

★综述★

糖胺聚糖与蛋白相互作用方法学研究进展*

高洋, 陈海敏, 严小军**

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室, 宁波 315211)

摘要: 糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 是一种长链多糖, 作为糖生物学中研究的主要物质种类, 广泛存在于动物细胞的面和细胞外基质。很多种类的 GAGs 与其受体蛋白结合, 包括细胞因子、粘附分子、趋化因子、生长因子、酶及病原体蛋白等, 从而介导重要的生物机制。探究 GAG-蛋白质相互作用, 对开发新的高特异性的临床药物具有深远的意义。但相对于蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸相互作用的研究而言, GAG-蛋白质相互作用的研究相对滞后。本文主要通过介绍近年来 GAGs 与蛋白质相互作用的研究方法, 包括亲和层析 (AC)、聚丙烯凝胶电泳 (PAGE)、毛细管电泳 (CE)、凝胶迁移或电泳迁移率 (GMSA/EMSA)、表面等离子共振分析技术 (SPR) 及质谱技术 (MS) 等, 并对其进行分析和对比, 为进一步研究 GAG-蛋白质相互作用提供技术参考。

关键词: 糖胺聚糖, 肝素, 蛋白受体, 相互作用, 硫酸多糖

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)12-2171-08

Research progress on the methodology of glycosaminoglycan-protein interactions*

GAO Yang, CHEN Hai-min, YAN Xiao-jun**

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract Glycosaminoglycans (GAGs) were linear polysaccharides present on all animal cell surfaces and in the extracellular matrix. Large numbers of GAGs can bind proteins, including chemokines, cytokines, growth factors, morphogens, enzymes, extracellular matrix, or adhesion molecules, and these protein-GAG interactions provide numerous important biological activities. Understanding of these interactions is of fundamental importance in the design of new highly specific therapeutic agents. In addition, the understanding of carbohydrate-protein interactions has lagged behind that of the more thoroughly studied protein-protein and protein-nucleic acid interactions. This review focuses on aspects of the methodology of glycosaminoglycan-protein interactions, including AC (affinity chromatography), PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), CE (capillary electrophoresis), gel/electrophoretic mobility shift assay (GMSA/EMSA), surface plasmon resonance (SPR), mass spectrometry (MS). Analysis and comparison of these methods is to provide information for further studying on the GAG-protein interactions.

key word glycosaminoglycans (GAG); heparin; protein receptor; interaction; sulfated polysaccharides

糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAGs) 是多糖中的一种, 是一类由重复的二糖结构单元组成的带有负电荷的长链大分子, 是细胞外组织基质、细胞表面和细胞膜基底层的主要组成成分, 在某些细胞外颗粒中也发现有 GAG。人体内重要的 GAGs 有肝素 (heparin, Hep)、硫酸软骨素类 (chondroitin sulfate,

CS)、硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS)、硫酸角质素 (keratan sulfate, KS)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 和硫酸乙酰肝素 (heparin sulfate, HS)^[1]。

随着生物领域对糖化学研究的不断深入, 大量的研究表明 GAGs 尤其是 HS 和 Hep 最为显著的特性是能够与大量受体蛋白特异结合^[2-6] (表 1), 包

* 国家自然科学基金项目 (No. 30800860) 资助

** 通讯作者 Tel: (0574) 87600590 E-mail: yanxiaojun@nbu.edu.cn

括细胞因子、粘附分子、趋化因子、生长因子、酶及病原体蛋白等,这种结合对受体蛋白的生物学功能起着至关重要的作用。同样, GAGs通过结合受体蛋白介导重要的生物学机制^[7], 比如抗凝血、维持或

抑制细胞生长、黏附和抗黏附、生物过滤器、促进或抑制血管形成、诱导神经轴突生长, 以及在正常发育和病理条件下, 结合、贮存及向靶细胞释放生长因子和参与信号转导等生物活性。

