

治疗关节炎的新靶点

——聚蛋白多糖酶 Aggrecanase 的研究进展

李静雅 叶其壮*

(中国科学院上海药物研究所国家新药筛选中心, 上海 200031)

摘要 聚蛋白多糖酶 (aggrecanase) 是新发现的降解软骨组织重要成分聚蛋白多糖 (aggrecan) 的金属蛋白酶, 是治疗关节炎的新靶点. Aggrecanase 的发现使得关节炎的治疗有望取得新的突破, 为从根本上治疗和预防关节炎提供了基础. 综述了 aggrecanase 从克隆到对其性质的研究, 阐明以该酶为靶点寻找抑制剂是治疗与预防关节炎的一条可能的途径.

关键词 聚蛋白多糖酶, 关节炎, 聚蛋白多糖, 基质金属蛋白酶, 酶抑制剂

学科分类号 Q71

关节炎一直是困扰人类健康的医学难题, 其发病率在老年人群中高达 60%. 目前临床上用于治疗关节炎的药物包括麻醉品镇痛剂、非甾体类抗炎药、糖皮质激素和慢作用的缓解症状药等, 它们的主要作用是针对病症的缓解^[1]. 据研究发现, 即使这些药物能够控制炎症与疼痛, 内在的软骨组织和骨组织仍在受到破坏, 所以近年来治疗关节炎的发展趋势是寻找降解软骨组织的蛋白酶的抑制剂, 保护基质完整, 从根本上治疗关节炎.

关节炎的发生主要是由于外在及内在的因素引起关节软骨组织内炎症细胞因子如 IL-1、TNF- α 等的释放, 促进其中蛋白酶的表达量上升, 过量的蛋白酶降解软骨重要成分聚蛋白多糖 (aggrecan) 和胶原 (collagen) 等, 最终导致关节病变及疼痛. 研究表明^[2], 在患有骨关节炎、风湿性关节炎病人的关节软骨组织中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 表达过量, 且降解活性显著升高, 导致软骨组织中 collagen 和 aggrecan 等的核心蛋白部分被过多降解, 破坏软骨组织“框架结构”, 使得关节不能维持正常的物理和生理功能. 近几年来, 以该类蛋白酶为靶点寻找抑制剂成为关节炎治疗的新途径, 并取得了很大的进展, 如 Roche 公司开发的针对 MMPs 的抑制剂 Ro32-3555 目前已经研究至临床 II 期^[3]. 但是 MMPs 的降解底物之间相互重叠而且酶与酶之间相互调控, 一种酶的抑制可能以另一种代偿的途径进行弥补; 另外由于 MMPs 的表达广谱性, 其抑制剂常具有较大的副作用.

研究表明^[4-8], 在发生炎症的关节软骨模型中 MMPs 抑制剂能有效抑制蛋白酶活性, 但不能完全抑制软骨的降解, 一种未知的降解因素有待发现. 1999 年 Tortorella 等^[9,10] 分别纯化并克隆到人类关节软骨中另一类降解软骨蛋白的金属蛋白酶: 聚蛋白多糖酶 (aggrecanase 1 和 aggrecanase 2). 正常牛鼻软骨组织经炎症细胞因子 IL-1 诱导表达 aggrecanase, 可引起软骨组织中 aggrecan 的降解; RNA 印迹结果显示在发生病变的关节炎组织中, aggrecanase 1 的表达量明显高于正常对照组; 最近还发现^[11] 在内皮细胞血管生成中也有一定水平的 aggrecanase 1 的表达, 表明 aggrecanase 1 可能参与肿瘤血管生成和转移的过程.

聚蛋白多糖酶 aggrecanase 在软骨组织中降解活性及位点的独特性, 使之成为治疗关节炎的新靶点. 以该酶为靶点寻找高效、高选择性、高生物利用的抑制剂可能会成为治疗关节炎的一条有效途径.

1 Aggrecan 与 Aggrecan 的降解

聚蛋白多糖 aggrecan 是关节软骨中的重要成分, 其重量占到软骨干重的 10% 左右^[12]. Aggrecan 由 250 ku 的核心蛋白 (core protein) 和粘附在核心蛋白上的葡糖胺聚糖 (也称粘多糖, glycosaminoglycan, GAG) 组成^[13]. 核心蛋白由三个球状区域 (G₁、G₂ 和 G₃) 组成, N 端的 G₁ 与

* 通讯联系人.

Tel: 021-50800598, E-mail: center@mail.shnc.ac.cn

收稿日期: 2000-12-21, 接受日期: 2001-01-20

基质中的水杨酸 (HA) 结合, C 端的 G₂、G₃ 区域之间是粘多糖结合的主要部位, 结合的粘多糖大分子表面带有数目众多的负电荷, 使得组织维持较高

的渗透压, 以保持整个软骨组织的框架结构, 使得关节软骨具有弹性并能够承受一定的压力. G₁ 与 G₂ 之间是蛋白酶降解的敏感区 (图 1).



