

纤溶酶原活化物抑制剂

武彩云 孙乐琴

(南京大学生物化学系,南京 210008)

提 要

纤溶酶原活化物抑制剂 (PAI) 能专一性地抑制纤溶酶原活化物,在纤溶系统中起重要的调节作用。本文综述了四种 PAI 的来源、性质、基因结构、生理功能及与疾病的关系。

关键词 纤溶酶原活化物抑制剂

蛋白酶抑制剂约占血浆总蛋白的 10%,它们调节结缔组织转换 (turnover)、血凝、纤溶、补体激活、炎症反应等活动^[1,2]。其中纤溶酶原活化物抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 是一类对纤溶酶原活化物 (plasminogen activator, PA) 专一的蛋白酶抑制剂,在纤溶系统中起重要的调节作用。

早在 1963 年 Brakman 等人就在孕妇血中发现了一种 PAI,它只抑制 PA 而不抑制纤溶酶 (plasmin)。1982 年以前由于缺少足够的证据,人们曾怀疑专一性的 PAI 是否有必要存在。因为 PA 活性受许多机制的调节,如从血管壁的释放及迅速的肝清除,与纤维蛋白专一性的反应和单链 PA 的蛋白水解激活;而且整个纤溶系统的活性强烈地受到 plasmin 抑制剂 α_2 -抗纤溶酶(血浆中含量达 0.06mg/ml)及 α_1 -抗胰蛋白酶的调节。近几年随着对 PA 研究的

深入,对专一性 PAI 的存在已经不再有了^[1,2]。事实上,在纤溶系统中, plasmin 和 PA 各有其专一性的抑制剂,它们分别在不同水平上调节纤溶活性(如图 1)。

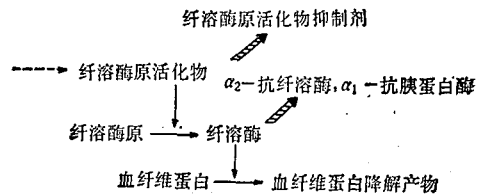


图 1 纤溶系统

从免疫学特性看, PAI 至少可分成四类: 内皮细胞型 PAI (PAI-1)、胎盘型 PAI (PAI-2)、尿型 PAI (PAI-3) 和蛋白酶 nexin (protease nexin, PAI-4), 它们对纤溶系统的调节功能还未完全搞清^[1,2]。

14 Kostka G, Schweiger A. *Biochem Biophys Acta*, 1982; 696: 139
 15 Kimura N, Cathala G, Baxter J D *et al. DNA*, 1983; 2: 195
 16 Tanuma S, Johnson L D, Johnson G S. *J Biol Chem*, 1983; 258: 15371
 17 Murcia G, Hulesky A, Lamarre D *et al. J Biol Chem*, 1986; 261: 7011
 18 Wong M, Miwa M, Smulson M *et al. Biochemistry*, 1983; 22: 2384
 19 Malik N, Wong M, Smulson M E. *Biochemistry*, 1984; 23: 3721

20 Ushiroyama T, Tanigawa Y, Tsuchiya M *et al. Eur J Biochem*, 1985; 151: 173
 21 Tanuma S, Johnson G S. *J Biol Chem*, 1983; 258: 4067
 22 Okayama H, Hayaishi O. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978; 84: 755
 23 Hough C J, Smulson M E. *Biochemistry*, 1984, 23: 5016
 24 Stone P R, Lorimer III W S, Kidwell W R. *Eur J Biochem*, 1977; 81: 9
 25 Sastry S S, Kun E. *J Biol Chem*, 1988; 263: 1505

[本文于1990年6月8日收到,11月2日修回]

PAI-1

内皮细胞型 PAI 已从内皮细胞、成纤维细胞、肝癌细胞等细胞培养液中发现,血浆及血小板中也发现了 PAI-1. PAI-1 最初产生于内皮细胞和血小板,是血浆中的主要 PAI^[2]. PAI-1 为一种糖蛋白,分子量为 45—50kD, pI 为 4.5—5.0^[3-5],属丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpine),反应中心为精氨酸,被称为精氨酸 Serpin (Argserpin)^[2]. PAI-1 对酸稳定,可抑制尿激酶 (UK) 和组织型纤溶酶原活化物 (t-PA),生成 1:1 的对 SDS 和热稳定的复合物,35℃ 时对 UK 和 t-PA 的二级反应速度常数相似,为 $10^7 \text{mol}/(\text{L}^{-1}\text{s}^{-1})$.

