

t-PA 蛋白质分子的改造

王 结 义 宋 后 燕

(上海医科大学分子遗传学研究室, 上海)

提 要

组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 与纤维蛋白有高亲和力, 具有特异地溶解血栓的功能。t-PA 含有多个结构域, 其分子结构和功能关系的阐明, 促进了改造 t-PA 分子以发展更特异的血栓溶解剂的研究。

组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 专一水解纤溶酶原形成纤溶酶, 从而激活纤溶系统。正常的纤溶功能对于清除血管内不溶性纤维蛋白, 保证血循环畅通起重要作用。药用 t-PA 则能高效地预防和治疗急性心肌梗塞等血栓性疾病^[1]。

t-PA 与纤维蛋白的亲合力很高, 而且其激活纤溶酶原依赖于纤维蛋白的作用。当 t-PA 接触到血栓后, 立刻形成纤维蛋白、t-PA 及纤溶酶原三元复合体, t-PA 选择性地高效激活血栓中的纤溶酶原生成纤溶酶, 后者水解纤维蛋白从而溶解血栓。纤溶酶本身的专一性不高, 除水解纤维蛋白外, 还能降解纤维蛋白原、V 及 VIII 凝血因子。但是游离状态的 t-PA 与纤溶酶原作用时 $K_m = 65 \mu\text{mol/L}$, 而血浆纤溶酶原浓度约 $2 \mu\text{mol/L}$, 所以 t-PA 几乎不激活血流中的纤溶酶原, 药用时一般不会引起“全身性纤溶状态”^[2]。

t-PA 用于溶纤治疗时也有一定的局限性, 例如入血后大部分与纤溶酶原激活剂抑制物 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 形成 1:1 分子比复合物, 快速失去活性^[3]。肝细胞膜上的特导受体识别 t-PA 分子^[4], 快速结合 t-PA, 使 t-PA 血流半寿期仅 4—6 分钟。因此, 治疗剂量高达 40—90 mg。受治疗的病人

血浆 t-PA 浓度上升到生理水平的 1000 倍时, 血浆纤维蛋白浓度下降 30—50%, 多次持续用药会易出现内出血倾向^[5]。因此, 改造 t-PA 分子结构, 消除上述缺点, 是目前引人注目的课题。

t-PA 的唯一功能是水解激活纤溶酶原, 然而直接与 t-PA 分子相互作用的有纤溶酶原、纤维蛋白、PAI、肝细胞膜受体四种蛋白质。说明 t-PA 的作用受到复杂的控制。研究这些分子间的相互作用机制, 尤其是 t-PA 对纤维蛋白的亲合力、激活纤溶酶原的活性、PAI 对 t-PA 的抑制作用及受体对 t-PA 的特异性摄取诸方面与 t-PA 分子特定结构域的关系, 会促进 t-PA 分子的结构改造, 使其有更强的溶纤专一性和效率。

一、t-PA 分子的结构和功能^[6]

t-PA 分子是含 527 个氨基酸的糖蛋白, 分子量为 67kD。天然 t-PA 为单链分子, 受纤溶酶或胰蛋白酶催化水解 Arg₂₇₅—Ile₂₇₆ 肽键, 转变为由单一二硫键相连的双链 t-PA。双链 t-PA 的 N 端是重链 (或 A 链), C 端为轻链 (或 B 链)。t-PA 的 cDNA 及染色体基因已成功地克隆和表达^[7,8]。人 t-PA 基因位于第 8 对染色体, 约 36kb, 有 14 个外显子, 分别由指形区 (Finger Domain, F)、表皮生长因子

