫酸软骨素和约 20 条硫酸皮肤素糖胺聚糖链,总分子量可达 2500 kDa。其中核心蛋白的重量只占 1/10(约 250kDa)。由于众多糖胺聚糖链上的硫酸基和羧基提供了大量的负电荷,聚集蛋白聚糖分子中可滞留大量水分子,加上与透明质酸结合,填充于软骨组织的细胞间隙,可以起缓冲机体和组织对关节的压强作用。此外,一些实验表明,聚集蛋白聚糖影响胚胎成纤维细胞附着于纤连蛋白(fibronectin),层粘连蛋白(laminin)和胶原蛋白(collagen),因而影响组织发育。聚集蛋白聚糖的硫酸软骨参与调节发育中的外周神经系统,推测它可能对神经突触的生长有定向作用。

多功能蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖一样,核心蛋白的分子量较大。不同的是只有 30 条左右的硫酸类肝素糖胺聚糖链。因此使水分子滞留的能力较小。多功能蛋白聚糖的表达受许多生长因子的调节。如用血小板衍生生长因子(PDGF)和转化生长因子(TGF)处理平滑肌后,可提高多功能蛋白聚糖的基因表达。这种调节可能通过不同的信号传递系统来进行。还发现一些透明质酸

丰富的肿瘤组织中,多功能蛋白聚糖常常过量沉积。这种沉积究竟是由于受肿瘤中某些因子的刺激而增加表达,还是由于多功能蛋白聚糖的超表达造成肿瘤发生或生长,目前还在探讨中。

神经蛋白聚糖首先是在大鼠脑中发现的,这种蛋白聚糖能够以很高的亲和性与神经细胞粘附分子 N-CAM 结合,进而抑制 N-CAM 的同嗜性粘附反应和阻止神经细胞突触生长。原位杂交和免疫组化实验发现神经蛋白聚糖只存在于出生前和新生动物的脑组织中。

3. 基底膜结合的蛋白聚糖

这类蛋白聚糖主要存在于动物血管上皮细胞的基底膜中。代表性的分子是基底膜蛋白聚糖、乙酰胆碱受体聚集因子(agrin) 和 Bamcan。

基底膜蛋白聚糖按命名者英文原意是“珍珠蛋白”,可直译为串珠聚糖。因为它的核心蛋白部分是由一个杆状的结构把许多球状的蛋白区域串联而成(见图 2.15)。基底膜蛋白聚糖与上述聚集蛋白聚糖的最大区别是它只有 3 条硫酸类肝素链附着在蛋白质部分,尽管它的核心蛋白部分很大。基底膜蛋白聚糖的主要功能是调节细胞分化和形态的建成。尤其是在胚胎发育时期,它起调控胚胎着床和促进胚胎血管形成的作用。当然,它和其他硫酸类肝素蛋白聚糖一样,硫酸类肝素部分也有储存生长因子的功能,因而也能调控肿瘤的发展。

乙酰胆碱受体聚集因子是最近几年发现的硫酸类肝素蛋白聚糖,主要存在于脑组织中。乙酰胆碱受体聚集因子的核心蛋白的基因 1995 年首次在鸡脑中克隆,它的结构与基底膜蛋白聚糖类似,但相对分子质量要小得多。乙酰胆碱受体聚集因子最重要的功能是引导乙酰胆碱受体在神经肌肉接头处聚集。此外,它和基底膜蛋白聚糖一样,也在胚胎发育中起调控作用,特别是在血脑屏障形成时,它在脑微血管的基底膜处聚集,维持微血管的非通透性。

Bamcan 虽然同属于与基底膜结合的蛋白聚糖,是这类中较小的。它的核心蛋白与上述两种没有任何同源性,而且糖胺聚糖链是硫酸软骨素,而不是硫酸类肝素。Bamcan 最早是从大鼠胚胎内胚层与滋养层之间分离得到的,目前对它的功能所知较少。有些实验表明,由于它和基底膜蛋白聚糖共存于胚胎细胞的基底膜,可能对组织的形态建成起制约作用。

2.5.1.4 糖胺聚糖的功能

蛋白聚糖之所以能与多种蛋白质分子结合,主要是由于糖胺聚糖链带有许多负电荷(硫酸基和羧基),所以容易和带正电荷的蛋白质结合。虽然这些反应的化学基础是正负电荷的相互作用,但结合的特异性也会很高。最典型的反应是肝素与抗凝血酶的结合。肝素是糖胺聚糖链,由动物的肥大细胞中形成。在肝素分子中含有大量的硫酸基和艾杜糖醛酸(iduronic acid),在由 100 个单糖组成的糖链中,有 170 个~250 个硫酸基,而与其基本结构类似的硫酸类肝素却只有 50 个~125 个。艾杜糖醛酸可以增加糖链的柔性,而硫酸基则决定糖胺聚糖与什么样的蛋白质结合。早在 20 世纪 30 年代肝素已在临床上被用作抗凝血药,其原因是肝素可以和抗凝血酶特异结合,改变抗凝血酶的构象,从而阻止凝血反应。图 2.18 表示与抗凝血蛋白特异结合的肝素的五糖序列,其中 C3-硫酸基是必不可少的。如果去掉 C3-硫酸基,则它与抗凝血酶结合的亲和力只有原来的千分之一。

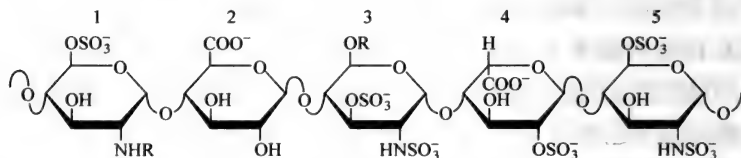


图 2.18 与抗凝血酶蛋白特异结合的肝素的五糖序列

近来有许多实验证明,某些生长因子和受体的结合,需要有糖胺聚糖介导。研究得最多的是纤维母细胞生长因子-2(FGF-2)和细胞表面受体靠肝素和硫酸类肝素链的结合。对与 FGF-2 结合的肝素的片段结构进行鉴定,以及对生长因子蛋白质的 X 射线衍射分析,都表明与 FGF-2 结合的最短糖链是五糖,而且其中一个艾杜糖醛酸的 C2 必须硫酸基化。尽管在体外实验中,由 6 个单糖构成的硫酸类肝素糖链片段和 FGF-2 的亲合力很高,但是把这样一个五糖分子和 FGF-2 一起处理细胞,却不能使 FGF-2 对纤维母细胞表现活性。还发现只有用至少 12 糖的肝素或硫酸类肝素片段才能激发 FGF-2 诱导的细胞内磷酸化反应。近来又发现,硫酸类肝素只和 FGF-2 结合并不能使 FGF-2 产生活性,还必须同时与受体结合才能促进 FGF-2 受体的活化,导致产生生物活性。在与受体结合的糖序列中,必须糖的 C6 位置有一个硫酸基。这些实验结果说明肝素和硫酸类肝素与 FGF-2 的结合是特异性的。这就暗示,我们可以根据肝素和硫酸类肝素与 FGF-2 及其受体结合的结构,设计一种只能与 FGF-2 结合,而不与受体结合的拟糖分子(memetics),用来封闭 FGF-2,进而阻止生长因子刺激增殖的功能,以达到抑止肿瘤细胞增长的效应。

硫酸类肝素除了可以介导生长因子与其受体的结合,还有储存和调控这些因子的作用。因为在正常情况下,这些生长因子与胞外基质的硫酸类肝素结合,呈静止状态,不能和它的受体接触。这些因子只有从硫酸类肝素中释放出来,它们才有机会与受体反应。我们还应提高一种很重要的内切葡聚糖酶,这种酶在体内可以切断硫酸类肝素,继而释放出储存的生长因子。已有大量实验结果表明,内切葡聚糖酶在肿瘤分化和转移过程中起着重要的调控作用,而这种酶在许多肿瘤组织中表达量增高。最近已经从人的胎盘和血小板中克隆了此酶的基因,这个突破将会在肿瘤的预防和治疗的攻关方面打开新的缺口,而硫酸类肝素可能会有重要

的用途。

2.5.1.5 分子生物学手段将使蛋白聚糖研究取得重大突破

蛋白聚糖分子的多样性为它提供了和其他分子进行多方位反应的可能性。它的生物学功能表现在核心蛋白上,有些反应则由糖胺聚糖完成。现在用分子生物学手段克隆核心蛋白基因的进展很快,因此对于已知蛋白聚糖结构与功能的了解相对较多,而对糖胺聚糖的了解就差些。主要难点是糖胺聚糖结构的分析。如前所述,已知的糖胺聚糖分子都是某种二糖分子的聚合物,但因为硫酸基可以在不同位点以不同程度进行硫酸化,导致了糖胺聚糖的结构种类的无限多样。同时糖胺聚糖的表达在很大程度上有细胞和组织特异性,如同一种核心蛋白在不同组织、不同发育时期和不同病理状态下,所结合的糖胺聚糖链的微细结构可能不同。困难不仅在于糖胺聚糖的结构复杂,而且测定糖胺聚糖结构的方法也相当不完善,目前试用的有聚丙烯酰胺凝胶电泳结合阳离子交换高效液相色谱法。这两种方法的优点是所需设备简单,普通实验室都可进行,但实验过程冗长,且灵敏度较低,分析实验结果需要一定经验。最近报道用 MALDI-MS 法,最低检测量为 100f mol ,而且自动化程度高,不足之处显然是仪器设备价格昂贵。可以想像,当对这些糖胺聚糖链结构的测定也像测定核酸或氨基酸序列测定那么容易时,对于蛋白聚糖的功能研究就会有较大的突破。

2.5.2 蛋白聚糖与神经功能

神经系统是人和动物最重要的机能调节系统,它精确而全面地调控着体内各器官的生理功能和代谢过程,以适应机体内外环境的各种变化。脑是神经系统的中枢,是进行高级思维活动的器官,它能接受信息,进而加工和发布信息,控制着人和动物的一切重要生命活动。然而,就是在这样重要的器官和系统中,近年来却

出人意料地发现了许多与构成软骨和结缔组织基质主要成分极其相似的蛋白聚糖,引起了糖生物学家和神经生物学家们的注意和研究兴趣。这给我们提出了一些值得思考和探讨的问题,例如神经系统,特别是脑中都有哪些蛋白聚糖?这些蛋白聚糖在神经系统中有什么生理作用?

2.5.2.1 神经系统中的蛋白聚糖

在神经系统中存在着许多蛋白聚糖,目前从脑中分离和鉴定的蛋白聚糖已接近 20 种。构成脑组织的神经细胞(又称神经元)和神经胶质细胞,以及脑血管中的内皮细胞等均能合成不同类型的蛋白聚糖。这些蛋白聚糖多数分布于细胞外基质中,有些则存在于细胞表面与细胞膜相结合。

有关神经系统蛋白聚糖的命名,目前尚不统一,主要有以下 3 种方法。

1. 按所含的 GAG 链来命名。例如硫酸软骨素蛋白聚糖(简称 CSPG)、硫酸类肝素蛋白聚糖(简称 HSPG)等。

2. 免疫命名法。神经组织蛋白聚糖具有较强的抗原性,因此应用适当的单克隆抗体,不仅可以鉴定蛋白聚糖的存在,而且也可使其得到分离和纯化。用这种方法发现的蛋白聚糖,在未搞清其核心蛋白分子结构之前,往往先用相应的单克隆抗体名称来命名。例如:Cat-301 蛋白聚糖、NG2 蛋白聚糖等。

3. 通俗名称(trivial name)命名法。凡是组织分布明确,而且应用分子生物学技术搞清其核心蛋白分子结构的蛋白聚糖,研究者往往根据它的结构和分布特点给以适当的通俗名称。例如:一种主要在神经系统合成和分布的蛋白聚糖,被命名为 neurocan(神经聚糖)。又如:一种由神经胶质细胞合成的蛋白聚糖,经 cDNA 克隆分析后发现它有 76% 的氨基酸序列与受体型蛋白质酪氨酸磷酸酶相同,因而命名为 phosphacan(磷酸聚糖)。这些通俗名称

目前已广泛地应用于各种文献资料中。

1) 神经系统细胞外基质蛋白聚糖

在脑组织的细胞外基质中已发现了多种蛋白聚糖,它们大部分是含硫酸软骨素糖链的蛋白聚糖(表 2.8)。这些蛋白聚糖与细胞外基质疏松结合,一般较易提取和分离。

表 2.8 中枢神经系统细胞外基质蛋白聚糖

英文名称	中文名称	GAG 链	核心蛋白相对分子质量 [△]
Neurocan	神经聚糖	CS	136 000
Brevican	短小聚糖	CS	100 000
Versican	多能聚糖	CS/DS	265 000 ~ 370 000
Aggrecan	聚集聚糖	CS	220 000
Cat-301PG	Cat-301 蛋白聚糖	CS	580 000*
Phosphacan	磷酸聚糖	CS/KS	173 000
6B4 PG	6B4 蛋白聚糖	CS/KS	250 000*
T1 PG	T1 蛋白聚糖	CS	300 000*
Agtrin	乙酰胆碱受体聚集因子	HS	200 000
Testican	睾丸聚糖	HS/CS	44 000
Decorin	饰胶聚糖	CS/DS	36 000
Biglycan	双链聚糖	CS/DS	38 000

△带 * 号的数据是用电泳法测得的相对分子质量。其他相对分子质量数以 cDNA 克隆查明的氨基酸序列为依据。

神经聚糖、短小聚糖、多能聚糖及聚集聚糖它们的核心蛋白结构具有共同的特征:在近氨基末端都有结合透明质酸的区域,因而可形成大的集聚体;在近羧基末端都含有 C 型凝集素样结构域;在二者之间则是长短不一的结合 GAG 链的区域。由于这些结构特征,所以这 4 种蛋白聚糖可归类为一个家族。Cat301 蛋白聚糖也可与透明质酸结合,但其核心蛋白的结构尚未完全阐明。另外,

饰胶聚糖及双链聚糖为小分子的蛋白聚糖,前者只含 1 个 GAG 链,后者则有 2 个;它们的核心蛋白结构几乎相同,都有富含亮氨酸的重复序列,属于另一个家族。

2) 神经系统细胞表面蛋白聚糖

在神经系统的细胞表面存在着一些与膜结合的蛋白聚糖,它们大部分是含硫酸类肝素糖链的蛋白聚糖,主要有两类。一类是插入膜的蛋白聚糖,例如神经粘结聚糖(N-syndecan,又称 syndecan-3)、 β 聚糖(beta glycan)及 NG-2 聚糖(含硫酸软骨素链)等。这些蛋白聚糖的核心蛋白可分为三个区域,即氨基末端细胞外结构域、跨膜结构域及胞浆结构域。糖链都是连接在细胞外结构域上。另一类是通过与膜上的糖基磷脂酰肌醇共价结合而锚定在细胞表面上,因而称为糖基磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican)。近年来在神经系统中发现的脑蛋白聚糖(cerebroglycan)也属于此类。

2.5.2.2 蛋白聚糖在神经系统中的作用

神经组织有如此众多的蛋白聚糖,它们在神经系统中起什么作用?这是人们感兴趣和关注的问题。从近年来的研究来看,主要涉及以下几个方面。

1. 蛋白聚糖与神经系统的发育

神经系统的发育经历着细胞增殖、分化、迁移、突触形成以及神经回路的建立等过程,内外环境的许多因素对此都有影响。蛋白聚糖既是神经元和神经胶质细胞基因表达的产物,又是构成细胞外环境的主要成分,因而在时间与空间上与神经系统的发育均有密切的关系。早期有关脑组织 GAG 的研究发现脑中存在有透明质酸、硫酸软骨素和硫酸类肝素等,这些 GAG 的相对含量常随脑的形态发生而变化。其中,透明质酸在胚胎期的大鼠脑中含量最高,约占总 GAG 的 60%,出生后则迅速降低。透明质酸是由神经胶质细胞产生的,它具有较强的吸水性,能维持未分化脑细胞之

间的水和状态,从而有利于神经细胞的迁移。在脑组织中,一些蛋白聚糖的含量、分子大小及糖链的组成常随年龄的不同而变化。例如大鼠脑中的神经聚糖和磷酸聚糖,在出生后7天和成年的变化就是一个典型例子(表2.9)。

表2.9 神经聚糖及磷酸聚糖的年龄性变化

	神经聚糖		磷酸聚糖	
	7天脑	成年脑	7天脑	成年脑
平均相对分子质量 (电泳法测定)	300000	180000	500000	500000
含量(占总CSPG的%)	20%	6%	12%	9%
GAG链的组成				
4-硫酸软骨素	80%	97%	67%	96%
6-硫酸软骨素	20%	3%	33%	4%

Cat-301 蛋白聚糖(以下简称 Cat-301)与视觉神经传导通路发育的关系是一个很有趣的例子。Cat-301 存在于猫的视觉传导通路 Y 细胞的表面,一般围绕在突触终末。有人做过这样的实验,将刚出生的猫(其视觉传导通路还未发育成熟)在遮断视觉的状态下饲养,经一定时间后,检测 Y 细胞区域,发现没有 Cat-301 的出现,这样饲养的猫其视觉发生严重障碍。用同样的条件对神经通路发育成熟的猫进行实验,发现 Y 细胞区域的 Cat-301 并没有减少,其视觉也无障碍。这说明 Cat-301 与视觉传导通路的发育有密切关系,它能诱导向 Y 细胞输入视觉刺激,并能维持 Y 细胞神经通路的稳定性。

2. 蛋白聚糖与神经突起的生长和延伸

神经元的突起关系到中枢神经内的神经通路和神经网络的形成,以及分布到全身神经的通路形成。神经元突起分为树突和轴突两种。树突呈树状分支,它可接受刺激并将冲动传向胞体;轴突

呈细索状,末端分支称终末,轴突能将冲动从胞体传向终末。近年来多数研究发现蛋白聚糖对神经突起的生长和延伸具有调节作用。硫酸类肝素可促进神经突起的生长和延伸,它还能与细胞外其他生物大分子例如层粘连蛋白,神经粘附分子以及碱性成纤维细胞生长因子等相互结合而共同发挥作用。脑蛋白聚糖是未成熟脑特异的表达产物,现已发现它对轴突的生长具有导向(pathfinding)作用,使轴突按特定的方向进行延伸。与此相反,硫酸软骨素蛋白聚糖则显示抑制作用,例如神经聚糖、NG-2聚糖及磷酸聚糖均能抑制神经突起的生长。蛋白聚糖对神经突起的这些作用可能对探讨神经损伤后的再生具有重要意义。例如有人曾报道,用软骨素酶将硫酸软骨素蛋白聚糖的GAG链切除,对中枢神经轴突的生长便不再起抑制作用,反而起促进作用了。

3. 蛋白聚糖与突触的形成

突触是神经元之间或神经元与感受细胞之间的机能联系部位,是神经信息传递的关键结构。从一个神经元向另一个神经元传递电讯号的突触称为电突触。通过神经递质(例如乙酰胆碱)在细胞之间传递神经信息的突触称为化学突触,化学突触最为普遍,典型的代表是从运动神经元向肌肉细胞传递信息的神经肌肉接头。神经肌肉接头的重要结构是其突触后膜,它常集聚着大量的乙酰胆碱受体,从而能有效地将神经信息传递至肌肉细胞。现已知运动神经元合成和分泌一种含硫酸类肝素的蛋白聚糖,称为乙酰胆碱受体集聚因子。此种聚糖是介导和触发乙酰胆碱受体集聚的主要成分,并对维持突触的结构发挥作用,所以它与突触的形成有密切关系。

与神经肌肉接头相比,中枢神经系统中突触的形成更为复杂,大量的神经递质和受体参与。即使这样,近年来在人和猿的小脑皮质突触前神经末端已鉴定出一些蛋白聚糖,这提示在中枢神经系统的突触形成中,蛋白聚糖可能也具有一定的作用。

4. 蛋白聚糖与脑的老化

一种发生于老年人群的退行性脑病称为 Alzheimer 氏病, 又称为老年性痴呆。据调查, 在 65 岁以上的老年人口中, 本病的发病率约为 5% ~ 10%, 已成为影响老年人精神健康的重要问题之一。本病的病理特征是细胞内神经纤维缠结及细胞外老年斑。构成老年斑的主要成分是 β 淀粉样多肽, 它是由一种分子量更大的淀粉样前体蛋白经水解剪切生成, 并进一步沉积形成纤维和斑块。近年来多数研究发现在老年斑中存在有蛋白聚糖, 主要是硫酸类肝素。此外, 在斑块和神经纤维缠结的周围还发现了饰胶聚糖。应用实验性动物模型进行研究, 发现在淀粉样物质沉积之前, 往往先出现硫酸类肝素合成量的增高, 因而认为蛋白聚糖的变化可能在早期发病机制中起着重要的作用。已有许多证据说明硫酸类肝素蛋白聚糖可与淀粉样前体蛋白结合和相互作用, 这种相互作用可形成一系列生化级联反应, 导致淀粉样物质的进一步沉积, 最终发生突触变性。因此, 人们提出如能设法纠正脑组织蛋白聚糖的代谢紊乱, 可能是预防和治疗老年性痴呆的重要策略。

李晋萍

田梦玉

3 糖链与疾病

3.1 免疫球蛋白分子糖链的异常 与自身免疫疾病

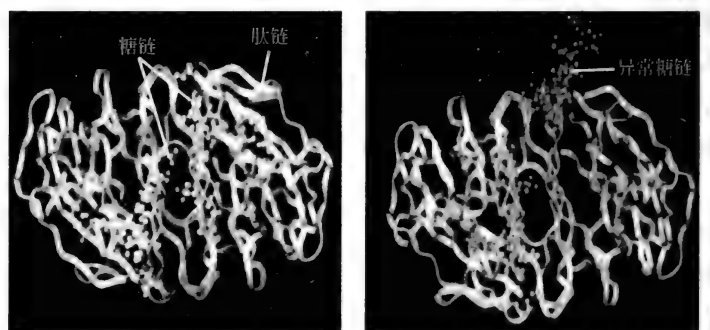
蛋白质是机体内含量丰富、功能最活跃的生物大分子物质。它既是构成细胞的基本成分,同时还执行着许多与生命休戚相关的生理功能。当蛋白质与糖通过共价键结合在一起时,就形成了糖蛋白。体内绝大多数的蛋白质都是以这种方式存在的。糖蛋白分子上的糖链的结构极其复杂和微妙,蛋白质由于所结合的糖链的数目、种类及糖与糖之间的连接位置不同,其性质和功能也大相径庭。人类对蛋白质研究起步早,且由于蛋白质本身分子大,结构功能复杂多样,使人们长期只重视糖蛋白分子中的蛋白质部分。随着糖分析技术的不断发展和进步,逐渐明确了糖链在维持蛋白质结构、性质及功能上的作用。糖链异常与疾病发生的直接相关性日益受到重视,取得了令人瞩目的研究成果。由此促进了糖病理学的崛起。以下我们通过目前研究较清楚的,由于免疫球蛋白分子的糖链异常引起的类风湿关节炎和肾小球肾炎,来说明糖链异常与自身免疫疾病的关系。

3.1.1 免疫球蛋白糖链的结构和特点

免疫球蛋白(Ig)是体液免疫的主力军,我们常听说的抗体就是指免疫球蛋白。它可以特异地识别并结合抗原,对机体起防御和保护作用。免疫球蛋白包括 IgG, IgA, IgM, IgD 和 IgE 五种。

每个分子都含有两条重链和两条轻链,并通过肽链内的及链间的二硫键连接排列成“Y”型的基本结构,其肽链上都结合有 N-连接或 O-连接糖链,只是各种免疫球蛋白分子上糖结合位点有所不同。糖在各种 Ig 分子中所占的比例不同,如 IgG 分子中,糖仅占 2% ~ 3%, IgA 含糖为 8% 左右,其余各类则一般低于 15%。本文简单介绍 IgG 和 IgA 分子的糖链结构。

IgG 分子蛋白质部分的结构很早就已阐明(见图 3.1),而对与其结合的糖链的结构和功能却所知甚少。直到 1980 年,经过 X 射线晶体结构分析确定了糖与蛋白的连接位点及糖链结构(见图 3.1),取得了突破性进展,才使糖链功能的研究迅速发展和深入。IgG 是通过蛋白质肽链第 297 位上的天冬酰胺(Asn)连接双分支



(a) 正常结构

(b) 类风湿关节炎患者体内异常的 IgG 结构
(图示糖链位置改变由分子内部到外部)

图 3.1 IgG 结构模式图(选自美国科学杂志 1995 年第 269 卷)

糖链(图 3.2a)。糖链部分对 IgG 分子的结构和功能起重要的作用,如维持糖结合位点附近区域结构的稳定性,增强 IgG 分子的抗蛋白酶水解能力,并为保持 IgG 分子与其他物质或细胞的正常结合所必需。

IgA 有 IgA1 和 IgA2 两个亚型,其中 IgA1 为主要成分,在血清中占 80% ~ 90%。两亚型的主要区别之一就是在 IgA1 肽链的特

定位置上,通过五个连续的丝氨酸(Ser)分子结合有五条并列的O-连接糖链(图3.2b),而IgA2及其他种类的免疫球蛋白都没有这种特异糖链结构。IgA糖链具有与IgG糖链类似的维持蛋白结构与功能的作用,此外,尚有抗自身分子凝集、抗细胞外基质粘附的功能。

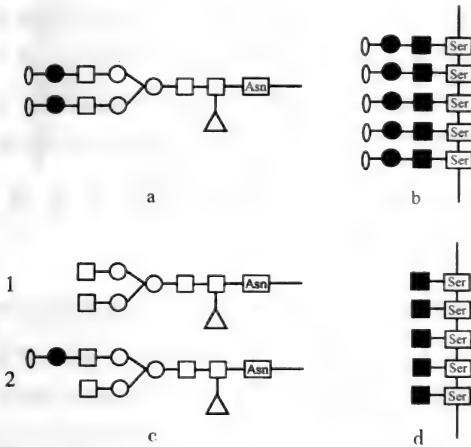


图3.2 正常IgG(a)、IgA(b)和异常IgG(c)、IgA(a)分子糖链结构示意图

○: 甘露糖; ○: 唾液酸; □: N-乙酰氨基葡萄糖; Asn: 天冬酰胺
●: 半乳糖; △: 岩藻糖; ■: N-乙酰氨基半乳糖; Ser: 丝氨酸

3.1.2 自身免疫疾病

在正常情况下,机体虽然不断受到外界因素(如致病菌等)的侵袭,但由于细胞免疫及体液免疫系统处于严密的防御状态,一旦发现险情,就会采取果断有力的措施,使机体免受其害。免疫系统这种对外来“敌人”的识别和攻击,是建立在能识别自我并耐受的基础上的。换句话说,它不会对自身有用的成分“动枪动炮”,这也是保证机体正常代谢生长和发育的前提。然而,一旦这些有用

的自身成分由于某种原因而改变了模样,则同样可以被免疫系统视为“异己”抗原,而进行攻击,这就叫做自身免疫反应。这种自身免疫反应虽然可以提供一定的保护作用,但它往往处于一种反应过度的状态,针对“异己”抗原产生大量抗体,并由此形成抗原-抗体复合物,再加上“异己”抗原本身对组织器官的破坏作用,就会引起自身免疫疾病,例如类风湿关节炎和免疫球蛋白 A 性肾病。自身免疫疾病种类很多,其中绝大多数的病因及发病机理都还不明确,因而缺乏相应的特异诊断和治本的治疗方法。这不仅使医生感到非常棘手,更给患者身心带来很大痛苦和负担。

3.1.3 免疫球蛋白糖链异常是自身免疫疾病的“罪魁祸首”

类风湿关节炎是医学上的常见病,其发病率高达 1%,多在壮年(20 岁~45 岁)发病,其典型的临床症状为发病初期双侧对称性关节疼痛和僵硬,特别在早晨明显,急性期还伴有有关节红肿。由于反复发作,逐渐加重,可使关节周围肌肉萎缩及关节变形(图 3.3),严重时使病人活动受限,甚至生活不能自理。据国外资料统计,有 10% 的类风湿关节炎病人在发病的几年内丧失劳动力,造成很大的家庭和社会负担。医学界称类风湿关节炎为“不死的癌症”。

经过糖生物学家多年的研究发现,原来导致类风湿关节炎发病的元凶,是糖链末端仅仅少了一个或两个小小的半乳糖单位的 IgG 分子。IgG 分子双分支糖链末端两个半乳糖均缺失为 IgG0 型(图 3.1c1),而只有一个糖链末端半乳糖缺失的是 IgG1 型(图 3.1c2)。1985 年,日本东京大学的木幡阳教授等发现,类风湿关节炎病人血清中 IgG 糖链的半乳糖含量明显低于正常人,并由此提出了糖病理学的概念,建立了糖基础研究 with 临床病理相结合的交叉学科。其后,IgG 糖链变化与类风湿关节炎病理的关系,又通过

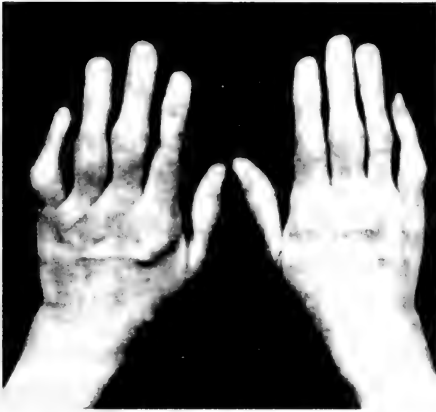


图 3.3 类风湿关节炎病人典型的骨关节畸形

动物模型及许多实验室大量病人血清及关节腔液中 IgG 糖链结构的分析,进一步得到证实。1997 年,阿何(K. Aho)发表了一篇很有说服力的文章。他们对芬兰 19518 名健康体检者 20 年前血清 IgG 的水平,及 20 年来这些人中患类风湿关节炎人的血清 IgG 的水平,进行了统计分析研究。结果显示患类风湿关节炎病的人血清 IgG 浓度升高,推测升高的 IgG 可能为异常的 IgG1 和 IgG0 型。

