

▶ 张树政 主编

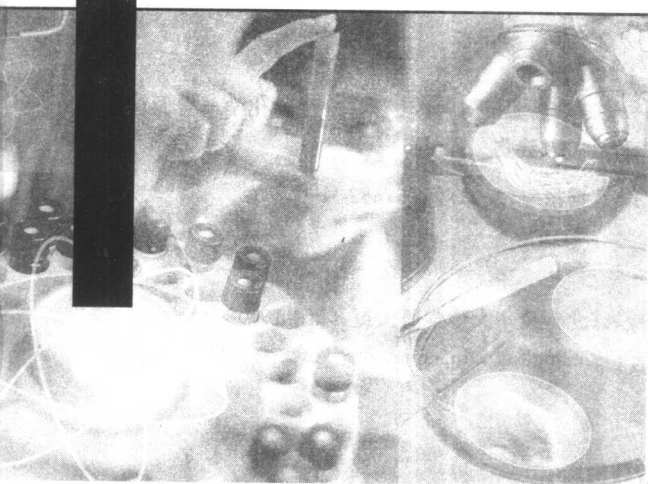
糖生物学 与 糖生物工程



清华大学出版社

► 张树政 主编

糖生物学 与 糖生物工程



清华大学出版社

(京)新登字 158 号

版权所有,翻印必究。

本书封面贴有清华大学出版社激光防伪标签,无标签者不得销售。

图书在版编目(CIP)数据

糖生物学与糖生物工程/张树政主编;王克夷等著. 北京:清华大学出版社,2002

ISBN 7-302-05711-7

I. 糖… II. ①张… ②王… III. ①碳水化合物—生物化学—普及读物
②碳水化合物—生物工程—普及读物 IV. Q53-49

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 057682 号

出版者: 清华大学出版社(北京清华大学学研大厦,邮编 100084)

<http://www.tup.tsinghua.edu.cn>

责任编辑: 罗 健

版式设计: 肖 米

印刷者: 北京四季青印刷厂

发行者: 新华书店总店北京发行所

开 本: 850×1168 1/32 **印张:** 5.875 **字数:** 146 千字

版 次: 2002 年 11 月第 1 版 2002 年 11 月第 1 次印刷

书 号: ISBN 7-302-05711-7/Q·24

印 数: 0001~3000

定 价: 15.60 元

◆ 主编简介



张树政 院士,中国科学院微生物研究所研究员,河北辛集市(前束鹿县)人,1922年出生。1945年毕业于北京大学理学院化学系。从事化学、微生物学、酶学、糖生物学和糖生物工程学研究五十多年,是我国微生物酶学研究的奠基人之一。年近80,仍积极倡

导和组织我国糖生物学和糖生物工程的研究。多次荣获中国科学院重大科技成果奖和科技进步奖,发表论文150余篇,并主编、合编过多种学术著作,于1991年当选为中国科学院院士。

◇ 编者的话

糖生物学与糖生物工程是 20 世纪末才开始蓬勃发展而引起世人注意的一个学科领域。这门新兴的学科既有深远的理论意义,又和人类健康和动植物生产有着密切的关系。本书由我国著名的生物化学家张树政院士倡导和组织,汇集了我国在本学科多有建树的十几位专家的创作,是介绍该学科知识和最新进展的综述性著作。

本书尽可能简要地介绍了糖生物学与糖生物工程的兴起和发展过程、糖生物学的基本内容和糖链与人类健康,特别是与癌症发生的关系,还简介了寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用,以及目前正广泛受到关注的有广阔应用前景的多糖——甲壳素和壳聚糖。

本书可供具有一定生物化学和生理学知识的大学生、研究生作为课外读物,也可供具有相应程度的高级科研管理人员参考。为了方便读者进一步了解和学习有关知识,书中大部分章节都提供了或多或少的参考文献。这些文献集中在全书的最后。

参加本书编写工作的有王克夷教授(中国科学院上海生物化学研究所)、崔肇春教授(大连医科大学)、朱正美教授(大连医科大学)、李晋萍博士(瑞典乌普萨拉大学生物化学中心医学生化和微生物系)、田梦玉教授(西安医科大学)、陈惠黎教授(上海医科

