

纤维蛋白原结构最新模型和纤维蛋白凝块形成机制解释

(引自上海医科大学出版《生物物理学讲义》 272~279 页, 1987 年, 施永德编写)

问题的提出

脊椎动物血液起着交通运输的作用, 虽然血液有一定的流动性, 但有时有失血的危险, 因此在组织损伤和血管破裂时, 血液易于流出血管。在机体内也存在着保护自己血液不让流失的控制系统。这种控制系统有其生物化学、细胞生物学、分子生物学、力学、流变学和生物物理学上的物质基础。这里包括受损肌肉和血管的收缩作用, 血小板和细细胞的聚集阻塞, 以及最后纤维蛋白凝块的形成, 堵住血管损伤的缺口, 保护了血液的不被流失。此外如果体内凝血机制过强, 血液本身在血管内纤维蛋白原形成纤维蛋白阻塞血管, 致使血液不能够顺利流动, 这就会导致缺血性脑血管病、心肌梗塞、视网膜血管阻塞、或外周血管阻塞等病理现象。因此纤维蛋白原如何变为纤维蛋白的科学研究, 特别对于物化学、生物物理和临床医生们是极感兴趣的问题, 对此问题已足足研究了两个世纪了, 最近对于纤维蛋白原如何变成纤维蛋白凝块的复杂结构的细节有了较好了解, 本文对此作一个综述。

回顾一下历来对纤维蛋白原所进行的研究工作

纤维蛋白原的提取方法有等电点(等电点为 5.8)提取法和冷乙醇(8-10%)提取纯化。最早先发现血浆中存在一种大分子物质, 会变成多聚体形式的网状结构的凝块, 其前身就是纤维蛋白原, 由它变为纤维蛋白凝块。凝血酶本身在血液中就存在着的, 不过它是以其前身是凝血酶原的形式而存在, 是一个含丝氨酸的蛋白酶。如何有凝血酶原变成凝血酶, 是一个极其复杂的过程, 涉及一系的内凝血系统的连锁激活反应才实现的。其较链的纤维蛋白凝块大致过程如图 14-2 所示。

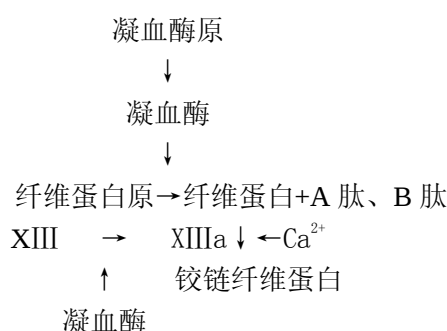


图 14-2 交链纤维蛋白形成过程

由于从纤维蛋白原上脱下 A 和 B 两肽以后, 虽只有损失其百分之几的总重量, 但可使纤维蛋白原的剩下物互聚, 以非共价键形式形成多聚体。A 和 B 的脱落大约有两个作用, 一个是揭开聚合区, 另一个脱下的是一个带负电荷的肽段, 因此使剩下的纤维蛋白原分子间静电斥力下降, 导致互聚。互聚成为线状以后, 由 XIIIa 和 Ca^{2+} 作用下, 以共价键形式互相成为交链结构。虽然近一、两百年来已认为纤维蛋白凝块的形成, 首先由于纤维蛋白原肽链脱下 A、B 肽片而开始的, 但仅仅还是上世纪的许多实验才打下坚实的基础, 很多实验证明, 纤维蛋白凝块的亚基与纤维蛋白的结构与形状上大致相近, 但有区别, 如 Elemer 和 Mihalyi 比较了纤维蛋白原和纤维蛋白在高浓度的尿素溶液中电泳行为和等电点的区别, 发现 A 和 B 肽链的脱下, 使纤维蛋白丧失了好大一部分的负电荷。同时, 二硝基氟苯 (FDNB) 作为氨基末端的识别的工作, 引起了生物化学家的巨大兴趣。英国剑桥和里兹两个研究组, 同时地进行纤维蛋白原和纤维蛋白的氨基末端进行了鉴别, 发现两者完全不同, 他们认为这是由于 A 和 B 两肽释放后, 才引起如此大的区别, 他们证明 A 和 B 肽上确实具有很多负电量,