为什么 IgG 糖链异常会引起这么严重的风湿关节炎呢?人们从多方面来说明其原因,如 IgG 去半乳糖后暴露出新的末端糖基(N-乙酰葡萄糖胺),就变成了异己抗原,从而诱发生成自身抗体,因此又称类风湿因子。IgG0 和 IgG1 可与类风湿因子形成的较大抗原-抗体复合物,并在关节腔内沉积,引起关节炎。还从对病人血液的分析中了解到,肝脏结合和处理去半乳糖型 IgG 的能力降低,在血液循环中滞留时间延长,增加了它们作为异己抗原的作用时间。此外,去半乳糖后糖链的空间排列方式发生了变化,显露出原来被它覆盖的蛋白质表面区域,使该区域与一种有激活补体作用的蛋白质(甘露糖结合蛋白)的结合增加,由此激活补体,更加

剧炎症反应。

肾小球肾炎又称 IgA 肾病,是一种病变起源于肾小球的疾病。肾小球是构成肾脏——机体“过滤器”的基本元件。IgA 肾病典型的病理变化是肾小球基底膜及系膜上有大量 IgA 沉积。这种疾病的临床表现极为复杂,如反复发作的肉眼血尿、蛋白尿、高血压,甚至出现肾功能不全等。根据临床肾活检病人随访资料的统计说明,约 20% 的 IgA 肾病患者可出现进行性肾功能不全,并导致尿毒症而危及生命。大量研究表明: IgA 肾病病人血清中升高的 IgA 及肾小球上沉积 IgA,主要是异常的 IgA1 亚型,其与正常的 IgA1 分子的糖链结构的差别也是末端的半乳糖缺失(图 3.4)。

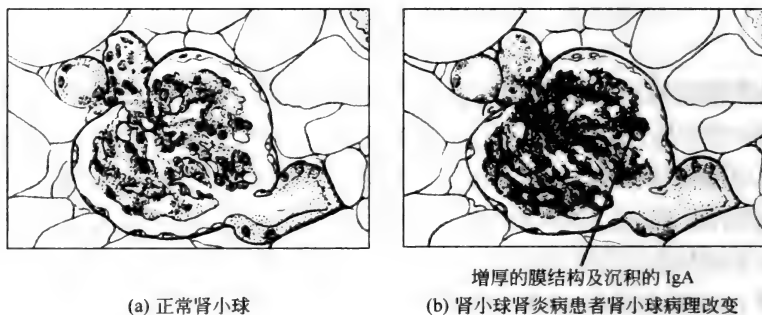


图 3.4 肾小球结构示意图

3.1.4 免疫球蛋白糖链异常在自身免疫疾病诊断中的应用

如果能在类风湿关节炎发病的一年半内给予及时治疗,使症状得到控制,则可避免关节不可逆损伤的严重后果。可见特异的类风湿关节炎早期确诊的方法,是控制病情发展,争取较好预后的关键。目前,临床常用的类风湿关节炎的实验室诊断方法,包括 C

反应蛋白、血沉和类风湿因子检测等,均因特异性不高或出现较晚,而不能达到早期确诊的目的。由于血清去半乳糖型 IgG 的变化可先于临床症状出现,并直接反映了关节的损伤程度,与病情复发、治疗效果观察及预后判断等均密切相关,是一个理想的客观诊断类风湿关节炎的指标,所以可作为建立实验室检查方法的凭据。

IgA 肾病与类风湿关节炎一样,也面临着早期确诊困难的问题。目前,临床常规实验室检查方法是测定血清 IgA 水平及补体水平。然而,血清 IgA 在许多疾病中均可升高,如结缔组织病、溃疡性结肠炎、其他继发性肾小球疾病等,都有血清 IgA 的异常。同样,一些免疫性疾病和感染性疾病,也表现出补体水平的变化。所以这两种指标也都缺乏诊断的特异性,并且还和病情、肾病理等无明显相关性。当今确诊 IgA 肾病的惟一方法是进行肾活检穿刺术取得肾组织,以通过光学显微镜、免疫荧光及电子显微镜分析来下定论。但由于肾活检是一种创伤性手术,有一定的危险性,可引起血尿等并发症,同时手术费用昂贵,所以常不被病人所接受。

如何将这两种自身免疫疾病糖病理学的研究成果应用于临床诊断的实践呢?这两种疾病所涉及的异常免疫球蛋白均表现为末端半乳糖缺失,只是各自新暴露出来的糖基不同,因此,都可选择能特异和糖基反应的蛋白质——凝集素为探针,测定不同凝集素识别新暴露的糖基。这种方法只需采取病人少量血清即可达到目的。我们实验室目前正积极开展这方面的工作,以望能尽早成功为临床服务。

3.1.5 自身免疫疾病的糖药物治疗及展望

自身免疫疾病目前尚无满意的治疗方法。用透析方法去除病人血清中的免疫球蛋白分子的方法虽有助于病人症状的暂时缓解,但会使病人血清中的 IgG 和 IgA 水平降低,削弱了免疫球蛋白正常的免疫功能。也可采用静脉输入正常免疫球蛋白的方法,以

纠正病人血中 IgG 的质和量,中和病人体内的自身抗体,并抑制补体介导的免疫损伤等。这种方法的效果虽较好,但可能引起交叉感染、异体反应等副作用。

糖作为一种分子表面的“识别标志”,参与体内许多正常生理及病理过程。糖病理学的研究为应用糖类药物治疗自身免疫疾病的设计和开发提供了新的思路。如针对类风湿关节炎中的 IgG 及肾病中的 IgA 异常改变,可通过化学修饰法,对它们的糖结构“再塑”,即把病人血中的免疫球蛋白进行体外糖链末端半乳糖化,把处理后的免疫球蛋白再回输给病人,设想会有满意的治疗效果。另外,由于 IgG 分子的半乳糖是经 β -(1 \rightarrow 4)半乳糖基转移酶催化加到糖链末端的,而 IgA 分子的半乳糖是由 β -(1 \rightarrow 3)半乳糖基转移酶催化完成的,而且已有文献指出,这两种酶在各自疾病中表达的水平降低。因此,人们已开始对有关酶基因的调控进行研究,以期用于基因治疗。总之,从病因、诊断及治疗等方面来深入研究自身免疫疾病,是糖病理学在生物医学中开辟的一个新领域,具有重要的理论和实际意义。

朱正美

3.2 糖蛋白中糖链结构异常和恶性肿瘤的诊断

3.2.1 良性肿瘤和恶性肿瘤

肿瘤是人体器官或组织中长出来的瘤子或肿块,有良性和恶性两种。良性肿瘤长到一定程度不再长大,没有致命性;而恶性肿瘤则不受控制地疯长,如果不及时治疗,恶性肿瘤不但会在原来所在的器官或组织中不断增大,引起该器官或组织的功能衰竭,还能

从原来的部位(称为原发灶)转移到别的器官,形成转移性病灶,又称转移性肿瘤或继发性肿瘤。恶性肿瘤又可以其发生的器官或组织分成两类,一类是从上皮、腺体等细胞恶变而来的,称为癌;另一类是从肌肉、结缔组织中发生的,称为肉瘤。白血病是血液细胞的恶性肿瘤,血细胞不属于上皮细胞,其恶性肿瘤不应称为癌,但一般非医务工作者为通俗起见,把白血病称为“血癌”。

目前我国人口中,死亡率最高的疾病是恶性肿瘤,其次是心、脑血管疾病,我国最常见的恶性肿瘤包括食道癌、胃癌、原发性肝癌、大肠癌、鼻咽癌、肺癌和乳腺癌。

人们一提起恶性肿瘤就“谈虎色变”,认为是不治之症,一旦得了恶性肿瘤就等于宣判死刑。实际上,许多恶性肿瘤通过手术切除、放射线照射、化学药物或生物制剂治疗等手段是可以治愈的,关键在于早期诊断。如果能将人体内的恶性肿瘤在早期,即肿瘤很小的时候就发现出来,就可以争取时间,及早治疗,把恶性肿瘤杀死于襁褓之中,挽救病人的生命。

3.2.2 恶性肿瘤的诊断

除了体格检查有时可发现一些体表或腔道的恶性肿瘤,如皮肤癌、直肠癌、宫颈癌,现代科学已研究出很多方法来诊断恶性肿瘤,包括物理学方法、生物化学方法和免疫学方法等。物理学方法有X射线(可加上造影剂)、超声波、断层扫描(CT)、核磁共振(NMR)等科学仪器来发现肿瘤,还可知道肿瘤的大小和位置(称为定位)。但有时候难于鉴别被发现的肿瘤是良性的还是恶性的?也无法确知肿瘤的恶性程度。生物化学方法必须采取病人的体液,其中主要是血液,有时也可以是尿液、脑脊液或肿瘤局部的渗出液,然后用化学手段测定体液中某些成分,例如蛋白质和酶等有无异常,即有没有高于正常人或低于正常人。免疫法方法也要采集病人的体液,测定体液中某些抗原成分的异常(增高或降

低)。所用的测定试剂是针对所要测定抗原的特异性抗体,后者能与对应的抗原发生特异性结合反应。人们可以根据结合反应的有无和强弱来测知体液中抗原的有无和多少,判断病人是否可能患有恶性肿瘤。生物化学和免疫学方法的优点是有益于区别良性肿瘤和恶性肿瘤。因为良性肿瘤的情况下,体液中被测定的成分(蛋白质、酶和抗原)往往和正常人无异或略高于或低于正常,而恶性肿瘤病人体液中的被测成分则往往和正常值(或正常范围)有明显差别。这种差别的多少还可用来估计肿瘤的大小或恶性程度。肿瘤越大,越恶性,被测成分的含量和正常值的差别就越大。但生物化学和免疫学方法无法对肿瘤作出定位,如不知道肾癌生在左肾还是右肾,不知道肝癌或肺癌生在左叶或右叶等。所以临床上一般把可以定位的物理学方法和可以探知良、恶程度的生化、免疫学方法结合起来一起使用,就可对肿瘤作出较为准确而完整的诊断,有时还需要采取一小块肿瘤组织,做成切片,染色后在显微镜下观察组织和细胞形态的改变,称为病理学诊断,便可确定肿瘤的细胞类型和分化程度(恶性程度越高,分化程度越低),对临床治疗极有参考价值。

下面主要介绍用生物化学或结合免疫学方法来测定肿瘤病人体液中糖蛋白糖链结构的改变来诊断恶性肿瘤。这种结构改变是一种“质”的异常,所以它的原理并不是利用体液中某一成分“量”的改变,即增高或降低,而是利用这一成分(糖蛋白,更确切地说是糖蛋白中糖链部分)“质”的改变来诊断肿瘤。

3.2.3 从糖蛋白糖链结构异常能够诊断恶性肿瘤

3.2.3.1 什么是糖蛋白

糖蛋白是糖类和蛋白质的结合物。

蛋白质是一种极为重要的生物大分子,由 20 种不同结构的氨

基酸以不同数目(一般至少在 50 个以上)头尾相接且不同前后排列(在生物化学上称为序列)地连接而成,是生命现象的重要体现者。如肌肉收缩靠的是肌肉中的肌球蛋白和肌动蛋白,血液运输氧气依赖于红细胞(俗称红血球)中的血红蛋白,食物消化又仰仗于消化道分泌的有催化作用的蛋白质,称为酶,酶不仅存在于消化液中,在人体细胞内外也无所不在。一切新陈代谢反应,如食物消化后的产物被吸收后转变成人体自身成分,人体成分分解变成代谢终产物以及释放能量提供人体生理活动,都依靠酶的催化作用。蛋白质按其成分可分成两大类,一类是单纯蛋白质,分子中除了氨基酸以外不含其他成分,另一类是结合蛋白质,分子中除了氨基酸组成的蛋白质外,还有一个非蛋白质成分,如这一成分是脂类,就叫做脂蛋白;如果是糖类,就叫做糖蛋白;如果是有色的小分子化合物,就称为色蛋白等。糖蛋白中糖类和蛋白质的结合比较牢固,为共价结合,而脂类和蛋白质的结合比较疏松,为非共价结合。

3.2.3.2 糖蛋白中的糖类

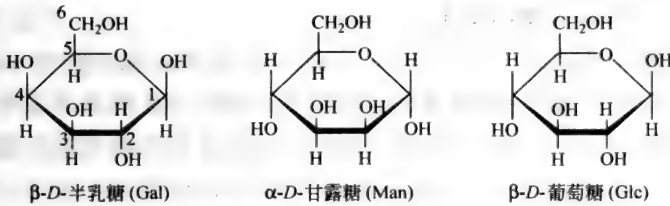
糖蛋白中的半乳糖(简写符号为 Gal)、甘露糖(符号为 Man)、葡萄糖(符号为 Glc)和木糖(Xyl)这四种糖都是 *D*-构型。糖类还有不少衍生物,例如氨基糖(又称糖胺),分子中除 C、H、O 三类元素外,还可含有 N, C、H、O 元素的比例也并非 1:2:1。如氨基半乳糖(又称半乳糖胺, GalN)和 N-乙酰葡萄糖胺(GlcN),它们的分子式是 $C_6H_{13}O_5N$, 其中 C 和 H_2O 的比例就不是 1:1, 因为它们分子中的一个羟基(—OH)换成了氨基(—NH₂)。在糖蛋白中这两种氨基糖总是被乙酰化的,即在氨基的氮原子上再接上一个乙酰(Ac)基团(CH₃CO—),取代氨基中的一个氢原子,故乙酰氨基半乳糖和乙酰葡萄糖胺的分子式是 $C_8H_{15}O_6N$, 因为乙酰基是和氨基中的氮原子(N)相连,故称为 N-乙酰氨基半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺(符号为 GalNAc)和 N-乙酰葡萄糖胺(符号为 GlcNAc)。另一

类衍生物是脱氧糖,如糖蛋白糖链中经常存在的岩藻糖(符号是 Fuc)是脱氧己糖,分子式是 $C_6H_{12}O_5$,它和糖蛋白中其他糖类不同,不是 *D*-型而是 *L*-型。还有一类衍生物称为唾液酸,高等动物体内的唾液酸(符号为 SA)主要是乙酰神经氨酸(符号为 NeuAc),分子式是 $C_{11}H_{19}O_8N$,是神经氨酸(符号为 Neu,分子式为 $C_9H_{17}O_7N$)被乙酰化的产物。唾液酸是一种酸性化合物,所以带有唾液酸的糖蛋白糖链称为酸性糖链,而不带唾液酸者为中性糖链。以上 *N*-乙酰糖胺、木糖、岩藻糖(符号为 Fuc)和唾液酸的结构式分别列于图 3.5 的(b)和(c)。为了方便起见,生物化学家把以上这些衍生物也称为糖类。

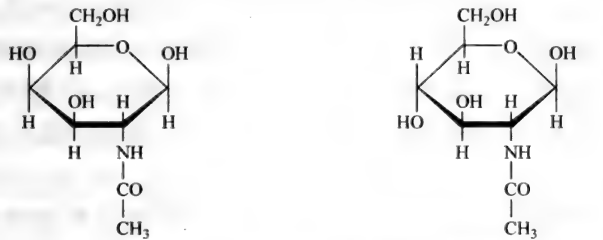
3.2.3.3 糖蛋白中糖链的糖类、组成和结构

糖蛋白中所含的糖基最少是一个,最多可达数十个或近百个。这些一个以上的糖基互相连接成链状,称为糖链。糖链可以没有分支也可以有分支。糖链按其和蛋白质中哪类氨基酸连接可分成两类:一类糖链和蛋白质中天冬酰胺(一种氨基酸的名称)中酰胺基团的氮原子连接,称为 *N*-连接型糖链,简称 *N*-糖链;另一类糖链则和蛋白质中的丝氨酸或苏氨酸中的氧原子连接,称为 *O*-连接型糖链,简称 *O*-糖链。

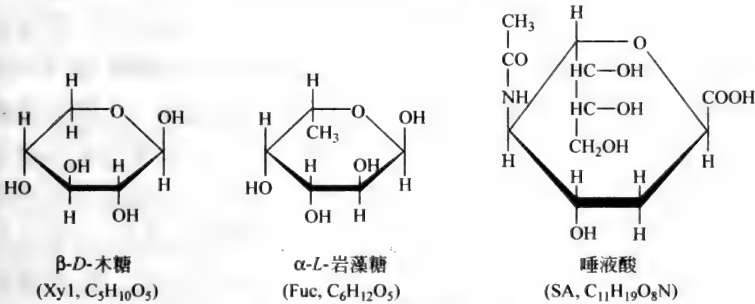
N-糖链都含 Man、GlcNAc 和 Gal 三种糖基,还可含有 Fuc 或/和 SA。但除个别外,不含有 GalNAc。糖链全部有分支,因为每一 *N*-糖链都含有一个分叉的核心部分,由两个 GlcNAc 和三个 Man 共五个糖基组成,称为五糖核心。核心最内侧和天冬酰胺相连接的糖基都是 GlcNAc。有些核心在最内侧 GlcNAc 上还接有一个 Fuc,称为核心岩藻糖(*c*-Fuc),也可在内侧的 Man 上连接另一个 GlcNAc,因其处于两个外侧 Man 之间,有将糖链核心一分为二之势,故称为平分型 *N*-乙酰葡萄糖胺(*bis*-GlcNAc)。两个外侧 Man 可由内向外连接由 GlcNAc 和 Gal 组成的外链,外链的末端或次末



(a) 糖蛋白中的三种六碳糖 ($C_6H_{12}O_6$)



(b) 糖蛋白中的两种乙酰氨基糖 ($C_8H_{15}O_6N$)



(c) 糖蛋白中的木糖、岩藻糖和唾液酸

图 3.5 糖蛋白糖链中各种单糖的结构和构型

端还可以接有 SA 或 Fuc, 也有兼有 SA 和 Fuc。这些外链在糖蛋白的术语中称为天线, 有似电视机的天线一样向外延伸。一条天线组成一个分支, 天线数最少的是 1 条, 常见的是 2 条~3 条, 少

数为4条,但在鸟类中可多至5条。

O-糖链都含有 GalNAc,也可含有 Gal、GlcNAc、SA 或/和 Fuc,但一般不含有 Man。其糖基数和结构都不同,已发现至少有8种不同的核心,常见的O-糖链最内侧和丝氨酸或苏氨酸相连的都是 GalNAc,核心还可含有 Gal 或/和 GlcNAc,可以分支或不分支。外链也可分支。

糖链中每两个糖基之间的连接方式比蛋白质中两个氨基酸的连接方式复杂得多。它们都是通过两个糖基的 OH 基互相连接,脱去1分子 H_2O 而以氧键(—O—)连接两个糖基,但是糖分子的环式结构(见图3.5)可有5个 OH 基(如 Man、Gal 和 Glc),按顺时针方向排序为1、2、3、4、6位,也可有4个 OH 基(如 GlcNAc 和 GalNAc),顺时针排列为1、3、4、6位。一般糖链中外侧的糖基都以第1位和其内侧相邻的糖基相连,只有 SA 例外,以第2位和内侧糖基相连,而内侧糖基与外侧糖基第1位相连的 OH 基可以是第2位、第3位、第4位或第6位,形成1→2、1→3、1→4 或 1→6 连接键;SA 和内侧 Gal 相连则通过2→3 或 2→6 连接键。更复杂的是这些连接键也有立体结构的不同,分为 α 、 β 两种。图3.5中各种糖的环式结构可看作是一个平面,平面周围的 OH 基如处在环的下方,可视为在平面之下,如处在环的上方,可视为在平面之上,其中最右侧第1位的 OH 基如在平面以下为 α -构型,如在平面上则为 β -构型。当此第1位 OH 与另一糖基连接时,就相应地形成 α 键和 β 键。 α 键和 β 键虽然只是立体结构的区别,但却能影响糖类的性质和功能。如米饭中的直链淀粉是由许多葡萄糖以 α -(1→4) 键连接,而棉花纤维中的纤维素却由许多葡萄糖以 β -(1→4) 键连接。我们肠液中的淀粉酶只能水解 α -(1→4) 键,不能水解 β -(1→4) 键,所以只能消化淀粉,不能消化纤维素,这就是“衣服不能当饭吃”的原因。糖蛋白糖链中各糖基的连接也有严格的立体专一性,如天线中 Gal 和内侧 GlcNAc 连接是 β -(1→4)

键(也可 β -(1 \rightarrow 3) 键),五糖核心中 Man 和内侧 GlcNAc 连接以及此 GlcNAc 和最内侧的另一 GlcNAc 连接时也是 β -(1 \rightarrow 4) 键, GlcNAc 和内侧 Man 连接则大多是 β -(1 \rightarrow 2) 键,也可 β -(1 \rightarrow 4) 键或 β -(1 \rightarrow 6) 键,而 Fuc 和内侧 GlcNAc 连接时为 α -(1 \rightarrow 3) 键、 α -(1 \rightarrow 4) 或 α -(1 \rightarrow 6) 键,和 Gal 连接时则为 α -(1 \rightarrow 2) 键。SA 和内侧 Gal 连接时是 α -(2 \rightarrow 6) 或 α -(2 \rightarrow 3) 键。五糖核心中两个外侧分支的 Man 和内侧 Man 的连接分别是 α -(1 \rightarrow 3) 或 α -(1 \rightarrow 6) 键,组成 N-糖链的 α -(1 \rightarrow 3) 臂和 α -(1 \rightarrow 6) 臂。五糖核心以外的 Man 和内侧 Man 的连接则一般是 α -(1 \rightarrow 2) 键。今以最常见的二天线 N-糖链中糖基连接方式为例,表示于图 3.6。

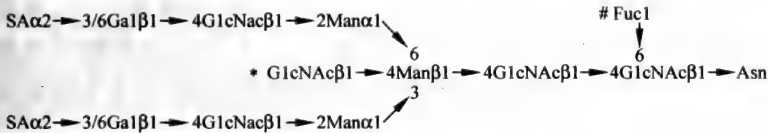


图 3.6 二天线 N-糖链中各糖基的连接方式

3.2.3.4 糖蛋白中糖链的合成

糖链合成主要是在细胞的高尔基体中进行,N-糖链和 O-糖链有不同的合成方式,但有一个共同特点,即糖链的合成没有模板,而和遗传相关的物质 DNA(脱氧核糖核酸)或 RNA(核糖核酸)以及蛋白质生物合成时都有一个模板。如核酸合成时只要按模板(母链)中核苷酸(核酸的组成单位)的序列逐步参入子链的核苷酸就能正确无误地合成子链,蛋白质生物合成时也是按照 RNA 中的核苷酸序列作为模板,以每 3 个相邻的核苷酸决定一个氨基酸的方式逐个地参入不同的氨基酸,使核苷酸序列所包含的遗传信息转变成蛋白质中氨基酸的序列,最后合成由核酸编码的蛋白质。但糖链的合成是由一组糖基转移酶将糖基逐个地转移至糖链上,

使糖链不断延长,糖基加入的顺序决定于高尔基体中这些酶的定位分布。当带有糖链前身的蛋白质穿过内质网和高尔基体时,一些糖苷酶将不需要的糖基修剪切除,定位于高尔基体前部的糖基转移酶先将它所负责搬运的糖基转移至修剪过的糖链前身,定位于高尔基体中部及后部的糖基转移酶再将相应的糖基转移上去,使糖链逐渐延伸,并使其中的糖基具有一定顺序。一个糖基转移酶只合成一个糖基和糖基之间的连接键。如 N-乙酰葡萄糖胺转移酶(GlcNAc T) IV 和 V 两个糖基转移酶分别将一个 GlcNAc 转移至 N-糖链五糖核心 1,3 臂和 1,6 臂的 Man 上,分别形成 β -(1 \rightarrow 4) 键和 β -(1 \rightarrow 6) 键,并使 N-糖链的天线数增多,而 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 III 则将 GlcNAc 转移至五糖核心的内侧 Man 上,合成平分型 GlcNAc,也形成 β -(1 \rightarrow 4) 键。 α -(1 \rightarrow 6) 岩藻糖转移酶(α -(1 \rightarrow 6) Fuc T) 则将岩藻糖转移至糖链最内侧(与天冬酰胺相邻)的 GlcNAc 形成核心岩藻糖(c-Fuc)等。

3.2.3.5 根据糖蛋白糖链结构异常诊断恶性肿瘤的原理

恶性肿瘤细胞和正常细胞的物质代谢有很大的不同,参与代谢的很多酶都发生活力的改变,特别是细胞增殖生长有关代谢过程的酶往往明显增高,使这一代谢过程加快,以适应肿瘤细胞不断分裂增殖的需要。其中糖基转移酶也是一类在恶性肿瘤细胞中活力有明显改变的酶,如前述的 GlcNAcT-IV, GlcNAcT-V、GlcNAcT-III 和 α -(1 \rightarrow 6)-FucT 在大多数恶性肿瘤中均见升高。但也有个别恶性肿瘤中上述四个酶中有些酶反而降低或活力不变,如肾细胞癌。今将 6 种恶性肿瘤中这些酶活力的变化列于表 3.1。

此外,在食道癌、乳癌等癌组织中也见有 GlcNAcT 的活力升高。

表 3.1 恶性肿瘤中 4 种糖基转移酶活力的改变

恶性肿瘤	糖基转移酶活力			
	GlcNAcT- III	GlcNAcT- IV	GlcNAcT- V	α 1,6FucT
原发性肝癌	少数增高	增高	明显增高	升高
胆管癌	明显升高	增高	明显增高	明显增高
胰腺癌	明显升高	明显增高	增高	未测定
肾癌	明显降低	降低	不变	未测定
恶性葡萄胎	增高	明显增高	增高	未测定
绒毛膜上皮癌				
白血病	增高	未测	增高	增高

由于糖链的结构是由参与糖链合成的各种糖基转移酶的活力所决定,某一糖基转移酶活力的增减可以直接影响糖链中某一糖基的多少,所以恶性肿瘤中糖基转移酶活力的变化必然带来细胞合成的糖蛋白上糖链结构的相应变化。如 GlcNAcT- III 活力增高使糖链中平分型 GlcNAc 增多, GlcNAcT- IV 或 GlcNAcT- V 活力增高使糖链天线数增多, α -(1 \rightarrow 6)-FucT 活力升高使糖链中核心岩藻糖增多,这些结构异常的糖链可出现在肿瘤细胞表面的糖蛋白上,使肿瘤细胞表面(细胞膜)的性质发生变化,进而导致细胞粘附、侵袭和迁移能力的改变,这是造成肿瘤细胞具有侵袭性和转移能力的一个重要原因。糖链异常的糖蛋白也可从肿瘤细胞中分泌出来,进入各种体液中。临床上收集病人的体液来测定其中糖蛋白糖链结构的变化,这就是利用糖蛋白糖链结构异常来诊断恶性肿瘤的基本原理。

然而,各种体液中的糖蛋白可来源于不同脏器或组织,如血浆或血清(血清是血液凝固后挤出来的淡黄色液体,实际上是去除纤维蛋白原的血浆)中的糖蛋白,除主要来自肝脏外,也可来源心脏、肌肉或其他组织。尿液中的糖蛋白除主要来自尿路外,也可来自血液。即使来自尿路,也可源于肾脏、输尿管、膀胱、尿道以及男

性生殖系统,如前列腺。那么,怎样知道这些体液中测出的糖蛋白糖链结构异常是来源于哪个脏器或组织,也即反映哪里的恶性肿瘤?另外,体液中有许多糖蛋白,其中只有小部分(可能只有1%或更低)来自恶性肿瘤,绝大部分来自正常组织,其糖链结构并未发生改变,因此我们就很难测定某一体液中全部糖蛋白的糖链异常来诊断恶性肿瘤。这不但劳民伤财,也难于获得阳性结果,因为只有1%或更少的糖蛋白发生糖链结构异常,无法用实验测出(生物化学实验的误差就在1%以上)。要解决上述两个困难,最好的办法就是选择患恶性肿瘤那个脏器所特异分泌的糖蛋白。因为体液中的这个糖蛋白只来源于这一特定脏器,那么这个糖蛋白上糖链结构的异常也就能特异地反映这个脏器的恶性肿瘤。例如血清中有百种以上的蛋白质,其中除含量最多(约60%)的白蛋白是单纯蛋白质外,其他含量虽少,但大部分是糖蛋白,其中约占血浆蛋白20%的免疫球蛋白来自与免疫有关的淋巴细胞,其他就来源于不同的脏器或组织,主要是肝脏,如转铁蛋白(Tf)、铜蓝蛋白(Cp)等。因此转铁蛋白糖链结构若有异常,必定是反映肝脏的病变,因为转铁蛋白是只有肝脏才能分泌的特异糖蛋白,血清中的碱性磷酸酶(ALP)主要来自肝脏和骨骼,分别称为肝型和骨型碱性磷酸酶,这两种来源不同的ALP可用生化方法予以分离而获得肝型ALP,后者也是肝脏分泌至血浆的特异性糖蛋白。还有血浆中的核糖核酸酶(RNA酶)可来自胰腺及肌肉等组织,来自人胰腺的RNA酶也是一种糖蛋白,它催化聚胞苷酸(一种人工合成的核糖核酸)水解的能力比来自肌肉等组织的RNA酶强得多,因此,选用聚胞苷酸为底物(被酶催化的化合物)来测定血浆中聚胞苷酸专一性RNA酶的活力,就可以测定来自胰腺的RNA酶。这一酶上糖链结构的异常就能较特异地反映胰腺的恶性肿瘤。又如尿液中一种糖蛋白—— γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)主要来自肾脏,在男性尚可来自前列腺,但来自前列腺的 γ -GT仅出现在终末尿中(尿流

的最后部分)。如果我们只收集中段尿(尿液的中间部分),就可避免来自前列腺的 γ -GT的混杂,因中段尿中的 γ -GT几乎全部来自肾脏,可以反映肾脏的病变,故测定中段尿中 γ -GT上糖链结构的异常就可以反映肾癌的存在与否。另外,孕妇尿中的一种糖蛋白——绒毛膜促性腺激素(hCG)主要来自孕妇子宫中胎盘绒毛膜的滋养细胞,滋养细胞将hCG分泌入血后,再经肾脏排出,测定尿中hCG糖链结构的异常可以测知胎盘绒毛膜的病变。当然也可测定血中hCG的糖链结构,但收集尿液较收集血液方便,易为病人所接受。当胎盘绒毛膜滋养细胞发生恶性肿瘤后(临床上称为恶性葡萄胎和绒毛膜上皮癌),尿中hCG的糖链结构就会异常。

综上所述,可将几种恶性肿瘤所分泌的糖蛋白上糖链结构异常的机制概括如下:

肝细胞癌→细胞中GlcNAcT-IV、GlcNAcT-V和 α 1,6FucT活力升高→肝中Tf和肝型ALP上N-糖链天线数和核心岩藻糖增多→血浆Tf和肝型ALP上N-糖链天线数和核心岩藻糖增多。

胰腺癌→细胞中GlcNAcT-III、GlcNAcT-IV、GlcNAcT-V活力升高→胰腺RNA酶上N-糖链的平分型GlcNAc和天线数增多→血浆聚胞苷酸专一性RNA酶上N-糖链的平分型GlcNAc和天线数增多。

肾癌→细胞中GlcNAcT-III、GlcNAcT-IV降低→肾中 γ -GT的N-糖链上平分型GlcNAc和天线数减少→尿中(特别是中段尿中) γ -GT的N-糖链上平分型GlcNAc和天线数减少。

绒毛膜上皮癌或恶性葡萄胎→绒毛膜滋养细胞中GlcNAc-IV、GlcNAcT-V增高→细胞hCG上N-糖链的天线数增多及天线分布异常→血清及尿中hCG上N-糖链的天线数增多及天线分布异常。

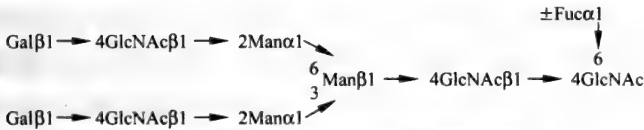
3.2.3.6 测定糖蛋白中糖链结构异常的方法

在阐明了利用糖蛋白中糖链结构异常来诊断恶性肿瘤的原理以后,接下来的问题就是怎样测定糖蛋白中的糖链结构,如何来推测它是否异常?