大多数细胞可同时产生 PA 和 PAI-1,它们的释放无依赖关系,而是被环境条件单独控制.地塞米松、内毒素、凝血酶、白细胞间介素-1 及转化生长因子- β 可刺激培养的细胞合成和分泌 PAI-1.

已发现内皮细胞、牛平滑肌细胞、HT-1080 成纤维瘤细胞培养液中,PAI-1 以两种形式存在,即活性形式 (active form) 和非活性的潜在形式 (latent form),而且后者很过量.活性的 PAI-1 (α -PAI-1) 可抑制 PA 活性,而非活性的 PAI-1 (λ -PAI-1) 在通常情况下不抑制 PA,但可被蛋白变性剂 (如 SDS、盐酸胍、脲、KSCN 等) 激活产生 PAI 活性^[6-8].

Hekman 等人研究了牛主动脉内皮细胞条件培养液中的 λ -PAI-1 被激活的情况,发现 0.01U/ml PAI 活力的条件培养液中,用 1.7 mmol/L SDS、4mol/L 盐酸胍、12mol/L 脲或 6mol/L KSCN 处理时,PAI 活力可分别增至 0.9、1.9、0.8 和 0.5U/ml,但用大量透析或 5mol/L NaCl 等盐溶液处理的方法不能刺激 PAI 活力的产生.凝胶过滤方法测得 α -PAI-1 和 λ -PAI-1 的分子量分别为 50kD 和 30kD.观察到的现象表明,这种活化不是由于培养液中能被透析除去的小分子组分或是与 λ -PAI-1 结合的大分子物质的去除引起的^[7].Levin 等人研究发现,人内皮细胞条件培养液中

两种形式 PAI-1 的比例与培养保温时间有关,当保温 4、8、16 和 24h 时,测得 λ -PAI-1 分别为 α -PAI-1 的 12、30、40 和 50 倍^[9].另外,在细胞匀浆中也发现了 PAI 活性,这种活性与培养液中 α -PAI-1 性质相似,SDS 不能使其活力增加,37℃ 保温时发现这种 PAI-1 活力下降,8 小时后只剩不足 10% 的活力,高温可使活力下降速度加快;经 SDS 处理后约 90% 的活力可以恢复,提示与细胞相关的这种 PAI-1 可能可转化为 λ -PAI-1 (培养液中的)^[6].研究还发现 α -PAI-1 和 λ -PAI-1 分子量有微小差异,前者略高于后者,可能 α -PAI-1 是 λ -PAI-1 的前体,细胞合成的是 α -PAI-1,在从细胞释放或释放后的过程中转化成 λ -PAI-1^[6,7].

不仅蛋白变性剂可使 λ -PAI-1 活化,某些脂类物质也可使 λ -PAI-1 活化^[8],如带负电荷的磷脂、磷脂酰丝氨酸 (PS)、磷脂酰肌醇等.净负电荷的存在是活化所必需的;当培养液中 PS 存在时,PAI-1 对 t-PA 的抑制作用比无 PS 时强 50 倍,而 SDS 则只能提高到 25 倍;Ca²⁺ 对 PS 活化的 PAI-1 的抑制活力有干扰作用^[8].

Wiman 等研究了血浆中的 PAI-1,发现正常人血浆中 PAI-1 很少 (<100pmol/L),而某些病人血浆中含量较多^[3].当血浆中加入 ³⁵S 标记的 t-PA 时,则很快可以生成分子量为 120kD 的复合物,推测该 PAI-1 分子量为 50kD.富含 PAI-1 的血浆经亲和层析后凝胶过滤,发现一个分子量为 205kD 的对称峰,加入等摩尔量的 t-PA 时,该峰消失.推测可能在富含 PAI-1 的血浆中,PAI-1 以四聚体形式存在,或 PAI-1 也能与血浆中的其它蛋白结合^[3].

