

纤维蛋白对尿激酶原激活纤溶酶原反应动力学的影响

党昕 杨晶鑫 茹强 袁洪生 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 反应体系中存在的纤维蛋白 (fibrin) 对尿激酶 (UK)、scuPA 以及组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 激活纤溶酶原 (plasminogen) 的反应有不同的作用: UK、t-PA 激活 plasminogen 的反应可被反应体系中存在的 fibrin 所加强; fibrin 对 scuPA 激活 plasminogen 反应的动力学常数无明显影响; 但对小分子质量 scuPA 与单链抗体的嵌合分子激活 plasminogen 的反应起明显的抑制作用. 为确定反应体系中存在的 fibrin 对 scuPA 的 K 区插入突变体 InB 激活 plasminogen 反应的影响, 测定了在反应体系中存在 fibrin 的情况下的 InB 激活 plasminogen 反应的 K_m^{fibrin} 以及 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$. $K_m^{\text{fibrin}} = 4.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 远远大于无 fibrin 时的 $K_m = 0.379 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明有 fibrin 存在时突变体 InB 与天然底物 plasminogen 的亲合性降低了. $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}} = 0.107 \text{ s}^{-1}$, 也远远大于无 fibrin 时 $k_{\text{cat}} = 0.0165 \text{ s}^{-1}$, 说明有 fibrin 存在时突变体 InB 对 plasminogen 的反应活性增强了. 原因可能是: 与 fibrin 结合的 plasminogen 的构象发生了有利于被纤溶酶原激活剂水解的变化.

关键词 纤维蛋白, 纤溶酶原, 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂突变体, 动力学

学科分类号 Q556⁺·9

反应体系中存在的纤维蛋白 (fibrin) 对不同纤溶酶原激活剂 (PA) 激活纤溶酶原 (plasminogen, plg) 的反应有不同的影响. 尿激酶 (UK)、组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 激活 plasminogen 的反应可被 fibrin 所加强^[1~6]; 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (scuPA) 对 fibrin 的存在不敏感^[7], 小分子质量 scuPA (32KscuPA) 与单链抗体的嵌合分子的溶栓活性可被 fibrin 强烈抑制^[7]; 但是纤溶酶 (plasmin) 的 A 链与 UK 或 t-PA 的 B 链组成的嵌合分子对 plasminogen 激活反应的 K_m 值在有 fibrin 的情况下将大大降低. Takada 等^[2]认为 fibrin 的存在提高了 UK 激活 plasminogen 反应的 k_{cat} 值, 但不影响 K_m 值与 Watahiki 等^[3]的结果相同; fibrin 对 t-PA 的影响则主要集中在 K_m 值上, 在有 fibrin 的情况下 t-PA 水解 plasminogen 反应的 K_m 值降低, 虽然 k_{cat} 值有一定升高, 但不显著^[6]; fibrin 对 plasmin 的 A 链与 t-PA、t-PA 的嵌合分子的影响也是降低了反应的 K_m 值^[8]. 而在我们的实验中发现, fibrin 对我们构建的 scuPA 的 K 区插入突变体 InB 激活 plasminogen 反应的影响为抑制作用^[9]. 为详细了解反应体系中存在的 fibrin 对 InB 激活 plasminogen 反应的影响, 我们测定了在有 fibrin 的情况下 InB

激活 plasminogen 反应的 K_m^{fibrin} , $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$ 值.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 突变体的构建: 尿激酶型纤溶酶原激活剂的 K 区插入突变体 InB 的构建参照我们实验室孙迎庆的方法^[10], 将 PRGDWR 序列插入 scuPA 的 kringle 区的 118 位 Gly 与 119 位 Leu 之间, 获得的突变体 PRGDWR-scuPA 的基因由甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 表达纯化得到.

1.1.2 试剂: S-2251 购自 Chromogenix-Instrumentation Laborator Spa (Italy), Plasmin (5.7 IU/mg)、Plasminogen 与 fibrin 购自 Sigma 公司. 所有试剂均以 TBST ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris·HCl, $0.038 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.01% Tween 80, pH 7.4) 溶解与稀释.

