

丝氨酸蛋白酶抑制剤的研究及应用

张 梅 朱作铭

(南开大学分子生物学研究所, 天津 300071)

摘要 丝氨酸蛋白酶抑制剤 (serpin) 是一类结构、序列同源的蛋白酶抑制剤, 它是体内许多蛋白水解级联反应的调节因子, 其遗传性结构或分泌异常将导致许多疾病, 因此对于其结构及作用机理的研究将为临床应用提供依据。

关键词 丝氨酸蛋白酶抑制剤, 结构, 作用机理, 临床应用

丝氨酸蛋白酶抑制剤 (serine proteinase inhibitor, serpin) 是一族由古代抑制剤趋异进化 5 亿年衍变来的结构序列同源的蛋白酶抑制剤。目前已在许多动物、植物及病毒体内发现了此类抑制剤的存在, 如 α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin, α_1 -AT)、调节炎症反应的 α_1 -抗糜蛋白酶、在血液凝固中起作用的抗凝血酶 III (antithrombin III, AT III)、参与补体级联反应的 C1-抑制子、Myxoma 病毒的致病因子 SERP-1、具有肿瘤抑制功能的 Maspin 以及在纤维蛋白分解中起作用的血纤维蛋白溶酶原激活子抑制剤-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 等均属此族, 约 40 多种。有些改变或丧失了抑制能力, 如起血压调节作用的血管紧张素原, 具有激素转运功能的皮质醇结合球蛋白等。它们在体内多种生理体系中起关键性的调控作用, 是维持体内环境稳定的重要因素。一旦功能缺陷, 将会导致许多疾病。

1 Serpin 的结构

Serpin 为单一肽链蛋白质。各种 serpin 大约有 30% 的序列同源性, 疏水区同源性高达 70%。血浆中的 serpin 多被糖基化, 糖链经天冬酰胺 (Asn) 的酰胺基与主链相连。

位于抑制性 serpin 表面、距 C 端 30~40 个氨基酸处的环状结构区 RSL (reactive site loop) 中, 存在能被靶酶的底物识别位点识别

的氨基酸 P1; 近 C 端与 P1 相邻的氨基酸为 P1', 以此类推, 即肽链结构表示为 N 端-P15~P9~P1-P1'~P9'~P15'-C 端。在对靶酶的抑制中, Serpin 以 RSL 中的类底物反应活性位点与靶酶形成紧密的不易解离的酶-抑制剤复合物, 同时 P1-P1' 间的反应活性位点肽键断裂。几种 serpin 氨基酸序列比较发现^[1], Serpins 各成员的抑制专一性是由 P1 决定的, 且与被抑制的酶的特异性切点一致。如抗凝血酶, 抑制以 Arg 羧基端为敏感部位的丝氨酸蛋白酶, 其 P1 为 Arg; α_1 -AT 主要抑制弹性蛋白酶, 其 P1 为 Met。在 α_1 -AT 匹兹堡变异型中, P1Met 变为 Arg, 使此抑制剤对弹性酶的抑制大大减小, 却能快速抑制凝血酶。

天然抑制性 serpin 变性温度为 58℃; 而与酶作用后释放出的被修饰抑制子变性温度为 80℃ 或更高^[2]。由于前者不能结晶, 后者很容易结晶, 因此研究 serpin 空间结构主要借助于被修饰抑制子、非功能性抑制子卵清蛋白 (ovalbumin)^[3] 及潜伏性抑制子 PAI-1^[4]。

1.1 抑制性 serpin

Serpin 二级结构中, α 螺旋及 β 折叠 (折叠 A、B、C) 约占 70%。在大多数抑制性 serpins 中均发现被切后失活的抑制子有一反平行的六带 β 折叠 (折叠 A) (图 1a), 其中,

