

- [3] Chu, K. C. et al.: *J. Med. Chem.*, 18, 593, 1975.
 [4] Massart, D. L. et al.: *Anal. Chem.*, 46, 1988, 1974.
 [5] De Clercq, H. et al.: *ibid.*, 66, 1269, 1977.
 [6] 安登魁等:《南京药学院学报》, (1), 1;(2), 14, 1982.
 [7] Dupuis, F. et al.: *Anal. Chem.*, 47, 379, 1975.
 [8] Jurs, P. C. et al.: *ibid.*, 41, 21, 1969.
 [9] Zierner, J. N. et al.: *ibid.*, 51, 1732, 1976.
 [10] Eckschlager, K. et al.: *Information Theory as Applied to Chemical Analysis*, 1979.

[本文于 1984 年 8 月 25 日收到]

人血浆 α_2 -巨球蛋白的研究概况

彭启明 张淑琴*

(中国医科大学, 沈阳)

α_2 -巨球蛋白 (α_2 -Macroglobulin, 简称 α_2 -M) 是人体中重要的血浆蛋白之一, 能与多种蛋白水解酶反应, 是血浆中含量最多的蛋白酶抑制剂。 α_2 -M 通过对蛋白酶水解活性的调节而参与凝血、纤溶、激肽释放、炎症及免疫等一系列生理及病理过程。因此, α_2 -M 的研究对某些疾病发病机制的了解具有重要的意义。

1953 年, Jacobsson 首先报道了 α_2 -M^[1]。此后对其组成、结构、理化性质及生物活性等方面的研究都有较详细的报道和论述^[2-5]。国内这方面的报道尚未见到。

一、 α_2 -M 的组成、结构及理化性质

α_2 -M 是一种高分子量的糖蛋白, 含糖量约为 8—11%, 已经证实糖单位中包含有半乳糖、甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰神经氨酸、岩藻糖等。 α_2 -M 的多糖部分都连接在对碱稳定的天冬酰胺的酰胺键上^[2]。有关 α_2 -M 的氨基酸组成已有报道^[2,3,17]。人血浆 α_2 -M 中每克分子还含有 4—8 克原子锌, 结合在 α_2 -M 上的锌约占血浆总锌的 20%。这样多的锌对 α_2 -M 的生理功能起什么作用还不清楚。有人认为可能没有重要作用^[4]。用超速离心法测出人 α_2 -M 的分子量为 725,000 左右^[3]。等电点为 5.0—5.5。其等电点受唾液酸含量的影响; 唾液酸含量低则等电点偏高^[6]。从电泳中发现人血浆中 α_2 -M 以两种形式存在: 泳动慢的区带, 称为 S- α_2 M;

泳动快的区带, 称为 F- α_2 M。实验证明, S- α_2 M 是存在于血液中未与蛋白酶结合的天然 α_2 -M, 是 α_2 M 的活性形式。而 F- α_2 M 则是天然 α_2 -M 与蛋白酶或胺类结合后形成的复合物, 不再具有反应活性, 能从血循环中被迅速清除^[7]。 α_2 -M 分子是含有四个相同亚基的四聚体, 其中每两个亚基通过二硫键连成二聚体, 两个二聚体又通过非共价键结合成 α_2 -M 分子^[6]。

α_2 -M 性质比较稳定。实验证明, 在相同条件下比 α_1 蛋白酶抑制剂稳定得多。 α_2 -M 对酸和热敏感, pH4 以下易失活, 在 pH 5.0—8.4 范围内比较稳定。一般贮存在 4℃; 冻干后在 -70℃ 可以存放一年。反复冻融则易失活^[3,8,9]。

二、 α_2 -M 与蛋白酶的 reaction 特性和机制

Barrett 等首先系统地阐明了 α_2 -M 与蛋白酶反应的独特性质。指出 α_2 -M 仅能与蛋白水解酶中的内肽酶反应(其中包括丝氨酸类、巯基类、羧基类、金属蛋白酶类全部四类内肽酶)。对外肽酶则毫无作用。而且它只能与有活性的内肽酶反应, 与灭活的酶或酶原都不能反应。这种反应是不可逆的, 即 α_2 -M 与蛋白酶一旦结合就不能再产生游离的酶和天然的 α_2 -M。虽然, 用 3M 的 NaSCN 处理后能使被 α_2 -M 结合的酶解离出来, 并恢复 5—10% 的活力, 但

* 沈阳医学专科学校

α_2 -M 则分解成亚基和碎片,不能再恢复活性。 α_2 -M 只要与任何一种蛋白酶分子结合,并使其饱和,就不能再与其他蛋白酶反应。这说明不存在竞争性抑制的关系。而被 α_2 -M 结合的蛋白酶,虽然它对大分子底物(蛋白质、多肽)失去催化活性,也不被其他大分子抑制剂(大豆胰酶抑制剂等)所抑制,但它对小分子底物及小肽仍然保持催化活性,而且这种活性能被小分子抑制剂再抑制。这说明 α_2 -M 与蛋白酶是以一种特殊的方式结合,结合后酶的活性中心不被占据^[3]。

