

甲种胎儿蛋白 (AFP) 结构与功能研究进展

陆选永* 曾庆镒

(中国科学院上海生物化学研究所)

甲种胎儿蛋白 (简称 AFP) 是一种单链糖蛋白。在过去 20 年中, 由于它作为胚胎、肝癌和胚源性肿瘤的特征性蛋白而受到了人们的广泛重视。AFP 临床应用、物化性质、生物合成、基因调控等方面的研究均取得很大进展。近几年来, 在分子水平上又发现 AFP 是不均一的, 这种不均一性不但表现在其肽链的一级结构上, 同样也表现在其寡聚糖单位结构上, 这一发现推动了对 AFP 变种及其精细结构的研究。本文拟从蛋白质结构和糖基结构的差异来叙述 AFP 各变种在精细结构上的不同, 以及这种不同可能引起的功能差别。

一、AFP 的一级结构及其在各变种中的差异

由于分子遗传学技术和概念的引入, 使 AFP 一级结构的研究有了突破。1981 年 Gorin 等和 Law 等分别克隆了小鼠卵黄囊 AFP, 测定了相应 AFP cDNA 的顺序, 并首次推测出小鼠 AFP 的一级结构。完整的小鼠 AFP 分子由 584 个氨基酸组成, 其中有 14 对二硫键, 使整个分子形成三个基本类似的结构区^[1]。第 227—229 (Asn-Phe-Thr)、305—307 (Asn-Pro-Ser)、478—480 (Asn-Ser-Ser) 位置具有 Asn-X-Thr-Ser 结构, 这种结构目前被认为是糖基化所必需的。同年, Jagodzinski 等用类似的方法推测大鼠 Morris 肝癌 7777 的 AFP 是由 522 个氨基酸组成, 其一级结构同小鼠卵黄囊 AFP 基本相似, 整个分子同样也可分成三个基本类似的结构

区, 14 对二硫键维系着分子的高级结构^[2]。人 AFP 的全部一级结构尚未见报道。最近 Beattie 等采用同样的方法推测出人胚肝 AFP405—532 这一段的氨基酸排列顺序^[3], 与鼠 AFP 第三结构区比较, 其二硫键数目和位置、及由此形成的结构区域中的氨基酸数目等基本相同, 因而推测人 AFP 结构区的划分同鼠类 AFP 极其相似。上述推测出的 AFP 高级结构和白蛋白极相似, AFP 也具有较高度度的 α -螺旋结构, 整个蛋白形状接近于球蛋白。糖基化对 AFP 的高级结构有影响, 其影响的程度和糖的形式及多寡有关。

1. AFP 的电泳不均一性 不论 AFP 的来源如何, 它们的分子大小和电荷量是不均一的。1963 年 Wise 首先使用淀粉胶电泳将大鼠 AFP 分成两个电泳行为不同的成份。1970 年 Purse 等使用同样的方法证实了人 AFP 在电荷性质上也是不均一的。此后, AFP 的分子大小和电荷多寡的不均一性不断地得到进一步证实。随着生化分析技术的不断发展, 近年来通过等电聚焦结合交叉免疫电泳, 已将人胎儿 AFP 分成十个等电点不同的变种^[4]。同时还有人使用 SDS-聚丙烯酰胺梯度 (5—25%) 凝胶电泳发现 AFP 可以分成两个分子量分别为 72 KD 和 74 KD 的成分, 两者分子量差异相当于 20 个氨基酸之多^[5]。

2. AFP 电泳不均一性和其一级结构的关系 以往认为, AFP 糖基成份中影响电泳行为

* 现上海市静安区中心医院免疫研究室。

的主要是唾液酸,但是被神经氨酸酶切除唾液酸成份后的 AFP,依然显示这种电泳不均一性。因此目前认为,AFP 的电泳不均一性至少还和其一级结构差异有关。为了进一步证实 AFP 各变种在一级结构上存在差异,许多人力图对其氨基酸顺序进行比较和分析。结果发现,不管是人 AFP 还是鼠 AFP,其 C-末端结构基本相同,一般为-Ala-Gly-(Leu,Ala) Val-OH,而 N-末端则有较大的差别,就人 AFP 而言,已经发现至少有三种不同的 N-末端^[6]。至于 N-末端的差异是否是引起 AFP 电泳不均一性的主要原因,还有待进一步证实,但 AFP 在一级结构上,特别是 N-末端存在差异这一事实,已得到普遍承认。

