DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.05.013

膜脂质微环境改变对 CD71蛋白分子结构的影响

糜漫天* 朱锡华 马 芳** (第三军医大学基础部免疫学教研室) 重庆,630038

提 要 采用亲和层析法从人胎盘滋养层细胞和 Molt-4细胞分离到高纯度 CD71蛋白,SDS-PAGE显示,在还原条件下有一明显 90× 10^3 u蛋白带。将此蛋白分子重组到由不同磷脂、胆固醇(Ch)构成的人工脂双层膜上,圆二色谱分析表明,随 DMPC/Ch和 DOPC/Ch脂膜上胆固醇增加,CD71蛋白 β片层结构减少,而 α螺旋及无规卷曲结构增多,色氨酸荧光光谱扫描也提示,随人工脂膜上脂质组成的变化,CD71蛋白空间构象也相应改变。

关键词 膜脂质;CD71蛋白;蛋白结构
中图法分类号 Q54

细胞膜是细胞内外环境的屏障,众多研究显示膜脂质组成及膜生物物理特性与细胞许多功能变化有关,它可控制不同的细胞膜特性、调节物质转运、配体与受体的结合、跨膜信号传递、细胞分化与细胞识别。膜脂质结构改变诱导的细胞功能的变化常常与它们影响了膜蛋白的结构与功能有关。近来发现与淋巴细胞增殖活性化有关的膜蛋白或通过疏水性的跨膜螺旋区与脂双层膜相连(膜内在蛋白,如 EGF-R、PDGF-R、PTK、FMS蛋白、CD7等),或经糖磷酸肌醇聚糖将蛋白锚在脂双层膜上(膜外周蛋白,如 CD14、SgP-60、CD55、CD59等),另外还有一些膜蛋白通过与脂肪酸共价相连而附着在胞浆膜上(如 G蛋白、CD9),它们多位点可逆的乙酰化可影响其与膜脂质的相互作用。推测膜脂结构(或膜脂微环境)的变化将干扰多种膜蛋白的功能[1,2]。

CD71蛋白分子是淋巴细胞最重要的膜分化抗原之一,为一膜内在糖蛋白,本研究用其配体制备亲和层析柱,从人胎盘及 Molt-4细胞分离纯化 CD71蛋白,进而研究不同的人工脂双层膜对该蛋白结构的影响,目的在于更好认识膜脂质组成改变后膜蛋白功能及细胞增殖能力变化的可能机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

1.1.1 试剂 Transferrin(Tf)、DOPG、DOPC、Benzamidine、CHAPS(Sigma公司产品),N,N′-methylen-bis-acrylamine(Fluka公司产品),Sepharose CL-4B、CNBr-activated Sepharose 4B、Sephadex G50(Pharmacia公司产品),66Ig10单抗由 Tauber博士惠赠,Ber-T9单抗(DAKO公司产品),WuT9单抗、HRP兔抗鼠酶标抗体(武汉生物制品研究所产品),低分子和中分子量蛋白标准(华美生物公司产品)。

1.1.2 仪器 J-500C型圆二色谱仪(日本)、FH8802-2型紫外检测仪,超速离心机(Beckman公司)、垂直电泳槽、转移电泳槽及电泳仪。

1.2 实验方法

1.2.1 CD71分子的分离、纯化及鉴定

1.2.1.1 亲和层析柱的制备 CNBr-Sepharose 4B干粉 2 g,经预处理后与 40 mg铁饱和 Tf按常规方法偶合,封闭,然后装柱,依次用 0.1 mol/L NaHCO pH 9.6缓冲液,0.1 mol/L硼酸-硼酸钠-1 mol/L NaCl pH 8.5缓冲液,0.1 mol/L醋酸-醋酸钠-1 mol/L NaCl pH 4.5缓冲液洗涤,去除游离蛋白质,最后用 pH 7.5 KPi/NaCl缓冲液(10 mmol/L KPO_4, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl)平衡。

