

- tor II on Na^+/H^+ exchange activity. *Hepatology*, 1995, 22 (2): 588~597
- 20 黄桂君, 钱桂生 (Huang G J, Qian G S). pH 对细胞凋亡的调控及 pH 调节的肿瘤治疗研究. *科学 (Science)*, 1997, 228 (8): 51~52

Advances in the Study of the NHE Gene Family. HUANG Guirjun, QIAN Guirsheng (*Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China*).

Abstract Na^+/H^+ exchangers (NHE) are vital transmembrane transporters involved in multiple cellular functions including the regulation of intracellular pH, the control of cell volume and ion transport. Five isoforms of Na^+/H^+ exchangers have been cloned and characterized to

date; they constitute a new gene family of vertebrate transporters. And these isoforms are highly regulated by a remarkably wide variety of stimuli which can modulate their expression level and activity. Among the isoforms, the increased expression level and activity of human NHE-1 have been found to play a role in some critical diseases, such as tumor, hypertension and diabetes. Thus it may provide a new way of diagnosing and treating for these diseases by investigating on the transcription modulation of NHE-1 gene and the activity regulation of the exchanger.

Key words Na^+/H^+ exchanger, intracellular pH, gene expression regulation, neoplasm, hypertension

导向性纤溶酶原激活剂的研究*

杨嘉树 茹炳根

(北京大学蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 溶栓疗法是血栓治疗中的一种重要措施. 研制具有高选择性的导向性纤溶酶原激活剂有着重大的理论意义和实用价值. 采用血栓特异的单克隆抗体及其片段来介导溶栓剂已展示出较好的应用前景. 双功能抗体以及同时具有抗栓, 抗凝活性的小肽正逐渐拓宽人们有关导向分子研制的视野. 所有这一切都将随着分子生物学技术的不断完善而付诸实现.

关键词 导向性纤溶酶原激活剂, 血栓, 血小板, 纤维蛋白, 单克隆抗体, 双功能抗体, 单链抗体, 活性小肽

学科分类号 Q51

由血凝块导致的脑血栓和冠状动脉血栓形成严重危害人类的健康. 对这类由于血液凝固阻塞血管而引起的疾病, 可以通过使用溶栓剂, 将纤溶系统中的纤维蛋白溶酶原 (plasminogen, 简称纤溶酶原) 活化成纤溶酶 (plasmin), 进而催化血凝块中的纤维蛋白降解成小分子的可溶物质而使循环畅通.

1 临床上使用的溶栓剂

目前, 在溶栓疗法中最常使用的溶栓剂有

三类, 即链激酶 (streptokinase, SK), 尿激酶 (urokinase, UK 或 urokinase-type plasminogen activator, u-PA) 和组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA). SK 和 UK 缺乏纤维蛋白专一性, 除了能激活纤维蛋白表面的纤溶酶原外, 也同时激活循环中游离的纤溶酶原而导致 $\alpha_2\text{AP}$ (α_2 -antiplasmin, 体内存在的纤溶酶的拮抗剂) 的消耗, 进而使

* 国家“863”计划资助项目 (863-102-09).

收稿日期: 1997-07-17, 修回日期: 1997-11-16

纤维蛋白原, 凝血因子 V 和 VIII 等几种凝血蛋白降解, 最终导致出血倾向. t-PA 有一定的纤维蛋白专一性, 产生的纤溶酶由于同纤维蛋白相联系, 避免了被 α_2 -AP 的迅速抑制, 从而有效地使血凝块中的纤维蛋白降解. 尽管如此, 在溶解冠状动脉血栓时, 所使用的 t-PA 的剂量仍会造成出血倾向. 此外, 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (single chain urokinase type plasminogen activator, scur-PA) 作为尿激酶的前体形式, 尽管不直接结合在纤维蛋白表面上, 但它更倾向于激活与纤维蛋白结合的纤溶酶原, 而不是血浆中的纤溶酶原.

