蛋白激酶C调控脊椎生物红细胞膜骨架蛋白间 亲和力的进化演变

唐福州 王 翔* 熊延连 邓雪茹 李遥金 王若峰 (重庆大学生物工程学院,生物流变科学与技术教育部重点实验室,重庆400044)

摘要 为了探讨脊椎生物红细胞膜骨架蛋白间亲和力大小变化引起红细胞变形能力变化的进化演变。四种脊椎生物(人、鸡、蛙、鱼)的红细胞在自然状态下和经蛋白激酶C(PKC)激活剂佛波酯(PMA)孵育2h后,利用原子力显微镜(AFM)检测各红细胞的黏弹性以及采用间接免疫荧光标记法观察各红细胞磷酸丝氨酸的荧光变化;利用生物信息学软件分析和比对各红细胞膜蛋白4.1和血影蛋白的蛋白序列。结果表明,人、鸡、蛙、鱼红细胞经PMA孵育2h后杨氏模量显著增加,增加量分别为(0.388±0.035) kPa、(0.219±0.022) kPa、(0.191±0.036) kPa和(0.141±0.007) kPa。鸡、蛙、鱼红细胞膜蛋白4.1都存在与人所对应的312号可磷酸化丝氨酸位点且人、鸡、蛙、鱼红细胞经PMA孵育2h后的磷酸丝氨酸荧光强度明显高于各自自然状态下的磷酸丝氨酸荧光强度。意味着鸡、蛙、鱼红细胞膜蛋白和人红细胞膜蛋白一样都能被蛋白激酶C(PKC)磷酸化,且各生物经PMA孵育2h后杨氏模量增加量呈现出与生物进化过程一致的趋势。这种趋势在为红细胞变形能力的获得在进化角度以及分子机制上提供了基础依据。

关键词 生物进化;红细胞;磷酸化

Evolution of the Vertebrate Erythrocytes Membrane Skeleton Protein Affinity is Caused by Protein Kinase C

Tang Fuzhou, Wang Xiang^{*}, Xiong Yanlian, Deng Xueru, Li Yaojin, Wang Ruofeng (*Chongqing University College of Bioengineering, Key Laboratory of Biorheology and Technology, Chongqing 400044, China*)

Abstract To study the relationship between the vertebrate erythrocytes membrane skeleton protein affinity and deformability of RBCs. Atomic force microscope (AFM) was applied to detect the viscoelasticity and fluorescence intensity was observed by indirect immunofluorescence labeling of these vertebrate erythrocytes (human, chicken, frog, fish) that were treated with Phorbol-12-myrisrate-13-acetate (PMA), a PKC activator, for 0 minutes, 2 hours, respectively. Bioinformatics softwares were used to compare the RBCs protein 4.1 and α -spectrin sequence. The measured Young's modulus of erythrocytes (human, chicken, frog, fish) increased significantly after PMA treatment 2 hours and were (0.388±0.035) kPa, (0.219±0.022) kPa, (0.191±0.036) kPa and (0.141±0.007) kPa respectively. Fluorescence intensity increased significantly after PMA treatment 2 hours because chicken, frog, fish erythrocytes protein 4.1 have the phosphorylation serine sites corresponding to the number 312 of human erythro-

收稿日期: 2012-12-21 接受日期: 2013-01-10

国家自然科学基金面上项目数学物理科学部项目(批准号: 11072275、10572159)和国家自然科学基金(批准号: 31271229)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 023-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

Received: December 21, 2012 Accepted: January 10, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.11072275, 10572159) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271229)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-23-65112877, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

网络出版时间: 2013-03-28 17:18 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1718.004.html

cytes protein 4.1 and PKC phosphorylate chicken, frog, fish erythrocytes. Young's modulus increased is consistent with biological evolution because of PKC. This trend provides a basis interpretation for the acquiring deformability of RBCs from biological evolution and molecular mechanism.

