

• 综述 •

二硫键和巯基在蛋白质结构功能中的作用及分析方法

田 悦, 杜军保

(北京大学第一医院 儿科, 北京 100034)

Effect of Disulfide Bond and Mercapto - Group on Structure and Function of Protein and Analytical Method

TIAN Yue, DU Jun - bao

(Department of Pediatrics Peking University First Hospital Beijing 100034, China)

摘要: 本文总结了二硫键和巯基在稳定蛋白质结构、实现蛋白质功能中的主要作用及二硫键和巯基在体内外各种条件下相互转化的影响因素。本文还综述了拉曼光谱这一结构生物学中重要研究手段的原理及在二硫键和巯基研究领域中的应用。

实用儿科临床杂志, 2007, 22 (19): 1499 - 1501

关键词: 二硫键; 巯基; 蛋白质; 拉曼光谱

中图分类号: R729

文献标志码: A

文章编号: 1003- 515X(2007) 19- 1499- 03

生物体是由多种物质组成的。其中既有水和金属离子等小分子物质, 又有核酸和蛋白质等生物大分子物质。蛋白质是由氨基酸聚合而成的生物大分子化合物, 为生命的最基本物质之一。蛋白质广泛存在于各种生物组织细胞, 是生命活动的物质基础, 生命活动几乎均是通过蛋白质实现的, 部分蛋白质在生物体内是结构物质, 部分蛋白质在生物体内是功能物质。二硫键等基团间的相互作用为蛋白质产生维持高级结构和功能提供基础。半胱氨酸残基中的巯基是所有蛋白质氨基酸残基中最活泼基团, 在体内多种反应中扮演着至关重要角色。二硫键与巯基间也可借氧化还原反应相互转化。

一、二硫键在维持蛋白质结构作用

二硫键是一种共价键。多数蛋白质具有二硫键。二硫键的形成使蛋白质肽链的空间结构更为紧密。王建丽等^[1]以二硫键稳定单链抗体融合 PE38 基因表达载体, 实现其高效表达, 可增强此抗体蛋白产物稳定性, 提高其抗肿瘤活性。二硫键也可具有不同的空间构型, 因此形成二硫键的 2 个半胱氨酸残基所在肽段的相对构象, 也可因为二硫键构型不同而改变。这从另一方面突出二硫键在蛋白质立体结构中的重要性^[2]。实验证明, 蛋白质中的二硫键经还原反应形成巯基后, 蛋白质构象将变得松散。经重新氧化后, 二硫键又可重新形成。当条件合适时, 二硫键可按照原来的配对进行组合, 这样形成的蛋白质可与天然蛋白质一样, 既有正确的空间构象, 又具有原来蛋白质的生物活性。这一过程被成为蛋白质氧化重折叠。关于这方面经典研究主要集中在牛胰蛋白酶抑制剂 (BPTI)^[2]和凝乳酶原。张渝英等^[3]实验证明蛋白质氧化重折叠的机制可从 2 个侧面去分析。

1 在蛋白质氧化重折叠过程中, 二硫键形成的基本规律

在满足二硫键形成的化学反应的条件下, 在还原、伸展的肽链折叠的早期, 二硫键形成基本上是一个随机过程, 因此形成不同巯基组合的分子群, 各种异构体缺乏稳定结构, 随

着进一步氧化与折叠, 二硫键形成越来越受肽链构象制约, 仅那些有一定柔性的类天然构象才可使相关的巯基相互靠拢、正确取向, 并有利于巯基 - 二硫键交换反应进行, 从而促进天然二硫键进一步形成。

2 就天然构象的恢复而言, 二硫键不仅能稳定天然构象, 且还能引导进一步氧化与折叠的发生。另外含有二硫键的蛋白在体外缓慢自发折叠 (数小时至数天或不能自发折叠) 与其在体内大量分泌所需时间 (30~ 60 min) 不相对应。这些问题真核细胞通过在特定氧化还原环境的内质网中装备催化二硫键形成和异构的催化剂来解决^[4]。

