

enzymes can be induced by ethylene. Many ripening-related genes have been cloned, sequenced and located in the chromosomes. The expression of these enzymes can be inhibited by using antisense technology, thus disclosing the function of them in fruit ripening, and inhibiting

the senescent process of tomato from molecular level. Seven antisense genes have been transferred to tomato. Antisense fruits keep fresh for 90 ~ 120 days *in vitro*.

Key words tomato, ripening-related enzymes, antisense technology, keeping fresh

人羧酯酶的研究进展*

唐景荣 孙曼霁

(军事医学科学院药物毒物研究所, 北京 100850)

摘要 羧酯酶是一类可与有机磷化合物结合且活性受抑制的 B-酯酶, 分布很广, 能水解许多羧酯类、酰胺类、硫酯类物质, 其天然底物尚未清楚, 故其生理功能仍在研究中, 可能与脂质代谢, 药物或毒物的生物转化有关. 对羧酯酶的一级结构及基因序列的研究表明, 羧酯酶是由许多生化特性不同的同工酶组成.

关键词 羧酯酶, 生化特性, 一级结构, 活性位点, 基因

羧酯酶 (carboxylesterases, EC 3.1.1.1) 是一类广泛分布于组织与器官的丝氨酸酶类, 能水解许多含有羧酯键、硫酯键、酰胺键的内源性 & 外源性物质, 可与有机磷化合物结合且活性受抑制, 属于 B-脂酶, 其主要功能可能是参与药物与毒物等的生物转化、脂质代谢、信号转导及维持生物膜结构的完整性^[1~5]. 因其生理底物尚不清楚, 故该酶在体内的生理作用亟待研究. 近年来, 随着分子生物学技术的迅猛发展, 羧酯酶的一级结构及其体外表达的研究更加深入, 将促进该酶生物特性及相关功能的研究.

1 分布与亚细胞定位

1.1 分布

羧酯酶在生物界分布极广, 从古细菌和真细菌^[5,6]、至真核微生物^[7]、昆虫乃至哺乳动物的各种组织均有活性较高的羧酯酶, 尤以肝脏中的酶活性最高^[1,8,9]. 用组织化学染色法

发现在血管内皮细胞^[10]、血液单核细胞^[11]、肺泡巨噬细胞^[2]、肾近曲小管上皮细胞、肠上皮细胞, 中枢神经系统均有羧酯酶分布^[10], 而血清中的羧酯酶是由肝脏合成分泌的^[3,12].

1.2 亚细胞定位

羧酯酶的亚细胞分布有明显的组织差异性. 采用差速离心法发现, 人肝、肾、脑等组织的羧酯酶主要位于微粒体的可溶性部分^[9,10], 而电镜观察其分布非常复杂, 羧酯酶主要位于肝细胞的粗面及滑面内质网腔内、线粒体、胞浆脂滴内; 肾近曲小管上皮细胞的滑面内质网及线粒体周围; 而空肠上皮细胞中除位于滑面内质网外, 尚存在于核膜及其他部位. 羧酯酶胞内分布的差异性, 一方面是由于存在着性质不同的同工酶^[9~12], 另一方面与该酶羧基端的氨基酸序列有关^[13~15].

*解放军总后勤部攻关课题.

收稿日期: 1995-04-07, 修回日期: 1995-06-10

2 生化特性

羧酯酶是以单体及寡聚体形式存在, 用凝胶过滤法从人肝中分离出两种分子量各为 60 ku 及 180 ku 的羧酯酶, 后者可能是稳定的三聚体形式; 等电聚焦法则分离出两种等电点不同的羧酯酶, 分别为低 pI (4.2~4.8) 及中 pI (5.2~5.8) 羧酯酶, 经不同浓度的丙烯酰胺凝胶电泳显示, 中 pI 羧酯酶呈一条带, 分子量为 144~173 ku, 而低 pI 羧酯酶则呈单一条或多条带, 分子量均为 60 ku 左右, 说明中 pI 羧酯酶可能是由相同亚基构成的以二或三聚体形式存在, 其电泳差异可能是在凝胶分离过程中, 该酶自发聚集与解离所致^[9]. 研究表明, 构成多聚体的亚基各含有一个活性位点, 且无论氨基酸组成、分子量还是糖基化程度, 均与天然单体羧酯酶截然不同^[9,16]. 人肝羧酯酶在中性 pH 时非常稳定. 中 pI 羧酯酶在 4~15℃ 储存数月, 其活性不变, 反复冻融对活性几无影响, 最适 pH 为 7~9; 而低 pI 羧酯酶在 4℃ 储存 4 周后, 完全失活, 仅保留其抗原性^[9].

