



人载脂蛋白 H 与磷脂膜的相互作用 及其膜结合态构象的研究

On the Interactions of Human Apolipoprotein H with
Phospholipid Membranes and the Conformation of
Membrane-bound Apolipoprotein H

王少雄



高等教育出版社
HIGHER EDUCATION PRESS



人载脂蛋白 H 与磷脂膜的相互作用 及其膜结合态构象的研究

On the Interactions of Human Apolipoprotein H with
Phospholipid Membranes and the Conformation of
Membrane-bound Apolipoprotein H

王少雄



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

中文摘要

载脂蛋白 H (apolipoprotein H, 简称 ApoH) 是一种属于载脂蛋白家族的血浆糖蛋白。到目前为止, ApoH 的生物学功能并不十分清楚。由于 ApoH 在体内的很多生理和病理功能都与磷脂膜的相互作用有关, 而目前这方面的研究成果还很少, 因此, 研究 ApoH 与脂膜的相互作用, 以及其在膜表面的结构将具有十分重要的生物学意义和潜在的应用前景。

本文应用单层膜、脂质体以及含有甲醇的有机溶剂体系等模型系统, 对 ApoH 与磷脂膜的相互作用及其膜结合态的构象进行了深入的研究。

首先, 我们利用气/液界面脂单层膜的方法在国际上首次证明了 ApoH 分子具有较强的两亲性, 它能够插入带负电荷的磷脂膜内, 其插膜的深度约为 $(0.2 \pm 0.1) \text{ nm}$ 。ApoH 插膜的作用力来自膜脂-蛋白之间的静电作用和疏水作用。

其次, 我们应用荧光光谱和圆二色光谱等实验技术研究了与脂质体相结合的 ApoH 的构象。实验结果显示当结合到带负电荷的脂质体表面之后, ApoH 分子的二级结构将发生显著变化, 蛋白分子被诱导产生出一定比例的 α -螺旋结构成分。通过改变脂质体中磷脂的组成和缓冲液中的离子强度等条件, 我们首次发现膜结合状态的 ApoH 分子具有两种不同的构象。在低离子强度条件下, 蛋白分子中大部分色氨酸残基吸附于脂膜表面, 少部分插入磷脂膜内; 随着体系离子强度的提高, 蛋白分子中非插膜的色氨酸残基将首先从脂膜表面脱附, 而插膜片段的脱附要显著滞后。ApoH 分子在膜表面的构象变化为其在体内发挥标记并免疫清除血浆中带负电荷的脂质体, 以及在抗磷脂综合征等自身免疫疾病中的生物学功能提供了重要的结构基础。

第三,我们应用含有一定浓度甲醇的缓冲液模拟膜-水界面区域的微环境,对 ApoH 分子的插膜与其膜结合态构象之间的相互关系作了进一步的研究。在含 57% 左右甲醇的溶液中 ApoH 能被诱导产生出与其在负电荷磷脂膜表面几乎相同的构象;同时,经该有机溶剂体系处理后,构象发生变化的 ApoH 分子的插膜能力也相应增强。经毛细管电泳技术检测,这时有更多的蛋白质分子吸附于脂膜表面区域。以上实验说明在 ApoH 与磷脂膜作用的过程中,蛋白的插膜与其特定的膜结合态构象密切相关。

综上所述,本文揭示了 ApoH 与磷脂膜相互作用的分子机制,并建立了一个有关 ApoH 插膜过程及在膜表面发生构象变化的模型。ApoH 首先通过与负电荷磷脂之间的静电引力富集于脂膜表面区域。接着,受该区域微观物理化学环境(主要是介电常数和 pH 条件)的影响,吸附于膜脂界面的 ApoH 将发生特定的构象变化,同时蛋白分子的一部分插入到膜脂内部。最后,插膜的 ApoH 分子将在膜脂界面发生进一步的构象调整并最终稳定于膜脂界面。有关 ApoH 插膜的模型具有一般性的生物学意义,它的建立为深入研究膜周边蛋白与磷脂膜的相互作用提供了重要的信息。

关键词:载脂蛋白 H(ApoH),气/液界面脂单层膜,脂质体,膜脂-蛋白相互作用,插膜

Abstract

Apolipoprotein H (ApoH) is a plasma glycoprotein belonging to the family of apolipoprotein. Hitherto, the biological function of ApoH is not very clear. Since it is known that the *in vivo* physiological and pathogenic roles of ApoH are closely related to its interaction with the phospholipid membrane, a more profound understanding on the interaction mechanism, as well as on the membrane-bound conformation of ApoH may have not only theoretically but also practically beneficial consequence.