中心带 s4A 是酶作用于 P1-P1' 位后, 从其氨基端释放的新羧基尾. 以在 serpin 家族中较有

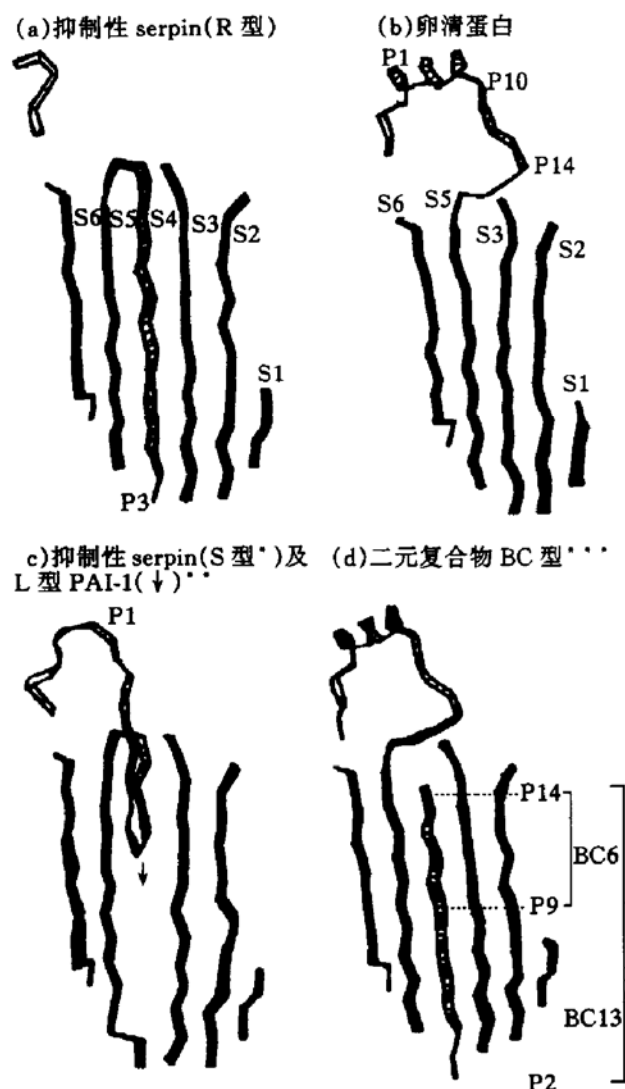


图 1 Serpin β 折叠 A 几种不同构象示意图^[6]

□ 为 P1~P14 区. * 抑制性 serpin 部分插入的活性构象; ** 插入超过 6 个氨基酸 (↓), 形成非活性 L (locked) 构象; *** 合成肽插入折叠 A 形成二元复合物 (binary complexes, BC).

代表性的 α_1 -AT 为例, P1-P1' (Met358-Ser359) 被切后, 新的自由羧基端从被切位点迁移到分子的另一端, 使新形成的蛋白水解端插入原来存在的五带 β 折叠 A 中, 而新的自由氨基端残基则形成蛋白表面另一个折叠 (折叠 C) 中的一条带, 造成 P1-P1' 肽键两端的残基位于分子的两端, 空间相距 7 nm. Haris 的傅立叶变换远红外 (FT-IR) 光谱研究^[5]表明, 被作用后的 α_1 -AT 不仅 β 折叠的量增加,

其 α 螺旋的量也较天然 α_1 -AT 有所增加, 氢键数量增加 20~30 个. 这种作用前后构象的巨大转变, 使抑制性 serpin 由紧密 S 构象 (stressed, S) 变为松弛 (图 1c)、有序 R 构象 (relaxed, R) (图 1a), 热力学稳定性显著提高. α_1 -抗糜蛋白酶、马嗜中性白细胞弹性蛋白酶抑制子、AT III 与其相应靶酶作用时, 也有此种构象转变发生, 其中纽带区 (P15~P9) 在转变中起关键作用.

1.2 卵清蛋白

卵清蛋白与 α_1 -AT 具有相似的序列和结构, 30% 同源. 由于 α_1 -AT 抑制弹性蛋白酶, 而卵清蛋白是弹性蛋白酶的底物, 因此研究它们构象变化的不同, 为了解 serpin 家族不同成员抑制功能提供了依据. 晶体结构研究表明^[3]: 非抑制子卵清蛋白 (图 1b) 与靶酶枯草杆菌蛋白酶作用, 其相应于 α_1 -AT s4A 部分的螺旋区根本不进入五带 β 折叠 A 中, 新形成的两个尾端仍位于原位、分子的相同端, 没有 S 型向 R 型的构象转变, 而且作用后螺旋区丧失, 稳定性下降.

因此, serpin 抑制功能和蛋白质二级结构的改变之间有一定的关系.

