

专论与综述

高等植物细胞壁中的伸展蛋白

何才平

(武汉大学生物系)

人们很早就发现植物细胞壁中存在着蛋白质,一般认为它们属纯功能性蛋白,如酶类。但60年代初期, Lampert 和 Dougall 两个实验室几乎同时发现细胞壁中有一种富含羟脯氨酸的糖蛋白(hydroxyproline-rich glycoproteins),简称 HRGP^[1,2]。其基本结构是寡糖外壳包裹着蛋白质核心。后来知道这类糖蛋白在植物细胞壁中普遍存在,是细胞初生壁的重要结构组分^[3]。因为它们与细胞壁的伸展作用明显相关,所以命名为伸展蛋白(extensin)^[4]。一种衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)其细胞壁完全由 HRGP 构成,对它有非常详细的研究^[5],它与高等植物细胞壁中的 HRGP 并不完全相同。本文仅介绍关于后者的一些研究进展。

核心蛋白的一级结构

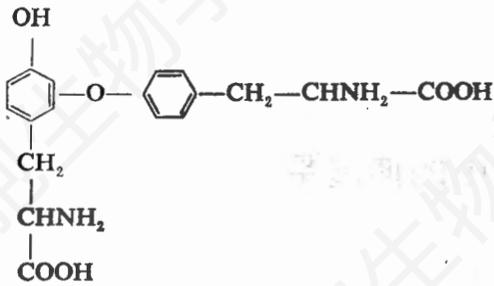
由于细胞壁的不可溶性,对伸展蛋白结构的研究在相当一个时期内没有突破。直到1985年, Chen 等^[6]才通过测定胡萝卜伸展蛋白基因的碱基序列,推算出了其核心蛋白的全部氨基酸序列。它由306个氨基酸组成,分子量约为34000。氨基酸的成分较为特别,不含 Glu、Asn、Asp 和 Trp 或 Cys,其中含25个 Ser-(Pro)₄ 重复序列,其他序列如 Try-Lys-Tyr-Lys, Thr-Pro-Val 也有多次重复。从正在生长的细胞壁中可分离出3种少量游离的伸展蛋白前体,分别称为 P₁、P₂、P₃,发现它们都是具有重复序列的结构^[6,9]。P₁ 主要是 Ser-(Hyp)₄-Thr-Hyp-Val-Tyr-Lys 和 Ser-(Hyp)₄-Val-Lys-Pro-Tyr-His-Pro-Thr-Hyp-Val-

Tyr-Lys 两种多肽的重复,两者的摩尔比为2:1; P₂ 主要是 Ser-(Hyp)₄-Val-Tyr-Lys-Tyr-Lys 的重复,偶尔出现 Ile 代替 Val 的情况; P₃ 的重复单位是 Ser-(Hyp)₄-Ser-Hyp-Lys, Ser-(Hyp)₄-Ser-Hyp-Ser-(Hyp)₄-(Tyr)₃-Lys 和 Ser-(Hyp)₄-Lys。总之,三种前体分子的每一重复单位均含有 Ser-(Hyp)₄,它们一般被变异性较大的数个氨基酸所分隔,这些氨基酸主要是: Tyr、Lys、Ser、Val、His、Pro、Thr 和 Hyp。

等二酪氨酸双酚酯桥

伸展蛋白前体之间的联接方式及它们与细胞壁多糖分子之间的关系是整个70年代争论的焦点。用无水氟化氢能破坏细胞壁中所有糖苷键,但可保留肽键。由它处理细胞壁后,得到一个仅有 HRGP 的核心蛋白所构成的“完整的”细胞壁^[7]。这说明伸展蛋白的不可溶性并非它与细胞壁纤维素、果胶多糖的共价联接所致,而在于它本身内部的联接作用;反之,用不破坏糖苷键的亚氯酸盐处理细胞壁,伸展蛋白可被降解^[8]。由于亚氯酸盐能裂解酚醛多聚体,一般被用来去木质化,因而推测伸展蛋白中存在类似木质素中的芳香交联键,并提出酪氨酸可能与这种交联有关。不久, Fry 发现等二酪氨酸(isodityrosine, 简称 IDT)是伸展蛋白的结构成分^[9],它由两个酪氨酸经双酚酯桥连结而成,结构式为:

本文承蒙杨弘远教授审阅,赵静为同志协助绘图,在此一并致谢。



Epstein 等发现不仅多肽链之间可形成 IDT, 同一多肽分子内也可形成 IDT, 如 P₂ 的重复多肽 Ser-(Hyp)₄-Val-Tyr-Lys-Tyr-Lys 由于形成分子内 IDT 而变异为 Ser-(Hyp)₄-Val-1/2 IDT-Lys-1/2 IDT-Lys。Stafstrom 等^[10]在电镜下看到了多肽分子中的 IDT 的结, 发现整个伸展蛋白都可形成 IDT, 但分子间的 IDT 比分子内的 IDT 多得多, 并证实结的分布与 Tyr-Lys-Tyr 的分布相关。作者认为分子内的 IDT 可增加分子的刚性, 防止旋转, 同时可调控分子间 IDT 的频度。

寡糖侧链与 pp II 螺旋

van Holst^[11]在分析胡萝卜根细胞伸展蛋白时发现: 碳水化合物占伸展蛋白的 65%, 其主要成分是阿拉伯糖和半乳糖, 分别占 62% 和 3%。Lampert 从番茄细胞壁伸展蛋白中分离出了丝氨酸-O-半乳糖复合物, 这一结构在胡萝卜和豌豆中得到进一步证实^[12], 说明半乳糖苷是结合在蛋白骨架的丝氨酸上。阿拉伯糖则以寡聚形式与羟脯氨酸相结合^[11]。此外, 免疫学分辩发现: 用糖苷化的伸展蛋白作抗原制备的抗体与脱糖苷化的蛋白骨架没有交叉反应, 说明寡糖完全包裹着蛋白质核心^[13]。

用圆二色性研究伸展蛋白的次级结构时, 既没有发现 α -螺旋, 也没有发现 β -片层构造, 但存在聚脯氨酸 II (polyproline II, 简称 pp II) 螺旋构象^[11]。pp II 是一种左手螺旋结构, 3 个基团构成完整的一圈, 每个基团上升 3.1 Å。这一构象曾在茄科植物的凝集素分子中发现^[14]。具 pp II 螺旋的伸展蛋白在电镜下是一个长约 800 Å 的细长棒状分子, 糖苷化和脱糖

苷化的伸展蛋白相比较, 发现其超微结构的差异与它们的分子量之间的差异极不成比例^[15], 前者是清晰的棒状, 斯托克斯半径约为 89 Å, 并可见到相互交联的纽带, 即 IDT; 后者则难以辨认, 可能是球状结构, 斯托克斯半径仅为 11 Å。由于脱糖苷化的伸展蛋白在含羟脯氨酸的部位也可自组形成 pp II 螺旋^[8,11], 解聚所有糖苷键的氟化氢不能解聚 pp II 螺旋, 因而 Stafstrom 等^[15]推测 pp II 螺旋仅分布在 Ser-(Hyp)₄ 这一功能域内, 分隔这一功能域的氨基酸则不参与 pp II 螺旋, 但它们的羟基可与阿拉伯寡糖的羟基形成氢键^[8]来约束这一功能域, 加固 pp II 螺旋构象, 同时使整个分子成为伸展状态, 这种稳定作用与氨基酸的顺序无关。从而 Stafstrom 等提出了阿拉伯糖与核心蛋白骨架发生作用的结构模型^[15], 如下图:

糖苷化的伸展蛋白



脱糖苷化的伸展蛋白



图 与羟脯氨酸相连的阿拉伯糖在维持伸展蛋白处于伸长构象中的作用(据 Stafstrom, 1986)

a. 糖苷化的伸展蛋白: 100% pp II 螺旋, 斯托克斯半径为 89 Å 棒状结构, 长度为 84 nm

b. 脱糖苷化的伸展蛋白: 50% pp II 螺旋, 斯托克斯半径为 11 Å, 模糊的球状结构

这一模型能解释有关 pp II 螺旋的数据和超微结构的结果^[11], 其中阿拉伯糖的寡聚数为 4 个时比 3 个的稳定范围更大。有趣的是, 在植物界, 伸展蛋白中阿拉伯糖数目的增加的确是一个进化趋势^[16]。结合在丝氨酸上的半乳糖对伸展蛋白也可能具有稳定作用。此外, 寡糖侧链还可能是伸展蛋白与细胞壁其他多糖发生作用的中介, 或保护核心蛋白以免受蛋白酶的水解。值得注意的是, Kieliszewski 最近