其结果完全与 Mihalyi 的电泳结果完全一致。虽然 A 和 B 肽的释放，可以很好地解释这是由纤维蛋白原变成为纤维蛋白的启动关键，但是纤维蛋白在空间结构是如何排列的，而不知道以什么化学力把它们母分子们约束在一起的呢？

首先，纤维蛋白原分子极不对称，而且其母体也是一个多聚体，是以折叠形式而聚成的，而且重复距离是半个分子的，这些问题应如何解释为好呢？

其次，由凝血酶单独作用后而形成的纤维蛋白可以用各种蛋白质解聚剂如尿素、肽、去污剂和稀酸等，可使纤维蛋白分散为单体，这证明为非共价键。如在生理条件下，即由凝血酶激活 VIIIa，VIIIa 使线状的纤维蛋白原以共价键形成纤维蛋白，这时用以上试剂就解不开了。这是何种原因呢？

还有，在生物化学历史上，指出关于纤维蛋白原的结构和功能的模式很多，这些模式由于当时条件限制，不能很好解释，而且互相有矛盾，造成思想上有些混乱，但这段时间却引起很多科学家们去进行精细的工作，由于其分子量之大，形状复杂，非刚性而具有柔性，天然存在于人体之中，至今未被晶化，电镜的观察也不很精确，仅供获得模棱两可的结果。至今很多工作者正在从事与它的一级结构的测定工作，在此基础上就有可能说明如何纤维蛋白原变成为纤维蛋白的“机制”的细节何在？

建立新纤维蛋白原的结构特征及要点

过去，对于确立纤维蛋白原的结构还不很成熟，但有很多假设性的模型，虽然有时使人们造成思想上的混乱。有的还内部矛盾，其原因是忽视了当前有价值的发现，在此本文引用最新材料，建立的模型也许是颇符合实际情况的。

首先纤维蛋白原是一个 Astbury 式的角-皮-肌-纤维式蛋白质类型来考虑，从其 X 衍射结果来看，有 5.1 埃 (angstrom, 10^{-8} 厘米) 的重复性，是一个典型的卷曲螺旋结构。因为纤维蛋白原中约有 30-35% 为螺旋结构，其中某些是卷曲着的。

其次，电镜揭示，纤维蛋白原具有三个球部的结构，而且三个球基本上是在一条直线上的。这些结果进而验证了早先工作观点，先由凝血酶作用后，形成聚体，最终产物形成网架结构，但具有线状花纹。X 衍射结果证明重复离距为 225 至 230 埃。几乎有半个分子的折叠距离，因为整个纤维蛋白原分子约为 450 至 460 埃长。

Hall 和 Slayter 的线性三球结构，得到酶学上的有力证明，因为纤维蛋白原和纤维蛋白的消化（如血浆素、许多蛋白水解酶）结果均释放出亚片，完全与如此三度空间结构相符合。其中间联结部分、很明显地是一个容易接触消化的区域，但是球部部分却较难酶解消化。最后模型要能作出解释为什么 A 和 B 链的移去，开始导致纤维蛋白原的聚合，以及进一步又由 VIIIa 作用下完成了交链作用。

在此建立新的纤维蛋白原模型的依据是什么？

下面试图提供现代较新的结构，虽然在某些方面与从前 Hall 和 Slayter 的有相似，但认为至今为比较合适的，根据的有关资料有：（1）一级结构分析；（2）电镜观察；（3）生物化学分析结果；（4）酶介分析结果；（5）三条非等同的链均来同一祖先的认识；（6）一个长螺旋的卷曲存在。

纤维蛋白原的一级结构和氨基酸组成

一级结构的主链：纤维蛋白原分子量约为 330,000 至 360,000，沉降系数为 7.65，其中 95% 为氨基酸，5% 为多糖，分子为一个二聚体，分子式可以用 $(\alpha \beta \gamma)_2$ 或 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 来表示，每半个分子中有 α 、 β 、 γ 三条肽链。 γ 链在所有生物中比较恒定，分子量约处于 55000~60000 之间， β 链分子量约为 40000~50000， α 链有更大差异，分子量处于 6000~80000 之间，整

