

尿激酶型纤溶酶原激活剂的研究

胡金勇 曾 英 桑玉英 王 东

(中国科学院昆明植物研究所植物生物技术室 昆明 650204)

尿激酶型纤溶酶原激活剂 u-PA(urokinase-type plasminogen activator)属于丝氨酸蛋白酶类,能激活细胞外基质中丰富的纤溶酶原生成纤溶酶,从而催化细胞外基质降解,对纤溶和癌细胞侵染及扩散等一系列生理和病理过程中发生的胞外蛋白水解起重要调节作用。

人 u-PA 基因位于第 10 号染色体之上,表达产生一个约 54kD 的单链糖基化多肽——尿激酶原。尿激酶原经纤溶酶在其 158 位赖氨酸和 159 位缬氨酸之间水解成为有活性的双链 u-PA 分子^[1]。在缺少纤溶酶的情况下细胞表面的 u-PA 大部分以单链形式存在,纤溶酶的存在使尿激酶原变为双链分子,而双链 u-PA 又可催化纤溶酶的形成^[2]。研究表明,单链 u-PA 对于其天然或合成底物没有或只有很少蛋白水解活性^[1],但在大肠杆菌中表达的重组单链 u-PA 的催化活性甚至优于双链 u-PA^[1,2,3]。单链和双链 u-PA 均可通过氨基端以相同的亲和力与 u-PA 受体 u-PAR 结合^[4]。

u-PA 受四类纤溶酶原激活剂抑制剂 (PAIs) 抑制,其中,PAI-1 来源于内皮细胞,PAI-2 来源于胎盘细胞或巨噬细胞,PAI-3(或蛋白 C 的抑制剂)来源于尿,而第四种 PAI 来源于蛋白酶-连接蛋白家族 (PN-1、PN-2)^[6]。近年来,通过重组手段已得到重组 PAI-2 分子^[7,8]。还证明 u-PA 的单克隆抗体是 u-PA 的有效抑制因子^[5]。此外,已研制出 u-PA 的人工合成抑制物如氨基吡咯密啶 (amiloride) 和 4-苯塞酚-2-羧基脒类 (4-benzo [b] thiophene-2-carboxamidines)(如 B428、B623)^[9]等。本文主要介绍 u-PA 变体及 u-PA 活性调控的研究进展。

一、u-PA 生理活性

u-PA 可由许多类型的细胞和细胞系合成,在一系列生理和病理过程中担负重要调节功能,如:炎症细胞的迁移,创伤的治疗和重塑,滋养层细胞的生长,子宫基膜的扩展,卵受精,血管内血凝块的溶解和血管外水肿的降解,器官退化,癌细胞的侵染和扩散等^[1,5]。近几年有关 u-PA 生理活性的研究主要集中在与溶栓和癌症相关的两个方面。研究表明,大多与上皮有关的癌细胞能产生 u-PA 并把它运输到细胞表面,与受体 u-PAR 结合激活纤溶酶原成为纤溶酶,从而引发一系列的蛋白水解反应,造成癌细胞的侵染和扩散^[5]。因此,u-PA 对癌症的临床预后和抗癌转移的研究有重要意义。

u-PA 参与神经系统的发育和分化。正在分化的大鼠和小鼠星形胶质细胞培养物中有纤溶酶原激活剂活性的存在;在小脑细胞的生长和外周神经系统的形成过程中也检测到纤溶酶原激活剂的活性^[6]。

u-PA 还参与信号传导过程^[10-12]。u-PA 与糖基磷脂酰肌醇 GPI 锚定受体 u-PAR 结合,传递胞外信号。如果 u-PA 活性对于信号传导是必需的,那么,TGF- β 等生长因子可能参与完成信号传导;否则,胞外信号通过 u-PA/u-PAR 的相互作用而传导,且这种传导机制依靠胞外磷酸化。

u-PA、u-PAR、组织型纤溶酶原激活剂 t-PA、PAI-1 和 PAI-2 等组成的 PA 系统在生殖系统的发育和分化过程中具有重要作用^[11]。u-PA 在早期黄体组织中明显增高,它与 PAI-1 等的协同表达可能与黄体生成过程中的组织重建和血管发生相关。小鼠和人的精子可以结合

u-PA,这可能与受精过程相关。在大鼠和人的胚泡着床点发现 u-PA 等的活性;人子宫内膜、胎盘细胞和胎膜等也有 u-PA 等,说明 u-PA 在胚胎植入和早期蜕膜化、子宫内膜的周期性变化等过程中有重要的作用。但 u-PA 系统在体内的协调过程目前还不清楚。

