

- 14 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 1998, **391** (6662): 43~ 50
- 15 Thornberry N A, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, 1998, **281** (5381): 1312~ 1316
- 16 Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, *et al.* Apoptosis signaling by death receptors. *EUR J Biochem*, 1998, **254** (3): 439~ 459
- 17 Pan G H, O'Rourke K, Chinaiyan A M, *et al.* The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, 1997, **276** (5309): 111~ 113
- 18 Cheng Y. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest*, 1998, **101** (8): 1992~ 1998
- 19 Barinaga M. Is apoptosis key in Alzheimer's disease. *Science*, 1998, **281** (5381): 1303~ 1304
- 20 Burinaga M. Stroke-Damaged neurons may commit cellular suicide. *Science*, 1998, **281** (5381): 1302~ 1303

**The Molecular Mechanism of Caspase Activation and Regulation.** XIONG Shi-Qin, ZHU Xi-Hua

(*Institute of Immunology, Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400038, China*).

**Abstract** Caspase is a rapidly growing family of aspartate-specific cysteine proteases (interleukin 1 $\beta$ -converting enzyme related proteases). Up to date, thirteen mammalian caspases have been discovered. Caspases normally exist in cells as inactive proenzymes. Caspases proteolytic processing at aspartate specific sites unleash their latent enzymatic activity and trigger cell apoptosis. Caspase as effector plays an important role in most cell apoptosis. Big progress was made for the molecular mechanism of caspase activation and regulation in cell apoptosis.

**Key words** caspase, induced proximity, caspase cascade, mitochondria

## 丁酰胆碱酯酶结构研究新进展

魏婉丽 孙曼霁

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要** 丁酰胆碱酯酶 (butyrylcholinesterase, BChE, EC 3.1.1.8), 能与有机磷毒剂或杀虫剂结合, 并能水解许多酯类、肽类及酰胺类化合物, 对这些化合物的中毒具有防治作用. 近年来通过计算机模拟技术及定点突变技术对其结构研究取得了重要进展, 对人 BChE 外周阴离子部位的结构有了新的认识, 并通过氨基酸替换使 BChE 获得了水解有机磷酸酯的新功能.

**关键词** 丁酰胆碱酯酶, 蛋白质结构, 定点突变

**学科分类号** Q556

丁酰胆碱酯酶又称假性胆碱酯酶, 属于丝氨酸酯酶家族. 主要分布于血清及肝脏中, 肌肉和脑组织中也有少量存在. BChE 能与有机磷毒剂或杀虫剂结合, 并能水解许多酯类、肽类及酰胺类化合物, 参与某些药物的代谢过程, 它还有促进细胞生长的作用<sup>[1~3]</sup>. 人血清 BChE (hBChE) 基因组 DNA 长约 80 kb, 为单拷贝基因, 定位于 3 号染色体 3q21~ q26 区域, 包含四个外显子和三个内含子. 外显子 1 长 120 bp 以上, 编码 5' 端非翻译区; 外显子 2 长 1 525 bp, 编码 28 个氨基酸的信号肽和 N 端 83% 的成熟蛋白质; 外显子 3 只有 167 bp, 编码中间 55 个氨基酸的小肽; 外显子 4 长 604 bp, 编码 C 端 41 个氨基酸和 3' 端非翻译区<sup>[4]</sup>. 近年来

随着分子生物学技术及计算机模拟技术的发展, 使得 BChE 蛋白质结构及其相关功能的研究取得了重要进展.

### 1 一级结构

Lockridge 等<sup>[5]</sup>采用 Edman 降解法测定了人血清 BChE 完整的氨基酸序列, 共含有 574 个氨基酸残基. BChE 氨基酸序列与其他酯酶家族蛋白有很高的同源性 (表 1).