个分子为 6 条链，它们之间由二硫键连在一起[图 14-3 (1)]。

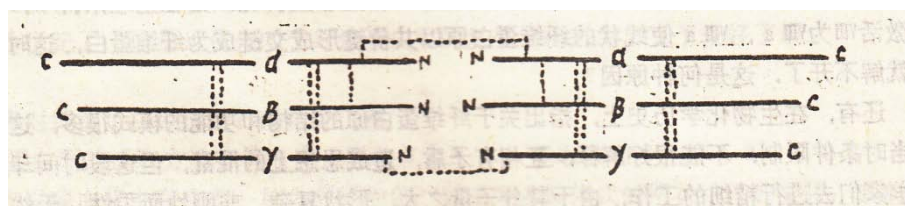


图 14-3 (1) 纤维蛋白原的 (α β γ)₂ 平面结构示意图

(虚线示二硫键, C 示 COOH 端, N 示 NH₂ 端)

纤维蛋白原的氨基酸组成: 在某种程度上, 它与典型的球蛋白的分子相近, 这三条链的氨基酸组成不完全相同, 若相互之间作一比较, 这一点就更为突出, 如 α 链的羧基端, 有大量的甘、丝和苏氨酸, 而缺乏非极性氨基酸, 其他部位有的地方无脯氨酸, 另有一些其他部位含有丰富的半胱氨酸。这些资料是提供纤维蛋白原分子结构的关键资料, 目前虽还缺少 X 衍射的高分辨率的资料, 但也足可以建立一个纤维蛋白原子结构的模型。

纤维蛋白原的一级结构的阐明

对纤维蛋白原的一级结构的测定有多个方案, 其中之一, 不外乎首先将二硫键打开, 对各条链进行酶和化学方法分解成片段, 然后测出各片段的氨基酸排列顺序。另一方法, 就是首先用酶和化学方法, 将各链分解成片, 测定各片段的氨基酸。其结果证明后一种方法是最为有利的, 因为这一方法以最快速度搞清楚了 (α β γ)₂ 结构式, 从而引伸出 Hall 和 Slayter 的三球结构。其中最为关键的一步为 Blomback 工作组所进行的工作, 他们首先分离了一个溴化氰产物的片段, 证明其有整个纤维蛋白原子分的六个氨基末端, 这一端为整个分子分子量的 20% 弱, 但具有全体分子一半以上的二硫键, 这一片段被命名氨基末端“二硫键结 (N-DSK)”, 后来另有人独立地分离到 E 片段。发现与上述溴化氰产物片段有免疫学上的交叉反应性。因而证明这部分为 Hall 和 Slayter 的三球结构中的中心球结构, 这部分的结构的完全明白, 就基本上确立了 (α β γ)₂ 的基本结构, 图 14-3 (2) 示侧中心结的结构。在上述 N-DSK 中可以看到 CYS-PRO-SER/THR-GLY/THR-CYS 的共同结构, 为什么三条链上都有这样的结构, 而且相互碰巧地绕在一起, 推测认为三链来自同一祖先, 如此共同的结构相应的反映了具有共同的功能。故天然地三条链上都用半胱氨酸打上“烙印”, 这就是所谓的“二硫键结”, 这结的一侧的氨基酸均为非极性的, 三条链之间互相绞纽的结构称之为“二硫键结”这种链结在远离氨基末端处还有存在。

α、β、γ 链的同源性

除上述以外, 其他区也有同源性, 这包括羧基末端片段 (图 14-4), 血浆素攻击部位和凝血酶作用区域 (释放 A、B 肽), 半胱氨酸分布上, 还有 Cys-Pro 的“节律”及其一侧无极性氨基酸。尤其是半胱氨酸的相似区, 实在是三条链间最相似的“音符”。

但是这三条链在分化过程中, 在功能上已有些不同了, 如 γ 链, 在止血过程中, 即由纤维蛋白原变成纤维蛋白时, 能在 VIII 因子作用下, 赖氨酸和谷氨酰胺间连结作用, 这两个相邻的 γ 链是在排列上起反平行作用的。这种排列绘出双折重叠的二聚对称体的分子, 造出线状的不对称的结构来 (图 14-5)。