因此, 一个理想的溶栓剂应当是专一性地激活血栓上的纤溶酶原, 而不是作用于循环中的凝血系统成分. 从组成上看, 血栓是由纤维蛋白提供骨架, 在其上堆积血小板等血细胞而组成, 因此, 可以作为溶栓剂识别位点的是那些在凝血过程后, 仅出现在活化血小板和纤维蛋白表面上的结构, 这些结构在静息血小板和纤维蛋白原上是不存在的.

2 天然纤溶酶原激活剂的结构和功能

t-PA 是一种丝氨酸蛋白酶, 纤溶酶水解 t-PA 分子的 Arg₂₇₅-Ile₂₇₆ 之间的肽键, 使之变成双链, 重链 (A 链, 氨基端) 含有多个结构/功能区, 包括“指环”区 (F), “表皮生长因子区” (E) 和与纤溶酶类似的“Kringle”区 (K1 和 K2). 轻链 (B 链, 羧基端) 是酶活性位点所在的区域. t-PA 各区的删除突变表明与纤维蛋白的结合是通过 F 区和 K2 区来实现的, 而且这种结合也取决于纤维蛋白的部分水解和 t-PA 从单链向双链的转变.

scur-PA 是单链的糖蛋白, 纤溶酶或血管缓激肽 (kallikrein) 有限地水解其分子的 Lys₁₅₈-Ile₁₅₉ 之间的肽键, 使之转变为双链 (即通常意义的尿激酶, UK), 二链之间靠 Cys₁₄₈ 与 Cys₂₇₉ 的二硫键连接. 催化中心在羧基端的重链上. 氨基端的轻链含有“表皮生长因子”区 (E) 和一个 Kringle 区 (K), 尚未证实的蛋白酶切断 Glu₁₄₃-Leu₁₄₄ 的肽键, 产生小分子

(32 ku) 的单链 (scur-PA-32K). 与双链 u-PA 不同, scur-PA 具有显著的纤维蛋白专一性, 关于这种专一性的机制目前还没有一致的看法. 由于 scur-PA-32K 和野生型均引起相同的纤维蛋白专一的血块溶解, 因此, scur-PA 分子中与纤维蛋白专一性有关的部分似乎独立于分子的氨基端部分.

从上面的论述可见, t-PA 与 scur-PA 的催化活性区和纤维蛋白结合区在功能上是彼此独立的. 这就为结构域的拼接及分子改造提供了可能.

3 结构域拼接

Robbins 和 Tanaka^[1] 用二硫键将纤溶酶原的 A 链与 UK 的 B 链交连起来. 这个 92 ku 的杂合分子在纤维蛋白凝块实验中表现出的纤溶活性比 UK 强 2 倍. 这种活性的提高主要是由于对纤维蛋白的亲合性提高了 8 倍多所致. Boreisha 等^[2] 将纤溶酶原的 A 链与 t-PA 的 B 链交连, 杂合分子的选择性纤维蛋白溶解活力与 t-PA 相同. 此外, Nelles 等^[3] 构建了一个重组分子, 它由 t-PA 的 A 链 (纤维蛋白结合区) 和 scur-PA-32K 构成, 并且在 CHO 细胞中成功表达, 遗憾的是, 重组蛋白的纤维蛋白亲和性比 t-PA 要差, 而且在人血浆凝块实验中, 对纤维蛋白的选择性不如单链或双链 t-PA.

从以上这些实验来看, 单纯的对纤溶系统中业已存在的具有不同功能的结构域进行嫁接, 无论是通过化学偶联还是通过基因工程的手段, 很难获得比亲本分子大很多的纤维蛋白选择性, 因此, 人们把目光又集中在其他效应分子上.

4 通过抗体介导的导向溶栓

抗体介导的溶栓剂根据抗体的特异性分为三类: 针对活化血小板的抗体, 针对纤维蛋白的抗体和同时针对血栓和溶栓剂而制成的双功能抗体. 以下逐一加以论述.