Key words biological evolution; erythrocyte; phosphorylation

红细胞在生物进化的过程中无论是形态还是 变形能力上都有极大的改变,包括有核红细胞生物 到无核红细胞生物的进化以及哺乳类红细胞吐核成 熟过程[1]。在脊椎生物中哺乳类红细胞大都具备双 凹碟盘形态无细胞核; 鱼类红细胞有较大的核, 呈扁 圆形;鸟类红细胞同样有细胞核,通常为卵圆形。这 种在进化过程中红细胞变形能力以及形态结构的变 化代表生物对于环境适应性其调节的演化[1-3]。冷血 动物微循环欠发达,对红细胞的变形性要求比较小, 温血动物微循环发达,因此对红细胞的变形性有高 要求。红细胞的生物力学性质与其生理生化功能有 着密不可分的联系,红细胞可变形性在生物进化中 可能作为某个标志。脊椎生物红细胞膜骨架蛋白间 亲和力维持着红细胞的形态和特定结构,在进化过 程中这种膜骨架蛋白间亲和力与红细胞形变能力的 不同有着某种特定的关系。

脊椎生物红细胞变形能力的获得主要来自红细 胞膜蛋白骨架,红细胞膜骨架蛋白主要包括血影蛋 白与带4.1蛋白、肌动蛋白一起构成红细胞质膜骨架 的超结构,以及带3蛋白与锚蛋白、收缩蛋白一起构 成的膜骨架结构间。这种膜骨架结构受到蛋白激酶 的调控,在人红细胞中存在蛋白激酶信使表达系统, 通过修饰细胞骨架蛋白以及受体的表达等方式在调 节红细胞的免疫功能和变形性方面起重要作用[5-6]。 蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)能使人红细胞带4.1 蛋白、内收蛋白、锚蛋白以及CD44分子发生磷酸化, 从而影响红细胞膜骨架蛋白间的结合,最终使红细 胞的结构和功能发生改变[6-8]。红细胞中的带4.1蛋白 被磷酸化后,减少了收缩蛋白与带4.1蛋白、肌动蛋白 的相互作用以及血型糖蛋白C(GPC)、带3蛋白和带4.1 蛋白的亲和力。这种由带4.1蛋白磷酸化而引起的红 细胞变形能力改变的大小为原细胞的30%左右[8-11]。

本文通过生物信息学分析4种脊椎生物(人、鸡、 蛙、鱼)红细胞膜蛋白4.1都存在可磷酸化位点, 经磷 酸丝氨酸抗体间接免疫荧光标记法检测4种脊椎生 物红细胞膜蛋白能够被蛋白激酶C活化而磷酸化。 利用原子力显微镜(AFM)检测了4种脊椎生物红细 胞膜在磷酸化前后各自杨氏模量。通过比较人、鸡、 蛙、鱼红细胞磷酸化前后杨氏模量差值来表征它们 通过磷酸化调控红细胞力学性质能力的差异。这种 差值同样用来表征收缩蛋白与带4.1蛋白、肌动蛋 白的相互作用亲和力的大小,这种红细胞膜蛋白间 结合程度亲和力的变化反映出在进化过程中红细胞 的可变形能力不同,这种差异为红细胞变形能力的 获得在进化角度提供基础依据^[12-14]。

1 材料与方法

1.1 试剂

蛋白激酶C激活剂佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)购自北京四正柏生物公司, 肝素、多聚-L-赖氨酸(Poly-L-Lysine, 分子量70 000~150 000) 均购自美国Sigma公司, AFM探针TR400PSA购自日本Olympus公司, 免源性磷酸化丝氨酸单克隆抗体、FITC标记的山羊抗兔抗体均购自加拿大Immune Chem Pharmaceuticals Inc(ICP)公司。

1.2 方法

1.2.1 红细胞制备 取健康成年人的血液5 mL,用 PBS洗涤4次然后3 000 r/min离心3 min,获取红细胞, 冷冻备用。取健康成年的鸡、蛙和鱼,在实验室常 温培养48 h。对家鸡进行肱静脉采血,对蛙和鱼进 行心脏取血,用500 U/mL肝素钠溶液(肝素钠效价 150 U/mg)与血液混合均匀,一次性注射器各取血约 5 mL。取出后,分别用PBS洗涤4次,然后3 000 r/min 离心3 min,获取红细胞,冷冻备用。

1.2.2 人、鸡、蛙、鱼红细胞蛋白激酶C的激活 实验分为两个组,即空白组和实验组。在空白组中, 取相同压积的人、鸡、蛙、鱼红细胞各1 mL分别加 入PBS 1 mL混匀用于原子力显微镜检测实验。在实验 组中,在空白组原有的基础上加入终浓度为20 ng/mL 的PMA分别孵育红细胞2 h^[5,7]。每个样本数量均为 10个。