对于 α_2 -M 的作用机制目前还不十分清楚,Barrett 和 Starkey 等提出了一个“陷阱假说”(trap hypothesis)^[5,10,14]认为在 α_2 -M 分子的每个亚基上都有一个对蛋白水解反应十分敏感的部位(称为“诱饵”)能诱使有活性的蛋白酶对其发生水解反应。只要蛋白酶与 α_2 -M 分子中的任何一个亚基上的“诱饵”部位发生作用,就能引起亚基上肽键的断裂,这种断裂就象一个“机关”被触发一样,使整个 α_2 -M 分子迅速发生构象变化,从而形成一个“陷阱”,将蛋白酶分子套入其中。这样被套入的蛋白酶的活性受到立体阻断,不能与大分子底物反应。但酶的活性中心并未被占据,再加上立体阻断又不十分严密,因此对于能靠近蛋白酶活性中心的一些小分子底物仍然保持催化活性。Harpel 等利用 SDS-聚丙烯酰胺电泳也提供了有关肽键断裂的证据^[11]。 α_2 -M 与蛋白酶反应后,部分亚基(分子量为 190,000)可转变为分子量为 85,000 的碎片,说明在亚基上发生了肽键的断裂。通过 X 射线衍射也表明, α_2 -M 与蛋白酶结合后分子变成中空的圆柱形,蛋白酶被包在圆柱内,同时释放出—段糖肽。由此可见肽键的断裂是 α_2 -M 与蛋白酶反应机制的关键。此假说的细节还有待进一步证实。

三、 α_2 -M 的分离和纯化

1955 年 Schultze 等首先从人血浆中分离出了 α_2 -M。^[12] 随后各国学者相继报道了各种不同方法分离提纯 α_2 -M。^[3,7,13,15] 复杂的纯化过程

易引起 α_2 -M 的失活,所以在分离纯化中必须兼顾其纯度和活性两个方面。为防止 α_2 -M 失活,原料用血浆而不用血清,因为血凝时 α_2 -M 会成为谷氨酰胺转移酶的底物^[10]。哈哥曼因子能激活多种血浆蛋白酶,这些酶能与 α_2 -M 结合而使其失活,所以血中应加入聚凝胺 (polybrene),并使用塑料或硅化玻璃器材^[4],以防止哈哥曼因子的活化。另外还需加入适量的大豆胰酶抑制剂,抑制血中激肽释放酶和其他丝氨酸蛋白酶,防止它们与 α_2 -M 结合^[11]。较常用的分离方法是先沉淀分离:用聚乙二醇沉淀, α_2 -M 在 4—12% 的聚乙二醇中含量最多^[14]。也可以用 1.6—1.9 M 硫酸铵沉淀,但要注意 pH 必须是酸性,并且不能有氨存在,否则易使 α_2 -M 失活。然后进行层析分离,多种凝胶过滤和亲和层析均可用于 α_2 -M 的分离纯化(包括 Sephadex G200, Sepharose 6B, DE-52 等)。近年来,有人利用 α_2 -M 对 Cibacron blue F-3GA 亲和力小,而清蛋白和免疫球蛋白对其亲和力大的特点,用 Cibacron blue Sepharose 层析法分离纯化 α_2 -M。也有用 Zn 螯合亲和层析,都得到很好的分离纯化效果。最后再利用多种抗血清制成免疫吸附柱,进行免疫吸附,可除去多种血浆蛋白杂质,可得到高纯度的 α_2 -M^[13,14]。Bridges 等报道利用 Cibacron blue Sepharose 柱层析和免疫吸附两步可从 5 ml 血浆样品中得到纯度是 98%,平均收率为 71% 的 α_2 -M^[15]。

α_2 -M 的活性和纯度鉴定:用 α_2 -M 胰蛋白酶复合物的酶解活力可较简便地测定 α_2 -M 的活性^[18]。Barrett 介绍用嗜热菌蛋白酶掩蔽能力的方法也可测定 α_2 -M 的活性^[14]。 α_2 -M 的纯度可通过免疫电泳,浓度梯度-聚丙烯酰胺凝胶电泳,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及聚焦电泳等方法测定^[7]。

四、 α_2 -M 的实际应用

α_2 -M 的生理及病理意义已被广泛研究。正常人血浆中 α_2 -M 含量为 2—4 毫克/毫升,比较恒定。新生儿含量是成人的三倍。不同年龄和性别仅有轻微差异。大多数疾病情况下 α_2 -