发现单子叶植物玉米细胞壁中的伸展蛋白缺少半乳糖,但含25%的苏氨酸,称为THRGP^[17]。看来,不同类别的植物其伸展蛋白的成分是有差异的。

合成、分泌与组装

迄今为止,所发现的伸展蛋白的3种前体P₁、P₂、P₃都是在细胞质中合成的,脯氨酸的羟化作用在内质网的内腔和由它释放出来的过渡泡中进行;糖苷化作用在高尔基体上进行^[18]。在法国菜豆中还发现一种能催化伸展蛋白阿拉伯糖苷转移反应的酶^[19]。高尔基体及其小泡分泌伸展蛋白的前体,并将其运输到壁中。甘苏生等证明细胞质中存在一个不断合成和分泌HRGP的库,并认为它们在入壁之前可能有少量异联化发生^[20]。

植物生活细胞壁的限制孔径为40—45 Å^[21,22]。Heckman等^[23,22]认为伸展蛋白的前体是由众多局部为棒状结构的单位相互连接形成的匍匐状的长链,它们可直接插入细胞壁。它们参与细胞壁的方式与纤维素的外叠加式(apposition)不同,而与半纤维素和果胶一样,能越过细胞已形成的纤维素网络,属于内填充式(intussusception)。高尔基体的分泌趋动力与这种碱性前体和果胶羧基间的吸引力可能构成它们插入壁孔的动力。同时果胶物质以甲基酯的形式向细胞壁分泌时,会形成一个跨壁的静电梯度^[24],这样就为伸展蛋白的前体定向移动提供了条件。进入细胞壁的前体由壁内预先存在的过氧化物酶催化形成IDT双酚酯桥,即发生异联化作用^[25]。当二硫苏糖醇(dithiothreitol)抑制过氧化物酶活性时,也抑制了伸展蛋白前体在壁内的组装^[26],进一步说明IDT是伸展蛋白前体分子间连接的关键所在。此外,HRGP进入壁后,剩余的Pro基团仍可发生少量羟化作用^[27]。

超微细胞化学研究发现,伸展蛋白在整个细胞壁中分布均匀,但中胶层中没有分布^[18]。这与果胶的主要成分RG-I在位置上互补

的^[28]。同时说明伸展蛋白不能越过中胶层,只能由它们所在壁所包围的细胞质合成,即具有细胞特异性。偶尔能观察到几个生活细胞包围着一个死细胞,而后者的细胞壁中没有伸展蛋白的分布,这不仅使伸展蛋白不能越过中胶层的推论得到证实,而且表明它们向细胞壁内填是在细胞发育晚期发生的^[18]。

Lampert等人推测伸展蛋白可能在细胞壁中形成一个开放且独立的网络结构,纤维素微纤丝的网络可与之相互渗透,形成两个网络的机械耦合^[25]。但甘苏生等认为,进入壁中的HRGP先以离子键与壁结合,然后向以共价键与壁结合的方式转化^[20]。

生理功能及其调控

伸展蛋白的不可溶性、与纤维素类多糖的紧密连接、核心蛋白的重复序列及具有PP II螺旋的棒状结构等等特征使其构成细胞壁结构组织的观点得到绝大多数研究者的认可。进一步的实验证明:因伸展蛋白的合成受阻,烟草原生质体由于不能再生正常的细胞壁而不能分裂^[29]。当细胞壁足够伸长,或由初生壁向次生壁转换时,壁的刚性增加,伸展蛋白的量也增加^[30]。Klis^[12]在研究因缺少光照而徒长的豌豆白化苗时,发现其生长速率与细胞壁中伸展蛋白的量正好负相关,这说明伸展蛋白能增加细胞壁的刚性,抑制细胞壁的伸长。Fry^[31]认为前体分子间的IDT对伸展蛋白实现这一功能起关键作用,通过它们而形成有规则的多孔结构,有利于伸展蛋白与纤维素微纤丝的相互渗透。IDT出现的频率可以影响伸展蛋白的次级结构,最终决定细胞壁的流程。过氧化物酶的含量可以决定IDT的频率^[31],反过来它又受激素(如赤霉素)的调节^[32]。伸展蛋白的糖苷化对于抑制壁的伸长也很重要,一种Fe²⁺螯合剂 α , α' -双吡啶(α , α' -dipyridyl)能抑制羟脯氨酸的糖苷化,用它处理豌豆上胚轴和根尖后,细胞虽然仍能分泌伸展蛋白的前体,并照样共价结合到细胞壁中^[33],但细胞壁伸长