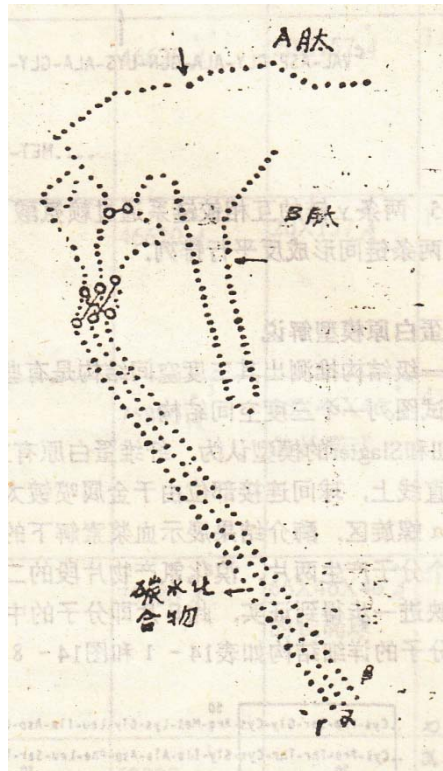


图 14-3 (2) 纤维蛋白原中心之半侧结构 (o-o 示二硫键)

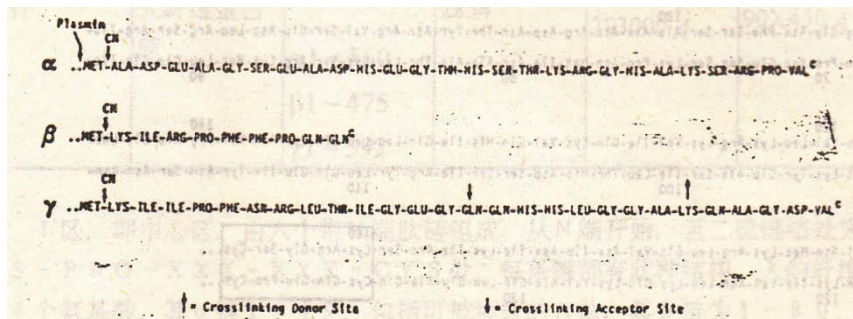


图 14-4 三条链即 α β γ 的 COOH 端溴化氰片段之间的同源性分析:

β γ 前面的氨基酸基之间很相似, α 和 γ 之间很少相似,
但与形成铰链的赖氨酸 (LYS) 是一致的。

此三条链的相互交链的问题, β 链已丧失其交链性能, 但 α 链仍有, 虽然它以所谓共价链的连结方式保证立体形状上的组合, 在形成多聚体中, α 链的作用被认为主要起侧向交链。这种交链主要发生于极性残基区, 而且含有此链上的 2/3 的羧基残基, 而且是露落于外面的区域上。

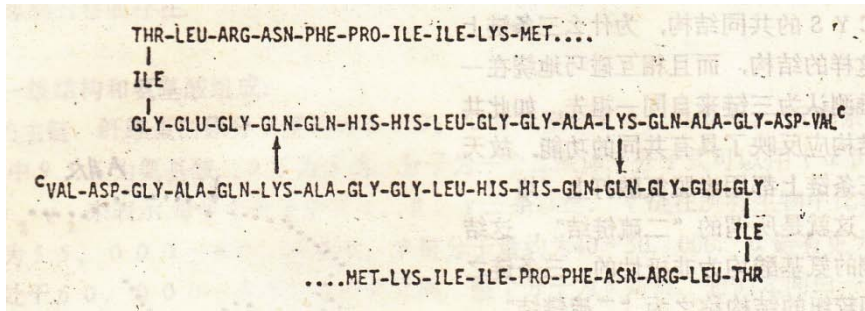


图 14-5 两条 γ 链的互相较链系通过赖氨酸 (LYS) 和谷氨酰胺 (GLN) 之间形成共价键的结果，两条链间形成反平行排列。

对纤维蛋白原模型解说

从一级结构推测出其三度空间结构是有些冒险性，但文章企图从电镜和生化分析相结合方法来试图列一个三度空间结构。Hall 和 Slagter 的模型认为，纤维蛋白原来三个球，中心是小球，两边稍大些，这三个球在同一条直线上，球间连接部位由于金属喷镀太模糊而看不清楚。Cohn 通过 X 衍射认为球间连结有 α 螺旋区。酶介结果展示血浆素解下的 E 片，一个分子产生仅为一片；而解下的 D 片，一个分子产生两片。溴化氰产物片段的二硫键结展示有六个末端的氨基酸，且从免疫学的交叉反映进一步得到证实，此 E 片即分子的中心球部结构。以上结果为基础，我们绘出纤维蛋白原分子的详细结构如表 14-7 和图 14-8。

