

水蛭素的分子生物学研究

韩玉珉 申同健

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100080)

提 要

本文从分子生物学的角度简述了蛋白酶抑制剂水蛭素的生物学和临床医学作用, 结构特点, 结构与功能关系, 水蛭素与凝血酶之间的作用方式, 以及水蛭素基因的克隆与表达。同时还指出了水蛭素基因的复杂性。水蛭素基因结构的阐明, 基因的表达调控, 将成为今后研究的重要方向之一。

关键词 水蛭素, 结构与功能, 基因克隆与表达

很久以来, 人们就知道水蛭(蚂蟥)叮咬过的伤口出血不易凝结。1955 年 Markwardt 首先从医用水蛭唾液腺中分离纯化了一种多肽, 称水蛭素, 并于 1970 年确定它是凝血酶的特异抑制剂^[1]。1984 年 Dodt^[2]测定了水蛭素的氨基酸排列顺序。水蛭素的医疗价值得到了人们的普遍重视, 然而由于它的产量太少, 使研究和应用受到了限制。近年来, 由于基因工程技术的建立, 大量制备水蛭素已成为可能, 因此, 有关水蛭素的分子生物学和临床医学的研究得到了迅速发展。

一、生物学作用

来源于医用水蛭的水蛭素是凝血酶的最强有力的天然抑制剂。多种动物模型实验及临床研究表明, 它能有效地阻止血栓的形成, 所以在临床治疗和预防各种血栓形成病方面是很有效的药物。众所周知, 凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶, 在止血时起中心作用。它是在因子 V_a 、 Ca^{2+} 和磷脂存在下, 通过因子 X_a 的作用, 由凝血蛋白酶原转变成的。凝血蛋白酶一旦产生, 便能裂解纤维蛋白原成为纤维蛋白, 这是血液凝血成块的主要成分。因为水蛭素对凝血酶有高的亲和性, 它们以 1:1 的方式形成紧密的非共价

相结合的可逆的复合物, 这样凝血酶便失去了裂解纤维蛋白原的能力, 阻止了纤维蛋白的凝固。此外, 水蛭素也阻止凝血酶催化的止血反应(如因子 V, VIII, XIII 的活化)及凝血酶诱导的血小板反应。血液中凝血酶的天然抑制剂是抗凝血酶 III, 生理条件下, 凝血酶的活性为酶原所平衡, 并被抗凝血酶 III 所抑制。当遗传的或后天的抗凝血酶 III 缺乏时, 应用水蛭素是一种很有希望的治疗血栓的药物, 特别是治疗扩散型静脉凝血时, 比肝素等药物更为有效。水蛭素的特点之一是它的专一性, 只与凝血酶作用, 很少有其它副反应, 这一点优于肝素, 因为肝素的异质性, 常有副作用发生。临床研究表明, 使用水蛭素并不引起心脏、呼吸频率的改变, 也无免疫学方面的效应, 且无毒性, 所以水蛭素在防治血栓形成方面是一种更为特异的更为有希望的药物^[3]。

二、结构特点

水蛭素是由 65 或 66 个氨基酸残基组成的单链多肽, 分子量为 7000。肽链中不含精氨酸, 甲硫氨酸及色氨酸。六个半胱氨酸组成的三个二硫桥位于肽链的 N 端区域, 对分子的构型可能起稳定作用。酸性氨基酸集中在 C 端区

域,在C末端最后九个氨基酸残基中有五个酸性氨基酸,并有一个硫酸化的酪氨酸。肽链中部还有一个由 Pro-Lys₄₇-Pro 组成的特殊序列,不被一般蛋白酶所降解,这个特殊的结构在水蛭素与凝血酶的相互作用中具有重要的功能^[3,4]。

Konno 等人^[5]在研究水蛭素的溶液构象时指出,水蛭素的 CD 谱不能用传统的蛋白质二级结构的三个成分(α -螺旋, β -折叠和无序结构)来说明。实验结果表明,椭圆率在 200 和 240 nm 之间的变化,不是因为 α -螺旋,而可能是三个二硫桥和 Tyr-SO₃ 的贡献。核磁共振的研究表明,在水蛭素多肽链中无 α -螺旋结构,并把水蛭素分子分成三个区域,一个是突出的指区(31—36 氨基酸残基构成),一个暴露的环区(47—55 氨基酸残基构成),一个中心核(由 3—30, 33—46 和 56—57 氨基酸残基构成)。通过二硫桥集结而成的 N 端是疏水的,而 C 端是亲水的,游离在分子的表面^[6]。

