

间 α 胰蛋白酶抑制剂与胞外间质

赵 明

(中国科学院上海生物化学研究所, 上海 200031)

米田雅彦 木全弘治

(日本爱知医科大学分子医科学研究所, 爱知县 480-11)

摘要 间 α 胰蛋白酶抑制剂 (ITI) 家族是在人和动物的血液中广泛存在的一类蛋白质. ITI 由一条硫酸软骨素糖链将三条蛋白质肽链共价地结合在一起, 其中两条肽链与硫酸软骨素链以氨基酸的羧基与糖链上的羟基形成酯键的形式相连. 在细胞外间质中, 这种酯键可以转移到透明质酸糖链上, 进而调控细胞外间质的大小和细胞的性质. 另一条肽链具有 Kunitz 型蛋白酶抑制剂的结构, 作为一种临床应用的药物可以从尿中分离到.

关键词 间 α 胰蛋白酶抑制剂, 硫酸软骨素, 透明质酸, bikunin

1 引言

在人及动物的血液中存在许多对维持机体正常运转极其重要的因子, 其中一部分确切的功能还不甚清楚, 间 α 胰蛋白酶抑制剂 (inter α trypsin inhibitor, ITI 或 IaI) 就是一例. ITI 在正常人血清中含量约为 0.4 g/L, 是含量较高的蛋白质 (因含有硫酸软骨素糖链, 应为蛋白聚糖) 之一. 追溯其名称来源, 乃 60 年代用琼脂电泳分析血清成分时, 在 α_1 -球蛋白和 α_2 -球蛋白之间存在一种具有胰蛋白酶抑制剂活性的物质, 因而命名为间 α 胰蛋白酶抑制剂. 最近几年来, 对于 ITI 的结构、功能等方面的研究取得了较大的进展. ITI 是一种对于透明质酸的代谢、机能及细胞外间质起重要影响的分子.

2 ITI 的结构

人 ITI 的分子质量为 230 ku, 含有三条肽链: HC1、HC2 及 HF-30 (图 1). HC1 和 HC2 的分子质量分别为 80 ku 和 85 ku, 称为重链. HF-30 称为轻链, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳显示分子质量在 45~55 ku 之间的不均一条带, 分子含有两个 Kunitz 型的胰蛋白酶抑制剂结构域 (domain), 因而又被称为 bikunin. ITI 的蛋白酶抑制剂活性集中在 bikunin 上.

Bikunin 的 N 端第 10 个氨基酸丝氨酸上连有一条硫酸软骨素糖胺聚糖链, 由于硫酸软骨素链的硫酸化程度不一致. 因而 SDS-PAGE 的条带显示不均一性^[1].

还有一种前 α 胰蛋白酶抑制剂 (pre α trypsin inhibitor, PaI), 因琼脂糖电泳时其位置处于 α_1 球蛋白之前而得名 PaI, 并非 ITI 前体之意. 与 ITI 不同的是, PaI 只含有一条重链 HC3. 三条重链 (HC1、HC2、HC3) 相互间的同源性为 33%~54%, 重链与轻链之间没有同源性^[1]. 从人尿中发现的胰蛋白酶抑制剂 (urine trypsin inhibitor, UTI), 与 bikunin 是同一物质. 对其糖链部分结构的进一步分析表明, 在 ITI 中硫酸软骨素与 bikunin 结合部位的半乳糖基的 4 位是硫酸化的^[2], 但在 UTI 中这个半乳糖基是非硫酸化的.

ITI 及 PaI 是肝细胞合成的. Bikunin 与 α_1 球蛋白 (microglobulin, A1m) 由同一基因转录而来并翻译成一条肽链, 在加工过程中 N 端部分转变成 A1m, C 端部分加工成 bikunin. A1m 在成熟的 ITI 中并不存在, 在血清中游离存在或与免疫球蛋白 A 的 H 链形成复合体. cDNA 序列分析表明, HC1、HC2 及 HC3 在成熟过程中都经过了加工, 由 mRNA 翻译后的肽链在 N 端和 C 端都比各自成熟的

收稿日期: 1996-05-27, 修回日期: 1996-09-20

重链多一段肽段. 例如 HC2 在翻译后 N 端和 C 端分别多出 36 个氨基酸和 248 个氨基酸, 这些多出的肽段内含有加工信号. 重链之间虽具有较高的同源性, 但并不是由同一基因转录来

的, 各基因甚至不在同一条染色体上. HC1 和 HC3 位于染色体 3 上, HC2 位于染色体 10 上, bikunin 位于染色体 9 上^[3].