大学)、周柔丽教授(北京大学医学院细胞生物学教研室)、李玉瑞教授(中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所)、徐桂云教授(中国科学院化学研究所)、许彩民教授(中国医学科学院基础医学研究所)、孔繁祚教授(中国科学院生态环境研究中心)和张惟杰教授(上海交大学生命科学技术学院);程光胜教授(中国科学院微生物研究所)协助张树政院士(中国科学院微生物研究所)进行了大量稿件的加工整理和统稿工作,清华大学出版社罗健先生为本书的出版付出了辛勤的劳动。

目 录

 导言	1
1.1 生物化学中新出现的广袤前沿——糖生物学与 糖生物工程的兴起和发展	1
 糖链的结构和功能	14
2.1 “乐谱”和“词典”——糖类作为信息分子的 结构基础	14
2.2 “人小鬼大”的糖鞘脂——糖鞘脂与信息传递	20
2.3 生殖过程中的中介——糖链	37
2.4 糖分子与异种器官移植	50
2.5 备受关注的古老生物大分子——蛋白聚糖	56
 糖链和疾病	73
3.1 免疫球蛋白分子糖链的异常与自身免疫疾病	73
3.2 糖蛋白中糖链结构异常和恶性肿瘤的诊断	80
3.3 糖链在癌症发生、发展中的意义及其在抗癌 中的潜在价值	102
3.4 细胞外基质和疾病	116
3.5 糖链在流感病毒侵袭细胞中的作用	136

3.6 糖基磷脂酰肌醇 GPI 锚结合蛋白及其与疾病的关系	141
 寡糖在植物自卫、生长调节和共生中的作用	149
4.1 前言	149
4.2 植物的细胞壁	150
4.3 植物自卫系统的激活及其机制	151
4.4 植物自卫作用的应用	152
4.5 常见的寡糖激活剂	153
4.6 寡糖类植物生长调节剂	157
4.7 根瘤菌与宿主共生的信息分子——能促进固氮作用的寡糖	159
4.8 寡糖素	161
4.9 寡糖素的制备	162
4.10 寡糖的合成	163
4.11 寡糖素的前景	164
 甲壳素/壳聚糖——有广阔应用前景的多糖	165
5.1 甲壳素在自然界中的分布	165
5.2 甲壳素/壳聚糖的性质	166
5.3 真菌来源的甲壳素/壳聚糖	169
5.4 甲壳素/壳聚糖的应用	171
参考文献	175

1 导 言

1.1 生物化学中新出现的广袤前沿 ——糖生物学与糖生物工程的兴起和发展

糖生物学 (glycobiology) 是在以糖链为“生物信息分子”的水平上阐明多细胞生物的高层次生命现象的一门科学。它是 20 世纪 90 年代才发展起来的生物化学中最后一个广袤前沿。研究糖生物学的方法论和基本技术,以及把基础研究获得的知识进一步转化为生产技术等,称为“糖工程”(glycotechnology)。两者合起来则称为“糖科学与糖技术”(glycoscience and glycotechnology), 1998 年提出了“糖生物工程”(glycobiotechnology)的概念。

1.1.1 糖链重大生理功能的揭示历程

1.1.1.1 糖决定了人的血型

众所周知,人的主要血型是 ABO 式血型,主要有 4 种:A 型、B 型、AB 型和 O 型,这是 1900 年兰德斯坦纳(K. Landsteiner)发现的。A 型、B 型血型的人的红细胞表面分别有 A 型抗原、B 型抗原,他们的血清中分别有 B 型抗体、A 型抗体。O 型血的人的红细胞上没有抗原,其血清中有 H 血型物质,所以常写作 ABO(H)血型抗原,H 血型物质是 A 型抗原、B 型抗原的前体。血型的鉴定在输血,组织和器官移植,以及法医鉴定中是绝对必需的,尤其是在第一次世界大战中,为抢救伤员曾经发挥过巨大的作用。兰德斯坦纳曾获得 1930 年诺贝尔生理医学奖。至今在医院中各型血浆