表 1 部分 GAG-蛋白受体及生物活性

Tab 1 The selected GAG-binding protein and the biological activity

蛋白受体 (protein receptor)	GAG	结合后生物功能 (the combination of biological function)
生长因子 (growth factor)		
成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor FGF)	H φ /HS	二聚化、保护蛋白免受降解 (dimerization protection from degradation)
肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor HGF)	H φ /HS	抑制生长因子 (growth factor sequestering)
血小板衍生生长因子 (platelet derived growth factor)	H φ /HS	影响受体结合 (affect receptor binding)
γ -干扰素 (γ -interferon)	H φ /HS	二聚化调节蛋白加工 (dimerization modulation of proteolytic processing)
Annexin V	H φ /HS	抗凝血活性 (anticoagulant activity)
肝素辅因子 II (Heparin cofactor II)	KS/HS	局部抗凝血 (local anticoagulant)
趋化因子 (chemokine)		
t-纤维蛋白酶原激活因子 (tissue-type plasminogen activator)	H φ /HS	凝块溶解 (clot dissolution)
白介素-8 (Interleukin-8 IL-8)	H φ /HS	抑制趋化因子 (sequesters the chemokine)
L选择素 (L-selectin), P选择素 (P-selectin)	H φ /HS	炎症 (inflammation)
血小板反应素 4 (thrombospondin-4 TSP-4)	Hep/HS/CS	细胞黏附/生长 (cell adhesion/growth)
细胞外超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)	H φ /HS	主体防御 (thematic defense)
酶 (enzyme)		
脂蛋白酶 (lipoproteinase)	H φ /HS	稳定二聚化、局部脂肪分解 (dimerization stability partial lipolysis)
抗凝血酶 (antithrombin)	H φ /HS	增强抗凝活性 (increasing antithrombin activity)
病原体蛋白 (Viral protein)		
单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus HSV)	H φ /HS	黏附到宿主细胞 (attachment to the host cell)
口蹄疫病毒 (foot and mouth disease virus FMDV)	H φ /HS	黏附到宿主细胞 (attachment to the host cell)
狂犬病毒 (Rabies Virus)	H φ /HS	黏附到宿主细胞 (attachment to the host cell)
粘附分子 (extracellular matrix ECM)		
层粘连蛋白 (laminin)	H φ /HS	黏附到 ECM (adhesion to ECM)
纤维粘连蛋白 (fibronectin)	H φ /HS	黏附, 形成粘着斑 (adhesion focal adhesion formation)
CD44	HA	细胞黏附/迁移 (cell adhesion/transfer)

鉴于 GAG-蛋白质相互作用的重要性, 寡糖片段成为药物设计的重要靶点。自 1973年, Rosenberg 和 Damus 首次发现肝素特异结合抗凝血酶 (AT-III), 并引起其构象的改变, 加快 AT-III 和一个没有活性的蛋白复合物的作用, 从而实现其抗凝血功能。肝素和 AT-III 的相互作用是首次有关 GAG-蛋白质复合物具有生物活性的报道^[8]。在之后的 20 多年里, 越来越多的生物活性被发现是通过肝素结合受体蛋白介导或调节完成, 这种交互作用在正常生理发育和病理条件下均起着重要的作用。然而, 肝素只有一小部分能与 AT-III 特异结合, 说明肝素具有的一个特殊的寡糖片段与 AT-III 高特异结合。后来通过结构分析, 肝素链中的一个特定的五糖序列是结合 AT-III 所必需的, 其中比较罕见的 3-O-SO₃ 对这种结合起着至关重要的作用。这样, 其

他蛋白是否能与类肝素/硫酸类肝素结合, 越来越引起人们的兴趣。

在 1991 年有研究报道, 所有成纤维细胞生长因子家族 (fibroblast growth factor FGF) 成员均与成纤维生长因子受体 (fibroblast growth factor receptor FGFR) 和肝素/HS 高亲和力结合, 从而形成稳定的活化 FGF-FGFR-Hep 复合物。而且, 缺乏 Hep/HS 的细胞对 bFGF (basic fibroblast growth factor) 的敏感性极低。X 射线衍射法分析证明, 肝素/HS 可与 FGF 及 FGFR 形成 2:2:2 的三元复合物 (图 1)。FGF-FGFR 复合物晶体结构研究显示, FGF 连接两个 FGFR 时形成一个阳性电荷沟, 被认为是肝素结合部位, 这更好地证明了肝素对 FGF-2 和 FGFR 的结合起桥梁作用^[9]。同时, 这个复合物研究对肝素-生长因子相互作用的研究和思考起了很大的推

动作用,但是很可能并不是所有的生长因子与肝素的相互作用如 FGF 家族。在 FGF-FGFR-肝素相互作用的大量研究的基础上,人们产生更大兴趣在 GAGs 尤其是类肝素结构多糖(如苏拉明、海洋硫酸多糖等)与蛋白相互作用所产生的药理作用,包括在传染疾病、炎症、过敏性疾病和癌症等方面。

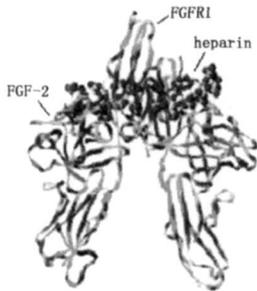


图 1 FGF-FGFR-肝素复合物结构(来源: Rbert J Linhardt 2003)
Fig 1 The structure of FGF-FGFR-heparin complex (From: Rbert J Linhardt 2003)

为了更进一步的探究 GAGs 在医疗方面的潜力,首先需要建立快速、有效的方法检测 GAG-受体蛋白的结合密度、结构信息等情况,从而弄清在组织中 GAG-受体蛋白复合物如何被调节,在体内 GAG 如何特异结合受体蛋白等问题,为更好的药物设计做理论基础。本文主要介绍了 GAG 与蛋白相互作用研究方法研究进展,并对各种方法进行分析和比较,以期为进一步研究 GAG-蛋白质相互作用提供技术参考。

1 糖胺聚糖(GAG)与蛋白质相互作用研究方法

1.1 亲和层析(AC)

