

七种二糖拟糖蛋白的制备及其在肝内源性凝集素组织定位中的应用

张世民 吴孟超 陈 汉

(第二军医大学肝胆外科研究所, 上海 200433)

王克夷 孙 册

(中国科学院上海生物化学研究所)

关键词 拟糖蛋白制备, 内源性凝集素, 肝癌组织化学定位

各种已知结构的糖蛋白是复合糖和糖结合蛋白研究中必需的工具。由于天然糖蛋白中糖链结构的复杂性和不均一性, 不适宜作为研究的工具。人工合成拟糖蛋白(neoglycoproteins)为糖的结构和功能的研究及凝集素和其它糖结合蛋白的研究提供了重要工具^[1], 同时为内源性凝集素(endogenous lectin, EL)介导的糖蛋白——药物靶向治疗进一步临床使用提供了物质基础^[2]。本文报道以牛血清白蛋白(BSA)和7种二糖为原料, 用 NaBH_2CN 还原氨基化法, 制备了7种拟糖蛋白, 并以它们为探针, 对正常肝和肝癌中EL进行了组织定位。

材 料 和 方 法

一、试剂

纯结晶 BSA 购自西德 Serva 公司; 纤维二糖(cellobiose, Cel)和麦芽糖(maltose, Mal)系中科院生物化学研究所产品; 乳糖(lactose, Lac)为上海试剂二厂产品; 壳二糖(chitobiose, Chi)由第二军医大学生化教研室提供; 松二糖(turanose, Tur)、龙胆二糖(gentobiose, Gen)和生物素-N-羧基琥珀酰亚胺(biotinyl-N-hydroxysuccinimide, BNHS)为美国 Sigma 公司产品; 蜜二糖(melitose, Mel)和 Sephadex G-25 分别为瑞典 Fluka 和 Pharmacia 公司产品; 氰基硼氢化钠(NaBH_2CN)和 ABC 试剂盒(avidin-biotin-peroxidase complex Kit)分别为美国 Arldlich 和 Vector 公司产品。

二、方法

1. 7种二糖拟糖蛋白的制备 拟糖蛋白的制备参照 Gray 和 Schwartz 等人的还原氨基化法^[3,4], 并稍加改良。68mg BSA、100mg NaBH_2CN 和 100mg 二糖, 溶于 2ml 0.2mol/L pH8.0 磷酸缓冲液中, 充分混

匀后置于 37℃。反应不同时间后, 反应液过 Sephadex G-25 凝胶过滤层析柱 [2×25cm, 用 0.25mol/L NaCl, 0.05mol/L pH8.0 磷酸钾缓冲液(PBS)预平衡], 用 PBS 洗脱, 收集第一个峰, 并对蒸馏水充分透析, 冷冻干燥。对冻干产品(即拟糖蛋白)同时测定糖和蛋白含量, 并与 BSA 作比较; 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对 BSA 和 7 种合成的拟糖蛋白进行分析, 观察其相对迁移率。

2. 生物素-拟糖蛋白的制备 5mg 拟糖蛋白溶于 5ml 0.1mol/L NaHCO_3 溶液中, 加入 3mg BNHS(先用 0.1ml DMF 溶解), 室温搅拌 1h, 4℃ 过夜, 对 PBS 充分透析去除游离的 BNHS。所得的生物素-拟糖蛋白 -30℃ 保存。

3. 肝组织 EL 的组织学定位 肝细胞癌 17 例, 肝硬化 2 例、正常肝 5 例, 标本在手术切取后立即于 -80℃ 保存。用前将标本浸入 Bouin's 液中固定 7 天(4℃), 乙醇分级脱水 7 天, 100% 苯中浸 3 天(换液 2 次), 56℃ 用 Paraplast 包埋。连续切片 20—30 张, 片厚 4 μm 。组织片 4℃ 短期保存备用^[5]。

肝组织 EL 的定位用 ABC 法。脱蜡、水化后的组织片用含 0.1% H_2O_2 的 30% 甲醇和 1% BSA 的 0.85% NaCl, 0.05mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液(TBS)各浸 30min。在用 TBS 洗涤后, 组织片与 0.025mg 生物素-拟糖蛋白或生物素-BSA 37℃ 共育 1h, 以后操作与报道的相同^[6]。