目前已发现水蛭素至少有三种变体,简称 HV 1, HV 2 和 HV 3,都有抗凝血酶活性。HV 1 N 末端第一、二个氨基酸为缬氨酸,而 HV 2 的第一个氨基酸为异亮氨酸,HV 1 和 HV 2 之间有九个氨基酸不同。HV 3 的第一个氨基酸也是异亮氨酸,它与 HV 1 有 82% 的同源性。纯的水蛭素常常以多聚体的形式存在。

三、结构与功能关系

蛋白质研究的一个中心目标是了解蛋白质或多肽的生物活性的物理化学基础。有关蛋白酶抑制剂结构与功能关系的研究,早期的工作主要集中在两个方面,一是通过特殊氨基酸的修饰来改变抑制剂的特性,二是研究天然抑制剂的肽片段或人工合成的肽片段,找出对生物活性所必需的最小序列。最近,点指导的基因突变技术为研究蛋白质的结构与功能关系提供了更为有力的手段。引起人们极大兴趣的蛋白酶抑制剂水蛭素,除了它的药用价值外,它与凝血酶之间的反应,为研究蛋白质与蛋白质的相互作用提供了一个理想的模型。

1. 化学合成的水蛭素肽片段的研究 美国 Mao 等人^[7]合成了水蛭素羧端的一系列肽片段,长度从 8 到 21 个氨基酸残基不等,分别测定这些肽片段对凝血酶的抑制活性及与凝血酶的结合能力,发现羧端 10 氨基酸(56—65 氨基酸残基)肽片段,对于结合能力和抗凝血是最小片段。54—65 多肽片段可与凝血酶结合形成复合物,而 57—65 多肽片段却不能。应当指出的是, Mao 等人关于 45—54 多肽片段并不参与同凝血酶结合的结论与 Chang^[8] 的论点相反, Chang 认为 46—48 (Pro-Lys-Pro) 多肽片段能结合到凝血酶的活性位点上。在水蛭素与凝血酶的相互作用中,第 56 位芳香族氨基酸(Phe)是重要的,如果把 56—65 多肽片段中的 Phe 换成 D-Phe, Glu 或 Leu 时,它的抗凝血活力将受损失。圆二色谱测定表明,羧端肽片段与凝血酶的结合,引起酶的构象变化,其构象的变化可能就是凝血活力损失的原因。

2. 肽链缩短对水蛭素活性的影响 为寻找具有生物活力的水蛭素最小肽片段,可将水蛭素与肽链端解酶一起保温,分离缩短了的水蛭素,研究它们与凝血酶的作用。Dodt 等人^[9]发现,羧端缩短了三个氨基酸残基的水蛭素与凝血酶的反应,其抑制常数 K_i 增加了 15—20 倍。用滴定法测定进一步证明,缩短 6 或 8 个羧端氨基酸,将大大降低水蛭素的抑制活力,删去 9 个氨基酸以上的水蛭素几乎失去全部抑制活力。Chang^[8] 也获得了类似的结果。很明显,水蛭素的羧端对其抑制活力有重要影响。根据这些结果推测,水蛭素与凝血酶之间紧密复合物的形成,要求羧端氨基酸与反应位点(Pro-Lys₄₇-Pro)之间有适当的距离,而羧端的缩短可能引起水蛭素分子构型的改变,导致蛋白酶与抑制剂之间的相互作用减弱。另外,羧端第 63 位酪氨酸残基的去硫酸化对水蛭素的抑制活力也有影响,其结果与羧端缩短了三个氨基酸的水蛭素的效应相同。但是,全部去硫酸化的水蛭素仍保持着最初活力的 45%。这种硫酸化的功能尚不十分清楚,它可能涉及到与凝血酶的直接作用,或是稳定水蛭素的结构。