二、巯基对于蛋白质结构功能影响

半胱氨酸残基中的巯基是所有蛋白质氨基酸残基中最活泼的基团, 在体内参抗氧化、亚硝基化和巯基 - 二硫键交换等多种重要生理反应。

1 巯基的抗氧化作用 谷胱甘肽 (GSH) 是由谷氨酸、甘氨酸和半胱氨酸组成的三肽, 其中半胱氨酸的巯基是其最重要的功能基团。GSH 的巯基维持细胞的正常代谢与保护细胞膜的完整性, 并能结合亲电子基, 重金属离子与氧自由基等有害物质, 具有抗脂质过氧化作用, 可直接使氧自由基还原或促进超氧化物歧化酶合成^[5-9]。另外, 由于巯基的抗氧化作用, 现已证明 GSH 水平下降是诱导细胞发生凋亡的重要因素。细胞发生凋亡前有 GSH 水平下降, 耗竭细胞内 GSH 可诱导多种细胞发生凋亡^[10-12]。

2 巯基的亚硝基化 巯基的亚硝基化主要是指与气体信号分子一氧化氮 (NO) 反应。这也是 NO 在体内发挥生理作用的机制之一。Stanler 等^[13]研究发现, 蛋白质巯基被 NO 或其衍生物修饰可发挥 NO 的生物活性, 且使 NO 更稳定; 并于 1994 年首先提出蛋白质巯基亚硝基化修饰概念。后续研究不断证实蛋白质的巯基亚硝基化修饰影响其在细胞内的活性和功能, 如核转录因子 (NF- κ B) 的一个亚基巯基亚硝基化影响其与 DNA 结合, 蛋白质巯基亚硝基化修饰能活化钙离子通道, 天门冬氨酸受体 (NMDAR) 蛋白质巯基亚硝基化影响相关信号通路, 蛋白质巯基亚硝基化调控 Caspase 酶活性, 用 Fas 处理细胞, Caspase-3 发生去亚硝基化后活化, 诱导细胞凋亡^[14]。

3 巯基 - 二硫键交换反应对细胞信号分子影响 人热休克转录因子 1 (heat shock transcription factor 1, HSF1) 的结构

收稿日期: 2007- 08- 10。
基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目资助 (2006CB503807); 国家自然科学基金重点项目资助 (30630031); 国家杰出青年科学基金项目资助 (30425010)
作者简介: 田 悦, 女, 博士生, 研究方向为心肺血管疾病。
通讯作者: 杜军保, 男, 教授, 长江学者, 博士生导师, 电子信箱 junbaodu@htrol.cn.net

和功能与其半胱氨酸残基氧化还原化学性能相关。林正等^[15]研究结果提示,与野生型一样,HSF1 半胱氨酸突变体均能被热激活并与 DNA 结合。在氧化条件下 HSF1 中的半胱氨酸残基 C153 可能与 C373 或 C378 形成分子内二硫键交联,使 HSF1 不能被激活。

HSF 中功能集团巯基氧化还原状态对其结构功能产生了关键性影响。对于其他含有巯基(或二硫键)的蛋白质,通过改变其巯基(或二硫键)氧化还原状态,同样会产生结构功能相应变化。对于新型气体信号分子硫化氢的作用机制也有望在此方面取得一定进展。

三、巯基与二硫键的相互转化

体内含有巯基的功能蛋白主要是通过巯基与二硫键的相互转化来实现其功能的。在体内和人工条件下,二者之间实现着互相转化的过程。

在体内自然状态下,二硫键与巯基的相互转化主要是通过巯基/二硫键氧化还原酶的催化而实现的。天然二硫键的形成是许多蛋白正确折叠中的限速步骤,在稳定蛋白质构象和保持蛋白质活性方面起重要作用。二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)是内质网中一种重要的蛋白折叠催化剂。PDI 广泛应用于基因工程,提高外源蛋白表达水平。PDI 是巯基/二硫键氧化还原酶—硫氧还蛋白超家族(thioredoxin superfamily)中功能最多成员^[16]。

在体外人工环境下,从氨基酸水平来看,半胱氨酸在碱性溶液中易被氧化形成二硫键,生成胱氨酸。氧化和还原剂均可打开二硫键。在研究蛋白质结构时,氧化剂过甲酸可定量拆开二硫键,生成相应磺酸。还原剂如巯基乙醇、巯基乙酸也能拆开二硫键,生成相应巯基化合物。由于半胱氨酸中巯基很不稳定,极易氧化,因此利用还原剂拆开二硫键时,往往进一步用碘乙酰胺、氯化苄、N-乙基丁烯二亚酰胺和对氯汞苯甲酸等试剂与巯基作用,将其保护起来,防止其重新氧化。

