

The Structure and Activity Studies Based on Combining Functional Domain of Human Interleukin-6 Receptor. FENG Jian-Nan, REN Yun-Fang, LI Song¹⁾, SHEN Bei-Fen (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;* ¹⁾*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Based on molecular docking method, the influence of interaction energy and molecular

interaction between mutated ligand combining functional domain "WSXWS" of human interleukin-6 receptor (hIL-6R) and human interleukin-6 (hIL-6) is studied. The conformation changes on key amino acids of human interleukin-6 receptor when combining with human interleukin-6 and the interactions between human interleukin-6 receptor and human interleukin-6 are analyzed.

Key words human interleukin-6 receptor (hIL-6R), human interleukin-6 (hIL-6), molecular docking, functional domain

肥皂草毒蛋白分离纯化及性质研究

杨元德 周康靖 潘克桢

(中国科学院福建物质结构研究所, 福州 350002)

张蓉真 陈儒明 饶平凡

(福州大学生物工程研究所, 福州 350002)

摘要 从肥皂草里分离到三种核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating proteins, RIPs): SO3a、SO3b、SO6。并测定 SO3a、SO3b 的相对分子质量分别约为 22 500、19 400, 等电点都为 8.4 左右。进行了氨基酸组成分析。用激光拉曼光谱初步预测 SO3a 和 SO3b 的二级结构含量。用反相毛细管色谱发现 SO6 含有两个组分, 而 Stripe 等报道 SO6 为单一峰。

关键词 核糖体失活蛋白, 肥皂草毒蛋白, 激光拉曼光谱, 二级结构

学科分类号 Q512.2

核糖体失活蛋白 (RIPs) 是一类作用于真核细胞核糖体, 抑制蛋白质合成的毒素。RIPs 在植物中分布极为广泛。目前已从 50 多种植物中分离到 60 多种不同的 RIPs 或具有 RIPs 活性的粗提物, 除植物外, 主要几种真菌中也发现 RIPs。RIPs 对细胞中蛋白质的生物合成具有强烈的抑制作用, 所以 RIPs 可以用来制造抗病毒制剂^[1]。肥皂草 (*Saponaria officinalis*) 原产于欧洲, 是在我国北方庭院常见的供观赏用的多年生草本植物。Stirpe 等^[2]于 1983 年首次从种子中分离到肥皂草毒蛋白, 是一个单链 RIPs, 不含糖^[3]。肥皂草毒蛋白在植物中含量高, 抑制活性强, 有效组分多, 国内外学者对其进行了多方面的研究, 在分离方法上也不断地改进, 对肥皂草部分组分也进行了晶体培养的尝试^[4,5]。SO3 在肥皂草种子中含量较少, 还没有文献对 SO3 的性质做深入的报道。本实验对 SO3 的两个组分进行了各种物理化学性质的测试, 测定了其氨基酸组成, 并用激光拉曼光谱测定了它们的二

级结构的含量, 用反相色谱发现按前人的方法分离出的 SO6 并不是单一组分。

1 材料与方法

1.1 材料

肥皂草种子购自北京植物园; HPLC 填料: Poros HS, 毛细管反相色谱填料: C-18, ProSpective 产品; Sephacryl S-200, Pharmacia 产品; bis, Fluka 产品; SDS, Serva 产品, 标准蛋白 (牛血清蛋白, 67 000, 卵蛋白, 43 000, 天花粉蛋白, 27 000, 溶菌酶, 14 300), 上海生物化学研究所东风生化试剂厂; 其他试剂均为分析纯。

1.2 氨基酸组分分析

在日本岛津 LC-4A 高效液相色谱仪上进行检测, 对每个峰进行 280 nm 检测。

Tel: (0591) 3712393; E-mail: yyuande@yahoo.com

收稿日期: 1998-11-08, 修回日期: 1999-03-08

1.3 相对分子质量测定

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 方法按 Fairbanks^[6]所述.

1.4 pI 测定

用等电聚焦, 方法按 Catsimpoolas^[7]所述.

1.5 激光拉曼光谱测定

激光拉曼光谱条件:

Nvcolet co. FT-Ramman 910 (傅立叶变换激光拉曼光谱仪), 光源: 1.064 μm , 扫描次数: 1 000次, MCT 检测器, 收集 90 ° 散射光, 样品为粉末状.

