

## 蛋白质构象的可变性及其在胰岛素结构中的反映

毕汝昌

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

我们对蛋白质三维结构的认识, 主要来源于对蛋白质晶体的 X 射线衍射分析。应用该方法已测定了一百多个蛋白质分子的结构。这些结构分析表明, 蛋白质分子具有一个特定的空间结构, 并且是相当稳定的致密结构。蛋白质多肽链的卷曲方式, 主要取决于非共价力。除了少数的二硫键外, 蛋白质结构中有大量的次级键。水溶性蛋白质结构内部由空间上契合得很好的疏水氨基酸侧链组成, 带电或极性侧链, 除了为行使特殊的功能而藏于凹窝或沟槽的深处, 一般都分布在分子的表面。由较长肽链组成的结构, 常常可以被划分为相对独立的较稳定的结构域; 而含有多条肽链的蛋白质, 通常形成由几个亚基装配成的四级结构。结构域或亚基间的相互配置关系也主要由非共价键维系。

由于蛋白质的空间结构主要依赖于非共价键, 其结构体现了相当高的柔性。这种柔性是蛋白质为行使其生物学功能所必需的。本文将概述蛋白质结构的可变性, 并结合胰岛素结构的特点, 对胰岛素作用中构象变化的意义进行讨论。

### 一、蛋白质结构的可变性及其意义

大量的分析结果指出, 蛋白质分子表面上的氨基酸侧链的构象常常是可以变动的, 处于表面的肽链转折部分也是较活动的。在适当的条件下, 蛋白质能发生重要的构象变化。这种变化系指分子几何中不涉及化学键断裂或重组的任何改变。如果不考虑分子中原子围绕它们的中心位置的热振动, 这里可分为氨基酸侧链、肽链片段和结构域或亚基等三种水平上的活

动。

蛋白质活动性的见证来自于一些物理方法的测定。常用的观测方法有溶剂交换、各种光谱法等。溶剂交换法测定进出蛋白质的氘或氚标记物的交换率, 因而可给出溶剂穿透蛋白质的信息; 不同类型的光谱法, 如荧光法, 特别是核磁共振, 能够提供局部构象变化的信息。近些年来, 一种理论计算方法——分子动力学引起了不少人的注意。这种分析是对含有经验势能函数的蛋白质原子运动方程求解, 模拟蛋白质分子的结构涨落。一个小蛋白质, 牛胰蛋白酶抑制剂的分子动力学已被模拟。定性地讲, 表面侧链的一般运动就象人群中的推挤碰撞一样; 其中一个内部的水分子, 借助在肽链 NH 和 CO 基团间的跳跃, 从蛋白质内部跑出来。

关于蛋白质结构的可变性, 晶体学方法可以提供较直接的证据。单晶体结构分析是测定蛋白质分子在晶体里的结构。但是, 在晶体里的蛋白质是高度水化的, 进而具有与在溶液中相类似的环境。晶体研究表明, 一个蛋白质晶体能够用一个由少数分子间接触点相联系在一起有序分子排列来描述。分子间的缝隙一般要占整个晶体体积的二分之一左右。因此, 蛋白质的晶体结构同溶液结构特点和性质是非常相近的。一般地讲, 对晶体结构测定获得的信息能够反映蛋白质在溶液里的性质。我们将在后面专门的章节叙述研究蛋白质柔性及其动力学性质的晶体学方法。

在文献中常常提到, 蛋白质的柔性, 特别是对于酶, 是它们发挥生物学功能所必需的。Koshland 提出了酶的作用机制中可能发生的构

象变化<sup>[1]</sup>。一个酶为适应其底物而诱发某些原子移动,进而形成联系更紧密的初始复合物,在催化的长过程中一些化学基团进一步的重新配置可导致化学催化的实现、产物的释放和辅酶的重新循环。

当一种寡聚体蛋白质的亚基和一小分子配体结合时,发生的蛋白质构象变化引起该蛋白质别的亚基和其他配体结合性质的改变,称为别构现象。第一个配体分子的结合导致各配体分子更易结合的现象称为正协同性;反之,若降低其亲合能力则称为负协同性。血红蛋白是最早发现的具有别构效应的蛋白质,第一个氧分子同一个亚基的结合可大大地加速其他亚基同氧的结合。结构的柔性对其他别构蛋白质的生物活性也是至关重要的,是亚基间交换信息,发挥调节功能必不可少的。不同的例子已由 Careri 等人所综述<sup>[2]</sup>。不久前,在英国一次关于分子作用的讨论会上,Chothia 就蛋白质亚基间的通讯,报告了初步研究结果,说明由配体的结合引起的蛋白质小的构象变化,可以在蛋白质亚基中或其间传导。