测定糖链结构的方法在近年来突飞猛进,如各种新型质谱、核磁共振、高效液相色谱和毛细管电泳等方法可微量准确地测出糖链的全部结构,加上各种外切糖苷酶的应用可将糖链中的糖基自外向内一个一个地水解下来,这不但可检测糖链中糖基的组成和序列,还可知道糖基之间连接键的位置和 α 、 β 构型。然而,这些方法都需要特殊而昂贵的仪器,而且手续麻烦费时,不适合在临床化验中应用。目前最适宜于临床诊断上应用的方法是凝集素分析法。

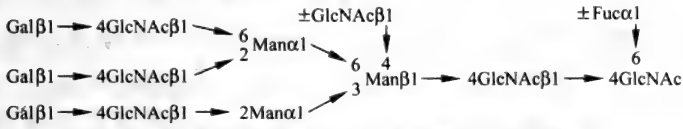
凝集素是一类能专一地结合某一特定单糖或糖链中某一特定糖基序列的蛋白质。这些凝集素主要从各种植物中提取出来,也可来自真菌或动物组织。它们可分别识别不同的糖链结构,包括糖链核心结构、天线数目和分布,以及天线的结构和取代糖基。糖链的结构一旦改变,这一糖基和某一特定凝集素的结合能力也随之增高或降低,人们可利用凝集素的这一性质来检测糖蛋白上糖链结构的异常,今举例说明之。

伴刀豆凝集素(ConA)是刀豆中提取出来的一种凝集素,ConA可和甘露糖或其衍生物,如 α -甲基甘露糖、甘露聚糖结合,也可和糖链中的甘露糖基结合,所以ConA不能和不含甘露糖的O-糖链结合。但它对N-糖链的结合也有结构特异性,只能较弱地结合二天线的N-糖链(图3.7(a)),而不能结合三、四天线的N-糖链,也即当N-糖链1,3臂或1,6臂的两个甘露糖中只要有一个甘露糖的外侧接上两个GlcNAc,形成三天线糖链(图3.7(b)、3.7(c))或两个甘露糖的外侧各自都接上两个GlcNAc,形成四天线



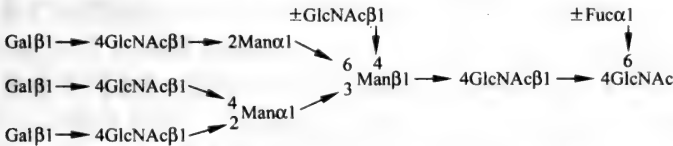
(a) 无平分型 N-乙酰氨基葡萄糖的二天线 N-糖链

ConA 结合, DSA 不结合, WGA 不结合, 如有平分型 GlcNAc 则 WGA 结合, 但 ConA 变成不结合, 如有 c-Fuc 则 LCA 结合



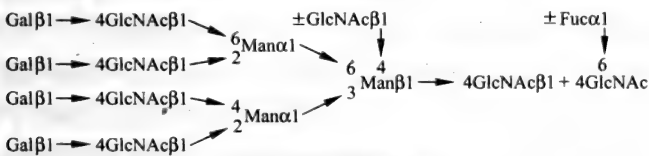
(b) 1,6 臂上有二条天线而 1,3 臂上只有一条天线的三天线 N-糖链

ConA 不结合, DSA 强结合, 如有平分型 GlcNAc 则 WGA 结合, 如有 c-Fuc 则 LCA 结合



(c) 1,3 臂上有二条天线而 1,6 臂上只有一条天线的三天线 N-糖链

ConA 不结合, DSA 弱结合, 如有平分型 GlcNAc 则 WGA 结合, 有 c-Fuc 时 LCA 也不结合



(d) 四天线的 N-糖链

ConA 不结合, DSA 强结合, 如有平分型 GlcNAc 则 WGA 结合, 有 c-Fuc 时 LCA 也不结合

图 3.7 N-糖链天线数、核心结构及其和各种凝集素的结合情况

糖链(图 3.7(d)), ConA 都不能结合。如果 N-糖链上有较多的甘露糖(每条糖链多于三个)则可和 ConA 较强地结合。此外,当糖链核心上带有平分型 GlcNAc 时,也会使 ConA 与之结合的能力下降,但是核心岩藻糖的存在与否并不影响 N-糖链和 ConA 的结合。

曼陀罗凝集素(DSA)是从植物欧曼陀罗种子中提取的一种凝

集素。它所识别和结合的单糖是 GlcNAc, 由 GlcNAc 组成的双糖、三糖或聚糖和 DSA 的结合力更强。对 N-糖链来说, 它所结合的糖链结构和 ConA 相反, 不能结合二天线 N-糖链(图 3.7(a)), 却能结合三、四天线的 N-糖链(图 3.7(b)、(c)、(d))。但 DSA 对不同三天线 N-糖链的结合力也不相同。如糖链 α -(1 \rightarrow 6)臂上有两条天线, α -(1 \rightarrow 3)臂上只有一条天线(图 3.7(b)), 这种三天线糖链就和四天线糖链(图 3.7(d))一样, 能和 DSA 牢固结合(强结合)。反之, 如糖链 α -(1 \rightarrow 6)臂上只有一条天线, 而 α -(1 \rightarrow 3)臂上则有两天线(图 3.7(c)), 这样的三天线糖链和 DSA 的结合就较弱(弱结合)。在 N-糖链的核心上不论是否存在平分型 GlcNAc 或岩藻糖都不影响 DSA 的结合强弱, 但如果糖链的外端有唾液酸处在某些不恰当的位置上, 就会减弱该糖链与 DSA 的结合, 甚至变为不结合。因此当用 DSA 来分析糖链结构时, 一般需用唾液酸酶预先把糖链末端的唾液酸水解除去。

麦胚凝集素(WGA)是从麦胚中提取出来的凝集素, 也能和含 GlcNAc 的糖类结合。对 N-糖链中平分型 GlcNAc 有特殊的亲和力, 往往被用来分析糖链中平分型 GlcNAc 的存在与否, 但 WGA 也能和唾液酸结合, 故兼有唾液酸和平分型 GlcNAc 的糖链和 WGA 结合时就难以分析此结合是由唾液酸引起还是由平分型 GlcNAc 引起。因此, 一般也将糖链用唾液酸酶去除外端唾液酸后, 再进行 WGA 分析。

小扁豆凝集素(LCA)是小扁豆或称兵豆中提取的一种对甘露糖专一结合的凝集素, 它只结合二天线或 1,6 臂上有两条天线而 1,3 臂上只有一条天线的三天线 N-糖链(图 3.7(b))。但它结合 N-糖链的另一要求是糖链必须带有核心岩藻糖, 因此常用来测定 N-糖链中核心岩藻糖的有无。

由于一分子糖蛋白上常有一条以上的糖链, 且各条糖链的结构, 如天线数和核心上取代的糖基可以不同, 这就是糖蛋白上糖链

的不均一性。因此对一条糖链来说,平分型 GlcNAc 或核心岩藻糖是有或无的问题,而对一分子糖蛋白或许多糖蛋白分子来说,就是平分型 GlcNAc 或核心岩藻糖多少的问题。

必须指出:一种凝集素一般只能测定糖链的一种结构,如要测定多种结构,包括天线数、平分型 GlcNAc 或核心岩藻糖的多少就必须联合应用多种凝集素。如用 ConA、DSA 来测定 N-糖链的天线数,再分别用 WGA 及 LCA 测定 N-糖链核心部分取代的平分型 GlcNAc 和核心岩藻糖的多少。

3.2.4 使用凝集素分析糖链结构的方法

3.2.4.1 方法简介

怎样使凝集素和糖链结合?常用的方法有凝集素亲和电泳法、酶标记凝集素探针法和凝集素亲和层析法。后两种方法比较常用,因为方法简便,凝集素的用量比较节省。

酶标凝集素探针法是将凝集素和一个酶(一般是过氧化物酶)相交联,合成酶标记的凝集素。首先,通过抗体亲和柱将所要测定的糖蛋白(如 Tf)纯化,再将纯化的糖蛋白点样于硝酸纤维膜上,形成圆点状,滴上制备好的酶标凝集素溶液,如这个凝集素能与膜上的糖蛋白所带的糖链结合,则在下一步用缓冲液冲洗纤维膜时,结合牢固的酶-凝集素交联物不会被洗掉,再滴上过氧化酶的生色底物,后者被过氧化物酶催化生成有颜色的化合物,使纤维膜上的点样圆点显色。糖蛋白上能和该凝集素结合的某一糖链结构越多,结合上去的酶标凝集素也越多,加酶底物生色后的颜色也就越深。可藉比色法来定量纤维膜上圆点的颜色深度,并用颜色深度代表阳性的程度,从而推出点样品糖蛋白所带糖链中某一结构的有无及多少。如果糖蛋白所带的糖链不被凝集素识别,不能结合,则在冲洗时,滴上去的酶标凝集素就被冲掉,加上酶的生色底

物后由于纤维膜上没有酶标凝集素而没有颜色生成,这就是阴性结果。本法中所用的酶标凝集素犹如一个探针,可以探测糖蛋白上糖链的结构,故称为酶标凝集素探针。

凝集素亲和层析法是将凝集素交联连接于一种称为葡聚糖或琼脂糖的凝胶颗粒上,再将已交联凝集素的葡聚糖或琼脂糖装入一根空心的玻璃或塑料柱中。让要测定糖链结构的糖蛋白溶液流过这含有固定化凝集素的凝胶柱,如果糖蛋白所带的糖链能和该凝集素结合,则被滞留在凝胶柱上,不能和凝集素结合的糖蛋白就被缓冲液冲洗出来。然后再用和该凝集素亲和力特别高的糖类冲洗凝胶柱,使凝胶柱上的凝集素和冲洗液中的糖类结合,把原来已结合的糖蛋白取代下来而冲出凝胶管。例如用 0.02 摩尔浓度的 α -甲基甘露糖可将 ConA 的弱结合糖蛋白部分洗脱下来,用 0.5 摩尔浓度的 α -甲基甘露糖可将 ConA 的强结合糖蛋白部分和 LCA 的结合糖蛋白部分洗脱下来。有时也可用无机酸将结合在凝集素上的糖蛋白洗脱下来,如用 0.01 和 0.05 摩尔浓度的醋酸分别可将和 DSA 弱结合和中度结合的糖蛋白洗脱下来,再用 0.1 以上摩尔浓度的醋酸可将 DSA 的强结合部分洗脱下来。这样,被不含糖类或醋酸的缓冲液洗脱下来的糖蛋白就是不和凝集素结合的糖蛋白,基本上不带有能被凝集素识别的糖链,称为不结合组分,而被含有糖类或醋酸的缓冲液洗脱下来的糖蛋白就是能和该凝集素结合的糖蛋白,带有能被该凝集素识别的糖链,称为结合(包括弱结合和强结合)组分。不结合、弱结合和强结合糖蛋白组分中某一特定糖蛋白可用免疫法或酶活力法予以定量测定,如用免疫法测定 Tf 和 hCG,用酶活力法测定肝型 ALP、RNA 酶和 γ -GT。根据结合组分中这一特定糖蛋白占总量(不结合组分 + 结合组分)的百分比(又称结合率),可以推知其所带糖链中某一结构的有无和多少。

3.2.4.2 应用凝集素诊断恶性肿瘤的实例

1. 原发性肝癌

原发性肝癌是指肝脏细胞本身的恶性肿瘤,而不是其他脏器或组织的恶性肿瘤转移至肝脏形成的继发性肝癌,故原发性肝癌又称肝细胞癌。临床化验中常测定肝癌血清中一种称为甲种胎儿球蛋白(简称甲胎蛋白 AFP)的蛋白质来诊断原发性肝癌的有无和严重程度,因为肝癌细胞能分泌 AFP 入血,而大多转移性肝癌中其他来源的肿瘤细胞不能分泌 AFP。肝细胞癌越大,越恶性,血清中的 AFP 浓度就越高,故 AFP 已成为疑有肝癌病人或肝癌普查时一个必需的检验项目。但是有些肝脏病变,如急性和慢性肝炎,当肝细胞坏死后再生时,也可见暂时性血清 AFP 升高,而且一些肝外肿瘤,如胚胎性肿瘤和消化道癌也会有血清 AFP 的上升,也即血清 AFP 增高不一定是原发性肝癌,这就造成临床诊断上的困惑。现在通过用 LCA 测定 AFP 上的核心岩藻糖就能解决这一难题。因为肝癌中 α -(1 \rightarrow 6)-FuCT 明显升高(见表 3.1),其合成分泌的 AFP 上就有较多的核心岩藻糖,可通过 LCA 凝集素分析法检测出来。原发性肝癌血清 AFP 能和 LCA 强结合,而良性肝病(肝炎)或其他恶性肿瘤所分泌的 AFP 都没有足够的核心岩藻糖能和 LCA 强结合。因此,血清中出现岩藻糖化的 AFP 就成了诊断原发性肝癌的特异性指标。

然而,因引起肝癌的病因不同,约有 30% 左右的原发性肝癌病人血清 AFP 为阴性(即其浓度在正常人的范围以内,低得不能用常规方法测出),这部分肝癌病人如何进行实验室诊断?测定血清中转铁蛋白(Tf)和肝型碱性磷酸酶(ALP)上 N-糖链结构的改变可以解决这一难题。因 Tf 和肝型 ALP 存在于每个人的血清中,这两种蛋白质的阳性率是 100%,并且肝癌病人血清 Tf 和肝型 ALP 都有 N-糖链结构的异常。如正常人血清 Tf 和肝型 ALP 上的

N-糖链几乎 100% 是二天线;而肝癌病人的 Tf 和肝型 ALP 的 N-糖链有一部分变成三天线或四天线,且其中核心岩藻糖增多,其原理已如前述。用 HRP-DSA 酶标凝集素探针法检测 Tf 中的三、四天线 N-糖链,发现约有 64.9% 的原发性肝癌病人血清 Tf 和 DSA 凝集素探针的结合呈中度阳性(++)或强阳性(+++);而转移性肝癌则为阴性。用 HRP-LCA 酶标凝集素探针检测 Tf 中的核心岩藻糖也发现 54.4% 的原发性肝癌呈中度阳性或强阳性;转移性肝癌及肝内良性肿瘤则呈阴性。但一部分消化道肿瘤病人的血清 Tf 对 HRP-DSA 和 HRP-LCA 也呈轻度或中度阳性反应。另一方法是测定血清 ALP 的 N-糖链结构,血清 ALP 可先用 WGA 亲和层析柱将肝型(WGA 不结合组分)和骨性(WGA 结合组分)ALP 分离,再将肝型 ALP 通过 DSA 亲和层析柱,发现正常健康人的血清肝型 ALP 完全不和 DSA 结合,用不含醋酸的缓冲液即可将肝型 ALP 全部从 DSA-葡聚糖层析柱上洗脱下来,即其不结合组分为 100%。急性肝炎病人血清肝型 ALP 有 13.5% (占血清肝型 ALP 总量) 与 DSA 呈弱结合,可用含 0.02 摩尔醋酸的缓冲液从层析柱上洗脱下来;慢性肝炎和肝硬化的血清肝型 ALP 除分别有 4.6% 和 5.5% 为弱结合组分外,另外分别有 18.6% 和 20.0% 的肝型 ALP 与 DSA 呈中度结合,需用含 0.05 摩尔醋酸的缓冲液才能从层析柱上洗脱下来。但不论正常人、肝炎或肝硬化血清的肝型 ALP 中都没有能和 DSA 呈强结合的组分,而只有原发性肝癌病人血清的肝型 ALP 有 7.0% 为 DSA 强结合组分,要用含 0.10 摩尔醋酸的缓冲液才能从 DSA 柱上洗脱下来,另有 21.4% 的中度结合组分和 71.6% 的不结合组分,但却没有弱结合组分。并且 38 例原发性肝癌病人的血清全部都有这一强结合组分,惟多少不同而已(低至 3%,高至 11%),即阳性率为 100%。值得注意的是:大部分肝硬化病人血清甲胎蛋白(AFP)均高于正常,但都没有血清肝型 ALP 的强结合组分。因此,这个只有在原发性肝癌血清中

存在的肝型 ALP 的 DSA 强结合组分就成了诊断原发性肝癌的另一个良好指标。还可用于鉴别肝硬化和原发性肝癌,追踪观察肝硬化病人是否已发展成原发性肝癌。因血清骨型 ALP 不能和 DSA 结合,都存在于 DSA 的不结合组分,因此为测定方便起见,血清 ALP 可不必先经 WGA 层析柱分离肝型和骨型 ALP,而直接上 DSA 层析柱获得上述同样的结果,即只有原发性肝癌病人血清有 DSA 强结合的 ALP 组分。

2. 胰腺癌

胰腺癌细胞中核糖核酸酶(RNA 酶)的 N-糖链中平分型 GlcNAc 和天线数增高,这种带有异常结构 N-糖链的 RNA 酶分泌至血中后,不但使血清 RNA 酶的总活力上升,还可使血清聚胞苷酸专一性的 RNA 酶(来自胰腺)也有上述相同的 N-糖链结构变化。当胰腺癌病人的血清通过 ConA 凝集素亲和层析柱,可发现其结合率明显降低,正常人血清 RNA 酶在 ConA 柱上的结合组分约占 74.7%,而胰腺癌血清 RNA 酶仅为 55.3%。同时胰腺癌组织中的 RNA 酶在 ConA 亲和层析柱上的结合组分也下降(正常胰腺组织为 35.1%,而胰腺癌仅 17.7%),说明胰腺癌中 RNA 酶的 N-糖链天线数也增高。如果换用 WGA 亲和层析柱来分析 RNA 酶的 N-糖链,则发现其结合率增加,结合组分的百分率从正常人血清的 8.5% 增加至 13.7%,说明 RNA 酶 N-糖链核心部分中平分型 GlcNAc 增多。因此,用 ConA 或 WGA 亲和柱层析分析血清 RNA 酶的 N-糖链有可能发展成为一项胰腺癌诊断的新方法,填补国际上胰腺癌生化诊断的空白。因目前国内外用血清 CA19-9(一种糖脂抗原)免疫测定诊断胰腺癌,其假阳性率很高,肝胆系统的癌肿和胃癌也有较高的阳性率,并且小部分胰腺炎病人的血清也有 CA19-9 的中度升高,故 CA19-9 并非胰腺癌诊断的理想指标。

3. 肾癌

和胰腺癌相仿,目前临床上还缺乏一种特异的肾癌生化诊断方法。肾癌病人尿中 γ -谷氨酸酰转肽酶(γ -GT)的N-糖链发生平分子型GlcNAc和天线数减少的变化,这种改变也可用ConA亲和层析柱测定出来。正常人尿中 γ -GT在ConA柱上的不结合、弱结合和强结合组分分别是66.9%、24.1%和14.4%,其中不结合组分的降低有显著的统计学意义。女性肾癌病人尿 γ -GT的不结合组分下降更甚。肾癌经外科手术切除病肾后,尿中 γ -GT的ConA结合率也就恢复正常,其他良性肾脏肿块,如肾囊肿、血肿、血管瘤和肾积水等,其尿中 γ -GT的ConA不结合组分均和正常人尿相仿。由此可见,尿 γ -GT的ConA亲和柱层析也有可能成为诊断肾癌和推测预后的一个指标。

4. 葡萄胎和绒毛膜上皮癌

葡萄胎是胎盘绒毛膜滋养细胞的肿瘤,分成良性和恶性葡萄胎两类。良性葡萄胎呈水泡状,但没有侵袭性;而恶性葡萄胎则有侵袭性,绒毛膜上皮癌(简称绒癌)的侵袭性更大,容易转移至肺部,和恶性葡萄胎同属于滋养细胞的恶性肿瘤。良性和恶性滋养细胞肿瘤的治疗方案在临床上截然不同,前者只要门诊刮宫,而后者则需住院将子宫切除。因此鉴别诊断良、恶性滋养细胞肿瘤就具有重要意义。临床化验上一般采用血清中绒毛膜促性腺激素(hCG)的高低来区别它们的良、恶性,但结果有很多重叠,即某些良性葡萄胎的血清hCG值可以超过恶性葡萄胎或绒癌,或后两者的血清hCG值低于良性葡萄胎。测定尿中hCG则需要收集24小时尿,其结果也有重叠。如果用DSA亲和层析柱分析尿中hCG的N-糖链,只要一次性晨尿即可,且结果很少有重叠现象。正常孕妇尿中hCG在DSA柱上的结合率(即结合组分的百分数)低于15.3%,平均9.7%;良性葡萄胎尿中hCG的DSA结合率为5.9%~23.4%,平均12.9%,和正常值相仿。但恶性葡萄胎中的

hCG 糖链因有天线数增多,其 DSA 结合率可高达 25.6% ~ 72.4%,平均 46.3%,其最低值还略高于良性葡萄胎组的最高值。绒毛膜上皮癌的 hCG 除了天线数增多外,还有天线分布异常,其二天线 N-糖链中的两条天线都连接于核心的 1,3 臂,而 1,6 臂上没有外链,其在 DSA 柱上的结合率更高,可至 33.8% ~ 87.1%,平均 61.9%。由于恶性葡萄胎和绒癌的治疗方案基本相同,所以也没有必要再将两者区别开来,但不论哪类滋养细胞恶性肿瘤,尿中 hCG 对 DSA 结合增强的阳性率都是 100%,明显超过 hCG 浓度测定的阳性率。当恶性葡萄胎或绒癌经治疗后,hCG 的 N-糖链结构逐渐恢复正常,尿 hCG 的 DSA 结合率也随之恢复正常。因此,尿 hCG 的 DSA 亲和柱层析为临床上恶性滋养细胞肿瘤的诊断提供了一个较为特异而简便的方法。

3.2.5 应用糖生物学技术诊断恶性肿瘤的前景令人乐观

利用恶性肿瘤细胞合成的糖蛋白中糖链结构异常来诊断恶性肿瘤是近几年来发展起来的新技术,其优点是:

1. 应用范围广,可诊断多种向体液中分泌糖蛋白的恶性肿瘤,只要选择的糖蛋白是所欲诊断肿瘤的特异性分泌蛋白,就能特异地诊断这一肿瘤。还要选择恰当的凝集素,使其能较专一性识别所欲测定糖蛋白中的糖链异常。

2. 阳性率高,因为它是利用糖链“质”的异常来诊断疾病,只要糖蛋白中糖链结构的改变能影响凝集素的结合率,都能获得阳性结果。

3. 和正常及良性肿瘤重叠较少。

目前,有关这方面的临床应用还刚刚起步,所述及的肿瘤种类还较少,病例也不多,但这项新技术将会在今后几年中飞跃发展,在恶性肿瘤的诊断、鉴别诊断和预后推断上发挥重要作用。然而,

该项技术还有不少问题有待改进,如怎样提高灵敏度以用于早期诊断的问题,以及减少良性疾病的假阳性问题等均有待于进一步研究解决。此外,在糖链结构测定的方法学上也有待于简化,使其能在中小型医院甚至农村医院推广,这就要求广大生化和糖生物学工作者的不懈努力。

陈惠黎

3.3 糖链在癌症发生、发展中的意义及其在抗癌中的潜在价值

3.3.1 糖缀合物的结构和功能

人体中的糖类除了用于提供和储存能量的葡萄糖和糖原(葡萄糖的多聚物)外,还有一些糖类是作为细胞与细胞外基质的结构与功能成分。这类糖不但种类繁多、结构复杂,而且在体内发挥多种多样的生物学作用。它们是与蛋白质或脂类连接形成的复合物,叫做糖缀合物(glycoconjugate),如糖蛋白、糖脂和蛋白聚糖。换言之,在糖缀合物分子中除糖成分外,还有一些非糖成分蛋白质或脂质。参与构成糖缀合物糖链的单糖至少有11种:在动物糖蛋白及糖脂中较常见的单糖,除葡萄糖外,还有半乳糖(Gal)、甘露糖(Man)、岩藻糖(Fuc)、N-乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)、N-乙酰氨基半乳糖(GalNAc)及唾液酸(Sia,又称神经氨酸,NeuAc)等;构成植物糖蛋白的则还有木糖(Xyl)及阿拉伯糖(Ara);构成蛋白聚糖糖链的还有葡萄糖醛酸(GlcUA)及艾杜糖醛酸(IdUA)。由上述单糖通过不同的组合及连接而构成结构繁多的寡糖链或多糖链。

糖缀合物的功能非常复杂,可以说它们参与机体的一切生命活动,如细胞的识别、粘附、存活、增殖、分化、凋亡、迁移、通讯,以

及机体的免疫应答、凝血反应、损伤修复和内环境稳定的调节等各种生理过程。糖缀合物也参与多种病理过程,如细菌、病毒甚至原虫的感染、炎症反应、血栓形成、癌变与癌转移等。糖类以及糖缀合物既然在生命活动中不可或缺,并参与疾病的发生、发展,那么,以糖类为药物就是顺理成章的了。实际上,糖类已被开发为多种药物,如一些抗菌药、抗病毒药、抗艾滋病药、免疫增强药、抗凝药等。糖类在抗肿瘤上也有巨大的潜在价值。

3.3.2 细胞生命活动异常与糖缀合物的结构改变有密切关系

3.3.2.1 细胞的生命活动

细胞的生命活动大致分为“管家”活动及“社会”活动两个方面。“管家”活动包括增殖、分化、凋亡、代谢及功能活动等;“社会”活动包括细胞和细胞之间、细胞和细胞外基质成分之间以及细胞和可溶性生物活性分子(如激素、神经递质、细胞因子、生长因子等)之间的相互作用。

3.3.2.2 细胞表面的糖链是细胞的生命活动中细胞识别的探测器和细胞粘合的连接杆

细胞的“社会”活动以细胞识别(cell recognition)为基础。细胞在相互识别的基础上发生结合、粘合或粘附,并可进一步建立细胞间的通讯或启动信号转导等。而细胞表面的糖链则是细胞识别的探测器和细胞粘合的连接杆。换言之,细胞借助于糖链与肽链(凝集素)及糖链与糖链间的相互作用而进行识别与粘合。细胞的社会活动在胚胎发育及肿瘤转移过程中特别活跃,对于成年人维持机体的稳定状态也不可或缺。

细胞的“管家”活动与“社会”活动是相互依存、相互制约、相

互影响的。二者之间借信号转导(细胞内、外信息的转换)相联系。细胞的“社会”活动通过细胞识别与粘附可以调节细胞本身的“管家”活动。例如,细胞经过细胞表面的一定受体分子上的糖链进行识别而与一定的细胞或细胞外基质成分或可溶性信息分子相互作用,启动一定的信号转导途径,从而影响细胞的存活、凋亡、增殖、分化、迁移等。细胞的“管家”活动由基因主导并主要靠基因产物(蛋白质)的磷酸化作用来调控;“社会”活动主要由糖缀合物主导并主要靠糖基化(糖链结构)来调节。即通过各种糖基化作用而生成不同结构的糖链。所以可以把细胞表面的糖链看作细胞接受信号的天线。天线的改变或异常无疑对细胞社会活动的失控具有决定性的影响。糖链是基因表达的二级产物,也就是说,糖链的生物合成不是基因表达的直接产物,也没有模板,而是通过逐步进行糖基化来完成的。糖基化作用需要各种特异性的糖基转移酶,有的还需要糖苷酶来催化。各种糖基转移酶及糖苷酶按一定的顺序作用,逐步合成多种多样的糖链。诸多参与糖链合成的酶都各是一定的基因的表达产物。细胞表面包括细胞衣、质膜及质膜下结构。细胞质膜是细胞与其外环境的分界膜。在细胞质膜中镶嵌着糖蛋白、糖脂及蛋白聚糖。这些糖缀合物的糖链都伸向细胞外,构成一层毛茸茸的细胞衣。换言之,细胞表面存在十分丰富的连接在膜蛋白或膜脂上的糖链。糖链由于结构多变化,适于储存多种多样的生物识别信息,因而执行重要的细胞识别与粘附功能。细胞表面是细胞与其微环境进行交流与通讯的场所。在这里不单进行细胞内外的物质交换,还进行信息的转换与交流。在细胞表面接受外环境的信息,通过跨膜信号转导将细胞外的信息传入细胞内,最终引起细胞发生一定的效应,影响细胞的增殖或分化、凋亡、迁移、侵袭等;在细胞表面还可将细胞内的信号传到细胞外或释放信息分子到其微环境中,从而直接或间接影响其他细胞。