2 结 果

2.1 分离和纯化

称肥皂草种子 50 g 浸泡在含 0.72% NaCl, pH 7.2, 5 mmol/L 磷酸缓冲液中, 至少 4 h. 用高速组织匀浆机匀浆 2 × 3 min, 于 4 °C 抽提过夜. 匀浆液用两层纱布过滤, 滤液用 40% 饱和度的硫酸铵沉淀, 过滤, 滤液用 100% 饱和度的硫酸铵沉淀, 过滤, 将沉淀溶于最小量的 5 mmol/L pH 6.5 的磷酸盐缓冲液中, 装透析袋, 对重蒸馏水透析 (3 × 8 h), 最后对 pH 6.5 的磷酸缓冲液透析 (1 × 8 h). 透析后的样品离心准备上 HPLC 阳离子交换柱. 已装好的柱用 pH 6.5 磷酸缓冲液平衡, 直到上下 pH 一致, 然后将粗提样品上柱, 上柱完毕后, 用磷酸缓冲液冲洗未吸附的杂蛋白. 最后用 NaCl 线性梯度的磷酸缓冲液洗脱. 洗脱完毕, 在 751 紫外分光光度计上比色 (图 1).

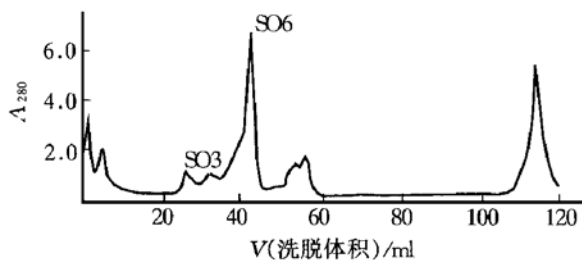


图 1 HPLC 洗脱图谱

2.2 凝胶过滤

装柱 Sephacryl S-200 (2.6 cm × 80 cm), 用 300 ml 50 mmol/L pH 6.5 磷酸缓冲液平衡, 将过 HPLC 的第三号峰 (SO3) 浓缩上柱, 用 50 mmol/L pH 6.5 磷酸缓冲液洗脱 (图 2). 洗脱速度 1 滴需 8~10 s, 走纸速度 3 cm/h, 部分收集器 1 管需 24 min, 检测仪波长 280 nm. 洗脱完毕

分别收集 SO3a 和 SO3b, 收集液浓缩后, 对水透析 4 × 8 h, 然后在真空冷冻干燥机上制成干粉.

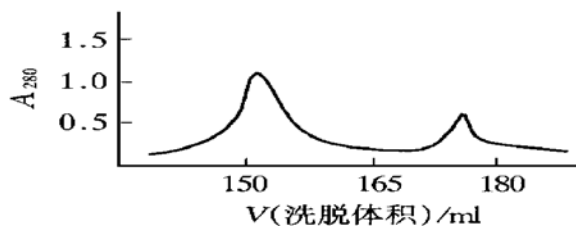


图 2 S-200 洗脱图谱

2.3 反相毛细管色谱分离

从 CM-32 柱上收集 SO6, 然后上 G-18 反相柱, 用 60%~90% 的乙腈梯度洗脱 (图 3).

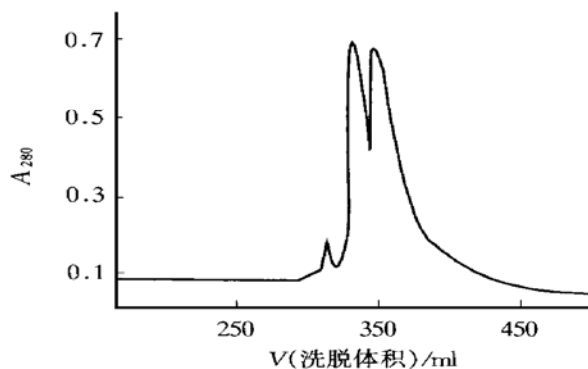


图 3 SO6 的反相色谱洗脱图谱

2.4 相对分子质量测定

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 方法按 Fairbanks^[6]所述, 以相对分子质量的对数对迁移率作图 (图 4), 计算出未知样的相对分子质量.