结构的柔性对分子间的相互识别,可能具有重要的意义。有利的论点之一,在于它允许更多的分子表面被埋进结构内部,从而增强两分子的缔合;它还可通过使结合步骤有序化进行选择。乳酸脱氢酶同辅酶的作用是一个很好的例子。NAD 的腺嘌呤部分首先连结,并诱使尼克酰胺结合的构象变化。结合顺序是固定的,尼克酰胺不能先于腺嘌呤连结,底物不能先于辅酶结合。

不久前 Huber 列举了用 X 射线衍射分析发现的大尺度的结构可变性<sup>[3]</sup>。一些蛋白质,如免疫球蛋白,是由结构上分隔开来的,通过单链肽段连结在一起的结构域组成的。这些连结单链使得结构域能较独立地活动和发挥作用,便于蛋白质执行复杂的功能;一些酶中不同结构部分间的相对运动发生在催化循环中。这些酶处于开放型时,可设想为允许底物结合和产物释放,而处于关闭型时其底物避开溶剂,并正确地相对于催化基团而配置,以便催化能够进行;

在另一种情形中,柔性可借助去除肽段或结合配体服务于蛋白质的调控性质。胰蛋白酶和其酶原有约 85% 的肽链的结构基本是相同的,其余 15% 有相当大的差异。这个有差异的结构部分由四个肽链片段组成,称为活化结构域。在酶原里它是无序结构,而在酶解切除 N 端肽段后生成的胰蛋白酶里,该结构域却是有序结构,使分子变为有生物活性的酶。这里,结构从无序到有序的转化是用于调节酶的活性。

## 二、蛋白质结构可变性的晶体学研究

X 射线晶体学方法测定的是静态结构,但从同类结构的分析比较,仍能获得不少有关蛋白质结构柔性的资料。下面列举通常应用的几种分析手段及可能得到的结果。

**1. 蛋白质同底物、抑制剂或其他配体的复合物的结构测定** 为研究酶或其他蛋白质的作用机制,在晶体学研究中,这是最好的办法。这样不但能够直接观察到结合部位,而且通过同原蛋白质的结构比较,可以得到一些有关作用方式的信息。如果能够将中间的过渡状态固定下来,并测定其结构,则可了解作用发展的过程。低温晶体学的进展使这种研究得以实现,并取得了初步成果。

从这类复合物的研究,已积累了相当多有关蛋白质构象变化的资料。已经发现,相当多的酶,如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、羧肽酶、溶菌酶,在连结它们各自的底物或其类似物时,在活性中心区域,都要发生某些原子位置的调整,有的催化基团移动达 14 埃。对于其他较复杂蛋白质的晶体学研究表明,与配体作用引起的构象变化不限于局部构象,而是涉及到较大部分结构甚至四级结构的变动。例如上述的血红蛋白,小小氧分子的连结,通过少数氨基酸侧链和部分主链的变动竟可导致由四个亚基组成的四级结构的变化,进而促进同其他氧分子的结合。另一个很好的例子是己糖激酶。它的活性中心位于两叶结构之间的隙缝中。结合底物葡萄糖时,发生相当大的构象变化,一叶结构相对于另一叶转动 12°,葡萄糖进入的隙缝会关闭起来。

**2. 不同晶体学环境中的结构对比** 同样的蛋白质常常以不同晶型结晶,有时也可形成一个独立单位有两个以上分子的晶体。对这类处于不同晶体学环境里的结构分析表明,一方面由于蛋白质结构的稳定性,不同晶体学环境里的结构是相类似的;另一方面利用相当弱的晶体包装力也能研究蛋白质结构的可变性。有时晶体包装力成为使这种研究复杂化的因素。例如,在溶液中某个氨基酸侧链或肽段是活动的,可以采取几个不同的构象。但在晶体里分子间的作用却可能使它固定下来,仿佛它具有刚性的单个构象。然而,在不同的晶体学环境里的结构分析能给出有关结构柔性的信息,在合适的结晶条件下,甚至可以观测到几种不同的构象。后面谈到的胰岛素结构研究就是很好的例子。偶尔,还会遇到更有趣的情形,蛋白质分子在不同晶型中的异样构象,似乎体现了一定的生物学意义。柠檬酸合成酶在两种晶型里采取不同的构象:在四方晶胞里的开放型没有催化活性,不能连结辅酶 CoA,而形状很好的 CoA 连结部位却已知存在于单斜晶胞里的关闭型中。