亲和层析(Affinity chromatography)最早用来研究肝素与蛋白质的相互作用的方法。将肝素偶联到 Sepharose 或 Agarose 层析柱上,形成 Sepharose-肝素或 Agarose-肝素亲和层析柱。洗脱液中的蛋白质以不同亲和力与肝素结合,通过用不同浓度的盐溶液将不同的蛋白质洗脱下来。亲和层析是一种比较成熟用于肝素与蛋白质相互作用研究的技术,但存在层析柱难于保存、亲和条件难于选择且只能定性地检测结合的平均亲和常数等问题,故主要用于 GAG-受体蛋白分离纯化。

早在二十世纪 80 年代, cappelletti 等将糖胺聚糖偶联到 Agarose 柱上,用 ¹²⁵I 标记层粘蛋白洗脱,研究基底膜上层粘蛋白与糖胺聚糖的相互作用。近些年,还有将组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)偶联到 Sepharose 将不同聚合度的标记的肝素寡糖混合物梯度洗脱 TFPI-

Sepharose 亲和层析柱^[10],得到不同聚合度的肝素寡糖与 TFPI 的亲和常数。之后有人利用 Agarose-肝素亲和层析柱分离纯化肝素与组蛋白酶 X 形成的复合物,通过添加荧光底物,借助紫外圆二色光谱研究肝素结合对组蛋白酶 X 活性的影响,同时发现在 pH 的变化下,肝素与组蛋白酶 X 复合物的构象也随之变化^[11]。

1.2 聚丙烯酰胺电泳(PAGE)

PAGE 也是一个较早用于研究 GAG-蛋白质相互作用的方法。由于 GAG 和蛋白质都具有极性,这就奠定了使用 PAGE 对 GAG-蛋白质复合物进行分析的可能性。此外,通过结合不同的染色方式,如阿尔辛蓝、卡马斯亮蓝、银染等^[12],直接观测到 GAG 与蛋白质的结合情况。PAGE 是一种快速检测 GAG-蛋白质结合情况的简便方法,只能给出定性的信息,更多定量信息比如结合位点、结合密度等则不能得到。但由于 PAGE 具有相对高的灵敏度和分辨率、样品用量少和操作简单等特点,被广泛用于 GAG-蛋白质相互作用的研究。

肝素和细胞因子结合,保护蛋白质不受蛋白酶降解,可以将细胞因子局限在其分泌位点,有利于细胞因子在局部组织发挥其作用。Christian(2001)等利用 PAGE 技术很好的证明了硫酸寡糖对 FGF-2 的保护作用,通过将不同浓度的硫酸寡糖与一定浓度的 FGF-2 孵育,同时在反应体系中加入一定量新鲜配制的胰岛素酶(insulinase),研究不同聚合度的硫酸寡糖与 FGF-2 结合情况^[13]。研究发现,在一定的浓度范围内,DP7-9 的硫酸寡糖能与 FGF-2 结合,很好地抑制胰岛素酶对 FGF-2 的降解。

1.3 毛细管电泳(CE)

CE(capillary electrophoresis)是一类以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力,根据样品中各组分之间迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术,具有速度快、分离效率高、样品用量少等特点,是一种研究肝素-蛋白质相互作用的重要方法,也是肝素及其寡糖分离分析的强有力工具^[14]。利用 CE 研究相互作用的数据处理方法主要是利用线性回归方法的 Scatchard 方程(Eq 1-1),即:

$$\frac{r}{C_1} = Kr + nK \quad (1-1)$$

方程 1-1 中, r 是结合配体(或受体)浓度与总受体(或配体)浓度比, C₁ 是游离配体(或受体)浓度, K 是表观结合常数, n 是受体的结合位点数。

1.3.1 毛细管区带电泳 (CZE)

CZE (Capillary zone electrophoresis) 法是使不同比例受体和配体混合物预先达到平衡, 将平衡样品进行区带电泳。结合组分和游离组分淌度差异导致其迁移时间不同, 从而得以分离。这种方法一般适用于反应速率较慢, 有稳定结合产物存在的体系, 由游离组分的峰高或峰面积, 利用 Scatchard 方程求得结合常数 K 和结合位点数 n_b 。

最初, Heegaard (1992) 利用 CZE 研究了肝素与一些合成肽的相互作用, 证明了 CZE 在研究复杂酸性多糖参与的相互作用的可行性, 并求得了它们相互作用的解离常数^[15]。在此研究中, 肽的浓度保持不变, 随着肝素浓度的增加, 肽的峰高降低、峰面积减小, 说明肽和肝素形成了稳定的络合物。10年后, 有人在最初的 CZE 方法基础上, 通过还原氨化制得肝素-牛血清白蛋白 (Hep-BSA) 缀合物, 研究了该缀合物与 bFGF 的相互作用^[16]。该方法其可取之处在于 Hep-BSA 在紫外区有吸收, 由此可检测到吸收很弱的肝素信号, 进而研究肝素的纯度, 以及从肝素混合物中筛选蛋白质结合组分。随着人们对结构-功能之间关系的认识, 肝素的来源和结构对 GAG-蛋白质相互作用的影响通过利用 CZE 方法进行了研究, 在接近生理条件下利用 CZE 研究了粒细胞集落刺激因子 (G-CSF) 和各种修饰肝素的相互作用。结果表明, 肝素来源影响其与 G-CSF 的相互作用, 肝素中 N-硫酸基团对 G-CSF-肝素相互作用的贡献很小, 而 2,3-O-SO₃⁻ 在此相互作用中起重要作用。Aye L (2006) 同时也对 G-CSF 和 λ 卡拉胶的结合情况进行了研究 (见图 1)。研究表明 G-CSF 和 λ 卡拉胶形成一个强的结合体系, 而且该峰随着 λ 卡拉胶浓度的增加而升高, 说明类肝素海洋硫酸多糖与 G-CSF 同样有很强的亲和作用^[17,18]。