3 底物特异性

因羧酯酶的天然底物尚未清楚, 对酶活性的研究均以合成有机物为底物. 人体分离的各种羧酯酶, 其底物特异性也有很大差异, 根据其作用类型可分为以下各类.

3.1 羧酯类化合物

纯化的人肝羧酯酶均能水解脂肪酰族及芳香族酯类化合物, 对 α -萘酚酯及对硝基苯酯类物质均有较高的特异性, 且对其相应的丁酸酯、戊酸酯活性最高, 该活性随碳链延长而减弱, 当碳链增至 C8 时, 几乎无水解能力; 对带侧链的对硝基苯丁酸酯的水解活性也降低. 人肝纯化的中性 pI 羧酯酶对中、长链甘油三酯均有水解能力, 而低 pI 羧酯酶仅能水解中链甘油酯, 且对中链甘油二酯的水解活性最高. 肝羧酯酶对于短链甘油一酯、甘油二酯及甘油三酯的水解能力也与脂链长度有关^[9].

脂链长度由 C2 增至 C8 时, 其活性渐增至高峰, 尔后, 随碳链的递增, 水解活性开始下降^[9,11], 提示羧酯酶可能参与脂质代谢及某些脂类药物如槟榔碱、丁酸甲酯、醋酸雌酮、阿斯匹林、氯苯乙酯等在体内的代谢^[17].

3.2 硫酯类化合物

硫代苯乙酰酯、硫代乙酰乙酯、硫代乙酰丁酯等均可被肝羧酯酶水解. Alexson 等^[18]自大鼠肝微粒体分离出一种与鼠肝羧酯酶的氨基酸序列呈高度同源性的酯酰 CoA 硫酯酶, 双-(4-硝基苯基) 磷酸酯 (BNPP) 可显著抑制其活性, 被认为是羧酯酶家族成员之一. 羧酯酶的这一特性可能影响细胞对半胱氨酸的摄取^[19]. 当酶活性被有机磷化合物抑制时, 胞内半胱氨酸含量显著下降, 提示羧酯酶可能参与乙酰半胱氨酸的水解. 另外, 对一些含有硫酯键的药物如卡比马唑及毒物马拉硫磷也有不同程度的水解作用^[2,9].

3.3 酰胺类化合物

人肝羧酯酶对酰基苯胺类化合物如非那西汀等有较高的结合力与水解能力, 其水解速率也随烃链的延长而减弱, 对局麻药丁酰苯胺, 普鲁卡因的亲合力及水解活性最强^[9,11].

总之, 羧酯酶对上述三类化合物均有不同程度的水解作用, 且对丁胺类或丁酯类化合物活性最强, 提示这类化合物的构型可能与酶的天然底物相似^[11].

4 抑制剂、激活剂与调节剂

4.1 抑制剂

羧酯酶属于 B 酯酶, 能与有机磷化合物结合且活性受抑制; 故有机磷化合物异丙氟磷 (DFP)、梭曼、对氧磷及苯甲基磺酰氟 (PMSF)、BNPP 等物质对羧酯酶呈竞争抑制作用^[11,20], 该特性既可用于羧酯酶的分离纯化和酶生理特性的研究, 又可保护体内乙酰胆碱酯酶免受有机磷化合物抑制; 巯基反应剂对氯汞苯甲酸 (PCMB) 及 $HgCl_2$ 均能显著降低酶活性, 提示酶活性位点中或周围有半胱氨酸^[7,12], 碳酸三苯酯对羧酯酶呈显著的竞争抑制作用, 而

碳酸二苯酯则呈非竞争抑制作用, EDTA 及依色林等对该酶活性无影响^[11].

4.2 激活剂

短链醇类化合物如甲醇、乙醇对该酶有明显的激活作用, 以正丁醇作用最强, 若代之以侧链或结构复杂的聚乙二醇、异丁醇、异戊醇等物质, 则对酶活性无影响, 提示醇类物质可能作用于酶的效应位点, 引起构型改变, 以加速底物与产物与酶催化位点的结合与释放而产生效应的^[11].