仍是必不可缺之物。

经过不少免疫学家,包括兰德斯坦纳和瓦特金(W. M. Watkins)等,半个世纪的研究,1960年瓦特金终于确定了ABO(H)抗原的决定基的糖链结构。发现H抗原有Ⅰ型和Ⅱ型之分。主链二糖是半乳糖以 β -(1 $\rightarrow$ 3)或 β -(1 $\rightarrow$ 4)键与N-乙酰葡萄糖胺连接而成,前者又叫N-乙酰新乳糖胺,后者称为N-乙酰乳糖胺。在半乳糖上都接上 α -(1 $\rightarrow$ 2)-岩藻糖就分别合成HⅠ型和HⅡ型三糖。再在H型三糖的半乳糖的3位上连接 α -(1 $\rightarrow$ 3)-半乳糖即成B型糖抗原。在同一位置上改为连接 α -(1 $\rightarrow$ 3)-N-乙酰半乳糖胺即成A型糖抗原。因此,A型和B型抗原仅有一个糖基的差别,仅差一个糖基就决定了血型。50年才解开了血型之谜,确定了永远不变的血型规律。除了ABO式血型外,还有路易斯(Lewis)血型Le。路易斯(Lewis)血型也有4种型别:Le^a、Le^x、Le^b和Le^y。前两种是在H形主链二糖的N-乙酰葡萄糖胺上连接 α -(1 $\rightarrow$ 4)-岩藻糖成Le^a,连接 α -(1 $\rightarrow$ 3)-岩藻糖成Le^x;后两种为在H型三糖的N-乙酰葡萄糖胺上连接 α -(1 $\rightarrow$ 4)-岩藻糖成Le^b,连接 α -(1 $\rightarrow$ 3)-岩藻糖成Le^y。仅仅连接糖的位置的不同即成了完全不同的血型。

1.1.1.2 一个血球细胞表面就有50万个糖蛋白分子

疾病的诊断一般先查血,最简单的是在显微镜下进行细胞计数。红细胞正常值为400万个/mm³~550万个/mm³,白细胞正常值为4000个/mm³~10000个/mm³。红细胞在显微镜下看上去像个光滑的小圆盘,其实不然。在红细胞表面含有大量的载糖蛋白A(glycophorin A),含糖量为60%,它所含的唾液酸占红细胞总唾液酸的80%。推算每个红细胞细胞膜上有50万个糖蛋白分子。这种糖蛋白分子有131个氨基酸,是跨膜蛋白,羧基末端(C端)在细胞内,靠氨基末端(N端)92个氨基酸肽链上有15条~19条O-糖链。载糖蛋白A与MN血型有关。在白细胞细胞膜上也有

含糖量极高的糖蛋白,称为白唾液酸蛋白(leucosialin),它含有白细胞唾液酸的85%,推算也是每个细胞膜上有50万个这种糖蛋白。这种糖蛋白有381个氨基酸。膜外N端肽链上有80多个O-糖链。在粒细胞、单核细胞及T淋巴细胞上也都有这种糖蛋白。血球上具有多量唾液酸,提供高的负电荷,避免在血管中流动时相互粘附或与血管内皮细胞粘附。

1.1.1.3 糖分化抗原和癌发展抗原的提出

1975年迈尔斯坦(Milstein)等创建了杂交瘤技术生产单克隆抗体,对生物学很多领域作出了重大贡献,在免疫学领域尤为突出。费兹(Ten Feizi)等利用单克隆抗体技术在1981年提出了“糖分化抗原”的概念,即在发育过程中细胞的糖蛋白或糖脂的糖抗原性的改变是由于序列的增加或删除一个糖残基引起的。她在1985年发表了综述“用单克隆抗体确认糖蛋白和糖脂的糖链结构是癌发展抗原(onco-developmental antigens)”。

1.1.1.4 白细胞分化抗原CD的命名

《糖锁工程》一书中有一章“糖链的免疫工学”,主要讲了单克隆抗体(简称单抗)的应用领域:①过去ABO(H)和Lewis血型都是用多抗鉴定,现在用单抗判定的试剂已经普及;②各种自身免疫疾病和自身抗原,如自身免疫性甲状腺炎、糖尿病、SLE(红斑狼疮)等;③白细胞的标记物,作为淋巴系细胞标记物的CD57、CDw60、CD76、CD77,作为粒细胞和单核细胞标记物的CD15、CDw17、CDw65等都写出了糖脂链结构;④肿瘤标记物,已知的糖链性癌抗原已有知的I型糖链2-3唾液酸Le^a,主要是消化系统胰脏、肝脏、胃、大肠等的肿瘤,II型糖链2-3唾液酸Le^x是肺癌、卵巢癌等的糖抗原。国际癌发育生物学和医学会(ISOBM)举办过多次组织分化(TD)研讨会。1997年在洛桑举行TD-6,主要研