1.3.2 亲和毛细管电泳 (ACE)

ACE (affinity capillary electrophoresis) 是被广泛用于 GAG-蛋白质相互作用研究的技术。在这种方法中, 受体组分的电泳淌度随运行缓冲液中配体组分浓度变化而变化, 从而实现对结合参数的测定。ACE 一般适用于中等强度结合的快速解离平衡体系, 结合常数在 mM-M 之间。采用 ACE 法研究相互作用只能求得结合常数, 不能求得结合计量比, 且必须有内标对电泳淌度进行校正。但是, 在不知道被检测一方样品浓度, 只知道加在缓冲液中另一方样品的浓度时, 就可以求得该反应体系的结合常数。

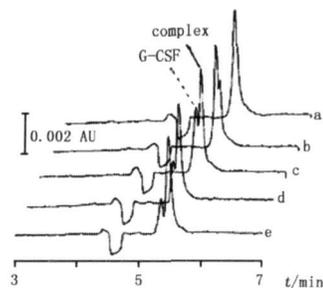


图 2 4.39 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ G-CSF 与不同浓度 λ 卡拉胶相互作用 CZE 电泳图 (来源: Aye L, 2006)

Fig 2 Electropherograms of 4.39 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ G-CSF mixed with various concentrations of λ carrageenan by CZE (From: Aye L, 2006)

a 0.0025 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ b 0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ c 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
d 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

这在研究一些无法知道浓度的样品 (例如从体液等提取的实际样品) 时, 显得尤为重要。用亲和毛细管电泳技术确定准确的亲和常数, 必须遵循以下的条件^[19]: (1) 放射性标记糖或蛋白质必须不影响结合; (2) Agarose 凝胶的物理特性必须不影响糖与蛋白质的结合; (3) 结合时间和解离时间必须小于电泳时间。

在采用 ACE 法研究肝素-蛋白质相互作用中, 一般都是将肝素用 ³⁵S 标记, 由于肝素带负电荷, 如果采用正向分离模式, 则蛋白质与肝素结合后负电荷增加, 从而电泳速度增大, 导致迁移速度减小, 出峰时间延后; 如果采用反向分离模式, 则蛋白质主要靠电泳速度, 所以与肝素有相互作用的蛋白质出峰时间会提前。同时, 也很容易和其他技术结合研究相互作用, 比如 Heegaard (1995) 等结合 ACE、HPLC 和 MS 技术, 研究了淀粉样蛋白的肝素结合位点序列。蛋白由酶水解为肽片段, 肽段经亲和色谱和 ACE 分离, 得到与肝素结合的肽段, 经质谱鉴定为一新的肝素结合序列^[20]。之后还利用 ACE 研究了乳铁蛋白与肝素的作用^[21], 对比了人奶中和人粒细胞中乳铁蛋白与肝素的结合能力。

1.3.3 前沿分析连续毛细管电泳 (FACCE)

FACCE (frontal analysis continuous capillary electrophoresis) 通过测定游离组分平台峰的高度进行定量, 从而求得结合常数和结合计量比。FACCE 将受体和配体的混合物连续进样, 这使游离受体浓度在混合物区域不会降低, 从而使络合物处于稳定平衡中。这种方法适用于快速解离平衡体系。Hattori 等 (2001) 用 FACCE 研究牛血清白蛋白 (BSA) 与肝素的相互作用 (分子量 13,500~15,000)^[22]。在 FACCE 谱图中出现两个平台峰, 第一个代表游离

BSA, 第二个代表游离 BSA 和络合物。在缓冲液离子强度 (I) 不变、混合物中肝素浓度不变时, 增大 BSA 浓度, 则两个平台峰都成比例增高, 说明 BSA 与肝素间发生了相互作用。在此基础上, 他利用 FACCE 研究了两种蛋白质 (BSA 和 R- 乳球蛋白) 与肝素等的相互作用, 发现结合常数的大小依赖这些聚合物链的灵活性, 而与线性电荷密度无关^[23]。

1.4 凝胶迁移或电泳迁移率 (GM SA /EM SA)

凝胶迁移或电泳迁移率 (gel/electrophoretic mobility shift assay GM SA /EM SA) 是一种最初用于研究 DNA - 蛋白质相互作用最为灵敏的方法, 可用于定性和定量分析, 由于其具有高重复性且检测信号呈线性关系等特点, 现被进一步用于 RNA - 蛋白质和 GAG - 蛋白质相互作用的研究。对于 GAG - 蛋白质相互作用的研究仅仅是刚刚起步, 方法还有待进一步的完善。

