

• 医学与免疫生物技术 •

血浆糖蛋白 β_2 -GPI 分子结构域与 ox-LDL 结合机制

张鹤¹, 李敬达¹, 陈阿梅², 刘庆平¹

1 辽宁省糖脂代谢研究重点实验室 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116000

2 内蒙古医科大学 组织胚胎教研室, 内蒙古 呼和浩特 010000

张鹤, 李敬达, 陈阿梅, 等. 血浆糖蛋白 β_2 -GPI 分子结构域与 ox-LDL 结合机制. 生物工程学报, 2017, 33(1): 122–131.
Zhang H, Li JD, Chen AM, et al. Binding of glycoprotein β_2 -GPI with oxidized low density lipoprotein. Chin J Biotech, 2017, 33(1): 122–131.

摘要: 通过酵母重组 $P.r\beta_2$ -GPI-DV (β_2 糖蛋白 I 第 5 结构域) 蛋白的荧光、圆二色谱及分子对接模拟, 分析血浆糖蛋白 β_2 -GPI-DV 分子结构域与 ox-LDL 的结合机制。SDS-PAGE、Western blotting 验证重组蛋白 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 表达正确性及纯度; 荧光、圆二色光谱、分子对接模拟解析重组蛋白与 oxLDL、oxLDL 配体 oxLig-1 可能存在的结合机制和位点。SDS-PAGE、Western blotting 显示, 在 12 kDa 大小处有目的蛋白存在且与特异性抗体结合; 荧光、圆二色谱的发色基团、二级结构的变化趋势及分子对接模拟结果揭示, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 的 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 和 Leu313-Ala-Phe-Trp316 区域组成的活性口袋与 oxLig-1 的 ω -COOH 羧基是实现二者结合的关键。以上结果表明, β_2 -GPI 通过其第 5 结构域 (DV) 的赖氨酸阳性区域与 ox-LDL 的 ω -COOH 基团识别结合, 为血清中 β_2 -GPI 特异性结合 ox-LDL 的机制研究提供理论依据。

关键词: β_2 -糖蛋白 I, 重组 β_2 -GPI 第五结构域, 氧化低密度脂蛋白, oxLig-1 配体, 结合机制

Received: April 29, 2016; **Accepted:** November 21, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81270361).

Corresponding author: Qingping Liu. Tel: +86-411-88709369; E-mail: qingpingliu40@126.com

国家自然科学基金 (No. 81270361) 资助。

Binding of glycoprotein β_2 -GPI with oxidized low density lipoprotein

He Zhang¹, Jingda Li¹, Amei Chen², and Qingping Liu¹

¹ Key Laboratory of the Glucolipid Metabolism, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116000, Liaoning, China

² Department of Histology and Embryology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, Inner Mongolia, China

Abstract: We analyzed the binding of *P.r* β_2 -GPI-DV with ox-LDL by fluorescence, molecular simulation and circular dichroism. We used SDS-PAGE and Western blotting to identify the purity of *P.r* β_2 -GPI-DV, fluorescence, circular dichroism spectroscopy and molecular docking simulation to analyze the binding between *P.r* β_2 -GPI-DV and oxLDL. *P.r* β_2 -GPI-DV was specifically recognized by anti-His antibody at 12 kDa position. The chromophoric groups, the changes of secondary structure and the molecular docking simulations revealed that the active pocket formed by Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 and Leu313-Ala-Phe-Trp316 of *P.r* β_2 -GPI-DV and the -COOH carboxyl of oxLig-1 were the key for binding. *P.r* β_2 -GPI combined with ox-LDL via the fifth functional domain and the -COOH group. Our findings provide theoretical basis to further study the binding between β_2 -GPI and ox-LDL in serum.

Keywords: β_2 -glycoprotein I, recombinant fifth domain of β_2 -glycoprotein I, oxidized low density lipoprotein, 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate ligand, binding mechanism

β_2 糖蛋白 I (β_2 -glycoprotein I, β_2 -GPI) 是一种血浆中的单糖链蛋白, 由 326 个氨基酸残基组成, 包含 4 个短的重复结构域 (SCR) 和在 C 端的第 5 个结构域。其中第 5 结构域由 86 个氨基酸残基组成, 4 个反向平行的 β 折叠和 2 个短的 α 螺旋形成一个中心, 在该区末端形成一个约 20 个氨基酸残基组成的疏水袢^[1]。在功能上 β_2 -GPI 能与多种带负电的物质结合, 如磷脂 (Phospholipids, PL)、心磷脂 (Cardiolipin, CL)、氧化低密度脂蛋白 (Oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、肝素、活化血小板的膜和凝血酶原等, 在与阴性电荷物质相互结合的过程中, 其第 5 结构域发挥着关键作用。Hunt、蔡国平以及 Haider 等分别应用基因突变手段, 证实了第 5 功能域中发挥结合活性的片段, 也证实了 DV 就是其与阴性离子如心磷脂

