

β -酪蛋白淀粉样纤维沉淀的形成及影响因素

刘继华¹, John A. Carver², David C. Thorn²

(1. 吉林大学药学院, 长春 130021; 2. 阿德莱德大学物理化学学院, 阿德莱德 5005)

摘要 利用硫磺素 T(ThT) 荧光分析法和透射电子显微镜检测 β -酪蛋白形成淀粉样纤维沉淀(Fibril) 的动力学过程, 研究了磷脂和硫酸肝素对其 Fibril 形成的影响. 实验结果表明, β -酪蛋白在 65 °C 下, pH 值为 5.4 ~ 9.0 的范围内, 加热 252 h 以上, 并未形成 Fibril, 说明 β -酪蛋白是一种很好的分子伴侣, 在高温、弱酸和弱碱条件下均不形成淀粉样纤维沉淀. 甘油磷酸胆碱 D6PC 和 D9PC 可以显著地促进 β -酪蛋白的 Fibril 的形成, 说明一定条件下蛋白质可能与细胞膜之间存在相互作用而导致其二级构象的转变. 硫酸肝素对 β -酪蛋白形成 Fibril 具有促进作用, 在炎症组织中, 硫酸肝素表达量的增加有可能促进 β -酪蛋白形成 Fibril, 说明乳腺炎与乳腺中的 *Corpora Amylacea* 的形成存在一定的联系.

关键词 β -酪蛋白; 蛋白质淀粉样纤维沉淀; 磷脂; 硫酸肝素; ThT 荧光分析法

中图分类号 O629.73

文献标志码 A

β -酪蛋白是乳汁的重要组成蛋白之一, 在牛乳中浓度为 8.40 ~ 8.61 mg/mL, 占牛乳蛋白总量的 37%^[1], 是牛乳中的重要营养成分, 对人类钙等金属元素的吸收有重要的影响^[2]. 近年研究发现, β -酪蛋白具有免疫增强作用^[3], 与 I 型糖尿病相关^[4], 对乳腺癌和结肠癌也有一定的影响^[5,6], 具有多种生理功能.

人类的乳汁蛋白组成与牛乳不同, 主要由 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白组成^[7], 其中 β -酪蛋白具有分子伴侣的活性, 而 κ -酪蛋白容易形成淀粉样纤维沉淀(Fibril)^[8], 二者呈现相反的特性, 使得正常状态下人乳呈现良好的溶解状态. 蛋白质的 Fibril 是由蛋白质的错误折叠引起的, 癌症、帕金森氏症、老年痴呆症和 II 型糖尿病等都与蛋白质发生错误折叠, 形成 Fibril 有关^[9]. 在动物的乳腺中还发现了类似蛋白质 Fibril 的小体与钙结合在一起, 被称为 *Corpora Amylacea*(CA), 它沉积在乳腺的间隙中, 阻碍了乳汁的分泌和流动, 从而引起乳腺疾病^[10~12]. Sauter 等^[5] 研究发现, 乳腺癌患者的乳腺抽取液中含有与 β -酪蛋白 33 ~ 62 肽段结构相似的多肽, 与乳腺癌的发生相关, 可作为乳腺癌的临床诊断标志, 表明 β -酪蛋白与乳腺癌的形成相关; 然而, 根据 Thorn 等^[8] 的研究, β -酪蛋白具有分子伴侣的活性, 可以抑制 α_2 -酪蛋白形成 Fibril, 应该具有一定的抗肿瘤活性, 二者结论相矛盾. 前文^[13] 研究发现, 虽然 α_{s1} -酪蛋白具有抑制 Fibril 形成的作用, 但本身在一定条件下可以形成 Fibril. 磷脂是生物膜的重要组成部分; 体内有炎症反应时, 细胞中硫酸肝素的量会增加, 二者均与蛋白质淀粉样纤维沉淀的形成有关^[14~17]. 为探究 β -酪蛋白是否也可在一定条件下发生错误折叠, 从而失去了对 Fibril 的抑制作用, 本文探讨了 β -酪蛋白形成 Fibril 的条件以及磷脂和硫酸肝素的影响. 通过研究二者对 β -酪蛋白形成 Fibril 的影响, 考察生物膜中的磷脂和细胞中的硫酸肝素能否促进 β -酪蛋白 Fibril 的形成, 从而与导致乳腺疾病的 *Corpora Amylacea* 的形成存在关联.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