4.3 诱导剂

苯巴比妥对肝羧酯酶有明显的诱导作用^[20], 但对肺、肾、脑等外周羧酯酶无影响, 故苯巴比妥可显著降低梭曼等有机磷化合物对机体的毒性, 而与其结构类似的戊巴比妥则增加有机磷物质的毒性. 维生素 A 对羧酯酶的体内表达也有显著影响. 维生素 A 缺乏时, 肝羧酯酶与 GST 活性同步显著下降, 提示维生素 A 可能对羧酯酶的表达具有调节作用^[4].

5 一级结构特点

羧酯酶的一级结构不仅与其活性位点的形成有关, 而且与酶的亚细胞定位及底物特异性均有密切关系.

5.1 C 端序列与亚细胞定位

羧酯酶是以分泌型与滞留型存在于细胞浆、血浆及细胞内质网腔内, 这与酶 C 端的 4 个氨基酸残基构成有关. C 端 KDEL 及 HDEL 这两种序列曾分别作为哺乳动物及真菌微生物如酵母合成的蛋白质滞留于内质网腔的特异序列, Robbi 等^[13]将不同 C 端引入肝羧酯酶的 cDNA 并在 COS 细胞作瞬时表达后, 发现 HDEL、HIEL 等序列也是哺乳动物的蛋白质包括人肝羧酯酶在内质网腔的滞留信号. 利用 PCR 合成含有不同 C 端的引物, 克隆并表达羧酯酶家族的 cDNA, 结果 HNEL、HVEL、HTEL 等类似于酵母蛋白质滞留信号的羧酯酶, 均能有效地储存于滑面内质网腔内, 而含其他序列如 HVER、THET 等的羧酯酶则被分泌到胞浆或培养基中, 其中最末两位氨基酸残

基 EL 是滞留信号的必需序列, 而倒数第三位则因同工酶而异, 即 HXEL、KXEL 是真核生物体内蛋白质滞留于内质网腔的特异信号序列, 其机制可能与受体介导有关^[14]. 目前分离到的各种人羧酯酶 C 端均含有 HIEL 序列, 故能有效地滞留于细胞内质网腔内; 而 Murakami 等^[15]用 COS 细胞表达了一种 C 端为 THET 的羧酯酶, 发现酶活性主要存在于培养基中, 同时从血浆中也检测到这种酶, 说明 C 端的氨基酸序列决定了羧酯酶属分泌型还是滞留型.

5.2 一级结构与活性位点

羧酯酶的氨基酸组成呈高度保守性, 人肝羧酯酶与肺泡巨噬细胞, 单核细胞羧酯酶的氨基酸序列几乎完全相同, 与大鼠及兔肝羧酯酶的同源性也达 70% 左右^[1,21,22], 其共同特征是: a. 属于丝氨酸酯酶的羧酯酶, 均有 Ser、His、Asp 残基构成电荷中继系统为该酶的活性位点; b. 分子内均有 4~5 个半胱氨酸, 构成两对二硫键以维持活性中心的空间构型; c. 近 N 端有一糖基化位点, 糖链对糖苷酶 H 非常敏感, 提示含甘露糖较多. 糖基化程度与酶的活性呈正相关, 采用衣霉素抑制糖基化程度低至 10% 时, 其活性只有 v_{max} 的 1/4, 说明该糖基化位点可能与酶的稳定性或活性位点的空间结构有关^[23].

6 基因克隆及其家族

6.1 基因克隆

迄今为止, 已有许多羧酯酶被克隆并在体外不同细胞进行表达. 人肝羧酯酶是用免疫法筛选 cDNA 文库后, 根据 N 端氨基酸序列或兔同源性序列合成探针, 复筛后得到含有完整开放阅读框架的全长 cDNA 克隆. 迄今发现的两种人肝羧酯酶编码区分别有 567^[1]及 454 个氨基酸组成^[21], N 端均有一长度不等的信号肽序列, 近 C 端有约 200 bp 的非翻译区, 该区内含有 -AATAAA- 的调节序列. DNA 序列分析表明, 肺巨噬细胞羧酯酶与 Long 等^[1]发现人肝羧酯酶序列几乎完全相同, 仅在信号肽末端少