**3. 温度因子分析** 晶体衍射的 X 射线强度,由于原子的热振动和其他原因造成的无序性,会以指数形式随衍射角度减弱。在晶体学中,表示这种强度衰减的因子称为温度因子,与原子贡献的衰减相关的原子温度因子决定于原子的均方移动。较好的蛋白质修正结果能够给出有意义的、可以看作是蛋白质柔性量度的温度因子。从一些蛋白质的温度因子分析,可以概括出若干带有规律性的特点,例如

(1) 外部残基侧链的温度因子沿侧链而增大。在电子密度图上,电子密度表现为随侧链往外伸长而越来越弥散,有时甚至变得难以追踪;

(2) 同种类蛋白质分子在不同晶型中,其温度因子的值沿肽链变化的倾向通常是一致的;

(3) 在一些酶中,接近活性中心的原子温度因子在天然型中较高,而在结合配体的情形

中会变得较低。

应用较复杂的温度因子分析,能够研究蛋白质的动力学性质。Frauenfelder 等人记录了高铁肌红蛋白在一系列温度下的 X 射线衍射数据,并应用约束性最小二乘方法,对结构模型进行了修正。对所得温度因子的分析,提供了蛋白质构象亚态存在的证据,因为原子的均方移动达到的值比热振动所能给出的要大得多<sup>[4]</sup>。

由于 X 射线晶体学方法给出的是按时间和空间平均的结构图象,一般不能区分由不同构象亚态在不同晶胞里的随机分布(称为静态无序性)和单构象热运动(称为动力学无序性)两者的效应。冷却是可以将它们区分开来的手段,因为只有热运动能够被冻结。上面曾提到,在胰蛋白酶原理,其活化结构域是无序的。应用低温分析技术,Huber 等人证明,这种无序性主要属于静态的,是由几个构象亚态所造成的,因为同室温状态相比,该活化结构域的有序性并没有由于温度降低而增加。

蛋白质结构修正技术的进展,是近些年蛋白质晶体学发展中的显著成就之一。应用数学方法,对用实验方法或较直接的方法所得到的结构模型进行精化,可以获得更准确的原子位置和温度因子参数,因而可以观测到以前不能测到的构象变化。随着修正方法和其他技术的进一步改进和完善,蛋白质晶体学必将对研究蛋白质的柔性和动力学性质做出更大贡献。另一方面,由于单晶衍射法的时间和能量分辨率是有限的,它需要同光谱法等其他方法相配合,才能更有效地探明蛋白质的复杂的结构性质。

### 三、胰岛素的结构和功能

胰岛素,作为一个小蛋白质,受到了广泛研究。虽然对这个多肽激素分子的空间结构的了解已达到目前蛋白质结构测定中最好的水平,但它发挥生物学功能的奥秘仍是对我们的巨大挑战,弄清它的作用机制及其后续的一系列生物学效应是现代分子生物学中的难题之一。

胰岛素是在胰脏里由  $\beta$  细胞产生出来的,它在糖类和其他重要物质的代谢调节中起着重

要作用。从各种来源胰岛素(包括不同种属、不同晶型和化学修饰)的晶体结构分析已经知道,同其他蛋白质分子一样,胰岛素具有相当稳定的空间结构。由 A、B 两条肽链组成的胰岛素分子结构,除三个二硫桥(A6—A11, A7—B7 和 A20—B19)外,主要由非共价键维系着。它具有三段由较规则化的氢键系统稳定的螺旋(B9—B19、A1—A8 和 A12—A19, 见图 1)和配置致密的疏水内核。