1.2.1.2 从胎盘组织中分离、纯化 CD71 参照 Turkewitz等[3]的方法,用 CD71分子配体制备的亲和层析柱从新鲜胎盘组织中分离、纯化 CD71。主要步骤为,胎盘组织匀浆制备、去污剂的溶解、铁的螯合,硫酸胺沉淀和亲和层析,CD71分子用两个柱床体积的 0.5 mol/L NaSCN, 50 mmol/L Hepes pH 7.5, 10 mmol/L CHAPS缓慢洗脱,洗脱液立即过预先平衡好的 Sephadex G-50柱子,以去除过多盐。

1.2.1.3 从 Molt-4T淋巴细胞株上纯化 CD71 参照文献[3,4]的方法。Molt-4淋巴细胞的大量培养细胞:收集约(1× 10^9)~(1× 10^{10})个细胞,细胞用 PBS液(pH 7.0)洗涤后,悬于裂解缓冲液中(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L PMSF, 2 mmol/L Benzamidine, and 1% NP-40)充分振摇,4℃ 15 min后 9000× g离心 60 min,以下 Fe的螯合、硫酸胺沉淀、亲和层析等步骤同上。

1.2.1.4 CD71分子的鉴定 SDS-PAGE:参照 Laemmli[5]的方法进行,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 4.65%,上述纯化的 CD71分子在还原及非还原条件下电泳(20 mA,电泳 5 h),考马斯亮蓝染色显示蛋白带。标准为中分子量标准蛋白,

* 预防医学系营养卫生学教研室 重庆,630038
** 清华大学生物科学与技术系膜工程国家重点实验室 北京,100000

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分子量 4.3× 10^3 u

免疫印迹: 上述 SDS-PAGE胶块经电转移至 NC膜上 (70 mA,电泳约 16 h),氨基黑染色证明转移成功后,进行间接酶染色,即 NC膜漂洗后,用封闭液 37℃封阻 60 min,加 1∶50稀释的 CD71单抗 (Ber-T9, DAKO公司)或 1∶200稀释的小鼠抗人 CD71抗体 66Ig10(腹水),同时设仅加稀释液或正常小鼠腹水的对照,37℃反应 60 min,洗膜,再加 1∶100稀释的兔抗鼠 HRP标记 IgG 37℃作应 60 min,最后加底物 4-氯-1-茶酚显色 10 min,立即用水反复冲洗,以终止反应。

1.2.2 CD17分子与脂双层膜的重组及结构分析

1.2.2.1 脂蛋白体制备 参照 Gautam等人[6]方法,所用合成磷脂为 DMPG, DOPC和 DOPG,选择逆相蒸发法制备胆固醇-磷脂 (Ch/PL, molar ratios)分别为 0, 0.25和 0.5的脂蛋白体 (DOPG占 PL10%,以促进 CD71嵌入人工脂膜内)。具体方法为加一定量溶于氯仿中的磷脂和胆固醇 (脂质浓度约为 25 μmol/L),再加适当体积的乙醚 (氯仿∶乙醚约 1∶4,φ_B),重组缓冲液 (0.15 mol/L NaCl-20 mmol/L Hepes)约 100μg CD17,用水泵抽气逆相蒸发去除乙醚,最后得到均质的悬浮液,10000 r/min离心 5 min,弃上清 (去除游离 CD71),加一定量重组缓冲液,水浴超声破碎脂蛋白体,离心后即获得嵌有 CD71的人工膜片段,用此做 CD谱分析。对照人工脂膜制备除未加蛋白外,其余同前。

1.2.2.2 圆二色谱测定 采用 1 mm石英比色皿在日本 J-500C型 CD谱仪上分析,扫描范围 250 nm~ 195 nm,灵敏度 2 m°/cm,时间常数 4,扫描速度 100 nm/min,重复 4次扫描,温度 25℃。扫描结束用 CDD32程序 (清华大学生物科学与技术系提供)做二级结构分析。未加 CD71分子脂双层膜测定背景信号。