1.1.3 仪器: 酶标仪为 TECAN Rainbow Reader (Austria).

1.2 方法

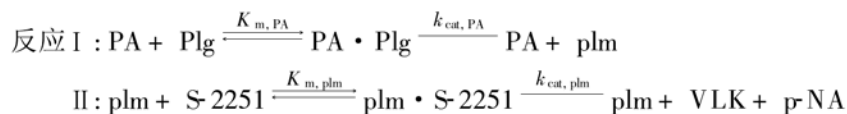
1.2.1 InB 激活纤溶酶原的动力学常数测定: 参

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2000-05-08, 接受日期: 2000-06-09

照我们建立的方法^[11]联合进行.



作 $A_{405} \sim t$ 图, 对原始数据进行多项式回归分析, 所得二次项系数为 A , 则 $v_{\text{plm}} = 2A/a$ (a 为 plasmin 水解 S-2251 反应的标准曲线经二次作图得到的系数). 作 $v_{\text{plm}} \sim [\text{plg}]$ 的双倒数图, 可得 K_m . 由 $v_{\text{plm}} \sim [\text{plg}]$ 、 K_m 可得 V_m , 作 $V_m \sim [\text{InB}]$ 图, 可得 k_{cat} . 测定 K_m 值时 $[\text{plg}]$ 的变化范围为: 2、1.5、1、0.5、0.1、0.075、0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 测定 k_{cat} 值时 $[\text{InB}]$ 的变化范围为: 42.7、28.47、21.35、17.08、14.23、12.2 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$.

1.2.2 有纤维蛋白时, InB 激活纤溶酶原的动力学常数测定: 方法同 1.2.1, 区别在于反应体系中加入了终浓度为 1 g/L 的 fibrin 悬浊液. 称取 5 mg fibrin, 加入 5 ml TBST, 超声破碎 (600 W, 每个循环超声破碎 10 s, 间隔 10 s, 进行 200 次循环), 悬浊液经超速离心: 12 000 g, 5 min, 取上清, 测 280 nm 的光吸收, 据 $E_{280}^{1\%} = 15.0$ 计算蛋白质浓度, 以 TBST 稀释至 4 g/L. 在 90 μl 体系中加入 22.5 μl fibrin 悬液. 在 K_m^{fibrin} 的测定中 $[\text{plg}]$ 的变化范围为 1.03、0.827、0.62、0.413、0.206、0.103 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $[\text{InB}]$ 为 15 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{S-2251}]$ 为 1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 测定不同浓度 $[\text{plg}]$ 在不同时间的 405 nm 光吸收 A_{405} , 作 $A_{405} \sim t$ 图, 对原始数据进行多项式回归后得到二次项系数 A , 根据 $v_{\text{plm}} = 2A/a$ 求得 v_{plm} , 作 v_{plm} 对 $[\text{plg}]$ 的双倒数图, 对图中各点进行线性回归, 得到回归方程后, 以该方程的斜率除以截距, 所得的商为 K_m^{fibrin} .

进行 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$ 的测定时, $[\text{plg}]$ 固定为 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{InB}]$ 的变化范围为: 32.2、26.8、21.44、16.12、10.75、5.375 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. 由 $A_{405} \sim t$ 图求出 v_{plm} , 根据 K_m^{fibrin} 、 $[\text{plg}]$ 与 v_{plm} 的值, 由米氏公式计算出 V_m , 作 $V_m \sim [\text{InB}]$ 图, 对数据进行线性回归后得到线性回归方程, 该方程的斜率为 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$.

2 结 果

2.1 对纤溶酶原的反应动力学常数测定

依据本实验室所建立的方法^[11], 先求出各个联合反应的二项式系数 A , 再根据 $v_{\text{plg}} = 2A/a$ 求出 v_{plg} , 求出 K_m . 在 K_m 的测定中 $[\text{plg}]$ 的变化范围

为 2、1.5、1、0.5、0.1、0.075、0.05 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. $K_m = 0.397 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 在 k_{cat} 的测定过程中 $[\text{plg}]$ 固定为 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[\text{InB}]$ 的变化范围为 42.7、28.47、21.35、17.08、14.23、12.2 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验测得 $k_{\text{cat}} = 0.0164 \text{ s}^{-1}$ ^[12].