对象是 Sle^a 的单抗。对成套的单抗加以定性,以便确定各自的相对价值,选出适用的单抗作为病人患胰腺、肝脏和胃肠癌的监测之用。用单抗技术确定的白细胞分化抗原统一称为分化簇(cluster of differentiation, CD)。

1.1.1.5 免疫球蛋白 G(IgG)糖链与类风湿病(RA)

免疫球蛋白是体液免疫的主力军。其中 IgG 占免疫球蛋白的 80%, IgG 的含糖量约大于 3%, IgG 的结构与功能早已知道,但它的糖链有什么作用却鲜为人知。直到 1981 年德森霍佛尔(J. Deisenhofer)才用 X 射线晶体分析确定了糖链的结构与 IgG 的结合位点。它是二天线的复合 N-糖链。1985 年木幡阳发现类风湿病人的 IgG 糖链中的半乳糖含量低于正常人的含量,由此提出了“糖病理学”的概念。糖病理学是研究糖链失常与疾病关系的学科。木幡阳与英国牛津大学著名糖生物学家缀克(Dwek)合作多年,终于确证了这种缺乏半乳糖的 IgG 引起构象的变化,使人体把它认为异物,在血管、关节等处发生免疫复合物的沉积,从而引发类风湿。它是病因而不是结果。

1.1.1.6 细胞外表面的模样

在日文中,细胞外表面被叫做“细胞之颜”,颜即脸的意思。前面说过,红细胞和白细胞的细胞表面都有 50 万条以上的糖蛋白。实际上多细胞生物的细胞外表面都布满了糖链,形象地讲,糖脂(glycolipid)像地面的草皮,脂质部分嵌在膜脂双层的外层,上面露出短的糖链;糖蛋白像大树,根深叶茂,主干为跨膜蛋白,主干上部可以有 1 条~5 条天线的 N-糖链和长短不等的 O-糖链。把这些糖链称之为天线是很恰当的,因为它们正是细胞间传递信息的收发者。它们还参与细胞之间的粘附,作为病原菌及毒素的受体和激素、酶、抗体和凝集素等的受体。细胞表面还有另一类更大

的分子叫做蛋白聚糖 (proteoglycan, PG), 它与糖蛋白的区别不在于含糖量的多少, 而是结构不同。PG 以蛋白质为主干, 侧链是糖氨聚糖 (glycosaminoglycan, GAG)。例如牛鼻软骨聚糖的主干蛋白质相对分子质量是 220kDa, 侧链 GAG 有 100 多个硫酸软骨素。每条糖链有 100 个 ~ 200 个单糖残基, 也有几条短链的硫酸软骨素。含糖量最少的 PG 要算 IX 型胶原蛋白, 它有 3 条肽链, 仅结合一个硫酸软骨素。糖脂、糖蛋白、蛋白聚糖总称为糖缀合物 (glyco-conjugate)。

1.1.1.7 多细胞生物的高层次生命现象

20 世纪 60 年代发展起来的分子生物学在核酸 (DNA 和 RNA) 及其直接产物蛋白质水平上来阐明生命现象, 取得了突出进展和重大成就。人类基因组和水稻基因组的研究已有重大进展, 原核生物和真核模式生物酿酒酵母以及美丽线虫基因组的测序工作已完成了上百个。然而用它们来阐明多细胞生物生命现象还是远远不够的。