β -酪蛋白(β -Casein)、硫磺素 T(ThT)、磷脂(1,2-Dipropionyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, D3PC; 1,2-Dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, D6PC; 1,2-Dinonanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, D9PC) 和

收稿日期: 2013-09-09.

基金项目: 吉林省自然科学基金(批准号: 20130101116JC)资助.

联系人简介: 刘继华, 女, 博士, 副教授, 主要从事天然产物化学及生物活性研究. E-mail: jljh@sina.com

硫酸肝素 (Heparin Sulphate, HS) 的纯度均大于 98%, 购自美国 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

Cary Eclipse 荧光光谱仪 (美国 Varian 公司); CM 100 透射电子显微镜 (美国 Philips 公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 β -酪蛋白样品溶液的制备 为了考察不同的温度、pH 值和加热时间下, β -酪蛋白能否形成 Fibril, 以 pH 值分别为 5.4, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5 和 9.0 的磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L) 溶解 β -酪蛋白, 制成浓度为 3 mg/mL 的溶液, 分别在 37, 50 和 65 °C 下加热, 并于加热后 0, 24, 48, 96, 144, 192, 216 和 252 h 吸取 10 μ L 样品溶液, 置于 2 mL 样品管中, 冷冻保存待测。

1.2.2 ThT 荧光法检测 Fibril 的形成 将待测样品取出融化, 加入 1.5 mL 10 μ mol/L 的 ThT 溶液, 混合均匀, 倒入比色池中, 在荧光光谱仪上测定吸光度, 激发波长 440 nm, 发射波长 490 nm, 测量时间 2 min。取测得的平均值绘制加热时间-吸光度曲线, 观察 Fibril 的形成情况。随着加热时间的增长, 如果有 Fibril 形成, Fibril 将与 ThT 特异性结合, 使溶液吸光度值逐渐增大, 并最终达到平台。

1.2.3 透射电子显微镜法 (TEM) 检测 Fibril 的形成 将待测样品取出融化, 吸取 5 μ L, 滴加于铜制样品膜上, 以滤纸吸取多余液体, 滴加蒸馏水 10 μ L 稀释 2 次, 加 2% 的乙酸铀酰水溶液 10 μ L 染色, 置于 TEM 下观察蛋白的形态, 判断是否形成了 Fibril。

1.2.4 磷脂对 β -酪蛋白 Fibril 形成的影响 取脂肪侧链长度分别为 3, 6 和 9 个碳原子的甘油磷脂 D3PC, D6PC 和 D9PC, 加入含 β -酪蛋白的缓冲液 (3 mg/mL) 中, 使其浓度分别为 0.1, 0.3, 1.0 和 3.0 mmol/L, 在 65 °C 下加热, 分别于加热后 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 216 和 252 h 吸取 10 μ L 样品溶液, 置于 2 mL 样品管中, 冷冻保存待测。采用 ThT 荧光法检测 Fibril 的形成情况, TEM 观察蛋白质的形态, 考察甘油磷脂对 β -酪蛋白形成 Fibril 的影响。

1.2.5 硫酸肝素对 β -酪蛋白 Fibril 形成的影响 将硫酸肝素加入 β -酪蛋白溶液 (3 mg/mL) 中, 使其浓度分别为 5, 10, 20 和 40 μ g/mL, 在 65 °C 下加热, 分别于加热后 0, 24, 48, 72, 96, 120, 158 和 216 h 吸取 10 μ L 样品溶液, 置于 2 mL 样品管中, 冷冻保存待测。采用 ThT 荧光法检测 Fibril 的形成情况, TEM 下观察蛋白质的形态, 考察硫酸肝素对 β -酪蛋白形成 Fibril 的影响。