区 (Epidermal Growth Factor Domain, E) 及两个三角区 (Kringle1、Kringle2; K₁、K₂) 由

IV、V、及 VI—IX 外显子编码, 轻链 (Light Chain, L) 由外显子 X—XIV 编码, 这五个

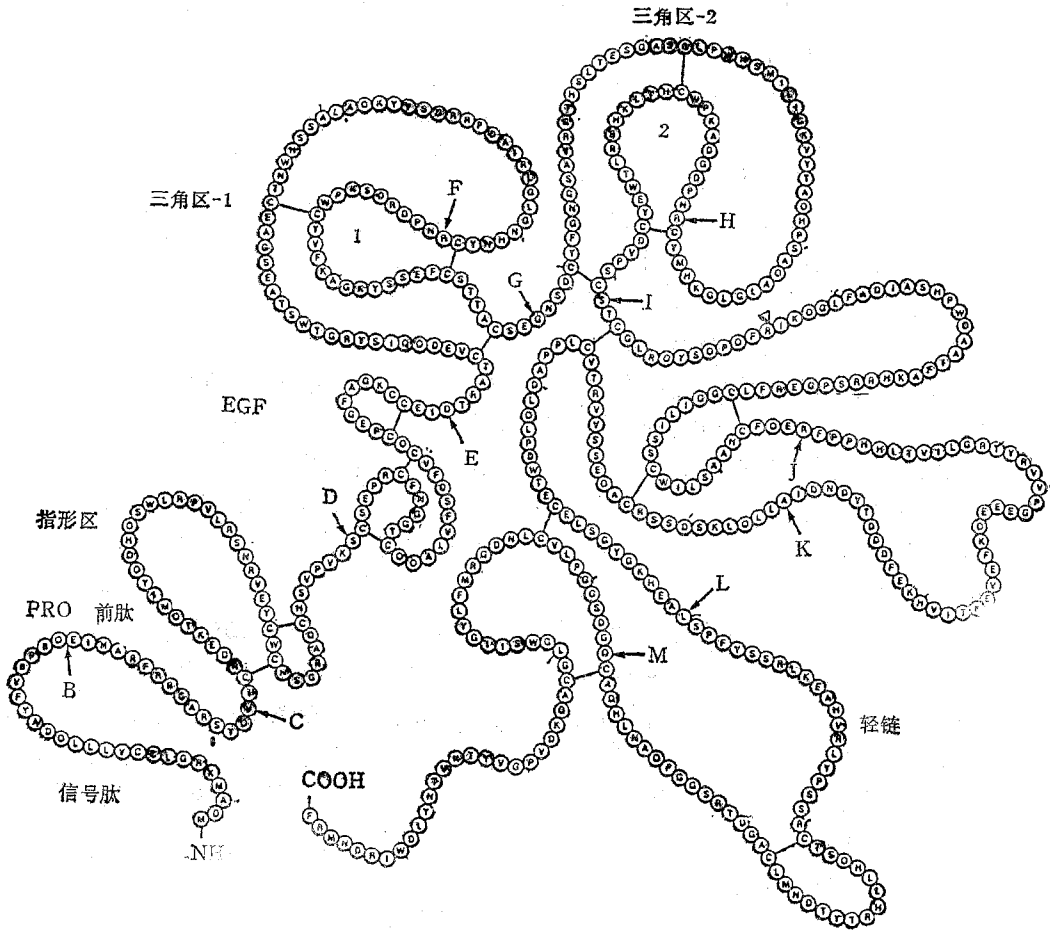


图1 t-PA 前体分子二级结构模型

结构域都有相对独立功能。

1. 重链和轻链 重链(H)或A链由1—275 氨基酸组成。轻链或B链由276—527 氨基酸组成。重链包含指形区、表皮生长因子区及二个三角区,它与 t-PA 激活纤溶酶原的活性无关。轻链与胰蛋白酶等丝氨酸蛋白酶有很高的同等性,含有 t-PA 的活性中心,即 His₃₂₂, Asp₃₇₁, Ser₄₇₈。

轻链具有激活纤溶酶原的活力,轻链的单克隆抗体能特异地与 t-PA 的轻链结合,并抑制其活性; t-PA 轻链 cDNA 的表达产物,也具有 t-PA 的活性。表明了 t-PA 分子水解纤溶酶原的功能由轻链决定。

轻链还与 t-PA 的活性受 PAI 抑制有

关。用 DFP 处理后的 t-PA 分子不能再和 PAI 结合,反之亦然。这说明 PAI 和 t-PA 的结合需要 t-PA 活性中心的丝氨酸参与。t-PA 轻链同完整 t-PA 分子一样,都能和 PAI 形成复合物。Rijken 认为 t-PA 的轻链在大鼠体内呈二相消除,是由于 t-PA 通过轻链和 PAI 之间形成复合物^[9]。