(Cardiolipin, CL) 结合的关键结构域^[2-4]。2011 年, Kolyada 等成功应用原核体系表达并结晶了重组 β_2 -GPI-DV 蛋白, 并提出 284、286 和 287 位的赖氨酸残基是与肝素形成氢键结合的关键位置^[5]。2014 年, Li 等用酵母重组表达 β_2 -GPI 第 5 结构域 (*P.r* β_2 -GPI-DV), 研究发现其特异性结合系统性红斑狼疮 (SLE) 和抗磷脂综合征 (APS) 患者血清 ox-LDL, 进一步显示了 β_2 -GPI 第 5 结构域 DV 特异性结合 ox-LDL 的结构特征, 但其结合的分子结构基础以及具体结合位点并未详尽地研究分析^[6]。2001 年, Kobayashi 等在划分 ox-LDL 脂类成分时, 分离出一种能与 β_2 -GPI 结合的特异配体, 分析其成分为 7-酮基胆固醇-9-羧基壬酸酯 (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate, oxLig-1), 并证实了该配体在连接 β_2 -GPI 和 ox-LDL 的过程中起到了关键

作用^[7]。Huang 等首次在国内合成 oxLig-1, 并揭示 oxLig-1 作为 ox-LDL 的表位结构, 在 ox-LDL 与血液中 β_2 -GPI 形成复合物参与动脉粥样硬化、系统性红斑狼疮、血栓进程中发挥重要作用^[8]。

以往研究揭示, 血液中高浓度的 β_2 -GPI 与 ox-LDL 的复合物严重危害人类的健康^[9-11]。由于 ox-LDL 复合物的特性, 国内很少关于 β_2 -GPI 与 ox-LDL 结合机制分析的研究报道。因此, 本文将应用荧光光谱 (Fluorescence spectrum)、圆二色 (Circular dichroism) 及分子模拟 (Molecular docking) 对接技术, 通过实验室酵母重组表达的 *P.r* β_2 -GPI-DV 蛋白和实验室自主合成的特异性配体 oxLig-1 对 β_2 -GPI 与 ox-LDL 的结合机制进行分析, 为研究血液中 β_2 -GPI/ox-LDL 复合物的形成机制及以该复合物为靶点的研究提供理论数据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

P.r β_2 -GPI-DV 蛋白的 *Pich* 酵母表达菌株 X-33 由本实验室构建保存; Cu^{2+} -ox-LDL 由本实验室使用铜离子自行氧化获得; LDL 购于北京协生生物科技有限公司; 心磷脂 (CL) 购于德国 Sigma 公司; 氧化低密度脂蛋白的脂类成分 oxLig-1 由本实验室化学合成获得。重组蛋白的缓冲稀释液 PB (0.05 nmol/L, pH 7.4) 及溶解脂类物质的无水乙醇 (分子级别) 均购于上海生工。分子模拟软件 AutoDock 4.2.6, 圆二色光谱仪 J-810 为日本 Jasco 公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 *P.r* β_2 -GPI-DV 重组蛋白的表达纯化

P.r β_2 -GPI-DV 的表达纯化按照实验室前期

建立的表达进行^[6]。取 X-33 酵母表达菌株接种于 BMGY 生长培养基, 30 °C、220 r/min 过夜培养 24 h; 将过夜培养酵母菌以 1 : 100 扩大培养至 1 L BMGY 中, 30 °C、220 r/min 过夜培养 24 h; 将菌液 1 : 50 的比例浓缩至 200 mL 的 BMMY 诱导培养基中, 每天补加 1.5% 甲醇诱导剂, 30 °C、220 r/min 连续培养 96 h。之后, 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min, 取菌液上清, 经镍柱亲和和层析的方法对重组蛋白进行纯化。

1.2.2 SDS-PAGE 和 Western blotting

取 15 μg 纯化后的蛋白, 加适量的上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 离心 1 min。按照常规方法进行 15% SDS-PAGE 电泳, 一块胶进行考马斯亮蓝染色, 一块电转于醋酸纤维素膜上进行免疫杂交。加鼠抗的抗 His 抗体 (1 : 1 000) 进行孵育, 洗膜后再加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1 : 3 000) 二抗孵育, 最后加显色液显色, 拍照。

1.2.3 荧光光谱检测

荧光光谱检测条件: 狭缝宽度 3 mm、5 mm, 激发光波长 280 nm, 检测波长 290–500 nm, 扫描速度为 500 nm/min; 响应时间 2 s; 检测灵敏度为中等。将纯化好的 *P.r* β_2 -GPI-DV 蛋白溶剂换成 0.2 mol/L 的 PBS 缓冲溶液, 蛋白浓度确定为 1 mg/mL; 取 1.2 mL 配制好的蛋白溶液置于 1 cm 的石英比色皿中, 置于 UV-Vis 吸收光谱仪中测定; 将比色皿中的溶液取出加入 10 μL 的 oxLig-1, 37 °C 孵育 30 min, 再次置于 UV-Vis 吸收光谱仪中测定; 在此基础上在溶液中加入 10 μL 的心磷脂, 37 °C 孵育 30 min, 置于 UV-Vis 吸收光谱仪中测定。