失控,说明伸展蛋白因糖苷化受阻而失去了它应有的抑制作用。Basile^[34]发现 α , α' -双吡啶能促进浮萍不定腹叶的形成,他认为这一变异来源于细胞壁伸展蛋白正常抑制功能的丧失。脯氨酸类似物3,4-脱氢脯氨酸是脯氨酸羟化及随后糖苷化的特异性抑制剂,它同样能抑制伸展蛋白的正常功能^[35]。

伸展蛋白的另一功能是防御外源微生物的侵害。真菌诱导剂能诱导伸展蛋白增加^[19],染病植物细胞壁中伸展蛋白大量集聚,后来发现这是一种与受伤有关的普遍现象^[37]。在受伤部位伸展蛋白的mRNA拷贝增加,并与乙烯的作用有关^[38]。L-脯氨酸是脯氨酸羟化作用的抑制剂,它可使本来对某一病原菌有抵抗力的植株失去抵抗力。最近,在细胞内发现一种伸展蛋白基因表达的抑制剂,它能与伸展蛋白的基因特异结合,而伤害作用可以明显的影响这种结合^[39]。

此外,大量伸展蛋白的沉积可能是细胞壁本质化的先兆^[37]。还有人推测它们与形态发生有关^[34,38],认为它们可以通过对植物体中各个细胞群体发育潜能的差异性抑制,而达到形态上的分化。但这些推测还有待于更深入的研究来证实。

摘 要

高等植物的细胞壁中有一种富含羟脯氨酸的糖蛋白,称为伸展蛋白。其核心蛋白质具有高度重复序列的结构;次级结构为pp II螺旋;它们在细胞质中合成,由高尔基体分泌到细胞壁内组装。作为细胞壁的结构成份,它们的主要功能是调控壁的伸展,并可能在防御反应和形态发生的调节方面起作用。

参 考 文 献

- [1] Lampport, D. T. A., Northcote, D. H., 1960, *Nature* (Lond.), 188:665—666.
 [2] Dougall, D. A., Shimbayashi, K., 1960, *Pl. Physiol.*, 35:396—404.
 [3] Roberts, K., et al., 1985, *J. Cell Sci. Supple* 2:105—127.

- [4] Lampport, D. T. A., 1965, *Adv. Bot. Res.* 2:151—218.
 [5] Chen, J., Varner, J. E., 1985, *EMBO. J.*, 4:2145—2152.
 [6] Smith, J. J., et al., 1986, *Phytochemistry*, 25:1021—1030.
 [7] Mort, A. J., Lampport, D. T. A., 1977, *Analyt. Biochem.*, 82:289—309.
 [8] Lampport, D. T. A., 1980, In Preiss, J. ed., *The Biochemistry of Plants*, Vol. 3. New York, Academic Press. pp 501—541.
 [9] Fry, S. C., 1983, *Meth. Enzym.*, 107:388—397.
 [10] Stafstrom, J. P., Staehelin, L. A., 1986, *Pl. Physiol.* 81:234—241.
 [11] van Holst, G. J., et al., 1984, *Pl. Physiol.* 74:247—251.
 [12] Klis, F. M., 1976, *Pl. Physiol.* 57:224—226.
 [13] Stafstrom, J. P., Staehelin, L. A., 1988, *Planta*, 174:321—332.
 [14] Desai, N. N., et al., 1981, *Biochem. J.* 197:345—353.
 [15] Stafstrom, J. P., Staehelin, L. A., 1986, *Pl. Physiol.*, 81:242—246.
 [16] Lampport, D. T. A., Miller, D. H., 1971, *Pl. Physiol.* 48:454—456.
 [17] Kieliszewski, M., 1987, *Pl. Physiol.* 85:823—827.
 [18] Sauer, A., Robinson, D. G., 1985, *Planta*. 164:287—294.
 [19] Bolwell, G. P., 1984, *Biochem. J.* 222:427—435.
 [20] 甘苏生等, 1986, *植物生理学报*, 12:272—280.
 [21] Carpita, N., 1979, *Science*, 205:1144—1147.
 [22] Gogarten, J. P., 1988, *Planta*, 174:333—339.
 [23] Heckman, J. W., et al., 1988, *Pl. Physiol.* 86:848—856.
 [24] De Loof, A., 1986, *Int. Rev. Cytol.*, 104:251—352.
 [25] Lampport, D. T. A., 1986, In Young, R. A., Rowell, R. M., ed., *Cellulose: Structure, Modification and Hydrolysis*. John Wiley & Sons, New York, pp 77—90.
 [26] Cooper, J. B., Varner, J. E., 1983, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:161—167.
 [27] 黄海等, 1983, *植物生理学报*, 9:85—92.
 [28] Moore, P. J., et al., 1988, *Planta*, 174:433—445.