Tel: (010) 66874609; E-mail: sunmj@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-05-27

表1 人 BChE 与其他蛋白质的同源性比较<sup>[6]</sup>

蛋白质	同源性/%
牛甲状腺球蛋白	29.0
果蝇乙酰胆碱酯酶	36.8
加利福尼亚电鳐乙酰胆碱酯酶	53.1
小鼠乙酰胆碱酯酶	52.1
电鳐 ( <i>Torpedo marmorata</i> ) 乙酰胆碱酯酶	53.2
人乙酰胆碱酯酶	52.3

## 2 空间结构

近年来以电鳐 AChE 的三维结构为模板对人 BChE 的三维结构进行计算机模拟结果表明, 人 BChE 的结构特征如下: a. 人 BChE 活性部位催化三联体同电鳐 AChE 相似, 由 Ser198-His438-Glu325 组成, 而不是 Ser-His-Asp. b. 酶活性中心为一狭长的囊袋 (约 2 nm), 囊袋入口处比 AChE 大 20 nm 左右, 在囊袋的四周内壁上镶着 8 个芳香氨基酸残基 (W82、W112、Y128、W231、F329、Y332、W430、Y440), 而 AChE 则有 14 个芳香氨基酸残基, 与 AChE 相对应的另外 6 个氨基酸为 N68、Q119、A276、L285、V288、A328 是非芳香氨基酸. 这一差别正是 BChE 特异性水解丁酰胆碱 (BCh) 的关键所在. 计算机模拟显示人 AChE 的 Phe388 和 Phe290 阻碍 BCh 进入到 AChE 的酯解部位, 用定点突变方法将这两个氨基酸突变成为 Leu 和 Val (BChE 所拥有) 后, 水解 BCh 的速度与水解 ACh 的速度相等, 表现出 BChE 的特征, 且对 BChE 特异性的抑制剂 *iso*-OMPA 敏感性增高. 证实 Phe388 和 Phe290 是决定 AChE 与 BChE 底物特异性的主要因素, 是真性及假性胆碱酯酶区别的本质<sup>[6,7]</sup>.

## 3 活性中心结构与催化机制

BChE 活性中心囊袋的底部为 Ser198, 其两侧相距 1 nm 处分别是酰基结合部位和胆碱结合部位<sup>[7,8]</sup>. BChE 在催化丁酰胆碱水解时, Glu325 的游离羧基参与协同 His438 咪唑基团的去质子化作用, 后者又通过共轭效应, 使丝氨酸的羟基变得更加活泼而攻击胆碱酯的羰基碳, 使其形成四面体过渡态, 而后丁酰基共价结合于酶的活性中心的丝氨酸残基上, 同时释出胆碱. 第二阶段丁酰化酶水解释放出丁酸, BChE 恢复原状, 是整个反应的限速阶段<sup>[8]</sup>. 此催化机制已被定点突变实验证实. 催化三联体的任何一个氨基酸发生突变, 活性即完全丧失. 位于胆碱结合位点附近的 Met437 点突变成

Asp437, 不影响酶和底物的结合, 但干扰催化三联体精确的相互作用, 活性也完全丧失. Tyr440 与胆碱结合位点相距 0.68 nm, 当其由酸性更强的 Asp440 替换时,  $K_m$  值无明显变化, 但对 DFP、*iso*-OMPA、二乙氧磷酰硫胆碱 (echothiophate) 三种抑制剂敏感性降低. 当胆碱结合位点 W82Y 或 W82F 突变时,  $K_m$  增高 100 倍以上<sup>[9]</sup>. 位于酰基结合部位附近的 Phe329 与 Leu286 突变后, 对抑制剂的敏感性明显受到影响. 当 Leu286 以 Asp、Arg、Glu、Lys 替换时, 突变体的  $K_m$  值和  $IC_{50}$  值明显升高, 顺序为 Lys > Glu > Arg > Asp. 当 Phe329 以极性氨基酸 Cys 或 Leu 替换时, 突变体对 *iso*-OMPA 的敏感性提高 10 倍. 以 Glu 替换时, 突变体对 DFP 的敏感性提高 3 倍, 而对二乙氧磷酰硫胆碱的敏感性降低 10 倍<sup>[8]</sup>.