1.2.4 圆二色谱检测

圆二色可以灵敏地反映出蛋白的构象变

化,已广泛用于蛋白质二级结构的研究中。本文运用圆二色谱对分子模拟软件分析 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 重组蛋白结构及结合功能进行验证,分析其结构功能特征。

实验中的圆二色光谱检测条件:狭缝宽度 0.5 mm;扫描波长范围 190–250 nm;扫描速度 50 nm/min;响应时间 1 s,累计扫描 3 次。

将稀释好的 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 重组蛋白 (900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 加入 0.5 mm 石英比色池中检测,得到蛋白的 CD 光谱;向蛋白质溶液中加入 oxLig-1 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,再次测定;向比色皿中的溶液中继续加入 CL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,再次测定;比较 3 次 CD 光谱的波谱变化。

改变加入 oxLig-1 与 CL 试剂的顺序后,按照上述方法重新测定,比较结果变化。

1.2.5 ELISA 检测 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 与 ox-LDL 结合特性

将 ox-LDL、LDL、oxLig-1、me-oxLig-1 各 2.5 μg 包被于 ELISA 板,每个物质设 3 个复孔;按照常规 ELISA 方法,封闭后加入 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 孵育 1 h,以抗 His 抗体为一抗加入孵育 1 h,洗板后加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h,OPD 显色,492 nm 下观察结果。

1.2.6 分子模拟分析 β_2 -GPI-DV 蛋白与 ox-LDL 结合机制

从蛋白质数据库 (Protein data bank) 中获得含配体的 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 复合物的晶体结构 (PDB 编号分别为 3OP8)。首先将配体从复合物中剥离抽出,将受体导入到 AUTODOCK 4.2.6 软件包中进行必要的结构修改,包括去除水分子、加入氢原子以及加入 Gasteiger-Marsili 电荷等。之后分别将 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 和 oxLig-1、me-oxLig-1 分子保存为 PDBQT 格式 (包含原子

类型和电荷) 的文件,利用 AutoDock 4.2.6 软件包对受体 β_2 -GPI-DV 和 oxLig-1、me-oxLig-1 分子进行半柔性对接。分子对接中 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 与 oxLig-1、me-oxLig-1 分子按 1:1 比例结合。在进行半柔性对接模拟前,使用 AUTOGRID 计算网格,每一次对接所用的网格长、宽和高均为 100 个网格点,网格包含 oxLig-1 分子可能作用的所有活性氨基酸残基。模拟对接过程中 β_2 -GPI-DV 结构视为刚性,oxLig-1、me-oxLig-1 分子为柔性,oxLig-1、me-oxLig-1 分子内的旋转键由 AUTODOCK 程序识别并可以在搜索过程中任意旋转,分子对接在 AutoDock 软件包中进行,对接使用 Lamarckian 遗传算法与局部能量搜索相结合 (GALS) 对 β_2 -GPI-DV-oxLig-1、 β_2 -GPI-DV-me-oxLig-1 复合物构象进行搜索。每一次均进行了 100 次对接计算,最终的计算结果从软件生成的输出文件中抽提出来^[12]。

2 结果与分析

2.1 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 重组蛋白的表达纯化结果

根据实验室前期建立的表达纯化方法,成功表达纯化了 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 重组蛋白。SDS-PAGE 检测结果表明, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 在 SDS-PAGE 中的显示位置与设计大小一致 (图 1A); Western blotting 结果表明, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白可被抗 His 抗体特异性地识别,在 12 kDa 大小处出现了特异性反应条带,经镍柱纯化后纯度达 90%以上 (图 1B)。

2.2 荧光光谱结果

蛋白质的荧光来源于蛋白质色氨酸、酪氨酸以及苯丙氨酸生色基团,其荧光峰分别在 348 nm、303 nm、282 nm 处。 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 在 280 nm 处的紫外吸收峰是其肽链上的色氨酸和

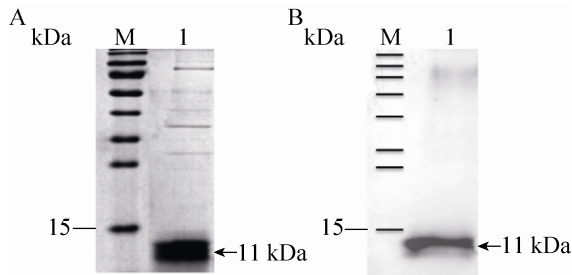


图 1 重组 $Pr\beta_2$ -GPI-DV 蛋白的表达纯化
Fig. 1 Expression and purification of the $Pr\beta_2$ -GPI-DV.