1.2.2.3 蛋白质内源性荧光光谱扫描 脂蛋白体制备方法同前,但省去离心及超声处理等步骤,以保证每份样品 CD71含量一致。用荧光分光光度计做蛋白质内源性荧光光谱分析。

2 结果

2.1 CD71分子分离、纯化及鉴定

本研究采用 CD71天然配体 Tf制成亲和层析柱,从 Molt-4淋巴细胞白血病细胞株及人胎盘滋养层细胞中分离纯化 CD71分子,两种来源样品在 SDS-PAGE上经考马斯亮蓝染色均出现相同的蛋白带,未还原条件下分子量为 18× 10^4 u,在还原条件下电泳后出现两条带,其中 9× 10^4 u带明显,约 8.8× 10^4 u带稍浅见图 1。免疫印迹见图 2,也证实从以上两种细胞中纯化的 CD71分子在还原及非原条件下均保持了与 Ber-T9, WuT9或 66Ig10等不同 CD71分子单抗良好的反应性,电泳后的两条带也都可在 NC膜上清晰显示出来,这也提示 88Kd带并非其它杂蛋白。由于人胎盘获取容易,CD71分子纯化产率高,且从该组织分离纯化的 CD71分子与 Molt-4细胞中提取的 CD71分子特性是一致的,所以以下的研究工作采用的 CD71来源于胎盘滋养层细胞。

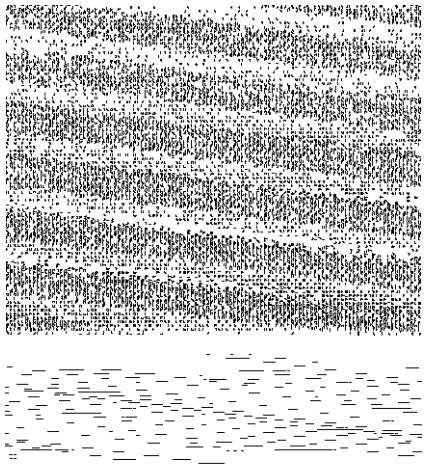


图 1 SDS-聚丙烯酰胺电泳分析

A, E中、低分子量标准; B, C, D胎盘 CD71(C未加 2-ME); F Molt-4细胞 CD71

Fig 1 SDS-PAGE analysis

A, E Protein standards; B, C, D Placenta CD71 (C with no 2-ME); F CD71 from Molt-4 cells

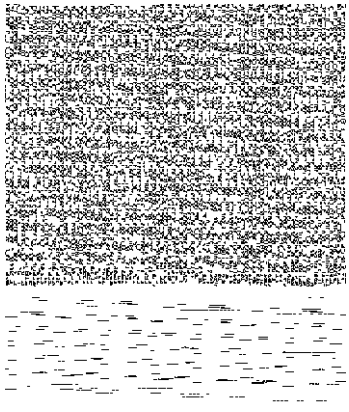


图 2 免疫印迹分析

A对照; B未加 2-ME; C, D分别为与 66Ig10, Ber-T9单抗作用结果

Fig 2 Immunoblotting test

A Control; B With no 2-ME; C, D Replicas were incubated with 66Ig10, Ber-T9 respectively

2.2 膜脂质环境改变对 CD71分子结构的影响

2.2.1 圆二色谱测定 该研究选用 DOPG, DMPG, DOPG三种磷脂与 Ch按不同摩尔比制成大单片层人工脂双层膜,同时按脂质∶CD71约为 (2.57~ 3.67)× 10^4(摩尔比)将 CD71与脂双层膜进行重组,研究磷脂 Sn-2位上脂肪酸碳链的不同及脂膜上 Ch高低对膜上 CD71分子结构的影响 (每一种脂膜上加入少许带负电荷的 DOPG以利 CD71分子嵌入膜内),图 3, 4是重组于脂膜上的 CD71分子圆二色谱仪 (CD谱仪)在 195 nm~ 250 nm远紫外区的测定结果,图中显示,CD71分子重组在由