## 4 外周阴离子部位

在电鳐 AChE 晶体结构不清楚以前认为 BChE 活性中心含有酯解部位和阴离子部位, 阴离子部位和胆碱季铵氮的阳离子结合后催化胆碱水解, 认为 D70 是属于活性中心的阴离子部位. 根据电鳐 AChE 晶体结构模建的 BChE 结构可知<sup>[10]</sup>, D70 位于 BChE 活性口袋的入口处, D70 羧基与活性中心 Ser198 的羟基之间相距 1.1963 nm, 这一距离使得 D70 不可能成为活性中心的阴离子部位, 而囊袋底部的 W82, 其侧链羧基与 Ser198 羟基相距 0.87 nm, 才是活性中心的阴离子部位. 在 AChE 中与 BChE D70 相当的 D72 是外周阴离子部位<sup>[10]</sup>, 其作用就是将信号由囊袋的入口处传入到囊袋底部而使得酶的构象发生改变. 在 AChE 中 W279、D72、Y70、Y121、E278、Y334 参与构成外周阴离子部位, 而其中 D72、W279 是外周阴离子部位的核心. 那么 BChE 中与 AChE D72 相当的 D70 是不是 BChE 的外周阴离子部位呢? Harel (1992 年) 认为 BChE 没有外周阴离子部位, 这是由于对外周阴离子部位的定义不同所造成的. 根据 AChE 外周阴离子部位的定义规则<sup>[11]</sup>, Masson 等<sup>[12]</sup>用实验证实 BChE 有外周阴离子部位, 而 D70 是其主要组成成分. 在 BChE 外周缺少 AChE 的芳香氨基酸 W279、Y121、Y70、D72、Y334、Y330 而代之的是 A277、Q119、N68、D70、Y332、A328. 只有 Y332 有一氢键和 D70 相连, 这使得 BChE 囊袋开扩, 与之作用的底物、抑制剂及药物等的范围宽. 胆碱结合部位 W82 通过底物上的正电荷与外周部

位 D70 上的负电荷作用, D70 决定底物到 W82 的方向. 将 BChE 外周部位的非芳香氨基酸突变成芳香氨基酸, 发现其增加对 Propidium 的结合, 但不影响其功能, 提示在 BChE 的外周部位芳香基氨基酸并不重要.

BChE 外周阴离子部位的 D70 与活性中心 Ser198 相距约 1.2 nm. D70G 突变后, 由于缺失了阴离子氨基酸, 其突变体对带正电荷的药物、抑制剂等底物的亲和力显著降低, 水解速度降低或丧失水解能力<sup>[11]</sup>. 研究还发现 D70G 突变体和底物相互作用有如下特点, 不能水解琥珀酰胆碱, 但仍能水解丁酰胆碱、苯甲酸胆碱、二硫代琥珀酰胆碱 (succinyldithiocholine)、对硝基酚丁酯 ( $\sigma$ -nitrophenyl butyrate). 其  $K_m$  值随催化底物所带正电荷数不同而不同. 带一个正电荷的底物只与 Omega loop 上 (Cys65~ Cys92) D70 及 Trp82 作用一次, 而带两个正电荷的二硫代琥珀酰胆碱则作用两次, 因此 BChE 催化带有 2 个正电荷底物的  $K_m$  值是催化带有一个正电荷底物  $K_m$  值的 10 倍<sup>[12]</sup>, 是催化不带电荷底物  $K_m$  值的 100 倍. Masson 等对 BChE D70G 突变体和有机磷毒剂抑制、老化及肟类重活化药相互作用的研究表明, D70 对带正电荷的二乙氧磷酰胆碱及重活化剂氯磷定 2-PAM 的亲和力高, 而对不带电荷的对氧磷 (Paraoxon) 及 iso-OMPA 没有影响, D70 突变体对二乙氧磷酰胆碱抑制比对氧磷及 DFP 敏感, 后二者抑制天然 BChE 的老化速度比后二者抑制突变体 BChE 的老化速度分别快 3 倍和 8 倍. D70G 突变体对氯磷定的重活化作用有一定的对抗作用<sup>[13]</sup>. 除 D70G 外, 研究还发现 BChE Glu197 突变、W82A、F329C、F329A 等突变都能延长二异丙基磷酰化酶老化的半值期, 说明这些氨基酸残基均参与了有机磷毒剂抑制的老化过程. 计算机模拟及分子动力学计算表明, W82 在老化的脱烷基化中起着稳定碳离子 (carbonium ion) 的作用, Glu197 在羧基化过程中起稳定作用, 而 D70 在脱烷基化过程中控制着构象的改变<sup>[14]</sup>.

