

肌酸激酶同工酶研究进展

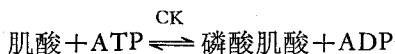
耿建国 杨一峰 陈灏珠

(上海医科大学附属中山医院、上海市心血管病研究所)

提 要

根据肌酸激酶同工酶在人体内各种组织和器官中分布不同的特点,对肌酸激酶同工酶的测定在医学中得到了广泛应用。本文概述了各种肌酸激酶同工酶的分布、组成、物理化学性质、分离纯化步骤、测定方法和实际应用等方面的近年研究进展。

肌酸激酶 (Creatine Kinase, EC2.7.3.2., 以下简称 (CK), 又称肌酸磷酸激酶, 是 Kuby 等^[1] (1953) 首先从兔骨骼肌中提取的。CK 广泛存在于几乎所有脊椎动物体中, 催化下述可逆反应:



以肌细胞为例, 正反应产物磷酸肌酸是其主要贮能物质之一, 直接参与肌细胞的能量代谢。

Duel 等^[2] (1964) 从细胞中提取出三种 CK 同工酶, 即 CK-MM、CK-BB 和 CK-MB。与此同时, Jacobs 等^[3] 发现线粒体 CK 同工酶 (Mitochondrial CK Isoenzyme, 以下简称 CK-MiMi)。上述发现引起学者们的广泛兴趣和深入研究, 其中对 CK-MB 的测定已成为常用的诊断急性心肌梗塞的指标。本文拟概述各种 CK 同工酶的分布、组成、物理化学性质、分离纯化步骤、测定方法和实际应用。

一、分布和组成

CK 酶分子是由 M 和 B 两种亚基构成的二聚体。根据来源及亚基的不同, 可以分为 MM、BB 和 MB 三种同工酶^[4]。CK-MM 主要存在于骨骼肌、心肌内, 并少量存在于主动脉、肾、脾、甲状腺、肾上腺、肺、肝、前列腺和胎盘等组织和器官内^[5]; CK-BB 主要存在于脑和脊髓,

少量存在于膀胱、前列腺、甲状腺、胰腺、胃、结肠、回肠、肾、肺和胎盘内^[5,6]; CK-MB 是 MM 和 BB 型 CK 酶分子不同亚基的杂化型, 主要分布在心脏, 并少量分布于子宫和胎盘^[5,6]。CK-MiMi 也是由两个 Mi 亚基构成的二聚体, 主要分布在心肌、骨骼肌、平滑肌和脑组织的线粒体中。一般认为 CK-MiMi 位于线粒体内膜的外侧面, 其生理功能是将线粒体内氧化磷酸化产

表 1 每克分子牛 CK 同工酶的氨基酸组成的克分子数

氨基酸	MM	BB	MiMi
天*	81	89	60
苏	30	38	26
丝	35	43	32
谷**	79	94	62
脯	39	52	34
甘	65	69	52
丙	38	55	28
半胱	0	0	4
缬	54	50	40
蛋	18	19	10
异亮	30	30	32
亮	68	79	48
酪	16	20	16
苯	32	32	18
赖	65	48	34
组	29	25	14
精	34	42	46

* 天冬氨酸包括天冬酰胺残基。

** 谷氨酸包括谷氨酰胺残基。

生的能量转运出线粒体外^[6]。

用氨基酸自动分析仪测定各种 CK 同工酶的氨基酸组成见表 1^[7]。最近, Pickering 等^[8]报告了兔 CK-MM 和 CK-BB 的 cDNA 序列分析结果。虽然两者均由 381 个密码子和相应氨基酸所组成, 但进一步分析比较发现, CK-MM 和 CK-BB 两者之间有 150 个密码子和 215 个核苷酸不同。然而, 其中 71 个密码子不同是由于三联体密码的第三个核苷酸不同所造成的隐性密码子改变。因此, CK-MM 和 CK-BB 两者 80% 的氨基酸相同, 其芳族、疏水、酸性、酰胺和羟基氨基酸残基的比例也大致相等。在 CK 同工酶中心的 183—223 个密码子有 41 个氨基酸序列相同, 而其 NH₂ 端的 47—82 个密码子处有 36 个氨基酸序列相同。此外, COOH 端的 24 个氨基酸序列中, 亦有 21 个氨基酸相同; 而另 3 个氨基酸则分别是 2 个异亮氨酸取代缬氨酸, 和 1 个甘氨酸取代谷氨酸。总之, 除了 3' 端末翻译区外, CK-MM 和 CK-BB 两者的序列甚为相似。同时, Benfield 等^[9]也报告了鼠 CK-MM 的 cDNA 序列分析结果。和兔 CK-MM 相比较, 两者 91% 的核苷酸和 98% 以上的氨基酸相同, 鼠和兔 CK-MM 仅有 6 个氨基酸不同。

