

## $\alpha$ -巨球蛋白研究进展

# PROGRESS ON THE RESEARCH OF THE $\alpha$ -MACROGLOBULIN

梅承芳 马洪明 麦康森

(青岛海洋大学海水养殖教育部重点实验室 266003)

$\alpha$ -巨球蛋白家族 ( $\alpha$ -Macro-globulins, 简称  $\alpha$ M $\beta$ ) 是存在于多种动物血浆中的一类大分子糖蛋白, 人血清  $\alpha$ M $\beta$  位于电泳  $\alpha$  区带, 故称  $\alpha$ -巨球蛋白。作为广谱蛋白酶结合因子,  $\alpha$ M $\beta$  通过调节内源或外源性蛋白酶的活性广泛地参与多种生理功能。近年来, 有关  $\alpha$ M $\beta$  结构、功能、作用机理以及  $\alpha$ M $\beta$  与补体间的相互关系的研究报道日益增多。本文介绍了有关  $\alpha$ M $\beta$  的主要研究进展, 包括无脊椎动物体内  $\alpha$ M $\beta$  的研究情况, 以期研究无脊椎动物体内与  $\alpha$ M $\beta$  相关的抗病机制提供一点借鉴。

### 1 $\alpha$ M $\beta$ 的生理功能

$\alpha$ M $\beta$  作为一种广谱蛋白酶抑制剂, 不是通过封闭蛋白酶的活性位点来控制其水解活性, 而是利用空间上的结合将酶分子隔离起来使之不能作用于底物。其抑制机理不同于以蛋白酶分子上的某些位点 (活性位点或其它位点) 为作用靶位的抑制因子。 $\alpha$ M $\beta$  与蛋白酶结合形成复合物后, 构象改变, 可被有关细胞受体识别, 迅速地从血循环中被清除。因而  $\alpha$ M $\beta$  的功能主要表现为清除组织中内源或外源性的蛋白酶。与其它一些蛋白酶抑制因子共同调控蛋白水解活性。如在凝

血与纤维蛋白分解过程中, 当主要的蛋白酶抑制因子耗尽时,  $\alpha$ M $\beta$  可充当候补抑制剂的角色。鲍玉洲等 1996 年报道, 炎症时, 机体能诱导合成丰富的  $\alpha$ M $\beta$ , 它进入组织, 与组织释放的过量的蛋白酶结合, 并清除之, 防止组织被进一步破坏<sup>[1]</sup>。同样,  $\alpha$ M $\beta$  可以通过抑制侵入机体的寄生虫和病原体释放的多种蛋白酶与毒素, 减少其对宿主的破坏, 增强宿主的抗病力。

鲍玉洲等 1996 年报道,  $\alpha$ M $\beta$  已被用于临床, 因能有效地治疗放射损伤疾病, 特别是对放射性溃疡有较好的治疗效果<sup>[1]</sup>。

### 2 $\alpha$ M $\beta$ 的结构与作用机理

郑远旗等 1992 年报道, 自从 1955 年 Schultze 从人血清中首次分离纯化出  $\alpha_2$ M<sup>2</sup> 以来,  $\alpha$ M $\beta$  的不同成员已经在哺乳动物、鸟类、爬行动物以及多种无脊椎动物中相继发现。如人  $\alpha_2$ M、Enghild 等 1990 年报道的人 PZP (Human Pregnancy Zone Protein)<sup>[3]</sup>、Nelsen 等 1993 年报道的鸡卵清 Ovostatin<sup>[4]</sup>, 以及 Enghild 等 1990 年在无脊椎动物 *Limulus polyphemus* 体内发现的 Li-mac<sup>[3]</sup>。

大部分的  $\alpha$ M $\beta$  是四聚体, 也有

以二聚体和单体形式存在的。如人  $\alpha_2$ M 和鸡卵清 Ovostatin 蛋白是四聚体, 人 PZP 和 Li-mac 为二聚体, 单体有大鼠  $\alpha_1$ I<sub>3</sub> ( $\alpha_1$ Inhibitor<sub>3</sub>)。二聚体之间依靠二硫键连接在一起, 四聚体则是由两个二聚体通过非共价连接形成。

$\alpha$ M $\beta$  对蛋白酶的隔离和活性抑制采取一种所谓的“捕获”机制, 即利用自身多肽链在接触蛋白酶后引发的构象变化, 形成一个“笼子”形结构, 将蛋白酶分子包裹在里面。阻止酶分子与蛋白质底物相互作用。在  $\alpha$ M $\beta$  家族中, 人  $\alpha_2$ M 是研究得较为透彻的一种。人  $\alpha_2$ M 分子由四个亚基组成, 亚基分子量大约为 180 kDa。每个亚基都包括一段诱饵区和一个分子内硫酯键。诱饵区是一段暴露在分子表面的含 25 个氨基酸残基的肽链, 这段肽链可被蛋白酶识别进而水解, 导致整个  $\alpha_2$ M 分子发生构象改变, 启动抑制

\* 国家重点基础研究项目

GI 99901 2012 课题资助。

第一作者: 梅承芳, 出生于 1979 年, 硕士研究生。E-mail: meichengfang@yqhoo.com.cn

收稿日期: 2001-09-17;

修回日期: 2002-01-18



酶活反应的发生。分子内硫酯键由半胱氨酸残基的巯基亲核取代谷氨酰胺残基侧链酰胺基上的氨基而形成。该键不稳定，具有很高的反应活性。它在诱饵区水解后发生断裂，生成了 $\alpha_2M$ 共价结合蛋白酶所必需的Glu残基。