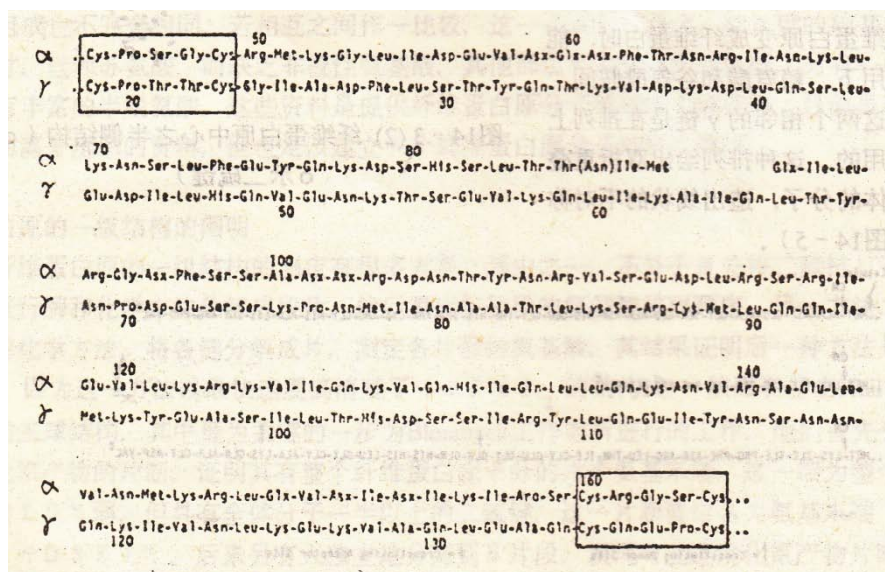


图 14-6 α 和 γ 两条链在两个“二硫键结”之间的一级结构

表 14-1 纤维蛋白原的结构分区域分析

区域	说明	链内残基号	总残基数	计算体积 ^a	外形尺寸	含脯氨酸%
I (中心)	从中心结引出的 6 个 N 端片	2 • α 1~49 2 • β 1~80 2 • γ 1~23	304	42560A ³	自由卷曲链	5.6
II (左)	主要为三股 α 螺旋	α 50~160 β 81~191 γ 24~134	333	46620A ³	20X157 A ^b	1.2

II (右)	主要为三股 α 螺旋	α 50~160 β 81~191 γ 24~134	333	46620 A ³	20X157 A	1.2
III (左)	形成一个椭 球	β 192~475 γ 135~392	542	75880 A ³	66X46X46A ^c 的长椭球	4.8
III (右)	形成一个椭 球	β 192~475 γ 135~392	542	75880 A ³	66X46X46A ^c 的长椭球	4.8
IV (左)	α 链的自由 附加端	α 161~560	400	52000 A ³		8.0.
IV (右)	α 链的自由 附加端	α 161~560	400	52000 A ³		8.0
合计	人纤维蛋白 原	α 1~560 β 1~475 γ 1~392	2854	393000 A ³	90X450 A	5.2

a 无水干体积、b 柱体、c 长椭球形状区。

I 区 即中心区，由六个带 N 端肽链组成，从 N 端开始，至二硫键结处为止，终止于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 处，每条键部都有此种结构，人的纤维蛋白原含有 304 个氨基酸，其 α 链 1-49，包括可被释放的 A 肽，其 β 链为 1-80，包括可被释放的 B 肽， γ 链为 23 个。这一球部并非完全对称，中心的二硫键结得很牢的，它可能非均一体，而像马尾巴结，此区有相当于平均量的脯氨酸，约占 5.6%，但在本区内，脯氨酸的量并不平均的。