Fig. 1 Structure of the aggrecan core protein
图 1 AGGRECAN 核心蛋白的结构

目前发现降解 aggrecan 核心蛋白部分的酶主要有两类, 一类是 MMPs, 如 MMP-1、2、3、7、8、9、10 和 13, 它们对 aggrecan 的降解发生在 Asn³⁴¹ ~ Phe³⁴², 另一类即是 aggrecanase, 它们的作用位点是 Glu³⁷³ ~ Ala³⁷⁴, 至今发现作用后一位点的酶有两种 aggrecanase 1 和 aggrecanase 2. 最新文献报道^[14], aggrecanases-1 酶解核心蛋白还不仅仅局限在这唯一的位点, 而在一些硫酸软骨素集中的核心蛋白区域也有该酶的剪切点, 如: GEIE¹⁴⁸⁰ ~ ¹⁴⁸¹GRGT、KEEE¹⁶⁶⁷ ~ ¹⁶⁶⁸GLGS、TAQE¹⁷⁷¹ ~ ¹⁷⁷²AGEG 和 VSQE¹⁸⁷¹ ~ ¹⁸⁷²LGQR. Aggrecanase 1 的酶切总是发生在谷氨酸与另一个氨基酸之间, 这表明谷氨酸在降解活性中可能是必需的, 由此该酶可能是迄今发现的第一类谷氨酸蛋白内切酶, 但待进一步考察与证实.

2 Aggrecanase 的基因组成及同源性比较

Aggrecanase 1^[9] 的全长共有 2 511 个碱基对, 编码 837 个氨基酸. 它分别由 51 个氨基酸组成的信号肽、61 个氨基酸组成的前导肽、316 个氨基酸组成的催化区域, 以及 C 端的 Disintegrin-like 区和血小板反应素模体 (thrombospondin motif, TSP motif) 组成, 无跨膜区 (图 2). 前导肽的 Cys¹⁹⁴ 是一个很多金属蛋白酶共同拥有的半胱氨酸开关, 和一个潜在的 furin 切割位点, 它们的功能是调控酶未成熟之前以酶源形式存在; 催化区的 HEXXHXXGXXH 是 MMPs 和 ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase) 都相当保守的 Zn²⁺ 结合序列; Disintegrin-like 区虽在金属蛋白酶中相当保守, 但其功能尚不清楚; C 端的 TSP 区域是 aggrecanase 结合天然底物 aggrecan 核心蛋白上的粘多糖, 发挥蛋白酶降解天然底物活性所必需的, 该区的另一重要功能是将酶固定于胞外基质 (extracellular matrix, ECM). Aggrecanase 2 与

aggrecanase 1 有着很高的序列同源性, 也分别由信号肽、前导肽、催化区、Disintegrin-like 区和 TSP 模体组成, 无跨膜区.

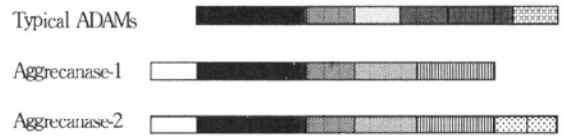


Fig.2 Sequences homology of aggrecanase-1, aggrecanase-2 and typical ADAMs

图 2 Aggrecanase-1、aggrecanase-2 与 ADAM family 的序列同源性比较

□: 信号肽; ■: 前肽; ▨: 催化区; □: 裂解区; ■: 富含半胱氨酸区; ■: 表皮生长因子重复区; ■: 跨膜区; ■: 胞质尾区; ■: 血小板反应素模体; ■: 间隙区; ■: 血小板反应素亚区.

从序列同源性分析^[15], aggrecanase 是 ADAMs 的家族成员, 该家族是一类与蛇毒金属蛋白 (snake venom metalloproteinase, SVMP) 相似的金属蛋白酶, 其成员如 fertilin、meltrin、TACE、MDC、MS2 及 Kuzbanian 等分别在细胞粘连、肌管蛋白形成、神经发生和炎症等生物过程中起重要作用. 经典的 ADAMs 家族成员由前导肽、催化区、Disintegrin-like 区、富含半胱氨酸区 (cysteine rich domain)、类内皮生长因子区 (EGF like domain) 及跨膜区和 C 端胞内区域组成. Aggrecanase 1 (ADAMTS-4) 和 aggrecanase 2 (ADAMTS-11) 与经典的 ADAMs 的家族成员之间基因结构上的区别在于信号肽和以 TSP 模体代替了富含半胱氨酸区、类内皮生长因子区、跨膜区和 C 端胞内区域. 所以 aggrecanase 在组织内以分泌的形式存在, 但通过 C 端的 TSP 区域固定与胞外基质, 而经典的 ADAMs 的家族成员都以跨膜的形式存在 (图 2). Aggrecanase 2 与 ADAMTS-1^[16] 有着更高的同源性, 但 ADAMTS-1 并不具备 aggrecanase 的降解活性.