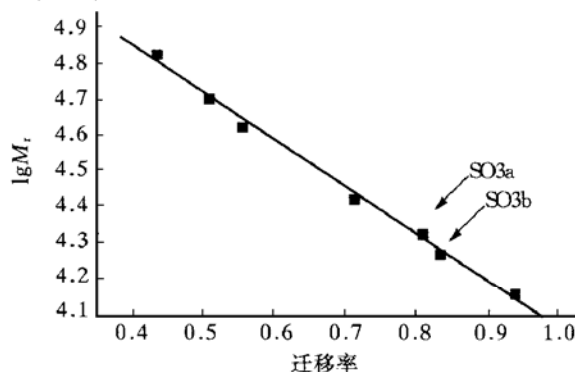


图 4 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测相对分子质量

2.5 pI 测定

用等电聚焦, 方法按 Catsimpoolas^[7]所述, 结果见图 5.

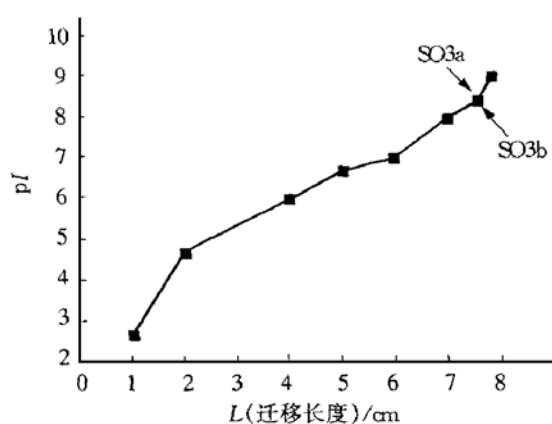


图5 等电聚焦测 pI 值

2.6 激光拉曼光谱初步预测二级结构

在蛋白质中, 酰胺基团的振动模式对骨架构象的变化很敏感. 酰胺 I 模型由 C—O 伸展振动, C—N 伸展振动和 C—N—H 平面弯曲振动组成. 酰胺 III 模型主要由 C—N—H 平面弯曲振动和 C—H 伸展振动组成^[8].

Lord^[9]首次提出了蛋白质激光拉曼光谱的酰胺带频率与构象 (α 螺旋, 反平行 β 折叠, 无规卷曲) 的关系 (表 1).

表1 蛋白质的酰胺振动带与蛋白质构象的关系

	酰胺 I	酰胺 III
α 螺旋	1645~ 1658 cm ⁻¹	1264~ 1310 cm ⁻¹
β 折叠	1665~ 1680 cm ⁻¹	1230~ 1245 cm ⁻¹
无规卷曲	1660~ 1666 cm ⁻¹	1242~ 1250 cm ⁻¹

根据表 1 对谱图作一定的处理就可以得到有关蛋白质二级结构的信息.

Lippert^[10]在 1976 年提出了以 poly-L-Lys 为模型化合物的计算二级结构含量的公式:

$$CI_{1240} = F_{\alpha}I_{1240\alpha} + F_{\beta}I_{1240\beta} + F_R I_{1240R}$$

$$CI_{1632} = F_{\alpha}I_{1632\alpha} + F_{\beta}I_{1632\beta} + F_R I_{1632R}$$

$$CI_{1600} = F_{\alpha}I_{1600\alpha} + F_{\beta}I_{1600\beta} + F_R I_{1600R}$$

$$1.0 = F_{\alpha} + F_{\beta} + F_R$$

相对强度 I_{1240} 是蛋白质在 1240 cm⁻¹ 处的光谱高度对 CH₂ 在 1448 cm⁻¹ 高度的比值; $I_{1240\alpha}$ 是纯 α 螺旋的相对强度. F_{α} , F_{β} , F_R 分别是蛋白质中三种构象的含量. C 是蛋白质中 CH₂ 带强度相对于 poly-L-Lys 的比例常数.