In the dissertation, the interaction of ApoH with phospholipid membranes and the conformation of membrane-bound ApoH was studied by using different model systems of lipid monolayer, liposome and an organic solvent contain water and methanol.

Firstly, with the method of phospholipid monolayer at air/water interface, we proved for the first time that ApoH is an amphiphilic protein which is capable of insertion into negatively charged lipid monolayer. The membrane insertion depth of ApoH is about (0.2 ± 0.1) nm. In the process of ApoH insertion into membranes, both the electrostatic and the hydrophobic interactions between protein and the lipid are evidently involved.

Secondly, we combined techniques of fluorescence and circular dichroism spectroscopy to study the conformation of membrane-bound ApoH. The experimental results showed that after binding to the negatively charged liposome, the secondary structure of ApoH will be significantly changed and some α -helix structure can be induced. By changing the composition of phospholipid in vesicles and the ionic

strengths in the buffer, we found that the membrane - bound ApoH molecules can adopt two conformations at the membrane surface. Under conditions of low ionic strength, the water - soluble ApoH will bind to the negatively charged lipid vesicles with most of its tryptophan residues adsorbing on the membrane surface and a small part of them inserting into the membrane. Under conditions of high ionic strength, the membrane - bound ApoH will have a different conformation with its non - inserted tryptophan residues mainly separated from the membrane surface, and its membrane - inserted ones still maintained their association with the membrane. The conformational change of ApoH upon binding to the membrane may provide important structural bases for the protein's biological function, e. g. in clearing the negatively charged liposome in plasma, and in the autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus.

Thirdly, we studied the correlation between the membrane insertion ability and the membrane - bound conformation of ApoH with the model system of water - methanol mixed solvent at moderately low pH that mimics the micro - physicochemical environment near the membrane surface. In a buffer of 57% methanol, ApoH can be induced to adopt a special conformation just the same as that bound to the negatively charged membrane. On the other hand, it is observed that the membrane insertion ability of the conformational changed ApoH increased, too. With the method of capillary electrophoresis, it is found that in this case, there are more ApoH molecules adsorbing on the monolayer surface. The above experiments suggest the close relationship between the membrane insertion ability and the membrane - bound conformation of ApoH.

In all, we partially revealed the molecular mechanism of the interaction of ApoH with phospholipid membranes and obtained a model for

the membrane insertion and conformational change of ApoH at the membrane surface. That is, ApoH will adsorb to the negatively charged membrane surface through electrostatic forces between protein and the lipid. Then, the surface adsorbed ApoH will suffer a conformational change due to the change of micro - physicochemical environment near the membrane surface. The ApoH molecule will insert into the membrane partially. Finally, the membrane inserted ApoH will adjust its conformation and reside in the membrane. Our model concerning the membrane insertion of ApoH will have general interesting for it may help the further understanding of interaction between other protein and phospholipid membrane.

Key Words: apolipoprotein H, air/water phospholipid monolayer, phospholipid vesicle, phospholipid - protein interactions, membrane insertion.

缩 略 语 (Abbreviations)

ApoH	apolipoprotein H
DMPC	1,2 - dimyristoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphocholine
DPPC	1,2 - dipalmitoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphocholine
DOPC	1,2 - dioleoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphocholine
PC	phosphocholine
DMPS	1,2 - dimyristoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphoserine
DPPS	1,2 - dipalmitoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphoserine
DOPS	1,2 - dioleoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphoserine
PS	phosphoserine
DMPG	1,2 - dimyristoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphoglycerol
DPPG	1,2 - dipalmitoyl - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphoglycerol
PG	phosphoglycerol
CL	bovine heart cardiolipin
<i>n</i> - DPC	1 - palmitoyl - 2 - stearoyl - (<i>n</i> - doxyl) - <i>sn</i> - glycerol - 3 - phosphocholine
π_i	initial surface pressure
$\Delta\pi$	surface pressure increase
π_c	critical surface pressure
SPR	surface plasmon resonance
SUVs	small unilamellar vesicles
CD	circular dichroism