利用 EM SA 方法研究在心血管系统中脂蛋白与 GAG 相互作用, 将纯化的脂蛋白和³⁵S 位素标记的 GAG 一同保温, 在非变性的聚丙烯凝胶电泳上, 分离复合物和非结合的 GAG, 发现 HS 能够特异结合 β - 超低密度脂蛋白 (β - VLDL) 和 β - VLDL+ 载脂蛋白 E (apoE), 但是与低密度脂蛋白 (LDL) 并没有结合。肝素和硫酸软骨素能结合所有脂蛋白 (LDL, β - VLDL 和 β - VLDL + apoE), 但显示出不同的亲和力^[24]。Jonghoon (2006) 等对前期的 EM SA 进行了改进, 用化学发光 (Chemiluminescence CL) 代替同位素标记, 提高了样品的安全性和稳定性, 并通过转化生长因子 - β 1 (TGF - β 1) 与肝素结合 (如图 3), 证实了运用 CL - EM SA 定量研究肝素 - 蛋白质相互作用的可行性^[25]。

1.5 表面等离子共振分析技术 (SPR)

表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 分析技术是上个世纪 90 年代由 Biacore AB 公司首先开发发展起来的一种以生物传感芯片 (bio-sensor chip) 为核心的生物传感分析检测技术。SPR 是一种物理光学现象, 基于其原理将一种具有特异识别属性的分子 (配体) 固定在传感芯片表面金属膜上, 含分析物的样品 (受体) 以恒定的速度通过传感芯片, 与该配体之间发生相互作用, 引起金属膜表面溶液的光学参数 (如折射率) 发生变化, SPR 光学信号也随之改变。与传统的相互作用分析技术相比较, SPR 生物传感器具有很显著的优越性, 如不需对分子进行标记, 能实时检测生物分子结合反应的全过程^[26] (如图 4), 操作简单、灵敏度高、响应迅速

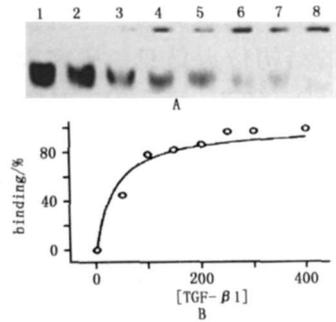


图 3 CL - EM SA 方法研究生物素化肝素与 TGF - β 1 相互作用 (来源: Jonghoon K, 2006)

Fig 3 CL - EMSA of biotinylated heparin and TGF - β 1 interaction (From: Jonghoon K, 2006)

A. 蛋白浓度分别为 0 nM (泳道 1), 50 nmol \cdot L⁻¹ (2), 100 nmol \cdot L⁻¹ (3), 150 nmol \cdot L⁻¹ (4), 200 nmol \cdot L⁻¹ (5), 250 nmol \cdot L⁻¹ (6), 300 nmol \cdot L⁻¹ (7) 和 400 nmol \cdot L⁻¹ (8) [protein concentrations were as follows 0 mol \cdot L⁻¹ (lane 1), 50 nmol \cdot L⁻¹ (lane 2), 100 nmol \cdot L⁻¹ (lane 3), 150 nmol \cdot L⁻¹ (lane 4), 200 nmol \cdot L⁻¹ (lane 5), 250 nmol \cdot L⁻¹ (lane 6), 300 nmol \cdot L⁻¹ (lane 7), and 400 nmol \cdot L⁻¹ (lane 8)] B. 随着 TGF - β 1 浓度逐渐增高, 肝素与 TGF - β 1 结合率变化 (degree of binding in percentage was plotted against TGF - β 1 concentration)

等, 其发展非常迅速, 已经成为一种成熟的检测生物分子间相互作用的方法。

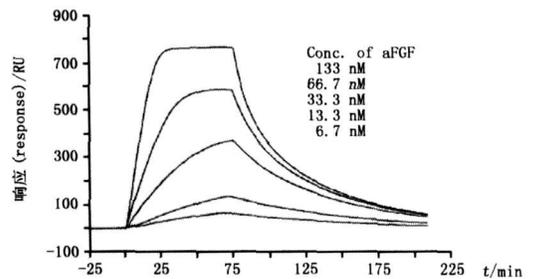


图 4 SPR 实时检测肝素和 α FGF 相互作用 (来源: Fuming Zhang 2002)

Fig 4 SPR sensograms of α FGF and heparin interaction (From: Fuming Zhang 2002)

在研究抗生素蛋白与肝素和其他的硫酸多糖特异结合及 GAG 聚合度对结合的影响时, 通过比较肝素及其他硫酸多糖对肝素 - 蛋白质结合的竞争作用, 利用 SPR 生物传感芯片技术的实时性, 发现肝素和 HS 与抗生素蛋白的亲合作用要高于硫酸皮肤素与抗生素蛋白之间的亲和作用, 而 4 - 硫酸软骨素和 6 - 硫酸软骨素则不能与抗生素蛋白结合。且 DP6 以下的肝素寡糖检测不到与抗生素蛋白结合的信号, 而 DP8 - 12 的肝素寡糖能很好的与抗生素蛋白结合^[27]。之后, Eva Munoz 等 (2006) 以 SPR 技术研究 GAG - 抗凝血酶 II 相互作用为基础, 通过用肝