## 5 金属离子结合部位

研究发现人 BChE 的氨基酸序列上有 HXXE ... ..H 的  $Zn^{2+}$  离子结合结构, Bhanumathy 等发现用 EDTA 或 NaCN 处理后的 BChE 可以和与  $Zn^{2+}$  络合的 Sepharose 柱结合并被 EDTA 或咪唑洗脱下来. 如先用二乙基焦碳酸盐修饰 BChE 上的组

氨酸后再用 EDTA 处理 BChE 则不能与  $Zn^{2+}$  络合的 Sepharose 柱结合. 用 EDTA 与人 BChE 作用并不影响其水解丁酰胆碱的活性, 但却使 BChE 的羧基酶活性丧失, 而用  $ZnCl_2$  后可以使丧失的羧基酶活性恢复. 这些实验说明 BChE 上有  $Zn^{2+}$  离子结合位点, 组氨酸参与  $Zn^{2+}$  与人 BChE 的结合, 很可能就是结合位点<sup>[15]</sup>. 迄今还未见 BChE 与其他金属离子作用的报道.

## 6 BChE 结构功能优化研究

BChE 同其他丝氨酸酯酶和蛋白酶一样能被有机磷毒剂 (OP) 快速而不可逆地抑制, 起到中和这些毒剂的作用. 能不能通过氨基酸突变而使 BChE 像水解丁酰胆碱底物那样水解 OP 呢? Millard 等<sup>[16]</sup> 用组氨酸替换 G115、G117、Q119、G121 这些距活性位点 Ser198 及 Oxyanion hole 各 0.3~ 1 nm 处的氨基酸, 发现 G117H 的突变体被 OP (沙林, VX) 抑制后酶活性可马上恢复至 100%. 而 G117K 突变体有与天然 BChE 相同的酯酶活性, 但 OP 抑制此突变体后, 其酶活性不能恢复, 说明 His 上的酸性基团 ( $pK_a$  6.2) 在这一过程中起着重要的作用. 这一结果表明, OP 不是 G117H 突变体的不可逆性抑制剂, 而是它的底物. G117H 的去磷酸化速度是天然 BChE 去磷酸化速度的 100~ 2 000 倍. 因为在 oxyanion hole 中咪唑基团上的离子处于适当位置时可以催化去磷酸化反应, 赋予 BChE 以水解有机磷酸酯的新功能. Lockridge 等<sup>[17]</sup> 也证实 G117H 突变体不但仍保留其原水解丁酰胆碱、苯甲酰胆碱、O-nitrophenyl butyrate 的功能, 还能催化有机磷酸酯的水解, 如水解 BChE 不可逆性抑制剂抗青光眼药二乙氧磷酰胆碱及有机磷杀虫剂对氧磷, 受这两种化合物抑制的 G117H, 在 2~ 3 min 内酶活性可恢复至 100%. 它催化这两种抑制剂的速度是非酶催化水解的 1000 000 倍. G117H 是现在所知的唯一能水解二乙氧磷酰胆碱的酶. G117H/E197Q 联合突变体具有水解有机磷毒剂梭曼四种异构体的新功能, 而 G117H, E197Q 单突变体均不能水解梭曼. 尽管这三种突变体水解丁酰胆碱的  $K_{cat}/K_m$  比值降低, 分别为 110、11、11 倍, 但通过突变使得天然 BChE 的不可逆抑制剂有机磷毒剂变为突变体的一种缓慢水解底物, 使 BChE 的功能发生突破性的改变, 在 BChE 的理论及应用研究上具有深远的意义<sup>[18]</sup>.