原核单细胞生物大肠杆菌 1 分为 2, 2 分为 4, 4 分为 8, …… , 在对数生长期几个小时细胞数就可达到 10^{8-9} 个/ml。而多细胞生物一个受精卵的二分分裂, 不但要互相结合, 还必须保持合理的空间配置和时间进程。糖链在其中的作用就非常重要。例如科学家发现, 在 8 ~ 16 细胞的胚胎期有叫做路易斯 X ($Le^x = CD15$) 的糖抗原表达, 所以把这种抗原称为阶段专一性胚抗原 (stage specific embryonic antigen, SSEA), 它可能与胚胎桑椹期的致密 (compaction of morula) 有关。我们人类有大约 4.0×10^9 个 ~ 5.0×10^9 个细胞集团, 每个集团的细胞相互粘附, 细胞与基质之间要相互识别和相互作用, 集团之间也要相互识别和相互作用、相互制约和调控, 沿空间配置和时间进程井然有序地发展, 其中的“生物信息”只能靠含有信息量比核酸和蛋白质高很多个数量级的糖链来承

担。于是就发展出“糖生物学”,而用于研究糖生物学的方法论和基本技术,以及把基础研究获得的知识转化为生产技术等则称为“糖生物工程”。两者合起来则称为“糖科学与糖技术”(glycoscience and glycotecnology)。

1.1.2 糖生物学研究中的一场革命

1990年11月,3个不同的研究小组几乎同时发现血管内皮细胞-白细胞粘附分子1[ELAM-1,后改称E-选择素(E-selectin)],这种分子能识别白细胞表面的四聚糖唾液酸路易斯X(SLe^x,一种血型抗原)。当组织受到损伤或感染时,白细胞与内皮细胞粘附,它们沿壁滚动终至穿过血管壁进入受损组织以杀灭入侵病原物,而过多的白细胞渗出则会引起炎症及自身免疫疾病(如类风湿)等。这是真正第一次在人体中确证了糖结合蛋白E-选择素、P-选择素和L-选择素等家族成员与寡糖SLe^x(也包括SLe^a)之间的识别功能。更使人吃惊的,是发现肺癌和大肠癌细胞表面也存在SLe^x或SLe^a,进入血液循环的癌细胞可能也借类似机制渗出血管而实现转移过程中的一个重要环节。这些发现被称为糖生物学中的一场革命。

这场革命引发了一场制备抗炎和抗癌药物的大竞赛,许多以糖命名的药厂如雨后春笋应运而生,如Genetech公司和Glycomed公司就签订了1500万美元的合同生产抗炎药物。

美国Scripps研究所的华裔科学家王启辉(Chi-Huey Wong)在这场竞赛中有突出贡献。他首先用三种不同的糖基转移酶合成了SLe^x,当时推算该四聚糖价格为每千克20亿美元,由于王先生合成成功,并使生产产量达到100g的水平,所以价格可降低3个~4个数量级。这种产品已由Cytel公司生产。

1.1.3 发达国家政府对糖生物学研究的支持

1.1.3.1 英国

英国牛津大学生化系设有糖生物学研究机构,1992年改称糖生物学研究所,该所缀克(Raymond Dwek)教授曾在1988年《生化年评》上发表了题为《Glycobiology》的综述,并于同年创建了牛津糖系统(Oxford Glycosystem)公司,专门研制生产有关糖的试剂,特别是自动化糖链分析仪,牛津大学出版社1991年创刊了《Glycobiology》专业杂志。

1.1.3.2 日本

日本政府科学技术厅于1989年提出关于“糖生物工程基础与应用研究推进战略”,经过专家评议提出了详尽的推进战略方案,遂于1991年开始由科技厅、厚生省、农林水产省、通商产业省等四省厅联合实施“糖生物工程前沿计划”。该计划为投资数百亿日元的15年计划,内容包括“糖生物工程”和“糖生物学”,后者又分为“糖分子生物学”和“糖细胞生物学”。同时成立了“糖生物工程研究协议会”作为协调机构。该协议会编辑出版了680页的《糖锁工程》专著,并早在1989年就创刊了日英双语专门杂志《Trends in glycoscience and glycotechnology, TIGG》。

1.1.3.3 美国

美国能源部资助佐治亚大学于1986年创建了复合糖研究中心(Complex Carbohydrate Research Center, CCRC),建立复合糖结构数据库 CCSD。其计算机计划也称 CarbBank Project。在1990年底即收集了糖结构数据6000个,1992年为9200个(包含在20000个记录中),1992年底记录达到22000个,到1996年已有记录42000多个。1996年一年增加的数量是1991年的4倍。到