对上述观点持不同意见的人认为,AFP 分子大小和电荷多寡与蛋白质一级结构的差异无关。Parmlee 认为这种差异是由于 AFP 结合的脂肪酸不同。但最近的实验证明,去除脂肪酸后的 AFP 仍显示上述不均一性,从而否定了 Parmlee 的看法。Lester 发现组织中的 AFP 和血清中的 AFP 所含主要变种的电荷不同,因而推测 AFP 在合成后的分泌过程中(或释放后在血液中)遭到机体的生化修饰而形成变种。但 Lester 的假设忽略了不同 AFP 变种在代谢率上的差别,因此仍难以让人完全信服。至于糖基本身的不同及糖基化后 AFP 构象发生变化而引起不均一性的假设,尽管有一些实验支持,但由于许多实验室发现,去糖基后的 AFP 依然存在差异,因此这种假设也缺乏说服力。

3. 引起 AFP 各变种一级结构不同的原因
总的来说,引起 AFP 一级结构不均一性的原因,目前尚不清楚。有人认为可能是 AFP 在分泌过程中,受到了蛋白水解酶的攻击,也有人认为这种差异来自于产生 AFP 的组织不同,不同组织有不同的修饰功能,从而导致血液中的 AFP 分子不尽相同。AFP 基因编码上是否存在不同,这是人们感兴趣的问题,许多人认为 AFP 肽链结构的不同来自于基因编码的不同。只是以上各种说法均处于假设阶段,都还缺乏

有力的证据。一旦对 AFP 各变种的氨基酸全排列及相应的基因编码弄清之后,这个问题也将会迎刃而解。

4. AFP 的结构差异在其生物功能上的意义
AFP 功能的研究一直是个吸引人的课题,但到目前为止,所得出的结论往往不能完全统一。现有知识认为,AFP 除了具备一些类似于白蛋白的功能外,还可以与雌激素结合,并且具有免疫抑制能力,后者和 AFP 的分子结构具有比较密切的关系。

Yachnin 等曾测定了 AFP 电荷量与免疫抑制的关系,发现 AFP 带负电荷越多,则免疫抑制效应越强。用神经氨酸酶切除唾液酸后这种性质不变^[7]。后来,他们又证明了 AFP 的免疫抑制活性和它所结合的脂肪酸,氢化可的松、溶血性卵磷脂、氧化型固醇类化合物等无关^[8]。因此,他们认为 AFP 的免疫抑制功能直接和它的肽链结构有关,并推测不同变种的 AFP 与淋巴细胞表面不同部位作用,从而导致免疫抑制效应上的差异。

最近 Yataka 等发现 AFP 能够抑制球蛋白的合成,并证实这种抑制作用主要是阻止三体复合物(真核细胞起始因子 2, GTP 和 Met-tRNA^{Met}),进一步形成 40S 起始复合物^[9]。AFP 的这种性能能够很好地解释为什么它具有抑制某些免疫活性的功能,因为抗体和淋巴因子都是球蛋白。AFP 在胚胎期的大量存在也可用于解释胚胎发育期某些基因的“开启”和“关闭”,因为基因表达的调节控制因子也是球蛋白。因此,胎儿合成并释放 AFP,一方面抑制母体对胎儿的免疫排斥反应,另一方面也可能对胎儿本身的生长和发育起到一定的调节作用。

二、AFP 的糖基结构及其在各变种中的差别

近年来,糖作为“功能密码”日益受到重视,就 AFP 而言,其糖成份也越来越显示它的重要性。AFP 含糖量占整个分子总量的 4% 强,糖的成份主要为甘露糖、半乳糖、N-乙酰葡萄糖

和唾液酸。由于 Lectin (凝集素)对糖有专一性的结合,使用 Lectin 对 AFP 糖结构的研究迅速发展起来。到目前为止,某些来源的 AFP 的糖基结构已经比较清楚,这些结构上的差别在功能上的意义也正得到深入的研究。