2 结果与讨论

2.1 β -酪蛋白的 Fibril 形成情况

根据 ThT 可与 Fibril 中的特异性结构- β 片层相结合的特性可知, 样品液中 ThT 荧光强度随着 Fibril 的逐渐形成而增大, 并最终可达到平台期。溶液的荧光越强, 说明形成的淀粉样纤维沉淀越多。由图 1 可见, 在 65 °C 和不同 pH 值条件下加热后, 随着时间的增长, 仅在 pH=5.4 和 5.8 时, 样品的吸光度值略有提高, 因此选择对 pH=5.4 和 5.8 时加热 252 h 的样品进行 TEM 观测, 并未观察到成熟的 β -酪蛋白淀粉样纤维沉淀生成。

由实验结果可知, β -酪蛋白在 pH=5.4~9.0 的范围内, 于 65 °C 加热到 252 h 也没有形成 Fibril, 说明 β -酪蛋白是一种极好的分子伴侣, 对热稳定, 在弱酸和弱碱条件下其天然结构依然稳定, 未发生变化。

2.2 磷脂对 β -酪蛋白的 Fibril 形成的影响

分别考察了甘油磷酸胆碱 D3PC, D6PC 和 D9PC 对 β -酪蛋白 Fibril 形成的影响, 结果表明 D3PC 对 β -酪蛋白无影响, 而 D6PC 和 D9PC 可以显著促进 β -酪蛋白 Fibril 的形成。

选取浓度为 0.1, 0.3, 1.0 和 3.0 mmol/L 的 D6PC 溶液进行实验。ThT 荧光检测结果 [图 2(A)] 表明, 加入 1.0 和 3.0 mmol/L D6PC 的样品荧光强度的升高明显快于未加 D6PC 的样品。TEM 结果表明,

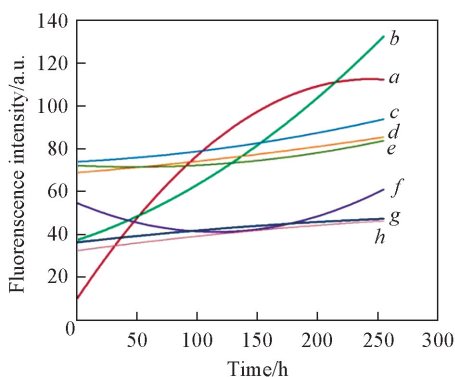


Fig. 1 ThT assay for β -casein incubated at 65 °C for 252 h in pH=5.4—9.0

a. pH=5.4; b. pH=5.8; c. pH=6.0; d. pH=6.5; e. pH=7.0; f. pH=8.0; g. pH=8.5; h. pH=9.0.

加入 1.0 和 3.0 mmol/L D6PC 的样品形成了 Fibril(图 3), 而未加 D6PC 以及加入 0.1 和 0.3 mmol/L D6PC 的样品未形成 Fibril. 可见, D6PC 对 β -酪蛋白 Fibril 形成的促进作用与其浓度有关, 浓度为 0.1 ~ 0.3 mmol/L 时不能促进 β -酪蛋白形成 Fibril, 而浓度为 1.0 ~ 3.0 mmol/L 时可明显促进 β -酪蛋白 Fibril 的形成.

