

人红细胞膜血型糖蛋白的研究进展

毛建平 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 血型糖蛋白 (GP) 是红细胞膜中主要含唾液酸的跨膜蛋白, 有 A、B、C 和 D 四种。GPA 是 MN 血型糖蛋白, GPB 表达 Ss、U 血型, GPC、GPD 则是 Gerbich 抗原。四种血型糖蛋白的结构有不同程度的同源性, 尤以同类间的同源性程度最高。GPA 在防止红细胞之间、红细胞与血管内皮细胞之间的相互作用有重要功能, 并在配体诱导下影响红细胞膜的物理性质。GPC 是维持红细胞正常形状、正常物理性质的重要因子。GPA 和 GPC 的功能还分别与带 3 蛋白、带 4.1 蛋白有关。

关键词 红细胞, 血型糖蛋白, 跨膜蛋白质

人红细胞膜血型糖蛋白 (glycophorin, GP 或 sialoglycophorin, SGP) 是跨越红细胞膜主要含唾液酸的糖蛋白, 目前, 已鉴定四种血型糖蛋白 GPA、GPB、GPC 和 GPD。GPE 是 GPA 和 GPB 基因家族的新成员。有关 GPA 等血型糖蛋白的结构研究刘俊凡等^[1,2]曾有过报道。本文拟就四种血型糖蛋白结构研究新进展及 GPA 和 GPC 重要的生物学功能予以综述。

1 血型糖蛋白的结构同源性

四种血型糖蛋白的结构及其基因结构

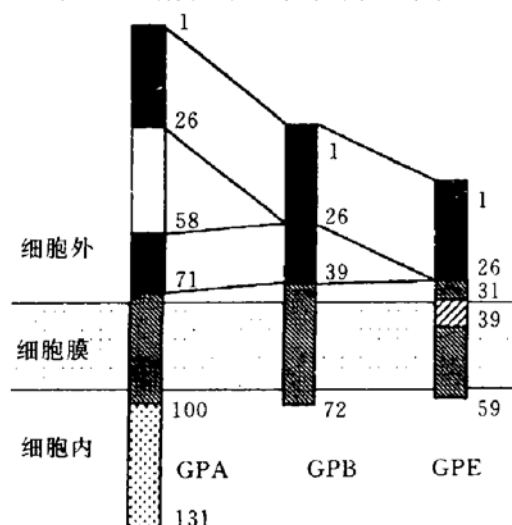


图 1 GPA、GPB 和 GPE 结构示意图^[3]

胞外辖区: GPA, 1—71; GPB, 1—39; GPE, 1—31; 跨膜辖区: GPA, 72—100; GPB, 40—72; GPE, 32—59. 胞内辖区: GPA, 101—131.

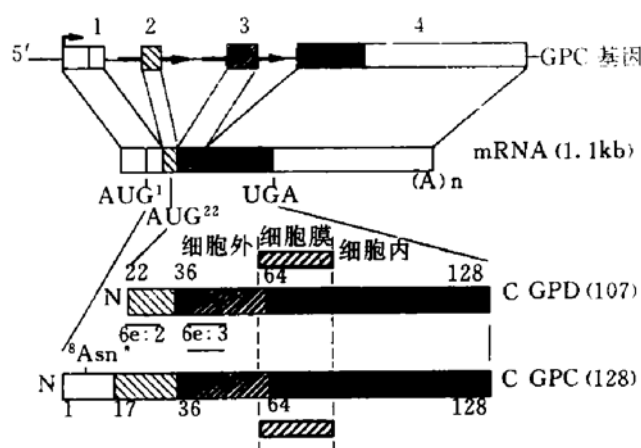


图 2 GPC 和 GPD 结构示意图⁹

已经了解得很清楚 (见图 1, 2)。GPA、GPB 和 GPE 基因依次串联排列于第 4 染色体 4q28—4q31 区^[3]。编码 GPC 和 GPD 的基因定位于第 2 染色体 2q14—2q21 区, 由同一基因所编码。在一级结构上 GPA 与 GPC 有两个片段的同源性, 即在 GPA 跨膜结构中第 80—85 位氨基酸 (-V-M-A-G-V-I-) 和 GPC 的跨膜结构第 61—66 位氨基酸 (-V-I-A-G-V-I-), 以及 GPA 胞外结构氨基端的第 8—12 位氨基酸 (-M-H-T-S-T-) 与 GPC 的胞外结构氨基端第 29—33 位氨基酸 (-M-H-T-T-T-) 之间的同源性, 且在第 10 和第 12 位都有两个相同的 O-连 Thr 糖基结合位点。这种不同基因编码的蛋白质区域同

源性可能具有某种生物学意义,有待研究.下面主要比较GPA、GPB和GPE之间及GPC与GPD之间的结构同源性.