PAI-1 不仅可以与 PA 形成共价不可逆复合物,从而抑制 PA 活性,而且可以被 PA 降解^[3,4,9].纯化的 HT-1080 PAI-1 (分子量为 54kD) 可以作为 PA 的底物,被催化量的 PA 水解成分子量为 50kD 的无活性的 PAI-1;丝氨酸蛋白酶抑制剂和 UK 单抗可以阻止这种水解反应的发生^[9].Andreasen 进一步研究了水

解前后 PAI-1 的氨基酸序列,并通过分离到的 PAI-1 cDNA 确定了 PAI-1 被切割位点附近的氨基酸序列,发现切点在距 C 端 35 个氨基酸残基处的 Arg-Met 键^[4];这一结果也证明了 PAI-1 属 Argserpin.

至今已有不少人研究了 PAI-1 基因结构和 cDNA 序列^[10,11],发现人 PAI-1 基因由 8 个内含子和 9 个外显子组成,全长 12.3kb. 外显子和内含子交界处符合“GT-AG”规则^[10]. 多数研究者认为人 PAI-1 的 N 端氨基酸序列为 Val-His-His^[10,11],但 Andreassen 等人研究发现,PAI-1 cDNA 端具有不均一性,有 Val-His-His 和 Ser-Ala-Val-His-His- (即多两个氨基酸残基)两种末端,这两种末端各占 55% 和 45%^[4]. Zeheb 对大鼠 PAI-1 cDNA 进行了研究,发现其核苷酸序列与人 PAI-1 cDNA 核苷酸序列有 82% 同源性. 同时对所编码的由 402 个氨基酸组成的蛋白质序列同源性也进行了比较,发现同源性为 81%,且活性中心相同^[12].

PAI-2

胎盘型 PAI 最初于 1968 年由 Kawano 等人从胎盘中发现,目前已从胎盘、单核巨噬细胞、U937 细胞及表皮细胞中得到纯化,它们具有免疫相关性. 此外孕妇血浆中也发现了大量的 PAI-2^[13].

PAI-2 主要调节细胞外的 PA 活性^[2],对其研究不及 PAI-1 深入. 已知它可以与 UK 和 t-PA 起反应,对 UK 的抑制作用比 t-PA 强,而对尿激酶原 (pro-UK) 无抑制作用^[1,12].

胎盘 PAI-2 已从胎盘抽提液中纯化,分子量为 47kD,可与 PA 反应中心结合生成 1:1 复合物. 该复合物对 SDS 稳定,从而证明为共价结合;在羟胺中该复合物可解离,提示形成复合物时可能是 PAI-2 的 C 端与 PA 活性中心丝氨酸的-OH 以酯键相连^[12].

表皮细胞 PAI-2 的分子量为 43kD, pI 为 5.2,可抑制 PA,但不抑制 plasmin 及其它丝氨酸蛋白酶,能调节表皮 PA 的活性,从而避免了因表皮中过量的 PA 活性导致的疾病的发

生. 纯化的表皮 PAI-2 可以与来自胎盘的 PAI-2 的抗体起反应,而不与 PAI-1 抗体反应,说明表皮 PAI-2 与胎盘 PAI-2 具有免疫相关性^[13].

内毒素可刺激巨噬细胞分泌 PAI-2. 这种 PAI-2 与巨噬细胞内的 PAI-2 分子量都为 50kD. 它们都可抑制 UK,并且与 UK 形成复合物的结合速度常数和复合物的解离平衡常数相同,分别为 $3 \times 10^5 \text{mol}/(\text{L}^{-1}\text{s}^{-1})$ 和 $4 \times 10^{-10} \text{mol}/\text{L}$ (37°C, pH7.4),与胎盘 PAI-2 相似^[14].