CK 二聚体的亚基可用尿素、盐酸胍和十二烷基硫酸钠等离聚。但是, 经稀释或透析去除变性剂后, 亚基可以再缔合, 并保持其原有的活力。动力学参数和圆二色性光谱性状^[4]。和 CK 同工酶是由两个同等亚基构成的传统观点不同, 新近, Degani 等采用亚基特异的化学修饰法, 成功地造成了亚基的非对称性缔合。此外, 亚基性状变异和非一致现象, 以及由三聚体、四聚体构成的 CK 同工酶也有报告^[1]。

另外, 文献中非典型 CK (“atypical” CK) 也时有报告^[5,6]。此种非典型 CK 多数是由 CK-BB 和 IgG 所构成的大分子-CK 复合物(macro-CK complexes), 故又称为 BB-IgG 复合物。Jockers-Wretou 等报告在 12 例中, 11 例是 BB-IgG 复合物, 另 1 例是 BB-IgA 复合物。此外, yuu 等报告在 3 例癌症患者中, 发现由 CK-MM

和 IgA 构成的大分子-CK 复合物(MM-IgA 复合物)。BB-IgG 复合物的分子量分别为 325, 000、350, 000 和 650, 000 不等。一般认为大分子-CK 复合物的热稳定性较大。例如, MM-IgG 复合物 56℃ 加热 10 分钟后酶活力无改变, 而 CK-MM 在 56℃ 加热 5 分钟后酶活力已丧失殆尽。但是, 大分子-CK 复合物的确切构成尚有异议。实验证明 1 分子 CK-BB 最多能和 4 个免疫球蛋白分子联接。yuu 等认为他们的 3 例中, 免疫球蛋白重链在 3 例中均是 α 链, 而轻链在 2 例中是 λ 链, 在另 1 例则是 κ 链。通常证实非典型 CK 存在应包括如下方面: 1. 电泳时在 CK-MM 和 CK-BB 之间, 有非典型 CK 蛋白沉淀带; 2. 分子筛析色谱时, 在 CK 活力洗脱峰段处, 可以分离出大分子-CK 复合物; 3. 免疫化学法证实此复合物中含有免疫球蛋白^[5]。

二、物理化学性质

分子量 虽然各家报告略有不同^[7,10]但是, 采用凝胶电泳法测定 CK 同工酶亚基的分子量约 42, 000 道尔顿, 故 CK 同工酶的分子量约 84, 000 道尔顿。最近, Pickering 等^[8]根据氨基酸序列分析的结果, 比较精确的推算出亚基的分子量是 42, 530 道尔顿。

电泳性状 纯化的 CK 同工酶在醋酸纤维薄膜电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 均为清晰的单一蛋白带, 从阴极至阳极分别依次为 CK-MiMi、CK-MM、CK-MB 和 CK-BB^[6,7,10]。

pH 值 采用酶偶联法(分光光度法测定还原型辅酶 II)测定 CK 活力的最适 pH 范围是 6.5—7.0^[5]。近年, Nealon 等^[11]报告采用上述方法测定人 CK 同工酶活力, 在 pH6.5—8.5 时的变化(以加入巯基乙醇组为例), 单纯 pH 改变并不明显改变 CK-MB 的活力; 但是, CK-MM 在 pH6.5—7.0 处活力最高(较 pH8.5 时增高 12.6%), 而 CK-BB 在 pH7.5 或以上处活力最高(较 pH6.5 时增高 5.5%)。另外, Nealon 等^[5]认为 CK 同工酶贮存的最适 pH 是 6.5, 并认为一硫甘油是最佳硫醇类试剂, 乙二醇双乙

脒醚-N, N'-四乙酸 (EGTA) 是首选螯合剂 (Ca^{++} 对 CK 有抑制作用, 故用金属螯合剂后, CK 活力增高)。然而, 对于 CK 同工酶贮存的最适 pH 等问题尚有异议。有人认为上述研究缺乏对照资料, 并对是否能用从组织中提取的 CK 同工酶, 来代表内源性血清 CK 同工酶的贮存性状持怀疑态度。

三、分离纯化步骤

文献报告^[6,7,10]中多采用 pH7.0—9.0 范围不等的硫酸铵溶液、或三羟甲基氨基甲烷缓冲液等, 经匀浆、离心、透析和超滤等步骤, 结合离子交换柱层析技术和免疫亲和柱层析技术等方法, 来分离和纯化各种 CK 同工酶。我们按照 Grace 法^[10], 用三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, 在 4℃ 下, 经两次 NaCl 梯度 DEAE-Sephadex 柱层析, 获得较高活性的凝胶电泳纯的 CK-BB^[12]。