偶联上针对活化血小板抗体的溶栓剂特别适合于动脉血栓的治疗. Bode 等^[4] 通过化学

偶联的方法用 N-琥珀酰亚胺 3-(2-二硫吡啶) 丙酸盐 (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP) 将 UK 与针对血小板表面的糖蛋白 GP II b/ IIIa 的单克隆抗体 7E3 的 Fab' 片段偶联起来。在血凝块的溶解实验中, 杂合分子的溶栓能力比单独用 UK 或 UK 与 7E3 (Fab') 的混合物强 25 倍 ($P < 0.009$), 而且这种溶栓能力是与血小板的浓度呈正相关的。杜羚等^[5]用 SPDP 将尿激酶 B 链与抗人活化血小板 α 颗粒膜蛋白 GMP-140 的单克隆抗体 SZ-51 的 Fab 片段共价偶联, 杂合分子 UK-SZ51 保留了原抗体的结合专一性。体外溶栓效率较尿激酶提高约 5 倍。其溶栓作用对血浆中的纤维蛋白原含量无影响。总体上看, 利用血小板作为靶分子的导向溶栓剂不是很多, 而且多半是通过化学偶联来进行的, 其中的原因可能与不易获得高特异性的抗体有关。

研究比较多的是针对纤维蛋白的导向分子。Runge 等^[6]将 scurPA 与抗纤维蛋白 β 链 N 端的单克隆抗体 59D8 的 Fab' 片段用 SPDP 偶联起来, 体外实验显示杂合分子的溶栓能力比 t-PA 强 33 倍 ($P < 0.001$), 比没偶联的 scurPA 强 230 倍 ($P < 0.0001$), 比 UK 强 420 倍 ($P < 0.0001$), 体内以兔颈静脉血栓为模型, 杂合分子的活力比 scuPA 强 29 倍。这种活性的提高除了由于纤维蛋白特异性外, 是否与偶联了抗体后 scurPA 的半寿期延长有关呢? 实验表明, 将 scurPA 与不具有纤维蛋白特异性的抗体偶联并没有出现溶栓活力的提高。看来延长半寿期的可能性较小, 主要还是由于纤维蛋白的导向所致。除了 59D8 外, 另一类针对纤维蛋白 β 链 N 端的单克隆抗体 64C5 也被用来作为导向分子^[7,8], 溶栓效果也有类似的提高。

纤维蛋白上的 D 二聚体 (D-dimer) 也是一种作为导向的靶部位, Dewerchin 等^[9]用化学偶联的方法将抗 D-dimer 的单克隆抗体 MA-15C5 与重组的 scurPA (rscurPA) 交联起来, 在体外实验中, 其溶栓活力比 rscurPA 提高了 6.4 倍, 比 rtcurPA 提高了 2.2 倍。使用抗 D-

dimer 的单克隆抗体比使用抗 β 链 N 端的单抗有一个优越之处, 即纤维蛋白的 N 端在纤维蛋白开始被降解后不久, 有可能被切割而使抗原决定簇丢失, 但对于前者, 这一问题并不存在。D-dimer 会一直伴随着纤维蛋白而存在, 除非纤维蛋白被彻底降解。