但是轻链激活纤溶酶原不受纤维蛋白的加速,也不能与纤维蛋白结合,说明 t-PA 分子与纤维蛋白的作用与轻链无关。抗重链的单克隆抗体,不仅抑制了 t-PA 与纤维蛋白的结合,而且抑制纤维蛋白对 t-PA 的激活作用。因此, t-PA 分子的重链决定了 t-PA 对纤维蛋白的亲和力,即 t-PA 溶血栓的高效性和特异性与

重链相关。

2. 指形区 t-PA 分子 1—43 氨基酸同纤维结合蛋白分子的指形区结构同源性很高, 被称为指形区 (F)。纤维结合蛋白与纤维蛋白亲和力和力很大, 那么是否 t-PA 的指形区决定了 t-PA 与纤维蛋白的高亲和力呢?

部分水解 t-PA 分子的 N 端, 破坏指形区, 导致 t-PA 分子失去与纤维蛋白的结力力; 编码指形区基因的表达产物能竞争性抑制 t-PA 和纤维蛋白的结合。另一方面, 也有实验表明缺失指形区 t-PA (t-PA Δ F), 仍具有与纤维蛋白亲和力, 而且 t-PA Δ F 激活纤溶酶原的速率仍受纤维蛋白加速。这两方面的结果表明 t-PA 分子与纤维蛋白的作用不仅和 F 有关而且和其它结构域相关。

3. 表皮生长因子区 t-PA 分子的 44—91 氨基酸结构与人表皮生长因子的同源性很高, 称为表皮生长因子区 (E)。E 区功能研究得不多, 最近 Browne^[10] 证实了 E 区存在肝细胞膜受体识别的结构, 通过 E 区 t-PA 与肝细胞膜受体结合, 从而快速地从血流中消除, 因此缺失 E 区的 t-PA 在体内有较长的半寿期^[4]。肝细胞膜受体识别 t-PA 的多肽链而不是糖链。Rijken 观察到 t-PA 的重链在血液中消除比较快, 认为受体主要识别 t-PA 分子的重链^[9]。

4. 三角区 t-PA 分子有两个三角区 (K₁ 和 K₂), 分别由氨基酸残基 92—173, 180—261 组成, K₁ 和 K₂ 都和纤溶酶原分子、凝血酶原分子的三角区有较大的同源性。K₂ 区是 t-PA 分子与纤维蛋白分子结合部位, 比 F 更为重要。

用单克隆抗体研究 t-PA 分子结构和功能, 发现特异地和 K₂ 结合的单抗与 t-PA 结合后, t-PA 失去了与纤维蛋白结合的能力; t-PA 分子的酶解片断, 如果包含完整的 K₂, 则具有对纤维蛋白的亲和力, 否则就没有。Van Zonneveld 对全长 t-PA cDNA 作缺失突变, 表达了一系列突变 t-PA 分子 (图 2)^[11]。结果表明含有 K₂ 的突变 t-PA (如 LEK₁₋₂, LK₁₋₂, LK₂) 结合纤维蛋白的能力都很高, 与 rt-PA 相同。含 F 但无 K₂ 的突变 t-PA (如 LEF,