最近, 文献报告^[3,14]根据 CK-MM 和 CK-BB 的 pH 值和 pI 的不同, 可以将两者进一步再分为若干亚带 (sub-band) 和变体 (variant)。其中, Vaidya 等^[13]采用离子交换柱层析和层析聚焦技术, 成功地证实 CK-MM 有 5 个变体, 分别称为 MM-I—MM-V, 其洗脱 pH 值依次分别为 8.3、7.9、7.6、7.2 和 6.8, pI 也依次分别为 7.2、6.9、6.7、6.4 和 6.2; 其中, MM-I—MM-IV 变体存在于骨骼肌和心肌两者中, 而 MM-V 仅见于心肌中。

四、测定方法和实际应用

CK 同工酶测定的方法繁多^[8], 常用者主要有 4 种, 即电泳法、柱层析法、免疫抑制或沉淀法和放射免疫分析法。其中, 电泳法使用最为广泛。Boone 等^[15]1984 年对 CK 同工酶的测定方法调查了美国 287 个实验室, 发现琼脂糖电泳占 44%, 醋酸纤维膜电泳占 33%。然而, 近年来采用放射免疫分析法的报告逐年增多。新近, Jackson 等^[16]采用单克隆抗体双位点免疫放射法测定 CK-BB 和 CK-MB, 在 0.1—1,000ng/ml 的范围内, 其批内测定变异系数 9—21%。此外, Urdal 等^[17]报告采用 CK-BB

血液浓度持续升高达 400—600u/L 的遗传性高 CK-BB 血症病人的自身抗体 IgG, 建立了测定 CK-BB 的平衡法放射免疫分析。

目前, 随着研究工作的进一步深入, 业已证明 CK 和糖酵解的控制机制有关, 并参与线粒体呼吸和肌肉收缩供能, 以及脑突触膜 ATP-依赖性的神经递质释放。另外, 在维持肌丝的 M 线结构中也起着独特的作用, 并发现 CK 直接和肌球蛋白头部缔合, 提示其直接参与肌肉的收缩过程。此外, Echert 等使用特异抗体证实 CK 和培养的哺乳类动物的细胞支架缔合; 同时, 免疫荧光法发现非肌肉组织的细胞纺锤体内有 CK 存在, 表明它可能有丝分裂过程的能量供应有关^[1]。

在临床医学中, 对 CK 同工酶的研究展示了广泛的应用前景。根据 CK 同工酶在体内分布不同的特点, 当血液中某种 CK 同工酶明显升高时, 常提示相应的组织、器官的损害^[6]。例如, CK-MM 增高见于各种肌病, CK-MB 增高见于急性心肌梗塞, CK-BB 增高见于急性心肌梗塞、各种脑部病损和肿瘤等病变, 而心肌 CK-MiMi 增高则是心肌损伤坏死的证据。此外, Morelli 等^[14]报告 CK-MM 亚带, 特别是 CK-MM₃ 和 CK-MM₁ 的比值, 是灵敏的和早期心肌梗塞的指征。

参 考 文 献

- [1] Kenyon, G. L.: *Advances in enzymology* (Ed. by Meister, A.), Vol. 54, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. John Wiley & Sons. 1983.
- [2] Deul, D. H. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 10, 276, 1964.
- [3] Jacobs, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 516, 1964.
- [4] Bickerstaff, G. F. et al. *Int. J. Biochem.*, 9, 1, 1978.
- [5] Henderson, A. R. et al.: *Clinical biochemistry review* (Ed. by Goldberg, D. M.), Vol. 3, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons, 197, 1982.
- [6] Lang, H.: *Creatine kinase isoenzymes, pathophysiology and clinical application*, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 1981.
- [7] DeLuca, M. et al.: *Heart creatine kinase* (Ed. by Jacobus, W. E. and Ingwall, J. S.), Baltimore, Williams and Wilkins, 18, 25, 1980.
- [8] Pickering, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

(下转第14页)

丧失,这提供了在分子水平上解释 Al^{3+} 的中毒机制。脑组织细胞对 Al^{3+} 中毒最敏感,以前发现早老性痴呆 (Alzheimer 症),神经纤维退化与 Al^{3+} 积累有关,但其机理始终不清楚,最近观察到脑中 Al^{3+} 的增加可使组织内 Ca^{2+} 积累升高几百倍,导致功能的紊乱。我们证明 Al^{3+} 抑制质膜依赖 CaM 的 Ca^{2+} 泵的活性可以解释这个现象^[17]。