3.3.3 细胞癌变过程中总是伴有糖链结构的改变

癌症既是细胞病,也是全身性疾病。个别细胞的癌变在生命过程中几乎是不可避免的。然而并非人人必然患癌症。如果癌变的细胞及时被机体的抗癌机制清除,则不会长成为癌瘤。这个过程实际上在绝大多数人的体内经常进行着,因而能克制癌瘤的发生。免疫监视及免疫杀伤是机体重要的抗癌机制。但是,如果机体的抗癌免疫机制受到损害而不够强大,如吸烟、酗酒、过劳、精神打击、感染艾滋病病毒等造成免疫功能低下,则癌细胞便可不受约束地增殖、发展而导致癌症的形成。

细胞的癌变在根本上是由于细胞核中基因组的改变(原癌基因的突变、易位、扩增等所导致的癌基因活化及抑癌基因的缺失或突变而导致的失活)。基因组的这些改变引起细胞的形态、结构、功能以及行为发生异常。其最重要的行为异常是增殖失控(不停的增殖)及侵袭正常组织与发生远处转移。

在细胞的癌变过程中总是普遍伴有糖链结构的改变。在癌变过程中,不少为糖链合成酶编码的基因发生突变或表达异常,或活性异常,从而导致糖链的异常。这些糖链结构的改变可反映在细胞表面的糖蛋白及糖脂,也可反映在分泌的糖缀合物中,而主要是在细胞表面的糖缀合物上。因此细胞表面的改变必然对癌细胞的行为以及癌细胞与癌细胞之间、癌细胞与癌患者细胞之间及癌细胞与细胞外基质成分之间的相互作用产生重要影响。这些影响直接与癌瘤的增大、侵袭与转移相关。因此,癌细胞糖链的改变直接关系到癌瘤的发展与癌患者的预后(生存时间和生存质量)。再者,癌细胞不是一成不变的。由于癌细胞在遗传学上的不稳定性,基因的突变、扩增与丢失不断进行,癌细胞的恶性程度因而不断地发展、演变,而且愈演愈烈。与此同时,细胞表面的糖链也不是一

成不变的。它随癌细胞的发生、发展而变化,因而有人将糖链称为肿瘤发展抗原(ontodeveloping antigen)。不同癌细胞表面糖链的改变固然有所不同,却往往具有一定的规律性变化趋势。例如,糖脂的和糖蛋白 O 连接的糖链往往因糖基化不完全而变短,出现一些在正常细胞中不可见或罕见的糖链结构,如 Tn 抗原(GalNAc α -Ser/Thr)、唾液酸化 Tn 抗原(Sia- α -(2 \rightarrow 6)-GalNAc α -Ser/Thr, sTn)及 T 抗原(Gal- α -(1 \rightarrow 3)-GalNAc α -Ser/Thr)。由于糖链的缩短又往往会暴露出原来被糖链遮盖的一段肽链,从而使富于 O 连接糖链的粘蛋白(mucin)分子上出现新的肽抗原表位,形成肿瘤相关抗原。至于糖蛋白 N 连接的糖链则往往出现多天线的长糖链,因而糖链变大(出现 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 分支的第四天线,并在该天线中存在多聚 N-乙酰氨基乳糖结构,且其非还原末端常常发生唾液酸化及岩藻糖化,形成唾液酸化 Lewis 抗原, SLe)。癌变的细胞,无论糖蛋白或糖脂的糖链都常出现唾液酸化增高的趋势,还可出现多聚唾液酸及多聚唾液酸的内酯化,并常发生唾液酸的 9-O-乙酰化。正像在胚胎发育中糖链可作为分化抗原一样,在癌变过程中糖链的变化也与其去分化状态相关。表 3.2 列举了一些在胚胎组织和肿瘤组织中共同表达的糖链,其中有很多糖链是在胚胎发育的特定时期表达的,在成体不表达,而在癌变时重新表达。这些糖链与细胞分化的调控及细胞表型的关系很值得研究。

表 3.2 在胚胎组织及肿瘤组织共同表达的糖链

肿瘤相关糖链	表达的胚胎组织	肿瘤组织
S-Tn	胚胎结肠粘膜	结肠癌、食道癌、胃癌、乳腺癌
S-Le ^a	桑葚胚	胰腺癌
S-Le ^x	原肠胚	结肠癌、肺癌
多聚唾液酸	NCAM 分子	Wilms 瘤、小细胞肺癌、淋巴瘤
α -(1 \rightarrow 6)-岩藻糖化	20 周以下胎肝	肝癌 AFP 分子

癌细胞具有一些“绝招”来逃避癌患者(即癌宿主)的免疫系统对癌细胞进行识别与杀伤,使癌宿主处于免疫耐受状态。癌细胞的这个“绝招”,就是释放或脱落一些可溶性的糖缀合物,这些物质能发挥免疫抑制或拮抗作用。例如,从癌细胞表面经常大量脱落一些具有显著免疫抑制作用的神经节苷脂(含唾液酸的糖鞘脂)。这种免疫抑制或拮抗作用包括干扰肿瘤相关抗原的加工与呈递、抑制淋巴细胞的增殖,以及消除对癌细胞进行杀伤的细胞毒反应等。此外,从癌细胞释放的一些糖蛋白或粘蛋白(含成簇分布的O连接糖链的糖蛋白),也可以中和癌患者体内相应的抗癌抗体而削弱抗癌免疫反应。人肝癌细胞的标志物——胎儿甲种蛋白AFP就具有广泛的免疫抑制作用,它主要抑制细胞免疫。例如小鼠乳腺癌细胞会产生一种粘蛋白,它们的分子上的T抗原表位可诱导T-阻遏物和淋巴细胞的反应,从而抑制抗癌免疫反应。癌细胞表面的唾液酸化粘蛋白可以遮盖肿瘤相关抗原使其失去免疫源性,或作为癌细胞与免疫系统之间的隔离物而妨碍抗肿瘤免疫反应的发挥。总之,癌细胞往往通过其细胞表面的糖链或释放一些糖缀合物来逃避宿主的免疫监视,当癌细胞的数量够多,即癌瘤达到一定的大小时,便可建立癌患者对癌细胞的免疫耐受,从而使机体丧失对癌细胞的免疫杀伤能力。明白了癌细胞的这个鬼把戏,我们便可以设法来对付它,使它不能得逞而及时被免疫系统消灭。例如,用适当的神经节苷脂合成酶的抑制剂来制止肿瘤细胞产生和释放神经节苷脂,或许就可以消除其对于抗癌免疫反应的抑制作用。

3.3.4 针对癌细胞表面糖链结构改变采取的防治措施

癌细胞糖链的改变直接关系到癌细胞的恶性行为。癌细胞的增殖、迁移、侵袭及转移行为均与细胞表面糖链介导的细胞粘附、

铺展以及由此所启动的信号转导相关。例如, sTn 及某些神经节苷脂就和细胞增殖有关。一些针对癌细胞表面糖链结构的单克隆抗体可有效地抑制肿瘤的生长。例如, anti-Gg3Cer 抗体, 可完全抑制小鼠 T 细胞白血病细胞的增殖; Anti-GD3 抗体用于 12 名黑色素瘤患者, 其中三名肿瘤消退; 还有报告指出, Anti-GD2 抗体能成功地抑制人类神经母细胞瘤。然而, 外源性抗体由于其自身具有免疫原性而往往诱导抗抗体的生成, 故难以直接用于临床治疗。

癌细胞的糖链除与癌细胞的增殖有关外, 大量实验证明, β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 分支的糖链与癌细胞的转移潜能有关。因此, 有人试图用肿瘤细胞糖链合成酶的抑制剂来抗肿瘤转移。例如, Swainsonine (苦马豆素) 是高尔基体甘露糖苷酶 II 的抑制剂。它可抑制癌细胞生成 β -(1 \rightarrow 6)-GlcNAc 分支的第四天线, 在动物实验及临床试验中均证明具有抑制癌细胞转移作用。

癌细胞表面结构异常的糖链可被机体的免疫系统视为非己外来物, 从而成为肿瘤相关糖抗原 (tumor associated carbohydrate antigen, TACA)。癌细胞表面的 TACA 比任何蛋白质抗原都更为丰富。这些在细胞表面暴露的 TACA, 有的是一定的肿瘤类型所特有的, 有的是与肿瘤的发展阶段相关的。也就是说, 不同的肿瘤及同一肿瘤的不同发展阶段可以具有不同的 TACA。它们不但参与癌细胞的识别与粘附, 并与癌细胞的增殖失控、活跃迁移以及侵袭正常组织等恶性行为有关, 而且往往在被动与主动免疫治疗中成为被特异性抗体及免疫细胞识别与攻击的最好的靶分子。

有人曾经认为抗癌抗体有时不但无助于杀伤癌细胞, 甚至还会刺激癌瘤的生长。然而, 近年的研究证明, 无论来自于被动免疫或主动免疫的抗 TACA 糖链的抗体, 都同样具有歼灭血液循环中的癌细胞及微小癌灶的作用。因此, 针对 TACA 的抗体不但有助于肿瘤的诊断, 还能够治疗肿瘤。最近, 人源化的抗体, 特别是通过噬菌体抗体库产生的人源化、高亲和性单链抗体 (scFv), 既避免

了引起宿主产生抗体,又具有很好的识别抗原的活性,故而在治疗肿瘤及预防转移上开辟了新的天地,展现了新的曙光。

以糖链疫苗进行特异性主动免疫治疗近年来已成为一个十分活跃的研究领域。实际上,无论以癌细胞的提取物(如糖脂),还是以化学合成的寡糖作为免疫原,在与一定的蛋白质载体共价偶联成缀合物时,都可以诱导抗肿瘤的主动免疫。即产生针对TACA的特异性抗体及诱导补体介导的癌细胞溶解和抗体依赖的细胞毒细胞溶解。在临床实验中证明对有些癌患者可以延长无瘤生存期及总生存期,少数患者中还可见肿瘤缩小。由此可见,除多肽疫苗和核酸疫苗外,糖疫苗的接种也是肿瘤免疫治疗的一个重要途径。而且,由于TACA以高浓度存在于癌细胞的表面,易被免疫系统识别与攻击。化学合成的寡糖疫苗还具有纯度高、供量无限及便于修饰等优点。特别有意义的是用合成寡糖可以制备多价及多表位免疫原,可望产生较强的免疫反应,并可望针对肿瘤细胞的异质性产生较为广泛的肿瘤细胞杀伤效果。不过,由于这方面的研究刚刚起步,目前所应用的少数寡糖疫苗主要诱导体液免疫,产生的抗体主要为IgM,而IgG较少;细胞免疫也还不够强。随着研究的深入及对免疫原分子结构的透彻了解和免疫佐剂的改进,特别是采用体外培养、诱导分化的树突状细胞及细胞因子(如GM-CSF)作为生物佐剂,糖疫苗具有非常诱人的研究与应用前景。20世纪90年代以来,加拿大、美国、英国及澳大利亚等国相继对卵巢癌、乳腺癌、大肠癌及前列腺癌患者进行了大量的合成寡糖疫苗的实验治疗,取得了令人鼓舞的可喜结果;并证明使用安全,副作用不大,只出现延续数日的局部皮肤反应,个别人出现流感样不适。总的来说,以寡糖疫苗作为抗肿瘤的免疫治疗还处于起步阶段,距在临床广泛应用还有漫长的时日。最近,有人采用TACA的肽模拟物(peptide mimotopes of carbohydrate antigens)作为肿瘤疫苗,激发了很好的抗肿瘤的细胞免疫反应。TACA的肽

模拟物是空间构象与 TACA 相同,并可与抗 TACA 抗体进行特异性反应的短肽。以这种肽模拟物作为疫苗增强了对细胞免疫反应的诱导。然而,设计与制备 TACA 肽模拟物的前提是充分了解 TACA 的结构,并且需要具备抗 TACA 的抗体来检测肽模拟物的结构。因此,对 TACA 结构的透彻研究是设计、制备其肽模拟物所不可缺少的基础。抗肿瘤疫苗诱导的主动免疫不仅可以控制已经形成的肿瘤,提高肿瘤的治愈率,而且可以对易于发生肿瘤的高危人群预防肿瘤的发生并对易于复发的肿瘤防止复发。

需要指出的是,癌细胞表面的 TACA 也可能存在于少数正常组织细胞或出现在胚胎发育或细胞分化的一定阶段。因此无论制备糖疫苗或者糖链的肽模拟物疫苗都必须对 TACA 进行深入、透彻的研究和严格的选择。此外,很多植物及真菌多糖,如人参多糖、香菇多糖、灵芝多糖、猪苓多糖、云芝多糖等,作为免疫增强药一直用于抗癌的辅助治疗,对某些癌患者具有一定的作用。然而,对于很多癌患者却未能收到满意的效果。其原因可能是癌细胞释放与脱落的一些可溶性糖缀合物在作怪。因此研究这些糖缀合物的结构并采取针对性的抑制措施可能是提高免疫增强药物疗效的重要方面。

3.3.5 用癌细胞表面的糖蛋白或糖脂作为 诊断、检测或预后判断的标志物

一些糖蛋白或糖脂可作为某些癌细胞的标志物,用于癌症的诊断、监测或预后的判断。例如,AFP 是肝癌的早期诊断指标;PSA 是前列腺癌的诊断指标;CA-125 是卵巢癌的诊断与监测指标;CEA 可监测结肠癌、乳腺癌及肺腺癌的复发。特别重要的是,癌细胞表面的某些糖链结构的改变具有鉴别良性与恶性疾患的作用。例如,AFP 的 N 连接糖链核心结构 α -(1 \rightarrow 6)岩藻糖基化可将肝癌与肝硬化及慢性活动性肝炎鉴别开;hCG 的 O 连接糖链的

四糖与二糖的比例可鉴别良性葡萄胎与恶性葡萄胎及绒毛膜上皮癌。 γ -GT 的 N 连接糖链上的平分型 GlcNAc 存在于大鼠肝癌,而不存在于人肝癌。一些糖链结构还具有判断预后的意义(见表 3.3)。例如黑色素瘤的肿瘤相关糖抗原为 GD3(正常黑色素细胞的神经节苷脂主要是 GM3)。黑色素瘤的 GD3 含量愈高,存活期愈短。

表 3.3 癌细胞表面糖链的预后价值

糖标志物	癌细胞	预后判断
S-Tn	各种腺癌	阳性者预后远较阴性者差
β 1,6 分支 GlcNAc	结肠癌、肝癌	晚期癌症
SLe ^x -Le ^x	结肠癌	晚期癌症,肝转移
Le ^x (SSEA-1)	尿道膀胱癌	转移倾向高
	食道癌	淋巴结转移
Le ^y	食道癌	预后不良
Le ^a	食道癌	侵袭癌
Le ^b	乳腺癌	晚期癌症
ABH 组织血型抗原	结肠癌	转移倾向低
	尿道膀胱癌	早期癌症
A/B 抗原丢失	头颈及子宫颈鳞癌	预后差,恶性程度与丢失程度一致
	非小细胞肺癌	预后差
GM3/GD3	黑色素瘤	比值与存活时间长短正相关
多聚唾液酸	小细胞肺癌	含量高者易转移
HPA	乳腺癌、胃癌	阳性者预后差
LTA	尿道膀胱移行细胞癌	阳性者预后差

此外,大量产生粘蛋白的肿瘤,如结肠癌、Wilms 瘤,预后不良。

癌细胞的恶性之所在主要是增殖与凋亡脱离了正常的控制,

并可侵袭正常组织和发生远处转移(播散)等。癌症之所以可以致命主要不在于癌瘤迅速而不断地长大,而在于其侵袭性与转移性。换言之,癌细胞转移是夺去癌患者生命的根本原因。不单在癌症的发展过程中可自发的发生广泛转移,而且在对癌症进行常规诊断与治疗的过程中也有可能人为地促进癌细胞的转移(医源性转移)。例如,进行诊断性针吸及手术切除肿瘤时可能发生肿瘤细胞的种植;化疗、放疗时损伤患者免疫功能也可能促进癌细胞的扩散。癌细胞转移是一个多步骤的复杂过程。幸运的是,大量动物实验证明只要阻断转移过程中的某一个或某几个关键性环节,就可能有效地阻止癌细胞的转移。癌细胞转移的全过程实质上是癌细胞与癌细胞,或癌细胞与癌宿主细胞(例如,血管和淋巴管内皮细胞、血小板及免疫细胞等),以及癌细胞与细胞外基质分子相互作用的一系列复杂过程。细胞之间的相互作用是有选择性的,而不是随机的。即细胞通过其识别能力,来辨别发生作用与不发生作用的细胞。细胞的这种识别功能是由细胞表面糖蛋白(细胞粘附分子及其受体)介导的,并主要是由细胞表面的糖链来执行的。由此可以看出糖链在癌细胞恶性行为中的关键性作用。重要的是,结构相似的游离的寡糖或糖缀合物可以阻断细胞表面的糖蛋白或糖脂上的糖链所参与的生物学作用。这就为用游离的寡糖或糖缀合物来抑制癌细胞的恶性行为提供了理论依据。近年,国内外已有不少实验室致力于研究以寡糖或糖缀合物来抑制癌细胞的增殖、侵袭及转移,并已取得令人鼓舞的结果。例如,一种由唾液酸(NeuAc)、岩藻糖(Fuc)、半乳糖(Gal)及乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)构成的四糖(唾液酸化 Lewis 抗原, SLe^x)或其类似物可以抑制癌细胞的转移。

为什么糖缀合物能抑制癌细胞转移呢?首先要介绍一下癌细胞的转移过程。癌细胞在转移时首先从癌瘤上脱落,侵袭(破坏并穿过)其自身的基底膜而迁移至结缔组织并接近脉管(血管或

淋巴管),破坏脉管壁及其基底膜而进入血管或淋巴管,脉管中的癌细胞相互聚集形成瘤栓,瘤栓粘附于脉管壁的内皮细胞,随之癌细胞破坏并穿过内皮下基底膜而出脉管,然后,在结缔组织中增殖形成易地的转移癌。此外,癌细胞在粘附于基底膜后分泌蛋白水解酶破坏细胞外基质成分。这对于穿过基底膜是至关重要的。 SLe^x 的作用在于抑制癌细胞与脉管内皮细胞的相互作用。尽管这种粘附作用是多步骤的,而癌细胞与内皮细胞粘附的第一步是由癌细胞表面糖蛋白或糖脂分子的糖链末端的 SLe^x 结构所介导的与内皮细胞表面的 E 选择素 (E-selectin) 分子的相互识别与结合。在活化的内皮细胞表面有一种称为 E 选择素的粘附分子。它是一种跨膜糖蛋白,其暴露于细胞外的肽链末端具有凝集素样结构域。凝集素是特异性识别一定的糖结构的蛋白质。E 选择素可识别和结合 SLe^x 糖结构。因而游离的 SLe^x 可以结合于内皮细胞表面的 E 选择素,从而阻断癌细胞与内皮细胞的相互识别与结合,以致阻止癌细胞的转移。糖类抗癌转移的第二个例子是干预癌细胞的糖基化,抑制其转移相关糖链的合成。前已述及,高转移潜能的癌细胞往往合成 β -1,6 分支的 GlcNAc 连接的糖链。尤其是 N-乙酰氨基葡萄糖基转移酶 V (GlcNAc-T V) 的表达增强,活性升高。GlcNAc-T V 是催化生成 β -(1 \rightarrow 6) 分支 GlcNAc 所连接之 N 糖链的关键酶。这一分支的延长生成 N 连接糖蛋白的第四天线。它的存在与癌细胞的转移潜能呈正相关。据此,人们设计了各种途径来抑制这种天线的合成,以抑制癌细胞的转移。例如,通过抑制剂抑制相关糖基转移酶或糖苷酶的活性或通过反义核苷酸阻遏相关酶的表达等。这些策略已在动物实验中取得一定的抗转移效果。糖类抗癌转移的另一个例子是层粘连蛋白总糖肽 (LN-GPs) 的抗转移作用。LN-GPs 可以抑制小鼠的实验性肺转移和实验性肝转移,延长荷瘤小鼠的存活时间。LN-GPs 的抗转移作用是多方面的。作用之一是阻断癌细胞与基底膜的相互作用。前面已经介

绍了癌细胞在转移的全过程中至少需要粘附并穿过基底膜三次。此外,癌细胞的增殖、迁移与侵袭行为也依赖于与基底膜中的某些成分(尤其是层粘连蛋白)的相互作用。因而癌细胞与基底膜的相互作用是癌细胞转移的关键之一。层粘连蛋白是基底膜中的主要功能性糖蛋白,含糖量 25% 左右。LN-GPs 是从层粘连蛋白制品制备的总糖肽,含有层粘连蛋白的一些主要糖链结构。实验证明,通过阻断癌细胞与基底膜层粘连蛋白的相互作用 LN-GPs 可以抑制癌细胞在层粘连蛋白基质上的增殖及迁移,还可以抑制癌细胞侵袭人工基底膜,抑制癌细胞分泌基质蛋白水解酶。再者,高转移潜能癌细胞可在内源性凝集素的作用下相互凝聚。LN-GPs 也可以抑制癌细胞的相互聚集。LN-GPs 不仅抑制癌细胞的上述转移相关行为,而且还可以活化巨噬细胞(一种非特异性免疫细胞),增强其对癌细胞的杀伤。除此之外,一些寡糖也在动物试验中产生一定的抗转移效果。例如,*D*-半乳糖、多价乳糖、一些化学合成的寡糖及肝素(一种硫酸化的氨基聚糖)都分别被证明具有一定的抑制癌细胞转移作用。然而,这些大都还只局限于动物实验研究阶段。其中 *D*-半乳糖已在欧洲进行临床实验,用于胃癌及结肠癌患者防止肝转移取得一定的效果,并延长了癌患者的总存活期。其作用机制可能是输入的 *D*-半乳糖封闭了肝脏中的特异性识别半乳糖的肝凝集素,从而防止癌细胞借助于其细胞表面的半乳糖与肝细胞相互粘附,遂抑制了癌细胞在肝脏中的滞留。至于肝素的抗转移作用可能是通过抑制肝素酶而阻止了细胞外基质,尤其是基底膜中的硫酸类肝素的降解。

3.3.6 针对癌细胞糖链结构异常设计的抗癌疗法

目前治疗癌症的办法主要是外科手术、物理治疗(辐射、冷冻或加热治疗)、化学治疗及生物治疗。化学治疗主要是局部或全

身输注抗癌药物。然而,当前所用的抗癌药物对癌细胞的杀伤大多基于癌细胞的旺盛增殖特性,因而在杀伤癌细胞的同时,常常难以避免地伤害体内旺盛增殖的正常细胞,如骨髓造血细胞及消化道粘膜上皮细胞等,因而往往引起白细胞(通常俗称的白血球)和血小板减少以及恶心、呕吐、厌食等严重的副作用。新思路的化学抗癌药物,例如以诱导癌细胞的分化与凋亡为目标的抗癌药,正在不断涌现。至于生物治疗虽在百余年前就有人尝试过特异性免疫治疗及非特异性的微生物(如新城疫病毒)感染以增强免疫反应,然而仅于近年才得到蓬勃发展。当今的生物治疗包括以下措施:输入抗癌细胞的抗体或与这类抗体偶联的抗癌药、毒素或放射性核素,输注体外激活的免疫细胞(LAK细胞、TIL细胞)和/或激活免疫细胞的细胞因子,通过疫苗诱导癌患者的主动特异性抗癌免疫,注入无毒或减毒的病原体(病毒、细菌)以增强癌患者的非特异性免疫,还有抗肿瘤的各种基因治疗等。近年,癌症的生物治疗虽然发展极快,形成了一些新的构思,并已在动物实验或临床实验中取得一定的效果,但尚未达到普遍的成功,还有待进一步的研究和完善。基于糖类在癌症发生、发展中的作用而拟定的抗癌策略在癌症的化学治疗及生物治疗上开辟了新的局面。需要特别指出的是,同一个肿瘤中的各个癌细胞并不完全相同,即恶性肿瘤细胞存在明显的异质性。因此,欲完全歼灭体内的所有肿瘤细胞采用一种措施常难以奏效,需要多种手段综合实施。针对癌细胞糖链异常的抗癌疗法将越来越显示出其重要性及威力。在这一领域存在着大量的科学问题值得研究和极大的潜力等待开发。

周柔丽

3.4 细胞外基质和疾病

多细胞的生物是由许多细胞有序地联系在一起行使协调统一生理功能的有机体。在高等动物体内,除了某些自由流动的细胞(如血细胞)外,组成某一器官的细胞必须紧密联系在一起,而不同功能的细胞又必须严格隔离,发挥这种联系和隔离作用的物质,称为胞外基质(extra-cellular matrix, ECM)。当机体衰老或出现疾病时,细胞外基质的组成和性质会发生改变,因此研究细胞外基质具有重要的理论和临床意义。

3.4.1 细胞外基质的组成成分

细胞外基质包括不同类型的胶原、蛋白聚糖(PG)、弹性蛋白(EL)和粘连糖蛋白。现分别简介如下:

3.4.1.1 胶原

胶原是一类结构类似的蛋白质,有多种类型。胶原的结构特点是必须含有一个由三条肽链组成的三螺旋(col)。在肽链中含有由G-X-Y组成的氨基酸重复序列,其中G代表甘氨酸,X、Y中之一或为脯氨酸或为羟脯氨酸,所以肽链中甘氨酸应占33%,脯氨酸与羟脯氨酸之和占20%~25%,此外,还含有大量赖氨酸,不过,不含有芳香族氨基酸和半胱氨酸。胶原的肽链较长,由1000个以上氨基酸残基组成。肽链分成中央螺旋区(col)、氨基端的球状蛋白区(NC)和羟基端的球状蛋白区。在球状蛋白区含有端肽和前肽区。

1. 胶原的分类和结构

现已发现的胶原有20多种类型,为避免混淆,分别以罗马字I、II、III编号;三螺旋中的不同肽链则以阿拉伯数字表示,例如

$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 等。例如 I 型胶原由两条 $\alpha 1(I)$ 和一条 $\alpha 2(I)$ 组成,而 II 型胶原是由两条 $\alpha 1(II)$ 组成,所以 I 型胶原的分子可写成 $[\alpha 1(I)]$,而 II 型胶原可写成 $[\alpha 1(II)]$ 。不同类型胶原的组成及结构见表 3.4、图 3.8、图 3.9、图 3.10。

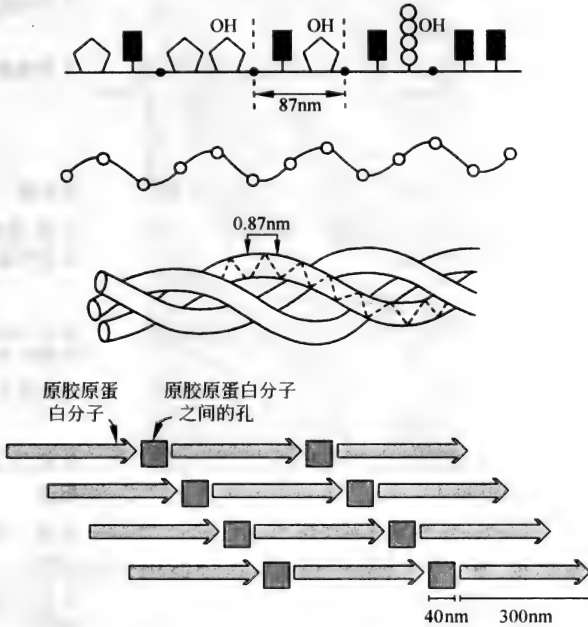


图 3.8 胶原分子与胶原纤维的组成

表 3.4 胶原的类型、分子结构与分布

分类有 α 肽链	分子结构	超分子结构	分布
1. 成纤维胶原			
$\alpha 1(I)$, $\alpha 2(II)$	长 300nm, 直径 45nm ~ 180nm	纤维中有间距 为 67nm 的横纹	皮肤, 骨肌腱等
$\alpha 1(II)$	长 300nm, 直径 10nm ~ 80nm	纤维中有间距 为 67nm 的横纹	软骨

续表

分类有 α 肽链	分子结构	超分子结构	分 布
$\alpha 1(III)$	长 300nm, 直径 5nm ~ 40nm	纤维中有间距 为 67nm 的横纹	皮肤,骨肌腱等
$\alpha 1(V), \alpha 2(V),$ $\alpha 3(V)$	长 300nm	小纤维	多数细胞外周
$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI),$ $\alpha 3(VI)$	长 105nm, 长 450nm	微纤维有间距为 100nm 的横纹二聚体	多数细胞外周
2. 非纤维型胶原			
1) 片层状胶原			
$\alpha 1(IV), \alpha 2(VI)$	长 390nm	无横纹,呈网状	基底膜
$\alpha 1(VII)$	长 450nm,有非螺 旋区插入	二聚体	肌腱、韧带、皮肤和 血管的基底膜
2) 短链胶原			
$\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII)$	< 750 个氨基酸	呈六角形网络	眼中 Descement 膜 动脉内皮细胞
$\alpha 1(X)$	长 130nm	呈六角形网络	过度增生软骨
3. 具中断三螺旋并与纤维相连的胶原 (FACLT)			
$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX),$ $\alpha 3(IX)$	三螺旋部分有非螺旋 区插入		软骨,与 II 型胶原 相连
$\alpha 1(XII)$	短的二螺旋区靠近 C 端, N 端非螺旋区很长		皮肤,与原纤维 相连
$\alpha 1(XIV)$	短的二螺旋区靠近 C 端, N 端非螺旋区很长		皮肤,与原纤维 相连
$\alpha 1(XVI)$	含 10 个 C01 区		成纤维细胞
$\alpha 1(XIX)$			成纤维细胞
4. 多簇形胶原			
$\alpha 1(XV)$	含 9 个 C01 区,有丝氨酸、 甘氨酸重复序列		血管丰富的器官中
$\alpha 1(XVII)$	含 10 个 C01 区		血管丰富的器官中
5. 其他			
$\alpha 1(XIII)$	含 4 个 NC 区		骨、软骨、横纹肌
$\alpha 1(XVII)$	含 3 个 C01 区		跨膜蛋白,皮肤,口 腔角膜上皮的半桥 粒中