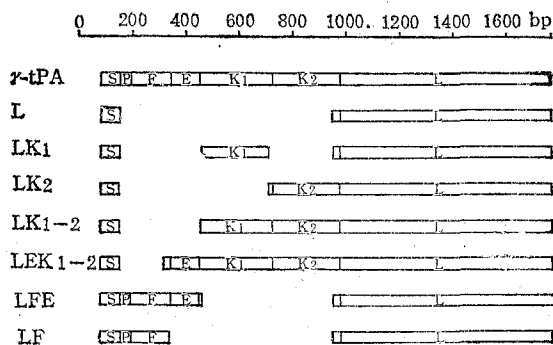


图 2 缺失突变 t-PA 分子结构示意图

LF) 也具有纤维蛋白亲和力, 但远不如 rt-PA。不含 K₂ 和 F 的突变 t-PA (如 L, LK₁) 没有与纤维蛋白结合的能力。突变 t-PA 与纤维蛋白亲和力同它们对纤溶酶原的激活作用受纤维蛋白加速的程度相一致。LEK₁₋₂, LEK₂, LK₂ 和 rt-PA 一样, 它们激活纤溶酶原的速率受纤维蛋白显著加速; LEF, LF 激活纤溶酶原也受纤维蛋白加速, 但程度还不如 rt-PA; LK₁, L 激活纤溶酶原不受纤维蛋白的影响。结果表明 t-PA 分子的各结构域有独立的功能, E、K₁、L 与 t-PA 分子的纤维蛋白亲和力无关, K₂ 对 t-PA 与纤维蛋白的高亲和力及 t-PA 激活纤溶酶原受纤维蛋白加速起关键作用。

那么, K₂、F 在 t-PA 与纤维蛋白分子相互作用的分子机制是怎样的呢?

Verheijen^[12] 也表达了一系列的突变 t-PA, 并证明了在没有纤溶酶原时, t-PA 和低浓度的纤维蛋白的结合主要通过 F 区; 但当纤维蛋白浓度高时, K₂ 区也参与结合。在有纤溶酶原时, 纤维蛋白不论浓度高低都与 K₂ 结合。纤溶酶原对 t-PA 分子的 K₂ 区与纤维蛋白结合的影响, 是由于纤溶酶原、纤维蛋白、t-PA 形成了三元复合物, 纤溶酶促使纤维蛋白部分水解使后者易与 K₂ 结合。Van Zonneveld^[11] 还发现 t-PA 分子的 K₂ 区有赖氨酸结合位点 (Lysine Binding Site, LBS), 而 F 区无 LBS。K₂ 和赖氨酸的结合受赖氨酸类似物的竞争, 而且赖氨酸类似物能竞争抑制纤维蛋白同 K₂ 的结合。F 与纤维蛋白的结合不受赖氨酸类似物的

影响。这说明 t-PA 分子的 F 和 K₂ 与纤维蛋白结合作用的机制是不同的。K₂ 通过其 LBS 与纤维蛋白的赖氨酸末端结合。

t-PA 与纤维蛋白的高亲和力导致血栓中纤溶酶原激活, t-PA 分子的 F 和 K₂ 区都起一定的作用。可能的机制是: 开始时血栓中完整的纤维蛋白分子 C 端没有赖氨酸, 纤维蛋白和 t-PA 的结合通过 F 区 AH 位点微弱结合, 并形成较弱结合的三元复合体。当部分纤溶酶原被激活生成纤溶酶, 后者水解纤维蛋白产生 C 端赖氨酸, t-PA 和纤溶酶原分子通过各自三角区的 LBS 快速与纤维蛋白末端赖氨酸结合, 形成稳定的三元复合体, 导致纤溶酶原被快速激活成纤溶酶, 纤溶酶水解纤维蛋白使血栓溶解。

t-PA 分子中 K₁ 和 K₂ 同源性虽高, 但 K₁ 中没有 K₂ 中存在的由 Asp、Arg 及 Trp 组成的 LBS, 这可能是 K₁ 与纤维蛋白无亲和力的原因。

5. 糖链 t-PA 分子含糖 6.8%, 有三个糖化位点 (Asn-X-Ser/Thr)。糖链对 t-PA 活性影响大, 但缺少糖链或无糖链的缺失突变 cDNA 表达的新型 t-PA 的血流内半寿期显著延长, 其有更大的应用价值。

二、t-PA 分子的改造

由于 t-PA 分子是由多个结构和功能相对独立的结构域相嵌而成, 因此可以用蛋白质工程等手段改造 t-PA 分子的结构, 使其具有更高的纤维蛋白亲和力、逃逸 PAI 的抑制、减慢肝细胞受体摄取 t-PA, 从而延长半寿期、增加溶栓效能和减小药用剂量以及副作用。

1. t-PA 与纤溶酶的共价连接 纤溶酶原分子中也含有能与纤维蛋白结合的三角区, 因此纤溶酶原与纤维蛋白也有亲和力。Robbin 成功地将纤溶酶的 A 链 [plnA(SH)₂] 和 t-PA 的 B 链 [t-PAB(SH)₂] 以二硫键相连, 制备了分子量为 92kD 的共价分子^[14]。新的 t-PA 分子溶解纤维蛋白的比活性和对纤维蛋白的亲合力都和天然的 t-PA 相同。