目前认为天然抑制性 serpin 在 P15~P5' 序列中亦有一螺旋区存在, 其中从 β 折叠 A 伸出至螺旋开始的 P15~P9 序列具有高度的保守性及柔韧性. 人类血浆 serpin 的病理学突变显示 RSL 必须保持相对可动性, 才能完成抑制功能, 如将抗凝血酶和 C1-抑制子 P12 或 P10Ala 变为 Thr、Ser 或 Pro, 虽然 P1-P1' 键断裂的敏感性不变, 但会造成活力全部或部分丧失, 使活性 serpin 由蛋白酶抑制子变为蛋白酶的底物. 通过比较 serpin 族氨基酸序列发现几乎所有的抑制性 serpin 在 P14 位均是小分子氨基酸, 而卵清蛋白及血管紧张素原则分别为 Arg、Glu^[7], 小分子氨基酸较大的柔韧性, 使抑制性 serpin 的 RSL 较卵清蛋白晶体结构中的螺旋区更加易动, 伴随螺旋的展开移入 β 折叠 A 中. 纽带区的突变还可造成抑制子聚合物的形成^[8].

1.3 潜伏型 PAI-1

PAI-1 不需断裂 P1-P1' 肽键, 便能自发折叠成稳定的、介于 S 型和 R 型之间的非活性状态-L 型 (图 1c), 在体内, PAI-1 与血浆玻璃连结蛋白的结合, 可使反应活性环从 β 折叠 A 中出来, 形成易于与酶作用的构象, 因此称为潜伏型。

单晶 X 射线回转技术研究显示^[4], PAI-1 识别位点处 N 端部分残基作为中心链插入 β 折叠 A 中, 与被作用 α_1 -AT 相应残基的位置极其相似; 而识别位点 C 端部分残基, 由于 s4A 的插入, scr356 ~ Arg368 (P2 ~ P10') 从折叠 A 中伸出, 沿 s4A C 端及 s4B N 端之间的蛋白表面延伸, 形成不同寻常的延伸环。其他的 serpin 也可通过低温暴露于温和变性剂 (如 0.9 mol/L 盐酸胍) 中或用人工合成的 RSL (BC₁₃ 或 BC₆) 直接插入 s4A 占据的空间, 组成二元复合物 (图 1d), 形成这种非活性的、被“锁”构象。L 型结构在热力学稳定性方面类似于 R 型构象。

1993 年, Bjork^[9] 使用免疫学方法研究抗凝血酶的 RSL。结果表明, 在被修饰抗凝血酶、抗凝血酶与人工合成十四肽的复合物、抗凝血酶在低温下由盐酸胍部分变性后及抗凝血酶与它的两个靶酶相结合的复合物中均存在新的、相同的或高度近似的表面抗原决定基, 新的决定基的出现源于 s4A 的插入, 第一次用实验证明了 serpin 在与靶酶的结合中, 伴随有 RSL 区插入 β 折叠 A, 为以前的推测提供了强有力的证据。

2 Serpin 的作用机理

目前关于 serpin 抑制机理有两个模型。

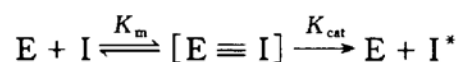
2.1 诱导构象改变模型

靶酶将 serpin 反应位点键作为正常底物攻击, 它们之间的相互作用诱导 RSL 的近 P12 区部分插入 β 折叠 A 中^[10], 这种作用使反应位点键断裂, 同时使蛋白处于一种动力学稳定状态。这种模型可以解释 serpin 与酶形成复合物后, 新的决定基的出现。

2.2 预平衡构象改变模型

抑制子以两种构象状态存在: 一种是非活性状态, 其 RSL 完全暴露; 一种是活性状态, 其环状结构部分插入 β 折叠 A, 而靶酶仅与后一种状态结合^[6], 即环状区有一与酶的反应位点相互补的形状, 将平衡移向后一种状态。