II 区，有两个，在中心区两旁，左、右各一，是连结中心与两端球部的桥梁。X 衍射证明此区存在着卷曲螺旋，氨基酸排列顺序支持这一观点。首先二硫键结为“烙印”开始，内含非极性残基开始，约束成为三股式螺旋，非极性朝内背向溶剂的。其次，所有这些链内缺少脯氨酸，这样形成螺旋更为容易（平均只有 1.2%），第三，在这个区域中心部位，也存在着极性区，使这一区域不能形成螺旋，这样这个区也易被蛋白酶水解。最后，再看一看两个二硫键绞结间的关系， γ 链起始于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 止于 CYS-XXX-XXX-PRO-CYS，中间相间 110 个残基，而 α 链也有如此结构，开始于 CYS-PRO-XXX-XXX-CYS 止于 CYS-ARG-GLY-SER-CYS，有些相近，由于 β 链的顺序尚未确定，但也证明有二硫键绞结。由此模型可以看出，在这一区域上三条链带有同源性，这一区域总残基数为 333，每条约占 111 个，按照 α 螺旋 5.1A 的重复性，此区应长达 157A。纤维蛋白原的弹性可能主要从这一区域的螺旋性弹簧上表现出来，II 区的一级结构一氨基酸的排列顺序如图 14-6 所示。

III 区，即外侧两个球部，大致于血浆素下的 D 片。从生物化学上来年，其大小与形状与血浆中清蛋白有具大的区别，其二硫键绞结着的三股头时分子量为 70,000，脯氨酸含量平均为 4.8%，其重量主要地一半来自 β 链羧端，一半来自 γ 链羧端。其中有些二硫键使 β 和 γ 捆成一起的坚实形状，而 α 链自二硫绞结伸出后，尚有一小段仍有二端绞结相连着的。

IV 区，即为 α 链自二硫绞结伸出后的自由附加端，此区缺少非极性氨基酸，但有丰富的甘、丝氨酸及其他极性氨基酸，脯氨酸平均为 8.0%，园二色散证明这一区域存在着随机卷曲，仅有一个二硫键使这个区域成为一个环状，此随机卷曲非为任意的柔软化。而且具有固定化的形状的。另一方面， α -链在聚合过程中所起的交链作用时，似乎表明这一片断实际上也是自由可以运动的。虽然这区域仅为 400 残基，但所占空间相当大而又广，可能相当于纤维

蛋白原其他部分的总体积那么大。这一区域在生物化学上应有很重要的作用的。全模型示图 8，根据残基的计算，绘出每区域的尺寸，并在老的经典模式有一定相符性，也与 Hall 和 Slayter 的模型有一定程度相符性，但这一模型比较精细，许多之处不同于老的。根据二硫键联结外的平行性，二聚体间应有一个角度，约为 145 度，这一角度系根据 Tooney 和 Cohen 对于附结晶的电镜观察以及纤维蛋白的 X 衍射重复点而确立的。还有最后一点，这一模型可以解释纤维蛋白的形成。I，II，III 单侧的示意图如图 14-7 所示，全分子双侧示意图如图 14-8。