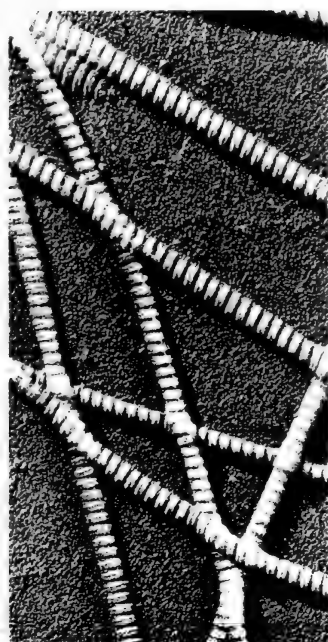


图 3.9 来自皮肤的完整胶原纤维电镜照片

不同类型胶原组成的纤维形态不同。I、II、III型胶原都呈纤维状,但其直径各不相同,分别为 $45\text{nm} \sim 180\text{nm}$, $10\text{nm} \sim 80\text{nm}$ 和 $5\text{nm} \sim 40\text{nm}$;IV型胶原呈筛网状,是细胞基膜的主要成分。

2. 胶原的生物合成

胶原在动物体内分布极为广泛,动物体可以自己合成胶原,合成过程由基因调控。调控胶原肽链合成的基因分子量很大,约含4万个碱基,在转录成mRNA前必须经过剪切,翻译成的肽链还要经过修饰,如羟基化、糖基化、在端肽区形成二硫键等,成为前胶原。当前胶原分泌到细胞外以后,经过前胶原肽酶的作用,去掉前胶原两端的端肽成为胶原分子。

胶原分子内部和胶原分子之间有许多交联键,它们把分子内

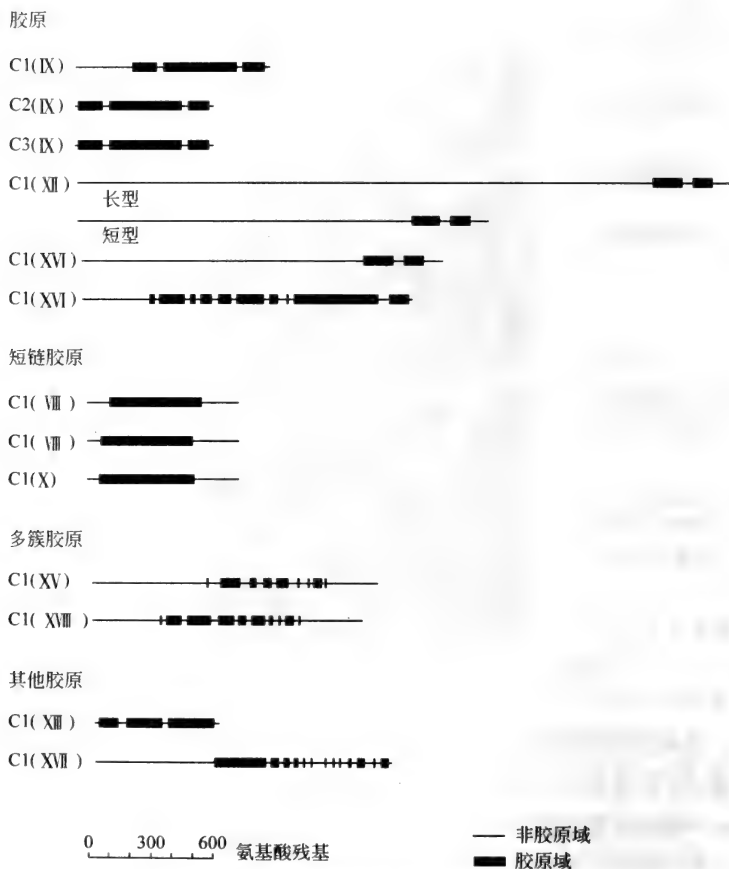


图 3.10 非纤维形胶原的结构示意图

的肽链或胶原分子连接起来。肽链上的赖氨酸分子经氧化成为醛，醛基彼此间，醛基和胺基间可形成多种交联键。这些交联键中最稳固的是吡啶诺林 (pridinoline)，这种结构类似锁链素，能把至少三条肽链交联起来。锁链素是一种弹性蛋白，其分子间至少可形成 4 条肽链之间的交联键。图 3.11 是胶原合成的示意图。

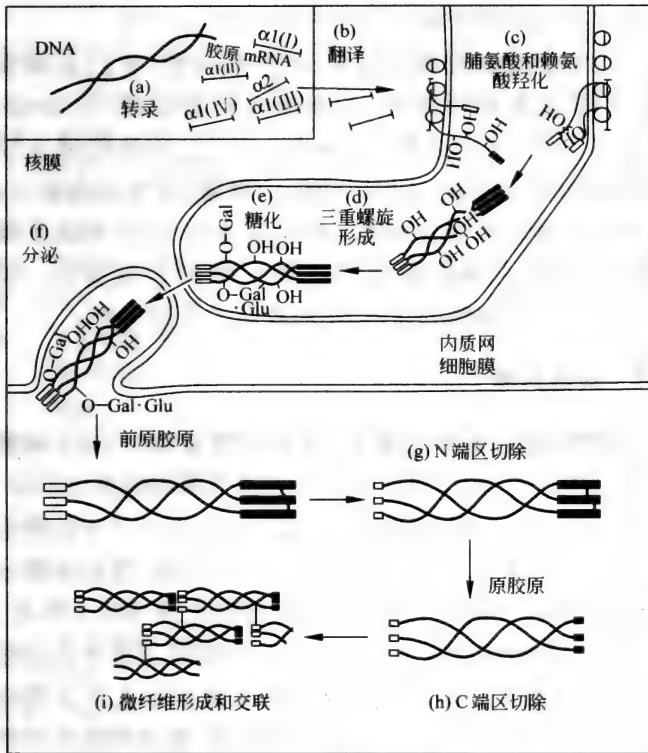


图 3.11 胶原的合成

3. 胶原的降解

胶原分子具有刚性,不易溶于水、酸或碱,一般的蛋白酶也不易将其分解。胶原的生理性转换率远远低于其他蛋白质,其半衰期以月,甚至以年为单位计算。但当机体组织重建时,它的降解速率很快,可以天或小时计算。催化 I 型胶原降解的酶能特异地将 I 型胶原分子(TC)切成 2 个片段 TC A 和 TC BB,它们分别是胶原分子总长度的 $\frac{3}{4}$ 和 $\frac{1}{4}$,切割的位点是在甘氨酸(772)和异亮氨酸(773)之间。胶原分子中有非螺旋结构区(NC),这部分可以被胃蛋白酶、胰蛋白酶降解。一旦非螺旋区被切割后,螺旋结构区

也可以被其他蛋白酶降解。

现在已知的降解胶原的酶有:1)I型胶原,它们是间质胶原酶;2)中性粒细胞型胶原酶(mmp-8);3)胶原酶-3(mmp-13);4)明胶酶A,又称间质溶素(stromelysin)。这些酶能够有效地破坏不同类型的变性胶原,还可以使蛋白聚糖、纤维粘连蛋白、基膜粘连蛋白等多种间质成分降解。在动物体内,也存在胶原酶的抑制剂,例如金属蛋白酶抑制剂TIMMP-1和 $\alpha 2$ 巨球蛋白。胶原酶抑制剂可以对抗胶原酶的作用,维持胶原的代谢平衡。

3.4.1.2 蛋白聚糖

蛋白聚糖(PG)旧称粘蛋白,是由糖胺聚糖(GAG)和蛋白质结合而成。PG与一般以蛋白质组分含量为多的糖蛋白不同,分子中的糖组分含量高于蛋白质组分含量。糖蛋白分子中的糖组分与蛋白质组分不能分离,一旦分离则失去生理功能,蛋白聚糖分子中的糖胺聚糖则可以和蛋白质分离而仍保持生理功能。再者,一般糖蛋白分子中的糖组分多为中性糖类以直链或支链方式连接成寡糖,而组成糖胺聚糖的是由直链连接的有规则的大分子糖链。各种动物的皮和骨中,我国传统的滋补品燕窝、海参和银耳中都含有丰富的蛋白聚糖。

1. 糖胺聚糖的组成和种类

糖胺聚糖旧称酸性粘多糖或粘多糖,它是由一个氨基己糖(N-乙酰葡萄糖胺或氨基半乳糖)与一个己糖醛酸(葡萄糖醛酸或艾杜糖醛酸)组成的二糖为单位,经过硫酸化或乙酰化组成的大分子糖链。它是一种多聚负离子,容易与水分子或正离子相结合。

在人体内常见的糖胺聚糖有7种,它们是透明质酸(HA)、硫酸皮质素(KS)、硫酸角质素(DS)、6-硫酸软骨素(C-6-S)、4-硫酸软骨素(C-4-S)、肝素(HP)和硫酸类肝素(HS)。只有透明质酸不含硫酸基团。它们的组成和分布见表3.5。

表 3.5 哺乳动物糖胺多糖的组成及分布

糖胺多糖 名称	双糖单位		硫酸基团 连接方式	与蛋白链 连接方式	相对分 子质量	主要来源	
	己糖醛酸	氨基己糖					
透明质酸	葡萄糖	N-乙酰葡			1×10^6	玻璃体液、	
	醛酸	萄糖胺			6×10^6	滑液、脐带	
4-硫酸 软骨素	葡萄糖	氨基半	-O-连接	-Gal-Gal-Xyl-Ser	2×10^4	软骨、骨、皮	
6-硫酸 软骨素	醛酸	乳糖			5×10^4	肤、主动脉	
	葡萄糖	氨基半	-O-连接	-Gal-Gal-Xyl-Ser	2×10^4	心脏瓣膜、	
硫酸皮 质素	醛酸	乳糖			5×10^4	软骨	
	艾杜糖醛 酸、葡萄糖	氨基半 乳糖	-O-连接	-Gal-Gal-Xyl-Ser		皮肤、血管、 心脏瓣膜	
硫酸角质素	半乳糖	N-乙酰葡	-O-连接	1) KS I	0.5×10^4	角膜	
				-GalNAc-Asn	2×10^4		
		萄糖胺		2) KS II			软骨
				-GalNAc-Ser(Thr) SA-Gal			
肝素	艾杜糖醛	N-乙酰葡	-O-连接	-Gal-Gal-Xyl-Ser	1×10^4	肺、肥大细	
	酸、葡萄糖	萄糖胺	-N-连接		2×10^4	胞、肝、皮肤	
	醛酸						
硫酸类肝素	葡萄糖醛	N-乙酰葡	-O-连接	-Gal-Gal-Xyl-Ser	0.2×10^4	细胞表面、	
	酸、艾杜糖 醛酸	萄糖胺	-N-连接		1×10^4	肝、肺、血 管、肾	

表中的符号:Gal:半乳糖;Xyl:木糖;Ser:丝氨酸;Thr:苏氨酸;Asn:天门冬酰胺;
GalNAc:乙酰半乳糖胺;SA:唾液酸。

2. 蛋白聚糖的结构

蛋白聚糖的结构多种多样,不同分布的蛋白聚糖结构不同。它们共同的特点是无定形,分子形态高度扩展,具有高度亲水性和高电荷密度,在水溶液中占有较大空间,会排挤其他大分子物质,小分子则可穿透它并被它吸附。蛋白聚糖的功能是作为基质使纤维和细胞分布其中,保留水分、无机盐,提供运输营养物质或废物、化学媒介物和激素等的通道。

蛋白聚糖中的糖胺聚糖以-O-连接或-N-连接方式与蛋白质的肽链连接,被连接的蛋白质称为核心蛋白。核心蛋白再通过连接蛋白与长链透明质酸相连。每个核心蛋白上连接的糖胺聚糖链数目不等。

为了说明蛋白聚糖的结构,现以从牛鼻软骨中提取的蛋白聚糖为例。

牛鼻软骨蛋白聚糖的相对分子质量为 $2 \times 10^5 \text{kD} \sim 4 \times 10^5 \text{kD}$, 它以一条核心蛋白为主干,分成3个不同区段:1)球状蛋白连接区,此区段含有较小的糖分子,即-O-连接寡糖和-N-连接寡糖,糖分子和核心蛋白肽链连接。此区段有两个球状蛋白 G1 和 G2, G1 与透明质酸链直接相连,还有两个较小相对分子质量的连接蛋白,它们的作用是稳定核心蛋白与透明质酸的连接。2)富含硫酸皮质素的区段,此区段含有约 50 条硫酸皮质素链。3)富含硫酸软骨素的区段,此区段含有 50 条~100 条硫酸软骨素链,其中有 C-4-S,也有 C-6-S,两者的含量比例在不同年龄的个体中不同,老年时 C-6-S 增多,年幼时则 C-4-S 较多。在此区段的末端还有一种球状蛋白 G3(见图 3.12、图 3.13)。

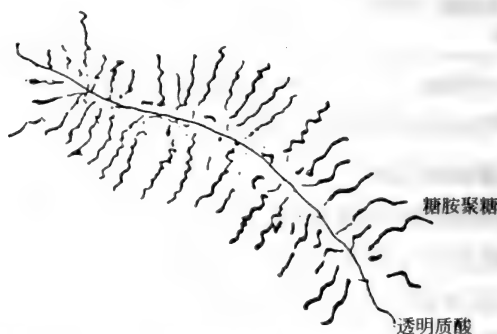


图 3.12 牛鼻软骨蛋白聚糖聚合体的电子显微镜图

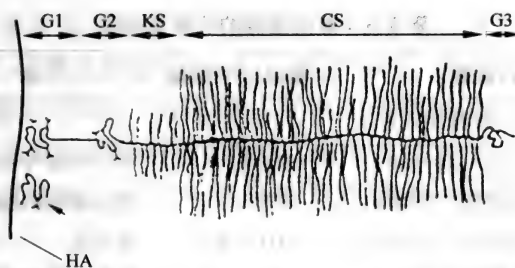


图 3.13 牛鼻软骨蛋白多糖的组成

1 条透明质酸长链可以和 100 条糖胺聚糖链结合,形成大的毛刷状聚合体。这种聚合体就是蛋白聚糖(图 3.11)。蛋白聚糖可吸附大量水分,这就是市场上出售的有护肤养颜作用的保湿因子。球状蛋白 G3 分子中含有一个生长因子样的片段,使蛋白聚糖有生长因子的作用。

3. 蛋白聚糖的分类

根据蛋白聚糖在动物体内的分布,可将它们分为 A、B 两大类。A 类存在于胞外基质, B 类存在于细胞内或细胞膜上。A 类又可分为 A I 型和 A II 型。A I 型是大型蛋白聚糖,其中有可聚蛋白聚糖 (aggrecan)、类肝素蛋白聚糖 (HSPG)、串珠样蛋白聚糖 (perlecan) 和多能蛋白聚糖 (versican) 等; A II 型是小型蛋白聚糖,包括贰聚糖 (biglycan)、修饰聚糖 (decorin) 和纤维蛋白聚糖 (fibromadulin)。贰聚糖的核心蛋白上只有两条糖胺聚糖链,而修饰聚糖只有一条糖胺聚糖链连接于核心蛋白上。B 类蛋白聚糖包括丝甘蛋白聚糖 (serine-glycine proteoglycan) 和倍他聚糖 (Betaglycan)。丝甘蛋白聚糖的核心蛋白的肽链上有交替的丝氨酸和甘氨酸残基;倍他聚糖是转化生长因子的受体 (TGF- β) III 型(表 3.6)。

表 3.6 蛋白聚糖的分类及分布

蛋白聚糖	相对分子质量	分 布
A I (大型蛋白聚糖聚合体)		
可聚蛋白聚糖 (aggrecan)	3×10^3	软骨的胞外基质
类肝素蛋白聚糖 (HSPG)	800	内皮细胞的胞外基质
串珠样蛋白聚糖 (perlecan)	410 ~ 475	基底膜
多能蛋白聚糖 (versican)	780 ~ 860	各种组织的基底膜
A II (小型蛋白聚糖, 富含亮氨酸序列)		
貳聚糖 (biglycan)	50 ~ 200	各种组织的胞外基质
修饰聚糖 (decorin)	50 ~ 200	各种组织的胞外基质
纤维蛋白聚糖 (fibromadulin)	50 ~ 200	各种组织的胞外基质
lumican	50 ~ 200	各种组织的胞外基质
B 细胞内或膜上的蛋白聚糖		
丝甘蛋白聚糖	750 ~ 1000	细胞中的分泌颗粒
倍他聚糖 (Betaglycan)	150 ~ 200	浆膜
	200 ~ 300	
类肝素蛋白聚糖 (HSPG)	150 ~ 250	内皮细胞膜或甲状旁腺膜
syndecan	40 ~ 100	表皮细胞
thrombomodulin	57	内皮细胞

3.4.1.3 粘连蛋白

粘连蛋白是介导细胞与胞外基质成分之间发生粘连的物质。现已发现有多种糖蛋白有这种功能。我们介绍其中两种,即纤维粘连蛋白(FN)和基膜粘连蛋白(或称层粘连蛋白,LM)。

1. 纤维粘连蛋白

纤维粘连蛋白是一种高粘附性蛋白质。在其结构中有不同区段分别与胶原、肝素、细胞、细菌及DNA相结合。它是一种二聚

体,由若干条对蛋白酶敏感的肽链相连接组成。两个亚基的羧基端由两个二硫键连接起来,呈V字形的70°角(图3.14)。每个亚基的分子量为220kD。纤维粘连蛋白在动物体内以三种形式存在:在血浆及其他体液中是可溶性二聚体;相似细胞表面以难溶性寡聚体形式存在;在胞外基质中以难溶性多聚体形式存在(图3.13)。

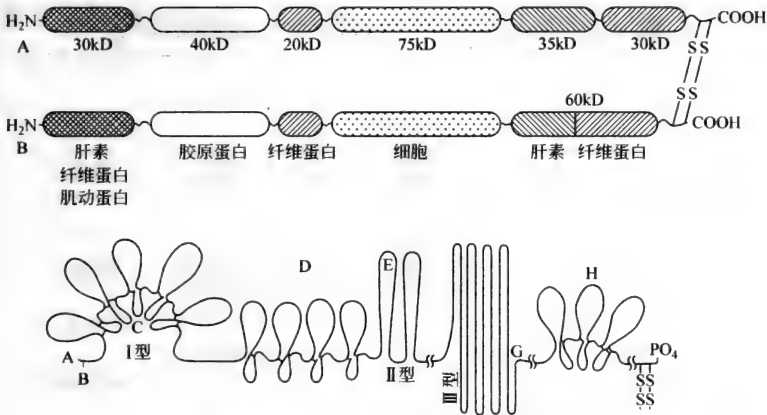


图 3.14 纤维粘连蛋白的结构示意图

纤维粘连蛋白的生物学作用是参与和促进细胞与 I、II、III 型胶原的粘附,促进红细胞和血小板的凝集,参与凝血过程,还能促进细胞的增殖、分化和迁移,引导细胞的趋化性,增强巨噬细胞、单核细胞和多核细胞的吞噬功能,增强免疫功能。

2. 基膜粘连蛋白

基膜粘连蛋白是基膜中的一种成分整合蛋白,相对分子质量很大,为 240kD,该分子由 1 条长臂和 3 条短臂呈十字交叉组成,长臂和短臂的球状区都可以与 IV 型胶原相结合(见图 3.15)。该分子中有与细胞结合的部分,还有与表皮生长因子同源的序列。基膜粘连蛋白是目前所知最复杂的糖蛋白,它与 IV 型胶原和硫酸

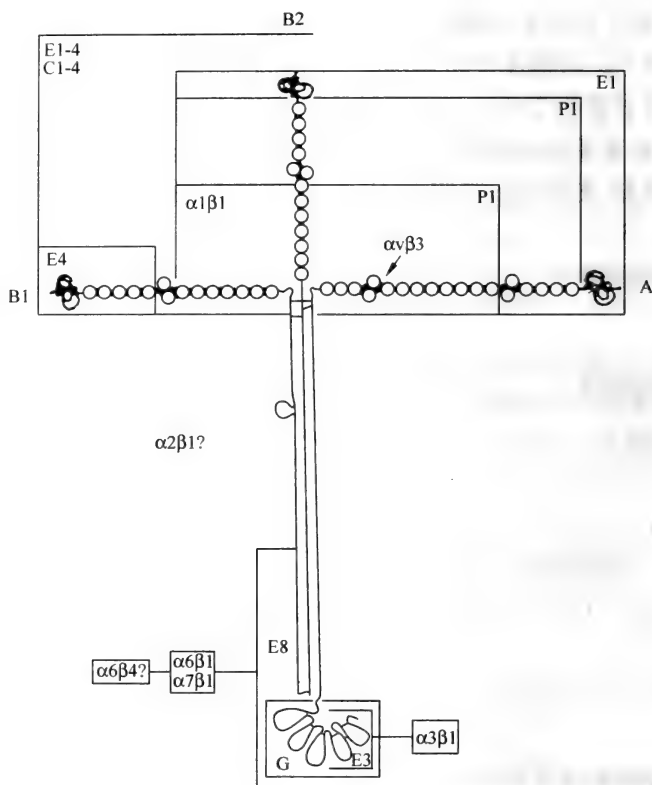


图 3.15 整合蛋白与基膜粘连蛋白的结合点示意图

E: 弹性蛋白酶裂解片段; P: 胃酶裂解片段; C: 糜蛋白酶裂解片段;

G: 球状蛋白区; A、B1、B2: 基膜粘连蛋白组成链; α 、 β : 整合蛋白亚单位

类肝素共同组成基膜。

基膜是位于上皮细胞、基质及内皮细胞之下的一层连续的组织,对细胞提供结构上的支持。基膜由胶原、蛋白聚糖和粘连蛋白组成,其结构可分为3层:1)透明外层,在上皮细胞或内皮细胞之下的电子透明层,宽度为20nm~40nm;2)致密中层,电子密度大,

有细的纤维网,宽度为 20nm ~ 100nm;3)透明内层,宽度不等,处于致密层及其以下的结缔组织之间。基膜粘连蛋白的长臂从基膜的致密层伸展到透明层,其十字交叉部分靠近细胞的质膜,3个短臂折回到致密层。短臂的球形区与IV型胶原相结合。IV型胶原本身交联成筛网状,硫酸类肝素蛋白多糖也参与其中。这种结构虽然还是推测的模式,但符合基膜粘连蛋白、IV型胶原和硫酸类肝素蛋白多糖的结构,这三者的紧密结合,组成了牢固而有弹性的基膜(图 3.16)。

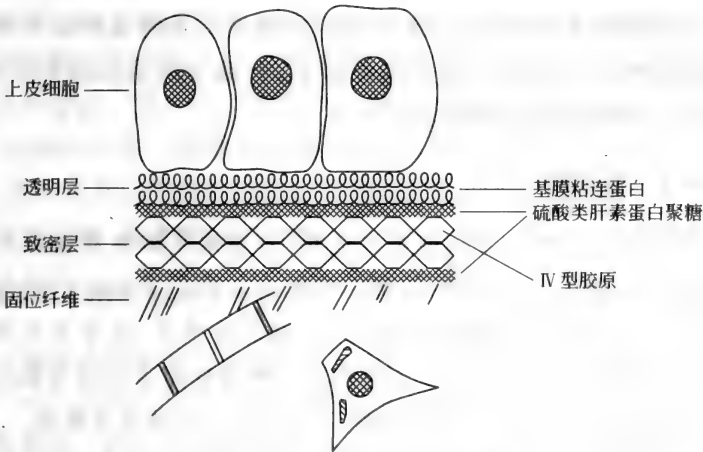


图 3.16 基膜的组成示意图

透明外层为电子透明区,其宽度为 20nm ~ 40nm,在上皮细胞或内皮细胞之下;
致密中层电子密度大,其宽度为 20nm ~ 100nm,有细的纤维网。

3.4.1.4 弹性蛋白

弹性蛋白是构成弹性纤维的成分。弹性纤维包括纤维部分和微纤维糖蛋白两部分。弹性蛋白分子中的赖氨酸可被氧化,经缩合,形成能交联 4 条肽链的交联链锁链素,使其结构更加稳固。弹

性蛋白存在于哺乳动物每种器官内,尤其是肺脏中。肺脏的弹性是由弹性纤维支持,才得以维持肺在呼吸过程中的伸缩。

在发生炎症时,巨噬细胞或中性粒细胞所分泌的弹性蛋白酶可将肺中的弹性蛋白分解。肺内还有 α I 抗胰酶,它可以对抗弹性蛋白酶的作用。缺乏 α I 抗胰酶是一种先天性遗传病,患者可发生肺损伤或肺部不能扩张等症状。

3.4.2 细胞外基质在疾病患者体内的变化

在多种病人体内,可以发现他们的胞外基质的各种组分的数量或性质发生了改变。研究胞外基质,有助于防治和诊断疾病。现列举几种疾病加以说明。

3.4.2.1 糖尿病

糖尿病患者的主要病症是高血糖,其后果是体内普遍发生无需酶催化的糖化反应,使糖与蛋白质缩合。糖化后的蛋白质容易聚合成大分子物质,使血管硬度增加,通透性增强,以至于大分子的蛋白质能够通过肾小球从尿中排出。糖尿病患者的器官和组织中胞外基质会发生变化,在糖尿病后期会发生各种合并症状。

主动脉:在糖尿病患者的主动脉,尤其是有斑块处,IV型胶原和硫酸角质素含量增高,透明质酸含量下降,因此透明质酸与硫酸角质素的比值下降。在无斑块处,透明质酸的含量却增高。

眼球:在视网膜的血管壁上,纤维粘连蛋白含量增高,在脉络膜和内限膜上,纤维粘连蛋白和基膜粘连蛋白均增多。

肾脏:肾小球基膜中蛋白质发生无需酶催化的糖化反应,交联度增加。蛋白聚糖和糖胺聚糖的含量减少,其中硫酸类肝素蛋白聚糖的含量减少至正常水平的30%,基膜粘连蛋白减少至正常的60%,但纤维粘连蛋白含量没有明显变化。肾组织中糖胺聚糖的

减少使吸附正电荷和水分的能力减弱,造成多尿。同时,糖的再吸收能力也受到损害,所以尿中出现糖。

皮肤:皮肤的主要成分是胶原和蛋白聚糖。糖尿病患者这些组分会发生改变或含量减少,胞外基质中的类似生长因子的结构也会减少,所以皮肤损伤后不易愈合。

3.4.2.2 肿瘤

肿瘤的转移首先由肿瘤细胞穿越基膜,再转移至其他部位。已知肿瘤侵犯基膜分3个步骤:第一步,肿瘤细胞粘附在基膜上,但不粘附在内皮细胞上,这种粘附是由纤维粘连蛋白和基膜粘连蛋白介导的。第二步,局部基膜被溶解,肿瘤细胞的伪足穿过基膜,基膜中的蛋白酶和胶原酶催化此过程。第三步,肿瘤穿透基膜,其运动方向受化学趋化因子影响(图3.17)。化学趋化因子来自结缔组织、血清和宿主细胞。

3.4.2.3 类风湿性关节炎

健康人的关节软骨中含水分60%~80%,含Ⅱ型胶原占湿重的15%~25%,Ⅱ型胶原与非纤维形的Ⅸ型胶原是软骨中的主要胶原成分。在关节的浅表层,主要是Ⅰ型胶原。蛋白聚糖的含量占湿重的10%,蛋白聚糖的含量在浅表层最少,在中层与深层则很多。关节软骨是一个不均一的组织,其中细胞密度距表面越远越低。表层的纤维较细,与表面平行排列,表面的细胞扁平,作为周围基质的蛋白聚糖含量相对少。在深层,细胞呈圆形,周围的蛋白聚糖含量较多(图3.18)。

在软骨中,Ⅰ型胶原的作用是稳定和减轻外来压力;Ⅲ型胶原是保证软骨的韧性,使肌腱与韧带易于粘附于骨质上;Ⅳ型胶原的作用是稳定基膜,提供机械力;Ⅵ型胶原形成伸展的纤维网,以固定胶原纤维与周围的结缔组织;软骨中还有丰富的硫酸软骨素与

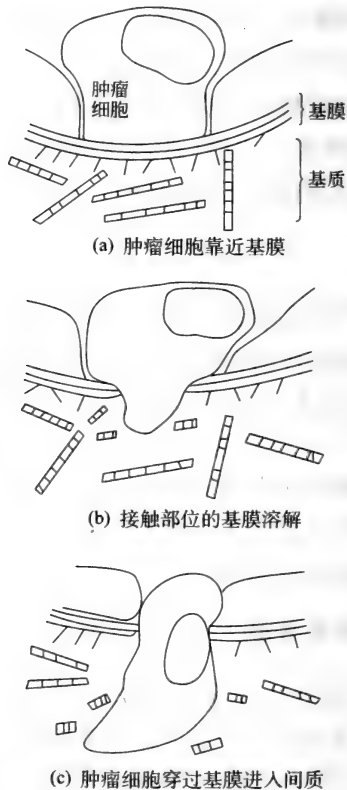


图 3.17 肿瘤细胞穿过基膜的示意图

硫酸角质素,透明质酸则是和胶原相结合的。

胶原纤维网具有抗伸展的性能,能够承担负重功能。蛋白聚糖含有大量负电荷及水分,可限制胶原纤维膨胀。胶原的抗张力作用与蛋白聚糖的膨胀力在关节软骨中达成平衡。当软骨受到压力时,软骨变形,水分被释放出来,致使蛋白聚糖浓度增大,膨胀力增高,与外界施加的压力达成平衡;当除去外界压力时,水分又回到软骨中,直到恢复原来的平衡状态(图 3.19)。