酪氨酸的苯杂环 π - π^* 跃迁引起的^[13]。 $Pr\beta_2$ -GPI-DV 蛋白质的荧光光谱如图 2A 所示，在 310 nm 处存在荧光峰，表明重组蛋白中存在生色氨基酸基团；在加入 oxLig-1、CL 等阴性物质后， $Pr\beta_2$ -GPI-DV 荧光峰位发生红移且强度增加 (图 2B、C)。这是因为色氨酸和酪氨酸的微环境变得极性增强， π - π^* 跃迁能量减小，从而最大发射波长红移，同时芳香族生色基团处于蛋白质的内部，在蛋白质变性的过程中芳香族氨基酸分子的侧链基团逐渐暴露于水溶液中，所处环境的极性逐渐增加，荧光发射峰 λ_{nm} 也逐渐增大。

2.3 圆二色谱结果分析

$Pr\beta_2$ -GPI-DV 重组蛋白的 CD 光谱结果显示 (图 3A)，在 208 nm 和 222 nm 处有 2 个负向峰，192 nm 处有 1 个正向峰，这是一个典型的蛋白质的 α 螺旋的 CD 谱特征，还有少量的 β 折叠。根据杨氏方程 $f\alpha = -([\theta]_{208} + 4\ 000) / 29\ 000$ 计算得出 α 螺旋占整个蛋白二级结构的 84%；在向 $Pr\beta_2$ -GPI-DV 蛋白溶液中加入 oxLig-1，再加入 CL 后，随着蛋白质构象的改变，CD 光谱的 α 螺旋、 β 折叠发生改变 (图 3B)；当改变加入 oxLig-1、CL 的顺序后，CD 光谱中 α 螺旋、 β 折叠也发生类似的变化 (图 3C)。

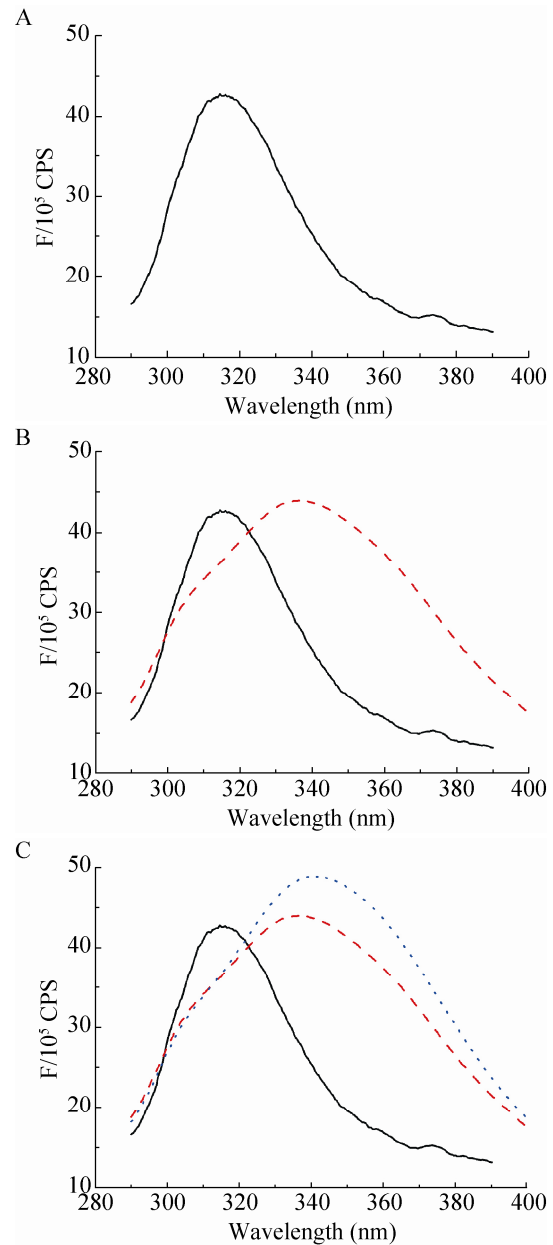


图 2 重组 $Pr\beta_2$ -GPI-DV 蛋白荧光光谱
Fig. 2 UV-Vis spectra of the $Pr\beta_2$ -GPI-DV. (A) Fluorescence spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV. (B) Black solid line: fluorescent spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV. red dotted: fluorescence spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV with oxlig-1. (C) Fluorescent spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV. Red dotted, black line: fluorescence spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV with oxlig-1; blue dotted line: fluorescence spectrum of $Pr\beta_2$ -GPI-DV with oxLig-1 then CL adding.