随着分子生物学技术的日趋完善和化学偶联所暴露出的缺点日益明显——如产物不均一, 活性损失较大, 产率低等。人们逐渐用基因工程的方法来构建导向溶栓剂。Runge 等^[10]分别将 t-PA 的 B 链基因和 scurPA-32K 基因^[11]接在单抗 59D8 重链第三恒区基因的后面, 构建表达载体, 导入重链表达缺陷的 59D8 杂交瘤细胞中, 表达出的杂合分子是与轻链组装在一起的。其中 r-scurPA-32K-59D8 在体外的溶栓活力比 scurPA 强 6 倍, 而在兔颈静脉血栓试验中, 溶栓活力比 scurPA 强 20 倍。近年来, 人们将导向分子的构建纷纷集中在用抗体可变区片段 Fv (fragments of variable region of antibody) 或单链抗体 scFv (single chain of fragments of variable region of antibody) 来与溶栓分子偶联。这是基于如下二点认识: 一是人们通过实验证实抗体介导的导向作用只需一价抗体的结合即可^[7], 即 Fv 或 Fab 的效果与完整抗体是一样的; 二是从基因工程的角度看, 操作 Fv 或 scFv 片段比操作完整抗体要容易得多, 更何况越来越多的实验表明 Fv 或 scFv 的抗原结合能力与完整抗体是相当的^[12]。Laroche 等^[13]构建了单抗 MA-15C5 (抗 D-dimer) 的单链抗体 scFv-K₁₂G₀, 它是轻链可变区在前, 通过一个合成的 7 肽与重链可变区相连, 该单链抗体在昆虫细胞 Sf9 中得到表达, 以后他们^[14]又将 scurPA33K (Ala132-Leu411) 的基因连在 scFv-K₁₂G₀ 后, 构建成了导向分子 K₁₂G₀S₃₂并且在 Sf9 细胞中获得表达, 表达产物具有纤维蛋白的特异性, 其对 D-dimer 的亲和力与 MA-15C5 相近, 正是由于这种纤维蛋白亲和性, 使得导向分子的溶栓能力比 scurPA 强 13 倍, 比 tcurPA 强 2.5 倍。用 sFv 来介导溶栓剂, 具有分子小, 穿透性

强, 清除快等优点. 应当说是今后导向溶栓发展的主流.

5 双功能抗体

能同时识别血栓和溶栓剂表面抗原决定簇的双功能抗体能够增加血栓周围溶栓剂的有效浓度, 因此是一种间接导向溶栓的途径. 用化学偶联的方法将 59D8 与抗 t-PA 的抗体 TCL8 相连, 所得的双功能抗体在体内 (兔颈静脉模型) 和体外均使 t-PA 的溶栓能力提高了 5 倍, 且消耗的纤维蛋白原和 α_2 -AP 更少, 相似的结果也从既识别纤维蛋白又识别 UK 的双功能抗体中得到^[15].

除了用化学偶联法制备双功能抗体外, 也可以用不同的杂交瘤细胞彼此融合的方法来获得. 如将胸腺嘧啶核苷激酶缺陷的 59D8 杂交瘤细胞与次黄嘌呤磷酸戊糖转移酶缺陷的 TCL8 杂交瘤细胞进行融合, 筛选到的细胞株能分泌具有双重抗原结合活性的抗体, 该抗体在体外溶栓实验中使 t-PA 的溶栓活力增强了 11 倍^[15].

当然用 scFv 来构建双功能抗体也是一种思路^[16]. 近年已有用基因工程的方法生产双特异性的 scFv 来治疗肿瘤^[17], 并且获得满意疗效, 只是在导向溶栓上未见报道.

6 其他

除了以抗体作为导向分子外, Tanake 等^[18]利用 Annexin V 构建了另一类导向溶栓剂. Annexin 是一个蛋白质家族, 它们具有 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合能力, 其中 Annexin V 是这一家族中分布最广泛同时也是结合能力最强的一种. 它可以通过 Ca^{2+} 牢固结合到活化血小板表面. 由于 Annexin V 是人体内的蛋白质, 因此, 用它做的导向分子除了具有对活化血小板的亲合性外, 不会象前述鼠源单抗那样引起免疫反应. Tanaka 等将 Annexin V 与尿激酶 B 链用二硫键相连接. 体外溶栓实验表明杂合分子的活性与尿激酶相当, 以鼠肺栓塞模型做的体内实验则表明杂合分子的溶栓能力

比尿激酶强 3~4 倍, 而杂合分子的血浆清除率却与尿激酶相同. Tait 等^[19]用基因工程的方法将 Annexin V 分别与 scurPA (Ser1-Leu411) 和 scurPA (Leu144-Leu411) 相连, 在 *E. coli* 中以包含体形式获得表达, 经变复性和纯化后, 杂合分子既具有 Annexin V 的活性, 也具有尿激酶的活性. 体外溶栓能力与尿激酶相近. 体内实验尚待进行.