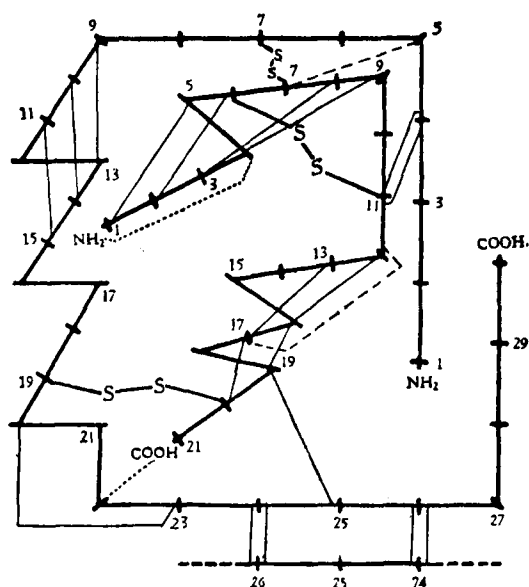


图 1 三方二锌晶体里胰岛素分子  
I 中氢键、盐键联系模式图  
细黑线表示主键间氢键

在不同的晶体学环境里,胰岛素分子的结构相类似,但不完全相同。在适当条件下,它能够发生显著的构象变化。在三方二锌猪胰岛素晶体中,两个独立分子以局部二重对称轴相关,形成二聚体。三个这样的二聚体围绕晶体学三重轴,并与轴上的两个锌离子相配合,构成六聚体。英国牛津 Hodgkin 研究小组首先报道,组成二聚体的两个分子非常相似,但不完全相同,一些氨基酸侧链,特别是 B25 的苯环的取向严重地偏离了二重对称性<sup>[5]</sup>。不久,我们公布了自己的分析结果,并指出这两个分子间的重要差异不仅包括某些侧链,而且也涉及到主链,在 A 链 N 端螺旋的构象上表现尤为明显<sup>[6]</sup>。后来

的一些研究表明,组成胰岛素二聚体的两个分子间的这类差异在某些场合里得以增大,而在另一些场合则可以减小<sup>[7]</sup>。在八目鳗胰岛素的四方晶型中,二聚体的两个分子以晶体学对称轴相关联,它们的结构是相同的。但是,在四锌胰岛素晶体中,胰岛素二聚体的两个分子的差异比二锌晶体中的大。其中一个分子的 B 链 N 端肽段,从二锌晶体中的伸展构象转变为螺旋构象,近似地成为原 B 链  $\alpha$  螺旋方向上的延续。这导致 A 链 N 端残基和 B 链 C 端残基背向移动和一些基团相对位置的变化。

对经过化学修饰的胰岛素的研究,同样可以对阐明胰岛素的结构性质做出贡献。我们曾对 B1 苯丙氨酸换为色氨酸的胰岛素衍生物进行晶体学分析<sup>[8]</sup>。低分辨率的分析结果指出,至少在三方二锌晶体中的一个独立的分子中,这种替换的反映较为明显,比苯丙氨酸疏水侧链还要大的色氨酸侧链指向分子内部,并对该分子的 A 链局部构象似有扰动。去 B 链羧端五肽胰岛素是另一个例子。该胰岛素类似物由酶解去除 B 链羧端五肽制备,还保留相当高的生物活性。在晶体里,去五肽胰岛素分子所处的环境,完全不同于已研究过的胰岛素晶态分子的环境。去五肽胰岛素分子是以单体形式存在,但其结构与胰岛素分子相似<sup>[9,10]</sup>。去五肽牛胰岛素 C2 晶胞中,一个独立的单位包含有两个相似、但不等同的独立分子。该结构已修正到 1.54 埃分辨率,与结构精度相关的 R 因子为 0.17。如果将这两个去五肽胰岛素分子和三方二锌胰岛素二聚体的两个分子进行比较,可以发现:结构的主要差异发生在 B1—B4 肽段和 B25 残基上,有的残基的位移达十多埃之远(见图 2);去五肽胰岛素分子更接近于三方二锌胰岛素分子 I (牛津小组称为分子 II),再次暗示分子 I 是比较稳定的胰岛素结构的基本形式<sup>[7]</sup>。各种已知的胰岛素分子结构的比较指明,胰岛素分子最稳定的结构部分是 B 链中段  $\alpha$  螺旋及其基于它的某些基团的相对配置关系,最易发生较大变动的部分,是 B 链 N 端肽段;不包括构象容易发生变化的肽链端部残基在内,所