3 Aggrecanase 的性质

重组表达的人源全长 aggrecanase 与从诱导的牛鼻软骨中提取的 aggrecanase 具有相似的活性与性质^[9,17], 都是 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 依赖型的, 能够被 EDTA 和 EGTA 抑制, 说明 aggrecanase 与 MMPs 相似, 属于金属蛋白酶一类, 但 MMPs 的特异抑制剂和体内抑制剂如 TIMP-1、TIMP-2 都不能有效抑制 aggrecanase, 表明 aggrecanase 是不同于 MMPs 家族的另一类金属蛋白酶。

Aggrecanase 1 在中性条件 pH 7.5、盐浓度为 100 mmol/L NaCl 时发挥最佳的降解天然底物 aggrecan 的酶活性。Aggrecanase 不能降解金属蛋白酶的其他天然底物如胶原 (collagen)、TSP、纤连蛋白 (fibronectin)、明胶 (gelatin) 和酪蛋白 (casein) 等^[13]。

4 Aggrecanase 活性的抑制

Aggrecanase 酶活性的抑制, 可以有效改善 aggrecan 的降解。筛选 aggrecanase 的抑制剂最直接的方法便是在体外 aggrecanase 活性的前提下, 采用天然底物 aggrecan, 被降解所新产生的特异游离 N 端 ARGS 和 C 端 TEGE, 通过特异抗体结合并放大信号显色 (蛋白质印迹) 和定量, 可以衡量化合物的抑制活性。但受该检测活性方法的限制, 目前不可能进行高通量的筛选工作, 所以建立一种简便而有效的检测该酶活性的方法迫在眉睫。采用结合荧光或紫外基团的特异多肽底物, 建立分子水平的高通量筛选模型, 是最理想的筛选方法, 但到目前为止仍没有成熟的检测方法和筛选模型问世。

Tortorella 等^[14]发现 aggrecanase 的 C 端 TSP motif 保守序列在降解天然底物 aggrecan 中发挥重要的作用。他们分别表达全长 (fAgg) 及切去 C 端 TSP 序列的 (tAgg) 酶, 采用抗 ARGS (BG-3 抗体) 和抗 TEGE 抗体, 经蛋白质印迹的方法鉴定前者具有降解 aggrecan 的活性, 而后者没有, 表明 C 端的 TSP 序列对酶的天然活性是不可缺少的。依据 TSP motif 中结合粘多糖 (GAG) 和 CD₃₆ 的序列设计合成的多肽片段 GGWGPWGPWGDCSRPCGGG 能够有效抑制全长 aggrecanase 结合并降解天然底物 aggrecan, IC_{50} 为 2 $\mu\text{mol/L}$; 预先经过去糖链处理的天然底物并不被全长 aggrecanase 所降解。其机理可能是基于多肽片段竞争结合了天然底物上的粘多糖, 从而抑制酶与底物的结合, 这表明 aggrecanase 的 C 端 TSP 序

列结合天然底物 aggrecan 上粘多糖是发挥降解活性的前提。这些实验结果也意味着 C 端 TSP 序列对寻找 aggrecanase 的活性抑制剂有相当的参考性价值。

Curtis 等^[18]发现 n-3 脂肪酸 (鱼油中提取的非饱和脂肪酸) 可以在基因转录水平上调节 aggrecanase 1 的 RNA 转录, 最终降低该酶的降解活性, 抑制活性与 n-3 脂肪酸的浓度呈线性关系; 而饱和脂肪酸则没有抑制活性。

另外 Bird 等^[19]发现 NO 能够抑制软骨组织中 aggrecan 的代谢, 可能在一定水平上调节 aggrecanase 1 活性, 缓解 aggrecan 的降解, 其机制不清楚。

综合现有的文献报道, aggrecanase 基因的发现为治疗关节炎提供了一个新的靶点。Aggrecanase 性质及结构的研究, 为高通量筛选的分子模型建立提供基础; 根据酶本身的结构, 其 C 端的 TSP 模体对于降解天然底物 aggrecan 有至关重要的作用, 类似于该片段的合成多肽就可能具有抑制 aggrecanase 酶活性的作用; 另外从基因转录、剪切及蛋白质翻译的水平上也可以对该酶的活性进行调节, 控制其在体内的活性。因为 aggrecanase 在体内分布表达的差异性和降解活性的独特性, 及其在破坏关节软骨中的必要作用, 使该酶成为继 MMPs 之后的治疗关节炎的新靶点, Aggrecanase 的抑制剂辅以 MMPs 的抑制剂的组合, 可能将成为治疗并预防关节炎的有效途径。