1.2.3 原子力显微镜检测 多聚-L-赖氨酸培养皿 的制备:取直径3.5 cm的培养皿若干,用低浓度的盐 酸溶液和低浓度的氢氧化钠溶液各清洗3次,用酒精

清洗和蒸流水清洗至透明清澈。称取1 mg多聚-L-赖 氨酸于10 mL离心管中,稀释10倍。配成 0.1 mg/mL 多聚-L-赖氨酸溶液再过滤除菌。分别向直径3.5 cm 的培养皿中加入0.3 mL多聚-L-赖氨酸溶液,轻轻摇 动培养器皿使溶液覆盖均匀。静置5 min后,弃溶液, 用PBS溶液淋洗干净后,自然干燥,放置备用。

各取待测红细胞悬浮液0.1 mL加入到涂抹上多 聚-L-赖氨酸的3.5 cm培养皿,静置30 min,再用PBS 清洗去没有固定的红细胞。红细胞表面带负电荷通 过静电作用固定在带正电的多聚-L-赖氨酸包被的 培养皿底部。用原子力探针接触粘附在多聚-L-赖氨 酸的培养皿中的红细胞来获得经PMA处理前后的4 种生物红细胞的力谱曲线,探针在整个实验过程中 以1.0 μm/s速度匀速进行,探针所受力的大小范围在 0.1~0.5 nN之间。探针采用标准氮化硅悬臂,其弹性 系数为0.03 N/m。探针形状为金字塔形,弹性系数为 0.08 N/m,针尖侧面角为17.5度。整个实验过程都处 于恒温(25 °C)、安静、洁净的环境中进行。实验中 每个样本随机选取100个细胞,每个细胞实验10次。

1.2.4 红细胞膜蛋白磷酸化测定 实验组的红细胞在含有葡萄糖的磷酸盐缓冲液中加入终浓度为20 ng/mL的PMA孵育2 h, 对照组的红细胞加入同样的磷酸盐缓冲液孵育2 h。用冷PBS终止反应, PBS反复洗涤红细胞3次, 分别用2%的多聚甲醛(PFA)和0.5%的戊二醛溶液固定红细胞, 0.2% TritonX-100处理10 min增加红细胞的通透性。用5%的BSA封闭40 min。分别加入免源性抗磷酸化丝氨酸单克隆抗体, 4°C过夜孵育, 反复用PBS洗涤红细胞, 再分别加入FITC标记的山羊抗兔抗体, 室温孵育1 h。最后洗涤红细胞待涂片观察。

1.2.5 蛋白序列和序列比对软件 人、鸡、蛙、 鱼等红细胞膜蛋白带4.1以及CD44分子序列均来 自NCBI和Swiss-Prot数据库;序列分析软件主要为 MEGA4.0以及DNAman。人(human)、猕猴(*Macaca mulatta*)、牛(cow)、狗(dog)、小鼠(rat)、鸡(chick)、 负鼠(opossum)、变色龙(chameleon)、蛙(frog)、罗 菲鱼(*Tilapla*)、斑马鱼(zebrafish)的红细胞膜蛋白 带4.1的序列编号分别为: gi|182082|gb|AAA35797.1|、 gi|297282726|ref|XP_002802317.1|、gi|41386788|r ef]NP_776736.1|gi|50979218|ref]NP_001003362.1|、 gi|123296391|emb|CAM21326.1|、gi|269784808|ref]NP 001161476.1|、gi|334328401|ref]XP_001373484.2|、 gi|327275215|ref|XP_003222369.1|、gi|62857677|ref |NP_001017221.1|gi|348542201|ref|XP_003458574.1|、 gi|22252698|gb|AAM94025.1|。

1.2.6 统计学处理 采用SPSS11.5软件对所得数 据进行统计学分析,主要统计指标进行正态性检验, 正态分布的各个统计指标均以*x*±s表示。同物种比 较采用单因素方差分析,组间比较采用两个样本均 值的*t*检验。