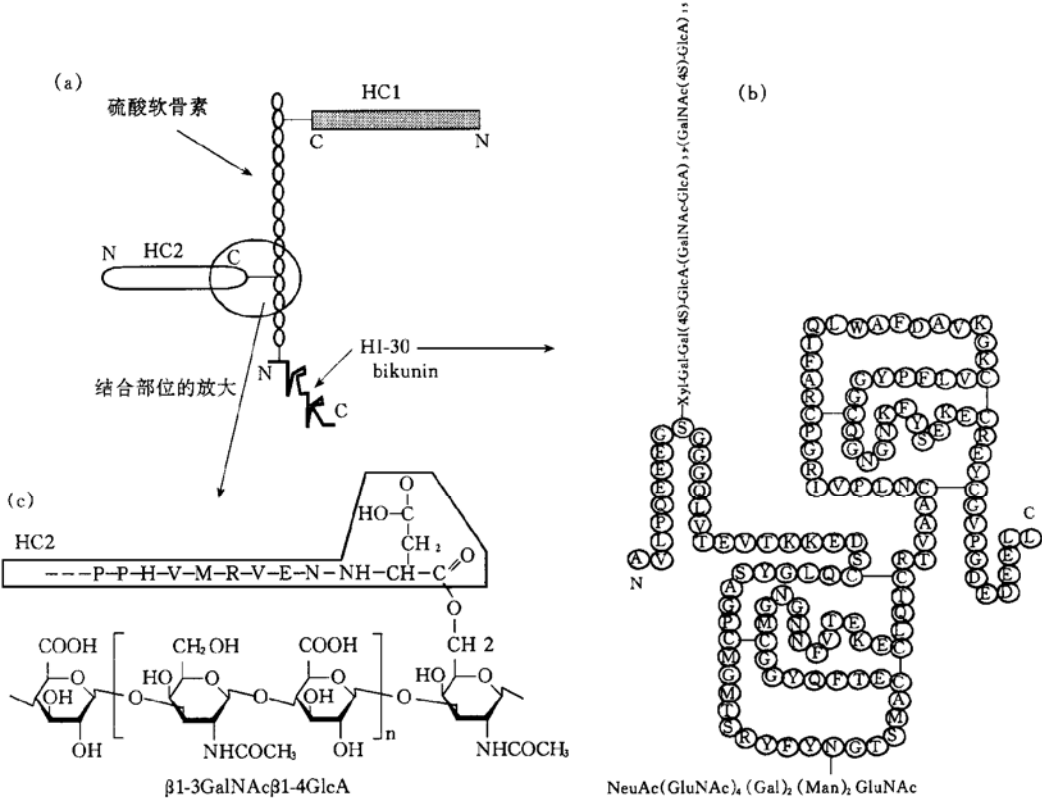


图 1 间 α 胰蛋白酶抑制剂 (ITI) 的结构

ITI 是由三条肽链组成的复合体, 分子由两条长链 (HC1 和 HC2) 及一条短链 (HC3) 组成 (a). HC3 含有两个 Kunitz 型的胰蛋白酶抑制剂区域, 分子连有硫酸软骨素而成为蛋白聚糖 (b). 两条长链与硫酸软骨素链形成酯键形式的共价结合 (c).

最近, ITI 及 PaI 分子的结构得到解明. ITI 在蛋白质序列分析时可以得到 3 个 N 端氨基酸, 但巯基还原剂及解离非共价结合的试剂都不能将三条肽链拆分, 一条硫酸软骨素糖胺聚糖链将三条肽链共价地连接在一起, 蛋白质化学结合质谱分析技术, 阐明了结合部位的结构: 三条重链 (ITI 的 HC1、HC2 和 PaI 的 HC3) C 端的最后一个氨基酸都是天冬氨酸, 这一天冬氨酸的 α -羧基与从轻链 bikunin 发出的硫酸软骨素链内的 N-乙酰氨基半乳糖 C-6 位的羟基脱水形成一个酯键. 这种酯键连接方

式是非常罕见的蛋白质与糖链的连接方式, 除了 ITI 和 PaI 内及 ITI 与透明质酸的结合外, 还没有发现其他例子. 这是蛋白质与糖结合的一种新的结构形式: 蛋白质-糖胺聚糖-蛋白质 (PGP)^[4].