2.2 有纤维蛋白时, InB 激活纤溶酶原的动力学常数测定

图 1 为测定 K_m^{fibrin} 时, 在不同浓度的 $[\text{plg}]$ 和不同时间测得的 A_{405} 值. 对图 1 进行数学分析后得到 v_{plg} (表 1). 作 $1/v_{\text{plg}} \sim 1/[\text{plg}]$ 图 (图 2), 以回归方程的斜率除以截距可得到 $K_m^{\text{fibrin}} = 4.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

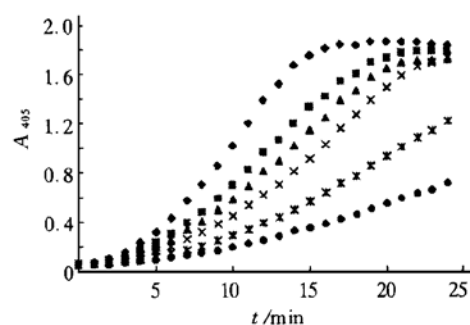


Fig. 1 Values of A_{405} measured at different time at different concentration of plasminogen

The curves counted from the top to the bottom stand for different $[\text{plg}]$ (1.03, 0.827, 0.62, 0.413, 0.206, 0.103 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively).

Table 1 Values of v_{plm} at different concentration of plasminogen

$[\text{plg}] / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.03	0.827	0.62	0.413	0.206	0.103
$V_{\text{plm}} / 10^{-3} \text{ A} \cdot \text{min}^{-1}$	6.3	5.4	4.5	2.9	1.6	0.9

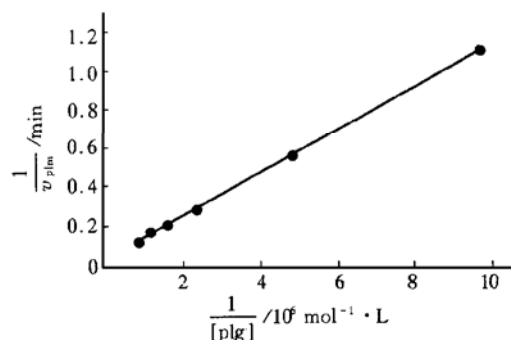


Fig. 2 Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus $[\text{plg}]$

The formula of the regression line is $y = 0.1112x + 0.0265$ ($R^2 = 0.9994$), $K_m^{\text{fibrin}} = 4.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

测定有 fibrin 存在时的 plasminogen 激活反应的 K_m^{fibrin} 时, 测得的不同浓度 $[\text{InB}]$ 在不同时间的 A_{405} 值见图 3. 由图 3 经数学分析, 得到 v_{plg} , 进而得到 $V_{\text{m, plg}}$, 数据见表 2. 根据表 2 作 $V_{\text{m, plg}} - [\text{InB}]$ 图 (图 4). 得到 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}} = 0.107 \text{ s}^{-1}$.

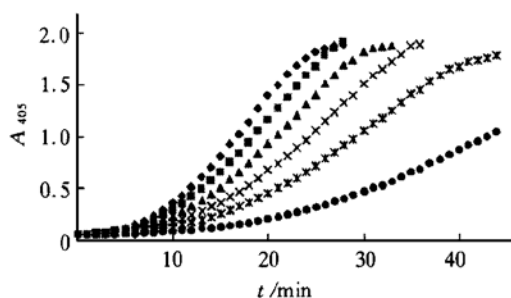


Fig.3 Values of A_{405} measured at different time at different concentration of $[\text{InB}]$

The curves counted from the top to the bottom stand for different $[\text{InB}]$ (42.7, 28.47, 21.35, 17.08, 14.23, 12.2 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively).