2 结果

2.1 人、鸡、蛙、鱼红细胞磷酸化处理前后原子 力显微镜检测

原子力显微镜通过探针针尖与红细胞表面的 交互作用,使氮化硅探针悬臂发生偏折,此时用特 殊微小雷射光照射探针臂背面,用雷射光相位器来 记录雷射光被探针臂偏移的变化,根据这种变化可 以计算出红细胞膜的黏弹性^[13]。图1显示,人红细 胞(A)、经PMA处理2h后的人红细胞(B)的原子力 (AFM)的力-距离曲线。其中,针压入深度表示探 针从接触点开始压入细胞的深度,压入细胞的最深 处在离细胞0.6~1.2 μm之间。蓝色曲线为回针曲线 (Retract),用来表征细胞对探针的最大黏附力值,红色曲线 为进针加载曲线(Extend),用来表征细胞的弹性,而 绿色曲线则为进针曲线的拟合曲线。

探针在距离红细胞正上方2.0 μm以1.0 μm/s速 度匀速压入细胞,在经过接触点后探针受力发生了 变化。从图1A和1B可以看出探针在受到弹性作用 力相同的情况下,探针压入细胞深度明显不同(经 PMA处理2h后的人红细胞探针压入深度要小于人 细胞), 表明经PMA孵育后细胞的硬度变大, 通过绿 色曲线即进针曲线的拟合曲线来表示。图1A和1B 中回针曲线和进针加载曲线并不是完全重合,表明 在回针时受到了细胞对探针的黏性,当由进针曲线 变回针曲线时,体现出细胞对探针的弹性。当黏附 力的大小和弹力相等时,表现出探针受力为零。接 着黏附力大于弹力表现出回针的负值直到探针脱离 细胞。在此过程中会出现黏附力的最大值,即图标 中的最大黏附力,图1B最大黏附力明显小于图1A, 通过回针曲线和进针加载曲线之间的面积差表现出 来。是因为红细胞经PMA孵育后硬度增加,杨氏模 量变大,反之黏附力变小。



图1 人红细胞(A)、PMA处理(2 h)人红细胞(B)的AFM力-距离曲线 Fig.1 AFM force-distance curves for human RBCs(A) and human RBCs treaded by PMA(2 h)(B)

其他物种(鸡、蛙、鱼)红细胞磷酸化处理前后 原子力显微镜检测结果如图2所示,各物种回针曲线 和进针加载曲线在趋势上基本一致,拟合曲线所表 现出的杨氏模量值在经PMA处理前后不一样,而且 最大黏附力也各不相同,各物种间在PMA处理前后 的杨氏模量差值也是不一样的。

2.2 人、鸡、蛙、鱼红细胞磷酸化处理前后的杨氏模量

通过JPK Image Processing软件对AFM力-距离 曲线进行分析,在进针加载曲线0~200 pN之间进行 拟合曲线,由拟合曲线确定该细胞的杨氏模量。每 个细胞在中心位置附近进行测量10次,取10次的平 均值作为该细胞的杨氏模量值。对各细胞的杨氏 模量值进行统计,以每个区间长度为0.1 kPa统计该 区间所对应的细胞数即杨氏模量分布直方图。图 3A-3H分别描述了人红细胞磷酸前后、鸡红细胞磷 酸化前后、鱼红细胞磷酸化前后以及牛蛙红细胞磷 酸化前后的杨氏模量分布情况。

对各自的杨氏模量直方图进行高斯拟合,分别 得出各自的杨氏模量均值,误差为高斯峰的半峰宽。 经磷酸化处理前后的人、鸡、蛙和鱼红细胞杨氏 模量如表1所示。红细胞经过磷酸化处理后杨氏模 量值都显著增加,增加量分别为(0.388±0.035) kPa、 (0.219±0.022) kPa、(0.191±0.036) kPa和(0.141±0.007) kPa。这差值中人红细胞变化量最大,接着为鸡红细 胞,其次为蛙红细胞,变化量最小的为鱼红细胞。

为了证实红细胞经PMA处理后杨氏模量增加是 PKC活化的结果,在实验中加入终浓度为0.05 μmol/L 的PKC抑制剂Calphostin C处理红细胞40 min,再加 入20 ng/mL的PMA孵育细胞2 h,再经原子力显微镜 检测如表1所示。各物种的抑制剂组红细胞的杨氏 模量与对照组相差无异(P<0.01)。