Wohlwend 等人发现人单核巨噬细胞能合成两种功能和抗原性相关的 PAI-2,一种是细胞内的不含糖的 PAI-2,另一种是糖基化的分泌到细胞外的 PAI-2. 鼠巨噬细胞也分泌两种功能和抗原性相似,但含糖量和分子量不同的 PAI-2. 分子量为 40kD 的 PAI-2 大部分从溶胞产物中发现,而分子量为 55kD 的糖化 PAI-2 则大量分泌到胞外^[15]. 鼠巨噬细胞 PAI-2 与人单核巨噬细胞 PAI-2 和人胎盘 PAI-2 功能相似,免疫学性质相关^[15]. 鼠巨噬细胞产生 PAI-2 的能力受体内外各种因素影响,骨髓巨噬细胞不能产生可检测到的 PAI-2,霍乱毒素可促使 55kD 的 PAI-2 的合成和分泌,地塞米松和克隆刺激因子可使两种 PAI-2 的合成都增加^[15].

PAI-2 也从孕妇血浆中发现. 经免疫学测定,在怀孕第九个月的孕妇血浆中其浓度达到 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($2 \mu\text{mol}/\text{L}$). 但这些 PAI-2 是否都具有活力还不清楚^[1].

同 PAI-1 一样,PAI-2 抑制 PA 时首先被 PA 降解^[16]. Kiso 等发现 PAI-2 被 PA 水解后释放 C 端 35 肽 (-Met-Thr-Gly-Arg-Thr-Gly-His-Gly-),然后降解产生的 C 端 Arg 的-COOH 与 PA 活性中心 Ser 的 -OH 生成酯键. PAI-2 活性中心也为 Arg,因而也属 Argserpin^[16].

胎盘 PAI-2 的 cDNA 已在 *E. coli* 中克隆和表达. 插入的 cDNA 全长 1909bp,其中含 5' 端 55bp 的非编码区,1245bp 的阅读框,终止密码,3' 端 581bp 的非编码区及 poly(A)

尾巴。其 mRNA 为 2.0kb, 翻译成 415 个氨基酸组成的分子量为 46.6kD 的蛋白质, 该蛋白无 N 端信号肽序列^[17]。

PAI-3

PAI-3 于 1986 年由 Stump 从尿和血浆中发现^[2,18], 对它的研究刚刚开始。已知 PAI-3 为一种糖蛋白, 分子量为 50kD, 电泳迁移率与 β -球蛋白相似, 尿中含量 $40\mu\text{g/L}$, 正常人血浆中含量为 $2\pm 0.7\mu\text{g/ml}$ 。PAI-3 可以与 UK 形成 1:1 复合物, 二级反应速度常数为 $8\times 10^3\text{mol/L}^{-1}\text{s}^{-1}$ (无肝素) 或 $9\times 10^4\text{mol}/(\text{L}^{-1}\text{s}^{-1})$ (50IU/ml 肝素存在时)。PAI-3 也可抑制双链 t-PA ($k < 3\times 10^3\text{mol/L}^{-1}\text{s}^{-1}$) 和凝血酶 ($k = 4\times 10^4\text{mol}/(\text{L}^{-1}\text{s}^{-1})$, 无肝素; $2\times 10^5\text{mol}/(\text{L}^{-1}\text{s}^{-1})$, 50IU/ml 肝素时), 但对单链的 pro-UK 及 plasmin 无作用。尿中的 UK 和 PAI-3 复合物分子量为 95kD, 比较容易解离^[18]。

PAI-4

蛋白酶 nexin (PAI-4) 由成纤维细胞等附着细胞合成, 已经从人真皮成纤维细胞条件培养液中纯化得到^[19], 其分子量为 43kD, 含糖量 6%。PAI-4 分子中具有高亲和力的肝素结合位点, 可与肝素结合并被活化^[1,2]。肝素存在时, 其与凝血酶的反应几乎是扩散控制的。PAI-4 不抑制 pro-UK, 但可抑制 plasmin、凝血酶及其它胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶, 是丝氨酸蛋白酶的广谱抑制剂^[19]。它对凝血酶和胰蛋白酶的反应速度常数比对 UK 和 t-PA 高很多, 因而不能算是真正的 PAI。