4. 其它方法

(1) 游离和结合型糖的测定: 中性糖用硫酸-酚法定量; Chi 先用 6mol/L HCl 100℃ 水解 1h, 再用 5mol/L NaOH 将水解液 pH 调至中性后, 按氨基糖的微量测定法定量^[7]。

(2) 蛋白质定量采用 Lowry 法^[8]。

实验结果

除 Tur 外,本文所用的 6 种二糖与 BSA 的偶联反应过程中,反应液的透明度和颜色均无明显改变。Tur 和 BSA 的偶联中,48h 反应液开始出现混浊,随着时间延长而加重,最后形成凝胶状物。改变反应液中 pH(6—9) 或减少 NaBH_2CN 的用量,并不能抑制这种现象。这可能是 Tur 和 BSA 之间形成网络样交联所致。

用 Sephadex G-25 凝胶过滤分离拟糖蛋白,检测洗脱液在 280nm 波长的光吸收($A_{280\text{nm}}$,蛋白吸收峰),用定糖法测定糖的吸收峰(中性糖为 $A_{490\text{nm}}$,氨基糖为 $A_{530\text{nm}}$)。结果表明,7 种反应液的层析洗脱曲线都有 2 个峰,第 1 个峰在 $A_{280\text{nm}}$ 和 $A_{490\text{nm}}$ (或 $A_{530\text{nm}}$) 处有光吸收,说明是大分子的拟糖蛋白峰,而后一个只是糖吸收峰,为未偶联的二糖(图 1)。

用糖和蛋白质定量法分析洗脱液、拟糖蛋白冻干产品中糖和蛋白的含量,比较偶联前糖的量 and BSA 含糖情况表明,未偶联的 BSA 中测不到糖存在;用 NaBH_2CN 还原氨基化法能使所用的二糖与 BSA 结合;糖与 BSA 的偶联率随反应液中 NaBH_2CN 量的增加而增加,增加反应液中二糖浓度虽能使 BSA 上偶

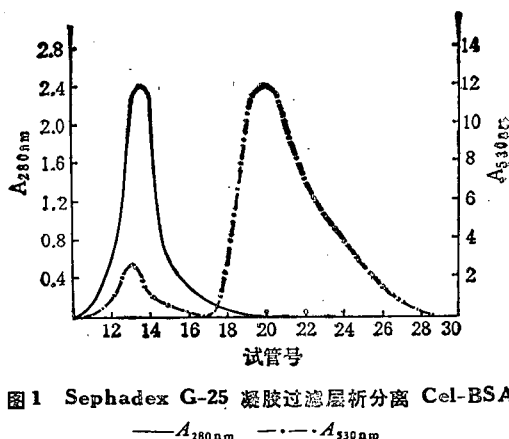


图 1 Sephadex G-25 凝胶过滤层析分离 Cel-BSA
— $A_{280\text{nm}}$ - - - $A_{530\text{nm}}$

联的糖少量增加,但糖偶联率明显下降;在 10 天内,偶联反应时间越长,偶联率越高。表 1 列举了 $1\mu\text{mole}$ BSA、100mg NaBH_2CN 100mg 二糖在 pH8.0 的磷酸缓冲液中反应 200h(37°C) 7 种二糖与 BSA 的偶联情况。从表 1 可以看出,各种糖与 BSA 的偶联率有一定的差别,糖的偶联率为 $11.94 \pm 3.89\%$,拟糖蛋白中糖与蛋白质的克分子比为 $39.36 \pm 14.73:1$ 。偶联率 Cel、Gen、Mel 较高, Tur 最低。

表 1 用还原氨基化法制各拟糖蛋白

	二糖-BSA						
	Cel	Chi	Gen	Lac	Mal	Mel	Tur
糖偶联率(%)	15.35	9.18	14.29	13.82	12.37	14.92	3.65
糖/BSA (克分子比)	47.7	23.0	52.9	43.5	44.5	52.5	11.4