1.1 GPA、GPB和GPE的结构同源性

GPA、GPB和GPE基因在结构上有着广泛的同源性,GPA基因有7个外显子,编码可剪切的信号肽和131个氨基酸的GPA蛋白,氨基端的5个氨基酸为S/L-S-T-T-G/E,第2、3、4位氨基酸为糖基结合位点,第1和第5位氨基酸显示表型多态性:分别为Ser、Gly时决定M血型,而为Leu、Glu时则决定N血型.GPB基因编码信号肽和72个氨基酸的GPB,由6个外显子组成,第1至第5外显子与GPA基因非常相似,第2外显子编码的氨基端26个氨基酸与GPA分子的N血型抗原同源.GPA和GPB的跨膜辖区分别有23个(第73至95位)和30个(第37至66位)氨基酸残基,都包含约20个疏水氨基酸.GPB的跨膜结构中的第44至66位氨基酸与GPA跨膜辖区结构高度相似,仅有6个氨基酸差异.两蛋白分子的胞内和跨膜辖区连结处都含有3—4个碱性氨基酸,它们与蛋白质在膜双层的定位有关.GPB胞外第29位氨基酸为Ss血型抗原决定位点,Met和Thr分别决定S和s血型.

GPE基因因为GPA、GPB基因家族的新成员^[4,5],cDNA的序列分析显示:GPE基因编码19个氨基酸的信号肽和含59个氨基酸残基的蛋白质.GPE基因有4个外显子,第1和第2外显子与GPA基因的第1、2外显子相同,因而这个蛋白质氨基端的29个氨基酸与GPA分子M血型抗原的相同.第3外显子与GPB基因比较,有多个密码子差异、有一个24bp插入序列和一个终止密码子,这个终止密码子缩短了阅读框架,因此它编码的第27至59位氨基酸则与GPA和GPB有着明显的区别.可是GPE 3'端核苷酸序列与GPB完全相同.GPE基因能有效的转录,但是迄今为止尚未能检测到它的蛋白质产物.

1.2 GPC和GPD的结构同源性

GPC和GPD基因不编码信号肽.GPC基

因含4个外显子,编码128个氨基酸,第2和第3外显子各包含在一个3.4kb的DNA片段中,此片段中各含两个重复序列,编码第17至22位和第36至41位氨基酸残基两个“-E-P-D-P-G-M-”重复肽段;两者的结构差异在于,第3外显子含一个27个核苷酸的片段,这个片段编码GPC胞外辖区第42至50位氨基酸残基,第2外显子则不然.GPC与GPD由同一基因所编码,在同一阅读框架的两个不同位点起始合成这两个糖蛋白^[6,7].GPD蛋白与GPC的相应肽段即GPC肽链氨基酸残基第21到128位是完全相同的.

2 血型糖蛋白的亚型结构特点

迄今为止,应用血清学、免疫化学及分子生物学技术已发现GP的多种亚型,其中值得注意的有三种GPA亚型和四种GPC亚型(见表1)它们对研究GP的功能有着重要的意义^[7-10].

表1 GP血型糖蛋白亚型

基因	亚型	结构
GPA	MkMk型	GPA和GPB缺失
GPB		(M,N,S,s抗原缺失)
GPE	En(a-)芬兰型	GPA和GPB缺失
	En(a-)英国型	杂合GP分子: GPA(M)-GPB
	Miltenberg V型	杂合GP分子: GPA(1—58)-GPB(27—72)
	Dantu型	杂合GP分子: GPB(1—39)-GPA(72—131)
GPC	Leach型	GPC,GPD缺失
	Ge血型	第36—63位氨基酸缺失
	Yus血型	第17—35位氨基酸缺失
	Webb血型	第8位氨基酸Asn被Ser替换

3 血型糖蛋白的生物学功能

随着单克隆抗体、流式细胞技术和PCR技术的应用,人们对血型糖蛋白及其亚型的生物学功能的认识也不断深化.