低胰岛素分子的生物活性。其中一些被置换的残基对于发挥生物活性是非常重要的。例如用亮氨酸代替苯丙氨酸 B25, 几乎可使胰岛素失活。B24、B25 等残基的重要性同时被 B 链 C 端缩短的实验所证实。大体上讲, 胰岛素的生物活性随去除的 C 端残基的增加而递减, 去五肽胰岛素还保持相当的活性, 而去六肽(即再去除 B25) 使活力降低到 40%<sup>[12]</sup>, 再切除 B24 的去七肽胰岛素则几乎完全丧失了生物活性<sup>[13]</sup>。基于上述各类研究结果, 可以推测, 胰岛素同受体的结合部位可能包括形成二聚体的疏水面的大部分残基, 例如芳香残基 B24、B25、B16 等, 而邻近该区域的一些残基 A1、A5、A19 和 A21 等也可能参与同受体的作用。

#### 四、构象变化在胰岛素作用中的重要性

胰岛素和它的受体同属于蛋白质, 因而我们可以从蛋白质间、酶与底物或抑制剂间相互作用的方式, 例如胰岛蛋白酶同其抑制剂的作用模式, 来设想它们之间的作用。但是, 与胰岛素的结构特点相联系, 这里也必定有其作用的特殊性, 以发挥特殊的生物学功能。同其他蛋白质相比, 胰岛素结构具有不少令人寻味之处。例如同它的受体分子相比, 胰岛素是一个相当小的调控蛋白质; 它有着一个重要残基分布广泛、包含较大的平畅非极性区域的表面结构; 能发生诸如 B 链 N 端肽段那样大尺度的构象变化。做为一个调控蛋白质, 在表达生物活性的过程中, 结构的可变性一般都起着重要的作用。结构相对的小巧似乎正是为适应对柔性的要求。对于稳定的卷曲构象, 似乎存在着极限大小, 能够以此来解释小的多肽激素, 如胰高血糖素的极端柔性。

胰岛素同受体作用的特异性, 意味着在两种分子的结合面中存在着紧密的立体互补接触, 通常包括形成氢键、水分子的位移以及极性基团的电荷搭配或非极性基团的几何契合。相对稳定的构象显然有利于这种互补配置, 但一定的柔性能够使结构具有更多的优越性。正如 Blundell 所指出的, 首先由于它允许探查更多的

作用而能加速激素受体间特异的识别过程; 其次一旦激素同受体结合, 为了激活其生物效应, 受体和激素里发生的构象变化可能是必需的<sup>[14]</sup>。柔性可以加强激素与受体间的作用, 或许通过构象变化的传递, 使分布在表面不同位置上的更多的原子基团参与。

正如上一节中提到的, 通过晶体学分析得知, B25 等残基在不同的环境里能采取不同的构象。进一步分析表明, 这种差异可能是由微弱的分子间的作用所引起的。在三方二锌胰岛素晶体里, 二聚体的两个 B5 组氨酸处于不同晶体学环境里, 同周围原子不同的作用能够导致 A 链两段螺旋构象和配置上的不同, 进而通过与 B25 邻近的 A19 酪氨酸侧链的影响, 可以使两个 B25 苯丙氨酸的侧链占据不同的位置。可以设想, 当胰岛素分子的一些残基, 例如 B24、B16、B12 等, 同受体分子结合时, 胰岛素分子将发生较广泛的构象变化, 一方面通过一些基团, 例如 B25 的苯环的方位调正, 使两个分子接触表面的作用达到最佳互补, 另一方面这类构象变化也可能是使后续生物学效应得以发展下去的必需条件。

相当多的实验结果, 难以用不考虑结构柔性的简单的结构与功能关系的思想来阐明。胰岛素交联衍生物之一, 是将同一分子内的 A1 和 B29 两个空间上相接近的氨基酸残基共价连结起来。该胰岛素衍生物的空间结构同胰岛素无比较甚变化, 但生物活性却下降到 2—3%, 比简单的将这两个氨基化学修饰所得类似物的活性要低得多。一个较好的解释是这种交联限制了表达生物活性所需要的构象变化<sup>[15]</sup>。另一个例子是关于 B 链 N 端在胰岛素行为中的作用。它对胰岛素的免疫性质是重要的, 对胰岛素六聚体的形成和晶体堆积方式也是较敏感的。切除 B1 对胰岛素的生物活性几乎没有影响, 虽然光化学标记实验说明它在胰岛素同受体结合时距受体结合面非常近。更重要的事实来自肽链的缩短实验: B1—B4 的去除将使活性降低到 35—40%, 进一步切除不变残基 B5 和 B6 可使活性下降到 5—10%<sup>[11]</sup>。其中个别残

