

细胞表面和血液中的粘附糖蛋白

——纤维连接蛋白

刘 秉 慈

(中国医学科学院、卫生研究所,北京)

目前,为了在分子水平上阐明细胞粘附、恶变、单核吞噬系统(网状内皮系统)的防卫功能以及结缔组织结构等问题,人们对一种有关的糖蛋白做了大量的分析研究工作,并将其命名为纤维连接蛋白(Fibronectin 缩写 Fn),来源于拉丁字 fibra(纤维)和 nectere(连接、固定)^[1]。

一、发现和命名

1948年 Morrison 等^[2]首先发现,有一种高分子量的血浆蛋白质在冷浴后可以和冷沉淀血纤维蛋白原一同沉淀下来,命名它为“冷不溶性球蛋白(CIG)”。1973—1974年几个实验室用不同的技术证实,在组织培养的成纤维细胞表面存在着一种大分子蛋白质。在此期间,其它工作者也相继报道了一些蛋白质或因子的存在。目前,经免疫学及生物化学方法分析鉴定,这些蛋白质和因子的结构及功能十分相似,实际上同属一种物质,即 Fibronectin(纤维连接蛋白)。表1是 Fn 的曾用名称与功能的关系^[3]。

Fn 主要以两种形式存在,一种是血浆中的 Fn,一种是细胞表面的 Fn。人血浆中 Fn 为多肽链的二聚体,亚单位分子量是 220,000,浓度是 0.3mg/ml。培养的成纤维细胞表面 Fn 占整个细胞全部蛋白的 1—3%,细胞 Fn 为二聚体或多聚体,亚单位的分子量是 200,000—250,000。两者的结构和功能都十分相似,具有十分相近的等电点、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳迁移率及溴化氰降解产物。抗血浆 Fn 抗体与抗细胞 Fn

表 1 Fn 的曾用名称与功能的关系

名 称	功能与性质
1.冷不溶性球蛋白(CIG)	与冷沉淀血纤维蛋白原一齐沉淀
2.成纤维细胞表面抗原(SFA)	由免疫学方法证实其抗原性
3.细胞表面蛋白(CSP)	存在于细胞表面
4.1 带、LI 带、I 带	用乳过氧化物酶催化碘化作用证实为最大的蛋白质
5. Zeta 带	
6.主要的成纤维细胞蛋白	主要的细胞相关蛋白质
7.半乳糖蛋白 A(GapA)	³ H-半乳糖氧化酶标记的糖蛋白
8.对外源性转化敏感的大分子蛋白(LETS)	体外转化后,该蛋白质消失
9.微纤维状蛋白	Fn 在组织中的形态
10.细胞连接蛋白(c-CAP)	介导细胞粘附的血浆 Fn
11.细胞粘附因子(CAF)	介导细胞粘附的细胞和血浆 Fn
12.细胞扩散因子	介导细胞扩散
13.调理素因子(α -2SB 调理素)	介导 Kupfer 细胞对明胶化颗粒的吞噬
14.抗白明胶因子	由溶液中沉淀白明胶

抗体很容易发生交叉反应,特异地抗某一种形式 Fn 的抗体尚未见报道。

两种形式的 Fn 在功能与性质方面也具有一些细微的差别。例如在中性水溶液中,细胞 Fn 的溶解度低于血浆的 Fn,这可能是因为细胞 Fn 是多聚体,亚单位之间存在有较多的交联键的缘故。

二、Fn 的 结 构

细胞表面,细胞培养和细胞外液的 Fn 之间存在着分子的不均一性,但基本结构具有同一性。不同种属的动物血液和细胞中提取的

Fn 的氨基酸组成十分相似,图 1 为 Fn 的结构模式图。

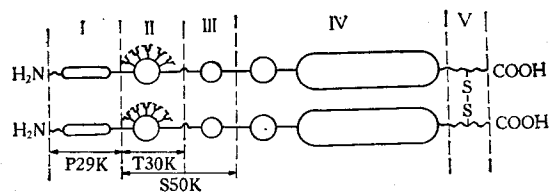


图 1 纤维连接蛋白分子结构示意图

[引自 *Biochem. Soc. Trans.*, 9(6) 506, 1981] 球形与椭圆形——Fn 分子多肽链折叠区, W——寡糖链, P29K——血纤维蛋白溶酶水解片断, T30K——胰蛋白酶水解片断, S50K——枯草杆菌蛋白酶水解片断 I、II、III、IV、V (见表 2)