2.3 人、鸡、蛙、鱼等红细胞膜蛋白序列生物信息学分析

蛋白4.1被限制性糜蛋白酶酶切出4个多肽片段 (30 kDa、16 kDa、10 kDa和22/24 kDa)。30 kDa多 肽为N末端区域连接到血型糖蛋白C(GPC)以及带3 蛋白上。10 kDa多肽参与spectrin-actin binding(SAB) 区域的构成。16 kDa多肽位于30 kDa多肽(也称 FERM区域)与10 kDa多肽区域之间。16 kDa多肽中





AFM force-distance curves for chicken RBCs (A), chicken RBCs treaded by PMA (2 h) (B), fish RBCs (C), fish RBCs treaded by PMA (2 h) (D), frog RBCs (E) and frog RBCs treaded by PMA (2 h) (F).

图2 红细胞的AFM力-距离曲线 Fig.2 AFM force-distance curves

表1 PKC激活剂PMA处理2 h组和PKC抑制剂Calphostin C处理40 min组及对照组人、鸡、蛙、鱼红细胞的杨氏模量(x±s) Table 1 Young's modulus of human, chicken, frog and fish RBCs comes from PMA treatment 2 hours group, Calphostin C treatment 40 minutes group, and without treatment group, respectively(x±s)

物种	分组	杨氏模量(kPa)	杨氏模量变化量(kPa)
Species	Group	Young's modulus(kPa)	Young's modulus variation(kPa)
Human	Control	0.607±0.138	
	PMA(2 h)	0.995±0.103	$0.388{\pm}0.035$
	Calphostin C(40 min)	0.605 ± 0.089	0.390±0.014
Chicken	Control	0.674 ± 0.077	
	PMA(2 h)	0.893±0.055	0.219±0.022
	Calphostin C(40 min)	0.675 ± 0.057	0.218 ± 0.002
Frog	Control	1.131±0.136	
	PMA(2 h)	1.322±0.113	0.191±0.036
	Calphostin C(40 min)	1.131±0.099	0.191 ± 0.004
Fish	Control	0.769±0.066	
	PMA(2 h)	0.910±0.073	0.141 ± 0.007
	Calphostin C(40 min)	0.770±0.045	0.140 ± 0.028



A、B、C、D、E、F、G、H分别表示人红细胞、PMA处理(2 h)的人红细胞、鸡红细胞、PMA处理(2 h)的鸡红细胞、鱼红细胞、PMA处理(2 h) 的鱼红细胞、蛙红细胞、PMA处理的蛙红细胞杨氏模量分布直方图。

Histograms of the Young's modulus determined for human RBCs (A), human RBCs treaded by PMA (2 h) (B), chicken RBCs (C), chicken RBCs treaded by PMA (2 h) (D), fish RBCs (E), fish RBCs treaded by PMA (2 h) (F), frog RBCs (G), and frog RBCs treaded by PMA (2 h) (H).

图3 红细胞杨氏模量分布直方图

Fig.3 Histograms of the Young's modulus of RBCs

的312号丝氨酸被PKC磷酸化后使FERM区域和SAB 区域的蛋白结构亲和力发生变化,使红细胞的黏弹 性以及变形性发生变化^[4,7]。

在NCBI和Swiss-Prot中查找出人(human)、猕猴(Macaca mulatta)、牛(cow)、狗(dog)、小鼠(rat)、鸡(chicken)、负鼠(opossum)、变色龙(chameleon)、 蛙(frog)、罗菲鱼(*Tilapla*)、斑马鱼(zebrafish)的红细 胞蛋白4.1序列。选取16 kDa多肽的280号位到320号 位氨基酸进行Blast序列分析,图4表明这些脊椎动物 在与人所对应的312号丝氨酸位点上都能找到该磷 酸化位点,而且在经蛋白可磷酸化软件预测分析后 同样得出该位点能被磷酸化。