3 与透明质酸的结合

透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 是由葡萄糖醛酸和 N-乙酰氨基葡萄糖二糖重复单位组成的相对分子质量 100 万以上的糖胺聚糖长链, 是细胞外间质的一种重要组成分子. 透明

质酸与其他胞外间质分子相互作用, 形成网状的结构, 维持胞外间质的稳定, 并对于细胞的性质、迁移及肿瘤的转移有重要的影响。

小鼠乳腺癌细胞 FM3A 及成纤维细胞在有血清培养中其透明质酸的合成及胞外间质大大增加。我们从培养的细胞中分离出的透明质酸中结合有分子质量为 83 ku 及 85 ku 的糖蛋白, 这一糖蛋白是血清来源的, 它的存在与胞外间质的大小有着相关关系^[5]。从病理的富含透明质酸的组织 (如骨性关节炎及风湿性关节炎患者的关节液) 抽提液中也大量发现这一透明质酸结合蛋白。蛋白质序列分析的结果表明其是 ITI 的重链^[6]。

ITI 的重链与透明质酸结合不同于其他透明质酸结合蛋白的性质: 其结合非常稳定, 高盐、去垢剂、蛋白质变性剂 (6 mol/L 盐酸胍) 及 100 °C 加热等解离非共价结合的方法都不能使它们解离, 它们的连接可能类似于 ITI 中重链与硫酸软骨素链的连接。蛋白质化学结合质谱分析的方法揭示了: ITI 及 PaI 的重链与透明质酸的结合也是通过其肽链 C 端的天冬氨酸的羧基与透明质酸长链内的 N-乙酰氨基葡萄糖 C-6 位的羟基脱水形成酯键而实现的^[7]。

别的研究小组从另外的角度也发现了 ITI 与透明质酸的结合。哺乳动物成熟的卵是在卵巢滤泡中由卵母细胞发育形成的, 卵的成熟过程中有一个卵丘膨胀的过程, 在此过程中卵丘细胞 (cumulus cell) 合成并分泌透明质酸形成胞外间质, 这一过程在体外可通过在培养液中添加促卵泡激素 (FSH)、胎牛血清及透明质酸合成的底物而实现。在不添加胎牛血清的情况下, 透明质酸的合成活性不受影响, 但合成的透明质酸分泌到培养液中而不是形成膨大卵丘^[8]。可见胎牛血清中存在胞外间质刺激因子 (ESF), 这一 ESF 被分离纯化后, 经氨基酸序列分析, 发现是牛血清的 PaI。分离的 bikunin 及其他蛋白酶抑制剂都没有 ESF 的活性, 因此 PaI 的 ESF 活性不是由其轻链 bikunin 的作用引起的, 推测是由其重链与卵

丘细胞外间质的其他构成成分相互结合相互作用而形成膨胀的卵丘, ITI 也具有相似的 ESF 活性。进一步的研究发现 ITI 与透明质酸之间有非共价结合。这种非共价结合的最适 pH 为 7, 结合活性随盐浓度的升高而降低^[9]。

4 UTI (bikunin) 的作用

ITI 的重链可与透明质酸形成酯键形式的共价结合, bikunin 就会游离出来。Bikunin 在体内的功能之一就是抑制蛋白酶的活性。有报道表明尿中存在的 UTI 是 ITI 的代谢产物。Bikunin 含有硫酸软骨素糖胺聚糖链, 其硫酸化程度低于体内存在的其他硫酸软骨素糖链, 该硫酸软骨素糖链 4 位硫酸化的二糖占 30%, 没有 6 位硫酸化^[10]。糖胺聚糖链的存在对 bikunin 的蛋白酶抑制剂的活性没有影响。肥大细胞 (mast cell) 也含有一种蛋白酶抑制剂称为 trypstatin, 为 bikunin C 端的 Kunitz 结构域部分。在肥大细胞中检测不到 bikunin 的 mRNA, 因而 trypstatin 是由血清进入细胞的^[11]。

Lewis 肺癌细胞 (3LL) 及白血病细胞 (U937) 的表面有 bikunin 受体存在^[12]。正常细胞表面存在的血纤维蛋白溶酶 (plasmin) 具有抑制肿瘤细胞浸润的活性, UTI 则具有抑制 plasmin 的活性, 因而癌细胞表面的 UTI 则可能抑制正常细胞表面的蛋白酶的活性, 从而创造一个对于癌细胞本身的转移及浸润有利的环境。由此不难理解癌患者尿中 UTI 的浓度比正常人高 100~ 500 倍。