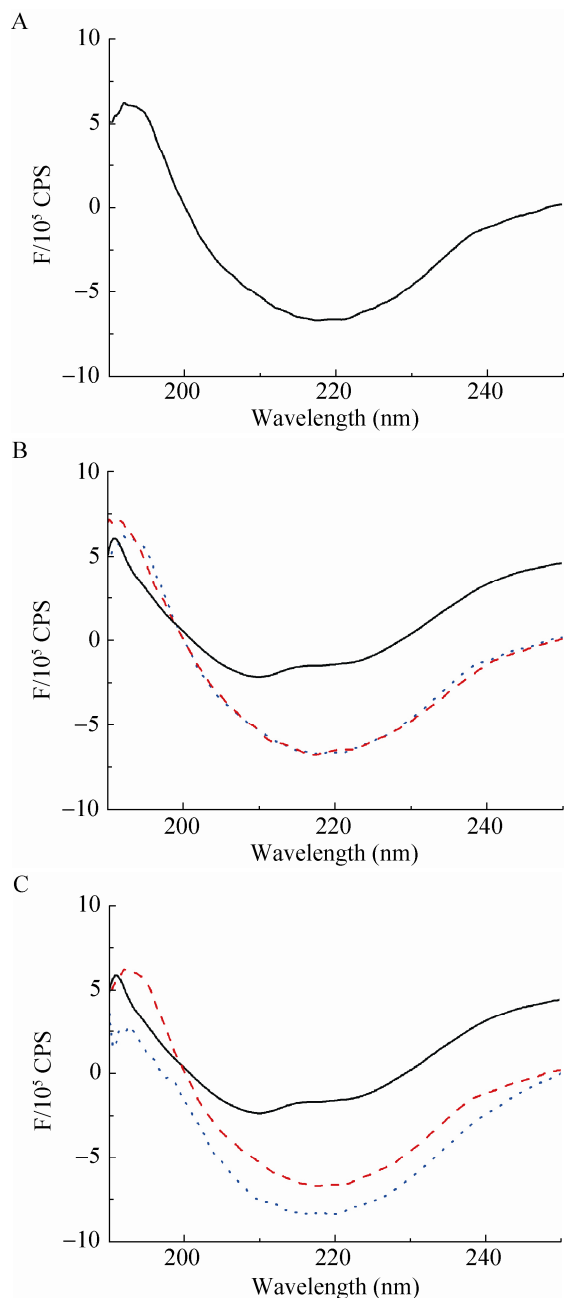


图3 重组 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白 CD 光谱

Fig. 3 CD spectra of $P.r\beta_2$ -GPI-DV. (A) CD spectrum of $P.r\beta_2$ -GPI-DV. (B) Black lines: CD spectrum of $P.r\beta_2$ -GPI-DV. red and blue dotted line: CD spectrum of $P.r\beta_2$ -GPI-DV with oxLig-1 then CL adding. (C) Black lines: CD spectrum of $P.r\beta_2$ -GPI-DV. Red and blue line: CD spectra of $P.r\beta_2$ -GPI-DV with CL then oxLig-1 adding.

2.4 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白与 ox-LDL 结合的 ELISA 结果

圆二色谱显示, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白可与 ox-LDL 的特异性表位 oxLig-1 结合, 为了分析 oxLig-1 在 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 与 ox-LDL 结合中的作用, 我们进行了 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白的 ELISA 结合实验。结果如图 4 所示, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白与 ox-LDL、oxLig-1 有明显的特异结合活性, 但不与甲基化后的 oxLig-1 结合。这一结果说明 oxLig-1 参与介导了 ox-LDL 与 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 的结合, 且其甲基化对结合有关键的影响作用。

2.5 分子模拟分析

β_2 -GPI-DV 经 AUTODOCK 对接后 oxLig-1 进入由 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 区域及 Leu313-Ala-Phe-Trp316 区域组成的活性口袋 (图 5 中红色区域) 后, 其 ω -COOH 能够接近阳性氨基酸残基位点, 与 284 及 308 位点中的赖氨酸形成氢键; 另外, 我们还发现其疏水核心母核中两个-COOH 中的氧原子能够分别与 283 及 284 位 Lys 形成氢键。me-oxLig-1 甲基化

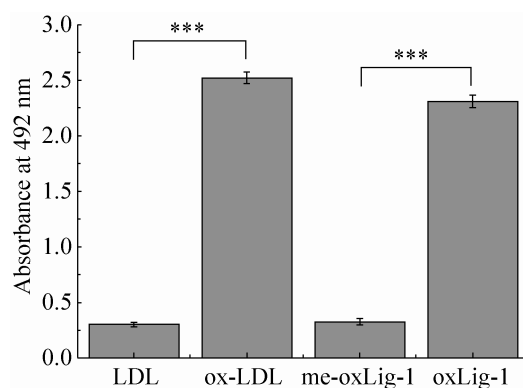


图4 oxLig-1 介导重组 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白与 ox-LDL 结合机制

Fig. 4 OxLig-1 mediated the combining mechanism of $P.r\beta_2$ -GPI-DV and ox-LDL. *** $P < 0.001$.

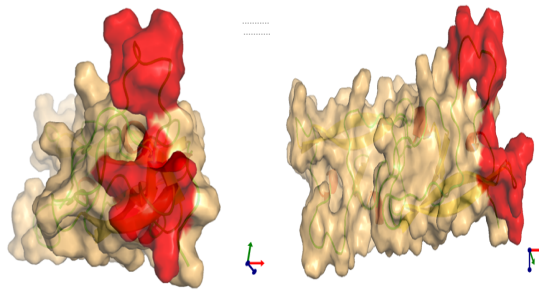


图5 β_2 -GPI-DV 与 oxLig-1 结合示意图
Fig. 5 Schematic diagram of binding between β_2 -GPI-DV and oxLig-1.