目 录

中文摘要	1
Abstract	3
缩略语	6
第1章 文献综述	1
§ 1.1 ApoH 及其分子结构简介	1
§ 1.1.1 ApoH 概述	1
§ 1.1.2 ApoH 的基因结构	2
§ 1.1.3 ApoH 的蛋白结构	2
§ 1.1.4 ApoH 的遗传多型性	7
§ 1.2 ApoH 的生理和病理	10
§ 1.2.1 ApoH 的主要生理功能	10
§ 1.2.2 与 ApoH 有关的一些病理现象	10
§ 1.2.3 ApoH 与自身免疫疾病	11
§ 1.3 ApoH 与磷脂膜作用的研究现状	13
§ 1.3.1 ApoH 与支撑膜的相互作用	13
§ 1.3.2 ApoH 与磷脂脂质体的相互作用	13
§ 1.4 本论文的研究工作	15
第2章 ApoH 的分离纯化及表征	17
§ 2.1 ApoH 的分离纯化	17
§ 2.1.1 仪器与材料	17
§ 2.1.2 实验步骤	18

§ 2.1.3 实验结果	19
§ 2.2 毛细管电泳方法测定 ApoH 的相对分子质量	22
§ 2.2.1 仪器与材料	22
§ 2.2.2 实验结果	22
§ 2.3 毛细管电泳方法测定 ApoH 的等电点	30
§ 2.3.1 仪器与材料	30
§ 2.3.2 实验结果	31
第3章 ApoH 与气/液界面脂单层膜的相互作用	36
§ 3.1 单分子层实验模型	37
§ 3.1.1 单分子层实验装置简介	37
§ 3.1.2 气/液界面脂单分子层实验方法	39
§ 3.1.3 实验材料与实验步骤	40
§ 3.2 ApoH 自发成膜性质的研究	42
§ 3.2.1 材料与方法	42
§ 3.2.2 ApoH 的自发成膜	42
§ 3.2.3 气/液界面 ApoH 分子面积的测定	43
§ 3.3 ApoH 插入气/液界面脂单层膜的研究	45
§ 3.3.1 ApoH 插膜的 $\pi-t$ 曲线	46
§ 3.3.2 ApoH 插膜对磷脂组成和状态的选择性	47
§ 3.3.3 亚相 pH 和离子强度条件对 ApoH 插膜的影响	52
§ 3.3.4 不同修饰状态的 ApoH 与磷脂膜作用的比较	58
§ 3.4 实验结果讨论	59
第4章 ApoH 与脂质体的相互作用	70
§ 4.1 材料与方法	70
§ 4.2 实验结果	74
§ 4.2.1 ApoH 的内源荧光光谱测定	74
§ 4.2.2 磷脂组分对 ApoH 与脂质体作用的影响	76
§ 4.2.3 环境温度对 ApoH 与脂质体作用的影响	78
§ 4.2.4 荧光能量转移方法研究 ApoH 与脂质体的相互作用	79
§ 4.2.5 疏水性自旋探针 5-, 7-, 12-Doxyl-PC 荧光猝灭实验	82
§ 4.2.6 不同修饰状态的 ApoH 与脂质体的相互作用	85
§ 4.3 讨论	87

第5章 膜结合态 ApoH 构象的研究	89
§ 5.1 材料与方法	89
§ 5.2 实验结果	91
§ 5.2.1 ApoH 与脂质体作用的 CD 光谱研究	91
§ 5.2.2 pH 条件对 ApoH 结构的影响	93
§ 5.2.3 Ca^{2+} 存在条件下 ApoH 与 PG/PC 脂质体的结合	94
§ 5.2.4 亚相离子对膜结合态 ApoH 的脱附	95
§ 5.2.5 碘离子和丙烯酰胺猝灭法研究 ApoH 与脂质体的 相互作用	98
§ 5.3 讨论	103
第6章 ApoH 在膜表面的构象与其插膜能力的关系	106
§ 6.1 材料与方法	106
§ 6.2 实验结果	108
§ 6.2.1 脂单层膜方法研究 ApoH 的插膜	108
§ 6.2.2 ApoH 在甲醇/水混合溶剂中的 CD 光谱	108
§ 6.2.3 经甲醇处理后的 ApoH 插入 DMPC 单层膜的研究	112
§ 6.2.4 毛细管电泳方法测定 ApoH 的界面浓度	114
§ 6.3 讨论	119
论文总结	121
参考文献	123
博士期间发表的学术论文	145
致谢	148