3.1 GPA的生物学功能

对多种非红系细胞组织、非红系细胞株的

mRNA 的分析以及对这些细胞表面抗原的免疫细胞化学分析证明, GPA 分子的表达仅限于红系细胞. 在红系爆式集落形成单位 (BFU-E) 和红系集落形成单位 (CFU-E) 的前祖细胞中未能检测到 GPA. 正常红细胞生成过程较晚期阶段的细胞, 如从原红细胞膜就可以检测到 GPA 的存在. 下面仅对成熟红细胞 GPA 的生物学功能予以阐述.

在 GPA 分子中唾液酸含量约占其分子量的 60%, GPA 承载着成熟红细胞表面的主要净负电荷, 对防止和消除在血液循环中红细胞和内皮细胞及红细胞之间的聚集有极其重要的生物学功能. En (a-) 和 Mkmk 血型个体的红细胞缺乏 GPA, 细胞表面净负电荷比正常红细胞少 60% 左右, 其功能将受到障碍, 事实上这种个体是正常的. 原来, 红细胞膜上带 3 蛋白的糖基化修饰使膜表面唾液酸含量增加, 消除了由于 GPA 缺乏带来的影响^[7]. 1987 年 Dahr 等人的实验从另一方面证明了 GPA 糖蛋白的重要性, 他们观察到 Dantu 阳性红细胞的 GP 为 GPB 与 GPA 的杂合分子, 这种分子中的唾液酸含量比正常红细胞 GPA 高, 过多的负电荷也是通过带 3 蛋白减少糖基而被消除.

这些实验研究揭示: GPA 对于维持红细胞膜表面的负电荷恒定, 防止红细胞聚集十分重要.

GPA 与红细胞膜骨架有紧密的联系, 它间接影响红细胞形态、红细胞膜柔性和机械稳定性. En (a-) 和 Mkmk 亚型个体红细胞虽然缺少 GPA, 但这些红细胞的形态表现正常, 临床上也没有出现显著的贫血现象. Reid 用实验证明了 En (a-) 红细胞膜的物理性质如膜柔性和机械稳定性都正常. 然而, 新近的大量研究结果表明, GPA 分子和它的特异性配体结合, 能使红细胞膜的行为发生一系列变化, 这些变化类似于粒细胞和淋巴细胞信号转导中配体-受体结合反应. 例如植物凝集素、麦胚凝集素结合在红细胞膜上, 能显著地降低红细胞膜的柔性. 抗 GPA 胞外辖区的单抗和它们的单价 Fab 片段, 都能降低膜的柔性. 据推测, 这一过程

是在 GPA 参与下的跨膜信号转导所引起. Knowles 证实了 GPA 的胞内辖区在这种跨膜信息传递中的重要性: 配体和 GPA 分子结合能减弱红细胞膜内 GPA 分子侧向运动性^[11], 但是并不影响 Miltenberg 血型杂合 GPA 分子的侧向运动, 因为这种杂合 GPA 分子只有 6 个氨基酸残基的胞内辖区^[12]. 基于以上结果, Chasis 认为: 正常 GPA 分子的胞内辖区与膜骨架没有或仅有极小的相互作用, 当配体与 GPA 分子结合以后, GPA 分子胞内辖区的构象发生变化, GPA 与膜骨架的结合变得紧密, 它在膜内的侧向运动便减弱, 从而降低了红细胞膜柔性.

不但如此, GPA 分子与配体结合后, 还增加了膜的刚性, 而红细胞膜刚性的改变程度又与配体在 GPA 胞外辖区不同位点的结合而不同. 例如, 识别 GPA 分子 N 末端附近抗原决定位点的单抗与 GPA 结合, 可使膜的刚性增加约 5.8 倍. 而 GPA 与识别其胞外辖区中部位点的单抗结合, 则能使膜刚性增加约 10.8 倍. 可是, 识别 GPA 靠近膜的第 56 至 67 位氨基酸位点的单抗能使膜刚性增加 18 倍! 由此可见, 配体结合位点决定着胞内辖区的构象变化程度, 这种构象变化改变了 GPA 与膜骨架的联系.