另外, UTI 作为一种医用药物的有效成分, 在临床上被广泛用于急、慢性肺炎及急性循环不全的抢救治疗。

5 结 语

经过 30 年, 特别是近年来的努力, 对血清中广泛存在的这一蛋白酶抑制剂家族 (ITI 家族) 的分子结构的研究有了较为清楚的认识, 对于其功能也有了一定的了解。正是随着对 ITI 家族研究的进一步深入, 新的问题不断展

现在人们面前。ITI 及 PaI 与透明质酸结合之后与其他胞外间质因子相互作用,从而影响到胞外间质的结构和功能,其作用的分子机制至今还不清楚。ITI 及 PaI 与透明质酸反应,将其重链转移到透明质酸上,对于这一转移反应是如何实现的,目前只了解到一个相当于转移酶的血清因子参与了这一反应,我们正致力于这一转移酶的分离纯化工作,以期揭开这一新型转移酶——酯基转移酶的性质及反应的过程及机理。另外,ITI 在细胞及其间质的调控方面的意义也是一个值得深入研究的领域。

致谢 中国科学院上海生物化学研究所孙册教授给予多处指导和帮助,特此表示感谢。

参 考 文 献

1 Castillo G M, Templeton D M. Subunit structure of bovine ESF (extracellular matrix stabilizing factor (s)). FEBS Lett, 1993, **318**: 292~ 296

2 Oyama M, Yamada S, Kinugasa H *et al.* Structural analysis of the chondroitin sulfate in the protein binding region of human ITI: extence of Gal (4 sulfate). Jpn Biochem Soc, 1994, **66**: 697

3 Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesboue R *et al.* Human plasma inter- α -trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. Eur J Biochem, 1989, **179**: 147~ 154

4 Enghild J J, Salvesen G, Thøgersen I B *et al.* Presence of the protein glycosaminoglycan protein covalent cross link in the inter- α inhibitor related proteinase inhibitor heavy chain 2/bikunin. J Biol Chem, 1993, **268**: 8711~ 8716

5 Yoneda M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum derived 85-kDa protein. J Biol Chem, 1990, **265**: 5247~ 5257

6 Huang L, Yoneda M, Kimata K. A serum derived hyaluronan associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter α trypsin inhibitor. J Biol Chem, 1993, **268**: 26725~ 26730

7 Zhao M, Yoneda M, Ohashi Y *et al.* Evidence for the covalent binding of SHAP, heavy chains of inter α trypsin inhibitor, to hyaluronan. J Biol Chem, 1995, **270**: 26657~ 26663

8 Salustri A, Yanagishita M, Hascall V C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell- oocyte complex during follicle-stimulating hor-

mon-induced mucification. J Biol Chem, 1989, **264**: 13840 ~ 13847

9 Chen L, Mao S J T, Mclean L R *et al.* Proteins of the inter α -trypsin inhibitor family stabilize the cumulus extracellular matrix through their direct binding with hyaluronic acid. J Biol Chem, 1995, **270**: 28282~ 28287

10 Yuki Y, Nomura K, Kirihara M *et al.* Charge isomers of urinary bikunin (trypsin inhibitor). Biochim Biophys Acta, 1993, **1203**: 298~ 303

11 Itoh H, Ide H, Ishikawa N *et al.* Mast cell protease inhibitor, trypstatin, is a fragment of inter- α trypsin inhibitor light chain. J Biol Chem, 1994, **269**: 3818~ 3822

12 Kobayashi H, Gotoh J, Fujie M *et al.* Effects of urinary trypsin inhibitor on the invasion of reconstituted basement membranes by ovarian cancer cells. Int J Cancer, 1994, **57**: 378~ 384

Inter α Trypsin Inhibitor and Extracellular Matrix. ZHAO Ming (*Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*); Yoneda Masahiko, Kimata Koji (*Institute for Molecular Science of Medicine, Aichi Medical University, Japan*).

Abstract Inter α trypsin inhibitor (ITI) is a kind of protein widely existed in human and animal blood. ITI was composed of three peptides covalently linked together by a chondroitin sulfate chain. Two of the three peptides were linked to the chondroitin sulfate chain each by an ester bond between the carboxyl group of the final amino acid of the peptide and an internal C-6 hydroxyl group of the sugar chain. In extracellular matrix, this kind of ester bond can be transferred from chondroitin sulfate chain to hyaluronan. Thus the extracellular matrix and cell functions were regulated. The other peptide chain of ITI has kunitz type protease inhibitor domains. As a medicine, it can be separated from urine.

Key words inter α trypsin inhibitor, chondroitin sulfate, hyaluronan, bikunin