2.4 人、鸡、蛙、鱼红细胞磷酸化处理前后的磷酸丝氨酸检测

未经PMA处理的人、鸡、蛙、鱼红细胞磷酸 丝氨酸荧光染色为对照组,实验组中各红细胞分别经 PMA孵育2h,结果如图5所示。B组的图片代表经磷 酸化处理2h后的红细胞,A组表示没有经过任何处理 的红细胞,从左到右分别为人、鸡、蛙、鱼的红细胞。 对照组和实验组的红细胞在荧光倒置显微镜下观察, 都可观察到周缘明亮中间较暗的绿色荧光信号。实 验组比对照组更亮,绿色荧光信号强,细胞轮廓明显。

天然的人、鸡、蛙、鱼红细胞存在着少量磷酸 化的丝氨酸, 经PMA孵育2 h后红细胞膜上更多的丝

	312	
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Human
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Macaca mulatta
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Cow
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Dog
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Rat
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	ALIDRPAP	Chicken
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	AMIDRPAP	Opossum
FIRLGSRFRFSGRTEYQATHG	SRLRRTS	Chameleon
FIRLGSRFRYSGKTEYQTTKS	KPRRSS	Frog
FLALGSKFRYSGRTQAQTRQA	SLIDRPAP	Tilapla
LLTLGSRFRYHGRKQSECVEA	SNITR-AP	Zebrafish

图4 红细胞膜蛋白4.1部份序列比对

Fig.4 Alignment of part the amino acid sequences of RBCs protein 4.1



红细胞磷酸丝氨酸荧光染色(A)和PMA处理(2 h)磷酸丝氨酸荧光染色(B),荧光图片从左到右分别为人、鸡、蛙、鱼的红细胞。标尺=10 µm。 Fluorescent micrographs of RBCs labeled with phospho-serine antibodies (A). Fluorescent micrographs of RBCs labeled with phospho-serine antibodies. The RBCs treaded by PMA (2 h) (B). The blood sample from lift to right is human, chicken, frog, fish respectively. Bars=10 µm.

图5 磷酸丝氨酸荧光染色



氨酸被磷酸化,因而荧光强度更强、染色效果更明显。这意味着人、鸡、蛙、鱼红细胞经PMA孵育后膜上的丝氨酸能够被PKC磷酸化,且各物种的不同各自磷酸化丝氨酸含量不同,经PMA孵育后各物种的丝氨酸被磷酸化的含量也不同。

在实验组中加入终浓度为0.05 μmol/L的PKC抑 制剂Calphostin C处理红细胞40 min,再加入20 ng/mL 的PMA孵育细胞2 h,再经荧光倒置显微镜检测得的 荧光图片和对照组的荧光图片基本一样。

3 讨论

脊椎动物红细胞具有独特的力学性质,这种力 学性质在维持高效率的新陈代谢,适应更加复杂多 变的外界和生理环境的过程中起到重要作用^[3]。脊 椎动物红细胞膜骨架蛋白上拥有众多潜在的磷酸 化位点,可受相应蛋白激酶的激活而影响骨架蛋白 间的连接导致红细胞力学性质的改变^[6,16-17]。不同 动物红细胞磷酸化前后杨氏模量变化的差异表明 细胞骨架蛋白通过磷酸化作用调控力学性质能力 的不同^[4-8]。

4种天然状态下脊椎生物的红细胞在经原子 力显微镜检测的杨氏模量即弹性模量,在生物领 域中用来表征细胞表面性质的一个物理量,仅由 材料本身的物理性质所决定,杨氏模量值的大小 标志细胞的刚性程度,杨氏模量越大,越不容易发 生形变。本实验中得出,杨氏模量为蛙>鱼>鸡>人, 意味着随着生物的进化,各自表现出的弹性模量并 不完全体现出生物由水生向陆生,由低等向高等的

变化趋势,这是由他们都要适应各自的生活环境和 条件所决定的^[1-3]。不同PMA浓度以及不同孵育时 间对红细胞变形能力有不同的影响, PMA浓度增加 量以及孵育时间在没有达到红细胞全部磷酸化饱和 前,红细胞变形能力随着PMA浓度的增加,时间的延 长,会相应增加。红细胞在PMA终浓度为20 ng/mL 时能够全部磷酸化。在足量PMA浓度下内收蛋白在 PMA孵育5 min时能全部磷酸化,其它膜蛋白会随着 PMA孵育时间的延长,磷酸化的程度也会加深。红 细胞在PMA孵育到30 min这个过程中膜蛋白磷酸化 程度会显著增加,在30 min后增加缓慢,在2 h后会达 到一个稳定值[4,7]。在本文中4种生物的红细胞经终浓 度为20 ng/mL的PMA处理2 h后,用冷PBS终止反应。 经原子力显微镜检测,这几种生物各自杨氏模量都有 不同程度的提高,实验测得经磷酸化处理后的杨氏 模量表示为蛙>人>鱼>鸡, 而杨氏模量增加程度上人 >鸡>蛙>鱼,这种因磷酸化调控引起红细胞杨氏模量 变化,反映出脊椎生物红细胞膜骨架间亲和力的不同 与生物过化过程中的趋势是一致的。