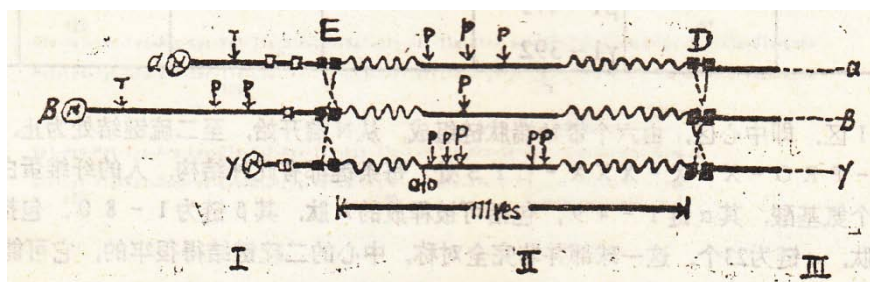


图 14-7 E 片与 I，II，III 区之间的关系（I 和 II 相当于 E 区，III 相当于 D 区）

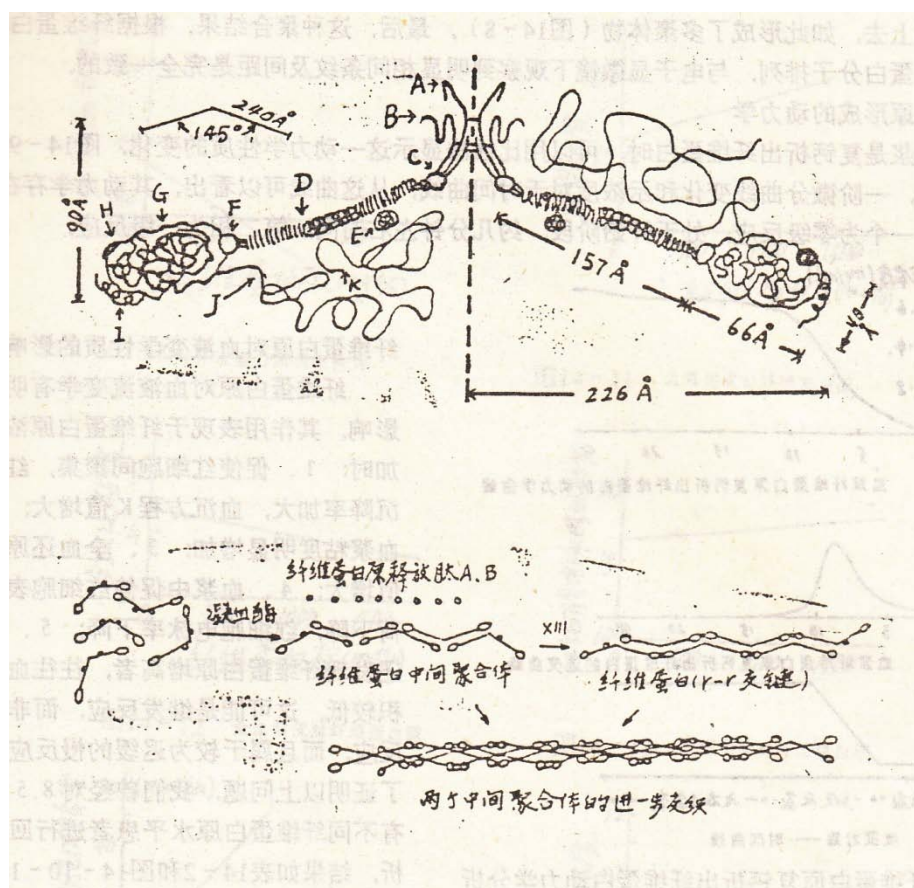


图 14-8（上）纤维蛋白原的结构模型（A 代表 A 肽断落头，B 代表 B 肽断落头，C 代表 C00H 端的二硫键结，D 代表螺旋卷曲区，E 代表 γ 链上 52 位的碳水化合物基团，F 代表远离 C00H 端的二硫键结，D 代表 III 区即相当于 D 片，H 代表 β 链上的碳水化合物基团，I 代表 γ 链上的 C00H 的端此链参与分子间的铰链作用，J 代表血浆素攻击区，K 代表 α 链 C00H 端）
（下）纤维蛋白原左右上下聚合过程。

纤维蛋白的形成机制

任何模型都要能解释，纤维蛋白是如何形成的。它包括纤维蛋白原释放的起动作用，连接羧基端的双分子相连的作用，然后 α 链的羧端又如何交链成为多聚物的凝块。此模型能对上述问题均作出了巧妙的解释。

首先纤维蛋白肽链的释放就允许两个纤维蛋白互补排列，当两个纤维蛋白的原分子，各有一个失去一个 A 和 B 肽链时，就可以因带异种静电而互补平行靠拢，随着凝血酶的作用，这种互补作用即可以很快延长。只要有三个分子互相形成互补结构，即可以形成双分子聚合体，但小于三个就不行，根据纤维蛋白原分子结构特点，这种聚合的相互之间是反平行式的。其次 α 链羧基端具有形成多聚体的作用，由于 α 链羧基端占有较大的空间，每一个羧基端可产生交链部位，多个羧基端就产生多个交链部位。当双分子粗细的纤维伸出来时，它可以被连接到几个邻近的 α 链上去，如此形成了多聚体（图 14-8 下）。最后，这种聚合结果，根据纤维蛋白原形成纤维蛋白分子排列，与电子显微镜下观察到明显相间条纹及间距是完全一致的。

以上模型有待精细 X 光衍射、冷冻电镜、多维核磁共振的结构生物学新技术进一步研究。