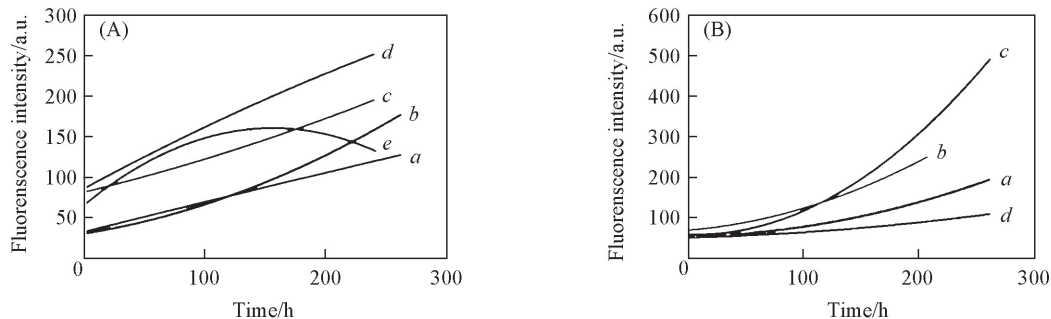


Fig. 2 ThT assays for β -casein incubated with D6PC(A) and D9PC(B) at 65 °C for 252 h in pH=5.4

(A) a. 0.1 mmol/L; b. 0.3 mmol/L; c. 1 mmol/L; d. 3 mmol/L; e. β -CN;

(B) a. 0.1 mmol/L; b. 1 mmol/L; c. 0.3 mmol/L; d. β -CN.

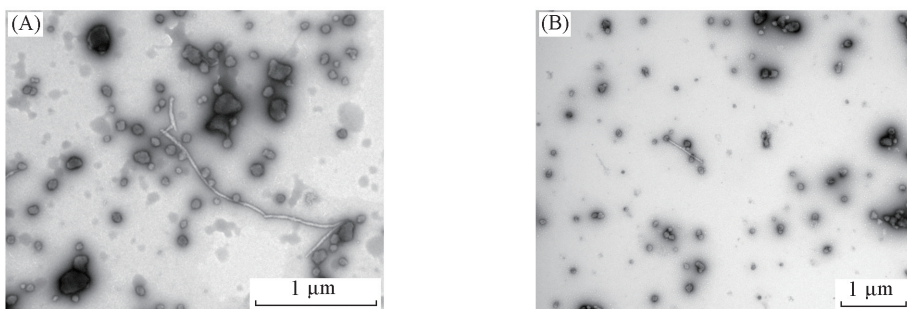


Fig. 3 TEM images for β -casein incubated with 1.0(A) and 3.0 mmol/L(B) D6PC at 65 °C for 252 h in pH=5.4

选用浓度分别为 0.1, 0.3 和 1.0 mmol/L 的 D9PC 溶液进行实验. ThT 荧光检测结果[图 2(B)]表明, 加入不同浓度 D9PC 的样品荧光强度的升高明显快于未加 D9PC 的样品. TEM 结果表明, 加入 0.1, 0.3 和 1.0 mmol/L D9PC 的样品均形成了 Fibril(图 4), 而未加 D9PC 的样品没有形成 Fibril. 可见, D9PC 浓度为 0.1 ~ 1.0 mmol/L 时可明显促进 β -酪蛋白的 Fibril 的形成.

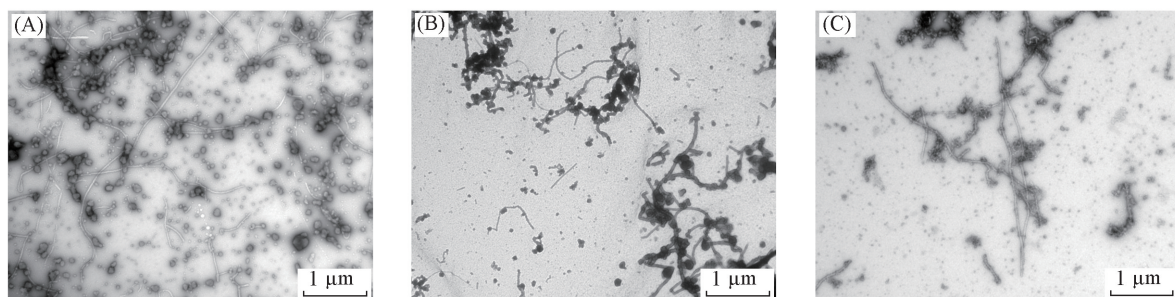


Fig. 4 TEM images for β -casein incubated with 0.1(A), 0.3(B) and 1.0 mmol/L(C) D9PC at 65 °C for 252 h in pH=5.4