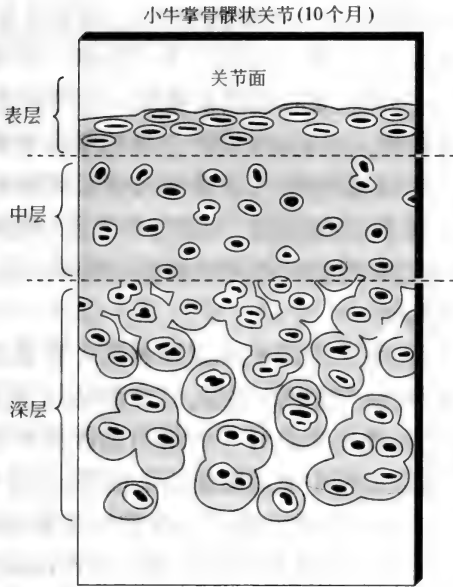


图 3.18 小牛掌骨髌状关节(10个月)

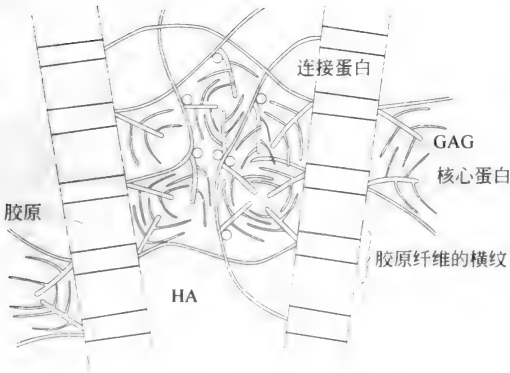


图 3.19 关节软骨中的胶原与蛋白聚糖

在患早期类风湿性关节炎病人的体内,胶原网受到损伤,蛋白聚糖的膨胀力加大,造成水分增加及关节肿胀。究竟是哪个部位的蛋白聚糖发生了分解,是在糖胺聚糖部分还是在透明质酸部分,它们的分解程度如何,可以从滑液中出现的蛋白聚糖的不同的分解片段来确定。在轻度损伤时,可发现与糖胺聚糖相连的核心蛋白片段在滑液中增多;当损伤较严重时,可出现与透明质酸相连的片段,所以从滑液中出现的片段可推断蛋白聚糖的分解情况,对诊断病情有一定的启示。

软骨受损伤后,软骨组织出现增厚状况。软骨细胞与滑膜细胞增生并发生纤维化。组织修复后,新合成的胶原与蛋白聚糖都是不成熟的,还会出现正常软骨中所没有的X型胶原。在患类风湿性关节炎时,病人血清中Ⅱ型胶原抗体增多,所以有人认为Ⅱ型胶原是自身抗体。利用Ⅱ型胶原已经成功地在啮齿动物中制作出类似人类患类风湿性关节炎的动物模型。此外,还发现Ⅰ、Ⅲ型胶原在关节损伤时出现在软骨中,它们作为自身抗原也会导致抗体增多(图3.20)。

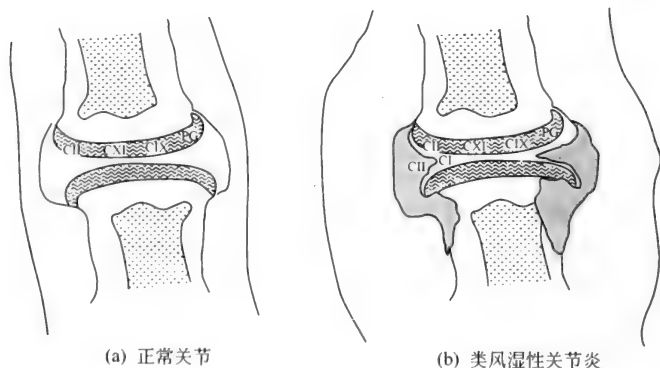


图3.20 正常的和患类风湿性关节炎的关节示意图

3.4.2.4 老年骨病和骨质疏松症

随着人的年龄增长,骨骼中的骨质会逐步减少,自40岁以后,平均每10年减少骨质10%。蛋白聚糖的分子量会变小,荷电量也会减少,各种糖胺聚糖的比值随着发生明显改变,硫酸皮质素增多,硫酸软骨素减少,但糖胺聚糖的总量变化不明显,透明质酸与总糖胺聚糖和硫酸皮质素与总糖胺聚糖的比值分别增加0.2%和2%~8%,硫酸软骨素下降60%~83%,和之比值则随着年龄增加而增大,因此容易发生老年性关节炎。

由于骨质减少,骨质疏松是常见的老年病。骨质中含有胞外基质的所有组分,还含有磷酸钙。骨质丢失后,不仅会缺钙,也缺少以有机化合物形式存在的基质成分。胶原与蛋白聚糖能把磷酸钙吸附在它们的分子之间,所以蛋白聚糖的存在有利于钙和水分的储存。胞外基质的各种组分就像建筑物中的钢筋,而钙和磷则像混凝土浇铸在钢筋上。如果没有钢筋,混凝土将无所依附而容易脱落。同样,骨质不足时即使补充钙盐,也不容易积存,只有同时补充胶原和蛋白聚糖等胞外基质,才能成功地预防和纠正骨质疏松的症状。

在我国的传统滋补品中,阿胶是纯胶原,有补血强身的作用。燕窝和银耳都含有大量蛋白聚糖。此外,各种动物的皮和骨骼都是胞外基质组分的主要来源。因此,在我国长期的养生保健经验中,许多补品都与补充胞外基质有关。这些经验值得总结提高,使我国的传统食品的应用具有坚实的科学依据,并从中开发出更多高效的强身健体的食品。

李玉瑞

3.5 糖链在流感病毒侵袭细胞中的作用

流感病毒一直威胁着人类,每年都有数以万计的人死于流行性感。1918年的流感大流行造成20万人~40万人死亡。一个世纪来,有关防治流感的研究取得长足的进展。近一二十年以来,由于糖类研究备受重视,糖的诸多生物学功能已被逐步揭示和认识。尤其对糖链在流感病毒侵袭细胞中作用的研究有突破性的进展。科学家们发现吸引流感病毒粘附在细胞表面上的分子是糖链。流感病毒通过它表面的糖蛋白分子与糖分子结合后,进入细胞质,继而感染细胞。把与流感病毒结合的糖分子称为流感病毒的受体。流感病毒与它的受体结合是侵袭细胞的开始。

与流感病毒结合的是含唾液酸的糖链。这类糖链以糖脂和糖蛋白的形式存在于细胞外表面。糖脂和糖蛋白是细胞膜的成分。糖脂是由糖类和脂类形成的共价化合物。脂质部分包埋在膜脂层内,而亲水的糖链部分露出在细胞外表面上。糖蛋白是由糖类和蛋白质形成的共价化合物,分子一般比糖脂大。长短不等的糖链连在蛋白主链上,糖链像天线一样露出在细胞外表面上,糖脂和糖蛋白上的糖链主要由葡萄糖、半乳糖、乙酰葡萄糖胺、乙酰氨基半乳糖、岩藻糖、甘露糖及唾液酸,这些糖以糖苷键连成链状,唾液酸是连在糖链的末端,是流感病毒结合的位点。

流感病毒颗粒的外表面有2个糖蛋白,一个叫血凝素(HA),是负责毒粒与细胞外表面接触并与糖链结合(图3.21)。另一个表面糖蛋白叫神经氨酸酶(NA),是负责释放在被侵袭细胞中新生成的毒粒。HA在毒粒外表面是呈柱状刺突,由一个纤维状杆部及其3个球形结构的顶部组成(图3.22)。3个球形结构绕杆顶端环形排列,3个顶端各有一个“浅袋状”结构。这个浅口袋正适合装入糖链末端的唾液酸分子。它与周边的氨基酸形成弱的化

学键,即氢键和范德瓦耳斯键。使毒粒粘附在细胞表面上,这就是流感病毒感染细胞的第一步。这一事实由哈佛大学 Wiley 教授的实验室,通过一个巧妙的三维结构分析实验所证实。^[1]

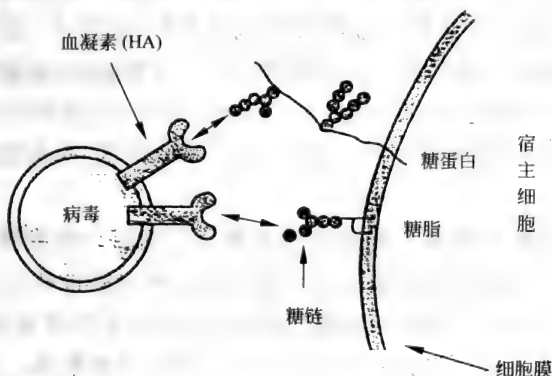


图 3.21 细胞外表面的糖链与流感病毒表面糖蛋白结合的模式图

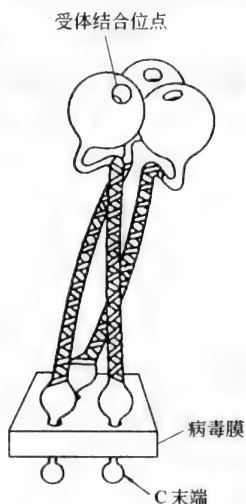


图 3.22 血凝素 (HA) 三聚体的三维结构示意图

流感病毒结合于细胞膜的糖链上,这部分膜内陷,形成小囊,病毒包在里面,随即分离下来形成小囊泡,进入细胞核内体,在核内体弱酸性环境中,病毒膜与核内体膜融合,使病毒基因转移到细胞质内,细胞的合成机构逐渐接受病毒 RNA 的指令,不再合成本身的核酸和蛋白质。只产生病毒的 RNA 和蛋白质,复制出新的病毒粒子,因此细胞很快死亡。由于 RNA 的作用,使新生成的毒粒从被感染的细胞内释放出去,又去侵袭其他细胞,引起感染而出现临床症状。

由于细胞外表面上糖链中唾液酸分子的介导使流感病毒进入细胞。所以说唾液酸是流感病毒的受体,唾液酸也称之为乙酰神经氨酸(NeuAc)。需要特别指出的是,从生物学角度来说,受体并不是为病毒入侵而设计的,病毒不是受体的自然配体。动物或人类细胞的病毒受体为细胞膜正常成分,有其正常的生理功能。含唾液酸的糖脂或糖蛋白在细胞膜中的含量一般较低,有的低于十万分之一,甚至更低。但近年来随着分离纯化技术的进步和分析鉴定技术的不断发展,科学家们从人或动物细胞中得到一些小分子含唾液酸糖缀合物的纯品,称之为神经节苷脂。它由糖链、脂肪酸和一个叫做鞘氨醇的长链碱基组成,由于鞘氨醇的氨基被脂肪酸酰化,所以这部分是亲脂的。糖链部分,包括唾液酸是亲水的,露出细胞外表面,容易被流感病毒识别并结合。结合在神经节苷脂的唾液酸分子主要有如图 3.23 所示的三种结构,5-N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)和 9-O-乙酰-5-N-乙酰神经氨酸(Neu5,9Ac),存在于人细胞膜中,而在动物细胞膜中主要是 5-N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)。唾液酸是通过其第二位碳原子以 2-3 或 2-6 糖苷键连接于糖链末端的半乳糖基上(图 3.24)。由于糖链的长短、糖链组成,糖基的连接顺序不同。加之唾液酸的连接键型不同,神经节苷脂表现出结构多样性。

通过病毒分子对神经节苷脂糖链末端唾液酸分子的识别和

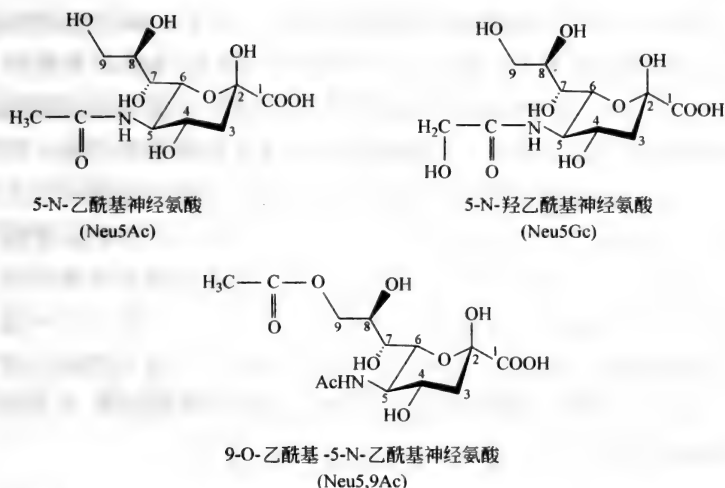


图 3.23 细胞外表面存在的主要唾液酸分子结构

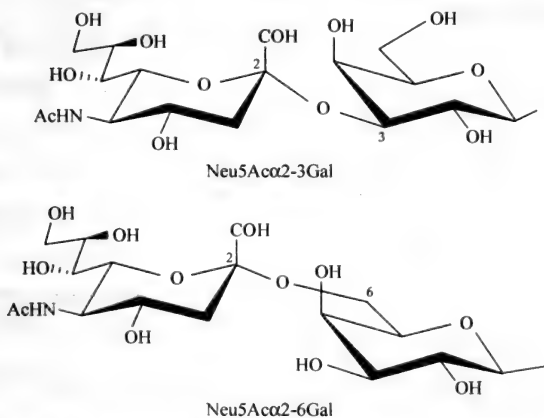


图 3.24 细胞外表面唾液酸分子与糖脂或糖蛋白上糖链末端连接的方式

结合活性的研究,发现人流感病毒 A、B 和 C 型识别不同结构的糖链作为受体。^[2]而这种识别的特异性非常强。如表 3.7 所示,A 型的 A/PR/8/43 病毒株特异地结合末端序列为唾液酸 2-3 半乳糖

(Neu5Ac α 2-3Gal)的神经节苷脂,而B型的B/Lee/40病毒株特异地结合末端序列为唾液酸2-6半乳糖(Neu5Ac α 2-6Gal)的神经节苷脂,这两种神经节苷脂的糖链组成完全相同,只是末端唾液酸连接与糖链的键型不同。C型病毒株不与上述两种糖脂结合。C型的C/Ann/Arbor病毒株特异地结合末端序列为除5位碳原子上连有N-乙酰基外,9位碳的羟基被N-乙酰基取代的唾液酸糖链(Neu5,9Ac)。这些结果说明糖链结构的细微差别会导致功能的重大差异。唾液酸与半乳糖连接键型的不同(2-3或2-6)可能会引起糖链构象的改变。糖链中乙酰基的数量及位置对糖链选择性影响很大,因为它能改变糖链分子的定向性和横向次序,从而改变了糖链的物理性质。

表 3.7 含唾液酸的糖脂与人 A、B 和 C 型流感病毒的结合活性

神经节苷脂结构	结合活性		
	A/PR/8/43	B/Lee/40	C/Ann/Arbor
Neu5,9Ac α 2-8Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	-	-	+++
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GlcNac β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	+++	-	-
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-3GlcNac β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	+	+++	-

表中符号: Neu: 唾液酸; Ac: 乙酰基; Gal: 半乳糖; Glc: 葡萄糖; Cer: 脑酰胺。

糖链在流感病毒感染中的作用以及与结合特异性的发现,对于流感病毒的诊断、预防和治疗都有十分重要的意义。为抗病毒药物的设计和研制提供了新的思路,如了解病毒结合的细胞外表面糖链结构和病毒表面糖蛋白上受体的结合位点即可采取两面夹攻,一方面可封闭受体,另一方面则可封闭病毒受体的结合位点,从而阻断病毒与受体的结合。另外还可将药物经受体导向到特定

部位,发挥抗病毒作用。一些抗病毒药和疫苗将会因此应运而生。

值得指出的是,上述结果是对糖链结构与流感病毒结合特异性的初步认识。由于细胞外表面糖缀合物结构复杂,难以搞清楚和流感病毒表面糖蛋白 HA 的抗原结构经常发生目前尚无法预测的变异,弄清糖链结构与各亚型流感病毒之间的特异性关系仍然是十分艰巨的研究任务。

徐桂云

3.6 糖基磷脂酰肌醇 GPI 锚结合蛋白 及其与疾病的关系

细胞由细胞核,细胞器,细胞质,以及外面一层包裹着那些细胞内容物的质膜等组成。这层质膜有脂质双层作为支持物。脂质双层中镶嵌着蛋白质、胆固醇及糖脂等。蛋白质种类很多,在膜内的蛋白质称膜蛋白,它们的分子中大多结合有糖链,是糖蛋白。膜蛋白在膜内的位置,有的是跨过膜的,它们横穿脂双层,蛋白质插入膜,糖基留在膜外。有的膜蛋白则用脂肪酸插入膜,而蛋白质部分“悬”在质膜的内侧或外侧。另外,还存在着一类由蛋白质、脂质和聚糖共价连接的糖缀合物,由于所含的脂质为磷脂酰肌醇,所以称为糖基磷脂酰肌醇锚结合蛋白(glycosylphosphatidyl-inositol linked protein,简称 GPI)。这类结合蛋白只通过脂肪酸插入脂双层的外层,蛋白质通过糖脂的核心被锚固在细胞膜上,所以又称糖肌醇磷脂锚固蛋白(glycosylphosphatidyl-inositol anchored protein)。这类蛋白质参与信息传递等许多生理功能。近年来又提出它们在细胞与细胞之间蛋白质的运转过程中起着重要的作用,并与某些疾病的发病机理与治疗有关。本章对糖基磷脂酰肌醇锚的结构、生物功能及其与某些疾病的关系作简要介绍。

3.6.1 GPI 锚结合蛋白的结构

从早期的单细胞生物(酵母菌细胞壁中的大部分蛋白均是 GPI 锚连的)到哺乳动物的进化过程中, GPI 被较完整地保留下来。它由一分子的磷脂酰肌醇(PI)、一个聚糖核心和一分子乙醇胺构成。在细胞表面,结合蛋白的 PI 端插入质膜的脂双层中,其乙醇胺端通过一个酰胺键与蛋白质分子的羧基端相连,蛋白质分子通过这种形式被“锚”在细胞膜上,见图 3.25。

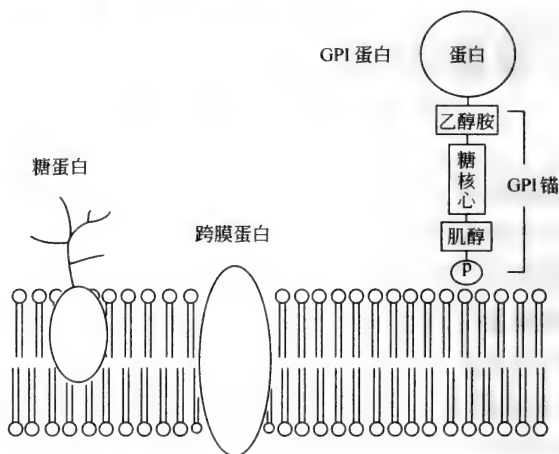


图 3.25 糖肌醇磷脂(GPI)锚结合蛋白结构示意图

3.6.2 GPI 锚结合蛋白的生物合成

GPI 锚结合蛋白的合成分三个步骤:首先,在核糖体合成肽链,新生的肽链进入内质网修饰,在 N 末端经肽酶(peptidase)水解掉约 15 个~30 个氨基酸残基的小肽。第二步,将 C-末端水解掉约 15 个~30 个氨基酸,然后与 GPI 结合。水解部位要求很严格,用基因工程方法,将 C-末端氨基酸依次切除,观察氨基酸与

GPI 结合的关系,结果发现在 ω 及 $\omega + 2$ 处对 GPI 结合影响大,只有丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸及天门冬氨酸才可与 GPI 结合,其他氨基酸都无作用。GPI 锚结合蛋白的合成在内质网内进行,在肌醇磷脂的基础上,结合多个单糖,形成聚糖,每个步骤都需要特异的酶,是一个非常复杂的过程。第三步,是修饰后的蛋白质与 GPI 结合。

3.6.3 GPI 锚结合蛋白的分布和种类

GPI 锚结合蛋白分布极广,大多数真核生物,包括原生动、酵母、粘菌、无脊椎动物等以及哺乳动物的血液、肝、肾、胎盘和脑等组织中都存在。目前,大约有近百种蛋白质已被确定是 GPI 锚结合蛋白,包括有多种水解酶、免疫蛋白,细胞粘连蛋白,补体调节蛋白等(见表 3.8)。

表 3.8 几种主要的 GPI 锚结合蛋白及分布

名 称	分 布
酶类	
碱性磷酸酶	人胎盘、哺乳动物组织
乙酰胆碱酯酶	人及羊红细胞、电鳗电器官
5'-核苷酸酶	哺乳动物组织
粘附蛋白类	
LFA-3 (CD ₅₈)	许多造血细胞
神经粘附分子	神经细胞、胶质细胞
补体调节蛋白类	
衰变加速因子 (CD ₅₅)	许多细胞和非造血细胞
反应性溶血膜抑制物 (CD ₅₉)	许多细胞和非造血细胞

3.6.4 GPI 锚结合蛋白的生理功能

GPI 锚结合蛋白的共同特点是:蛋白的 C-末端与 GPI 锚结合

蛋白的乙醇胺结合。不同的 GPI 锚结合蛋白的多糖和磷脂的成分是不同的。膜蛋白的这种锚固形式与镶嵌形式相比,在理论上有许多优点。这种方式有利于在膜上结合更多蛋白,而且锚固蛋白具有更多的侧向运动能力,有利于它们和其他细胞或具有生理功能的胞外分子更快地结合和反应,同时锚固蛋白可以被 GPI 特异性磷脂酶 C(GPI-PLC)和磷脂酶 D(GPI-PLD)从 GPI 锚结合蛋白上解离,解离后的产物具有第二信使的功能。自然,这些优点并不代表 GPI 锚结合蛋白的全部生物学意义,各种 GPI 锚结合蛋白具有特定的生理功能。

3.6.4.1 GPI 锚结合蛋白与免疫及神经细胞活化

许多 GPI 锚结合蛋白与免疫功能有关。这类蛋白与其他细胞作用从而引发生物学效应。T-淋巴细胞有不少 GPI 锚结合蛋白(Thy-1, Ly-6, qa-2),经相应抗体激活,可使 T 细胞活化。如将 Ly-6, qa-2 改造成为跨膜结构,仍用抗体激活,T-淋巴细胞不能被活化;相反,膜蛋白 H-2 原来不是 GPI 锚结合蛋白,本来在 T-细胞激活中不起作用,若把它转化成 GPI 锚结合蛋白,即可被抗体活化,从而使 T-细胞激活。从这些实验看来,T-细胞活化过程中 GPI 锚结合蛋白起着重要的作用。不仅 T-细胞表面有 GPI 锚结合蛋白,其他细胞表面也有,如中性粒细胞表面免疫球蛋白受体(Fc γ R),当用抗体激活,可释放超氧阴离子,有杀菌功能。Fc γ R 有两种类型,跨膜及 GPI 结合型,但跨膜型与抗体作用无超氧阴离子释放效应。

神经细胞表面有神经粘附分子(N-CAM),它有两种类型,一种是溶解的,另一种是 GPI 结合型的。后者在信息传递及轴突伸展方面都有作用,而溶解型只有使轴突伸展的功能;如睫状神经营养因子受体(ciliary neurotrophic factor receptor),参与神经元的发育及功能,它也是一个 GPI 锚结合蛋白,通过酪氨酸激酶起作用。

3.6.4.2 GPI 锚结合蛋白与信息传递的关系

带 GPI 锚结合蛋白的膜蛋白有参与细胞信息传递的功能。用 GPI-PLC 水解 GPI 锚结合蛋白产生的降解物已被确定为重要的第二信使物质。解离的产物是二酰甘油(DG)和三磷酸肌醇(IP₃)。DG 能激活蛋白激酶 C(PKC)的活性,使蛋白磷酸化,而 IP₃ 使细胞内钙释放,进而调节细胞内的其他功能。

GPI 锚结合蛋白与一般膜蛋白不同,它不溶于中性去污剂。不溶物的组成中,包括五种蛋白:1)小窝蛋白(caveolin),它是跨膜蛋白;2)GTP 结合蛋白(G-蛋白);3)GPI 锚结合蛋白;4)非受体型蛋白激酶;5)膜联蛋白(annexin II)。以上五种蛋白的功能很多,因为每种蛋白都有其各自的信息通路。例如细胞外信息可通过 GPI 锚结合蛋白传递到小窝蛋白,因 GPI 锚结合蛋白只插入脂双层的外层,而小窝蛋白是跨膜蛋白,它一头接触 GPI 锚结合蛋白,另一头又接触 G 蛋白(G-蛋白通过脂肪酸时插入脂双层内层)或酪氨酸激酶,这样便可以把信息传到胞内,引起生理效应,见图 3.26。信息不同,细胞不同,会有不同的生理效应。另外,膜联蛋白可被 Ca²⁺ 激活,又结合骨架蛋白,将信息传递到核内。

3.6.4.3 GPI 锚结合蛋白与受体

有些受体,如叶酸受体,本身就是 GPI 锚结合蛋白。当叶酸与其结合时,易形成 50nm 大小的囊泡。经转胞作用(transcytosis),小泡被转入细胞内。受体与叶酸结合后,pH 值变小,GPI 锚结合蛋白与叶酸解离,叶酸进入细胞。一般受体是在笼形蛋白(clathrin)帮助下通过吞饮作用(endocytosis)进入细胞,而叶酸受体作用机制与它们不同,可能是受体作用的另一个方式。有报道指出,铁的运转也有相似的方式。有种蛋白与转铁蛋白受体同源,称墨素转铁蛋白(melanotransferrin, 或 P₉₇),也是一种 GPI 锚结合蛋白。

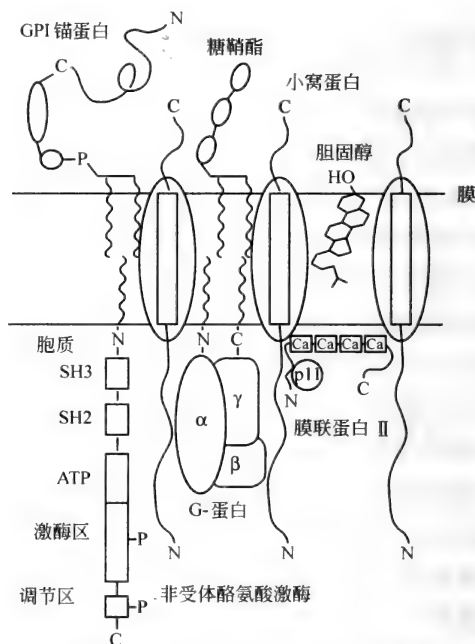


图 3.26 糖肌醇磷脂(GPI)结合蛋白传递信息示意图

因为将转铁蛋白受体及 P_{97} 的 cDNA 分别转入 CHO 细胞株, 比较两种受体对铁摄取的能力, 发现 P_{97} 比转铁蛋白受体摄取的铁更多。证明 P_{97} 有类似转铁蛋白受体的作用。

3.6.5 GPI 锚结合蛋白与细胞表面工程

1995 年以来, 有许多报道说明 GPI 锚结合蛋白可从一个细胞转到另一个细胞。用大鼠的 Thy-1 抗原与小鼠淋巴细胞保温, 经流式细胞仪检测, 发现小鼠淋巴细胞上有大鼠的 Thy-1 抗原。如用另一种 GPI 蛋白 FcR III (CD_{16}), 与缺失 CD_{16} 的人中性粒细胞一起保温, 经流式细胞仪检测, 也发现在人的中性粒细胞表面有 CD_{16} 。用同样方法与 T 及 B 细胞一起保温, 在 T 及 B 淋巴细胞表

面也有 CD₁₆ 的表达。这两个实验都证明在体外 GPI 锚结合蛋白可从一个细胞转移到另一个细胞表面。在体内也有同样的例子,在患非洲锥虫病病人的红细胞膜上曾发现锥虫的一种 GPI 锚结合蛋白膜 VSG,而正常人红细胞膜上没有锥虫的抗原,说明是锥虫的 VSG 转移到了人的红细胞上。

1996 年 Medof 根据 GPI 锚结合蛋白与蛋白运转的关系,提出了“细胞表面工程”的设想。即应用基因工程的方法,将一般蛋白质改造成 GPI 锚结合蛋白。方法很简单,只需把要转移到细胞表面蛋白的 cDNA 和与 GPI 结合必需的 C-末端的 cDNA 融合,形成融合 cDNA,然后将融合 cDNA 转入到细胞内,使其表达融合蛋白。这种新的蛋白质,既有原来欲改造的蛋白质,又有与 GPI 结合所必需的 C-末端,当遇到 GPI 时,即可结合形成 GPI 锚结合蛋白。从细胞上提取出这种蛋白质,与欲转移的细胞保温,GPI 锚结合蛋白即可自动组装到靶细胞上。

细胞表面工程有以下优点:1)通过融合基因的方法可制备大量的 GPI 锚结合蛋白;2)对一些难进行基因转染的细胞,用此方法较为容易进行;3)细胞表面可按要求,直接修饰,不需繁琐的细胞培养。修饰后的细胞表面蛋白还保留原有功能;4)蛋白可以舒展在细胞表面,易于控制;5)多种 GPI 锚结合蛋白可以同时结合在一个细胞表面。

由于 GPI 锚结合蛋白有多种重要功能,缺了它们会影响细胞正常生命活动,因此可应用细胞表面工程的方法,改造某些病态细胞,将缺少的蛋白改造成 GPI 锚结合蛋白转入细胞,从而恢复细胞功能。许多细菌、寄生虫毒性蛋白都是 GPI 锚结合蛋白,它们把毒素转移给宿主,使宿主产生疾病,如何防止转移也是研究防止疾病发生的一个新课题。目前已找到几种药物,可抑制 GPI 锚结合蛋白从膜上释放。这些结果防治疾病开辟新的天地。