这两种模型均认为 serpin 作为自杀性底物与蛋白酶相结合是其完成抑制所必需的。



其中 E 为靶酶, I 为抑制性 serpin, $E \equiv I$ 为酶-抑制剂四面体复合物, I^* 为水解后被释放的抑制子。从结构学上看, Serpin 可作为丝氨酸蛋白酶的适合底物存在, 但动力学常数表明, 虽然显示其水解 P1-P1' 键能力的 K_{cat}/K_m 值很大 ($10^4 \sim 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)^[11], 但 K_{cat} 值及 K_m 值较其他正常底物低好几个数量级。因此 serpins 对酶的抑制源于二者紧密的结合, 极慢的水解速率和被分解抑制剂的极慢释放率。NMR 研究^[12] 表明在 α_1 -AT 与猪胰弹性蛋白酶复合物形成时, 有一稳定四面体中介物出现, 抑制子存在于 $E \equiv I$ 和 I^* 平衡之间。

3 Serpin 的病理学变异与疾病

Serpin 是维持体内环境稳定的重要因素。任何影响其活性的因素如温度、浓度^[13]、氧化作用、非靶酶对 serpin 的蛋白水解作用、靶酶的饱和作用或其遗传性结构或分泌异常均会使其活力下降或丧失^[14], 造成严重的病理性疾病 (表 1)。

造成病理学变异的两种突变是: a. 影响分子关键功能位点 (如反应中心位点, 涉及辅助因子结合位点) 的突变; b. 影响分子整体结构统一性的突变。以在北欧中普遍存在的 α_1 -AT 变异型为例: 这种变异型主要有 S 型和 Z 型两类, 均是由于肽链中单个氨基酸发生替换所形成的, 表现为血浆 α_1 -AT 水平低下。其中 Z 型仅为正常 M 型基因产物水平的 15%, 实验证明, Z 型纯合子个体血浆中 α_1 -AT 水平降低, 是由于分泌受阻引起的, 即 Glu342 变

为 Lys 后, 纽带区的柔韧性发生改变, 使另一分子的 RSL 插入突变分子 s3A、s5A 空隙扩大的 β 折叠 A 中, 形成环-折叠聚合物, 大量聚集于肝细胞的内质网中, 不能分泌^[15]。在单

体与聚合物共存的平衡态中, 释放的 15% 单体不足以抵抗弹性蛋白酶水解对肺的损害, 引发肺气肿。

表 1 Serpin 的自然变异

结构	Serpin 及名称	突变残基	突变效应	引发疾病
hA	抗凝血酶 Rouen- I	47* Arg→His	丧失肝素结合位点	血栓形成
hA	抗胰蛋白酶 I	39Arg→Cys	丧失盐桥, 缺陷	肺气肿
hA	抗胰蛋白酶 M Procida	41Leu→Pro	螺旋扭曲, 不稳定	肺气肿
hD	甲状腺素结合球蛋白 Gary	96Ile→Asn	T4 结合位点破坏	?
s3C	抗胰蛋白酶 Null Bellingham	217Lys→终止	不表达	肺气肿
s4A	抗凝血酶 Hamilton	382Ala→Thr	RSL 区变异, 非功能性	血栓形成
s4A	抗纤维蛋白溶酶 Enschede	Ala 插入 353~357	RSL 紧密性丧失, 非功能性	出血
反应中心	C1-抑制子	444Arg→Cys	非功能性	血管神经性水肿
反应位点	抗凝血酶 Denver	394Ser→Leu	活力减弱	血栓形成
s4B	C1-抑制子	458Met→Val	表面正常	多态

注: hX: 螺旋 X (A、D), sYA (BC): β 折叠 A (BC) 第 Y (4、3) 带, * 为相应 serpin 残基序号。

4 Serpin 的肿瘤抑制功能-Maspin

依据 Liotta 提出的肿瘤细胞浸润模型: 肿瘤细胞必须附着于细胞外基质, 降解并越过基质。由于蛋白酶能水解破坏周围组织, 因此在浸润中起一定作用。1994 年, Zou 等^[16]从人乳腺表皮细胞中分离到一具有肿瘤抑制活力的 serpin-maspin。它在正常乳腺表皮细胞系中表达为 3.0 kb 的 maspin mRNA, 但在大多数被检乳腺癌细胞系中并未发现。将 maspin 转染子导入裸鼠, 发现肿瘤细胞的生长及转移均减弱。间接免疫荧光显微镜研究表明, Maspin 的可能作用方式为在细胞外基质或胞膜上以活性抑制子 (S 型) 与靶酶 1:1 结合, 形成稳定的抗变性复合物, 造成蛋白酶的失活。位于反应活性中心 N 端对决定靶特异性有重要作用的 P1 残基为 Arg。