PAI 的生理

PA 在许多过程中起中心作用, 其中纤溶系统最受注意, 因而关于 PAI 的大多数文献讨论其在血液循环中、血栓形成中的作用, 而对 PAI 在许多其它涉及 PA 的生理过程中的作用知道甚少^[4]。健康个体血液中的 PAI 活性有周日涨落, 最低值在下午三点, 而且个体间血浆 PAI 水平差异很大 ($0.0-1.3\text{nmol/L}$)^[20]。在

贮存的人血浆中未发现 PAI-2 和 PAI-4, 约 60% 的 PAI 活性来自 PAI-1, 其余的 40% 归于一种 PA 结合蛋白^[4](可能为 PAI-3)。在体外, PAI-1 在 37°C 时不稳定, 半衰期为 2 至 4h, 激活的蛋白 C 和凝血酶可灭活内皮细胞条件培养液中的 PAI 活性。血浆中的 PAI 表现为快相 (acute-phase) 反应蛋白, 在大手术、心肌梗塞和严重的外伤以后, PAI 活性迅速上升, 是至今发现的最快的快相反应蛋白^[4]。怀孕期中, PAI 活性渐增到孕前的 10 倍, 达到 $100\mu\text{g/ml}$ (在第九个月末), 产后迅速回到孕前水平。用抗 PAI-2 的单抗进行免疫吸附, 可将 PAI 活性从孕妇血中分离出, 说明孕妇血浆中的 PAI-2 至少部分是活性的^[4]。

高水平的 PAI 活力可能与某些疾病有关, 至今研究的最多的是深层静脉血栓的形成, 已确定深层静脉血栓的形成与高水平的 PAI 相关(但不是必需)。Paramo 等人发现, 术后发生深层静脉血栓的病人术前 PAI 活性明显高; 另一方面深层静脉血栓常与 t-PA 从血管壁释放减慢有关。这表明减弱的纤溶可能在深层静脉血栓的病理形成中起某种作用; 许多研究者发现心肌梗塞病人的 PAI 活性上升, 同时 t-PA 或 t-PA 抗原水平下降; 然而在冠状动脉病人中, 增加的 PAI 活性并不与病情的严重程度有关。另外高 PAI 活性还与高脂蛋白血症及血清中甘油三酯水平有关^[1,20]。综上所述, 血浆中 PAI 活性的上升是上述急病的一个指标, 但不与某一特定类型的病相关。虽然至少在深层静脉血栓形成中 PAI 活性可能有一定的诊断价值, 但是还没有 PAI 水平增高与某一疾病有因果联系的可靠证明^[4]。

总之, 正常人血中至少有两个 PAI 库: 一个是血浆库, 周转很快, 且个体间差异较大; 另一个是血小板库, 周转速度与血小板相似, 正常个体差异小。在血凝过程中, 血小板 PAI 可能在保护血凝免受早熟水解 (premature lysis) 中起重要作用; 血凝块中高浓度的活化的血小板可能产生局部的比血浆中高几个数量级的 PAI 浓度, 从而防止太快的水解。在 37°C PAI

的不稳定性和激活的蛋白 C、凝血酶引起的 PAI 失活, 可能使 PAI 逐渐从血凝块中消失, 随后 PA 扩散进入血块, 导致血块水解。血浆中 PAI 活性可能在 PA 活性的系统控制中起作用, 防止在“休息”状态下 PA 起作用。

此外, Hill 等人发现, 丝氨酸蛋白酶抑制剂是防御入侵寄生物的有效物质。PAI 除在凝血、纤溶等过程中起关键性调控作用外, 是否还象其它丝氨酸蛋白酶抑制剂那样在机体防御系统中起重要作用, 这一点还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Sprengers E D, Kluft C. *Blood*, 1987; 69(2): 381
- 2 Hart D A, Rehemtulla A. *Comp Biochem Physiol*, 1988; 90B(4): 691
- 3 Wiman B, Chmielewska J, Rånby M. *J Biol Chem*, 1984; 259(6): 3644
- 4 Andreasen P A, Riccio A, Welinder K G *et al. FEBS Lett*, 1986; 209(2): 213
- 5 Levin E G. *Blood*, 1986; 67(5): 1309
- 6 Levin E G, Santell L. *Blood*, 1987; 70(4): 1090.