- [29] Cooper, J. B., 1984, In Dugger, W. M., ed., *Structure & Biosynthesis of Plant Cell Walls*. Rockville, M. D., American Soc. of Plant Physiologists. pp 75—88.
- [30] van Holst, G. J., et al., 1980, *Planta*, 149: 209—212.
- [31] Fry, S. C., 1979, *Planta*, 146:3343—3351.
- [32] Fry, S. C., Street, H. E., 1980, *Pl. Physiol.*, 65:472—477.
- [33] Smith, M. A., 1981, *Pl. Physiol.*, 68: 956—963.
- [34] Basile, D. V., 1980, *Bull. Torrey Bot. Club*, 107:325—338.
- [35] Cooper, J. B., Varner, J. E., 1983, *Pl. Physiol.*, 73:324—328.
- [36] Joldsworth, M. J., Laties, G. G., 1989, *Planta*, 179:17—23.
- [37] Hammerschmidt, R., et al., 1984, *Physiol. Plant.*, 24:43—47.
- [38] Showalter, A. M., et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 82:6551—6555.

内皮细胞的免疫学功能

*吴金莹

**盛民立

(上海医科大学放射医学研究所)

应用体外细胞培养技术和免疫组织化学方法,可在组织细胞原位或离体活细胞表面检测抗原的种类、分布及含量变化,进行细胞表型及生物学功能研究,探讨某些疾病的发生机理。近十几年来,关于内皮细胞表面抗原的研究已有不少报道, Jaffe, E. A. 首先研究证明,体外培养的内皮细胞表面存在针对供体组织的红细胞 ABO 血型抗原^[1]和人类白细胞抗原(HLA 抗原)^[2],以后又发现内皮细胞表面能表达某些内皮细胞特异性抗原,例 E-抗原, EAG-1 抗原等^[3]。近年来,应用抗 leu 系列单克隆抗体检测到内皮细胞表面 T 淋巴细胞分化抗原的表达^[4]。说明,内皮细胞表面多种抗原成分的表达与机体免疫应答和免疫调节有密切联系。

一、内皮细胞表面 HLA 抗原、ABO 血型抗原与移植免疫的关系

移植免疫的中心问题是排斥反应,其结果导致移植器官的早期衰竭,移植失败。有关移植排斥的病理生理机制研究提示血管内皮细胞的作用^[5]。Dvorak 等研究证明^[6],皮肤移植中以广泛内皮细胞损伤为特征的初次排异反应者,早期内皮细胞膜破裂,细胞核缩小,细

胞坏死脱落,同时血管周围出现淋巴细胞和单核细胞浸润为主的损伤性改变,由于内皮细胞损伤引起血管腔狭窄,关闭及血液灌流减少,最终移植物被排斥。因此有人提出^[2],在器官移植排斥反应中,宿主免疫反应攻击的主要靶组织可能是供体移植器官的血管内皮细胞。Högman, C. F 和 Paul, L. C. 等用混合淋巴细胞培养和免疫荧光技术研究血管内皮细胞表面与移植免疫有关的人类主要同种异型抗原表达,结果在多种移植器官,例如肾、肝、脾、心、肺、皮肤等组织切片中,都证明血管内皮细胞表面存在针对供体组织的 ABO 抗原和 HLA 抗原^[7,8],研究结果支持这一假设,并进一步认为^[2],在供体器官几乎不含过路淋巴细胞情况下,引起受体免疫反应早期和主要的“异己”刺激物是移植器官的血管内皮细胞,它可刺激受体淋巴细胞致敏,导致移植器官的排斥。

50 年代末,组织培养技术的应用进入了一个繁盛阶段,为在离体活细胞上进一步研究细胞表面抗原的分布和表达开辟了前景。Jaffe, E. A. 首次成功地在体外长期传代培养

* 研究生, ** 导师