四、拉曼光谱技术在二硫键和巯基研究领域中的应用

拉曼光谱技术早在 20 世纪 30 年代就诞生了,直到近年来共振拉曼光谱,表面增强拉曼光谱,傅立叶变换拉曼光谱等一系列新技术的出现,才正式揭开了拉曼光谱在分子生物学领域应用黄金时代。

1 拉曼光谱技术原理 每一个不同的分子均有其独一无二的振动指纹,这是现代振动光谱学的基础。拉曼光谱就是用一束光照射样品溶液或晶体来分析其散射的光子。处在基态的样品分子在受到一定能量的外来光子的激发后,其能态上升至一个不稳定的中间状态,样品分子在离开这个中间状态时随即辐射光子。如光子与样品分子间发生弹性散射,则散射光频率与入射光频率相同,称之为瑞利(Rayleigh)散射;如受激分子跃迁到一个较基态能量高的某一振转能级,此时光子为非弹性散射,损失能量,散射光频率低于入射光频率,称之为斯托克斯(Stokes)散射,反之,如散射光频率高于入射光频率,则称为反斯托克斯散射。拉曼实验通常应用的时斯托克斯效应。拉曼光谱中的这些非弹性散射的光子提供了与分子振动和转动密切相关信息,反之,这些信息

也反映分子构象及其所处的环境状态^[17]。

2 二硫键的拉曼光谱表现 由于二硫键 S-S 伸缩振动的频率对它所处的构象非常敏感,因此拉曼光谱可作为二硫键构象研究的探针。在蛋白质和多肽的拉曼光谱中, S-S 和 C-C 的伸缩振动谱带出现在 500~700 cm^{-1} 。其中 C-C-S-S-C-C 键因峰值不同可能有 3 种构型: ~510 cm^{-1} , ~525 cm^{-1} , ~540 cm^{-1} , 分别是 C-C-S-S-C-C 键的扭曲扭曲扭曲式、扭曲扭曲-反式和反式扭曲-反式构象。

如人血清清蛋白(HSA)是人血浆中水平最高的蛋白质。整个 HSA 分子富含半胱氨酸(6%),除 1 个半胱氨酸外,其他半胱氨酸形成 17 个二硫键。郭建宇等^[18]通过单独测量清蛋白拉曼光谱谱带和测量与 3-氨基吡啶作用后的清蛋白的谱带的实验证实:在 502 和 526 cm^{-1} 分别有二硫键的特征峰,通过峰的强度比值计算 HSA 的 17 个二硫键有 12 个为扭曲扭曲扭曲构象和 5 个扭曲扭曲-反式构象。当 HSA 与 3-氨基吡啶作用后,位于 526 cm^{-1} 的峰消失,在 540 cm^{-1} 出现新的拉曼峰,说明二硫键构象发生改变,变为扭曲扭曲扭曲和反式扭曲-反式两种构象。由峰的强度比值计算,12 个为扭曲扭曲扭曲构象,有 5 个是反式扭曲-反式构象^[18]。

3 巯基的拉曼光谱表现及其应用 对于巯基在拉曼光谱方面研究主要集中在含巯基的芳香族化合物上^[19]。根据李晓伟等^[20]研究,巯基与银反应生成牢固的 -SAg 键,失去了原有的特征性巯基氢键,其光谱特点发生明显改变:例如苯硫酚原本高频区位于 2569 cm^{-1} 的巯基谱峰完全消失,与之相应低频区 231 cm^{-1} 处出现 -SAg 键的特征振动峰。

正是由于二硫键和巯基在蛋白质的结构功能方面起重要作用,对二者研究逐渐成为近年来蛋白质分子结构方面研究热点。拉曼光谱作为重要研究结构生物学的手段,又因为其在研究二硫键和巯基领域独特优势,将被越来越多的应用于这二者研究。希望本文可为日后研究细胞膜表面离子通道的构象和气体信号分子作用机制方面研究奠定基础。

参考文献:

- [1] 王建丽,郑玉玲,王保莉,等.二硫键稳定单链抗体融合 PE38 免疫毒素的构建及活性分析[J].细胞与分子免疫学杂志,2006,22(1): 74-77.
- [2] 冯慧星,黄力勤,龚睿,等.分子内二硫键对 HERV 囊膜蛋白融合核心结构的影响[J].中国病毒学,2005,21(5): 437-442.
- [3] 张渝英,杨开宇.蛋白质的氧化重折叠[J].生物工程学报,2003,19(1): 1-8.
- [4] Winter J, Klappa P, Freedman RB *et al*. Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin[J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 310-317.
- [5] 张春晶,于海涛,邹朝霞,等.谷氨转蛋白的生物学活性及其与人类疾病的关系[J].生命的化学,2006,26(2): 163-165.
- [6] 张国顺,李玉林.还原型谷胱甘肽治疗急性胰腺炎肝损害 35 例疗效观察[J].山东医药,2007,47(7): 40.
- [7] 张向东,赵建美.还原型谷胱甘肽对 62 例新生儿缺氧缺血性脑病的治疗效应[J].南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(2): 182-183.
- [8] 张红梅,夏枚生,胡彩虹.纳米硒对断奶仔猪肝脏谷胱甘肽过氧化物酶和脱碘酶 I 活性的影响[J].生物医学工程学杂志,2007,24(1): 153-156.
- [9] 刘爱翔.还原型谷胱甘肽治疗颅脑损伤肝损害的临床研究[J].军医进修学院学报,2007,28(1): 31-32.
- [10] 孟小芹,曹绍岐,叶华茂.还原型谷胱甘肽治疗肾病综合征临床观察[J].山东医药,2007,47(1): 48.

[11] 吕黄伟,冯娅妮,王俊科,谷胱甘肽对人离体嗜中性白细胞超氧阴离子产生和清除的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2006 35 (6): 634-636

[12] 刘 莉,徐兆发,贾 克,等.谷胱甘肽与 α 硫辛酸对锰致大鼠神经元凋亡影响 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22 (10): 1239- 1240

[13] Stan ler JS. Redox signaling Nitrosylation and related target interaction of nitric oxide [J]. *Cell*, 1994 78 (6): 931- 936.

[14] 陈 畅,黄 波,韩佩韦,等.蛋白质巯基亚硝基化——一种典型的氧化还原依赖的蛋白质翻译后修饰 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33 (7): 609- 615

[15] 林 正,黄 帆,马中富,等.氧化还原作用对热休克转录因子 1 结构和功能的调控 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2003 35 (6): 542-547

[16] Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function [J]. *Trends Biochem Sci* 2003, 28 (4): 210- 214

[17] Gray WR. Disulfide structures of highly bridged peptides: A new strategy for analysis [J]. *Protein Sci*, 1993 2 (10): 1732- 1748

[18] 郭建宇,孙真荣,吴良平,等.人血清白蛋白与 3- 氨基吡啶相互作用的拉曼光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2006 26 (3): 460-462

[19] 彭红军,周光明,黄 成,等.拉曼光谱技术在生物体系研究中的应用 [J]. 化学通报, 2005, 68 542- 547.

[20] 李晓伟,郑军伟,周耀国,等.苯硫酚及其衍生物在银电极表面的吸附取向 [J]. 分析化学, 2003, 31 (11): 1333- 1336

(本文编辑: 张耀东)

(上接第 1466 页) 身高 107 cm, 呼吸 24 次 / min, 血压 100/60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 神清, 生长发育营养正常, 无发绀、水肿, 心界不大, 心尖搏动呈抬举性, 心率 92 次 / min, 心音有力, 肺动脉第二心音明显亢进, 双肺无殊, 肝脏不大, 无杵状指 (趾) 。实验室检查: Hb 166 g/L, RBC $5.88 \times 10^{12} L^{-1}$, WBC $7.07 \times 10^9 L^{-1}$, PLT $112 \times 10^9 L^{-1}$; CRP < 8 mg/L, ESR 5 mm/1 h 全血生化正常; 类风湿因子、抗核抗体、抗中性粒细胞胞浆抗体均阴性, 补体 C₃、C₄ 及 N 末端脑利钠肽正常。血气分析: 动脉血血氧饱和度 99% 。心电图: 电轴右偏, 右心室肥大; 超声心动图: 右心房、右心室扩大, 右心室肥厚、三尖瓣中度返流, 估测肺动脉收缩压 (PASP) 85 mmHg X 线胸片: 肺动脉段突出, 右心缘饱满; 肺部 CT: 肺动脉扩张; 腹部超声未见异常; 脑电图正常。入院第 10 天予华法林 1 mg/d 和西地那非 (100 mg 片, 美国辉瑞公司生产, 生产批号: 65883009) 治疗。西地那非起始剂量 0.5 mg/(kg · 次), 1 周内逐渐加量至 1.6 mg/(kg · 次), 4 次 /d 口服, 用药后患儿双手掌潮红, 心率、血压无明显变化, 服药 2 周活动后气促明显好转, 复查超声估测 PASP 71 mmHg 服药 3 个月 PASP 65 mmHg 服药 6 个月为 68 mmHg 服药 9 个月行右心导管检查测 PASP 62 mmHg 全肺阻力 3.6 Wood 单位 /m², 肺毛细血管嵌压 5 mmHg 并除外先天性心脏病。目前患儿已服用西地那非 10 个月, 无不适, 活动后气促不明显, 未限制活动, 未再发生晕厥。