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

DOPC、DMPC及不同 PC/Ch摩尔比的脂双层膜上,其 CD图谱明显不同,未加入 Ch的 DMPC和 DOPC脂双层膜,CD71分子 CD信号较弱(图中 CD信号强弱度以 m°/cm表示),随加入 Ch的增加,CD信号增强,尤以 DMPC/Ch摩尔比为 0.5时,信号增加明显,另外图中 208 nm和 222 nm处 α-螺旋结构的特征峰,CD信号也有差异,总的趋势是 DMPC或 DOPC膜上随 Ch增加该两位点 CD信号加强,提示脂双层膜上掺入 Ch高低对 CD71分子 α螺旋结构有一定影响。另外 CDD32程序分析还显示,在本实验条件下,脂双层膜上 Ch增加,CD71分子 β-片层结构减少,无规卷曲增多。

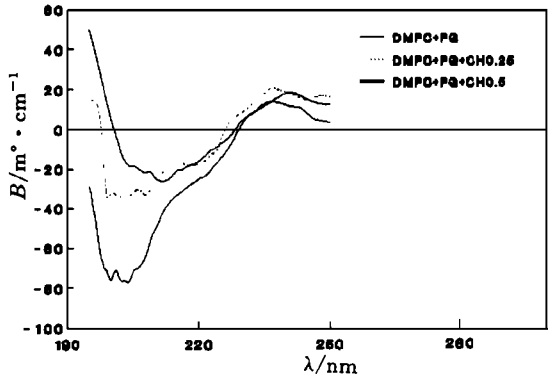


图 3　人工膜上 CD71圆二色谱分析

Fig 3　Circular dichroism analysis of CD71 reconstituted into DMPC/Ch artifical membranes

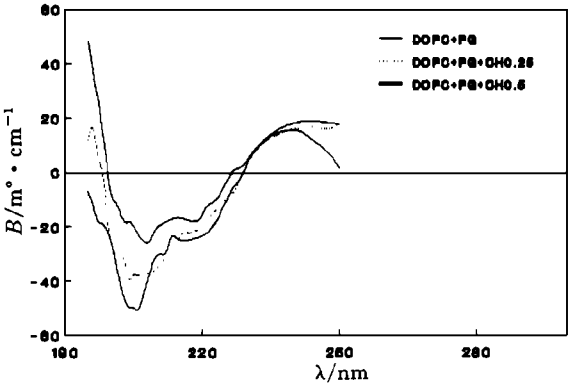


图 4　人工膜上 CD71圆二色谱分析

Fig 4　Circular dichroism analysis of CD71 reconstituted into DOPC/Ch artifical membranes

2.2.2　CD71分子内源性荧光光谱扫描及 KI荧光淬灭效应

CD71分子以同样的方法嵌入大单层脂双层膜,只是未掺入膜内的游离 CD71分子不去除,在同等蛋白含量的条件下进行蛋白质内源性荧光光谱扫描。结果显示,随人工脂双层膜中 Ch增加,荧光强度加大,在 DMPC/Ch摩尔比为 0.25和 0.5脂膜上,CD71最大发射峰位右移到 345 nm,而同样 Ch含量条件下 CD71在 DOPC膜上荧光峰位示明显偏移(图略)。进一步研究了 KI对重组在 DMPC膜上 CD71荧光的淬灭效应见图 5结果发现膜中 Ch增加荧光虽然增强,但加入 KI后,荧光很易被淬灭。