红细胞中的带4.1蛋白、内收蛋白、CD44分子, 能够被红细胞蛋白激酶C活化进而发生蛋白磷酸化 作用,内收蛋白对红细胞的变形能力的影响在2分钟 后可以忽略,蛋白4.1被磷酸化后对红细胞变形能力 的影响为30%左右^[18-19],通过生物信息学分析可以得 知在NCBI中不管任何已知的脊椎动物在与人所对 应的312号丝氨酸位点上都能找到该磷酸化位点,在 经磷酸化软件预测同样得出该位点能被磷酸化。本 文所取的4种脊椎生物的红细胞,在对照组和实验组 (PMA孵育2 h)的磷酸丝氨酸荧光染色检测,表明鸡、 蛙、鱼、人的红细胞都能够被蛋白激酶C激活而磷 酸化。磷酸化前后这4种脊椎生物红细胞杨氏模量的 差值表现为各自膜蛋白间的结合程度,反应的结合程 度为鱼>蛙>鸡>人,这与生物从水生到陆生从低等到 高等的进化过程是一致的。这意味着红细胞膜蛋白 间的亲和力强度与物种进化过程存在一定的关系。 这种亲和力随着生物的进化体现出红细胞的膜骨架 间亲和力越来越弱,可变形能力、对环境的适应能力、 对血液流动性以及血液微循环等越来越强。

红细胞中由带4.1蛋白、血影蛋白以及肌动蛋白 的某些多肽片段构成的区域结构(SAB), 在调控红细 胞形变以及功能上起着重要的作用,蛋白4.1中10kDa 多肽中312号位丝氨酸的磷酸化会影响SAB区域膜蛋 白间的亲和力^[20]。血影蛋白α、β链在SAB区域的功 能结构上有着重要的影响,主要包括肌动蛋白、带4.1 蛋白以及血影蛋白α链的EF区域, 血影蛋白β链在生 物进化过种处于十分保守的状态,蛋白的结构和功能 区都具有很强的相似性[20-21]。图6所示为红细胞膜血 影蛋白α链的系统进化树以及同源矩阵的构建。哺乳 类和非哺乳类为二个大的分枝,不同的物种的分枝长 度所代表的进化时间都体现各自的进化特性。图中 的同源矩阵用来表征红细胞血影蛋白α链的相似度。 基于红细胞血影蛋白α链的相似度表征不同生物间红 细胞膜蛋白的变化,基于经磷酸化处理2h后和天然 状态下红细胞杨氏模量的变化量表征红细胞的可变 形能力,构建如图7所示的生物进化相似度与杨氏模 量变化量的进化关系模拟曲线。由此猜想随着物种 的进化在脊椎动物中红细胞越易于变形,而且这种形 变的能力大小可能是多项式曲线关系。这为研究在 进化过程中红细胞变形能力的获得提供了力学上以 及分子机制上的方法和依据。



0.05

图6 红细胞血影蛋白α链的系统进化树和同源矩阵 Fig.6 Phylogenetic tree and homology matrix of α-spectrin cDNA sequences



图中4个点从左到右分别表示鱼、蛙、鸡、人红细胞杨氏模量的变化量(kPa)以及对应的血影蛋白α的相似度。 These points represent the change of young's modulus and sequence identities of the α-spectrin. These points from lift to right are fish, frog, chicken and human respectively.