SDS-PAGE 结果表明,BSA 在电泳上基本为一条带;而各种二糖-BSA 则表现为:(1)电泳速度减慢;(2)蛋白带变宽,这可能是 BSA 上带二糖量不同造成不匀一的结果。

用 7 种生物素-拟糖蛋白作探针,以生物素-BSA 作对照,对肝细胞癌、癌旁组织、肝硬化组织和正常肝组织中 EL 进行组化研究,结果显示,ABC 法使组织中 EL 染成棕色,苏木素衬染使细胞核蓝紫色。BSA 只能使部分癌和非癌组织着色很淡,并被高浓度盐所消除;而拟糖蛋白能使绝大部分组织着色,不能被高盐抑制,但被无生物素标记的同种拟糖蛋白或其二糖所抑制。这说明拟糖蛋白与组织中 EL 的结合是特异性的。组织中的 EL 主要分布在实质细胞的质膜和胞浆内,少量存在于间质和间质细胞上。

3 种非癌肝组织中 EL 的分布差异不大,仅在染色深浅上有些不同。但肝癌组织中 EL 与非癌组织有些差别,主要表现在(1)癌组织内和不同癌组织标本之

间染色深浅不一,有些染色深,有些则较浅;(2)正常肝细胞胞浆内 EL 较少,而某些癌细胞内则较多;(3)多数情况下,肝细胞的着染率高于癌细胞的着染率。

7 种拟糖蛋白中,以 β -葡萄糖苷为末端的拟糖蛋白(Cel-BSA 和 Gen-BSA)着染率高并且染色最深,尤其是细胞膜和上皮细胞染色特别深;以 α -葡萄糖苷为末端的拟糖蛋白(Mal-BSA 和 Tur-BSA)着染率低,染色浅。癌组织的内皮细胞上几乎极少有 Tur-BSA 结合的 EL。二种以半乳糖为末端的拟糖蛋白都能使纤维组织着色,但以 α -半乳糖苷为末端的 Mel-BSA 对细胞的着染率远高于以 β -半乳糖苷为末端的 Lac-BSA,染色也深,这二种 EL 在细胞质膜上较多。带有 GlcNAc 末端的 Chi-BSA 特异性 EL,也主要分布在癌细胞和肝细胞质膜上,而间质中无此类 EL。

讨论

拟糖蛋白的合成方法很多,主要是用不同的方法

将糖连接到蛋白质的氨基、羧基、酚基或咪唑基上^[1,9,10]。多数合成方法需要昂贵的试剂,操作比较复杂。本研究用 NaBH_3CN 将糖的非原端与蛋白质的氨基形成共价连接^[3],但以 Tur 与 BSA 偶联时形成不溶性交联物推测,可能还存在其它连接方式。用这种还原氨基化法制备拟糖蛋白能在较宽的 pH 范围 (pH5—9) 内进行,蛋白质上基团被糖基取代率较高,产物也较稳定^[3],而且操作方便,试剂简单,易推广。但有 2 大弱点:(1)只有二糖或多糖能与蛋白质连接,单糖则不宜;(2)需要时间较长,偶联反应一般需 7 天以上。这就要求各种试剂、物品、器件相对无菌。

拟糖蛋白是研究各种糖结合蛋白及糖结构和功能关系的重要工具。Debbage 等人用拟糖蛋白研究了肿瘤血管上内源性糖结合蛋白的分布及其与肿瘤生长的关系^[9]; Monsigny 和 Gabius 等人观察了肿瘤内源性凝集素导的药物-拟糖蛋白复合物对肿瘤细胞的靶向杀伤作用^[2,11]。本研究用拟糖蛋白对肝硬化、癌旁肝、正常肝及肝细胞癌组织中 EL 进行了组织化学研究。结果提示,EL 广泛地存在于非癌肝组织内,不同糖特异性的 EL 在量和分布上有一定差别。组织癌变