Table 2 Values of $V_{\text{m, plg}}$ at different concentration of InB

$[\text{InB}] / 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	42.7	28.47	21.35	17.08	14.23	12.2
$v_{\text{plg}} / 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	3.73	3.14	2.55	1.86	1.27	0.686
$V_{\text{m, plg}} / 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	35.03	29.49	23.01	17.47	11.93	6.44

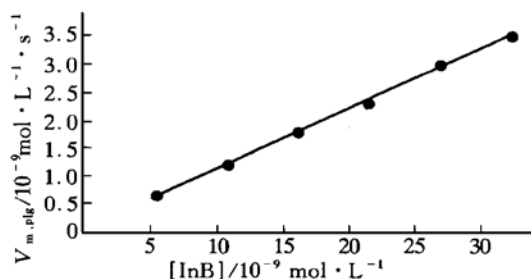


Fig.4 Plot of $V_{\text{m, plg}}$ versus $[\text{InB}]$

The slope of the regression line is $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}} = 0.107 \text{ s}^{-1}$.

3 讨 论

实验测得的反应体系中不存在与存在 fibrin 两种情况下的动力学常数见表 3.

Table 3 Kinetic constant (with fibrin or with out fibrin)

Kinetic constant	$K_m / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$k_{\text{cat}} / \text{s}^{-1}$
without fibrin	0.379	0.0165
with fibrin	4.2	0.107

由表 3 可看出: fibrin 的存在使 plasminogen 激活反应的 K_m 值增加 10 倍以上, 说明 fibrin 的存

在极大地降低了 InB 对底物-plasminogen 的亲活性. 而 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$ 值的明显升高 (比反应体系中无 fibrin 时的 k_{cat} 升高近 6.5 倍), 说明反应活性得到了加强. 但总体的催化活性 k_{cat} / K_m 值由无 fibrin 时的 $4.4 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 变化为有 fibrin 时的 $2.5 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 催化活性被抑制了 41.5%. 抑制的原因可能为: plasminogen 具有 fibrin (ogen) 的结合活性 (plasminogen 的 K5 区与 fibrin 的 D 区相互作用, 结果为一分子 fibrin 结合两分子的 plasminogen^[12]), 而 scurPA 也具有 fibrin (ogen) 的结合活性^[13], 作为 scurPA 的突变体 InB 仅在 scurPA 的 K 区插入了 6 个氨基酸 (PRGDWR), 所以有理由推论 InB 也能与 fibrin (ogen) 结合, 而这种结合活性妨碍了 InB 与 plasminogen 的结合, 降低了 InB 与 plasminogen 的亲活性, 最终导致 K_m^{fibrin} 值的升高. 在我们的其他实验中发现, 在 fibrin 悬浊液浓度为 1.5 g/L 时 InB 的 plasminogen 激活活性被抑制 53.7%^[9], 这个结果与本实验的结果相对照可以发现: fibrin 对 InB 激活 plasminogen 反应的抑制作用是剂量依赖性的. 按照我们的推论, 反应体系中存在的 fibrin 越多, 与 fibrin 结合的 plasminogen、 InB 也越多, InB 的催化活性被抑制的也越多.

对 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$ 值的升高, 有一种假说认为: plasminogen 与 fibrin 结合后构象发生了有利于 plasminogen 向 plasmin 转化的变化^[11], 这种变化使 plasminogen 更易被 scurPA 水解, 表现为 $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}}$ 值的升高, 反应活性增强. 但从总体上看: k_{cat} 的升高幅度较 K_m 的升高幅度要小, 所以最终的结果是催化活性的下降.

我们的结果间接证明了我们构建的突变体- InB 具有 fibrin 的结合活性, 所以可能具有导向溶栓的功能. 作为一种双功能突变体^[9], InB 有极大的研究以及开发价值.

致谢 感谢肖传英、杜莉芬老师的热情帮助.