修饰的关系，其 ω -COOH 的活性被甲基所掩盖，未能如 oxLig-1 一样进入由 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 区域及 Leu313-Ala-Phe-Trp316 区域组成的活性口袋中，仅能结合于活性口袋的边缘，未能与周边氨基酸残基形成氢键。结合能量显示 (图 6)，me-oxLig-1 整体结合能量为 -4.8 Kcal/mol，明显大于 oxLig-1 的结合能量 -5.41 Kcal/mol。因此，其羧基端在结合过程中发挥了关键的作用。

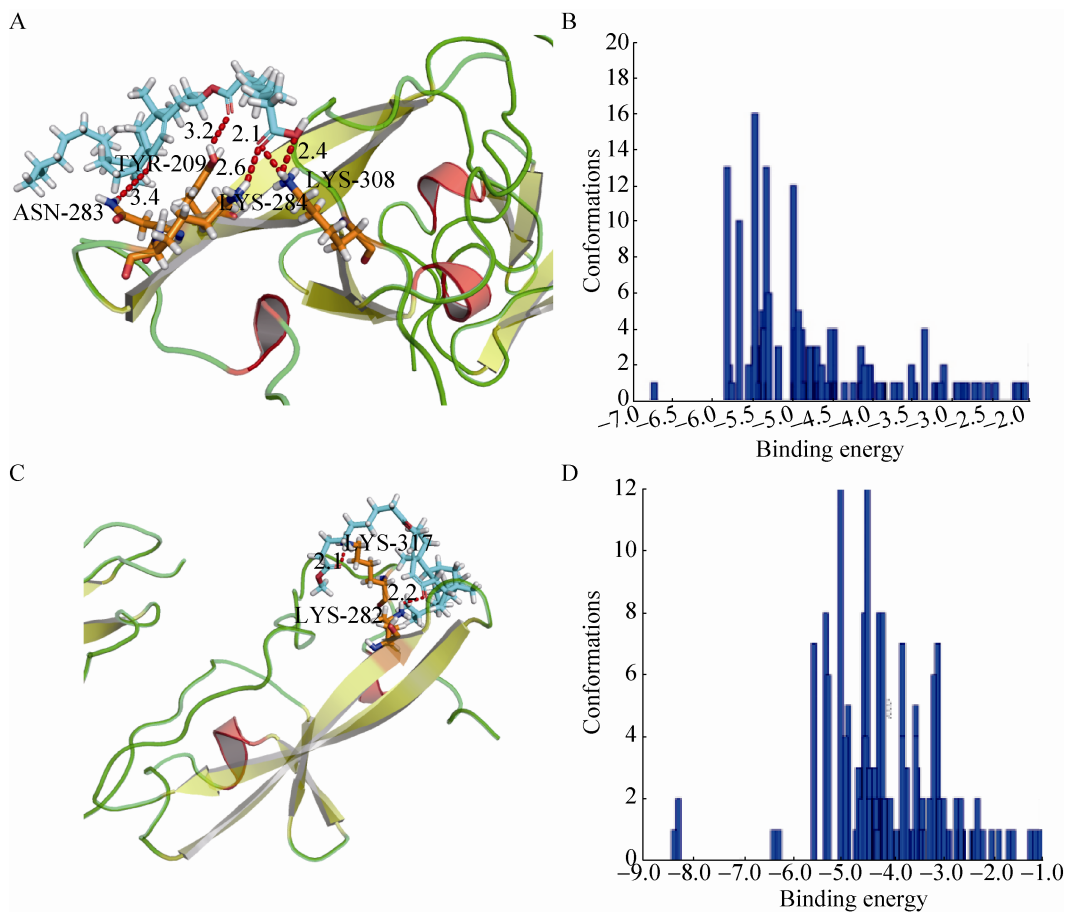


图6 重组 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 蛋白的分子对接

Fig. 6 The docking of $P.r\beta_2$ -GPI-DV with oxLig-1 and me-oxLig-1. (A) Docking conformation figure of $P.r\beta_2$ -GPI-DV and oxLig-1. (B) Clustering results figure of $P.r\beta_2$ -GPI-DV and the oxlig-1. (C) Docking conformation figure of $P.r\beta_2$ -GPI-DV and me-oxLig-1. (D) Clustering results figure of $P.r\beta_2$ -GPI-DV and me-oxLig-1.