Fn 的体积比球蛋白长,由两条或多条肽链组成,两条肽链通过链间二硫键连接。二硫键位于分子的羧基末端。在肽链内部,存在若干链内二硫键。将链间或链内的二硫键还原或碱化,均不影响 Fn 的粘附活性。因此,Fn 单体同样具有促进细胞粘附和扩散的功能。Fn 肽链的氨基末端被吡咯烷酮羧酸(PCA)封闭。

Fn 是一种糖蛋白,其中糖占 4—5%,主要由寡糖组成,通过 N-糖苷连接于天冬氨酸。每条 Fn 肽链上有 4—6 个糖的结合部位,这些结合部位全部位于 S50K 片断上(见图 1)。寡糖主要由甘露糖、半乳糖、氨基葡萄糖、唾液酸和少量的岩藻糖及葡萄糖所组成。Fn 中的糖对 Fn 的生物活性并非必需,但糖的存在可以防止蛋白酶对 Fn 的水解作用。

对于 Fn 的二、三级结构,曾经用圆二色性及荧光法进行了研究。由于 Fn 的光学活性较差,圆二色性对它们的二级结构了解很少。尽管如此,还是可以推测 Fn 分子中存在着一些折叠区。色氨酸荧光光谱表明,部分色氨酸埋藏在疏水基中,加热可暴露色氨酸支链,并破坏 Fn 的凝集活性。一般认为 Fn 的二、三级结构介于普通膜结构和循环的球蛋白结构之间,并具有高度不对称性。

为了解 Fn 生物活性的结构基础,很多实验室用化学方法和酶学方法对 Fn 肽链上的某些氨基酸,—SH 基、—NH₂ 基以及—COOH 基进行了修饰,或将 Fn 用蛋白酶水解成若干片断,

并通过体外实验观察其活性的改变,图 1 及表 2 示蛋白酶作用部位及水解片断与一些生物大分子或细胞相结合的对对应关系^[4]。

表 2 蛋白酶水解片断及其配体

水解片断	I	II	III	IV	V
大小 (道尔顿)	27,000— 34,000	30,000— 45,000	20,000	160,000	≤2,000
相结合的 配体	血纤维 蛋白	白明胶	肝素	细胞	
	谷氨酰胺 转移酶		肌动蛋白	肝素	
	肝素		DNA	血纤维 蛋白	
	肌动蛋白		金黄色 葡萄球菌	肌动蛋白	
	金黄色 葡萄球菌			DNA	

三、细胞 Fn 的分布

Fn 是细胞外基质的主要成分之一。具有膜外 Fn 的细胞大多紧密排列于支持结构的周围,并把 Fn 以纤维的形式分泌到细胞外的间质中,因此,Fn 广泛分布于包括胚胎皮肤在内的基膜、滋养层和肺泡基膜,脾、肠、肝窦状隙和横纹肌的肌纤维膜以及粘膜,汗腺、皮脂腺、乳腺和腮腺等外分泌腺中。

免疫荧光法证明,Fn 在细胞外多以广泛的纤维网的形式存在。细胞表面的某些神经节苷脂可能是 Fn 的受体。有关 Fn 与细胞膜之间的细微关系,目前尚未完全搞清。

能够合成 Fn 的细胞有:成纤维细胞、星形神经胶质细胞、许旺细胞、内皮细胞、软骨细胞、成肌细胞、某些上皮细胞以及一些肿瘤细胞等等。

四、Fn 的粘附功能

Fn 与细胞的许多生物活性有关,其中最主要的是它的粘附功能。Fn 能介导细胞间以及细胞向培养基上的粘附与扩散。

很早发现,某些细胞向胶原覆盖的培养皿上粘附并进一步扩散,必须有血清某一因子参

与。后经 Pearlstein 等证实,这种血清因子就是 Fn。Fn 不仅介导细胞向胶原覆盖的培养皿上粘附或扩散,而且也能促使细胞向玻璃和塑料培养皿上粘附与扩散。某些细胞的贴壁与扩散不需要加入血清 Fn,这是因为这些细胞表面具有较多的 Fn,它同样具有促使细胞贴壁或扩散的生物活性。有实验证实,细胞 Fn 的粘附活性较血浆 Fn 强。