3.6.6 GPI 锚结合蛋白与疾病

近年发现,某些疾病与 GPI 锚结合蛋白有关。例如疯牛病、炎症和某些肿瘤的发生都与 GPI 锚结合蛋白有关。报道最多的是一种称为阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)的溶血性血液病。此病是由于后天性基因缺陷引起的。PNH 患者的异常血细胞(包括红细胞、单核细胞、淋巴细胞、粒细胞、血小板等)的共同特点是细胞膜上缺失十几种 GPI 锚结合蛋白,如红细胞上缺失 C₃ 转化酶衰变加速因子(DAF、CD₅₅)、反应性溶血膜抑制物(CD₅₉)、C₈ 结合蛋白、乙酰胆碱酯酶(AchE)等,其他血细胞缺失 CD₁₄、CD₁₆、CD₂₄、CD₄₈、CD₅₂、CD₆₆等。由于上述蛋白有些是补体调节蛋白,如 CD₅₅、CD₅₉等,它们的缺失使补体活化产生红细胞的溶血。PNH 是一种慢性而难治的疾病,目前的治疗大多只是对症治疗。科学家们正试图利用 PNH 患者自身异常的造血干/祖细胞加以改造,或将正常的细胞加以扩增,以达到治疗的目的。我们实验室证明存放一定时间的红细胞可释放囊泡,而囊泡中富含 CD₅₅和 CD₅₉等 GPI 锚结合蛋白。将释放的囊泡收集后与 PNH 患者血细胞一起保温后,经流式细胞仪检测,发现原来没有 GPI 锚结合蛋白表达的 PNH 异常细胞可部分表现为 CD₅₉阳性,并能抑制红细胞的溶血。这一方法为 PNH 患者提供了另一条对症治疗的方法。总之,对 GPI 锚结合蛋白结构与功能的了解,将会对某些疾病的发病机制和寻找防治手段有着重要的意义。

许彩民

4 寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用

4.1 前 言

植物生病,比如白粉病、锈斑病、枯萎病等植物病害,都是由微生物引起的,它们会使植物的生长和发育受到严重影响,也会严重危及农作物的产量和品质。对付植物的病虫害,人们首先想到的是农药。经过多年的实践、探索,农药的使用已经历了漫长的发展、几代的更迭,由最初的用简单的无机物如硫酸铜、氯化汞,继而用合成的、但对环境有严重污染的有机物如六六六、DDT,再到使用高效、低残留的有机磷农药,以及最近发展起来的高效、低毒氯氟菊酯类农药。虽然作物的病虫害得到了有效的控制,但生态环境的污染和破坏也使人们付出了沉重的代价。尤其是六六六、DDT等造成的污染,其严重程度超过人们的预计,它们虽已被停用多年,但至今仍能在许多农产品中检出它们的残留。沉痛的教训迫使人们去思考、探求,能否找到高效杀菌灭虫而又不污染环境对人无害的农药呢?答案是乐观的、肯定的,因为现在人们已发现存在于某些植物中的成分是有有效的杀病虫害剂,由于是天然产物,所以能在自然界中降解,不污染环境。另一方面,人们也发现,植物自身有一套完整的自卫系统,就像人体一样,人通过注射疫苗可以增加抵抗力,预防疾病,植物通过适当的途径也能使自卫系统活化,也就是说通过调动植物自身的能力来抵御病虫害的侵袭,从而保护自己的健康。不用农药防治植物病害,当然也就避免了生态

环境的污染。植物是如何保护自己的呢？本文从寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用方面加以介绍。

4.2 植物的细胞壁

植物的自卫系统始于细胞壁,细胞壁的90%由多糖和糖蛋白组成,在多糖中,20%~30%是纤维素,即 β -(1 \rightarrow 4)连接的葡聚糖,葡聚糖是由葡萄糖组成的均聚多糖,另外70%~80%是杂聚多糖,包括由半乳糖醛酸及甲酯化的半乳糖醛酸组成的果胶,由葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖组成的半纤维素等。半纤维素是由多种单糖组成的杂聚多糖,它的重复单元是一些聚合度由4到10的寡糖,这些寡糖由不同的单糖组成,由4个糖组成的寡糖叫四糖(或称聚合度为4),而由10个单糖组成的寡糖就叫十糖,寡糖和多糖没有明显的分界定义,但一般认为,聚合度大于20,就叫多糖,小于20,叫寡糖。图4.1是组成半纤维素中的寡糖重复单元的单糖的结构。

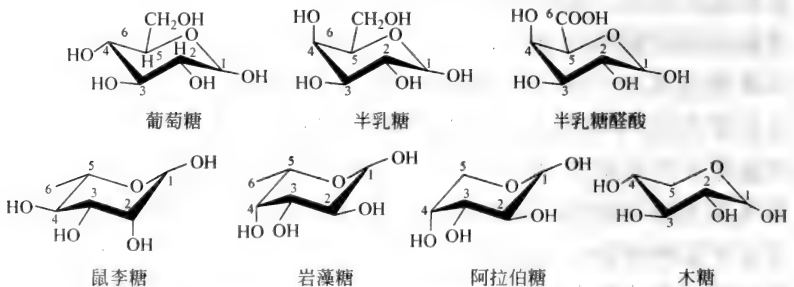


图 4.1 组成半纤维素中的寡糖重复单元的单糖的结构

图4.1中,用常见的六元环构象式表示每种糖的结构,这种六元环的构象也是糖在自然界中存在的稳定形式,图中标出了每个碳原子的序号,C-2,3,5及六元环上的O等四个原子在一个平面

上,而 C-4 及 C-1 分别位于此平面的上方和下方,分别像椅背和椅脚,因此这些构象式又叫椅式构象。葡萄糖、半乳糖、鼠李糖、岩藻糖、半乳糖醛酸都是含六个碳原子的糖,而木糖和阿拉伯糖是含五个碳原子的糖,半乳糖和葡萄糖的差别,就是 C-4 的构型不同,而半乳糖醛酸与半乳糖的差别就在于前者的 C-6 被氧化成了羧基,植物中的鼠李糖和岩藻糖都是 C-6 上无羟基的糖,或称为 C-6 脱氧糖,半乳糖醛酸是细胞壁中的酸性糖,它是组成果胶质的基本单元,图中 C-1 上连着的羟基有 α 和 β 两种构型,用曲线表示,当 C-1 羟基与 C-5 上的取代基分处环的两侧时,称为 α 构型,而当它们处在环的同侧时,称为 β 构型。在多糖中 α 和 β 连接会给出截然不同的性质,如淀粉和纤维素都是 1 \rightarrow 4 连接的葡萄多糖,前者为 α 连接,是食物,后者为 β 连接,是材料。由于植物细胞壁的多糖及糖蛋白的结构颇为复杂,很多细微的结构至今还未搞清楚。

4.3 植物自卫系统的激活及其机制

当对于植物有毒的无机盐如氯化汞、硫酸铜或一些有机物如多肽接触植物细胞壁时,细胞壁即发出信号,植物的自卫系统即可启动,在受到紫外线照射或机械损伤时,同样有这种自卫性反应。人们称这些无机盐或有机物为激活剂或启动剂(elicitor),它们能在 10^{-5} mol/L 浓度(1mg/L ~ 10mg/L)时起作用。病原体(包括真菌、细菌、病毒等)是高效的生物来源的激活剂,当它们侵袭植物时,即使在非常低的浓度下(10^{-8} mol/L),也能使植物自卫系统启动,这就像人注射牛痘疫苗能产生对天花的免疫力的道理相似。研究表明,病原体中的能激活植物免疫系统的有效成分是多糖,这个多糖相对分子质量有数十万道尔顿(Dalton),基本由葡萄糖组成。20 世纪 80 年代更进一步的研究^[1]揭示,多糖中活性最高的部位是个有特殊结构的七糖,它的活性非常高, 10^{-13} mol 的量,即

足以使一片大豆子叶产生足够的植保素(phytoalexin),抵御微生物的侵袭,更通俗些说1g七糖(寡糖激活剂)可以使几百吨正在生长的植物产生足够的植保素。这一重要发现引起了植物学家、化学家的极大兴趣,为验证这一结论,化学家用可靠但却复杂的方法合成了这种七糖^[2]寡糖,并检验了它的活性,发现其与天然的寡糖完全相同,从而证实了某些特定结构的寡糖能作为病原体的最有效成分,像“抗原”一样激活植物的自卫系统,使其产生植保素。

有关寡糖激活剂作用的原理机制,现在比较一致的认识^[3]是:寡糖类激活剂在穿过细胞壁后,与原生质的膜蛋白发生作用,由此发出防卫信号,接着是此信号转移,并被翻译,转化为复杂的生物过程,活化植物的自卫基因表达。这样,一方面能产生糖苷酶,如 β 葡萄糖苷酶、几丁质酶、半乳糖醛酸酶来分解含有激活剂的病原体;另一方面活化几个生物酶,这几个酶能合成一些简单的有机物如黄酮、萜烯、酚、多炔类等化合物,这些有机物也都能毒杀病原体。也就是说,植物自身就有保护自己的能力,只要通过有效的手段将它们调动起来,植物自己就能合成一些“生物农药”如酶或有机物,来对付病原体的侵袭,防治病害。由于这些“生物农药”产生于植物自身,因而完全能在自然界中降解,决不污染环境。

4.4 植物自卫作用的应用

植物自卫作用理论的发现,使人们眼界大开,人们开始尝试将这一实验室的成果推向实用。20世纪90年代初,美国的科学家开始试用对植物,如蔬菜、水果、粮食作物等喷洒果胶酶^[4],该酶能使被喷洒的植物细胞壁分解,产生半乳糖醛酸的寡糖——一类寡糖激活剂,从而使正在生长的植物或已收获的植物免受病害的

侵袭。用此方法能使已收获的果品明显延长存储期。我国的研究单位也试用粮食作物细胞培养液的部分水解物来作为激活剂,其有效部分也是寡糖,取得了较好的效果。日本科学家还报道了直接用食用菌的多糖水提取物来喷洒作物,亦有成效。不过上述应用尚处于实验阶段,主要把糖类激活剂用于无病的作物,着眼于预防。这些激活剂的组成成分多不清楚,是成分不定的混合物,这为确定使用量带来一些不便和不确定度。

要想把寡糖真正发展成“绿色农药”,一定要满足下列几个要求:1)用量要小;2)使用后,产生作用要快;3)效率要高,能杀菌。用量小,一则是在经济上容易过关,二则不会有副作用,不会因产生太多的“抗体”而杀死植物正常细胞;作用快、效率高则使其充分发挥“农药”的功能。这样它们既可用于防,又可用于治,可与传统的农药媲美。而且它对真菌类病害具有特效,正可弥补传统农药的不足。

4.5 常见的寡糖激活剂

常见的、结构已经搞清了的寡糖类激活剂有葡萄糖的六糖、七糖、半乳糖醛酸寡糖,以及几丁质寡糖。

4.5.1 葡萄糖寡糖激活剂^[3]

葡萄糖寡糖是以 β -(1→6)连接为主链并带有 β -(1→3)连接侧链的寡糖。它是美国科学家在20世纪80年代由真菌大雄疫霉(*Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*)的菌丝体细胞壁的多糖中得到的。当把该多糖用稀酸水解时,可得到很多不同组分的寡糖,光是七糖就得到了100多种,经过还原反应,把末端醛基变成羟基后使组分得以简化,再经高效液相色谱分离得到纯品,得到了几种七糖,但发现只有一个七糖有活性。说明植物对寡糖激活剂

的结构有极高的识别力,即使支链位置发生了改变的同分异构体也完全没有活性或活性极小。众所周知,植物的细胞壁含有大量的葡萄糖 β -(1 \rightarrow 4)连接的多糖结构,在如此大量 β -(1 \rightarrow 4)结构多糖的环境中,植物能识别出极微量的结构有差异的寡糖,进而作出自卫反应,识别分辨能力之强、之灵敏,令人赞叹。不过以上所述制备方法仅能用于研究,因为水解 10g 的细胞壁多糖,最后只能得到 0.1mg 七糖活性纯品,它的结构如图 4.2。

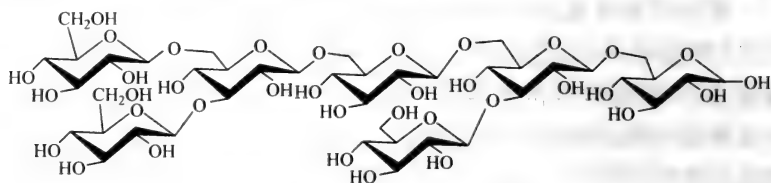


图 4.2 一种七聚葡寡糖的结构

这种七聚葡寡糖亦可用图 4.3 所示简式代表。

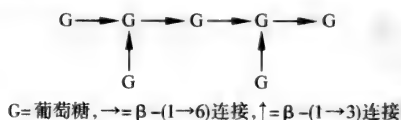


图 4.3 代表七聚葡寡糖的简式

如将其结构稍加改变,变成如图 4.4 所示的同分异构体,活性即减至原来的 1/1000。



图 4.4 七聚葡寡糖的同分异构体

以后的研究表明,寡糖的还原端(简式右方)的结构变化对其活性影响不大,如在还原端放上烷基、芳基,构型变为 α ,活性基本

不变。但非还原端(简式左方)的微小变化就能显著地降低活性,还确定了非还原端的葡萄糖六糖或它的烷基苷、芳基苷是具有高活性的最基本的决定部位,如图 4.5 所示。

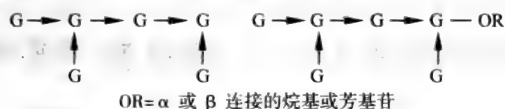


图 4.5 烷基苷、芳基苷在寡糖还原端的连接

上述葡萄糖的寡糖存在于很多种真菌中,但未在植物中发现,是植物以外来源的寡糖激活剂,又称外源性激活剂。

4.5.2 半乳糖醛酸寡糖激活剂^[3]

半乳糖醛酸寡糖激活剂是由果胶酶水解果胶质的多糖而得,或由稀酸水解果胶质的多糖而得。植物的细胞壁都含有果胶质,因此半乳糖醛酸寡糖可通过将果胶酶喷洒在植物上“就地”产生。半乳糖醛酸寡糖由 α -(1→4)连接的半乳糖醛酸组成,部分半乳糖醛酸以甲酯的形式存在,从四糖到十四糖都有效,以十糖以上的寡糖效率更高,它的作用与葡萄糖寡糖激活剂的作用类似,但它的活性只有葡萄七糖的 1/1000。但研究表明,把两种寡糖激活剂混用,效果更佳。在混用时两种激活剂的用量都比单独应用时的用量减少。半乳糖醛酸寡糖的结构如图 4.6。

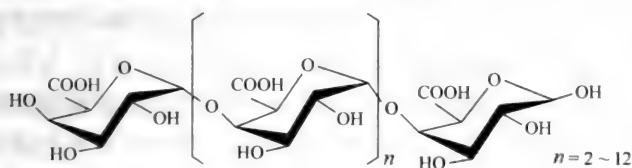


图 4.6 半乳糖醛酸寡糖的结构

4.5.3 几丁质寡糖激活剂^[3]

几丁质寡糖可由水解真菌细胞壁获得,它们作为激活剂的活性与半乳糖醛酸寡糖相当,其结构见图 4.7,为 β -(1 \rightarrow 4)连接的乙酰 N-乙酰葡萄糖胺或 β -(1 \rightarrow 4)连接的 N-乙酰葡萄糖胺。

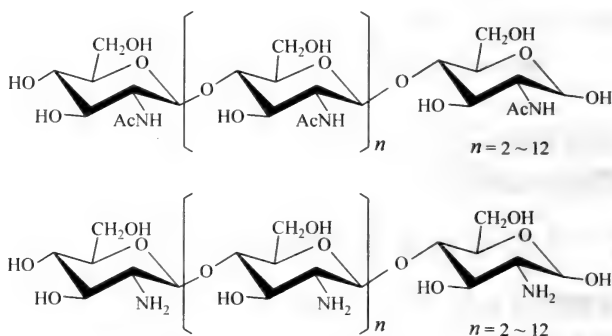


图 4.7 几丁质寡糖的结构

这两种寡糖激活剂也能产生葡萄糖寡糖激活剂的大部分作用,但两种之间还稍有差别,如乙酰 N-乙酰葡萄糖胺寡糖对稻米、受伤的小麦叶子不起作用,而氨基葡萄糖寡糖就有作用。

以上所述的几种寡糖激活剂在植物中所引起的信号作用类似。这些信号使植物的防卫基因活化,并产生相似的防卫反应。但随植物种类的不同,由防卫基因产生的产品出现的顺序可能各异。活化防卫基因有瞬时的,如能产生植保素的酶的基因被活化得非常快,而有些基因如与木质素合成酶相关的基因,与羟基脯氨酸糖蛋白相关的基因被活化就慢。有些防卫反应能持续几天或几个星期。总之,植物的信号体系像个复杂的网络,当受到激活剂刺激时,它调控着几个防卫基因的表达,从而活化相应的防卫蛋白酶,并产生防卫化合物。

在已经报道的寡糖类激活剂应用中,主要就是应用半乳糖醛

酸寡糖及几丁质寡糖。

除了以上所述的寡糖类激活剂外,还发现了一些新的寡糖激活剂,但它们结构较特殊,亦不常见,此处不再一一赘述。

4.6 寡糖类植物生长调节剂

寡糖除了能作为植物的免疫激活剂外,还能作为植物生长的调节剂,有些寡糖兼具二者的功能,如半乳糖醛酸寡糖。

4.6.1 木糖-葡萄糖类寡糖生长调节剂^[5]

木糖-葡萄糖类寡糖生长调节剂存在于植物新生细胞壁的半纤维素多糖中,该多糖含有多个具有生长调节活性的寡糖,其结构如图 4.8 所示。

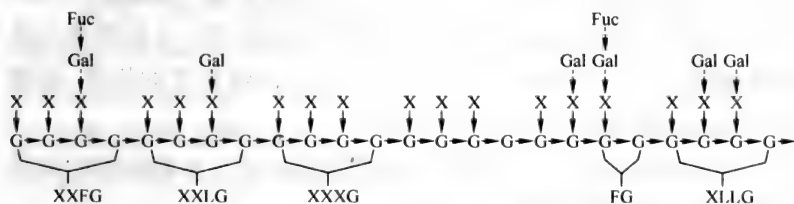


图 4.8 木糖-葡萄糖类寡糖的结构

式中,G = 葡萄糖,X = 木糖,Gal = 半乳糖,Fuc = 岩藻糖

→代表 β -(1→4)连接,↓代表 α -(1→6)连接,虚线的竖箭头代表1→2连接,

其中半乳糖是 β 连接,而L-岩藻糖是 α 连接。

在寡糖的缩写符号中,G表示葡萄糖(单糖),X表示葡萄糖上连有一个木糖(双糖),L表示葡萄糖上连有木糖及半乳糖(三糖),F表示葡萄糖上连有木糖、半乳糖、岩藻糖(四糖)。

由图 4.8 可见,该多糖的主干为 β -(1→4)连接的葡萄糖,在葡萄糖的 6 位连有木糖,由四个葡萄糖分子和三个木糖分子组成

的寡糖 XXXG 是该多糖的基本结构。式中所标出的 XXFG (9 糖)、XXLG (8 糖)、XXXG (7 糖)、FG (5 糖)、XLLG (9 糖) 等寡糖片段都具有促进植物生长的活性,有趣的是,XXFG (9 糖) 仅比 XXLG (8 糖) 多一个岩藻糖单元,其性质就有了很大的不同,前者在 10^{-8} mol/L 的浓度下能抑制由激素刺激的植物生长,后者就没有此抑制作用。且 XXFG 在 10^{-9} mol/L 的浓度下能引发葡萄糖多糖合成酶的活性,增加羧甲基纤维素酶及几丁质酶的活性,而 XXLG 及 XXXG 仅有促进植物生长的作用。这个对比除了说明岩藻糖是寡糖抑制生长作用的决定部位外,也再次向人们昭示了寡糖结构上的微小变化,能引起其活性和性质的巨大变化。

以上所述的半纤维素多糖中的寡糖片段,多具有促进植物生长的活性,因为这些寡糖是木葡聚糖的内切转糖基酶 (xyloglucan endotransglycosylase) 的底物。它们进入细胞壁后,会通过与此内切酶作用,使该酶切断木葡聚糖,从而破坏细胞壁上半纤维素与纤维素的结合,造成植物细胞壁的瞬时松弛,而细胞壁的松弛,是细胞生长的前提。

上述的对植物生长有调控作用的寡糖能通过水解新鲜的种子的细胞壁或水解细胞培养液获得。

4.6.2 半乳糖醛酸寡糖类生长调节剂^[5]

半乳糖醛酸寡糖除了自卫激活剂的作用外,还有调节植物生长的作用,且它作为调节剂起作用时所需的浓度,比它作为自卫激活剂起作用时所需的浓度低 10 到 100 倍,它能引发开花,促进果实成熟,抑制根的生长。但它在整个植物生长发育中所起的作用还未搞清楚。

4.7 根瘤菌与宿主共生的信息分子

——能促进固氮作用的寡糖^[6]

根瘤菌与豆科植物宿主共生是伙伴之间的交互分子通讯。最初植物分泌一种基因诱导物黄酮类物质,它们诱导细菌表达结瘤基因,这些基因表达所产生的蛋白质是合成结瘤因子所需的酶类。共生过程分4步进行:1)伙伴的相互识别;2)根毛弯曲变形;3)形成称为“感染线”的管子,使细菌进入;4)形成固氮根瘤。

经过多年遗传和分子遗传研究,已鉴定出很多结瘤基因,大致分为三类:共同基因(*common nod gene* 或 *nod ABC*), 调控基因(*regulatory nod gene* 或 *nod D gene*), 宿主专一性基因(*Host-specific nod gene*)。(图4.9)

直到1990年,法国的P. Lerouge才首先从黄酮类诱导的苜蓿根瘤菌(*Rhizobium meliloti*)的培养上清液中鉴定出共生信号分子(*symbiotic signals*),称为苜蓿结瘤因子(*NodRm*)。它是脂-寡糖化合物,即N-脂酰基化的几丁寡糖衍生物。寡糖主链为4个~5个 β -(1 \rightarrow 4)N-乙酰葡萄糖胺(几丁四糖-五糖)。非还原末端葡萄糖胺的N-乙酰基改变为N-脂酰基(*vaccenic acid* C_{18:1}),同时该糖分子的C-6被O-乙酰化,还原末端的单糖C-6则被硫酸化。从苜蓿根瘤菌得到的结瘤因子命名如下:*NodRm IV (S)*; *NodRm V (S)*; *NodRm IV (S, Ac)*和 *NodRm V (S, Ac)*,IV,V代表寡糖数,括号中的S代表还原端C-6的硫酸基,Ac代表非还原端C-6-O-乙酰基。(图4.10)

此后又在其他根瘤菌中发现了多种多样的取代基,脂肪酸可以是C_{18:4}, C_{16:1}, C_{16:0}等,C-6可加上2-O-甲基岩藻糖或阿拉伯糖,这些取代基决定宿主专一性,糖主链则决定共同的生物活性,同时也查明了各种*nod*基因编码的蛋白质各是些什么酶。

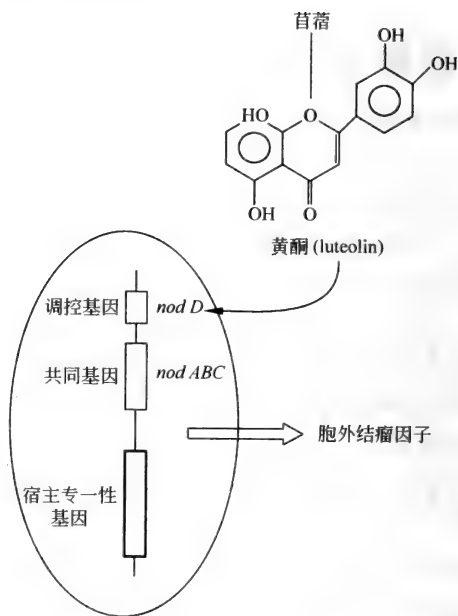


图 4.9 由苜蓿根瘤菌 (*Rhizobium meliloti*) 引发产生结瘤因子的示意图

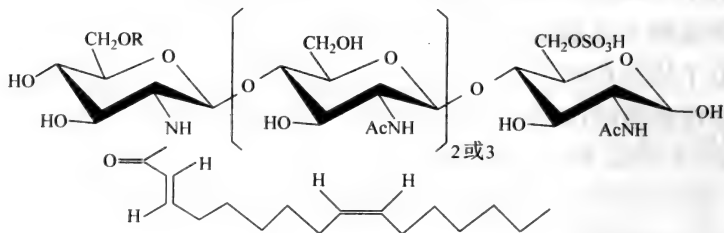


图 4.10 从苜蓿根瘤菌得到的结瘤因子
对 NodRm IV(S) 及 NodRm V(S), R = H;
对 NodRm IV(S,Ac) 及 NodRm V(S,Ac), R = Ac

结瘤因子的生物活性也已阐明。纯化的结瘤因子可以诱发宿主根毛变形,使根毛膜电位去极化,还能诱导宿主在感染早期形成 *nodolin* 的基因,纯化的结瘤因子在 10^{-9} mol ~ 10^{-12} mol 时可引发豌豆和苜蓿的 *nodolin* 基因的转录,诱导宿主内皮层细胞分裂,形成前感染线结构。在较高浓度 (10^{-7} mol) 可引发苜蓿根部结瘤。因此,脂-几丁寡糖是一类新的信号分子,它们在无细菌的情况下,能够在豆科植物中引发瘤器官的形成 (*nodule organogenesis*)。

尚未解决的问题,是我们还不知道宿主植物如何察觉这一信号。很可能是信号物与宿主的受体相结合。美国和我国的科学家先后完成了此信号分子的全合成^[7]。通过放射性或光亲和标记可以找到植物膜上或细胞内的受体。

4.8 寡糖素

寡糖类激活剂和寡糖类植物生长调节剂统称为寡糖素,对寡糖素的研究,无论是它们植物生理学的研究,还是它们的应用研究,都还有许多未知的领域有待人们去揭示。如寡糖类激活剂的受体是什么,它们的结构如何?受体和激活剂作用后,启动的是哪些酶?调控的是哪些基因表达?而最后产生的又是哪些植保素?这一系列的问题,在有些植物中了解得比较清楚,而在另一些植物中还很不清楚。即使对某些过程比较清楚,但对过程中的某些环节尚有疑问。继续深入地研究,需要化学、微生物学、植物生理学、分子生物学等学科的努力,从微生物、植物的结构分析,以至模拟合成天然的结构及改性,进一步研究结构与活性的关系等。寡糖素的研究有很好的应用前景,它的有效应用将改变与农业有关的化工产业,如农药、生长促进剂的结构。对寡糖素实际应用的,现刚刚起步,如何经济地制取寡糖素,如何使寡糖素充分发挥效益,如何施用,将其有效地用于农作物种植,防治病害,都是亟

待解决的问题。

我国的农作物病害未得到有效防治。如造成巨大损失的棉花枯萎病、稻瘟病等由真菌引发的病害,至今苦无良策。要研制寡糖类生物农药,深入进行基础研究并认真进行应用研究,将是解决这一问题的最好途径。

4.9 寡糖素的制备^[8]

要想批量获得寡糖素,现实而廉价的方法是酸水解或酶解植物或微生物的细胞壁的多糖。酸水解的重复性好,所用条件较简单,酶解的条件温和,但酶本身的纯制较难,纯的酶很贵,而用不纯的酶去水解,得到的产品复杂,性质不稳定。也可以用碱水解的方法,但容易造成糖的分解。用酸水解和酶解,得到的产品都是混合物,要想得到纯化合物,就必须精制,而精制的程序非常复杂,理论上可行,实际上由于花费过多不可能。因此这样制备的寡糖素是成分易变的复杂的混合物。

另一种制备寡糖素的方法是化学合成。一谈起合成,人们就会问,这样复杂的糖,能够批量合成吗?有这种疑问并不奇怪,因为在20世纪80年代末,植物生理学家拿到了合成化学家送来的几毫克寡糖激活剂样品,就感到非常满意,觉得享受到了合成化学进展的成果,10年过去了,合成的方法和技巧又有了长足的进展,过去难以想像的、复杂的价格曾定在100万美元/g的含唾液酸的4糖 Sialyl Le^x,通过技术上的突破,解决了酶促合成中的昂贵的辅剂回收问题,使得千克级的、成本在几百美元每克的 Sialyl Le^x 的合成得以实现。因此人们有理由相信,批量的、复杂的寡糖的合成是可能的。

4.10 寡糖的合成

众所周知,在三大类生物大分子(蛋白质、核酸、糖)中,寡糖的合成远比多肽、核酸复杂,因为它们含有多个羟基,存在吡喃、呋喃两种环式,且在形成糖苷键时又有 α 、 β 两种构型。以葡萄糖为例,有直链式、 α -吡喃式、 β -吡喃式、 α -呋喃式、 β -呋喃式。它们在溶液中呈平衡状态,但直链式所占比例极少,主要是以吡喃式(六元环)存在,图4.11表示了几种形式。

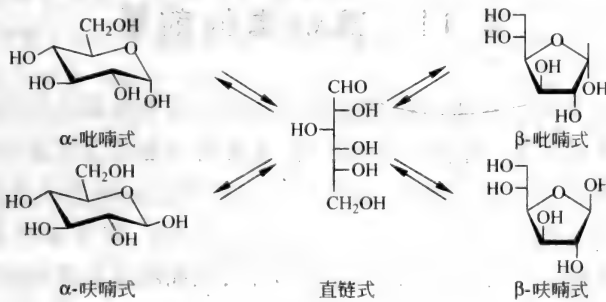


图 4.11 葡萄糖的几种形式

寡糖合成要解决的中心问题,是高收率、高区选、高立体选。高区选要求在特定的位置上连接(如1 \rightarrow 2,1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4或1 \rightarrow 6连接),高立体选则要求在连接时有单一的苷键构型(α 或 β 连接)。目前还没有一个通用的合成方法,但合成方法的发展,已使得选择的余地大增。

用不保护或少保护的糖为原料合成寡糖是最近发展的新方法^[9],由于它具有选择性高、步骤简单的优点,已被应用于合成复杂的寡糖如植保素激活剂六糖、香菇多糖的基本单元七糖等。尽管寡糖合成的研究已取得很大进展,如小川(T. Ogawa)合成了25

糖^[10],王启辉(C. H. Wong)用酶法合成了千克级的 Sialyl Le^x^[11]等,但和多肽、核酸的合成相比,寡糖的合成进展仍是相形见绌,寡糖合成方法学的突破,就是要像多肽、核酸的合成那样,能高选择性、高收率、简洁地合成各种结构的寡糖。现在还远未达到,国内外的科学家都在致力解决,一旦在寡糖合成方法学上取得突破,必将极大的推动寡糖结构与活性的研究,进而推动免疫学、医药学、分子生物学乃至整个生命科学的研究,并在农业、医药业上得到重要的应用。