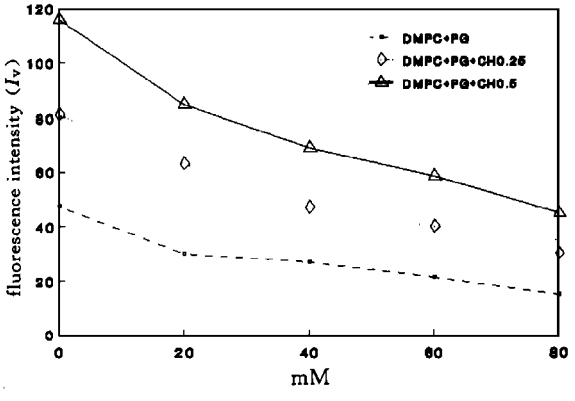


图 5　碘化钾荧光淬灭效应图

Fig 5　Fluorescence quenching curves of potasssium iodide

3　讨论

CD71分子是淋巴细胞膜上重要的分化抗原,由 90×10³ u两亚单位组成,它与 Fe^{3+} 饱和的铁传递蛋白结合,内在化介导细胞对 Fe^{3+} 的摄取,CD71分子与 CD25、CD30、CD70等被认为是细胞活化过程中期的活化标志物[7],用 CD71单抗封闭其与配体的结合,淋巴细胞大部分受阻于 G1期。现已证实 CD71分子为一膜内在糖蛋白,跨膜部分是由疏水性氨基酸构成的 α-螺旋结构(氨基酸序列为 CSGSICYGTLAVⅣFFI-IGFMIGYL)。以往我们的研究显示,用小单片层人工脂双层膜与淋巴细胞孵育或用 HMGCoA还原酶抑制剂抑制内源性胆固醇合成,进而改变淋巴细胞胞浆膜脂质结构可影响细胞膜表面 CD71分子数,其与配体的亲和特性以及内在化运动。

为进一步研究 CD71分子亲和特性及内在化运动的变化是否与不同脂质微环境条件下 CD71分子结构改变有关,本实验用 CD71配体制成亲和层析柱从 Molt-4细胞和人胎盘滋养层细胞分离纯化了 CD71分子,将纯化的 CD71与不同的合成磷脂、胆固醇构成的人工脂双层膜重组,使此蛋白分子嵌于脂膜上,进而用圆二色谱仪(CD)、蛋白内源性荧光光谱扫描两种方法研究磷脂酯酰链不同及脂膜中含不同 Ch对 CD71

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

二级结构及空间构象的影响,结果显示在 195 nm~250 nm远紫外区的扫描范围内, CD71分子重组在由 DOPC(Sn-2位上含不饱和酯酰链)、DMPC(Sn-2位为饱和酯酰链)及不同 PC/Ch摩尔比的脂双层膜上其 CD谱均明显不同,未加入 Ch的 DMPC和 DOPC脂膜上,CD71分子 CD信号较弱,随加入 Ch的增加, CD信号增强,尤以 DMPC/Ch摩尔比为 0.5时,信号增强明显,且在 DMPC膜上随 Ch增加,α-螺旋 208 nm的特征峰位蓝移, DMPC/Ch摩尔比为 0.5时,此峰蓝移到 200 nm~ 205 nm处,而在 DOPC膜上 208 nm峰位未明显偏移, CD71在 DMPC膜上 CD信号较在 DOPC膜上强,尤其是 208 nm和 220 nm处 α螺旋结构的特征峰, CD信号也有差异,总的趋势是 DMPC或 DOPC膜上随 Ch所占比例升高,该两位点 CD信号增强,提示脂双层膜上掺入 Ch高低对 CD71分子二级结构有影响。另外 CDD32程序的运行结果显示重组在脂膜上的 CD71分子 α-螺旋结构明显比其在极性溶液中 α-螺旋结构少,在本实验条件下前者 α-螺旋结构所占比例小于 10%,后者可达 16%,这也说明 CD71分子所处环境极性对其二级结构有明显影响,另外程序计算还显示,随 Ch增加,β-片层含量下降,而无规卷曲增加。以往就有人发现溶液中以 α-螺旋为主的蛋白在膜表面被诱导出部分无规卷曲构象,这两种变化原因不详。另外, CD71分子内源性荧光光谱扫描也显示,随膜中 Ch增加, CD71内膜性荧光强度加大,在 DMPC/Ch摩尔比为 0.25和 0.5脂膜上, CD71最大发射波长右移到 345 nm,而同样条件下 CD71在 DOPC膜上荧光峰位未明显偏移,表明 CD71分子在 DMPC上结构变化较在 DOPC膜上显著;另外 DMPC膜上随 Ch增多,荧光强度加大,同时荧光很易被 KI淬灭,提示荧光强度的增加系色氨酸(TrP)残基暴露所致。已知 CD71分子有较多 TrP残基,但这些 TrP或许相当一部分被遮盖在蛋白分子内部,在不同脂质环境中,由于 CD71分子某些部位变得疏松,或重新折叠,使 TrP残基所处位置改变,从而引起内源性荧光强度及荧光峰位变化。有研究显示在蛋白质收敛时 TrP残基旋转自由度下降,表现为内源性荧光强度减小,蛋白质跨膜部分 TrP残基周围环境疏水性增加,引起蛋白质内源性荧光峰位蓝移[8],从 CD71分子一级结构看其跨膜疏水区不含区不含 TrP残基,因此 CD71分子在 DMPC/Ch膜上随 Ch增加,荧光峰位红移,可能是跨膜区结构的变化诱发了 CD71分子胞外区或胞内区结构变化使 TrP残基较多暴露于极性环境中。由于 CD71与配体结合位点在胞外区,从膜脂环境改变 CD71与其配体亲和特性变化提示胞外区空间构象也可能发生变化,使原来埋藏于分子内部的 TrP残基暴露,内源性荧光强度及荧光峰位改变,另外也说明膜脂微环境,并非仅影响蛋白质跨膜区结构。