1. AFP 和 Lectin 的反应 1973 年 Smith 和 Kelleher 首先报道用 ConA 可以将大鼠 AFP 分成两个不同的变种,即 ConA 结合型和 ConA 非结合型。同年他们又证实了人 AFP 同样存在上述差别,于是他们首先提出了 AFP 的糖基结构不尽相同的假设。以后, Bayard 等又进一步将人 AFP 分为 ConA 强结合型、弱结合型和非结合型三类变种^[10]。1977 年 Bayard 等使用另一种 Lectin RCA (*Ricinus communis* Agglutinin) 将 AFP 分为结合型和非结合型两大类变种。1979 年 Kerckaert 等又使用 LCA (*Lens culinaris* Agglutinin) 将人 AFP 分成三大类变种,即 LCA 强结合型、弱结合型和非结合型。1980 年 Mackiewicz 和 Breborowicz 为了

进一步弄清不同 Lectin 所得变种之间的相互关系,使用两种不同 Lectin 和抗 AFP 抗体进行三维亲和电泳,证明了已经不再能被某一 Lectin 进一步区分的 AFP 变种,仍然可被其它 Lectin 再分开^[11]。由此可见,AFP 和 Lectin 的反应是有多种类型的,随着新的 Lectin 的使用,到目前为止,已经确定了 AFP 在糖结构上的变种达 9 种之多。

2. AFP 的寡聚糖结构 AFP 和 Lectin 反应的基础在于它的糖基结构。现有的研究表明,糖在 AFP 中主要是以寡聚糖单位的形式存在,这种寡聚糖单位结合在蛋白链的特定位置,并形成向外伸展的支链。一个寡聚糖单位并非是一单链结构,在其游离的一端一般呈分枝状。和 Lectin 呈不同反应的各种 AFP,其糖基结构的区别主要在于分枝结构的不同。Bayard 等分析了大鼠羊水 AFP 糖成份,提出了 ConA 结合型和 ConA 非结合型 AFP 的寡聚糖单位模型,如图 1 所示^[12]。很明显,和 ConA 反应的

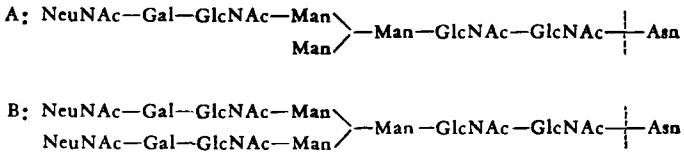


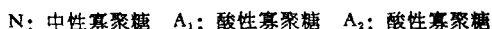
图 1 大鼠羊水 AFP 寡聚糖结构

A: ConA 结合型 B: ConA 非结合型

Man 甘露糖 Gal 半乳糖 NeuNAc N-乙酰神经胺 GlcNAc N-乙酰葡萄糖胺 Asn 天冬酰胺

差别仅取决于一个分枝的不同,前者只有一个甘露糖,后者则在甘露糖之后多了-GlcNAc-Gal-NeuNAc 结构。ConA 可以专一性地结合 α -D-甘露糖,却不结合 N-乙酰神经胺,因此 AFP 糖基结构的细小差别就可通过对 ConA 的反应表示出来。Yoshima 等对人肝癌 AFP 的糖基结构进行了研究,他采用胼解法,在纸电泳上将人肝癌 AFP 的寡聚糖分成三个不同成份,即中性成份 N、酸性成份 A₁ 和 A₂,随后使用专一性的糖基水解酶, N 位重新乙酰化等方法来确定各寡聚糖的结构,如图 2 所示^[13]。中性成份 N 的两分枝末端均由半乳糖组成。酸性成份 A₁ 只有一个分枝末端为半乳糖,另一末端为 N-乙酰神经胺。酸性组份 A₂ 的两个分枝末端均

为 N-乙酰神经胺。据此,可以推测,与半乳糖有专一性结合能力的 Lectin,如 RCA 等,应能将人肝癌 AFP 分为三个不同类型的变种,即 RCA 强结合型,弱结合型和非结合型,但目前尚未见文献报道。此后, Krusius 等又报道了胎牛血清 AFP 两种寡聚糖单位结构,一种是与肝癌 AFP 酸性组份 A₂ 相同(参看图 2, A₂) 的二分枝结构,另一种为三分枝结构^[14]。RCA 专一性结合半乳糖, LCA 可和甘露糖、葡萄糖残基反应,它们所反应出来的 AFP 糖基结构上的特点,虽然没有象 ConA 那样被具体化,但很明显和 ConA 反映出来的特点是不相同的。不同的 Lectin 反应所体现的变种并非相同,这已被 Mackiewicz 和 Breborowicz 所证实,因此可以