在蛋白质和多肽的激光拉曼光谱中, 850 cm⁻¹ 带和 830 cm⁻¹ 带由于酪氨酸残基的结构

特点, 总是成对出现. 而这二谱带的强度比可表征酪氨酸残基所处的环境. 根据 Craig 和 Gaber^[11] 1977 年提出的公式可以定量地得出其是呈 “暴露式” 或 “埋入式”.

$$0.5 Nb + 1.2 Ne = I_{850} / I_{830}$$

$$Nb + Ne = 1$$

SO_{3a}, SO_{3b} 中酪氨酸暴露于外的分别占酪氨酸总数的 71.4%, 58.4%, 埋入在蛋白质分子内部分别占酪氨酸总数的 28.6%, 41.6%. 用于上述计算的激光拉曼光谱数据见表 2 和表 3.

表2 激光拉曼光谱数据

	1448 cm ⁻¹	1240 cm ⁻¹	850 cm ⁻¹	830 cm ⁻¹
I_{SO3a}	0.876	0.604	0.525	0.507
I_{SO3b}	0.549	0.375	0.333	0.355

表3 激光拉曼光谱相对强度

	1240 cm ⁻¹	1632 cm ⁻¹	1660 cm ⁻¹
α 螺旋 ¹⁾	0.00	0.80	0.55
β 折叠 ¹⁾	1.20	0.72	0.88
无规卷曲 ¹⁾	0.60	0.08	0.78
SO _{3a} (干粉)	0.7226	0.5788	0.8436
SO _{3b} (干粉)	0.6685	0.6248	0.8415

¹⁾ 纯 α 螺旋、β 折叠和无规卷曲的相对强度 (Lippert J L, et al. J Am Chem Soc, 1976, 98 (22): 7075~ 7080).

3 讨 论

SO_{3a} 和 SO_{3b} 是从阳离子柱分出的单一峰里, 用凝胶过滤分出的两个组分, 所以它们的等电点应该相近, 等电聚焦结果也证实了这一点 (图 5). SO_{3a} 比 SO_{3b} 的相对分子质量大, 这从二者的迁移率 (图 4) 和凝胶过滤峰的位置 (图 2) 可以得印证.

从激光拉曼光谱的二级结构测定可以看出, 二者在二级结构上有一定的差异 (表 4). 从二者的氨基酸组分分析看 (表 5), Asx, Glx 含量最多, Lys, Arg 含量次之. 等电聚焦表明二者都是碱性, 约为 8.4 左右, 故认为 Asx, Glx 多以酰胺形式存在. 二者氨基酸组成相比较, SO_{3a} 的 Pro 含量是 SO_{3b} 的 4.6 倍. Pro 的存在不利于 α 螺旋的形成, 这一点与激光拉曼光谱的二级结构测定相符合, SO_{3a} 的 α 螺旋含量明显低于 SO_{3b} 的含量. SO_{3a}, SO_{3b} 的蛋白质纯度很高, 再结合 HPLC 可知道 SO_{3a}, SO_{3b} 的组分也很单一. 通过 SO_{3a}, SO_{3b}

与已知 RIPs 的二级结构含量比较可知, SO3a, SO3b 富含 β 结构, 我们推测 SO3a, SO3b 很可能是一种新型的 RIPs.

表 4 根据 Lippert 的三级结构模型算出的二级结构含量和已知的 RIPs 的二级结构含量的比较

	占总残基百分数			比例常数 C
	α 螺旋	β 折叠	无规卷曲	
SO3a	28.6	35.7	35.7	0.89
SO3b	35.5	32.3	32.2	0.87
天花粉毒蛋白	48.3	16.3	35.2	
苦瓜子毒蛋白	48.6	14.1	37.2	
α 丝瓜子毒蛋白	47.6	19.1	33.5	
β 丝瓜子毒蛋白	49.0	10.7	40.3	
蓖麻毒蛋白 A 链	39.0	23.3	37.7	
蓖麻凝集素	38.4	26.1	35.4	
香恩子毒蛋白 A 链	31.5	28.3	48.3	
商陆抗病毒蛋白	41.7	13.5	44.7	
紫茉莉抗病毒蛋白	46.4	17.6	36.0	