参考文献

1 Christopher M P, Chein N C, Cambier J C. Point mutation define a mIgM transmembrane region motif that determines intersubunit signal transduction in the antigen receptor. J Immunol, 1994; 152(8): 2837

2 Birgit J M, Zhang W, Rossoff P M. Modulation of the intracellular Ca and inositol triphosphate concentration in murine T lymphocytes by the glycosyphatidylinositol anchored protein Sgp-60. J Immunol, 1993; 150(8): 3189

3 Turkewitz A, James F A, David B. A high yield purification of the human transferrin receptor and properties of its major extracellular fragment. J Biol Chem, 1988; 263(17): 8318

4 Kurrle A, Rieber P, Sackmann E. Reconstitution of transferrin receptor in mixed lipid vesicles. An example of the role of elastic and electrostatic forces for protein lipid assembly. Biochemistry, 1990; 29(36): 8274

5 Laemmli V K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T. Nature, 1970; 227(2): 680

6 Gautam S, Dorothy M O, Jacqueline O G. A transforming growth factorα-pseudomonas exotoxin hybrid protein undergoes pH-dependent conformational changes conductive to membrane. Biochemistry, 1993; 32(13): 3488

7 Antonaci S, Tortorella C, Polignano A. Modulating effects on CD25 and CD71 antigen expression by lectin-stimulated T lymphocytesin the elderly. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1991; 13(1): 87

8 Craig J M, Matthews C R. Structure and stability of an early folding intermediate of Escherichia Coli trp aporepressor meassured by far-uv stopped flow circular dichroism and 8-anilino-1-naphthalene sulfonate binding. Biochemistry, 1993; 32(22): 5282

(收稿: 1995-12-19;修回: 1996-09-09)

(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Effects of changes of membrane lipid microenvironment on CD71 protein conformation

Mi Mantian, Zhu Xihua, Ma Fang (Department of Immunology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Highly purified CD71 protein was isolated from human placental trophoblasts and Molt-4 cells with affinity chromatography. SDS-PAGE revealed that it was a single major species with an apparent mass of 90× 10^3 u under reducing condition. After the protein was reconstituted into the artificial membrane composed of various phospholipids and cholesterol (Ch), circular dichroism measurements indicated that CD71 underwent a conformational change from b-structure to a-helica and random coil upon interaction with the increment of Ch content in DMPC/Ch or DOPC/Ch artificial membrane. Meanwhile, tryptophan fluorescence spectra also indicated that the conformation of CD71 protein was changed with the modification of lipid composition in artificial membrane.