另外,研究还证实双链 u-PA 可以促进细胞有丝分裂。这就为把 u-PA 作为治疗侵袭性(invasive)和增生性(proliferative)癌症的靶点提供了理论基础^[13]。

二、u-PA 变体(variants)研究

如前所述,u-PA 在纤溶系统中有重要作用。u-PA 作为溶栓剂早已在临床使用^[14]。双链尿激酶是最早进入临床的溶栓药物,它对纤维蛋白没有选择性,大量使用会造成血液中纤维蛋白原降解而引发出血,产生系统性溶栓副作用^[2,14]。另外,由于 u-PA 的大量加入,是否会引起各种癌变仍不清楚,需要作大量研究。而理想的溶栓剂应当专一性地激活血栓上的纤溶酶原(而不作用于循环中的凝血系统成分)、仅把在凝血后出现于活化血小板和纤维蛋白原

上的结构(这些结构在静息血小板和纤维蛋白原上并不存在)作为溶栓剂识别位点^[2]。单链尿激酶原具有一定的内在激活纤溶酶原活性,同时可以选择性地在纤维蛋白的表面活化纤溶酶原而选择性地降解血栓凝块^[2,3,14],因此目前的大部分变构工作集中在尿激酶原上。利用免疫亲和层析法已经成功地在实验室完成了单链尿激酶的大量制备和纯化^[15]。有人将尿激酶原基因导入家兔剥落内膜后的髂动脉血管内,可以防止新生内膜的增生^[16]。将去整合素分子的特异功能序列精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸(RGDS)导入尿激酶原基因,获得了既有溶栓作用又有较强抑制血小板聚集活性的双功能分子^[17,18]。研究表明双链 u-PA A 链 Lys151 和 Arg154 残基为导致双链尿激酶低纤维蛋白选择性的结构基础^[14];而尿激酶原的上皮生长因子区(E 区)与受体介导的 u-PA 的清除有关,C 端的 P 区为蛋白酶功能催化区,其中 His204, Asp255 和 Ser356 构成活性中心,Asn302 连一个糖基^[3];同时 u-PA 的糖基化与它的寿命和纤溶活性有关^[3]。迄今研究的 u-PA 变体的主要类型见表 1。

表 1 u-PA 变体类型

变体类型	变体依据	实 例	参考文献
延长半衰期	E区与u-PAR介导的u-PA清除有关,糖基在u-PA的清除中起识别作用	缺失E区、去除糖基均可明显延长半衰期	3
提高纤维蛋白特异性	149-158片段中的正电荷氨基酸对纤维蛋白亲合性有明显影响,Lys151和Lys154为双链分子低纤维蛋白选择性的基础;糖基与纤维蛋白特异性有关;t-PA K ₂ 区含有纤维蛋白结合位点;血栓和血小板特异性抗体的靶向作用	缺失150-156位残基的u-PA具有较高纤维蛋白亲合性;t-PA 1-3和176-275位氨基酸与尿激酶原159-411位氨基酸嵌合体有较高纤维蛋白亲合性;重组血小板单抗与尿激酶原形成的抗体导向型溶栓剂有明显特异性溶栓活性	2,3,14,19,20
提高纤溶活性	糖基影响尿激酶原活性;P区297-313为易变区,在尿激酶原内在催化活性中有重要作用	去除糖基的尿激酶原活性高于天然尿激酶原2倍;突变P区297-313片段中的Lys300变成His,溶栓活性增强	2,3
双功能分子	纤溶作用和抗血小板聚集或抗凝血酶活性结合可溶栓并防止或减少再栓塞	构建的RGDS尿激酶原分子既有溶栓作用又能较强地抑制血小板聚集	17,18

三、u-PA 活性调控

生理条件下 u-PA 活性调控主要由四类 PAIs 来完成。人工合成的抑制剂如氨基吡咯嘧啶、4-苯塞酚-2-羧基脒类(4-benzo[b]thiophene-2-carboxamidines)(如 B428、B623)^[9] 等对 u-PA 活性有明显抑制。另外,人工合成源于 u-PA 的环肽 cyclo^{19,31}uPA₁₉₋₃₁ 可以阻断 u-PA 和 u-PAR 的反应^[21]。

1. PAI-1 和 PAI-2

(1)PAI-1 PAI-1 主要来源于血液系统的血小板和血浆^[22],属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族,通过“自杀”途径或“底物”途径,与 u-PA 形成一种稳定的复合物来抑制 u-PA 的活性。