2. t-PA 基因的突变 体外缺失突变 t-PA

cDNA 结合点突变改变 t-PA 分子中连接糖链的 Asn, 得到了一系列缺失突变 t-PA^[11,15]。Collen^[16] 用动物模型, 研究了这些缺失突变 t-PA 的溶栓功能及其药代动力学, 看到缺失糖链

表 1 缺失突变 t-PA 与 rt-PA 的比较

	rt-PA	t-PA- ΔFE	t-PA- ΔFE _{1x}	t-PA- ΔFE _{3x}
半数溶血栓剂量 (mg/kg)	0.40	0.37	0.20	0.40
血浆峰值 (μg/ml)	0.055	2.1	0.6	0.5
血浆纤维蛋白原的变化 (占基础水平的%)	100	81	100	85
α ₂ -抗纤溶酶的变化 (占基础水平的%)	82	55	85	90
t _{1/2} (分钟)	4	25	42	14

Δ后为缺失部分, 1x、3x 分别表示 1 个、3 个糖化位点。

及 E、F 的突变 t-PA 在血流内半寿期显著延长, 疗效提高而副作用减少。如 t-PA ΔFE_{3x} 用于治疗狗冠状动脉血栓症, 效率大大高于 rt-PA。Browne 表达的缺失 E 的 t-PA (t-PA ΔE), 在动物体内的消除速率较完整 t-PA 慢得多^[8]。

单链 t-PA 在纤维蛋白辅助下激活纤溶酶原的效率和双链 t-PA 相同, 但单链 t-PA 结合纤维蛋白的能力更高、体内半衰期更长, 受 PAI 的抑制也相对较弱, 因此单链 t-PA 较双链 t-PA 更为可取。单链 t-PA 极易被水解成双链 t-PA, 应用基因点突变改换 t-PA 分子的 Arg₂₇₅, 形成 t-PA Glu₂₇₅, 确实有更高的纤维蛋白亲和力和较长的半衰期, 治疗剂量可以减小。

3. t-PA 和 u-PA 基因的重组表达 单链尿激酶 (scu-PA) 也有选择性激活血栓局部纤溶酶原的特性, 亦为较理想的栓溶剂。t-PA 与 scu-PA 激活纤溶酶原溶解纤维蛋白的机制不一样。t-PA 溶栓特异性依赖于 A 链, 而 scu-PA 则不必依赖于 A 链。同时, 合并应用 t-PA 及 scu-PA 治疗心肌梗塞有协同增强作用, 因此 t-PA 分子的 A 链与 scu-PA 分子的 B 链形成的杂交体, 结合了这两类分子对纤维蛋白的选择性, 将会是更好的溶血栓药物^[17]。

Nelles 等成功地表达了一些 t-PA 和 scu-PA 的杂交体^[18,19], t-PA₁₋₂₆₃-u-PA₁₄₄₋₄₁₁, 分子量 70kD 比活性达 570000 IU/mg, 有纤维蛋白亲和力, 激活纤溶酶原的速率也受纤维蛋白加速, 有关动力学参数列于表 2, 可能会有更好的

表2 t-PA/ μ -PA 杂交蛋白激活纤溶酶原动力学参数

scu-PA	t-PA ₁₋₂₆₃ -u-PA ₁₄₄₋₄₁₁		t-PA ₁₋₆₇ -u-PA ₁₃₆₋₄₁₁
	单链	双链	
K _m (μ mol/L)	0.53	80	1.4
K _{cat} (S ⁻¹)	0.0034	5.6	0.0027

溶栓效果。t-PA 分子的 F 区与 scu-PA 的杂交蛋白 (t-PA₁₋₆₇-u-PA₁₃₆₋₄₁₁) 分子量为 43kD, 其性质与 scu-PA 相近, 与纤维蛋白无亲和力, 它激活纤溶酶原的动力学参数见表 2。Collen 还将 t-PA 的 K₂ 区插到 scu-PA 分子中, 产生的杂交体之功能尚难定论。