3 讨论

β_2 -GPI 可与血液中的脂质结合,参与脂类物质的转运,因此又称载脂蛋白 H (apoH)。 β_2 -GPI 是一种亲磷脂糖蛋白,其作为 aCL 的辅因子,能通过与带有负电荷的磷脂的结合,抑制依赖磷脂的凝血过程,故起抗凝作用,被认为是人体内的天然抗凝物^[14];另一方面,在 ox-LDL 的介导的情况下,anti- β_2 -GPI 可以直接造成血管内皮免疫损伤,还可诱导血管内皮或单核细胞表达促凝物质促进血栓形成^[15-16]; β_2 -GPI 的第 5 结构域还可通过结合外翻的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)清除凋亡细胞和体内异物^[17]。以往研究数据显示, β_2 -GPI 在与磷脂、肝素、细胞膜、凋亡细胞及 ox-LDL 结合时,第 5 结构域发挥重要作用,但其具体部位部分学者认为发生在 Cys281-Cys288 附近^[18-19],也有学者认为 Leu313-Trp316 起关键作用^[20-21]。而这两个区域都有一个共同的特征,那就是都因富含赖氨酸残基而带有大量正电荷,因此易于结合阴性磷脂。同时,在 β_2 -GPI 第 5 结构域与阴性离子结合后,暴露出隐藏在第 1、4 结构域的抗原决定簇,诱导机体产生 β_2 -GPI 抗体,形成 β_2 -GPI/anti- β_2 -GPI 二元复合物; β_2 -GPI 还可与 ox-LDL 特异性结合形成 ox-LDL/ β_2 -GPI/anti- β_2 -GPI 三元复合物。这两种复合物可被巨噬细胞所吞噬,导致泡沫化继而病变,从而参与动脉硬化 (Arteriosclerosis, AS)、APS 等一类自身免疫性疾病的发生和发展。

近年来的研究结果显示, β_2 -GPI 第 5 结构域能够介导 β_2 -GPI 蛋白与 ox-LDL 的结合作用,其 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287Leu313-Ala-Phe-Trp316 肽段由于含有大量碱性氨基酸

残基,因此在结合过程中发挥了活性口袋的作用^[22-24]。氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 作为伴有高动脉粥样硬化自身免疫性疾病的生物标记物,一直都被认为是此类疾病的危险信号,研究表明 β_2 -GPI 与 ox-LDL 组合并通过共价结合形成复合体,但不与低密度脂蛋白 (LDL) 结合,通过自身 anti- β_2 -GPI 识别该复合体然后再被巨噬细胞所吞噬,最终导致了细胞的泡沫化并发生病变。另一方面,本课题组在前期研究中成功分离得到了 ox-LDL 的表位结构 oxLig-1,经结构鉴定后推测其可能为 ox-LDL 的胆固醇氧化修饰衍生物,并证明了其在 β_2 -GPI 与 ox-LDL 的结合过程中同样发挥了关键作用^[8]。为了进一步研究 β_2 -GPI 与 ox-LDL 的结合机制,确定二者结合的关键位点,在本研究中,我们成功表达及纯化得到了 β_2 -GPI-DV 蛋白^[6],并通过圆二色及分子对接模拟等实验手段,进一步研究了二者在相互结合过程中的作用机制。

在圆二色谱实验中,我们发现在加入 oxLig-1 后, $P.r\beta_2$ -GPI-DV 的荧光光谱谱峰出现红移现象,说明 oxLig-1 与 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 发生结合反应,使蛋白质的构象发生改变,暴露出了大量的发色氨基酸;之后我们向体系中加入 CL,结果发现谱峰没有发生明显的红移或蓝移,但荧光强度增加,因此证明加入 CL 后 DV 蛋白结构没有发生明显改变,确认二者结合 DV 蛋白上的同一位点,均位于 DV 结构中 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287Leu313-Ala-Phe-Trp316 肽段上的阳性氨基酸上^[25]。另一方面,通过 oxLig-1 的结构分析可以发现其尾部的羧基端具有阴性电荷的性质,因此我们推测,此羧基端为结合 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 的关键位点。为了验证此推测,我们进行了分子对接模拟实验,结果显

示, 在 oxLig-1 与 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 结合的过程中, oxLig-1 的羧基端能够与 $P.r\beta_2$ -GPI-DV 的 283、284、308 位氨基酸残基形成稳定的氢键, 键长分别为 3.2、2.6、2.4, 而甲基化修饰后的 oxLig-1 由于其羧基端被封闭, 则不能形成此氢键; 在结合能量方面, oxLig-1 表现为甲基化 oxLig-1 需要更少的结合能量 (oxLig-1 结合能量为 -5.41 Kcal/mol, me-oxLig-1 整体结合能量为 -4.8 Kcal/mol)。通过以上圆二色谱及分子对接实验可以发现, oxLig-1 能够定位于 β_2 -GPI-DV 结构域 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 所形成阳性电荷凹槽内, 其羧基端能够与 283、284、308 位赖氨酸残基发生结合形成稳定的氢键, 在整个结合过程中起到锚定的作用。