一丙氨酸, 与鼠肝羧酯酶及兔肝羧酯酶的序列同源性分别为 69% ~ 76% 及 77% ~ 48%^[21,22]. 羧酯酶的活性位点序列 G-E-S-A-G-G/A-X-S (G-X-S-X-G) 是高度保守序列; 分子内 4 个半胱氨酸基的位置也很相似; 但糖基化位点差异较大, 人羧酯酶仅有一个糖基化位点, 而大鼠、兔的糖基化位点多至 3~4 个, 这可能是人羧酯酶活性低于其他种属的原因之一^[23,24]. 目前发现的人肝、肺泡巨噬细胞的羧酯酶基因定位于 16 号常染色体上, 基因长度为 30 kb, 包括 14 个外显子和 13 个内含子, 其中第 2、第 14 个外显子均少于 200 bp, 而最大的内含子为 4 kb, 最小的内含子为 0.3 kb^[8,23].

6.2 基因家族

许多真核细胞的酯酶与羧酯酶基因序列呈高度同源性^[25~27], 如人乳汁中分离纯化的胆盐激活酯酶, 是由乳腺细胞分泌、促进乳汁在肠道乳化吸收的一种酶, cDNA 序列为 2428 bp, 序列与羧酯酶出自同一基因, 3' 端有 112 bp 的非翻译区与 AATAAA 的信号; 肝微粒体的脂酰 CoA 硫酯酶, 在体内以单体和三聚体的形式存在, 除 N 端序列外与肝羧酯酶非常相似, 可能是羧酯酶基因家族成员之一. 另外, 羧酯酶与胆碱酯酶、甲状腺球蛋白、脂肪酶等序列同源性较高, 可能由同一祖先基因复制并分化出的、具有不同功能的蛋白质^[26].

7 羧酯酶与疾病

尽管羧酯酶的生理作用尚不清楚, 用特异性抑制剂 BNPP 使其 90% 活性受抑制时, 尚未观察到机体内发生的病理变化, 但许多研究表明, 羧酯酶在某些疾病的发生与诊断上起着不可忽视的作用.

7.1 羧酯酶与肿瘤

羧酯酶同工酶在体内的表达差异是诊断单核细胞白血病的标志之一^[11], 在 3 种肝癌细胞内未检测到正常表达的羧酯酶^[2]. 体外观察发现, 羧酯酶能诱发乙烯基乙酯的细胞毒性及 DNA 与蛋白质的交联反应^[28]. 若用 BNPP 抑

制其活性后, 可显著降低该物质的细胞毒性, 可使 DNA-蛋白质交联降低 75% 以上, 而纯化的羧酯酶可使交联反应增至正常的 10 倍以上, 提示羧酯酶可将乙烯基乙酯水解成毒性更强的乙醛, 促进 DNA-蛋白质交联, 诱发鼻粘膜肿瘤形成. 先天性或获得性羧酯酶缺陷者, 体外杀伤肿瘤能力也降低^[2,11].

7.2 羧酯酶与自身免疫病

氟烷麻醉可造成严重肝损害, 其机制是因氟烷在体内产生的异氟烷及安氟烷可与肝内羧酯酶共价结合而改变其抗原性, 诱发自身免疫. 免疫化学显示, 三氟醋酸化的羧酯酶密集在肝小胆管区而造成胆汁性硬化^[29]. 另外, Alzheimer's 病、萎缩性脑梗死患者的脑毛细血管内皮细胞、小胶质细胞及梗死区的巨噬细胞, 均有大量与肝羧酯酶抗体发生交叉反应的羧酯酶分布, 有待研究^[10].

7.3 其他

羧酯酶调节急性反应期的 C-反应蛋白 (CRP) 的释放^[30]. 正常状态下, 羧酯酶与 CRP 紧密结合滞留于内质网腔内, 应激反应如创伤、急性感染期等, 二者结合力下降, 可释放出许多 CRP, 调节机体的代偿功能, 说明羧酯酶也参与机体的应激反应. 脂代谢紊乱及其他吸入性肺部疾患^[2]以及许多药源性疾病都与羧酯酶的作用有关^[28,29].

8 结 语

羧酯酶包括许多生化特性不同的同工酶, 广泛分布于机体内, 对体内外含有羧酯键、硫酯键以及酰胺键的物质均有不同程度的水解作用, 而对丁酰类化合物的活性最强. 羧酯酶的这种特性提示: a. 羧酯酶可能参与体内脂质代谢; b. 参与异源性脂类及酰胺类物质的生物转化, 以发挥解毒或致毒作用; c. 其生理底物可能与丁胺类化合物结构类似, 基因克隆的序列分析呈高度保守性, 种属间同源性很高, 提示羧酯酶可能与生物进化有关, 且与许多疾病的发生有关, 这些资料将有助于其生理功能及寻找天然底物的研究.