讨 论

患儿以反复晕厥入院, 查体肺动脉第二心音亢进, 超声心动图检查提示肺动脉压力升高, 心导管测定 PASP > 30 mmHg 故肺动脉高压 (PH) 诊断成立, 患儿临床表现及辅助检查结果均支持诊断。患儿有晕厥症状, 按 WHO PH 分级标准为 3 级 PH。患儿超声心动图及心导管检查除外先天性心脏病, 无左心衰竭, 肺部 CT 除肺血管发育畸形及肺实质病变, 临床及实验室检查除结缔组织病、免疫性血管炎等导致 PH 疾病, 故特发性 PH (PH) 诊断成立。PH 为少见病, 病因不明, 预后较差, 其主要病理生理为肺小动脉管壁增厚及管腔狭窄, 肺血管阻力进行性升高, 致右心衰竭而死亡。本病治疗主要为扩张肺血管, 既往用扩血管药物钙通道阻滞剂有效率较低, 且无肺血管选择性, 易造成低血压等不良反应; 前列

环素类药物及内皮素受体拮抗剂价格昂贵, 且前者需持续静脉输注或频繁雾化吸入给药, 不适于长期使用。西地那非是 5 型磷酸二酯酶 (PDE5) 抑制剂, 能选择性抑制 PDE5 减少环磷酸鸟苷 (cGMP) 降解, 增强一氧化氮 (NO) 扩血管作用, 由于肺动脉平滑肌细胞中也存在丰富 PDE5, 因而西地那非可选择性扩张肺动脉, 降低肺血管阻力, 初步证实西地那非用于 PH 中长期治疗是安全有效的^[1]。迄今最有力证据来自于一项对世界各地 53 个医疗机构共 278 例 PH 患者在内的多中心随机双盲安慰剂对照研究, 研究中患者分 3 组, 分别服用西地那非 20、40、80 mg 3 次 /d 用药 4 周各组 6 min 步行距离即较对照组显著增加, 用药 12 周肺血管阻力及肺动脉平均压均显著下降, 心排出量显著增加, 80 mg 组用药 12 个月时 6 min 步行距离仍保持稳定, 根据此项研究结果, 美国食品与药品监督管理局于 2005 年 6 月正式批准西地那非用于治疗 PH^[2]。目前已有西地那非治疗儿童 PH 报道, Hump^[3]用西地那非 1 mg/(kg · 次), 4 次 /d 治疗吸入 NO 无反应和对钙通道阻滞剂疗效不满意的 PH 及先天性心脏病相关 PH 患儿 14 例, 服药后 6 周时 6 min 步行距离即由用药前 278 m 延长到 331 m, 服药 6 个月延至 443 m, 并在此后 0.5 a 保持稳定, 平均服药 10.8 个月 PASP 由 86 mmHg 下降至 70 mmHg 肺血管阻力由用药前 15 Wood 单位 /m² 降至 12 Wood 单位 /m², 而心指数及血压无明显变化, 且未出现明显不良反应。本例服用西地那非 2 周即有临床症状改善和 PASP 下降, 用药 3~9 个月维持稳定, 用药过程中患儿无不适, 结合文献及本例经验, 西地那非用于儿童 PH 安全有效, 应进一步评价本药远期疗效。

参考文献:

[1] Hennes AR, Champion HC. Sildenafil a PDE5 inhibitor in the treatment of pulmonary hypertension [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2006 4 (3): 293- 300

[2] Galis N, Ghojani HA, Torbicki A, et al. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353 (20): 2148- 2157

[3] Hump^l T, Reyes JT, Holby H, et al. Beneficial effect of oral sildenafil therapy on childhood pulmonary arterial hypertension Twelve-month clinical trial of a single-drug open-label pilot study [J]. *Circulation*, 2005 111 (24): 3274- 3280

(本文编辑: 范艳芬)