实际意义。AFP 是目前为数不多的,能大量纯化的糖蛋白之一,因此可以通过对它的深入研究探讨糖蛋白分子的基因表达、基因的“开启”和“关闭”、蛋白质生物合成的调节和糖基化过程等分子生物学基本问题,阐明目前认为十分重要的糖蛋白的功能以及糖基结构对这种功能的影响。AFP 作为肝癌细胞的“特征”蛋白,在临床诊断上已得到特别重用,如果从分子水平上对 AFP 变种的进一步研究,必将会提高它对肝癌、肝硬化和肝炎的鉴别诊断能力。

参 考 文 献

- [1] Gorin, M. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1954, 1981.
- [2] Jagodzinski, L. L. et al.: *PNAS USA* **78**, 3521, 1981.
- [3] Beattie, W. G. et al.: *Gene*, **20**, 415, 1982.
- [4] 曾庆镒,等:《科学通报》**305**, (5), 1981.

- [5] Kerchaert, J. P. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **576**, 99, 1979.
- [6] 曾庆镒,等:《原发性肝癌》, 163, 汤钊猷主编,上海科学技术出版社, 1982.
- [7] Lester, E. P. et al.: *Immunol. Commun.*, **7**, 137, 1978.
- [8] Yachnin, G. S. et al.: *Oncodev. Biol. Med.*, **1**, 137, 1978.
- [9] Yataka, A. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 9566, 1982.
- [10] Bayard, B. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 489, 1977.
- [11] Mackiewicz, A. et al.: in *Lectins, Biology-Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol. 1, 315. Bøgg-Hansen, T. (ed.) W. de Gruyter, Berlin, 1981.
- [12] Bayard, B. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **113**, 405, 1981.
- [13] Yoshima, H. et al.: *Cancer Res.*, **40**, 4276, 1980.
- [14] Krusius, T. et al.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 3453, 1982.
- [15] Belanger, J. et al.: *Biochemistry*, **18**, 1962, 1979.
- [16] Smith, C. J. P. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **605**, 1, 1980.

[本文于 1983 年 7 月 7 日收到]

核磁共振在生物学医学方面应用的进展

吕 昌 祥

(重 庆 医 学 院)

核磁共振 (NMR) 技术在医学生物学中具有广泛的用途,它既能研究活的动物器官中的蛋白质、核酸等生物大分子的代谢过程,也能研究像水、金属离子小分子含量和分布状态。它还能使整个组织器官成像,用以无损伤地诊断身体内部器官的病变。

总之其优越性其他方法,如放射性同位素、X 射线计算机断层术等无法比拟的,所以它近年来发展很快。

一、核磁共振谱仪在生物医学中的应用

NMR 谱仪最初用它研究生物大分子,后来用于完整的细胞、细胞器、器官,进而研究体内的代谢过程,获得了有关结构、运动,反应速度等详细的信息。所用的原子核也从质子扩展到 ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P 和 ^{39}K 等。

许多生物大分子,可以用核子(最常用的是质子)NMR 的化学位移来显示它们的电子环境,从而了解其共价结构和其它空间结构。这对蛋白质研究特别有用,因为蛋白质由大约 20 种不同的亚单位组成,它们的二级和三级结构,可引起核磁共振参数(如化学位移、偶合常数,弛豫时间等)的很多变化。此外, NMR 对生物膜的研究也取得了很大进展,最新理论认为膜系统是一种“固体”或液晶,并且已经有人用氙测出 NMR 峰的四重裂分和碳或磷的各向异性的化学位移。从这些工作可详细地描绘出磷脂的运动及其状态的改变。NMR 的研究已为人们提供了许多有关膜动力学的知识^[1]。

Shulman 等用高分辨的 NMR 谱仪对细胞和提纯的线粒体进行了研究。他们用 ^{31}P -NMR 分别测量了完整的肝细胞中细胞质和线粒体的