后,大部分细胞的 EL 有明显减少,而且分布发生了变化。这些肝癌组织 EL 改变的生物学意义有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 王克夷. 国外医学分子生物学分册,1987;9(4): 151
- 2 Gabius H-J *et al. Cancer Res Clin Oncol*, 1987; 113: 126
- 3 Gray G R. *Archiv Biochem Biophys*, 1974;163:426
- 4 Scharz B A, Gray G R. *Archiv Biochem Biophys*, 1977; 181: 542
- 5 Debbage P L *et al. Eur J Cell Biol*, 1988; 46:425
- 6 张世民等. 第二军医大学学报,1990;11(5): 402
- 7 张世民等. 第二军医大学学报,1989;10(1): 31
- 8 Lowry OH *et al. J Biol Chem*, 1951; 192: 425
- 9 Stowell C P, Lee Y C. *Advance in Carbohydr Chem Biochem*, 1980; 37: 225
- 10 McBroom C R *et al. Methods in Enzymol*, 1972; 28: 212
- 11 Monsigny M *et al. Biol Cell*, 1984; 51: 187

[本文于 1990 年 6 月 22 日收到, 9 月 17 日修回]

(上接第 393 页)

未知低聚糖。文献[10]指出,蔗糖是光合作用主要最终产物^[1]。因此在处理组的功能叶片内,从葡萄糖和果糖合成蔗糖的能力比对照高。处理组含磷高也是有利于蔗糖合成的^[11]。

表 5 小麦幼苗功能叶片的各类糖含量百分比 ($X \pm SD$)

组别 \ 种类	还原糖	非还原糖	可溶性糖
高压静电场处理	5.05 ± 0.21	41.87 ± 0.69	46.92 ± 0.47
对 照	42.45 ± 0	7.59 ± 0.01	50.04 ± 0.01

4. 由于上述碳、氮化合物合成旺盛,代谢活跃,处理组幼苗就会生长优于对照,也能抵抗恶劣环境。在 2 月份连续多日低温冻害下,其冻害程度为 0.38 级,而对照为 0.74 级,体内游离脯氨酸含量 ($1.63 \times 10^3 \pm 10 \text{ ppm}$) 也比对照 ($1.36 \times 10^3 \pm 35 \text{ ppm}$) 高 ($P < 0.01$)。

5. 显微观察虽未发现幼苗功能叶片结构有改变,但气相色谱结果已证实处理对膜脂高级脂肪酸成分产生明显效应: 在处理组未检出亚麻酸、棕榈油酸 (C_{18} 烯酸) 的存在,却检出花生酸;油酸和亚油酸浓度(分别为 9.91 和 53.53% 甲酯干重)明显高于对照(分别为 2.28 和 13.82% 甲酯干重)。

靳枫、姚位民、周康才、徐达、朱春沂等同志参加工作。

江苏省理化测试中心测定氨基酸,江苏省植物研究所秦慧贞研究员对叶片进行显微结构观察,王翔燕同志测定高级脂肪酸,周久亚同志测定叶绿素,钱伟珍同志摄影,谢志谢忱。

参 考 文 献

- 1 黎先栋,王淑惠. 生物化学与生物物理进展,1986;(3): 36
- 2 鲍重光主编. 现代静电技术. 北京: 万国学术出版社, 1988
- 3 上海植物生理学会编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社,1985: 73—76
- 4 陆宝树,蒋福兴. 南京大学学报,1983;(4): 695
- 5 宋长铤,韦恩章. 植物生理学通讯,1987;(2): 63
- 6 宋长铤. 植物生理学通讯,1987;(4): 33
- 7 孙炳寅编. 南京大学学报 米草研究的进展——22 年来研究成果论文集. 南京: 南京大学学报编委会和南京大学大米草及海滩开发研究所,1985: 206
- 8 ШКОЛЬНИК М Я 著,原田竹治译. 植物の生命と微量元素. 东京: 農山漁村文化協会,1982(昭和 57 年): 34—36
- 9 曹宗巽,吴相钰同编. 植物生理学(下册). 北京: 人民教育出版社,1980: 276
- 10 Bonner J, Varner J E 主编,《植物生物化学》翻译组译. 植物生物化学. 北京: 科学出版社,1984: 355,547
- 11 Павнова О А, Туркина М В. *Физиол раст*, 1978; 25(5): 1039

[本文于 1990 年 7 月 3 日收到, 1991 年 2 月 11 日修回]