表 5 氨基酸组分分析

名称	含量/%		平均氨基酸数/个	
	SO3a	SO3b	SO3a	SO3b
Asp	15.2	17.52	14	25
Thr	5.7	5.65	6	9
Ser	4.58	4.73	5	9
Glu	10.54	10.82	9	14
Pro	2.83	0.62	3	1
Gly	5.52	5.41	9	14
Ala	7.21	8.65	10	19
Cys	—	—	—	—
Val	6.03	4.10	6	7
Met	1.38	1.16	1	2
Ile	4.80	5.05	5	7
Leu	7.73	6.64	7	10
Tyr	6.59	6.10	4	6
Phe	6.59	7.08	5	8
His	1.26	0.81	1	1
Arg	6.34	6.85	4	8
Lys	8.98	8.72	4	8
Trp	—	—	—	—

注: % 是质量百分比, 平均氨基酸数以 His 个数为 1, Trp Cys 酸解时被破坏.

根据氨基酸组成分析, 可算出 SO3a、SO3b 的最小相对分子质量分别约为 12 342、19 187, 而从凝胶过滤知道, SO3a 的相对分子质量大于 SO3b, 并且电泳测得 SO3a、SO3b 分别为 21 135、19 770 左右, 故可估计 SO3a、SO3b 的相对分子质量约为 22 500、19 400.

Stripe 等报道 SO6 为单一峰, 本实验中采用反相毛细管色谱发现 SO6 含有两个组分, 在本实验中用反相毛细管色谱发现 SO6 含有两个非常相似的峰, 因为本实验中的反相毛细管色谱是根据样品的疏水性来分离的, 所以我们推测 SO6 的两个组分的一级结构区别只存在于极少数氨基酸上, 甚至极个别氨基酸上. SO6 一直未能获得晶体, 可能与 SO6 含有两个相似的组分有关.

致谢 在本项工作中福州大学生物工程研究所的陈天豹, 李琰, 徐小华, 林晓辉, 李邦德等给予了许多帮助, 在此对他们表示感谢!

参 考 文 献

- Byers V S, Baldwin R W. A Phase I / II study of trichosanthin treatment of HIV disease. AIDS, 1990, 4 (12): 1189~ 1196
- Stripe F, Anna G C, Anna F, et al. Ribosome inactivating proteins from the seeds of *Saponaria* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle), of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). Biochem J, 1983, 216 (3): 617~ 625
- 郑 硕. 植物核糖体失活蛋白的研究概况, 生物化学与生物物理进展 (Zheng S. Prog Biochem Biophys), 1989, 16 (1): 16 ~ 18
- Lappi D A, Fred S E, Luigi B, et al. Characterization of a *Saponaria officinalis* seed ribosome inactivating proteins: immunoreactivity and sequence homologies. Biochem Biophys Res commun, 1985, 129 (3): 934~ 942
- 黄东宏, 邱 巍, 傅珠 等. 肥皂草毒蛋白的纯化、性质及晶体生长研究. 生物化学与生物物理学报 (Huang D H, Qiu W, Fu Z J, et al. Acta Biochimica et Biophysica Sinica) 1995, 27 (3): 333~ 336
- Fairbanks G, Theodore L S, Wallach D F H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry, 1971, 10 (13): 2606~ 2617
- Catsimpoilas N. Micro isoelectric focusing in polyacrylamide gel columns. Anal Biochem, 1968, 26 (3): 480~ 482
- Krimm S, Abe Y. Intermolecular interaction effects in the amide I vibrations of polypeptides. Proc Natl Acad Sci USA, 1972, 69 (10): 2788~ 2792
- Belloq A M, Lord R C, Mendelsohn R. Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. Biochim Biophys Acta, 1972, 257 (2): 280~ 287
- Lippert J L, Tyminski D, Desmeules P J. Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy. J Am Chem Soc, 1976, 27: 7075~ 7080
- Craig W S, Gaber B P. Laser Raman scattering from an enzyme of well-documented structure, human carbonic anhydrase B. J Am Chem Soc, 1977, 99 (12): 4130~ 4134

Purification and Characterization of Saporins.

YANG Yuan-De, ZHOU Kang-Jing, PAN Ke-Zhen (Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China); ZHANG Rong-Zhen, CHEN Ru-Ming, RAO Ping-Fan (Biotechnology Institute, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China).