- 7 Hekman C M, Loskutoff D J. *J Biol Chem*, 1985; 260(21): 11581
- 8 Lambers J W J, Cammenga M, König B W *et al. J Biol Chem*, 1987; 262(36): 17492
- 9 Nielsen L S, Andreasen P A, Grøndahl-Hansen J. *FEBS Lett*, 1986; 196(2): 269
- 10 Loskutoff D J, Linders M, Keijer J *et al. Biochem*, 1987; 26(13): 3763
- 11 Zehnb R, Gelehrter T D. *Gene*, 1988; 73(2): 459
- 12 Wun T C, Reich E. *J Biol Chem*, 1987; 262(8): 3646
- 13 Hibino T, Izaki S, Ohkuma M *et al. FEBS Lett*, 1988; 231(1): 202
- 14 Chapman H A Jr, Stone O L. *Biochem J*, 1985; 230(1): 109
- 15 Wohlwend A, Belin D, Vassalli J D. *J Immunol*, 1987; 139(4): 1278
- 16 Kiso U, Kaudewitz H, Henschen A *et al. FEBS Lett*, 1988; 230(1, 2): 51
- 17 Ye R D, Wun T C, Sadler J E. *J Biol Chem*, 1987; 262(8): 3718
- 18 Stump D C, Thienpont M, Collen D. *J Biol Chem*, 1986; 261(3): 1267
- 19 Scott R W, Bergman B L, Bajpai A *et al. J Biol Chem*, 1985; 260(11): 7029
- 20 Chmielewska J, Rånby M, Wiman B. *Thromb Res*, 1983; 31(3): 427

[本文于1990年7月9日收到, 10月9日修回]

(上接第 328 页)

Thanmatin 单链的启发, 设计了 link (序列为 YENERIK), 将 B46-Ile 与 A6-Gly 联接起来, 得到单链的甜蛋白 Model-Monellin, 对热及酸碱稳定。

三、多肽设计的前景

蛋白质化学已进入蛋白质工程的时代, 多肽的设计成为其重要的前提, 目前的工作已初步取得令人兴奋的结果, 各实验室的工作不仅在上述工作的基础上进一步发展, 而且不断提出各种新颖的设计思想^[18], 随着多肽合成和基因合成技术的进步, 将使合成大而完整的蛋白质成为可能, 分离方法的突破, 将使多肽的量满足结晶和核磁的研究用量。从各个角度进行多肽的设计不仅有助于丰富已有的蛋白质的结构知识, 而且激发我们以崭新的观点去考察蛋白质的结构原理和卷曲机制。

参 考 文 献

- 1 Jane S R *et al. Protein Engineering*. Alan R Liss, Inc,

- 1987: 149—163
- 2 Zimmerman S S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1977; 74: 4126
- 3 Chou P Y *et al. Biochemistry*, 1974; 13: 222
- 4 Ptityn O B *et al. Biopolymer*, 1983; 22: 15
- 5 Schiffer M *et al. Biophys J*, 1967; 7: 121
- 6 Crippen G M, Kuntz I D. *Int J Pept Protein Res*, 1978; 12: 47
- 7 Douglas H O *et al. Protein Engineering*. Alan R Liss Inc, 1987; 165—173
- 8 Boldwin R L *et al. Protein Engineering*, Alan R Liss Inc, 1987: 127—148
- 9 Connolly M L. *Science*, 1983; 221: 709
- 10 Manfred M *et al. Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1989; 5: 13
- 11 Kaiser E T. *Protein Engineering*. Alan R Liss Inc, 1987: 193—199
- 12 Susan E V *et al. Protein Engineering*. Alan R Liss Inc, 1987: 201—211
- 13 DeGrado G F *et al. Science*, 1988; 240: 1177
- 14 Germann H P, Heidemann E. *Biopolymer*, 1988; 27: 157
- 15 Talbot J A, Hodges R S. *Acc Chem Res*, 1982; 15: 224
- 16 Urry D W. *J Protein Chem*, 1988; 7: 1
- 17 Kim S H *et al. Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 1989; 2(8): 571
- 18 Richardson J R *et al. TIBS*, 1989; 14(7): 304

[本文于1990年7月12日收到, 10月5日修回]