2000年5月,已经超过5万个数据。

1.1.3.4 欧洲

欧洲各国也不甘落后。1994—1998年的研究计划中有一项“欧洲糖研究开发平台(European Carbohydrate Platform)”计划,目的是协调欧洲各国的糖研究与开发,以强化欧洲在糖的基础研究以及将研究成果转化为商品方面与美国和日本竞争的能力。

由于美、日、欧三大集团的重视,糖生物学研究近年来已取得了不少进展。现已确证糖链作为信息分子在受精、发生、发育、分化、神经系统、免疫系统恒态的维持方面起着重要作用,在炎症及自身免疫疾病、老化、癌细胞异常增殖及转移、病原体感染、植物与病原菌相互作用、豆科植物与根瘤菌共生过程中都涉及糖链的介导。在此基础上,新兴的糖生物学正处在蓬勃发展的起点,前程远大。糖生物学涉及生物学科的多个领域,如分子生物学、细胞生物学、病理学、免疫学、神经生物学等,而糖生物学研究的发展又会促进这些学科的发展。21世纪的生命科学研究将是对多细胞生物学过程的高层次生命现象的解释,因此对生物体内介导识别和调控生物学过程的信息分子——糖的研究是必不可少的。

1.1.4 近年来糖生物学的突飞猛进

从重大国际会议、期刊上和著名糖生物学家的言论中可以看出糖生物学突飞猛进的发展。

1.1.4.1 生物化学中最后一个广袤前沿

1993年5月在美国旧金山召开的首届“国际糖生物工程会议”上,大会主持人哈特(G. W. Hart)说:“生物化学中最后一个广袤前沿——糖生物学的时代正在加速来临!”同年9月美国国立卫生研究院召开首届糖生物学会议,题为“人类疾病的新前景”。

1994 年在美国召开的第二届糖生物工程会议仍由哈特主持,他说:“糖生物学是生物化学和生物医学交叉点的新前沿。”

1.1.4.2 糖基转移酶转基因细胞的出现

1995 年,由澳大利亚和美国科学家联合报道了一项糖基转移酶转基因细胞的研究工作。把猪器官移植到人体后,猪的主要抗原决定簇 $\text{Gal}\alpha-(1\rightarrow3)\text{-Gal}$ 会在几分钟内引起急性器官排斥反应 (HAR)。人抗体 IgG 和 IgM 都与猪细胞表面的 $\text{Gal}-\alpha-(1\rightarrow3)\text{-Gal}$ 发生反应。该研究将 $\alpha-(1\rightarrow2)\text{-岩藻糖基转移酶}$ 基因转入猪肾细胞后稳定表达,使猪肾细胞表达人的 H 抗原,同时降低了 $\text{Gal}-\alpha-(1\rightarrow3)\text{-Gal}$ 的表达,从而显著降低了人抗体与猪肾细胞的结合及补体介导的细胞裂解。这一研究表明,糖基转移酶转基因猪将可能成为人类器官移植的供体。

1.1.4.3 钙粘素 N-CD1 单晶三维结构的阐明

1995 年英国《自然》杂志突出报道了神经粘附分子 NCAM 中一类称作钙依赖粘附分子 N-钙粘素 (cadherin)。鼠脑中的 N-钙粘素 N-CD1 的单晶的三维结构现已弄清。该糖蛋白的 N-端肽链在细胞内的一段与细胞骨架紧密相连,膜外肽段则与相邻细胞的相应肽链犬牙交错地形成拉锁状结构。

1.1.4.4 糖基化对糖蛋白作用的阐明

1996 年芬兰科学家嘎伯格 (Gahmberg) 等终于给糖基化对糖蛋白起什么作用给出了满意的回答。答案就是:没有正确折叠的肽链不能从内质网腔外逸并到达细胞外表面。N-糖基化与翻译同步的过程在内质网内腔发生,翻译后的修饰在高尔基体内腔进行。N-糖基化的高甘露糖型原始寡糖的最内部的一个葡萄糖,在内质网内腔中与两种细胞内凝集素钙粘蛋白 (calnexin) 和钙网蛋