Fn 在细胞与培养基的结合中起了桥梁作用。细胞表面有 Fn 受体,但是只有在 Fn 预先与培养基形成复合物之后,才能识别并接受 Fn。

Fn 介导的细胞向胶原培养基上的粘附与扩散主要分为以下三步:(1) Fn 与胶原形成复合物。(2) 细胞粘附于 Fn-胶原复合物上。(3) 细胞在培养基上扩散。Fn 与胶原的反应无需二价离子参与,但细胞向 Fn-胶原复合物上的粘附,必需有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 二价离子的存在。

除胶原外,Fn 还可与许多重要的生物大分子相连接。如蛋白多糖、血纤维蛋白及肌动蛋白等。Fn 与这些生物大分子的反应,与 Fn 的粘附活性等有关。

利用 Fn 对胶原的亲性和,可用亲和层析技术由血液和细胞表面提取 Fn。将白明胶(变性胶原)共价偶联于 Sepharose 4B 上,待 Fn 与胶原充分结合后,用抗 Fn 抗体、2—4M 尿素,硫酸钠或胶原酶等,将 Fn 洗脱下来。

五、Fn 与细胞转化的关系

细胞转化后,细胞表面 Fn 含量下降,甚至完全缺失。这种现象普遍存在于不同种属、不同类型的转化细胞中。转化手段包括 DNA 或 RNA 肿瘤病毒致突变、临床致癌物诱发癌变、许可温度下温度敏感病毒突变以及组织培养细胞的自发恶变。

Pearlstein^[5] 注意到几种自发和病毒致癌的细胞系,虽然在体外其 Fn 维持在正常水平,但在体内肿瘤仍可以发生。Coll^[6] 等发现 SV40 及自发恶变的细胞系,其 Fn 含量的多寡有无与肿瘤的发生无关。类似现象也被其他学者发

现,他们认为 Fn 含量与肿瘤的发生无关,而与肿瘤的转移有关。

恶变后 Fn 含量的下降可能涉及到一个复杂的生物过程,其中包括 Fn 的合成减少和转运障碍、Fn 降解相对增加以及 Fn 不能成功地插入并固定在细胞膜上。

Olden 和 Yamata^[7] 证实,在病毒转化后,Fn 的合成降低 3—6 倍,细胞池内则减少 4—5 倍。Fn 合成的减少是由于恶变后具有翻译能力的 mRNA 减少了 5 倍左右。标记蛋白测定表明,Fn 代谢的半衰期由 36 小时减少到了 16—26 小时。

人类神经胶质细胞瘤表面几乎无 Fn 存在,但染色证明其细胞内存在有大量的 Fn,并能将 Fn 分泌到细胞外。这说明即使是自然发生的癌细胞也可以产生 Fn,但不能将 Fn 有效地固定在细胞表面。Kleiman 最近报道,有确凿证据证实 GD_{1a} 及 GT_1 神经节苷酯可以作为 Fn 受体。恶变后神经节苷酯的合成受阻,从而导致 Fn 不能在细胞表面存留。

在 Fn 合成减少的同时,胶原前体含量和一些硫酸化糖胺多糖的含量也减少,Fn 与硫酸类肝素和透明质酸的亲和力降低。如前所述,Fn 可与许多重要的生物大分子(包括糖胺多糖和胶原)相互反应。恶变后它们之间的相互关系的变化尚待深入研究。