Key words membrane lipid; CD71 protein; protein conformation

小肠系膜畸胎瘤破裂所致感染性休克患儿的护理

The nursing of infectious shock caused by the rupture of mesenteric teratoma in a child

路 菊 (第三军医大学附属西南医院特诊科) 重庆, 630038

1 病例介绍

患儿男, 8岁。于 1993年 9月 24日上午 10:00与同学玩耍时摔倒,即感上腹疼痛,进而弥散至全腹。于 13:40来我院。腹透发现右隔下有积气。血象高。按急性腹膜炎收住院。体检: T: 39℃; P. 180次/min; BP. 10/7 kPa 急性痛苦面容,神志清楚,面色苍白,口唇发绀,肢端湿冷。腹部膨隆,全腹压痛,反跳痛,病情进行性加重。19:50急行剖腹探查术。术中发现患儿腹腔内有大量深咖啡色液体,其间混有大量乳酪样物质及黑色块状物。十二指肠空肠曲肠系膜上有一个囊性包块已破裂。术中切除囊肿,彻底冲洗腹腔,并置引流管。术后病理检查证实为畸胎瘤。由于病人因腹膜炎时间长,感染性休克严重,术后出现持续低血压,高热,昏迷,并出现代谢性酸中毒,生命垂危。经过医护人员的大力抢救和护理,病情明显好转,患儿住院治疗 20 d后痊愈出院。

2 护理体会

2.1 严密观察病儿的生命体征

患儿术后出现烦燥不安,谵语及意识障碍,持续高热,体温最高时达 41℃;脉搏细速,心率最快达 202次/min;呼吸急促;血压低,术后 48 h一直在 6/3 kPa~ 10/6 kPa间波动,四肢湿冷,口唇发绀。在特别护理下,立即给予持续氧吸入,迅速建立通道补充血容量,输入升压药物及大量抗生素。同时,每 30 min测量病儿的生命体征,随时观察意识状况和末梢循环改善的情况,做好记录,发现问题及时报告医生。

2.2 保持各种引流管的通畅

每班护士除仔细观察胃管、尿管和引流管是否通畅外,还要了解引流液的性质、颜色变化,并准确记录其数量,定时更换引流袋或引流瓶。尿量的准确记录和尿比重的测定是为了观察休克纠正的情况及做为调整治疗的依据[1]。

2.3 保持输液管道的通畅

休克病人肢端血管塌陷极难辨认,因此保护好输液管道的通畅十分重要,应随时防止穿刺局部皮肤红肿及药物渗漏现象,尤其是使用升压药时需特别小心。另外,要严格控制滴数和药液输入的先后顺序。

2.4 做好生活护理

因病人长时间高热,并置有胃管,故每日需做口腔护理[2]。用消毒棉球醮 0.02%的呋喃西林按顺序做口腔护理,每日 2次,之后用液体石腊油涂擦唇面,以防干裂。病儿病情重,常大小便在床,加上伤口渗出及各种引流液的污染,经常弄脏床单和被套,我们做到了见脏、见湿就换,勤于整理,勤于擦洗、勤于翻身。同时每天坚持给病儿拍背,鼓励其咳嗽、排痰,病性稳定后,鼓励患儿早期下床活动,以促使整个机体的功能恢复,促进伤口愈合。由于我们为该患儿制定了周密的护理计划,并实施得及时,经过积极的抢救和护理,获得了良好的效果,病人未发生任何护理并发症。痊愈出院。

关键词 畸胎瘤;腹膜炎;感染性休克
中图法分类号 R730.269

参考文献

1 翁维权,陈家愚主编.内科危重症的抢救.第 2版.北京:人民卫生出版社,1986:64
2 孙建荷.手术期的护理观察.中华护理杂志,1993;28(7):434

(收稿: 1995-12-31;修回: 1996-08-16)
(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net