M 浓度不发生变化。Laurell 普查了十万份血清,没有发现 α_2 -M 缺乏现象;低于 0.5 毫克/毫升者很少见^[9]。正常情况下,人每天约有 10% 的 α_2 -M 被代谢分解掉。动物实验证明; α_2 -M 与蛋白酶形成复合物后可迅速地由血循环中被清除。这可能是由于 α_2 -M 与蛋白酶结合后,构象改变,释放出糖肽使疏水区暴露,易于被细胞受体识别,因而能很快地被肝、脾和骨髓的网状内皮细胞吞噬^[10]。由此推测 α_2 -M 很可能是机体的一种古老的防卫系统。 α_2 -M 除能清除血中多余蛋白酶外,对组织蛋白酶也有抑制作用。在正常生理条件下,大分子的 α_2 -M 不易进入组织,但在炎症时血管通透性增高, α_2 -M 可进入组织并与其中的弹性蛋白酶和胶原酶等结合形成复合物,防止组织的进一步水解破坏。另外, α_2 -M 还能抑制病原体 and 寄生虫入侵机体时释放出来的多种蛋白酶,它对某些病毒也有抑制作用。 α_2 -M 还能通过抑制体内多种蛋白酶的活性来调节机体的免疫反应。这些进一步证实了 α_2 -M 的防卫作用^[10,14]。

α_2 -M 是血纤溶酶的抑制剂,能阻止纤维蛋白的水解,与凝血有密切的关系。实验证明妇女使用雌激素后,血中 α_2 -M 浓度显著增高,因而增加了血栓形成的危险性^[22]。动物实验还发现静脉注射胰蛋白酶后,当血中所有的 α_2 -M 都被复合后,能造成动物立即死亡^[10]。可见 α_2 -M 具有重要的功能,是血浆中不可缺少的成分。 α_2 -M 分子巨大,含有多种独立的结合位置,所以它与蛋白酶的结合不是唯一的。它还能与多种物质结合,其功能尚待进一步探讨。 α_2 -M 已经作为一种试剂用于对多种蛋白酶的分析研究。

总之,近三十年来对 α_2 -M 的大量研究,已经取得很大进展,但关于其生理调节功能和作用机制还需进一步阐明和证实。如能结合临床工作,研究 α_2 -M 在某些病理情况下的重要调节作用,进一步探讨其与某些疾病的发病机制的关系,亦是一件具有实际意义的研究课题。

参 考 文 献

- [1] Jacobsson, K. et al.: *Clin. Lab. Invest.*, 5, 97, 1953.
- [2] Dunn, J. T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 242, 5549, 1967.
- [3] Harpel, P. C.: *Meth. Enzymol.*, Vol. 45, 639, 1976.
- [4] Jones, J. M. et al.: *Biochem. J.*, 127, 187, 1972.
- [5] Barrett, A. J. et al.: *Biochem. J.*, 133, 709, 1973.
- [6] Hall, P. K. et al.: *Biochem. J.*, 171, 27, 1978.
- [7] Barrett, et al.: *Biochem. J.*, 181, 401, 1979.
- [8] Eriksson, S.: *Acta Med. Scand*, 177, Suppl, 432, 1965.
- [9] Laurell, C. B. et al.: *The plasma proteins*, 2nd ed. 1, 229.
- [10] Starkey, P. M. et al.: *Proteinase in Mammalian Cells and Tissues*, 663, North-Holland Amstexdem 1977.
- [11] Harpel, P. C.: *J. Exp. med.*, 138, 508, 1973.
- [12] Schutze, H. E. et al.: *Z. Natur.forsch. Teil B*, 10, 463, 1955.
- [13] Virca, G. D. et al.: *Anal. Biochem.*, 89, 274, 1978.
- [14] Barrett, A. J.: *Methods Enzymol.*, 80, 737, 1981.
- [15] Bridges, M. A. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 118(1), 21, 1982.
- [16] Ohlsson, K.: *Clin. Chim. Acta*, 66, 1—7, 1976.
- [17] Bourrillon and Razafima haleo: *Glycoprotein. Their Composition, Structure and Function*, Vol. 5, 699, 1972.
- [18] Ganrot, P. O.: *Clin. Chim. Acta*, 14, 493, 1966.

[本文于 1984 年 10 月 25 日收到]

(上接第38页)

激下,直接释放到外周循环中。其机制尚有待研究。

参 考 文 献

- [1] Zeiller K et al: *Immunology*, 26, 995, 1974.

- [2] 姜世勃等:《肿瘤防治研究》,9(3);127,1982.
- [3] 姜世勃等:《第一军医大学学报》,4,449,1983
- [4] 李文简,姜世勃:《生物化学与生物物理进展》,1,58,1980
- [5] Sabolovic D. et al: *Immunology*, 24,601, 1973.

[本文于 1984 年 9 月 24 日收到]