运用重组 DNA 技术, 还可以将凝血酶、u-PA, 纤维结合蛋白、纤溶酶原等分子中的三角区接到 t-PA 分子中, 形成具有多个三角区的 t-PA, 以便提高其与纤维蛋白的亲和力, 但至今未见理想的结果。

4. 单克隆抗体介导 t-PA 抗纤维蛋白的单克隆抗体对人纤维蛋白的亲和力极高, 是 t-PA 的 1000 倍, 用它介导 t-PA 作溶血栓治疗会更理想。Rung 将 t-PA 和抗纤维蛋白单克隆抗体 (59D₈) 以二硫键共价相联, 形成 t-PA-59D₈, 具有 t-PA 活性及 59D₈ 的抗体活性, 比 t-PA 的溶栓效率高 2.8—9.6 倍, 在取得相同的疗效剂量时, t-PA-59D₈ 引起的血浆纤维蛋白原及 α_2 -抗纤溶酶的下降要少得多^[20]。Schnee^[21] 将编码 59D₈ 重链基因与 t-PAB 链 cDNA 重组, 表达出抗体-t-PA 融合蛋白, 具有 t-PA 活性和抗体活性。还有人将抗纤维蛋白的单克隆抗体和抗 t-PA 的单克隆抗体连接后, 再和 t-PA 一起作溶血栓治疗。200 单位 t-PA 和双抗体合用时, 溶栓效率为 23.1%, 而纤维蛋白原和 α_2 抗纤溶酶不受影响; 然而单独用 200 单位 t-PA, 有效率仅为 1.8%。双抗体的连接, 可采用化学方法, 也可将这二株杂交瘤再融合

(或抗 t-PA 的杂交瘤和抗纤维蛋白的 B 淋巴细胞再融合) 形成新的杂交瘤细胞, 后者合成分泌既抗纤维蛋白又抗 t-PA 的抗体。

5. t-PA 蛋白分子的修饰 聚乙二醇与蛋白分子偶联后, 可防止该蛋白分子同其它大分子的相互作用, 从而延长半寿期, 逃逸蛋白酶的水解。Garman^[22] 用 PEG 修饰 t-PA, 使 t-PA 在体内半寿期延长了 5 倍, 但 t-PA 活性损失 30%。此外, Slürzebecher 等制备的 t-PA 酰化衍生物, 半寿期也显著延长。

t-PA 的发现和应用使治疗和预防急性心肌梗塞发生了根本性改变。在分子生物学新技术和生物技术高速发展之时, 疗效更好, 副作用更少的新型 t-PA 正在不断地创造出来。

参 考 文 献

- [1] Collen, D: *Thromb. Haemostasis*, 1985, 54, 893.
- [2] Verstratet, M. et al.: *Lancet*, 1985, II, 965.
- [3] Loskutoff, D. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 2956.
- [4] Krause, J. *Fibrinolysis*, 1988, 2, 133.
- [5] Collen, D. et al.: *Circulation*, 1986, 73, 51.
- [6] Pannekoek, H et al.: *Fibrinolysis*, 1988, 2, 123.
- [7] Pennica, D. et al.: *Nature*, 1983, 301, 214.
- [8] Ny, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 5355.
- [9] Rijken, D. C. et al.: *Biochem. J.*, 1987, 238, 643.
- [10] Browne, M. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 1599.
- [11] Van Zonneveld, A. J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 4670.
- [12] Verheijen, J. H. et al.: *EMBO J.*, 1986, 5, 3525.
- [13] Van Zonneveld, A. J. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 14214.
- [14] Robbins, K. C. et al.: *Biochemistry*, 1987, 26, 4661.
- [15] Collen, D. et al.: *Thromb. Haemostasis*, 1987, 58, 254.
- [16] Collen, D. et al.: *Blood*, 1988, 71, 216.
- [17] Cambier, P. et al.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, in press.
- [18] Nelles, L. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 10855.
- [19] Gheysen, D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 11779.
- [20] Runge, M. S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7659.
- [21] Schnee, J. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6904.
- [22] Garman, A. et al.: *FFBS Lett.*, 1987, 223, 361.

[本文于1988年7月8日收到]