基在胰岛素作用中可能属于重要残基, 参加与受体的结合或进一步的信息传递。但是, B 链 N 端肽段在晶体里的相当大的构象变化似乎暗示, 它接触受体时的变动以及这种变动引起的分子其他部位的变化, 可能是其发挥作用的形式。在 B1 置换为色氨酸的胰岛素类似物的结构分析中, 我们曾涉及这一问题<sup>[6]</sup>。胰岛素与比它大得多的受体分子的作用可能是多点作用, B 链 N 端残基也以某种方式参与, N 端肽段的自由卷曲能力对正常作用的发挥可能是相当重要的。Dodson 提出, A 链和 B 链 C 端间的移动, 很可能是同 B 链 N 端的变动相关联的。支持这种猜测的迹象, 是不能将 A1—B29 交联胰岛素生长为类似于四锌胰岛素那样的晶体。前者对 A 链 N 端和 B 链 C 端进行了交联, 因而不能象后者那样, 伴随着 B 链 N 端的变动, A 链 N 端和 B 链 C 端的相对位置也可发生变化。总之, 如果考虑胰岛素结构柔性, 很多实验结果是容易解释的, 暗示结构可变性在胰岛素行为中的重要意义。

## 五、结 语

做为组成生物机体的主要组分, 种类繁多的蛋白质执行着各种功能, 以维持其生命。一种蛋白质能执行特定的生物学功能, 是由于它具有一个独特的精巧的空间结构, 它在各种生理条件下, 既能保持相对稳定的结构, 又能随着环境的微小变化发生一定的构象变化。应用 X 射线晶体衍射技术, 已观测到各种类型的蛋白质结构。关于蛋白质构象的变化及其重要意义也早有报道。但是, 由于缺乏合适的有效研究手段, 对蛋白质结构可变性的分析研究进展缓慢。随着对生命物质研究的广泛开展, 以及研究方法和技术的不断革新, 越来越清楚地认识到, 构象变化广泛地存在于各种作用系统之中, 不仅发生在蛋白质里, 而且发生在核酸或它们的相互作用中。结构的稳定性和可变性, 是具有生物活性的生物大分子, 发挥生物学功能必需的两个方面。

生命在于蛋白质、核酸等生命物质的运动。

新陈代谢过程中每一步都是重要的, 但每一步又往往源于分子或原子水平上的运动和变化, 分子构象的变化是其中最重要的一种。很多实验事实提示我们, 仅有蛋白质静态结构的资料是不够的, 不考虑结构的变化, 实验结果很难得到满意的解释。胰岛素就是一个很好的例子。这个蛋白质激素行使着复杂的功能, 它的结构具有相当的柔性。种种迹象表明, 只有把这种柔性在发挥生物活性时表现形式和作用搞清楚, 才能正确理解它的作用机制。

近些年来, 蛋白质研究领域取得了不少进展。已积累了相当的蛋白质结构资料, 特别是由于蛋白质晶体学研究技术的发展, 获得了更多的精确的信息; 在蛋白质结构及其相互作用的研究中引入了电子计算机图象显示系统等新的有力工具; 理论研究方法也有所发展, 用分子动力学已能算得同实验数据相比拟的结果。所有这些进展对研究蛋白质的动力学性质和柔性提供了有利条件, 并将给以有力的推动, 相信在不同学科相互渗透和各种方法相互配合的情况下, 蛋白质结构可变性的本质及其各种生物学表现形式将会被揭示出来。

## 参 考 文 献

- [1] Koshland, D. E.: *Scientific American*, **229**, 52, 1973.
- [2] Careri, G. et al.: *Crit. Rev. Biochem.*, **3**, 141, 1975.
- [3] Huber, R.: *Trends in Biochemical Sciences*, **4**, 271, 1979.
- [4] Frauenfelder, H. et al.: *Nature (London)*, **280**, 558, 1979.
- [5] Blundell, T. L. et al.: *Contemp. phys.*, **12**, 209, 1971.
- [6] The, Peking Insulin Structure Research Group: *Scientia Sinica*, **17**(6), 752, 1974.
- [7] Cutfield, J. et al.: *Structural Studies on Molecules of Biological Interest*, p. 527, (eds. Dodson, G. et al.), Clarendon Press, Oxford, 1981.
- [8] 毕汝昌, 雷克健等:《生物化学与生物物理学报》, **14**(1), 39, 1982.
- [9] Bi Ru-chang, et al.: *Acta Cryst.*, **B39**, 90, 1983.
- [10] Stuart, D. et al.:《中国科学》, **B**(1), 24, 1984.
- [11] Katsoyannis, P.: *Structural Studies on Molecules of Biological Interest*, p. 454, (eds. Dodson, G. et al.), Clarendon Press, Oxford, 1981.
- [12] 中国科学院上海生物化学研究所胰岛素组:《生物化