以上结果表明, 虽然 β -酪蛋白是一种很好的分子伴侣, 对热、弱酸和弱碱均很稳定, 其天然结构不易发生改变形成 Fibril, 但是磷脂可以促进其形成 Fibril, 并且磷脂的作用与其脂肪侧链的长度有关, 3 碳侧链的磷脂无作用, 较长的 6 碳和 9 碳侧链的磷脂则可促进 Fibril 的形成; 而且 D9PC 在较低的浓度(0.1 ~ 0.3 mmol/L)即可发生作用, 而 D6PC 在此浓度范围无作用, 表明磷脂的脂肪侧链的长度对 Fibril 的形成有影响, 侧链越长, 作用强度越大. 磷脂是细胞膜的重要组成成分, 本实验结果说明 β -酪蛋白在乳腺中可能与细胞膜的磷脂双分子层之间存在相互作用, 在一定条件下形成 Fibril, 同时失去其

分子伴侣的活性,从而无法抑制乳汁中的 κ -酪蛋白形成 Fibril,进而引起乳腺疾病.

2.3 硫酸肝素对 β -酪蛋白的 Fibril 形成的影响

考察了不同浓度的硫酸肝素对 β -酪蛋白形成 Fibril 的影响. ThT 荧光检测结果表明, β -酪蛋白与浓度为 5 ~ 40 $\mu\text{g/mL}$ 的硫酸肝素共混加热后,与未加硫酸肝素的样品相比,荧光强度的升高明显加快,说明可能形成了 Fibril(见图 5),其中硫酸肝素的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,曲线上升速度与幅度最大. TEM 结果表明,加入不同浓度硫酸肝素的样品均形成了 Fibril(见图 6),其中硫酸肝素的浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,形成的淀粉样纤维沉淀最粗、最长,印证了 ThT 检测结果. 以上结果表明,硫酸肝素对 β -酪蛋白 Fibril 的形成有明显的促进作用,且这种作用受硫酸肝素浓度的影响.

硫酸肝素是氨基葡聚糖的一种,广泛存在于细胞表面和基底膜中^[18]. 研究^[19,20]表明,硫酸肝素可促进蛋白质 Fibril 的形成,它沉积于多种蛋白质的淀粉样沉积物中,促进蛋白质在折叠时由不规整的卷曲向 β -片层结构转化^[17,21],加快蛋白质形成 Fibril 的速度^[22]. Shimizu 等^[23]发现,在人乳脂肪球膜中存在大量的氨基葡聚糖,而硫酸肝素是其中成分之一. 当乳腺有炎症发生时,硫酸肝素的表达量会增加^[16],根据本文研究结果,如果硫酸肝素的浓度达到一定数值,就有可能促使乳腺中的 β -酪蛋白形成 Fibril,失去其分子伴侣的活性,与其它蛋白一起沉聚在乳腺中,引起乳腺疾病.

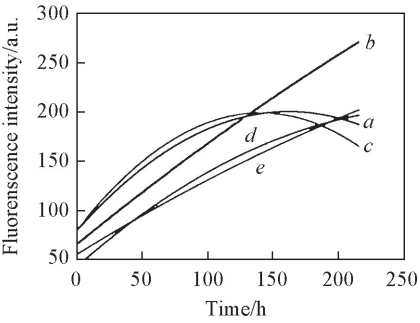


Fig. 5 ThT assays for effects of Heparin sulphate concentration to fibrils formation by β -casein
a. 5 $\mu\text{g/mL}$; b. 10 $\mu\text{g/mL}$; c. 20 $\mu\text{g/mL}$;
d. 40 $\mu\text{g/mL}$; e. β -CN.