参 考 文 献

- 1 卫晓恩. 骨关节炎软骨基质蛋白聚糖研究进展. 国外医学: 创伤与外科基本问题分册, 1999, 20 (4): 193~196
Wei X E. Advance in cartilage aggrecan of osteoarthritis. Foreign Medical Science: Chuang Shang Yu Wai Ke Ji Ben Wen Ti Fen Ce, 1999, 20 (4): 193~196
- 2 Fosang A J, Last K, Maciewicz R A, et al. J. Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. J Clin Invest, 1996, 98 (10): 2292~2299
- 3 Abdel-Meguid S S, Helm Klaus von der, Korant Bruce D. Protease as Targets for Therapy. New York: Springer Press, 2000. 221~234
- 4 Loulakis P, Shrikhande A, Davis G, et al. N-terminal sequence of proteoglycan fragments isolated from medium of interleukin-1-treated articular cartilage cultures. Biochem J, 1992, 284: 589~593
- 5 Flannery C R, Lark M W, Sandy J D, et al. Identification of a stromelysin cleavage site within the interglobular domain of human aggrecan. J Biol Chem, 1992, 267: 1008~1014
- 6 Sandy J D, Flannery C R, Neame P J, et al. The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. J Clin Invest, 1992, 89: 1512~1516

- 7 Fosang A J, Neame P J, Last K, *et al.* The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 19470~ 19474
- 8 Fosang A F, Last K, Neame P J, *et al.* Neutrophil collagenase (MMP-8) cleaves at the aggrecanase site E373-A374 in the interglobular domain of cartilage aggrecan. *Biochem J*, 1994, **304**: 347~ 351
- 9 Tortorella M D, Burn T C, Pratta M A, *et al.* Purification and cloning of aggrecanase 1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*, 1999, **284**: 1664~ 1666
- 10 Abbaszade I, Lin R Q, Yang F, *et al.* Cloning and characterization of ADAMTS11, an aggrecanase from the ADAMTS family. *J Biol Chem*, 1999, **271** (33): 23443~ 23450
- 11 Kahn J A, Mehraban F, Ingle G, *et al.* Gene expression profiling in an *in vitro* model of angiogenesis. *J Pathol*, 2000, **156** (6): 1887~ 1900
- 12 Paulsson M, Morgelin M, Wiedemann H, *et al.* Extended and globular protein domains in cartilage proteoglycans. *Biochem J*, 1987, **245**: 763~ 772
- 13 Arner E C, Pratta M A, Treaskos J M, *et al.* Generation and characterization of aggrecanase. *J Biochem*, 1997, **272** (14): 9294~ 9299
- 14 Tortorella M D, Pratta M A, Lin R Q, *et al.* Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4). *J Biol Chem*, 2000, **275** (24): 18566~ 18573
- 15 Black R A, White J M. ADAMs: Focus on the protease domain. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, **10**: 654~ 659
- 16 Kuno K, Matsushima K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin Type 1 motifs and its spacing region. *J Biol Chem*, 1998, **273** (22): 13912~ 13917
- 17 Little C B, Flannery C R, Hughes C E, *et al.* Aggrecanase versus matrix metalloproteinases in the catabolism of the interglobular domain of aggrecan *in vitro*. *Biochem J*, 1999, **344**: 61~ 68
- 18 Curtis C L, Hughes C E, Flannery C R, *et al.* n -3 fatty acids specifically modulate catabolic factors involved in articular cartilage degradation. *J Biol Chem*, 2000, **275** (2): 721~ 724
- 19 Bird J L, May S, Bayliss M T, *et al.* Nitric oxide inhibits aggrecan degradation in explant cultures of equine articular cartilage. *Equine Vet J*, 2000, **2** (2): 133~ 139

A New Target for Arthritis Therapy: Advance in the Study of Aggrecanase

LI Jing-Ya, YE Qi-Zhuang*

(Shanghai Institute of Medical Metabolism, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Aggrecan degradation is an important factor in the erosion of articular cartilage in arthritis. Aggrecanase is a newly cloned enzyme which degrades the core protein of aggrecan between the Glu³⁷³ and Ala³⁷⁴, a site different from the matrix metalloproteinases cleavage site, Asn³⁴¹~ Phe³⁴². The discovery of aggrecanase and searching for its inhibitors will accelerate the development of therapeutic agents for arthritis.

Key words aggrecanase, arthritis, aggrecanase, matrix metalloproteinases, enzyme inhibitor

* Corresponding author. Tel: 86-21-50800598, E-mail: center@mail.shenc.ac.cn

Received: December 21, 2000 Accepted: January 20, 2001