素酶特异的处理多糖,探究参与与抗凝血酶 II 结合的硫酸多糖的结构位点信息。研究表明, 2-O-SO₃⁻, 6-O-SO₃⁻ 和 3-O-SO₃⁻ 对硫酸多糖与抗凝血酶 II 结合均有贡献^[28]。这一研究奠定了 SPR 技术可用于 GAG-蛋白质相互作用中结构和活性关系研究的基础。但是,由于传感芯片单一、生物材料不易结合于芯片和非特异结合等问题,应用受到一定的限制。

1.6 质谱分析 (MS)

最初的质谱分析仅仅局限于分子量小且稳定的样品,然而,由于电喷雾离子化源 (ESI) 的问世,实现了大分子量样品和非共价复合物的研究。电喷雾离子化技术的突出特点是:可以生成高度带电的离子而不发生碎裂,从而在检测过程中保持非共价复合物的完整性,可将质荷比降低到各种不同类型的质量分析器都能检测的程度,通过检测带电状态可计算离子的真实分子量。ESI-MS 具有其他研究方法不能比拟的优点,快速、灵敏且能直接地得到复合物的显著化学计量数。另外,ESI 可以很方便地与其他分离技术联接,如液相色谱 (LC-ESI-MS)、毛细管电泳 (CE-ESI-TOF-MS) 等,可方便地纯化样品用于质谱分析。

MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) 也有报道用于非共价相互作用的研究,Maciej 等 (1996) 通过用 5 种结构不同的半抗原分别以 3 个不同的摩尔比孵育 BSA, 得到 15 种不同水平上的半抗原-BSA 复合物,用于研究 ESI-MS、MALDI-MS 和 SDS-PAGE 方法对研究非共价复合物相互作用的优点与局限性^[29]。研究表明,与其他 2 种相比 LC-ESI-MS (如图 5) 是分析 BSA 复合物最好的方法,LC-ESI-MS 检测到一个 BSA 能够共价结合 25 半抗原。而且表明这种方法能够检测到分析物结合和纯化的全过程,且不管是大分子量还是小分子量的分析物都会出现单个的信号。MALDI-MS 对极性和非极性物质之间的灵敏度相对比较差,且更多提供定性上信息,但是并不能区分细微的变化。

近年来,MS 被大量与 CE、HPLC 等分离技术相结合更好地用于非共价复合物相互作用的研究。Gerald 等 (2003) 利用 CE-ESI-TOF-MS (capillary electrophoresis-electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry) 研究肌血球素-亚铁红素非共价复合物^[30]。通过模拟体内环境变化,探究其对肌血球素-亚铁红素非共价复合物稳定性的影响。研究发现,CE-ESI-TOF-MS 是一种检测非

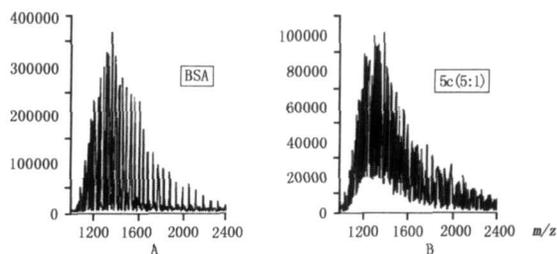


图 5 LC-ESI-MS 方法研究非共价复合物相互作用 (来源: Adamczyk M, 1996)

Fig 5 Research on interaction of non-covalent complex by LC-ESI-MS (From: Adamczyk M, 1996)

A. BSA 的 ESI 质谱图 (ESI mass spectra of BSA) B. BSA-5c(5:1) 半抗原结合图谱 [ESI mass spectrum of conjugate hapten(5c)(5:1)]

共价复合物相互作用的一种可行的方法,而且发现鞘液中的 pH 值的微小的变动都会影响肌血球素复合物的稳定性。软离子方法 (ESI 和 MALDI) 已经被成功的用于中性多糖和蛋白质或脂质相互作用的研究,而对于硫酸多糖-蛋白质的研究 (如肝素-蛋白质等) 还仅仅是刚刚开始^[31]。

1.7 其他方法

X-射线衍射结晶技术^[32]和核磁共振 (NMR)^[33]技术也用于研究 GAG-蛋白质的相互作用。这些技术是在分子水平上对 GAG-蛋白质相互作用进行结构及构象分析。艾杜糖醛酸残基构象的柔性可能参与 HS-GAG 与蛋白质的相互作用。到目前为止,已经得到肝素与 FGF、抗凝血酶 III (AT-III)、口蹄疫病毒 (FMDV) 蛋白、Annexin V 等共结晶结构,其中肝素-FMDV 复合物共晶体结构为一个五聚物结构,这样的 12 个五聚物结构组成二十面体病毒外壳。肝素结合位点由三个主要的外壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3 交联形成 (如图 6)。研究显示,蛋白碱性氨基酸残基与肝素糖链的硫酸基、羟基之间存在特异性的盐桥,形成螺旋对称的 HS-GAG 糖链结构。