学与生物物理学报》, 9, 169, 1977。

[13] 鲁子贤, 虞荣华: 《中国科学》, 10, 990, 1980。

[14] Blundell, T. L. and Wood, S.: *Ann. Rev. Biochem.*, 51, 123, 1982。

[15] Cutfield, J. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 362, S. 755, 1981。

[本文于1983年4月23日收到]

## 甲种胎儿蛋白分子变异体研究进展

许 凯 黎

(上海市肿瘤研究所)

胚胎发育及癌变过程中, 人或动物细胞癌发育基因产物——癌胚蛋白 (oncodevelopmental proteins) 的量与质均具有一定的相似性。正常与胚胎或癌细胞之间的差异, 仅在于前者的癌基因表达被抑制, 后者去抑制。这一基本概念上的突破推动了生物学及医学的深入研究, 为癌症及其它胎儿先天性疾患的诊断奠定了基础。

当前在临床上 AFP 除已被确认为一种特异性较强的肿瘤标志物, 同时从基础上也研究了它的胚胎发育及癌变过程中基因表达、生物合成和分子构型的演变。本文着重概述 AFP 分子变异体的理化和生物学特性及其临床意义的研究进展。

### 一、AFP 变异体的物化特性

#### 1. AFP 分子的不均一性

早期资料分析表明 AFP 是均一性的多肽链蛋白, 仅在高度纯化过程中因 AFP 变性形成聚合体, 电泳上才出现多种分带。

随着蛋白质分离技术进展及对 AFP 分子结构的深入了解, 证明 AFP 是由多种不均一的蛋白质分子组成。用等电聚焦电泳分析人体肝癌细胞株及猴肝癌细胞株分泌入培养液中的 AFP, 有 8 M 尿素时出现六条带、分布范围是 pH6.0—6.2, 无尿素时有二条带, 分别在 pH4.6 及 pH5.2。用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析人、大鼠及小鼠的纯化 AFP, 当用 12% 凝胶电泳分析时, 大鼠的 AFP 为二条蛋白分子带, 分

子量分别为 74000 及 72000; 小鼠也为二条带, 分子量为 73000 及 72000; 但人仅为一条带, 分子量为 70000。当凝胶浓度降至 7.5%, 大鼠出现六条带。人出现三条带。这表明在电泳中呈现的不均一性与凝胶浓度有关, 其主要原因是分子表面所带电荷不同, 而与分子大小无关<sup>[1]</sup>。

#### 2. AFP 与不同碳水化合物结合形成分子变异体

各种不同来源的 AFP 经电泳分离分析, 表明它们含有不同数量的碳水化合物; 含量范围在 6%—7%。各种 AFP 分子结合的碳水化合物数量上的差异, 是造成电泳分子不均一性的主要原因。用神经氨酸酶处理纯化大鼠 AFP, 使原来二条迁移率不同的蛋白带并成一条。这证实了分子中碳水化合物是造成迁移率不同的根本原因。在确认 AFP 是糖蛋白分子后, Smith 等<sup>[2]</sup>首先将大鼠的 AFP 用刀豆球蛋白 A (Con-A) 亲和柱层析, 发现有二种与 Con-A 结合能力不同的 AFP 变异体, 即 Con-A 结合型及 Con-A 非结合型, 或细分成三种类型: Con-A 结合型、Con-A 弱结合型及 Con-A 非结合型。Kerchcart 等<sup>[3]</sup>用植物凝集素亲和双相免疫交叉电泳, 分析人、大鼠、小鼠的纯化 AFP 与各种凝集素的结合能力, 结果发现不同的凝集素与各种 AFP 具有不同的结合能力。扁豆植物凝集素 (LCA) 仅小部分分子不与小鼠 AFP 结合, 而 Con-A 却有一半以上分子不与小鼠 AFP 结合。但 Con-A 约有 90% 与人体 AFP 结合, 而 LCA 却有 50% 与人体 AFP 不