Abstract Three saporins, SO3a, SO3b and SO6, were separated and purified from the seeds extracts of *Saponaria officinalis*. The molecular weights of

SO3a and SO3b are about 22 500, 19 400, respectively, and their pI values are about 8.4 and the amino acid components are analysed. The contents of the secondary structure of SO3a and SO3b are determined by laser Raman spectrum. In the experiment it was also found by reverse phase capillary chromatography that SO6 which was reported by stripe to be a purified protein, contain two components in fact.

Key words RIPs, saporin, laser Raman spectrum, secondary structure

佛波酯 (TPA) 促进 NIH3T3 细胞 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白的合成*

贺建宇¹⁾ 方新初 曹立环 查锡良²⁾

(卫生部糖复合物重点实验室, 上海医科大学生化教研室, 上海 200032)

摘要 佛波酯 (TPA) 是潜在促肿瘤剂, 也是蛋白激酶 PKC 激活剂. TPA 能在极低浓度下替代 DG 激活 PKC, 从而导致一系列细胞功能变化. 应用 100 nmol/L TPA 作用于 NIH3T3 细胞, 观察 NIH3T3 细胞的粘附变化, 发现 TPA 可促进 NIH3T3 细胞与基质纤连蛋白的粘附, 进一步研究 Fn 的主要受体 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白在细胞表面含量, 发现 TPA 作用 24 h 使 α_5 及 β_1 含量分别增加 52.3% 和 51.6%. 应用 ³H-甘露糖标记 N-糖链和凝集素柱层析方法分析 TPA 作用后细胞 N-糖链总量和组分比, 结果均与对照组相仿, 说明是通过增加细胞合成整合蛋白 α_5 及 β_1 亚基含量实现的. 在 TPA 作用于细胞的同时, 加入 PKC 抑制剂 Sphingosine, 发现 α_5 、 β_1 含量和细胞与 Fn 的粘附均回复至对照组水平, 提示 TPA 增加 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白合成而增加的细胞与 Fn 粘附作用, 是由 PKC 介导完成的. 此外还发现酪氨酸蛋白激酶抑制剂也阻断 TPA 增加 $\alpha_5\beta_1$ 整合蛋白含量的作用.

关键词 整合蛋白, 细胞粘附, 蛋白激酶 C, 佛波酯

学科分类号 Q5

蛋白激酶 (protein kinase)^[1] 主要有三类, 即蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)、和酪氨酸蛋白激酶 (tyrosine protein kinase, TyPk), 它们参与胞外信号跨膜传递, 通过蛋白质丝/苏氨酸或酪氨酸磷酸化, 在调节细胞代谢、分化、生长、增殖及癌变过程中具有十分重要的作用. PKC 是一种广泛分布的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 催化底物蛋白 Ser/Thr 残基磷酸化. PKC 活化后, 可催化多种底物蛋白质磷酸化, 包括 Na⁺/H⁺ 交换泵磷酸化而使细胞内 pH 升高. 最终导致 DNA 合成增加. PKC 还催化胰岛素受体、表皮生长因子受体 (EGFR), 钙调蛋白等多种重要的生理活性蛋白的 Ser/Thr 残基磷酸化, 影响细胞内生物信息的传递, 发挥重要的生物学功能^[2].

佛波酯 (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA) 是已知的潜在促肿瘤剂 (tumor promotor), 实验证实 PKC 是 TPA 的直接作用受体. 结构分析提示 TPA 具有甘油二酯样结构, 因此 TPA 能在极低浓度下替代 DG 激活 PKC, 并能大大地增加 PKC 和 Ca²⁺ 的亲和力, 导致细胞内无法觉察的 Ca²⁺ 流动时, 而 PKC 已完全被激活^[2-6].

由于 TPA 能通过激活 PKC 导致细胞内一系列生化反应, 产生细胞众多生理功能, 但 TPA 能否引起细胞粘附变化, 目前尚不明确, 这值得进一步

* 国家自然科学基金 (39570169) 和上海市教委重点学科资助项目.

¹⁾ 上海医科大学肝癌研究所.

²⁾ 通讯联系人.

Tel: (021) 64041900-2696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

收稿日期: 1998-12-26, 修回日期: 1999-05-24