5. Ca^{2+} , CaM 与疾病

鉴于 CaM 对多种生理功能所具有的广泛的调节作用,其结构或功能表达上的不正常很可能是病理的重要因素。囊纤维化病人 (Cystic fibrosis) 红细胞与成纤维细胞质膜 Ca^{2+} 泵活力下降,胞内 Ca^{2+} 提高。Gnegy 报道病人的皮肤成纤维细胞中 CaM 浓度提高^[18]。在转化细胞,肿瘤肝细胞,再生肝细胞中发现 CaM 水平大大增加,从 Ca^{2+} , CaM 参与调节细胞增殖的角度来看,这是有趣的研究对象。另外在实验性糖尿病中也发现 CaM 的不正常,这种变化的生理意义还不清楚。

除上述疾病中发现 CaM 的含量不正常外,在另外一些疾病中则发现胞内 Ca^{2+} 的反常:肌营养不良症胞内 Ca^{2+} 的增加可能与该病的病理有关,钙阻断剂异搏定有可能用于该病的治疗。

最近人们认为,高血压病可能是一种膜缺陷疾病,原发性高血压病人细胞膜结合的 Ca^{2+} 减少,而胞内 Ca^{2+} 增加,这是胞外因素影响 Na^+ 泵的结果还是膜本身的不正常尚不清楚。苏联学者最近报道原发性高血压病人体内 CaM 活化 Ca^{2+} 泵的能力偏低, Ca^{2+} 泵对 Ca^{2+} 的亲合力也低,而 CaM 在胞内的分布与正常人无大差

异,似乎高血压病人 Ca^{2+} 泵活力的变化是由于 CaM- Ca^{2+} 泵相互作用不正常引起的^[19]。

肾衰病人的尿毒症,显示有许多依赖 Ca^{2+} 的不正常代谢,可能与 CaM 不正常调节有关。由于 CaM 能调节神经递质的合成与释放,尿毒症引起的昏迷可能得到解释^[20]。

由于目前对许多 CaM 结合蛋白的生理功能尚不很清楚,这些内原性的调节 CaM 功能的蛋白的反常也可能是分子医学研究的一个重要领域。

参 考 文 献

- [1] 徐友涵:《生物化学与生物物理进展》, 1, 22, 1985; 2, 17, 1985。
 - [2] Babu, Y. S. et al.: *Nature*, **315**, 37, 1985。
 - [3] Seaton, B. A. et al.: *Biochemistry*, **24**, 6740, 1985。
 - [4] Ikura, M. et al.: *Biochemistry*, **22**, 2573, 1983。
 - [5] Minowa, O. et al.: *J. Biochem.*, **96**, 1175, 1984。
 - [6] Szyja, W. et al.: *Cell Calcium*, **7**, 73, 1986。
 - [7] Wang, C. L. et al.: *Biochemistry*, **23**, 4610, 1984。
 - [8] Wang, J. H.: *Current Topics in Cell Regulation*, Vol. **27**, 419, 1985。
 - [9] Stewart, A. A. et al.: *FEBS Lett.*, **137**, 80, 1982。
 - [10] Gietzen, K. et al.: *Calmodulin Antagonists and Cellular Physiology*, 347, 1985。
 - [11] 徐友涵等:《科学通报》, 17, 1368, 1985。
 - [12] 徐友涵等:《生物物理学报》, **2**, 1, 1986。
 - [13] 张遂坡等:《生物化学与生物物理学报》, (待发表)。
 - [14] Xu Y. H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **140**, 461, 1986。
 - [15] Gietzen, K. et al.: *Biochem. J.*, **230**, 277, 1985。
 - [16] Malencik, D. A. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **114**, 50, 1983。
 - [17] 徐友涵:《生物化学与生物物理学报》, **18**, 367, 1986。
 - [18] Gnegy, M. E. et al.: *Biochemical Medicine*, **26**, 294, 1981。
 - [19] Postnov, Y. V. et al.: *Clin. Science*, **66**, 459, 1984。
 - [20] Ritz, E.: *Kidney International*, Vol. **24**, Suppl. 16, s-161, 1983。
- [本文于 1986 年 10 月 20 日收到]
- ~~~~~
- (上接第30页)
- 82, 2310, 1985。
- [9] Benfield, P. A. et al.: *Biol. Chem.*, **259**, 14979, 1984。
 - [10] Grace, A. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **123**, 59, 1982。
 - [11] Nealon, D. A. et al.: *Clin. Chem.*, **27**, 402, 1981。
 - [12] 耿建国等:《上海医科大学学报》, 待发表。
 - [13] Vaidya, H. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **790**, 230, 1984。
 - [14] Morelli, R. et al.: *Circulation*, **67**, 1283, 1983。
 - [15] Boone, D. J. et al.: *Clin. Chem.*, **30**, 33, 1984。
 - [16] Jackson, A. P. et al.: *Clin. Chem.*, **30**, 1157, 1984。
 - [17] Urdal, P. et al.: *Clin. Chem.*, **27**, 83, 1981。
- [本文于 1986 年 10 月 3 日收到]