3. 水蛭素蛋白质工程研究 寡聚核苷酸指导的基因突变, 提供了在任何位置改变蛋白质氨基酸残基的手段, 更有力于研究蛋白质的结构与功能关系。最近几年, 已有人将基因点突变技术用于研究水蛭素与凝血酶的相互作用中, 企图了解水蛭素的哪些部位对抑制凝血酶的活力起重要作用。Braun 等人^[10]将水蛭素中的三个碱性氨基酸(第 27, 36 和 47 位的赖氨酸)及 51 位的组氨酸分别换成谷氨酰胺, 以动力学分析方法研究发现, 只有第 47 位赖氨酸改变的水蛭素变体与凝血酶的复合物的解离常数有所增加(约 9 倍), 这种增加主要是由于结合常数的减小所致, 而其它变体对复合物的解离常数没有影响。Dodt 等人^[11]也用点突变技术, 将水蛭素中第 27, 36 和 47 位的赖氨酸分别变成异亮氨酸和谷氨酸, 将第 51 位组氨酸变成亮氨酸和门冬氨酸, 得到 8 种变体, 测定它们与凝血酶复合物的抑制常数 K_i , 发现仍然是第 47 位赖氨酸改变的水蛭素变体表现出与凝血酶的复合物有较高的 K_i 值, 其影响主要是由于解离常数的增加。将羧端区域的谷氨酸(第 57, 58, 61 和 62 位)单一的或多个的变成谷氨酰胺, 引起解离常数的增加, 而且随突变数目的增加而增大。当全部四个谷氨酸都改变后, 增加到最大值(61 倍)。动力学研究表明, 在所有情况下, 解离常数的增加, 是由于结合常数减少所致。实验再次证明水蛭素酸性的羧端区域对其与凝血酶的相互作用的影响是至关重要的。

4. 水蛭素与凝血酶的作用方式 水蛭素与凝血酶相互作用的研究发现, 水蛭素分子二硫桥的氧化或还原, 蛋白水解酶的降解作用, 重要氨基酸的突变, 都会引起水蛭素分子二级和三级结构的改变, 严重影响水蛭素抗凝血活性。为阐明水蛭素与凝血酶相互作用的机理, 除了解水蛭素分子的结构特点外, 还必须知道凝血酶的性质, 它的哪些部位与水蛭素起反应。目前认为, 凝血酶是由三个功能截然不同的区域组成, 即所谓原发特性口袋, 凝血酶的催化位点在此; 非极性的结合位点和阴离子结合区域, 它负责与纤维蛋白原的相互作用。那么, 水蛭素

与凝血酶两者之间是如何相互作用呢? 这是人们极感兴趣的问题。研究表明, 被二硫桥所稳定的水蛭素分子的氨基末端与酶的非极性结合位点有关系, 其中的二氨基吡啶被水蛭素所取代。水蛭素分子的羧端则结合到酶的阴离子结合部位, 被认为是水蛭素的反应位点的碱性侧链, 主要是指 Pro-Lys₄₇-Pro 占据了酶的特性口袋部位。但是, 水蛭素不同于其它已知的丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白, 凝血酶并非强烈地依赖于抑制剂蛋白的这一假定的反应位点, 可能还有独立于反应位点的其它识别结合位点。水蛭素与凝血酶特异地相互作用的更详细的区域有待深入研究。

四、基因的克隆与表达

目前所使用的水蛭素是从医用水蛭提取的, 然而这对进一步诊断实验和最终的临床应用是不现实的。利用重组 DNA 技术生产水蛭素可以解决这一问题。最近几年, 几个实验室相继得到了水蛭素 HV1 和 HV2 的基因克隆, 并在大肠杆菌和酵母细胞中得到表达。Dodt 等人^[12]依照水蛭素的氨基酸排列顺序, 化学合成了 229 bp 的 DNA 片段, 除包括 HV1 的编码基因外, 5' 端有起始密码, 3' 端有终止密码, 将其插入载体质粒中, 在半乳糖苷酶启动子或噬菌体 λ pL 启动子的控制下, 在大肠杆菌中表达。Fortkamp 等人^[13]也在大肠杆菌中表达了水蛭素 HV1。水蛭素表达产物以融合蛋白或非融合蛋白的形式分泌到细胞间质中。Lolison 等人^[14]将化学合成的水蛭素基因 HV2 放入酵母 MF₂ 基因前原序列框架中, 用此去转化尿嘧啶营养型选择的酵母细胞, 有生物活性的水蛭素被有效地分泌到细胞培养液中。由基因表达产物的产率计算, 水蛭素基因在大肠杆菌中表达所得到的蛋白低于总蛋白的 0.1%, 而在酵母中表达产物占总蛋白的 1%, 可见酵母是更为理想的表达系统。目前, 我们实验室正在进行着水蛭素基因 HV2 在酵母中表达的研究, 并得到了有抗凝血活性的水蛭素。