为达到 u-PA 溶栓和抗血栓的目的,人们试图不直接调节 u-PA 的活性而是从抑制 PAI-1 的角度着手^[23]。本所的几个研究小组已经从植物中初步筛选到几种天然化合物能够较好地抑制 PAI-1 的活性。

(2)PAI-2 PAI-2 是 u-PA 的专一性抑制剂,其半衰期很短。多种细胞或细胞系可以合成 PAI-2^[10],利用重组技术还得到了重组 PAI-2 分子^[7,8]。但 PAI-2 只有在较高浓度下(46 nmol/L)才能有效地抑制 u-PA 的活性,而生理状态下 PAI-2 在血液中的浓度低于 5 pmol/L^[24]。研究认为,PAI-2 可能通过与 PAI-1 类似的途径来完成对 u-PA 的抑制^[25]:无论是分泌型还是重组型的 PAI-2 都能通过形成一种抗 SDS 的复合物来抑制 u-PA^[4,7,8,10,26];利用圆二色谱进行分析发现 PAI-2 比 PAI-1 具有与卵清蛋白更相似的 CD-光谱^[10];PAI-2 环状活性结构(reactive site loop, RSL)插入 u-PA 的 β -片层 A 对 PAI-2 的 u-PA 抑制活性来说是至关重要的^[27];对 PAI-2 晶体结构的研究结果也为此提供了证据^[28]。但是,PAI-2 的详细作用机理及其生理功能仍需继续研究。

2. 其他影响 u-PA 活性的因素

u-PA 活性除了受纤溶酶、u-PAR、PAIs 等的调节外,还受生长因子、GAGs(黏多糖)和脂

蛋白等因素影响。

(1)生长因子 大鼠表皮培养细胞可以分泌 t-PA 和 u-PA,而且受 hCG(100 ng/mL)和 GnRH(1×10^{-6} mol/L)的调控^[29];GnRH 可以抑制 u-PA 的活性及分泌,而 hCG 则可以明显提高纤溶酶原激活剂的活性分泌;转化生长因子(TGF- α)可增强 PAI-1 和 u-PA 的产生,从而同时增强酶和酶抑制剂的活性^[5];肾上腺素-血管紧张素系统可以调节 PAI-1 的表达,从而影响 u-PA 的活性^[23];LH, Δ 4-雄烯二酮等也可以调节 u-PA 的活性^[29]。

另外,成纤维细胞生长因子 FGF-2 能诱导 u-PA 表达,而成纤维细胞生长因子受体 FGFR-1 中不同酪氨酸残基的自我磷酸化可调节这一诱导过程,其中 Tyr463 或 Tyr730 的磷酸化对于诱导是不可缺少的^[30]。

(2)GAGs(黏多糖)和脂蛋白类 黏多糖肝素、硫酸肝素和 6-硫酸软骨素(chondroitin 6-sulphate)可以增强人纤溶酶对尿激酶原的激活,这可能是通过与尿激酶的催化中心的相互作用来实现的。脂蛋白、脂蛋白 A 和低密度脂蛋白(LDL)可以抑制肝素和硫酸肝素对于纤溶酶形成的激活增强作用。在体内,这些黏多糖和脂蛋白可能对于 u-PA 介导的纤溶酶形成具有重要调节作用^[31]。

(3)生理条件的改变 研究认为大部分与上皮细胞有关的肿瘤将会产生 u-PA,以满足癌细胞侵袭和扩散的需要^[5]。另外,u-PA 活性在早期黄体组织中明显增高^[11]。因而生理条件的变化将会引起 u-PA 及其相关分子的变化。

3. 源于植物的抑制剂

据报道,绿茶含有一种表没食子儿茶酚-3-没食子酸 EGCG(epigallo-cathechin-3 gallate)成分,能通过抑制 u-PA 的活性防止癌症^[32]。尽管 EGCG 的活性要比氨基吡咯嘧啶弱,但因其摄入量大而无副作用而仍具有很高的应用和开发价值。然而,也有人指出 EGCG 并不是通过影响 u-PA 来起作用的^[33]。