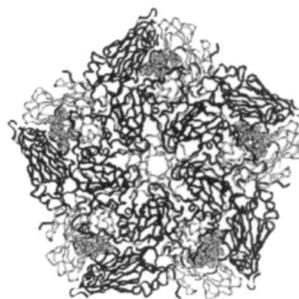


图 6 肝素-FMDV 复合物共晶体结构 (来源: Mulloy B 2001)

Fig 6 The crystal structure of heparin-FMDV complex (From: Mulloy B 2001)

还有,免疫化学方法^[34]、高灵敏度等温滴定量热法^[35]、浊度滴定^[22]等用于 GAG-蛋白质相互作用的研究。

2 小结

进一步在分子水平上弄清 GAG-蛋白质相互作用机理,对高特异性设计药物起着重要的作用。另外,HS-蛋白质的研究对弄清正常的生理发育和病态生理机制,比如发生生物学、癌症、瘀伤、传染疾

病、炎症和派生神经突等都有很大的帮助。但是由于 GAG 结构的多样性和复杂性等原因,尽管有很多可用于相互作用的研究的技术,但是很少真正的用于 GAG-蛋白质相互作用进行研究,致使其研究发展缓慢。本文对近年来用于 GAG-蛋白质相互作用研究的方法做了详细的介绍和对比(见表 2),为进一步研究 GAG-蛋白质相互作用作参考。

表 2 研究 GAG-蛋白质相互作用的部分方法
Tab 2 Partly methodology of GAG-protein interaction

研究方法 (research method)	提供信息 (provide information)	适用范围 (application scope)	优点 (advantage)	缺点 (disadvantage)
PAGE	结合情况 (combined or not)	初级检测 (initial detection)	操作简单 (easy operation)	只获得简单表观结合信息 (only got the apparent combination information)
AC	亲和常数 (affinity constant)	高特异性 (high specificity)	技术稳定 (technical stability)	层析柱保存困难 (difficult to preserve chromatography)
CZE	结合常数和位点数 (binding constant and sites)	反应速率慢 (slow reaction rate)		
ACE	结合常数 (binding constant)	快速解离平衡体系 (fast dissociation equilibrium system)	研究未知浓度样品 (study on the unknown concentration of sample)	
FACCE	结合常数和位点数 (binding constant and sites)	快速解离平衡体系 (fast dissociation equilibrium system)		
EMSA	结合率 (associative property)		灵敏度高、高重复性,检测信号呈线性关系 (high sensitivity, reproducibility, the detection signal was a linear)	技术不稳定 (technical instability)
SPR	结合率 (associative property)		不需分子标记、响应迅速 (without molecular marker, and fast response)	传感芯片单一、非特异结合 (sensor chip type was single and non-specific binding)
MS	化学计量数 (stoichiometric number)	高灵敏度、分辨率、直观性 (high sensitivity, resolution and intuitionism)	技术不稳定 (technical instability)	
NMR/X-射线衍射结晶技术 (nuclear magnetic resonance/X-ray diffraction)	三维空间结构 (three-dimensional structure)		直观结合信息、确定结合位点 (combine visual information and determine the binding site)	操作复杂、仪器昂贵 (complex operation and expensive equipment)

目前大部分的实验还只是处于摸索阶段,真正可以用于实际样品测定的方法和体系并不多,故远远不能满足人们对其结构和功能认识的迫切要求,而且由于复合物结构的复杂性,用一种方法研究其相互作用很难得到全面、准确的信息,需要几种研究方法的配合使用,所以 CE-MS、CE-NMR、HPLC-CE、HPLC-CE-MS 等联用技术将是未来的发展方向,也是重要的研究课题。而且,大部分实验方法还仅仅是检测其结合情况和亲和密度等浅层的现象,对其活性机理更多地还停留在推测的基础上,这样也就需要更多地在分子水平上研究结构-功能的关

系。总之,尽管 GAG-蛋白质研究面临的挑战与困难重重,但其发展前景广阔,因此吸引了越来越多的科研工作者的参与,而且随着各种检测技术的进步(如生物芯片技术等),也必将为 GAG-蛋白质相互作用研究的发展带来更多的契机。

参考文献

- Imberty A, Lortat-Jacob H, Perez S. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res* 2007; 342: 430
- Tumbull J, Powell A, Guimond S. Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 75
- Tumova S, Woods A, Couduan J, B. Heparan sulfate proteoglycans