参 考 文 献

- Lucas M A, Straight D L, Fretto L J, *et al.* The effects of fibrinogen and its cleavage products on the kinetics of plasminogen activation by urokinase and subsequent plasmin activity. *J Biol Chem*, 1983, **258** (20): 12171~ 12177
- Takada A, Sugawara Y, Takada Y. Enhancement of the activation of Glu-plasminogen by urokinase in the simultaneous presence of tranexamic acid or fibrin. *Haemostasis*, 1989, **19** (1): 26~ 31

- 3 Watahiki Y, Takada Y, Takada A. Kinetic analyses of the activation of Glu-plasminogen by urokinase in the presence of fibrin, fibrinogen or its degradation products. *Thromb Res*, 1987, **46** (1): 9~ 18
- 4 Takada A, Takada Y, Sugawara Y. Effects of fibrinogen and fibrin on the activation of Glu-plasminogen by urokinase. *Thromb Res*, 1984, **33** (6): 561~ 569
- 5 Maizel A S, Bookstein J J. Streptokinase, urokinase, and tissue plasminogen activator: pharmacokinetics, relative advantages, and methods for maximizing rates and consistency of lysis. *Cardiovasc*, 1986, **9** (5~ 6): 236~ 244
- 6 Zamarron C, Lijnen H R, Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by natural and recombinant tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1984, **259** (4): 2080~ 2083
- 7 Holvoet P, Laroche Y, Lijnen H R, *et al.* Biochemical characterization of single-chain chimeric plasminogen activators consisting of a single-chain Fv fragment of a fibrin-specific antibody and single-chain urokinase. *Eur J Biochem*, 1992, **210** (3): 945 ~ 952
- 8 Fears R, Dodd I, Ferres H, *et al.* Kinetic studies on novel plasminogen activator. Demonstration of fibrin enhancement for hybrid enzymes comprising the A-chain of plasmin (Lys 78) and B-chain of tissue-type plasminogen activator (Ile 276) or urokinase (Ile 159). *Biochem J*, 1990, **266** (3): 693~ 696
- 9 党 昕, 杨晶鑫, 茹 强, 等. PRGDWR-单链尿激酶型纤溶酶原激活剂双功能嵌合分子的性质研究. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (2): 203~ 209
Dang X, Yang J X, Ru Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (2): 203~ 209
- 10 孙迎庆, 郭 雁, 李令媛, 等. RGDS-尿激酶原嵌合体的构建与表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (2): 189~ 193
Sun Y Q, Guo Y, Li L Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (2): 189~ 193
- 11 党 昕, 茹 强, 杨晶鑫, 等. 一种新的纤溶酶原激活反应动力学研究方法. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (1): 84 ~ 86
Dang X, Ru Q, Yang J X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (1): 84~ 86
- 12 党 昕, 茹 强, 杨晶鑫, 等. 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 Kringle 区功能的探讨. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (1): 89~ 95
Dang X, Ru Q, Yang J X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (1): 89~ 95
- 13 Liu J N, Pannell R, Gurewich V. A transitional state of pro-urokinase that has a higher catalytic efficiency against glu-plasminogen than urokinase. *J Biol Chem*, 1992, **267** (22): 15289~ 15292

The Influence of Fibrin on the Reaction of Plasminogen Activation by Mutant of Pro-Urokinase

DANG Xin, YANG Jing-Xin, RU Qiang, YUAN Hong-Sheng, RU Bing-Gen*

(College of Life Sciences, Peking University, National Laboratory of Protein Engineering, Beijing 100871, China)

Abstract Because the influence of fibrin on the reaction of plasminogen activation by various plasminogen activators is different, the kinetic constant of the reaction of plasminogen activation catalyzed by InB with and without fibrin were detected. The result is: $K_m^{\text{fibrin}} = 4.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, greater than the normal $K_m = 0.379 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $k_{\text{cat}}^{\text{fibrin}} = 0.107 \text{ s}^{-1}$, greater than the normal $k_{\text{cat}} = 0.0165 \text{ s}^{-1}$. The results suggest that existence of fibrin in the reaction system of plasminogen activation depress the affinity between InB and plasminogen, but accelerates the hydrolysis of plasminogen by InB. The count up effect is inhibition.

Key words fibrin, plasminogen, mutant of single-chain urokinase-type plasminogen activator, kinetics

* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

Received: May 8, 2000 Accepted: June 9, 2000