结 束 语

u-PA 在纤溶系统中具有重要作用。癌症的侵染和扩散,神经系统的发育,信号传导,生殖过程等过程都与 u-PA 密切相关。此外, u-PA 可促进有丝分裂。在体内, u-PA 的活性主要由四类 PAIs 调节,一些人工合成的抑制剂能有效地抑制 u-PA。从绿茶中发现的 EGCG 抑制 u-PA 的活性虽较弱但因其可大量摄入而无副作用仍具有很好的应用和开发价值。生理条件的改变以及一些生长因子等都会影响 u-PA 活性。因 u-PA 在纤溶系统中的重要作用, u-PA 作为溶栓药物的相关研究成为近几年的热点之一。单链尿激酶原具有纤溶活性和纤维蛋白专一性而成为 u-PA 变体研究的核心。目前有关 u-PA 变体研究内容分为延长半衰期、提高纤维蛋白特异性、提高纤溶活性和双功能分子的研究四个方面,其中,既有溶栓作用又有较强的抑制血小板聚集活性的双功能分子的研究是一个很有发展潜力的研究方向。此外,从蚯蚓中已筛选到一种 u-PA 类似分子^[34,35]。

综上所述,有关 u-PA 的研究已取得多方面进展,但仍存在一些问题。

首先,关于 u-PA 与抑制剂之间相互作用的机制仍不甚清楚,如 PAI-2 与 u-PA 作用的机理是否与 PAI-1 一致等。

第二, u-PA 在体内有重要功能,但诸种功能之间是如何协调的呢? 目前人们在考虑其溶栓作用时往往忽略与癌症相关的问题,而在研究与癌症相关的问题时却又容易忽视它在溶栓中的作用。因此,诸种功能之间协调的研究将会对克服临床应用 u-PA 的副作用有重要参考价值。另外, u-PA 诸种调节因子之间的协调研究也需加强。

第三,理想的 u-PA 抑制剂,应该在抑制 u-PA 的同时不能影响 t-PA 和纤溶酶的活性。目前,人工合成的抑制剂中除 4-取代苯塞酚-2-羧基脒类(如 B428、B623)^[9]符合这一要求外,其他如氨基吡咯啉(amiloride)等作为理想的抑

制剂仍需要结构改造。即使 u-PA 的天然抑制剂如 PAI-1 和 PAI-2 等,在抑制 u-PA 的同时也会强烈抑制 t-PA 的活性。

此外,由植物、真菌、藻类等生物资源中筛选抑制剂或 u-PA 类似分子的研究报道还很少,这将是值得探索的研究领域。

参 考 文 献

- [1] Blasi F., et al., 1987, *J. Cell Biol.*, **104**:801-804.
- [2] 杨嘉树, 茹炳根, 1998, 生物化学与生物物理进展, **25**:429-433.
- [3] 朱甫祥等, 1998, 科学通报, **43**:1805-1811.
- [4] Ellis V., et al., 1990, *J. Biol. Chem.*, **265**:9904-9908.
- [5] Evans D. M., and Sloan-Stakleff K. D., 1997, *DN&P.*, **10**:85-88.
- [6] Murphy P. G., et al., 1993, *Biochem. Cell Biol.*, **71**:248-254.
- [7] 田昱等, 1998, 中国生物化学与分子生物学报, **14**:258-263.
- [8] 田昱等, 1998, 中国生物化学与分子生物学报, **14**:536-541.
- [9] Towle M. J., et al., 1993, *Cancer Research.*, **53**:2553-2559.
- [10] Mikus P., et al., 1993, *Eur. J. Biochem.*, **218**:1071-1082.
- [11] 刘以训, 1999, 科学通报, **44**:242-252.
- [12] 周爱武等, 1996, 生物化学与生物物理进展, **23**(2):121-124.
- [13] Fischer K., et al., 1998, Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung: 42 Jahrestagung, Prämierte Abstracts, p068, Frankfurt am Main.
- [14] 彭贵洪等, 1997, 科学通报, **42**:972-976.
- [15] 高丽华等, 1999, 生物技术通报, **15**:43-45.
- [16] 朱甫祥等, 1998, 高技术通讯, 第四期:43-47.
- [17] 孙迎庆等, 1999, 中国生物化学与分子生物学报, **15**:189-193.
- [18] 钱斌等, 1999, 中国科学(C辑), **29**:125-131.
- [19] 马忠等, 1996, 中国科学(C辑), **26**:392-397.
- [20] 刘征辉等, 1998, 生物化学与生物物理学报, **30**:601-606.
- [21] Buergle, et al, 1997, *Biol. Chem.*, **378**(3-4):231-237.
- [22] Mei jer M., and Pannekoek H., 1995, *Fibrinolysis.*, **9**:263-276.
- [23] 陈历胜编译, 1998, 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, **19**:195-198.
- [24] Perides G., et al., 1996, *Biochem. Biophys. Res. Communi.*, **219**:690-695.
- [25] Kruithof E. K. O., et al., 1995, *Blood.*, **86**:4007-