配体结合反应显示 GPA 能特异结合的膜蛋白有带 4.1 蛋白和带 3 蛋白. 1985 年 Anderson 等人报道了带 4.1 蛋白与 GPA 的结合是在磷酸肌醇参与下完成的. 缺乏带 4.1 蛋白的红细胞在与配体结合后刚性增加. 另一个与 GPA 结合的膜蛋白是带 3 蛋白, 抗体与 GPA 分子的相互作用能影响带 3 蛋白的自旋运动, 带 3 蛋白和 GPA 分子在膜双层是紧密联结的. 而且, 专一抗 W_r^b 血型抗原的单抗能沉淀 GPA 和带 3 蛋白, 放射免疫学分析也指出这些抗体只与有带 3 蛋白和 GPA 的红细胞反应^[13]. 因此, GPA 通过与膜蛋白的相互作用决定了红细胞膜性质. 同样, 大量的病毒和细菌抗原能与 GPA 的糖残基相结合, GPA 与这些抗原的结合将引起膜刚性的变化, 进而增强捕捉和吞噬功能. 即 GPA 与各种细菌病毒抗原结合引发

了增强清理细菌病毒抗原作用的机制。

关于 GPA 的功能还有待深入研究, 它的主要功能应归功于它对膜负电荷的贡献, 防止和减弱了红细胞的聚集。

3.2 GPC 的生物学功能

GPC 与 GPA、GPB 不一样, 它不仅在红系细胞株中表达, 免疫细胞化学和 DNA 印迹分析表明, GPC 存在于多种非红系细胞组织中, 只是在这些组织中 GPC 的 mRNA 表达水平要低一些而已。

Leach 血型个体缺乏 GPC, 尽管在临床上并不表现出贫血症状, 但是可观察到红细胞形态改变, 以及红细胞膜柔性、膜机械稳定性的显著降低。所以, GPC 在维持红细胞膜的形态和调节膜物理性质上起着极重要的作用。并且, 承担这一重要功能的结构就是 GPC 的胞内辖区。实验证明, Gerbich Yus 和 Webb 血型个体的 GPC 胞质外辖区都有变异, 但它们的胞内辖区却是正常的, 这种个体红细胞的形态、膜柔性和稳定性都正常^[10]。

不但如此, 通过和带 4.1 蛋白的相互作用, GPC 的胞内辖区将膜骨架锚泊在膜双层内侧。非离子型去污剂不能从正常红细胞膜提取 GPC, 但可以从缺乏带 4.1 蛋白的红细胞膜中抽提出 GPC。正常红细胞膜 GPC 常和带 4.1 蛋白一起被提取, 而且 GPC 在细胞膜中的含量也与带 4.1 蛋白含量密切相关。在带 4.1 蛋白为正常红细胞半数的红细胞膜, 其 GPC 量为正常的 44%, 带 4.1 蛋白缺失的红细胞中, GPC 含量约为正常红细胞的 9%。研究表明, 带 4.1 蛋白缺失的细胞, GPC 基因正常, 所以 GPC 量的减少是因带 4.1 蛋白缺失所致。因此, GPC 在红细胞膜上的定位与结合依赖于带 4.1 蛋白^[14]。总之, GPC 的生物学功能通过与带 4.1 蛋白之间相互作用实现, 它维持红细胞正常形态和物理性质如膜柔性和膜机械稳定性。

4 血型糖蛋白的研究意义

GPA 是许多病原体, 如流感、仙台病毒、一些大肠杆菌、恶性疟原虫等, 以及某些生物活

性物质, 如补体、外源性凝集素、僧帽水母毒素等的受体, 与红细胞膜的生物学功能和病理变化, 如阵发性夜间血红蛋白尿等临床疾病, 有着密切的关系。鉴于它的独特性质, 在过去的几十年一直是生物化学和细胞生物学的研究素材, 其抗原结构的特异性也引起了广泛的重视。对 GPA 抗原结构研究不但增加了我们对血型多态性了解, 而且对临床应用有一定的价值, 如抗疟疾疫苗的研制。