(下转第 117 页)

IDENTIFICATION OF HISTIDINE RESIDUE IN THE ACTIVE SITE OF FETAL LAMB 3β , 20α -HYDROXYSTEROID OXIDOREDUCTASE

Chen Qingxuan Frederick Sweet

(Institute of Developmental Biology, Academia Sinica, Beijing 100080)

ABSTRACT

In order to further characterize the active site of fetal lamb 3β , 20α -Hydroxysteroid Oxidoreductase, we have synthesized the radioactive 16α -bromoacetoxyprogesterone and 5α -dihydrotestosterone 17-bromoacetate as affinity labeling reagents. Both of them are the irreversible, active-site-directed and competitive inhibitors of the enzyme. When the concentration of the enzyme is $1\text{ }\mu\text{mol/L}$, inhibitor is $100\text{ }\mu\text{mol/L}$, the inactivation reaction followed pseudo-first-order kinetics with a $t_{0.5} = 75\text{ min}$ (16α -BAP) and $t_{0.5} = 480\text{ min}$ (5α -DTB). When substrate progesterone or 5α -dihydrotestosterone was present in the incubation mixture, the speed of inactivation of the enzyme was slowed down. The labeled enzyme was hydrolyzed by hydrochloric acid, through amino acid analysis, the labeled histidine was identified. The histidine at active site may play important role in the oxidoreductive reaction.

Key Words 3β , 20α -Hydroxysteroid Oxidoreductase, Affinity Labeling, 16α -(bromo[2'- ^{14}C]acetoxy) progesterone, 5α -dihydrotestosterone 17-[2'- ^{14}C]bromoacetate, Histidine

(上接第 90 页)

从医用水蛭头部的 cDNA 库中筛选水蛭素基因已成功,并在大肠杆菌中得到表达^[15]。Harvey 等人以克隆的 cDNA 为探针,测定了天然水蛭体内的 mRNA 和 DNA 的分布情况。Northern 分析结果表明,水蛭中存在着三种为水蛭素编码的 mRNA,这也可能是一个单一的基因被转录后,在不同组织中经过不同的剪接而产生的。Southern 分析结果显示出水蛭中存在着几种水蛭素基因,当然这并不排除假基因存在的可能性。总之,水蛭素基因是相当复杂的。关于水蛭素基因表达调控的研究,有待于基因组结构的阐明,这也是今后研究的重要方向之一。

参 考 文 献

- 1 Markwardt F. *Methods in enzymology*, 1970; 19: 924
- 2 Dodt J *et al. FEBS letter*, 1984; 165: 180
- 3 Markwardt F. *Folia Haematol, Leipzig*, 1988; 115: 10
- 4 Dodt J *et al. Biol Chem Hoppe-seyler*, 1985; 366: 379
- 5 Konno S *et al. Arch Biochem Biophys*, 1988; 267: 158
- 6 Clore G M *et al. EMBO J*, 1987; 6: 529
- 7 Mao S J T *et al. Biochemistry*, 1988; 27: 8170
- 8 Chang J-Y. *FEBS letter*, 1983; 164: 307
- 9 Dodt J *et al. Biol Chem Hoppe-Seyler*, 1987; 368: 1447
- 10 Braun P J *et al. Biochemistry*, 1988; 27: 6517
- 11 Dodt J *et al. FEBS letter*, 1988; 229: 87
- 12 Dodt J *et al. FEBS Letter*, 1986; 202: 373
- 13 Fortkamp E *et al. DNA*, 1986; 5: 511
- 14 Loison G *et al. Bio/Technology*, 1988; 6: 72
- 15 Harvey R P *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 1084

[本文于1989年12月31日收到,1990年4月25日修回]。