恶变后,细胞形态也发生若干变化。体外实验证明,向转化的细胞培养基中加入 Fn,可以在一定程度上恢复转化细胞的原有形态。Fn 的这种作用,与它的粘附活性有关。

六、Fn 与单核吞噬系统的关系

单核吞噬系统(MPS)又称为网状内皮系统(RES),是机体防御病原体侵入的第二道防线,又是非特异免疫和特异免疫之间的重要环节。MPS 不仅能识别并吞噬销毁进入体内的微生物等异物,还能清除体内不断生成的废物,如:细胞碎片、纤维蛋白凝块、细胞颓变成分以及肿瘤细胞。

早已证实,MPS 功能的发挥很大程度上依

赖于血浆某一因子,该因子曾被称为调理素蛋白,体液识别因子,特异调理素及 α -2表面结合糖蛋白,Blumenstock等证实该血浆因子就是Fn。

通过一些动物实验证明巨噬细胞具有某些杀伤肿瘤细胞的作用。取已对肿瘤产生免疫反应的动物腹腔渗出细胞与相应的肿瘤细胞一起培养,可以观察到肿瘤细胞生长受到明显抑制。MPS保持这种正常的吞噬活性直接与Fn水平有关。以IV肿瘤细胞攻击大鼠24小时后,大鼠血浆Fn水平明显升高,反映了宿主有较强的抗肿瘤能力。宿主抗肿瘤能力下降时,其血浆Fn水平下降。在肿瘤扩散阶段,MPS功能衰退,其血浆Fn含量也逐渐减少。在进行性恶性病患者血浆中,几乎检验不到Fn的存在。肝脏中的Kupfer氏星状细胞,是吞噬能力最强的吞噬细胞。然而,癌症患者的血浆不能介导Kupfer细胞对胶状颗粒的吞噬。因为患者血浆中缺乏一种体液识别因子——Fn。如果通过一定途径向大鼠体内输入Fn,就可以改变大鼠抗癌能力,抑制肿瘤生长。

MPS具有清除体内血纤维蛋白凝块的功能,该功能的发挥也依赖于Fn。Fn具有介导纤维蛋白与巨噬细胞结合的能力。患洛矶山斑疹热的猴,其血浆Fn水平较正常猴低,MPS不能有效地清除血纤维蛋白凝块,从而导致播散性血栓形成。

MPS功能抑制常见于外科手术后及创伤性休克(如烧伤)。此时Fn水平下降,吞噬能力减退。采用调理疗法可纠正MPS功能减低^[8]。术后2小时Fn含量急骤下降,经采用Fn疗法后24小时,Fn水平上升,比对照患者高51%,避免了MPS功能抑制,提高了手术成功率。

七、Fn与血小板

1970年,Mosesson^[9]等提出,在Fn与血小板之间存在着一定的联系。免疫荧光法证实,Fn存在于血小板表面,可从血小板细胞膜上分离下来。其浓度是 $2-4\mu\text{g}/10^9$ 血小板。

Furch^[10]等报道了一种遗传性结缔组织紊

乱疾病——Ehlers-Danlos综合症。它以外伤修复缺陷和血小板凝聚异常为特征。当患者注射正常血浆Fn以后,血小板凝聚异常现象得到纠正,这可能是Fn参与了血小板的凝聚过程。

最近的研究证实,几乎所有的血小板Fn都存在于细胞的 α 颗粒中。当受到胶原或凝血酶刺激后,血小板中50%左右的Fn释放到介质中,其余的Fn则插进血小板浆膜内。未受刺激的血小板表面几乎没有Fn。实验证明,血小板Fn分布在细胞表面,有利于血小板凝聚并粘附于血纤维蛋白凝血酶和结缔组织上。

Bensusan^[11]等认为,血小板表面Fn可能是血小板细胞膜上的胶原受体。其证据是:(1)用声波处理血小板并冲洗干净后,Fn可与血小板反应,进而与胶原相连接。(2)抗Fn抗体刺激血小板的分泌。(3)将胶原与血浆Fn预先共同孵育,可以抑制血小板与胶原的反应。

Santoro等否认血小板Fn是胶原的受体。用纯化的抗Fn抗体或它们的F_{ab}片断处理血小板,只能轻微地阻断血小板向胶原的粘附。将血小板与高浓度的明胶预先共同孵育,可以抑制血小板与天然胶原的结合。然而,即使白明胶的浓度极高,也只能抑制其结合能力的百分之二十,因此他们认为血小板对胶原的受体不是Fn,而是血小板本身。