最近的研究发现^[17], 可在体内外诱导产生的表皮 serpin-皮肤衍生的抗白细胞蛋白酶 (SKALP) 对肿瘤细胞的浸润也有抑制作用。

5 Serpin 的应用前景

Serpin 是研究蛋白质结构, 特别是一级结构与其功能关系的良好模型。而且由于 serpin 在生理上的重要调节作用以及它在肿瘤抑制方面的潜在应用价值, 人们试图通过对其结构及作用机理的研究, 治疗某些疾病, 比如 α_1 -AT Z 型纯合子导致的致死性儿童肝硬化, 可通过向肝细胞中导入人工合成的 α_1 -AT 特异性环状肽链 (BC₁₃) (图 1d), 以阻止聚合物的形成来缓解; 利用肿瘤恶性发展过程中 maspin 表达水平低下, 使其作为有效的诊断依据, 同时在乳腺癌细胞系中诱导 maspin 蛋白的重新表达或阻断靶酶的表达, 为肿瘤治疗提供一种新的药理学方法; 使用 serpin 缓解胰酶异常激活引发的急性胰腺炎或构建具有天然 serpin 活性的小分子抑制剂, 以弥补其分子量大所引致的治疗缺陷, 更好的应用于临床等。

目前关于 serpin 结构及它与靶酶的作用机理还存在许多争议, Enghild 等人认为, serpin 反应中心肽链断裂及复合物热力学稳定性提高

并非其完成抑制所必需^[18]。随着研究方法及技术的发展,人们会对 serpin 有较明了的认识。

参 考 文 献

- 1 Laskowski M Jr, Kato I. *Annu Rev Biochem*, 1980; **49**: 593
- 2 Huber R, Carrell R W. *Biochemistry*, 1989; **28**: 8951
- 3 Stein P, Leslie A G W, Finch J T *et al.* *Nature*, 1990; **347**: 99
- 4 Mottonen J, Strand A, Symersky J *et al.* *Nature*, 1992; **355**: 270
- 5 Haris P I, Chapman D, Harrison R A *et al.* *Biochemistry*, 1990; **29**: 1377
- 6 Carrell R W, Evans D L I, Stein P E. *Nature*, 1991; **353**: 576
- 7 Wright H T, Qian H X, Huber R. *J Molec Biol*, 1990; **213**: 513
- 8 Aulark K S, Eldering E, Hack C E *et al.* *J Biol Chem*, 1993; **268**: 18088
- 9 Bjork I, Nordling K, Olson S T. *Biochemistry*, 1993; **32**: 6501
- 10 Skrive K, Wikoff W R, Patston P A. *J Biol Chem*, 1991; **266**: 9216
- 11 Estell D A, Wilson K A, Laskowski M Jr. *Biochemistry*, 1980; **19**: 131
- 12 Matheson N R, van Halbeek H, Travis J. *J Biol Chem*, 1991; **266**: 13489
- 13 Lomas D A, Evans D L I, Stone S R *et al.* *Biochemistry*, 1993; **32**: 500
- 14 Potempa J, Korzus E, Travis J. *J Biol Chem*, 1994; **269**: 15957
- 15 Lomas D A, Evans D L, Finch J T. *Nature*, 1990; **357**: 605
- 16 Zou Z Q, Anisowicz A, Hendrix M J C *et al.* *Science*, 1994; **263**: 526
- 17 Alkemade H A C, Henri O F M, Ivonne M J *et al.* *American J Pathol*, 1993; **143**: 1679
- 18 Enghild J J, Valnickova Z, Thogersen I B *et al.* *J Biol Chem*, 1994; **269**: 20159

Study and Application of Serine Proteinase Inhibitor. Zhang Mei, Zhu Zuoming (*Institute for Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China*).

Abstract Serpin is a family of serine proteinase inhibitors homologous in structure and sequence, regulating many proteolysis cascade reactions. Their genetic aberrations in structure or secretion may result in substantial pathological problems. The clinical applications are based on their structures and mechanisms of inhibition.

Key words serine proteinase inhibitor, structure, reaction mechanism, clinical application