综上所述, 本研究证明了 β_2 -GPI 的 DV 功能结构域上的 Cys281-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys-Lys287 及 Leu313-Ala-Phe-Trp316 能够与 ox-LDL 表面胆固醇氧化衍生物 oxLig-1 的羧基端发生结合并形成氢键, 由此介导了 β_2 -GPI 与 ox-LDL 的结合。本研究为 β_2 -GPI/ox-LDL 复合物的形成、含量测定及以复合物为靶点的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JMH, et al. Adhesion mechanism of human β_2 -glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J*, 1999, 18(19): 5166–5174.
- [2] Sanghera DK, Wagenknecht DR, McIntyre JA, et al. Identification of structural mutations in the fifth domain of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) which affect phospholipid binding. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(2): 311–316.
- [3] Rahgozar S, Yang QX, Giannakopoulos B, et al. Beta₂-glycoprotein I binds thrombin *via* exosite I and exosite II: anti- β_2 -glycoprotein I antibodies potentiate the inhibitory effect of β_2 -glycoprotein I on thrombin-mediated factor XIa generation. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(2): 605–613.
- [4] Mehdi H, Naqvi A, Kamboh MI. Recombinant hepatitis B surface antigen and anionic phospholipids share a binding region in the fifth domain of β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H). *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1782(3): 163–168.
- [5] Kolyada A, Lee CJ, De Biasio A, et al. A novel dimeric inhibitor targeting beta2-GPI in beta2GPI/Antibody complexes implicated in antiphospholipid syndrome. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15345.
- [6] Li JD, Chi Y, Liu SQ, et al. Recombinant domain V of β_2 -glycoprotein I inhibits the formation of atherogenic ox-LDL/ β_2 -glycoprotein I complexes. *J Clin Immunol*, 2014, 34(6): 669–676.
- [7] Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, et al. A specific ligand for β_2 -glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *J Lipid Res*, 2001, 42(5): 697–709.
- [8] Huang ZY, Li WZ, Wang RJ, et al. 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate induced nuclear factor-kappa B activation in J774A.1 macrophages. *Life Sci*, 2010, 87(19/22): 651–657.
- [9] Nowak B, Szmyrka-Kaczmarek M, Durazińska A, et al. Anti-ox-LDL antibodies and anti-ox-LDL/ β_2 -GPI antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Clin Exp Med*, 2012, 21(3): 331–335.
- [10] Liu L, Liu ZZ, Chen H, et al. Oxidized low-density lipoprotein and β -glycerophosphate synergistically induce endothelial progenitor cell ossification. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(12): 1491–1497.
- [11] Zhang CN, Luo Y, Huang ZW, et al. Elevated serum β_2 -GPI-Lp(a) complexes levels in children with nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta*, 2012, 413(19/20): 1657–1660.
- [12] Liu QP, Li WZ, Liu YY. A natural surfactant of an peroxide multiplication activated receptor- γ : China, CN16090726. 2016-04-10 (in Chinese) 刘庆平, 李文哲, 刘媛媛. 一种过氧化物增殖物激活受体- γ 的天然活性剂: 中国, CN16090726.

- 2016-04-10.
- [13] Wu D, Xu GY. Study on protein-surfactant interaction by spectroscopic methods. *Acta Physico-Chim Sin*, 2006, 22(2): 254–260 (in Chinese).
吴丹, 徐桂英. 光谱法研究蛋白质与表面活性剂的相互作用. *物理化学学报*, 2006, 22(2): 254–260.
- [14] Nimpf J, Wurm H, Kostner GM. β_2 -glycoprotein I(apo-H) inhibits the release reaction of human platelets during ADP-induced aggregation. *Atherosclerosis* 1987, 63(2-3): 109–114.
- [15] Kamboh MI, Sanghera DK, Mehdi H, et al. Single nucleotide polymorphisms in the coding region of the apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) gene and their correlation with the protein polymorphism, anti- β_2 -glycoprotein I antibodies and cardiolipin binding: description of novel haplotypes and their evolution. *Ann Hum Genet*, 2004, 68(4): 285–299.
- [16] Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(2): 168–175.
- [17] Okkels H, Rasmussen TE, Sanghera DK, et al. Structure of the human β_2 -glycoprotein I (apolipoprotein H) gene. *Eur J Biochem*, 1999, 259(1/2): 435–440.
- [18] Lopez LR, Kobayashi K, Matsunami Y, et al. Immunogenic oxidized low-density lipoprotein/ β_2 -glycoprotein I complexes in the diagnostic management of atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2009, 37(1): 12–19.
- [19] Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med*, 2008, 263(5): 479–488.
- [20] Shi T, Iverson GM, Qi JC, et al. β_2 -Glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: loss of inhibition by clipped β_2 -glycoprotein I. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101(11): 3939–3944.
- [21] Matsuura E, Hughes GRV, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev*, 2008, 7(7): 558–566.
- [22] Sheng Y, Sali A, Herzog H, et al. Site-directed mutagenesis of recombinant human β_2 -glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. *J Immunol*, 1996, 157(8): 3744–3751.
- [23] Ohkur N, Hagihara Y, Yoshimura T, et al. Plasmin can reduce the function of human β_2 glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form. *Blood*, 1998, 91(11): 4173–4179.
- [24] Mehdi H, Naqvi A, Kamboh MI. A hydrophobic sequence at position 313-316 (Leu-Ala-Phe-Trp) in the fifth domain of apolipoprotein H (β_2 -glycoprotein I) is crucial for cardiolipin binding. *Eur J Biochem*, 2000, 267(6): 1770–1776.
- [25] Hunt JE, Simpson RJ, Krilis SA. Identification of a region of β_2 -glycoprotein I critical for lipid binding and anti-cardiolipin antibody cofactor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(6): 2141–2145.

(本文责编 郝丽芳)