4.11 寡糖素的前景

由于寡糖素在激活植物的免疫系统及调节植物生长方面都有非常显著的作用,而且不污染环境,非常有可能成为高效的绿色农药及促进植物生长的激素,改变未来农药和农业制剂的产业结构,成为农业发展的新方向。化学家、生物化学家、农学家正在努力,力争使寡糖的大量合成简单化、经济化,从而将寡糖素的研究成果转化为生产力。

孔繁祚

5 甲壳素/壳聚糖

——有广阔应用前景的多糖

5.1 甲壳素在自然界中的分布

地球上存在的各种天然聚合物中,纤维素的储量无疑是最多的,甲壳素(chitin)则位居第二。有人估计,自然界中每年生成的甲壳素有将近100亿吨之多。甲壳素总量虽多,但在生物类群中的分布却较为局限。它是构成甲壳类动物和某些昆虫外骨骼的主要成分,主要分布在节肢动物、软体动物、环节动物、原生动物以及真菌、藻类的细胞壁中。(见表5.1、表5.2)

表 5.1 甲壳素含量较高的一些生物(%)

甲壳纲	昆虫纲	软体动物	真菌
巨蟹 72.1(a)	<i>Blatella</i> 35(a)	蛤壳	黑曲霉
	蟑螂 10.0(b)	(Clamshell)6.1	(<i>Aspergillus niger</i>)42.0(d)
大蟹	<i>Colcoptera</i> 27~35(a)	牡蛎壳	鲁氏毛霉
(<i>Carcinus</i>)64.2(a)	甲虫 5~15(b)	(Oyster shell)3.6	(<i>Mucor rouxii</i>)44.5(d)
雪场蟹	跳甲	鱿鱼骨	蘑菇
(<i>Paralithodes</i>)35(b)	(May beetle)16(b)	(Squid,skeletalpen) 41.0	(<i>Lactarius vellereus</i>)19.0
Crangon 虾 69.1(a)	真蝇		
	(<i>Diptera</i>)54.8(a)		
Nephrops 龙虾 69.8(a)	含硫蝴蝶		
	(<i>Pieris</i>)64(a)		
Homarus 龙虾 77.0(a)	蝗虫 2~4(c)		
	(Grasshopper)20(a)		
拉斯加虾 28(a)	蚕蛹		
	(<i>Bombyx</i>)44.2(a)		

注:(a)壳重;(b)干重;(c)湿重;(d)细胞壁干重

表 5.2 甲壳素资源的年产出量

kt

甲壳素来源	可收获数量	甲壳类废物				甲壳素
		可得率	湿重	含固率	干重	
甲壳*	1700	50% ~ 60%	468	30% ~ 35%	154	39
Krill 脱蛋白壳	18200	40%	3640	22%	801	56
蛤/牡蛎	1390	65% ~ 85%	521	90% ~ 95%	482	22
骨	660	20% ~ 40%	99	21%	21	1
真菌	790	100%	790	20% ~ 26%	182	32
昆虫	可忽略		21 ~ 56			
合计	22740		5118		1640	150

* 包括蟹壳、小虾壳、对虾壳、龙虾壳和淡水产的小龙虾壳。

5.2 甲壳素/壳聚糖的性质

从生物化学的角度来看,甲壳素属于多糖。这就是说,甲壳素是由许多个单糖分子脱水缩合而成的生物大分子。

在甲壳素中,一种 β 构型的单糖——N-乙酰葡萄糖胺是构成整个大分子的砖石,这种单糖在结构上可以看成是由葡萄糖的 2 位羟基被乙酰氨基取代而得到的。两个 β 构型的乙酰葡萄糖胺分别将自己位于 1 号碳和 4 号碳上的羟基贡献出来,通过脱水缩合形成新的化学键—— β -(1 \rightarrow 4)-糖苷键,这就构成了甲壳素分子中基本的重复单位——“壳二糖”。一个个“壳二糖”再以上述相同的方式聚合在一起,甲壳素的高分子长链就这样形成了。

同蛋白质等许多生物大分子一样,甲壳素也具有“高级结构”。生物大分子的高级结构往往是由它的一级结构决定的。在对甲壳素的结构类似物——纤维素的研究中,人们发现这种线型高分子在空间结构上也呈直线形,且“线”与“线”之间通过很多存在于分子间的氢键维系在一起,形成一种微纤维状的聚集体。甲

壳素和纤维素同样以 β -(1 \rightarrow 4)-糖苷键作为主链的联结方式,它们的区别仅仅在于 2 位上的羟基是否被乙酰氨基置换。可以预见,这两类物质应当具有相似的高级结构特征。事实上,在电子显微镜下是清晰可见的甲壳素是直径大约为 2nm ~ 3nm 的纤维状结构。与此形成鲜明对照的是淀粉,联结各个单糖的是 α -(1 \rightarrow 4)-糖苷键,因此其在高级结构中显示出螺旋形的构象。无论是哪种高级结构,它的维系都少不了氢键的功劳。有趣的是,各类氢键往往有一个共同点,那就是将一级结构中相距遥远的结构单位拉近,而这对于生物大分子功能的实现往往是必需的。

研究多糖的结构是一项难度很大的工作。经常要通过对样品红外吸收、紫外吸收、质谱以及核磁共振、X 射线衍射等数据的综合分析,有时还要加上化学反应和酶促反应的结果,才能找到解决问题的线索。

前文提到过,甲壳素存在着微纤维状的高级结构,正是通过对这些微纤维结构的 X 射线衍射分析,人们又在它们的核心部分找到了相应的晶体结构特征,而且晶形还不止一种。 α 型晶体占绝大多数,它通常与无机盐类紧密结合在一起,形成虾、蟹和昆虫等坚硬的外骨骼而 β 型的晶体则存在于乌贼鱼和硅藻中,它通常与胶原蛋白紧紧相连,表现出一定的柔韧性和流动性,还在体内控制着聚阴离子和电解质物质的运输。上面这两种晶形的甲壳素可以用许多手段加以区分,比如说,在 α 型晶体的红外光谱中,波数为 1656cm^{-1} 和 1621cm^{-1} 的位置上总是出现双峰,而 β 型的晶体则只在上述两个位置之间显示出一个单峰。

甲壳素的生产,通常以甲壳类动物的外骨骼为原料。受地理环境和生物迁徙规律的影响,不同地区的甲壳素生产单位往往会选用不同的原料。我国大陆沿海地区多用对虾头、对虾壳;而台湾和日本除用对虾壳外,还采用梭子蟹壳。在欧洲和南美,龙虾壳就成了占主导地位原料。在上述这些原料中,甲壳素都是与大量

的无机盐、壳蛋白紧紧地结合在一起的。因此,在提取工艺上一般要先用稀酸脱去无机盐,再用热的稀碱溶液除掉蛋白质。通过电镜观察得知,蛋白质分布在壳体的呈无规则网络结构的甲壳素中,而无机盐则填充在由甲壳素和蛋白质组成的层与层之间的空隙中。所以,只有在经过多次重复酸碱处理后,才能得到具有珍珠光泽的甲壳素精制品。可是,由于甲壳素是很难溶于稀酸稀碱和一般有机溶剂的,这就使它的应用受到了很大的限制。

把精制的甲壳素放在45%~55%的浓碱中处理一段时间后,情况就大不相同了。新生成的物质在稀酸溶液中具有良好的溶解性,人们叫它“可溶性甲壳素”也叫“壳聚糖”(chitosan),它是多糖中惟一带碱性者,因而具有许多独特的物理和化学性质。结构研究证实,壳聚糖之所以与甲壳素不同,是因为前者在浓碱处理中丢失了大量的乙酰基;也就是说,在壳聚糖的长链上,许多糖环的2位上的氨基上不再由乙酰基取代。这些氨基很易与氢离子形成阳离子配合物。近年来,壳聚糖用于保健食品的生产,表现出多方面的生理活性,而这些活性产生的机制,则很可能与壳聚糖的多聚阳离子特性有关——在生物体中,多聚阳离子实在是难得一遇的。

在化学测定中,我们把壳聚糖大分子中游离氨基和总氨基的摩尔数之比定义为“脱乙酰基度”(Degree of deacetylation, D. D. 值)。D. D. 值是壳聚糖性质的非常重要的一个指标,它不仅与壳聚糖的很多物理、化学性质有关,也关系到该物质的一些生理活性作用。壳聚糖能够溶于稀酸,也与大量游离氨基的存在有关。事实上,这一溶解过程是分步进行的,而氢离子与游离氨基形成阳离子配合物,则是整个过程中最关键的一环。由此,人们得到的启发是:甲壳素在稀酸溶液面前如此顽固,可能是与相应的阳离子配合物形成过于困难有关。在结构上,由于乙酰基与氮原子相连,羰基氧强大的电负性会使氮原子上电子云的密度有所减弱。这样一来,除非是高浓度的无机强酸,一般浓度的氢离子就对它无可奈何

了。顺着这一思路,为解决甲壳素溶解问题,人们把目光投向了氢在周期表上的近邻——锂,因为锂离子对负电荷的亲合性比氢离子要大。将锂盐加入溶剂会更有利于上述阳离子配合物的形成。果然,当甲壳素被投入到氯化锂与酰胺的混合溶剂中时,困扰人们许久的甲壳素溶解问题终于得到了解决。这个发现是 Austin 在 20 世纪 70 年代末作出的,在此基础上,甲壳素的研究近 20 年来取得了飞速的进展。

纤维素可通过微晶化处理而使其性能得到改善,同样,甲壳素也可通过进行类似的处理制备出“微晶甲壳素(microcrystal chitin MCC)。其制备方法是:先用浓的无机强酸将粒度较大的甲壳素溶解,再将酸溶液稀释而使甲壳素得以微晶化。据报道,这样制得的产品,其直径可以小到 $80\mu\text{m}$ 以下。MCC 由于粒度小,其溶解性能比微晶化前得到了明显改善,这不仅大大地扩展了甲壳素的应用,而且对于相关的基础研究也具有重要意义。甲壳素分子带有大量的乙酰基,这使它在紫外波段具有相应的吸收,这些紫外吸收数据对于研究甲壳素的物理化学性质具有重要的意义。特别是不同生物来源的甲壳素可能带有不同的侧链修饰基团,从而可能会在物化性质和生理活性上有所差异。然而,紫外吸收只有在真溶液中才能测定。但若将甲壳素制成壳聚糖后再进行紫外研究,则有可能使一些基团在浓碱处理中丢失。MCC 的制备则为这些问题的研究提供了方便。

5.3 真菌来源的甲壳素/壳聚糖

从海洋甲壳纲生物的外壳中制备甲壳素,虽然方法简单,但由于产品的原料来源受到相关生物生长周期和捕量的制约,其产量受到限制,再加上生产工艺上存在大量耗酸、耗碱、腐蚀设备、污染环境等问题,因此,近年来各国都在积极开展利用真菌发酵技术,

从其细胞壁中提取甲壳素和壳聚糖的研究。用这类方法,不仅可望使生产原料的供应得到稳定,有可能增加甲壳素、壳聚糖的供应量。一个更重要的优点是,从许多真菌中可以直接分离得到壳聚糖,耗碱量极大的脱乙酰基操作可以完全省去。此外,人们还期待,真菌来源的甲壳素/壳聚糖很有可能同海洋来源的这类物质存在结构上的细微差异,从而导致它们的物理、化学性质乃至生物活性也会有所不同。关于这些问题的研究,现在正在加紧进行之中。我国在真菌来源甲壳素、壳聚糖的研究中也取得了不小的进展,近年来已有从黑曲霉、米根霉、鲁氏毛霉、蓝色犁头霉等一批真菌中制备此类物质的方法问世(表 5.3)。

表 5.3 细胞壁中含甲壳素/壳聚糖的真菌类群

真菌类群	细胞壁成分	备注
卵菌纲 节水霉目	纤维素,甲壳素, β -葡聚糖	节水霉科
前毛壶菌纲	纤维素,甲壳素	
接合菌亚门	甲壳素,壳聚糖	
壶菌纲		
子囊菌亚门	甲壳素, β -葡聚糖	(除半子囊菌纲)
担子菌亚门		(除掷孢酵母科)
掷孢酵母科	甘露聚糖,甲壳素	
红酵母科		

无论甲壳素/壳聚糖的来源如何,它们在真菌体内都是通过一系列相当复杂的酶促反应被制造出来的。这一生物化学过程通过葡萄糖、6-磷酸果糖和6-磷酸葡萄糖胺的代谢途径,甲壳素合成酶最终利用这一途径生成的 UDP-N-乙酰葡萄糖胺为原料构建甲壳素的大分子。某些种类的真菌中还存在甲壳素脱乙酰基酶——这使得它们的细胞壁中含有壳聚糖。甲壳素合成酶首先从链孢霉中被发现,此后在芽枝卵菌、毛霉、水霉、曲霉、根霉等多种真菌中都

找到了它的踪迹。真菌中甲壳素合成的部位,在细胞质膜内侧的“几丁体(chitosome)”上,这种圆形颗粒直径通常在40nm~70nm之间,它所含的甲壳素合成酶处于酶原状态,需要靠蛋白酶切去其上的部分肽链才能具备活性。将UDP-N-乙酰葡萄糖胺,蛋白酶和几丁体在体外一同保温,就可以观察到甲壳素纤维的生长过程,以毛霉和啤酒酵母等真菌为实验材料都可看到此类现象。若要得到比活力较高的甲壳素合成酶,则需先用丁醇和毛地黄皂苷等溶剂将甲壳素合成酶原从几丁体中抽提出来,再通过凝胶过滤、胰蛋白酶处理等方法将抽提物纯化、活化。这样,人们就可以更好地研究这种酶的脾气秉性,从而设计出各种方法来提高细胞壁中甲壳素/壳聚糖的含量了。比如说,二价金属离子镁和钴对甲壳素合成酶有明显的活化作用,故而在添加少量镁盐的培养体系中,这两者的产量都会有所提高(表5.4)。

表 5.4 阳离子对甲壳素合成酶活力的影响*

阳离子 终浓度:10 mmol	被结合的 N-乙酰葡萄糖胺 nmol/min·mg 蛋白	对照物水平
对照	0.90	100.0%
铁离子(三价)	0.26	28.5%
镁离子	1.88	206.6%
钴离子	1.02	112.1%

* 实验材料:被孢霉属的 *Mortierella vinacea*

5.4 甲壳素/壳聚糖的应用

甲壳素和壳聚糖已在工业、农业、医药、轻工等诸多行业中大显身手。但其溶解性能仍是应用中的主要限制因素。所以,人们还在研究各种方法,通过对它们进行一些化学修饰,改善其溶解性,甚至可以使其溶水中。在这些改性后的产物中,往往还会具有

改性前所没有的其他优良性质。可以这样说,甲壳素、壳聚糖以及它们衍生物的广泛应用,正在悄悄地改变着我们的生活。

首先谈谈医药领域,这是它们发挥作用的主战场。甲壳素、壳聚糖特别适于被制成人造皮肤和手术缝合线。拆线是令手术病人感到很痛苦的事,但用甲壳素制成的手术缝合线却无需拆除,手术后一个月就被人体分泌的溶菌酶自然降解了。更重要的是,用壳聚糖制成的人造皮肤、人造肾膜、人造血管、血海绵等产品,与人体组织不产生排异反应,具有良好的适应性。一般来说,如果皮肤破坏一旦伤及真皮部分,利用自体再生修复就不再可能了。而除双胞胎外,异体移植又可能会引起严重的排异反应。用壳聚糖制成的人工皮肤具备良好的组织亲和性,可以减轻患者疼痛,再加上透气性强,因而越来越受到人们的普遍关注。壳聚糖是制造隐形眼镜和相应护理液的好材料,它优良的透气性和良好的吸水性能正日益得到佩戴者的好评。羧甲基甲壳素可以用于制备缓释胶囊,用这种物质包裹的药物进入体内后,其药力能够得到持续地释放。

甲壳素/壳聚糖还被广泛应用在农业领域中,壳聚糖可以用于制造种子处理剂,激发种子提前发芽,促进作物生长,提高抗病能力,从而大幅度提高农作物产量。它用量少,无毒副作用,具有良好的应用前景。大田试验的结果证实,经壳聚糖处理过的棉籽和玉米,其增产幅度可分别达到 11.8% 和 14.2%,效益十分显著。

在动物实验中,人们发现壳聚糖与胃酸形成的凝胶可以在肠道内稳定存在,具有吸附胆汁酸和胆固醇的诱人性质。用这个原理制成的功能食品不仅可以减轻胃酸过多所带来的危害,防止胃溃疡,更可以收到降血脂的良好效果。

壳聚糖还是工业废水处理中的得力助手,由于它含有大量的羟基和氨基,所以具有与多种金属离子螯合的能力。利用它的这一特性,人们将它制成放射性废物回收剂,从海水和铀矿废水中回收铀;制成废水处理剂,净化重金属废水。将壳聚糖溶于醋酸后

还可作为离子絮凝剂使用,特别适用于活性污泥的絮凝、脱水。这种絮凝剂不仅无毒,而且比合成絮凝剂具有更好的可降解性。实验证实,在浊液浓度为 1152×10^{-6} 时,用 100×10^{-6} 的壳聚糖处理后其浊度去除率可在 90% 以上。

甲壳素、壳聚糖和它们的衍生物还有许多的用途,可以这样说,甲壳素/壳聚糖类产品正在日益广泛地渗入到人类生活的各个方面。

对甲壳素/壳聚糖的生物活性研究是一个更为吸引人的领域,甲壳素的结构类似于纤维素,但纤维素惰性较强,而甲壳素/壳聚糖却表现出多方面的生物活性。首先,这类物质表现出很强的抗肿瘤活性。壳聚糖在体外就可以直接抑制癌细胞的生长,研究发现,在含量为 1×10^5 个/ml 的癌细胞溶液中加入 0.5mg/ml 的壳聚糖,结果 4 小时后癌细胞全部死亡。原来,肿瘤细胞的表面比正常细胞具有更多的负电荷,这种电荷上的不均衡使细胞的粘附力下降,组织遭破坏,而壳聚糖是一种聚阳离子电解质,它可以中和那些过剩的负电性,从而抑肿瘤细胞的生长和转移。近来,人们还发现甲壳素和它的多种衍生物具有促进免疫系统功能的良效,从而间接地关系到抗癌,抗病毒的活性。科学家们发现:由甲壳素制成的衍生物 NACOS-6,具有诱导干扰素生成的作用,从而产生抗癌的效果。近来也有研究显示,壳聚糖分子的小片段在体内可使多种表征免疫系统功能的指标有所提高;而这种活化免疫系统的机制,则很可能包括对 C-3 补体途径的激活。更为引人关注的是,1998 年新合成的一种甲壳素硫酸酯具有抗 HIV 的活性。人们认为这种新物质是通过自身的磺化位点与 HIV 上糖蛋白 gp120 相互作用后产生作用的。

自 1970 年来,已相继召开了 4 届关于甲壳素/壳聚糖的国际讨论会,出版了一大批专著。关于甲壳素/壳聚糖及其衍生物的研究正在世界范围内方兴未艾。目前,每年发表的相关论文和专利

数量增加很快。特别是在日本,平均每3天就有一项相关专利诞生。我国在此领域内的研究同世界先进国家相比还有不小的差距,但我们有理由相信,通过中国科学家的不懈努力,我国将在这个充满了机遇与挑战的领域中占有一席之地,为甲壳素造福人类做出自己的贡献。

张惟杰

参 考 文 献

2.2 “人小鬼大”的糖鞘脂——糖鞘脂与信息传递

1. Rock P, et al. *BIOCHEMISTRY* 1990, 29: 8484
2. LEDEEN R W, et al. *METHODS ENZYMOL* 1982, 83:139
3. HAKOMORI: *BIOCHEM SOC TRANS* 1993, 21: 583 ~ 595
4. Sorice, et al. *J Lipid Res* 1997, 38: 969 ~ 980
5. Haseltine W A. *Sci Am* 1997, 276 (3): 92 ~ 97
6. Tsuji S, et al. *J Biochem* 1983, 94: 303 ~ 306
7. Hakomori S. *JBC* 1990, 265: 18713 ~ 18716
8. Weis F M B, Davis RJ. *JBC* 1990, 265: 12059
9. Bremer E G, Hakomori S, et al. *JBC* 1984, 259: 6818
10. Stephan V, et al. *Mol Immunol.* 1997 Feb, 34(3):227 ~ 235
11. Rodrig N, et al. *J Biochem (Tokyo)* 1988, 104(2): 215 ~ 219
12. Yates A L, et al. *J Neurochem* 1989, 53(1): 162 ~ 167
13. Ding Y, et al. *In Vivo* 1998, 12: 357 ~ 362
14. 崔肇春, 张新波等. *生物化学杂志* 1992, 8(6): 724 ~ 729
15. 马克里, 崔肇春等. *生物化学杂志* 1996, 12(3): 365 ~ 369
16. 崔肇春, 马克里. *生命的化学* 1994, 14(2): 8 ~ 11
17. Wang L H, 崔肇春, 杨福愉等. *FEBS Lett* 1996, 388: 128 ~ 130
18. Yuling Wang, Zhaochun Tsui and Fuyu Yang. *Glycoconjugate Journal* 1999, 16: 781 ~ 786
19. Taki T, et al. *Glycoconjugate J* 1995, 12(4): 541
20. Lewin B. *Genes (6th Ed)*, Oxford, 1997, 1124
21. Wallach D. *TIBS* 1997, 22(4): 107 ~ 109
22. De Maria R, et al. *Science* 1997, 277: 1652
23. Cuvillier O, et al. *Nature* 1996, 381: 800
24. Wu G S, Ledeen R W, et al. *J Neurosci* 1955, 15(5): 3739 ~ 3746

2.3 生殖过程中的中介——糖链

1. L. H. Bookbinder, A. Cheng, J. D. Bleil. Tissue- and species- specific expression of sp56, a mouse sperm fertilization protein. *Science* 1995, 269, 86 ~ 89
2. P. M. Wassarman. Zona pellucida glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.* 1988, 7415 ~ 7425
3. A. Cheng, D. Stout, N. Kresge, H. Fox, J. Bleil. *Biochemistry of fertilization in mammals.* TSRI Scientific Report 1997—1998: 207
4. M. Seppala, H. Koistinen, R. Koistinen, E. Mandelin, S. Oehninger, G. F. Clark, A. Dell and H. R. Morris Glycodelins; role in regulation of reproduction, potential for contraceptive development and diagnosis of male infertility. *Hum. Reprod.* 1998, 13262 ~ 13270
5. B. A. Fenderson, E. H. Holmes, Y. Fukushi and S. Hakomori, Coordinate expression of X and Y heptants during murine embryogenesis. *Dev. Biol.* 1986, 114, 12 ~ 21
6. F. Poirier and S. Kimber, Cell surface carbohydrates and lectins in early development. *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3(10), 907 ~ 918
7. Z. M. Zhu, N. Kojima, M. R. Stroud, S-i. Hakomori and B. A. Fenderson. Monoclonal antibody directed to Le^y oligosaccharide inhibits implantation in the mouse. *Biol. Reprod.* 1995, 52903 ~ 52912
8. Z. M. Zhu, X. Q. Wang. Role for cell surface oligosaccharide in cell recognition during implantation. *Molecular Human Reproduction* 1998, 4735 ~ 4738
9. G. F. Clark, D. Anne, H. R. Morris, M. Patankar, S. Oehninger and M. Seppala. Viewing AIDS from a glycobiological perspective; potential linkages to the human foetoembryonic defence system hypothesis. *Mol. Hum. Reprod.* 1997, 3, 5 ~ 13

2.4 糖分子与异种器官移植

1. Uri Galili. *Immunol. Today* 1993, 14, 480 ~ 482
2. Jeffrey L. *Plant Nature* 1998, 392 (supp), 11 ~ 17
3. Narin Osman, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 14677 ~ 14682
4. Robert P. Lanza, et al. *Scientific American* 1997, 276, 54 ~ 59

2.5 备受关注的古老生物大分子——蛋白聚糖

1. Hardingham T. E. , Fosang A. J. *FASEB Journal* 1992,6:861 ~ 870
2. Iozzo R. V. *Annu Rev. Biochem*,1998,67:609 ~ 652
3. Maccarana M. , Lindahl U. *Glycobiology*,1993,3(3):271 ~ 277
4. Ruoslahti E. *Annual Review of Cell Biology*,1988,4:229 ~ 255
5. Ruoslahti E. , Yamaguchi Y. *Cell*,1991,64(5):867 ~ 869
6. Saunders S. ,Jalkanen M. ,O'Farrell S. and Bermfield M. *J. Cell. Biol.* 1989, 108(4):1547 ~ 1556
7. Schonherr E. , Jarvelainen H. T. , Sandell L. J. and Wight T. N. *J. Biol. Chem.* , 1991, 266(26):17640 ~ 17647
8. Turnbull J. E. , Hopwood J. J. , Gallagher J. T. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* , 1999,96(6):2698 ~ 2703
9. Tsen G. , Halfler W. et al. , *J. Biol. chem.* 1995,270:3392 ~ 3399
10. Venkataraman G. , Shriver Z. , Raman R. and Sasisckharan R. *Science* , 1999,286(5439)537 ~ 542

3.1 免疫球蛋白分子糖链的异常与自身免疫疾病

1. R A Dwek, A C Lellouch, M R Wormald. *Glycobiology: The function of sugar in the IgG molecule. J Anat.* 1995, 279
2. K N Lai and C K Leung. *Current topics in Nephrology: The nature of IgA molecule in IgA nephropathy.* 1997, Vol 6(6):509
3. J Mestechy et al. *Defective galasylation and clearance of IgA1 molecules as a possible etiologic factor in IgA nephropathy Contrib Nephrol* 1993, 104:172
4. M Levy et al. *Worldwide perspective of IgA nephropathy Am J Kidney Dis* 1998, 12:340
5. K Aho et al. *Serum immunoglobulins and the risk of rheumatoid arthritis. Annals Rheu Dis* 1997, 56:351
6. P J Delves. *The role of glycosylation in autoimmune disease Autoimmunity* 1998, Vol 127: 239

3.5 糖链在流感病毒侵袭细胞中的作用

1. W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel and D. C. Wiley. Structure of the influenza virus hemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid, *Nature*, 1988, Vol. 333:426 ~ 431
2. Y. Suzuki. Gangliosides as influenza virus receptor, variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains, *Prog. Lipid Res.* 1994, Vol. 33:429 ~ 457

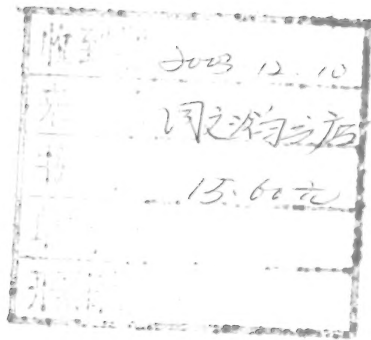
4 寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用

1. J. K. Sharp, B. Valent, P. Albersheim, *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 11312
2. (a) B. Lindberg et al., *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 11341. (b) N. Hong, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 3179. (c) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. Derosse, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 449. (d) W. Wang, F. Kong, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 1937
3. F. Cote, M. Hahn, *Plant Mol. Biol.* 1994, 26, 1379
4. P. Albersheim et al., WO 91/06312
5. R. A. Creelman, J. E. Mullet, *Plant Cell*, 1997, 9, 1121
6. (a) P. Lerouge, *Glycobiology*, 1994, 4, 127. (b) J. Denarie et al, *Nature*, 1991, 351, 670; *Cell*, 1993, 74, 951. (c) H. Rohrig et al, *Science*, 1995, 269, 841
7. (a) K. C. Nicolaou et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 8701. (b) L. Wang, Y. Hui et al, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 7763
8. S. Aldington, S. C. Fry, *Adv. Bot. Res.*, 1992, 19, 1 ~ 101
9. W. Wang, F. Kong, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 5744. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1999, 38, 1247
10. Ogawa, T. et al. *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 1061
11. (a) Wong, C. H. *Chimia*, 1993, 47, 127. (b) Wong, C. H. Gaeta, F. C. A. WO 94 25,614

5 甲壳素/壳聚糖——有广阔应用前景的多糖

1. 吴东儒等. 糖类的生物学. 北京:高等教育出版社,1987
2. 蒋挺大. 甲壳素. 北京:中国环境科学出版社,1996

3. Muzzarelli. R. A. A. Chitin, 1977
4. Matthens F. A. Goosen. Applications of Chitin and Chitosan, 1997
5. Roberts George A. F. Chitin Chemistry, 1992
6. Shin-ichiro Nishimura et al. Carbohyd. Res. 1998, 306:427 ~ 433



2003.12.10

中国科学院图书馆

15.60元

中科院植物所图书馆



S0001634

58.17422
549

000027592



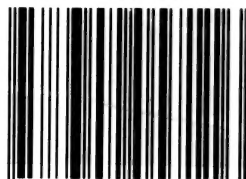
张树政 院士

河北辛集市（前束鹿县）人，1922年出生，1945年毕业于北京大学理学院化学系，从事化学、微生物学、酶学、糖生物学和糖生物工程学研究五十多年，是我国微生物酶学研究的奠基人之一。年近80，仍积极倡导和组织我国糖生物学和糖生物工程学的研究。多次荣获中国科学院重大科技成果奖和科技进步奖，发表论文约150篇，并主编、合编过多种学术著作，于1991年当选为中国科学院院士。

▶ 后基因组学和蛋白质工程正在为人类作出划时代贡献时，糖生物学才露出冰山一角。糖生物学和糖生物工程是生命科学中最神秘、最吸引人们探索的新领域。这个谜一般的领域中，蕴藏着哪些玄机，将会有助于解决哪些人类面临的难题，读者们可以从这本小册子中初窥一斑。

责任编辑 罗 健

ISBN 7-302-05711-7



9 787302 057116 >

定价：15.60元