研究表明, GPA 基因和 GPB、GPE 基因间的关系不仅对研究哺乳动物进化关系有所帮助, 有意义的是, GPA 和 GPB (可能 GPE) 基因易被辐射引起突变, 在原子弹幸存者中很容易检测到高频率的 GPA 位点突变事件, 这一性质在近几年备受关注, 因此对研究环境中基因毒素对人体的损害, 有着重要的意义^[8]。同时 GPA 抗原能用于对正常骨髓红系细胞的鉴定和分类, 用于早期红白血病的诊断。GPC 也可作为分子标志, 检测红细胞前体细胞以鉴别白血病患者和正常个体。

GPA 和 GPC 同样对研究细胞膜骨架, 及其相关蛋白, 如血影蛋白、带 4.1 蛋白和带 3 蛋白, 研究其它组织中的类似蛋白, 研究红系细胞的分化, 细胞间信号传递, 膜蛋白糖基化等有着重要的价值。

参 考 文 献

- 1 刘俊凡, 卢义钦. 生命的化学, 1988; 3: 26
- 2 卢义钦, 刘俊凡. 生命的化学, 1992; 2: 14
- 3 Vignal A, London J, Raheul C *et al.* Gene, 1990; 95: 289
- 4 Kudo S, Fukuda M *et al.* J Biol Chem, 1990; 265: 1102
- 5 Vignal A, Raheul C, London J *et al.* Eur J Biochem, 1990; 191: 619
- 6 Cartron J P, Colin Y, Kudo S *et al.* Blood Cell Biochemistry, 1990; 1: 299
- 7 Chasis J A, Mohandas N. Blood, 1992; 80 (8): 1869
- 8 Fukuda M. Seminars in Hematology, 1993; 30 (3): 138
- 9 Cartron J P, Kim CLVK, Colin Y. Seminars in Hematology, 1993; 30 (2): 152
- 10 Chang S, Reid M E, Coboy J *et al.* Blood, 1991; 77: 644
- 11 Knowles D, Chasis J A, Evans E *et al.* Blood (abstr. sup-

pll), 1990; 76: 10a

12 Chasis J A, Knowles D, Winardi R *et al.* Blood (abstr. suppl), 1991; 78: 252a

13 Telen M, Chasis J A. Blood, 1990; 76: 842

14 Reid M E, Takakuwa Y, Conboy J *et al.* Blood, 1990; 75: 2229

二级结构形成：蛋白质折叠起始过程的框架模型

胡红雨 杜雨苍 鲁子贤

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

摘要 框架模型认为二级结构形成是蛋白质起始过程的结构基础。文章介绍蛋白质同源片段的溶液构象及其构象研究法和多肽二级结构的从头设计, 并综述这些研究成果应用于折叠起始过程的理论模型和蛋白质折叠起始过程的最新研究进展。

关键词 框架模型, 二级结构, 从头设计, 折叠起始

蛋白质的空间结构, 肽链折叠与生物功能的关系是蛋白质科学的重大前沿领域。自从 Anfinsen 通过对牛胰核糖核酸酶(RNase A)二硫键重组研究, 揭示蛋白质一级结构和高级结构关系以来, 已对许多蛋白质的变性和复性、折叠(folding)和去折叠(unfolding)进行了广泛的研究^[1], 提出了蛋白质折叠途径的几种模型, 比较典型的有框架模型(framework)^[2], 扩散-碰撞模型(diffusion-collision)和溶球态模型(molten globule), 发现了许多蛋白质折叠过程中的中间体(intermediate), 并且已开始探讨折叠起始点(initiation)问题^[3]。其中 BPTI 二硫键的组装和肽链的折叠研究是最突出的例子。