- 4024.
- [26]Ragno P., et al., 1995, *Eur. J. Biochem.*, **233**: 514-519.
- [27]Saunders D. N., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**: 10965-10971.
- [28]Harrop S. J., et al., 1999, *Structure.*, **7**:43-54.
- [29]周红明等, 1997, *科学通报*, **42**:757-760.
- [30]Patrizia D. E., et al., 1999, *Mol. Biol. Cell.*, **10**(1): 23-33.
- [31]Edelberg J. M., et al., 1991, *Biochem. J.*, **276**: 785-791.
- [32]Jerzy J., et al., 1997, *Nature*, **387**:561.
- [33]Cao Y. H., and Cao R. H., 1999, *Nature*, **398**:381.
- [34]杨嘉树等, 1998, *中国生物化学与分子生物学学报*, **14**:156-163.
- [35]杨嘉树等, 1998, *中国生物化学与分子生物学学报*, **14**:164-169.

转录因子 NF- κ B/I κ B

向国胜 孙方臻

(中国科学院发育生物学研究所 北京 100080)

可与 κ appa 基因相结合的核因子 NF- κ B (nuclear factor- κ appa gene binding) 是研究得最为广泛的转录因子之一。该因子由 Baltimore 等人首先在 B 淋巴细胞发现^[1], 后来发现它广泛存在于其他类型细胞中。NF- κ B 具有如下特征: 对外界信号的刺激反应迅速, 控制广泛的基因表达, 在免疫及炎症反应中起中心作用以及在胚胎发育中充当信号分子。本文就 NF- κ B/I κ B α 的结构、调节和功能作一综述。

一、分类及结构

转录因子 NF- κ B 常以结构上相关的蛋白质家族成员组成的同源或异源二聚体的形式与其抑制蛋白 I κ B (inhibitor- κ binding) 结合存在于细胞质中。NF- κ B 的最显著特征是接受外界信号刺激后快速由细胞质向细胞核转移。NF- κ B 每个成员在 N 末端含有大约 300 氨基酸残基组成的保守的 Rel 同源域 (RHD)。Rel 同源域中存在 DNA 结合域、二聚化域以及核定位信号。迄今为止, 已证明在哺乳类细胞中有五种 NF- κ B 家族成员^[2-5], 它们是 RelA (p65)、C-Rel (Rel)、Rel B、NF- κ B1 (p50/p105) 和 NF- κ B2 (p52/p100)。在果蝇中, Relish、Dorsal、Dif (Dorsal-related immunity factor) 都是 NF- κ B 的同源物。

I κ B 家族蛋白在哺乳类细胞中发现有七种: I κ B α 、I κ B β 、I κ B γ 、I κ B ϵ 、Bcl-3、p100 和 p105。I κ B 蛋白 (包括果蝇 *Drosophila* I κ B 同源物 *Cactus*) 具备三个特征: 第一、含有保守的模体 (motif) —— 锚蛋白重复序列 (AR), AR 含 30-33 个氨基酸, 重复的数量从 3 到 7 个, 是连接 NF- κ B/Rel 蛋白所必需的^[6]; 第二、C 末端存在一个酸性域, 酸性域可能与 NF- κ B 的 DNA 结合域形成一种分子间的相互作用^[7]; 第三、富含 Pro、Glu/Asp、Ser 和 Thr 的 PEST 序列的存在, PEST 序列影响诱导的蛋白水解作用的速率^[8]。

I κ B 控制 NF- κ B 的激活和调节。通过非共价结合, I κ B 掩盖 NF- κ B 的核定位信号 (NLS) 而阻止 NF- κ B 的核转位。一旦受到信号分子 (如 TNF α 或 LPS) 的刺激, NF- κ B 就从 I κ B 中释放出来, 进入核中调节基因的转录。在 NF- κ B 诱导表达的靶基因的启动子或增强子区域, 存在一个顺式作用 κ B 位点^[4]。它们是由 10 个碱基组成的相同序列 5'-GGGPuNNPyPyCC-3' (Pu 表示 Purine, Py 表示 Pyrimidine)。NF- κ B 就是通过 RHD 中 DNA 结合域与靶基因的 κ B 位点结合来诱导这些相关基因的表达。由于 NF- κ B 的刺激和激活不需要蛋白质的合成, 所以靶基因能得到快速有效的转录。