第1章

文献综述

§ 1.1 ApoH 及其分子结构简介

§ 1.1.1 ApoH 概述

载脂蛋白 H (apolipoprotein H, 简称 ApoH), 又称 β_2 - glycoprotein I (简称 β_2 - GPI), 是一种属于载脂蛋白家族的血浆糖蛋白。ApoH 对富含甘油三酯的脂蛋白有较高的亲和力, 并有在体外激活载脂蛋白酯酶的活力, 满足载脂蛋白的标准, 因此将其指认为载脂蛋白 (Lee et al., 1983)。该蛋白由 Schultze 等人于 1961 年首次报道 (Schultze et al., 1961)。人血浆中含有浓度约为 3 ~ 6 μmol 的 ApoH。与载脂蛋白家族的其他成员不同, ApoH 分子在水中几乎不缔合。经超离心分析, 其中的大部分 (约 60%) 位于不含脂蛋白的高密度梯度区域 ($d > 1.21 \text{ g/mL}$), 这部分 ApoH 呈水溶性状态在血浆中循环; 其余 40% 的 ApoH 主要存在于富含甘油三酯的乳糜微粒 (chylomicrons) 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 密度梯度段中 (Polz and Kostner, 1979)。

§ 1.1.2 ApoH 的基因结构

目前,牛 ApoH、小鼠 ApoH 和人 ApoH 的 cDNA 都得到了克隆 (Gao et al., 1993; Aoyama et al., 1989; Mehdi et al., 1991)。

Mehdi et al. 从两种途径得到了人 ApoH cDNA 的克隆:一是急性期病人的肝脏 cDNA,另一个是人肝癌细胞系 (HepG2) cDNA 库。

从 pTZ19 人肝 cDNA 库中筛选出反义克隆后,以 ApoH - 1 寡聚链为引物,采用双脱氧核糖核酸末端法测序 (Sanger et al., 1977)。该 cDNA 的有意链的阅读框架从 ApoH - 1 寡聚链中最后 22 个密码子,一个终止密码子及其后的 99 个核苷酸处开始 (图 1.1),而终止于 12 个腺嘌呤残基前,形成了一个多聚腺嘌呤尾链。蛋白质的转录起始于第 34 个核苷酸,在其上游第 10 个核苷酸处有一个断裂的终止码。这个终止码和第 1069 位的第一个终止码共同作用,构成一个含 345 个氨基酸残基的蛋白质。N 端包括了一个 19 个氨基酸残基的疏水多肽,在蛋白质分泌的过程中被清除,因而在成熟蛋白质中是不存在的。

为检验 ApoH cDNA 所转录的 mRNA 是否有功能,对转染的 COS - 1 细胞所合成的蛋白进行标记并作免疫电泳。阳性组检测到相对分子质量大约为 50 000 000 的蛋白质组分,而对照组 (无 ApoH 相应 mRNA 序列) 经检验没有发现此蛋白成分。

§ 1.1.3 ApoH 的蛋白结构

1. 一级结构

1984 年 Lozier 测定了 ApoH 分子的全序列 (图 1.2) (Lozier et al., 1984)。ApoH 分子是一个单链糖蛋白,人 ApoH 与来自小牛、小鼠、大鼠的 ApoH 具有高度的序列同源性 (Kato and Enjyoji, 1991; Bendixen et al., 1992; Nonaka et al., 1992; Aoyama et al., 1989)。人 ApoH 的表观相对分子质量为 54 000,含 326 个氨基酸

```

1 CCA CTT TGG TAG TGC CAG TGT GAC TCA TCC ACA ATG ATT TCT CCA
46 GTG CTC ATC TTG TTC TCG AGT TTT CTC TGC CAT GTT GCT ATT GCA
91 GGA CGG ACC TGT CCC AAG CCA GAT GAT TTA CCA TTT TCC ACA GTG
136 GTC CCA TTA AAA ACA TTC TAT GAG CCA GGA GAA GAG ATT ACG TAT
181 TCC TGC AAG CCG GGC TAT GTG TCC CGA GGA GGG ATG AGA AAG TTT
226 ATC TGC CCT CTC ACA GGA CTG TGG CCC ATC AAC ACT CTG AAA TGT
271 ACA CCC AGA GTA TGT CCT TTT GCT GGA ATC TTA GAA AAT GGA GCC
316 GTA CGC TAT ACG ACT TTT GAA TAT CCC AAC ACG ATC AGT TTT TCT
361 TGT AAC ACT GGG TTT TAT CTG AAT GGC CTT GAT TCT GCC AAG TGC
406 ACT GAG GAA GGA AAA TGG AGC CCG GAG CTT CCT GTC TGT GCT CCC
451 ATC ATC TGC CCT CCA CCA TCC ATA CCT ACG TTT GCA ACA CTT CGT
496 GTT TAT AAG CCA TCA GCT GGA AAC AAT TCC CTC TAT CGG GAC ACA
541 GCA GTT TTT GAA TGT TTG CCA CAA CAT GCG ATG TTT GGA AAT GAT
586 ACA ATT ACC TGC ACG ACA CAT GGA AAT TGG ACT AAA TTA CCA GAA
631 TGC AGG GAA GTA AAA TGC CCA TTC CCA TCA AGA GCA GAC AAT GGA
676 TTT GTG AAC TAT CCT GCA AAA CCA ACA CTT TAT TAT AAG GAT AAA
721 GCC ACA TTT GGC TGC CAT GAT GGA TAT TCT CTG GAT GCC CCG GAA
766 GAA ATA GAA TGT ACC AAA CTG GGA AAT TGG TCT GCC ATG CCA AGT
811 TGT AAA GCA TCT TGT AAA GTA CCT GTG AAA AAA GCC ACT GTG GTG
856 TAC CAA GGA GAG AGA GTA AAG ATT CAG GAA AAA TTT AAGAAT GGA
901 ATG CTA CAT GGT GAT AAA GTT TCT TTC TCT TGC AAA AAT AAG GAA
946 AAG AAG TGT AGC TAT ACA GAG GAT GCT CAG TGT ATA GAT GGC ACT
991 ATC GAG GTC CCC AAA TGC TTC AAG GAA CAC AGT TCT CTG GCT TTT
1036 TGG AAA ACT GAT GCA TCC GAT GTA AAG CCA TGC TAA GGT GGT TTT
1081 CAG ATT CCA CAT AAA ATG TCA CAC TTG TTT CTT GTT CAT CCA AGG
1126 AAC CTA ATT GAA ATT TAA AAA TAA AGC TAC TGA ATT TAT TGC CGC
1171 AAA AAAAAA AAA 1182