## 参 考 文 献

- 1 Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmac Ther.* 1990, **47** (1): 35~ 60
- 2 Mattes C E, Lynch T J, Singh A, *et al.* Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, **145** (2): 372~ 380
- 3 Alber R, Sporns O, Weikert T, *et al.* Cholinesterase and peanut agglutinin being related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs. *Anat Embryol Berl*, 1994, **190** (5): 429~ 438
- 4 Arpagaus M, Kott M, Vatsis K P, *et al.* Structure of gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, 1990, **29** (1): 124~ 131
- 5 Lockridge O, Adkens S, La Da B N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem*, 1987, **262** (27): 12945~ 12952
- 6 李 松, 焦克芳. 人脑及人血清胆碱酯酶三维结构的计算机模拟研究. *生物化学与生物物理学报* (Li S, Jiao K F. *Acta Biochem Biophys Sin*), 1995, **27** (4): 423~ 429
- 7 Harel M, Sussman J L, Krejci E, *et al.* Conversion of Ache to Bche: modeling and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (22): 10827~ 10831
- 8 Shafferman A, Velan B, Ordentlich A, *et al.* Substrate inhibition of acetylcholinesterase identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *EMBO J*, 1992, **11** (10): 3561~ 3568
- 9 Loewenstein-Lichtenstein Y, Glick D, Gluzman N, *et al.* Overlapping drug interaction sites of human butyrylcholinesterase dissected by site-directed mutagenesis. *Molecular Pharmacology*, 1996, **50** (6): 1423~ 1431
- 10 Barak D, Kronman C, Ordentlich A, *et al.* Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J Biol Chem*, 1994, **269** (9): 6296~ 6305
- 11 Masson P, Froment M T, Bartels C F, *et al.* Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur J Biochem*, 1996, **235** (1~ 2): 36~ 48
- 12 Masson P, Lockridge O, Schopfer L M, *et al.* Role of aspartate 70 and tryptophan 82 in binding of succinylthiocholine to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 1997, **36** (8): 2266~ 2267
- 13 Masson P, Lockridge O, Bartels C F, *et al.* Importance of aspartate-70 in organophosphate inhibition oxime reactivation and aging of human butyrylcholinesterase. *Biochem J*, 1997, **325** (Pt1): 53~ 61
- 14 Masson P, Lockridge O, Bartels C F, *et al.* Aging of diisopropyl phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Biochem J*, 1997, **327** (Pt2): 601~ 607
- 15 Bhanumathy C D, Balasubramanian A S. Evidence for a Zn (2+) -binding site in human serum butyrylcholinesterase. *Biochem J*, 1996, **315** (Pt1): 127~ 131
- 16 Millard C B, Broomfield C A, Lockridge O. Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 1995, **34** (49): 15925~ 15933
- 17 Lockridge O, Millard C B, Broomfield C A, *et al.* A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 1997, **36** (4): 786~ 795
- 18 Millard C B, Lockridge O, Broomfield C A. Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase. *Biochemistry*, 1998, **37** (1): 237~ 247

**Progress in Structure of Human Butyrylcholinesterase.** WEI Wan-Li, SUN Man-Ji (*Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

**Abstract** Human butyrylcholinesterase (BChE, EC, 3.1.1.8) is capable of binding with organophosphate poisons and pesticides. Besides, it is able to catalyze the hydrolysis of many esters, peptides and amides. It is effective in prophylaxis or therapy of the intoxication of these compounds. Its structure study was made important progress by modeling and site-directed mutagenesis. It shed a light on the structure of peripheral anionic site of human BChE, and made the enzyme exhibiting organophosphorus acid anhydride hydrolase activity by amino acid substitution.

**Key words** butyrylcholinesterase, protein structure, site-directed mutagenesis

## 真菌诱导的植物几丁酶蛋白

于雪梅 郭顺星<sup>1)</sup>(中国医学科学院 药用植物研究所, 北京 100094)  
(中国协和医科大学)

**摘要** 几丁酶, 水解几丁质-真菌细胞壁的主要成分, 该酶广泛存在于微生物和动植物中. 近年来, 植物几丁酶在植物抗真菌感染过程中的作用和巨大的应用前景, 已引起了人们的广泛关注. 重点综述亲和组合、不亲和组合及内生菌根中真菌对植物几丁酶蛋白的诱导、几丁酶的组织细胞学定位及其抗真菌活性研究.

<sup>1)</sup> 通讯联系人. Tel: (010) 62899729; E-mail: shunxing.guo@bj.col.com.cn 收稿日期: 1998-12-16, 修回日期: 1999-05-19