核糖体上新生肽链的合成, 修饰, 折叠, 组装及分泌是继基因表达之后分子生物学领域的第二战略步骤, 探索蛋白质折叠的起始过程是研究蛋白质折叠的重大突破口。Baldwin^[3]综述了蛋白质折叠起始的三种可能因素: 疏水作用, 二级结构及某些特殊作用力(如二硫键)。其中二级结构的形成是框架模型的结构基础^[4]。框架模型认为二级结构的形成在决定蛋白质折叠途径中起中心作用, 折叠起始于独立, 瞬时的肽段二级结构^[5]。因此, 研究蛋白质中肽段(segment)和游离同源多肽片段(frag-

ment)的结构和分子设计在探讨蛋白质折叠起始点和折叠途径问题中具有重要意义^[6]。

1 溶液中小肽的构象

1.1 蛋白质同源片段的溶液构象

按 Zimm-Brag 模型, 早期一般认为小于 20 个残基的小肽在水溶液中不能形成稳定的 α

表 1 一些在溶液中具有一定二级结构的短肽片段

二级结构	肽片段
转折	YPGDV, SYPYDV, GRGDSP
新生螺旋	蚯蚓血红蛋白 C-螺旋
螺旋	RNase A C 肽, 肌红蛋白 H-螺旋, BPTI C 端(47-58), 以 Ala 和 Glu, Lys ($i, i+4$) 为基础设计的短肽
疏水簇	甲状旁腺素 (VQWL), 质体蓝素 (KIVFKNNA)

螺旋结构。Brown 和 Klee^[7]报道, RNase A 经枯草杆菌蛋白酶水解得到 N 端含 20 残基的 S 肽和经溴化氰裂解所得的 N 端含 13 残基的 C 肽在水溶液中均有高含量稳定的 α 螺旋构象存在。这一发现, 使人们对溶液中小肽的构象有

ratory of Pharmaceutic Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210008). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 497—500

The expression of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene is finely regulated at the levels of both transcription and post-transcription. The transcriptional regulation involves some *cis*-active elements, such as the CATT (A/T) repeat sequence, GC-rich sequence, CK-1, CK-2, κ B specific sequence and inducible CsA-sensitive enhancer, which are all located in the 5'-untranscriptional region of the hGM-CSF gene. At the post-transcriptional level, a 62bp AU-rich sequence located at 3'-untranslation region of the mRNA is related to the stability of hGM-CSF mRNA. These mechanisms can up or down regulate the production of hGM-CSF when the cells receive the signals from the stimuli of cytokines and other stimulating factors.

Key words hGM-CSF gene, transcriptional regulation, post-transcriptional regulation

The Advance of Application of Ultrasound to Biotechnology. Feng Ruo, Zhao Yiyun, Li Huamao, Wang Jin. (*Institute of Acoustics Nanjing University, Nanjing 210093*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 500—503

The application of ultrasound to biotechnology is one of the new interesting research fields. A number of studies has shown that some biochemical processes can be activated by ultrasound in the presence of enzymes and cells. Generally, lower intensity ultrasound can increase the activity of enzymes and immobilised enzymes or improve the metabolism of cells by the improvement of mechanism of mass-transfer of substrates. The advance and future of

applications of ultrasound to biotechnology is discussed by some examples given.

Key words ultrasound, cavitation, biotechnology

The Advances in Red Blood Cell Glycophorins Research. Mao Jianping, Sun Zhixian. (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 504—508

Glycophorin (GP or sialoglycophorin)-A, B, C and D constitute a group of red blood cell (RBC) transmembrane proteins. GPA carried the M- and N-blood group antigens. GPB represents the Ss. and U antigens. GPC and GPD exhibit the Gerbich receptors. Some homologous peptide sequences exist in four of the GPs, but extensive similarities are within GPA and GPB family, GPC and GPD family as well. Because of its abundant sialic acid content, GPA plays a critical role in preventing and minimizing interactions of RBC to RBC, and of RBC to other cells in circulation. Binding of a ligand specific for GPA induces profound changes in membrane material behavior. GPC has a important role in regulating RBC shape, membrane deformability and membrane mechanical stability. The functions of GPA and GPC are associated with band 3 and 4.1 proteins respectively.

Key words erythrocyte, glycophorin, transmembrane protein

Secondary Structure Formation: Framework Model of Protein Folding Initiation. Hu Hongyu, Du Yucang, Lu Zixian. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (6): 508—513

Framework model emphasizes that secondary