八、Fn与细胞周期

细胞表面Fn与细胞周期之间存在着规律性的联系。用长春花碱硫酸盐或羟基脲将仓鼠细胞同步化后,用乳过氧化物酶催化的碘化作用显示:在有丝分裂期,细胞表面几乎没有Fn存在,G₁期Fn含量明显上升,自S期至M期前,细胞表面Fn水平恒定。采用免疫荧光和免疫扫描电镜技术观察到了细胞有丝分裂期细胞表面(不是细胞内部)Fn量的减少。

早已确知,处于有丝分裂期的正常细胞与转化细胞,其细胞膜具有许多共同的特点,其中包括质膜流动性增加,外源凝集素的凝集力增强,细胞形态发生变化以及质膜组分改变等。因此,有丝分裂期的正常细胞,其表面Fn减少或

消失,与转化细胞Fn改变雷同的现象,并不是十分令人惊奇的。问题在于,什么原因导致Fn含量下降。在进入有丝分裂期之前,细胞陷于广泛的Fn密网中。有丝分裂时,细胞变圆,并从Fn密网中脱离出来。细胞从Fn密网中挣脱,可能是由于失去对Fn的亲合力,或者是局部将Fn密网击破。这些问题尚未解决。

九、结 语

综上所述,Fn是一类重要的大分子糖蛋白,与细胞的许多生物活性有关。最近五年内,有关Fn的研究进展迅速。由于Fn与肿瘤转移,凝血以及MPS功能的维持关系密切,引起许多学者注意,正致力于弄清Fn在体内的作用机制。这些研究有着重要的理论和实际意义。

(本文由李玉瑞教授审阅)

参 考 文 献

- [1] Yamada, K. M. et al.: *Nature*, **275**, 179, 1978.
- [2] Morrison, P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**: 3103 1948.
- [3] Pearlstein, E. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, **29**, 103, 1980.
- [4] Yamada, K. M. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **9** (6) 506, 1981.
- [5] Pearlstein, E. et al.: *Cancer Reserch*, **36**, 1475, 1976.
- [6] Coll, J. M. et al.: *Biochem.*, **16**, 3169, 1977.
- [7] Olden, K. et al.: *Cell*, **11**, 957, 1977.
- [8] Saba, T. M. et al.: *J. Reticuloendothel. Soc.*, **22**, 16a Abstract, 1977.
- [9] Mosesson, M. W. et al.: *Blood*, **56**, 145, 1980.
- [10] Furcht, L. T. et al.: *J. Cell. Biol.*, **83**, (2 part) 61a, 1979.
- [11] Bensusan, H. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**, 5864, 1978.
- [12] Santoro, S. A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 2644, 1979.

[本文于1982年9月3日收到]

胰 岛 素 受 体

王 志 珍

(中国科学院生物物理研究所)

激素和受体这两个概念在上世纪末已形成。八十多年来,激素的研究取得了巨大的进展,但相对来说受体的研究却落后了很多。1921年胰岛素为Banting和Best首次从小牛胰脏分离得到,至今六十多年中,在结构(一级结构,晶体结构),合成(人工化学全合成,遗传工程生产),生理生化性质,结构功能、临床应用等各方面都研究得相当透彻。但是胰岛素作用机制的研究,即胰岛素分子与细胞膜上的胰岛素受体分子特异结合的相互作用^[1]所诱导的一系列从

分子水平到细胞水平的复杂变化,最后导致整体的生物效应的过程至今仍然了解得很少。要彻底了解胰岛素的作用机制,最终解决糖尿病等医学实践问题,受体的研究是十分重要的。尽管50年代初就有人尝试直接研究受体,但直至1971年Freychet^[2]和Cuatrecasas^[3]分别制备了保存活力的碘同位素标记的胰岛素分子,并用此定义了具有生物特异性的胰岛素受体的结合之后,才有可能直接研究胰岛素受体。此后,发现几乎所有脊椎动物的组织和细胞中都存在胰岛