```

图 1.1 ApoH 的 cDNA 序列 (Mehdi et al., 1991)

残基和 5 条以葡萄糖胺与氨基酸主链相连的寡糖侧链,侧链占蛋白相对分子质量的 19%,由半乳糖、N-乙酰葡萄糖、岩藻糖及 N-乙酰神经氨酸组成 (Lozier et al., 1984; Kristensen et al., 1991;

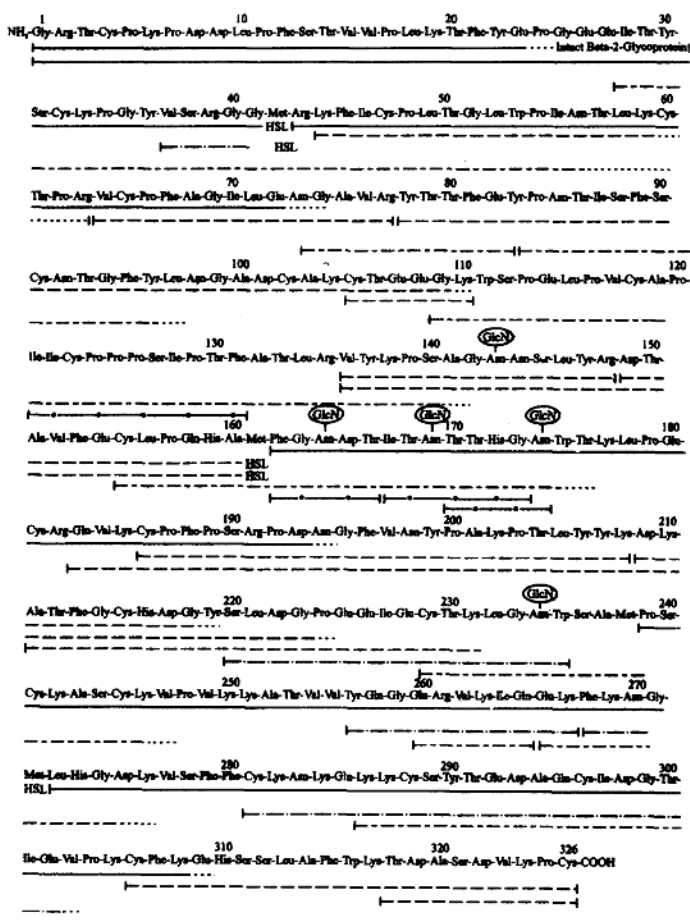


图 1.2 ApoH 的氨基酸全序列 (Lozier et al., 1984)

Mehdi et al., 1991; Steinkasserer et al., 1991)。图 1.3 是 ApoH 的结构模型图。ApoH 富含 Cys(6.2%) 和 Pro(8.3%), 其氨基酸