目前, 溶栓治疗中常见的一个问题是治疗后不久又会出现血小板介导的再栓塞 (platelet-mediated reocclusion), 因此血栓治疗往往需要将纤维蛋白特异的溶栓剂与抗凝血酶或抗血小板聚集药物联合使用. Lijnen 等^[20]正是出于这样的考虑, 将水蛭素 (hirudin) C 端 53~65 (Asn53~Gln65) 位的片段通过一段人工合成的 14 肽与 scurPA-40K (Ser47-Leu411) 相连. 用基因工程的手段在 *E. coli* 中表达出目标蛋白. 这种杂合分子没有破坏 scurPA-40K 对纤维蛋白的亲合性, 同时表现出剂量依赖的凝血酶时间 (thrombin time) 的延长, 其对血栓的溶解能力与 scurPA 相当. 此外, 杂合分子还可以抑制凝血酶介导的血小板聚集. 其他的一些性质并没有比亲本分子有太大的改进. 严格说来, 上述分子并不能称的上是导向溶栓剂, 但是由于血栓治疗往往是多因素的, 因此也不宜在溶栓与抗栓和抗凝之间划出严格界线^[21]. 我们实验室将一类广泛存在的具有细胞结合作用的 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列插入到 scurPA 的 K 区, 成功的构建了多种突变体, 并在 Sf9 细胞中获得表达, 初步结果显示杂合分子具有抗血小板聚集作用, 进一步的工作正在进行当中.

7 展 望

随着人们对血栓形成机理的不断探索, 各种特异性的导向溶栓剂将被应用于血栓治疗. 提供导向的分子将会从完整的鼠源单抗逐渐变为具有同样亲和性的单链抗体, 进而也可能只将抗体可变区上的互补决定区 (complementarity determining regions, CDRs) 移植到溶栓

剂上而达到分子最小, 导向性不变的目的. 同时越来越多的既具有导向性又具有抗栓, 抗凝活性的人体内的一些小肽将被用来介导溶栓剂, 以达到综合治疗血栓的目的. 所有这些都有赖于蛋白质工程技术的不断完善.