图7 红细胞变形能力摸拟进化曲线



参考文献 (References)

- King N. The unicellular ancestry of animal development. Dev Cell 2004; 7(3): 313-25.
- 2 Baines AJ. Evolution of the spectrin-based membrane skeleton. Transfus Clin Biol 2010; 17(3): 95-103.
- 3 Snyder GK, Brandon A. Sheafor. Red blood cells: Centerpiece in the evolution of the vertebrate circulatory system. Amer Zool 1999; 39: 189-98.
- 4 Chang SH, Low PS. Regulation of the glycophorin C-protein 4.1 membrane-to-skeleton bridge and evaluation of its contribution to erythrocyte membrane stability. J Biol Chem 2001; 276(25): 22223-30.
- 5 郝一文,程大也,陈进涛,陈海伟.红细胞蛋白激酶C活性变化 对锚蛋白的影响.中国医科大学学报(Hao Yiwen, Cheng Daye, Chen Jintao, Chen Haiwei. Efects of protein kinase C on ankyrin in erythrocytes. Journal of China Medical University) 2008; 37(4): 485-88.
- 6 Sumie M, Yuichi T, Kaoru N, Narla M. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by β-spectiin phosphorylation and dephosphorylation. J Biol Chem 1995; 270(10): 5659-65.
- 7 Sumie M, Yuichi T, Narla M. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. J Biol Chem 2005; 280(9): 7581-7.
- 8 Antonella P, Emanuela F, Franco C, Franca M, Giuliana G, Rosa V, et al. Analysis of changes in tyrosine and serine phosphorylation of red cell membrane proteins induced by P. falciparum growth. J Proteomics 2010; 10(6): 3469-79.
- 9 Ricky W, Dennis D, Clare K. Evolutionarily conserved alternative pre-mRNA splicing regulates structure and function of the spectrin-actin binding domain of erythroid Protein 4.1. Blood 1995; 86(11): 4315-22.
- 10 Meihua L, Zhen D, Zhanqua Y. Protein kinase C in proliferation and infiltration of eosinophils in nasal polyp. Chinese Medical Journal 2003; 116(10): 1553-6.
- 11 Antonella P, Lucia DF, Emanuela F, Rosa V, Franco T. Current knowledge about the functional roles of phosphorylative changes of membrane proteins in normal and diseased red cells. J Proteomics 2010; 73(5): 445-55.

- 12 Switart AH. Mikrut JM. Ketterson JB. Macdonald RC. Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton. J Microscopy 2001; 204(3): 212-25.
- 13 Bushell GR, Cahill C, Clarke FM, Gibson CT, Myhra S. Imaging and force-distance analysis of human fibroblasts *in vitro* by atomic force microscopy. Cytometry 1999; 36(3): 254-64.
- 14 Girasole M, Pompeo G, Cricenti A, Congiu-Castellano A, Andreola F, Serafinoc A, *et al.* Roughness of the plasma membrane as an independent morphological parameter to study RBCs: A quantitative atomic force microscopy investigation. Biochim Biophys Acta 2007; 1768(5): 1268-76.
- 15 Sato K, Yoshida Y, Hirahara T, Ohba T. On-line measurement of intracellular ATP of Saccharomyces cerevisiae and pyruvate during sake mashing. Biosci Bioeng 2000; 90(3): 294-301.
- 16 Stewart JM, Blakely JA, Karpowicz PA, Kalanxhi E, Thatcher BJ, Martin BM. Unusually weak oxygen binding, physical properties, partial sequence, autoxidation rate and a potential phosphorylation site of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) myoglobin. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol 2004; 137(3): 401-12.
- 17 Sourav G, Frank CD, John VC. CK2 constitutively associates with and phosphorylates chicken erythroid ankyrin and regulates its ability to bind to spectrin. J Cell Sci 2002; 115(Pt 21): 4107-15.
- 18 Anthony JB. A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. BMC Genomics 2006; 7(85): 1471-8.
- 19 Marcela S, Xiuli A, Xinhua G, Walter B. Gratzer. Mammalian α1-spectrin is a neofunctionalized polypeptide adapted to small highly deformable erythrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(3): 643-8.
- 20 Crista MB, Serdar U, Anthony AK, Ronald SR. Characterization of engineered actin binding proteins that control filament assembly and structure. PLoS One 2010; 5(11): e13960.
- 21 Liao EC, Paw BH, Peters LL, Zapata A, Pratt SJ, Do CP, *et al.* Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. Development 2000; 127(23): 5123-32.