序列的显著特征是 Cys - Pro 连接按一定间隔连续出现:4 ~ 5、65 ~ 66、123 ~ 124、186 ~ 187。经计算机分析其序列,发现 5 个连续的同源片段,其中 Cys、Pro 和 Trp 高度保守。这暗示 ApoH 基因可能由一个编码 60 个氨基酸残基的基因多次重复而成(图 1.4)。

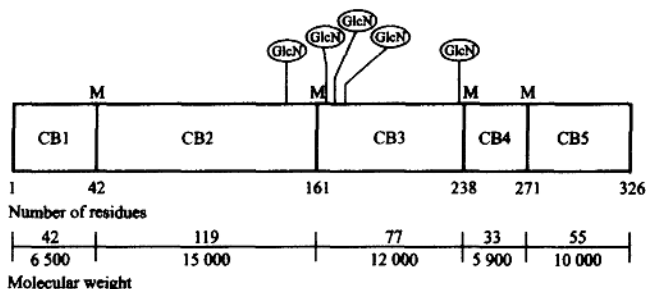


图 1.3 ApoH 的结构模型:5 个 CNBr 片段 (CB1—5) 和 5 条寡糖链 (GlcN)

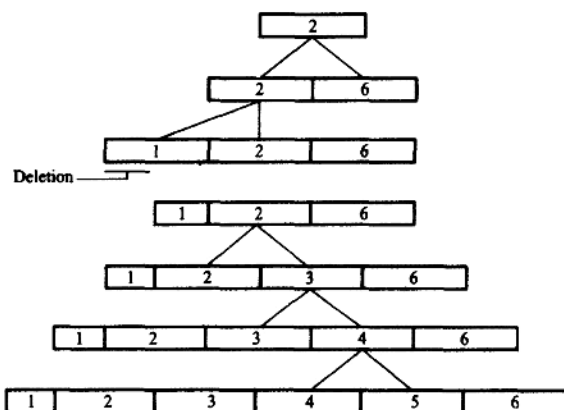


图 1.4 ApoH 进化顺序示意图

2. 高级结构

ApoH 分子内部含有 5 个重复的序列片段, 前 4 个片段(Domain I~IV)均由约 60 个氨基酸残基构成, 内部包含 2 对二硫键, 形成典型的“Sushi”结构(Ichinose et al., 1990)(如图 1.5 所示)。第 5 个重复片段(Domain V)由约 80 个氨基酸残基构成, 并含有 3 对二硫键。由于该重复片段中的 2 对二硫键的定位与前 4 个片段相同, 因此该片段也具有“Sushi”结构的特性。

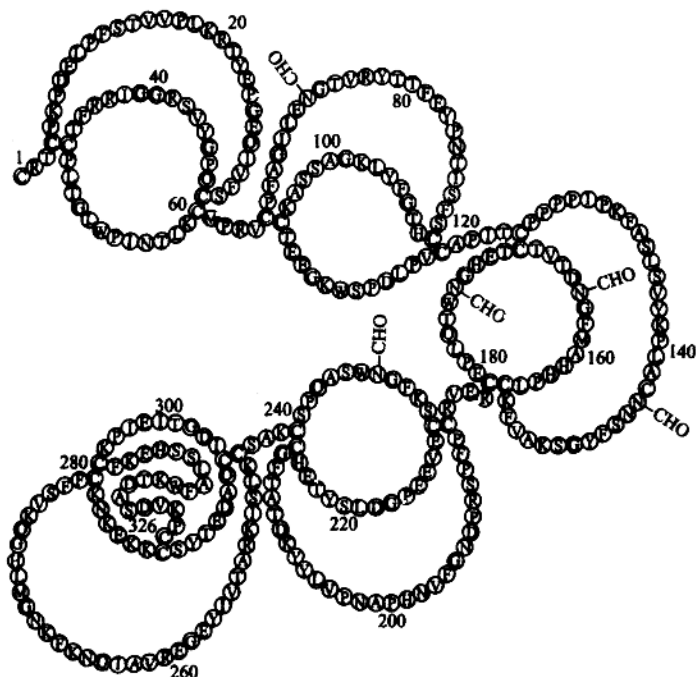


图 1.5 ApoH 的 Sushi 结构示意图

目前, 运用 NMR 技术已经解出了人补体因子 H 等 3 种具有“Sushi”结构的蛋白质的溶液构象(Norman et al., 1991; Barlow et