参 考 文 献

- 1 Long R M, Calabrese M R, Martin B M *et al.* Life Sci, 1991; **48**: 43
- 2 Munger J S, Shi G P, Mark E A *et al.* J Bio Chem, 1991; **266**: 18832
- 3 McCracken N W, Blain P G, Williams F M. Biochem Pharmacol, 1993; **46**: 1125
- 4 Gad M Z. Biochem Pharmacol, 1994; **48**: 139
- 5 Manco G, Gennaro S D, Rosa M D *et al.* Eur J Biochem, 1994; **221**: 965
- 6 Kim Y S, Lee H B, Choi K D *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1994; **58**: 111
- 7 Sugihara A, Shimada Y, Nagao T *et al.* Biosci Biotech Biochem, 1994; **58**: 7532
- 8 Shibata F, Takagi M, Kuroda T *et al.* Genomics, 1993; **17**: 76
- 9 Ketterman A J, Bowles M R, Pond S M. Int J Biochem, 1989; **12**: 1303
- 10 Yamada T, Hosokawa M, Satoh S *et al.*, Brain Res, 1994; **658**: 163
- 11 Saboori A M, Newcombe D S. J Biol Chem, 1990; **265**: 19792
- 12 Alexson S E H, Finlay T H, Hellman U *et al.* J Biol Chem, 1994; **269**: 17118
- 13 Robbi M, Beaufay H. J Biol Chem, 1991; **266**: 20498
- 14 Medda S, Proia R L. Eur J Biochem, 1992; **206**: 801
- 15 Murakami K, Takagi Y, Mihara K *et al.* J Biochem, 1993; **113**: 61
- 16 Miller S K, Main A R, Rush R S. J Biol Chem, 1980; **255**: 7161
- 17 Patterson T A, Kosh J W. Gen Pharmacol, 1993; **24**: 641
- 18 Alexson S E H, Mentlein R, Wernstedt C *et al.* Eur J Biochem, 1993; **214**: 719
- 19 Butterworth M, Upshall D G, Cohen G M. Biochem Pharmacol, 1993; **46**: 1131
- 20 Maxwell D M, Lieske C N, Brecht K M. Chem Res Toxicol, 1994; **7**: 428
- 21 Riddles P W, Richards L J, Bowels M R *et al.* Gene, 1991; **108**: 289
- 22 Yan B, Yang D, Brady M *et al.* J Biol Chem, 1994; **269**: 29688
- 23 Kroetz D L, McBride O W, Gonzalez F J. Biochemistry, 1993; **32**: 11606
- 24 Morlock-Fitzpatrick K R, Fisher E A. Proc Soc Exp Biol Med, 1995; **208**: 186
- 25 Nilsson J, Blackberg L, Carlsson P *et al.* Eur J Biochem, 1990; **192**: 543
- 26 Nilsson J, Hellquist M, Bjursell G. Genomics, 1993; **17**: 416
- 27 Ozols J. J Biol Chem, 1989; **264**: 12533
- 28 Kuykendall J R, Taylor M L, Bogdanffy M S. Toxicol Appl Pharmacol, 1993; **123**: 283
- 29 Smith G C M, Kenna J G, Harrison D J *et al.* Lancet, 1993; **342**: 963
- 30 Macintyre S, Samols D, Dailey P. J Biol Chem, 1994; **269**: 24496

Progress on Human Carboxylesterases. Tang Jingrong, Sun Manji (*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Carboxylesterases (EC 3.1.1.1) can be inhibited by combining with organophosphorus compounds and classified into B-esterase. The enzymes are responsible for the hydrolysis of ester, thioester and amide bonds of many compounds although their natural substrate and physiological role are unclear. Recently, it is found that purified carboxylesterase may play an important physiological role in biotransformation of drugs or xenobiotics and lipid metabolism. Human carboxylesterases consist of an important family of isoenzymes that have distinct biochemical characteristics with studies on the primary structure and gene sequence of many different isoenzymes.

Key words carboxylesterase, biochemical characteristics, primary structure, active site, gene