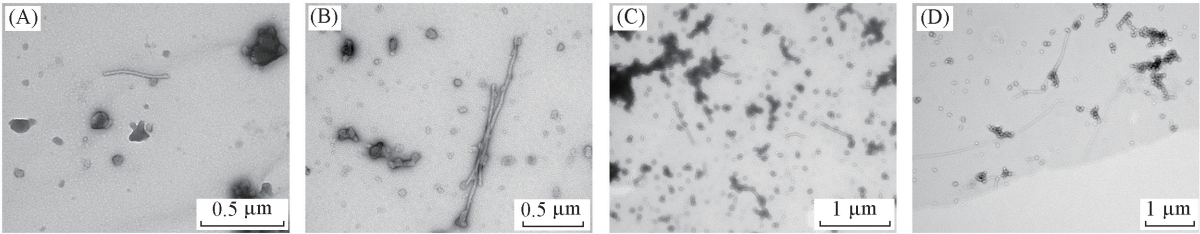


Fig. 6 TEM images for effects of Heparin sulphate concentration to fibrils formation by β -casein
(A) 5 $\mu\text{g/mL}$; (B) 10 $\mu\text{g/mL}$; (C) 20 $\mu\text{g/mL}$; (D) 40 $\mu\text{g/mL}$.

3 结 论

β -酪蛋白是一种结构非常稳定的分子伴侣,在高温、弱酸和弱碱条件下均不形成 Fibril. 但是在磷脂和硫酸肝素的作用下,其稳定的结构发生变化,产生错误折叠,形成了 Fibril. 本文结果表明,硫酸肝素可以促进 β -酪蛋白 Fibril 的产生,如果乳腺有炎症,硫酸肝素的表达量增大,局部浓度提高,可能导致 β -酪蛋白发生错误折叠,形成 Fibril,从而失去其本身具有的分子伴侣活性.

参 考 文 献

[1] Johansson A. , Lugand D. , Rolet-Répécaud O. , Mollé D. , Delage M. M. , Peltre G. , Marchesseau S. , Léonil J. , Dupont D. , *Molecular Immunology*, **2009**, 46(6), 1058—1066
[2] Dael P. A. , Kastenmayer P. , Clough J. , Jarret A. , Barclay D. V. , Maire J. , *J. Nutr.*, **2005**, 135(6), 1438—1443
[3] Kawahara T. , Katayama D. , Otani H. , *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, 68(10), 2091—2095
[4] Monetini L. , Barone F. , Stefanini L. , Petrone A. , Walk T. , Jung G. , Thrope R. , Pozzilli P. , Galvallo M. G. , *J. Endocrinol.*, **2003**, 176, 143—150
[5] Sauter E. R. , Davis W. , Qin W. , Scanlon S. , Mooney B. , Bromert K. , Folk W. R. , *Biomark Med.*, **2009**, 3(5), 577—588
[6] Oliveira M. J. , Van D. J. , Lauwaet T. , De C. V. , De B. G. , Verschraegen G. , Vaneechoutte M. , Goethals M. , Ahmadian M. R. , Muller O. , Vandekerckhove J. , Mareel M. , Leroy A. , *EMBO J.*, **2003**, 22(22), 6161—6173