- on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 32: 269
- 4 Mulloy B, Linhardt JR. Order out of complexity— protein structures that interact with heparin *Curr Opin Struct Biol*, 2001, 11: 623
 - 5 Stringer S E, Gallagher J T. Heparan Sulphate *Int J Biochem Cell Biol*, 1997, 29(5): 709
 - 6 Presta M, Leali D. Heparin derivatives as angiogenesis inhibitors *Curr Pharm Des*, 2003, 9: 553
 - 7 Capila I, Linhardt R J. Heparin— Protein Interactions *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41: 390
 - 8 Combea D R, Kett W C. Heparan sulfate— protein interactions: therapeutic potential through structure— function insights *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 410
 - 9 Linhardt R J. Heparin structure and activity. *Am Chem Soc*, 2003, 46(13): 2551
 - 10 Xu X Y, Takano R, NagaŸ, *et al*. Effect of heparin chain length on the interaction with tissue factor pathway inhibitor (TFPI). *Int J Biol Macromol*, 2002, 30: 151
 - 11 Nascimben F D, Rizzi C A, Nanteses IL, *et al*. Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans *Arch Biochem Biophys*, 2005, 436: 323
 - 12 Volpi N, Maccari F. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides *J Chromatogr B*, 2006, 834: 1
 - 13 Katsbauer C W, Paper D H, Franz G. Sulfated β -(1-4)-galactose— oligosaccharides and their effect on angiogenesis *Carbohydr Res*, 2001, 330: 427
 - 14 Miliotopoulou M, Lamari F, Karamanos N K. Capillary electrophoresis a tool for studying interactions of glycans/proteoglycans with growth factors *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 32: 823
 - 15 Heegaard N H H, Robey F A. Use of Capillary Zone Electrophoresis to Evaluate the Binding of Anionic Carbohydrates to Synthetic Peptide Derived from Human Serum Amyloid— P Component *Anal Chem*, 1992, 64(21): 2479
 - 16 Dimitrellos V, Lamari F N, Miliotopoulou M, *et al*. Capillary electrophoresis and enzyme solid phase assay for examining the purity of a synthetic heparin proteoglycan— like conjugate and identifying binding to basic fibroblast growth factor *Biomol Chromatogr*, 2003, 17(1): 42
 - 17 Liang A Y, Du Y G, Wang K Y, *et al*. Capillary Zone Electrophoresis Investigation of Interactions between Granulocyte— colony Stimulating Factor and Dextran Sulfate/Carrageenan Oligosaccharide *Chin Chem Lett*, 2005, 16(5): 647
 - 18 Liang A Y, Zhou X M, Wang Q Y, *et al*. Structural features in carrageenan that interact with a heparin— binding hematopoietic growth factor and modulate its biological activity. *J Chromatogr B*, 2006, 843: 114
 - 19 Lee M K, Lander A D. Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: Development of a sensitive electrophoretic approach. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88: 2768
 - 20 Heegaard N H, Mortensen H D, Roepstorff P. Preparative capillary electrophoresis and mass spectrometry for the identification of a putative heparin— binding site in any b1b1 P component *J Capillary Electrophor Microchip Technol*, 1995, 2(5): 219
 - 21 Heegaard N H, Brinnes J. Comparison of heparin— binding to lactoferrin from human milk and from human granulocytes by means of affinity capillary electrophoresis *Electrophoresis*, 1996, 17(12): 1916
 - 22 Hattori T, Kinura K, Seyrek E, *et al*. Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis *Anal Sci*, 2001, 295(2): 158
 - 23 Hattori T, Kinura K, Seyrek E, *et al*. The use of frontal analysis continuous capillary electrophoresis to compare protein binding by natural and synthetic polyelectrolyte *Anal Sci*, 2001, 17: 93
 - 24 Olsson U, Ostergren— Lunden G, Moses J G. Glycosaminoglycan— lipoprotein interaction *Glycoconjugate J*, 2001, 18: 789
 - 25 Kang J, Lee M S, Gorenstein D G. Chemiluminescence— based electrophoretic mobility shift assay of heparin— protein interactions *Anal Biochem*, 2006, 346: 156
 - 26 Zhang F, Fath M, Marks R, *et al*. A Highly Stable Covalent Conjugated Heparin Biochip for Heparin— Protein Interaction Studies *Anal Biochem*, 2002, 304: 271
 - 27 Kett W C, Osmond R I W, Moe L, *et al*. Avidin is a heparin— binding protein: Affinity specificity and structural analysis *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1620: 225
 - 28 Munoz E, Xu D, Avci F, *et al*. Enzymatic synthesis of heparin related polysaccharides on sensor chips: Rapid screening of heparin— protein interactions *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339: 597
 - 29 Adamczyk M, Gebler J C, Mattingly P G. Characterization of Protein— Hapten Conjugates 2. Electro-spray Mass Spectrometry of Bovine Serum Albumin— Hapten Conjugates *Bioconjugate Chem*, 1996, 7: 475
 - 30 Brenner— Weiss G, Kirschhofer F, Kuhl B, *et al*. Analysis of non-covalent protein complexes by capillary electrophoresis time— of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2003, 1009: 147
 - 31 Thanawiroon C, Rice K G, Toida T, *et al*. LC/MS Sequencing Approach for Highly Sulfated Heparin— Derived Oligosaccharides *J Biol Chem*, 2003, 278: 569
 - 32 Raman R, Venkataraman G, Emst S, *et al*. Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins *PNAS*, 2003, 100(5): 2357
 - 33 Tabour C, Mallet J, Bono F, *et al*. Oligosaccharides Corresponding to the Regular Sequence of Heparin: Chemical Synthesis and Interaction with FGF— 2. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7: 2003
 - 34 Chan M, Malynn E. Utility of consecutive repeat HIF ELISA testing for heparin— induced thrombocytopenia *Am J Hematol*, 2008, 83(3): 212
 - 35 Ziegler A, Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV— 1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters *Biophys J*, 2004, 86(1): 254

(本文于 2009年 8月 28日修改回)