参 考 文 献

- 1 Robbins K C, Tanaka Y. Covalent molecular weight ~ 92000 hybrid plasminogen activator derived from human plasmin aminoterminal and urokinase carboxyl-terminal domains. *Biochemistry*, 1986, **25** (12): 3603~ 3611
- 2 Robbins K C, Boreisha I G. A covalent molecular weight ~ 92000 hybrid plasminogen activator derived from human plasmin fibrin-binding and tissue plasminogen activator catalytic domains. *Biochemistry*, 1987, **26** (15): 4661~ 4667
- 3 Nelles L, Lijnen H R, Collen D *et al.* Characterization of a fusion protein consisting of amino acids 1 to 263 of tissue-type plasminogen activator and amino acids 144 to 411 of urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1987, **262** (22): 10855~ 10862
- 4 Bode C, Meinhardt G, Runge M S *et al.* Platelet-targeted fibrinolysis enhances clot lysis and inhibits platelet aggregation. *Circulation*, 1991, **84** (2): 805~ 813
- 5 杜 羚, 余瑞荣, 华子春等 (Du L, Yu R R, Hua Z C *et al.*). 抗活化血小板单克隆抗体与尿激酶杂合分子的纤溶作用. *中国科学 (B 辑) (Science in China (Series B))*, 1993, **23** (1): 32~ 37
- 6 Bode C, Runge M S, Schnermark S *et al.* Conjugation to antifibrin Fab' enhances fibrinolytic potency of single-chain urokinase plasminogen activator. *Circulation*, 1990, **81** (6): 1974~ 1980
- 7 Bode C, Runge M S, Newell J B *et al.* Thrombolysis by a fibrin-specific antibody Fab'-urokinase conjugate. *J Mol Cell Cardiol*, 1987, **19** (4): 335~ 341
- 8 Bode C, Matsueda G R, Hui K Y *et al.* Antibody-directed urokinase: a specific fibrinolytic agent. *Science*, 1985, **229** (4715): 765~ 767
- 9 Dewerchin M, Lijnen H R, Hoef B V *et al.* Biochemical properties of conjugates of urokinase-type plasminogen activator with a monoclonal antibody specific for cross-linked fibrin. *Eur J Biochem*, 1989, **185** (1): 141~ 149
- 10 Schnee J M, Runge M S, Matsueda G R *et al.* Construction and expression of a recombinant antibody-targeted plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84** (19): 6904~ 6908
- 11 Runge M S, Quertermous T, Zavodny P J *et al.* A recombinant chimeric plasminogen activator with high affinity for fibrin has increased thrombolytic potency *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (22): 10337~ 10341
- 12 Huston J S, Hunter M M, Tai M S *et al.* Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. *Methods in Enzymology*, 1991, **203**: 46~ 88
- 13 Laroche Y, Demaeyer M, Stassen J M *et al.* Characteriza-

tion of a recombinant single-chain molecular comprising the variable domains of a monoclonal antibody specific for human fibrin fragment D-dimer. *J Biol Chem*, 1991, **266** (25): 16343~ 16349

- 14 Holvoet P, Laroche Y, Lijnen H R *et al.* Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of a single-chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer specific antibody and a truncated single-chain urokinase. *J Biol Chem*, 1991, **266** (29): 19717~ 19724
- 15 Haber E, Quertermous T, Matsueda G R *et al.* Innovative approaches to plasminogen activator therapy. *Science*, 1989, **243** (4887): 51~ 56
- 16 Mallender W D, Voss E W. Construction, expression and activity of a bivalent bispecific single chain antibody. *J Biol Chem*, 1994, **269** (1): 199~ 206
- 17 Gruber M, Schodin B A, Wilson E R *et al.* Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J Immunol*, 1994, **152** (11): 5368~ 5374
- 18 Tanaka K, Einaga K, Tsuchiyama H *et al.* Preparation and characterization of a disulfide-linked bioconjugate of Annexin V with the B chain of urokinase: an improved fibrinolytic agent targeted to phospholipid-containing thrombi. *Biochemistry*, 1996, **35** (3): 922~ 929
- 19 Tait J F, Engelhardt S, Smith C *et al.* Prourokinase-Annexin V chimeras. *J Biol Chem*, 1995, **270** (37): 21594~ 21599
- 20 Lijnen H R, Wnendt S, Schneider J *et al.* Functional properties of a recombinant chimeric protein with combined thrombin inhibitory and plasminogen-activating potential. *Eur J Biochem*, 1995, **234** (1): 350~ 357
- 21 Collen D. Thrombolytic Therapy. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (1): 742~ 746

Advances in Thrombi-targeted Plasminogen Activator. YANG Jia-shu, RU Bing-gen (*National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, Peking University, Beijing 100871, China*).

Abstract Thrombi-targeted plasminogen activator has an important effect on thrombolysis. Some good results have been obtained by using monoclonal antibody or its fragments specific for fibrin or platelet to direct the plasminogen activator. Bispecific antibody and some peptides with properties of antithrombin or anticoagulation give new angle of view for targeted plasminogen activator.

Key words thrombin-targeted plasminogen activator, thrombi, platelet, fibrin, monoclonal antibody, bispecific antibody, single-chain antibody, active peptides