- [7] Azuma N. , Yamauchi K. , *Biosci. Biotech. Biochem.* , **1992** , 56(7) , 1140—1141
- [8] Thorn D. C. , Meehan S. , Sunde M. , Rekas A. , Gras S. L. , Macphee C. E. , Dobson C. M. , Wilson M. R. , Carver J. A. , *Biochem.* , **2005** , 44(51) , 17027—17036
- [9] Stefani M. , Dobson C. M. , *J. Mol. Med.* , **2003** , 81(11) , 678—699
- [10] Reid I. M. , *J. Comp. Pathol.* , **1972** , 82(4) , 409—413
- [11] Nickerson S. C. , Sordillo L. M. , Boddie N. T. , Saxton A. M. , *J. Dairy Sci.* , **1985** , 68(3) , 709—717
- [12] Claudon C. , Francin M. , Marchal E. , Straczek J. , Laurent F. , Nabet P. , *Tissue Cell* , **1998** , 30(5) , 589—595
- [13] Yin J. Y. , Carver J. A. , Thorn D. C. , Liu J. H. , *Chem. J. Chinese Universities* , **2013** , 34(8) , 1894—1898(尹建元, John A. Carver, David C. Thorn, 刘继华. 高等学校化学学报, **2013** , 34(8) , 1894—1898)
- [14] Gorbenko G. P. , Kinnunen P. K. , *Chem. Phys. Lipi.* , **2006** , 141(1) , 72—82
- [15] Andrew H. , GriYn M. D. , Howlett G. J. , Yarovsky I. , *Eur. Biophys.* , **2008** , 38(1) , 99—110
- [16] Bishop J. R. , Schuksz M. , Esko J. D. , *Nature* , **2007** , 446(7139) , 1030—1037
- [17] Ancsin J. B. , *Amyloid* , **2003** , 10(2) , 67—79
- [18] Shukla D. , Spear P. G. , *J. Clin. Invest.* , **2001** , 108(4) , 503—510
- [19] Kisilevsky R. , Fraser P. E. , *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* , **1997** , 32(5) , 361—404
- [20] Meng F. , Abedini A. , Song B. , Raleigh D. P. , *Biochem.* , **2007** , 46(43) , 12091—12099
- [21] Lashley T. , Holton J. L. , Verbeek M. M. , Rostagno A. , Bojsen-Møller M. , David G. , Horsen J. , Braendgaard H. , Plant G. , Frangione B. , Ghiso J. , Revesz T. , *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* , **2006** , 32(5) , 492—504
- [22] Neda M. , Elodie M. , Silvia T. , Annalisa R. , Fabrizio C. , *J. Bio. Chem.* , **2009** , 284(43) , 29921—29934
- [23] Shimizu M. , Uryu N. , Yamauchi K. , *Agric. Biol. Chem.* , **1981** , 45(3) , 741—745

Amyloid Fibril Formation by β -Casein and Its Influence Factor[†]

LIU Jihua^{1*} , John A. Carver² , David C. Thorn²

(1. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. School of Physics and Chemistry, Adelaide University, Adelaide 5005, Australia)

Abstract β -Casein is the second abundant among the casein proteins in bovine milk and reported to exhibit biological activities. In this study, the focus was placed on the influence of lipids and heparin sulphate to β -casein fibril formation. In order to study the time course of fibril formation by β -casein, the samples were incubated and picked up at specific times and tested by ThT assay and transmission electron microscopy. The results showed that amyloid fibrils were not formed by β -casein incubated in pH = 5.4—9.0 at 65 °C for 252 h, which suggested that β -casein is a good molecular chaperone. The β -casein fibril formation was promoted in the presence of longer-chain phosphatidylcholine lipids(D6PC and D9PC) , which indicated that the interaction of β -casein with biomembrane of mammary gland abundant with lipids maybe caused β -casein structure changed from native to more β -sheet. Heparin sulphate, a major component of the extracellular matrix and a species which is commonly associated with extracellular amyloid deposits, interacted with β -casein to promote its aggregation. It is supposed that Corpora Amylacea is associated with mastitis because of high expression of heparin sulphate in inflamed mammary. This study explored that it is possible for chaperon proteins to form amyloid fibrils influenced by components *in vivo* and lose its chaperon effects.

Keywords β -Casein; Amyloid fibril; Lipid; Heparin sulphate; ThT assay

(Ed. : P, H, N, K)

[†] Supported by the Natural Science Foundation of Jilin Province, China(No.20130101116JC).