Sottrup Jensen 1989 年报道，通过电镜观察，人 $\alpha_2M$ 分子的立体结构（从侧面看）呈对称的唇形，由两个小杆状的二聚体交叉楔合在一起形成<sup>[5]</sup>。每个二聚体由两个亚基反向平行组成。两个小杆沿着唇形分子的长轴顺时针扭曲 $90^\circ$ ，于两侧各形成一个直径为 $25 \text{ \AA}$ 的开口<sup>[6]</sup>。小杆的末端是硫酯键，四段诱饵区位于小杆的中间部位（分子中心）。由于构象改变后的 $\alpha_2M$ 可以在分子短轴两侧各结合一个酶分子，因此将 $\alpha_2M$ 沿分子的短轴分为两个功能区域<sup>[6]</sup>。当蛋白酶靠近 $\alpha_2M$ 时，酶的介入使得位于唇形分子短轴一侧同一功能区内的两段诱饵区首先解离，进而同侧的两个硫酯键也发生断裂。导致两个小杆状二聚体在此端解开缠绕而分离，分子内部形成了一个具有四个直径为 $50 \text{ \AA}$ 开口的漏斗形空腔<sup>[7]</sup>，使得 $\alpha_2M$ 更加容易接触到蛋白酶分子。当剩余的诱饵区与硫酯键完全解离后， $\alpha_2M$ 分子的构象发生了更大的变化。两个小杆完全分离，形成4条细丝状的肽链，它们具有较高的蛋白质密度<sup>[7]</sup>。据 Sottrup Jensen 1989 年报道，整个分子结构最终成一个“H”形<sup>[5]</sup>，可以在分子的上下各结合一个蛋白酶分子（图1）。 $\alpha_2M$ 利用硫酯键断开后生成的谷氨酰胺残基侧链羰基与酶分子表面的赖氨酸残基的 $\epsilon$ 氨基形成共价连接，然后包围在酶分子周围的四条伸展的肽链重新缠绕以锁定蛋白酶<sup>[7]</sup>。这样，两个酶分子完全处于“H”形空腔内，使蛋白酶不能与其底物接触，达到对蛋白

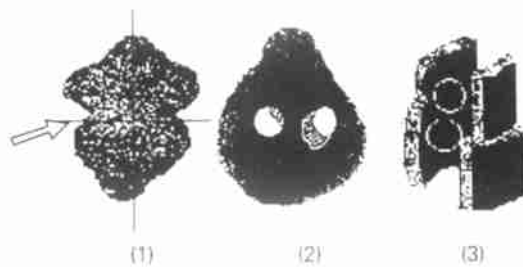


图1 人 $\alpha_2M$ 分子构象变化示意图

(1)唇形 $\alpha_2M$ 分子,相互垂直的线条标志分子的长短轴,诱饵区位于箭头所指的分子中心部位,分子长轴的两端是硫酯键;(2)蛋白酶的介入使两个扭曲在一起的二聚体于分子短轴的一侧解开缠绕,内部形成漏斗形空腔;(3) $\alpha_2M$ 分子构象完全改变,成“H”形,可在内部结合两个酶分子<sup>[5,7]</sup>。

酶活性的抑制。到目前为止，人 $\alpha_2M$ 分子在抑制蛋白酶反应中是依靠小杆二聚体的解开与重新缠绕的构象改变的理论得到了大多数研究者的肯定。

由于 $\alpha Ms$ 特殊的抑制机理，被 $\alpha Ms$ 结合的酶分子的活性部位是不受影响的。因此，一些低分子量的氨基化合物或酯类的底物可以进入到“笼子”形结构的内部，被蛋白酶水解。这一性质可以作为检测血浆是否具有 $\alpha Ms$ 活性的依据。

### 3 内部硫酯键及其在抑制反应中的作用

目前所分离得到的 $\alpha Ms$ 可分为两类，一类含有分子内硫酯键。绝大多数的 $\alpha Ms$ 都属于这一类如人 $\alpha_2M$ ；另一类不含有分子内硫酯键，只发现了存在于鸡蛋清中的Ovostatin。

绝大部分 $\alpha Ms$ 与人补体因子 $C_3$ 、 $C_4$ 共同含有一个由大约200个氨基酸残基构成的硫酯键区域<sup>[8]</sup>。硫酯键位于上述区域的末端，具有很强的反应活性，在以下情况发生断裂。

Sottrup Jensen 1989 年报道，当蛋白质发生热变性时，硫酯键缓慢断开成开链的形式，形成一个焦谷氨酸残基<sup>[5]</sup>。Bowen 等

1997 年报道，硫酯键在小分子亲核物如甲胺的诱导下断裂，生成Glu残基<sup>[9]</sup>。此时， $\alpha Ms$ 的一切蛋白酶抑制活性将彻底丧失。因为甲胺诱导的硫酯键断裂导致 $\alpha Ms$ 的空间结构发生巨大改变，酶分子无法正常与 $\alpha Ms$ 结合。当蛋白酶分子与 $\alpha Ms$ 开始反应并水解诱饵区之后，硫酯键和蛋白酶分子共同处于一种高度激活的状态，键断开后大部分 $\alpha Ms$ 利用生成的Glu残基与酶分子表面的Lys残基形成 $\epsilon\text{-Lys}-\gamma\text{-Glu}$ 的共价连接。Enghild 1990 年研究表明，这种共价连接对于维持单体 $\alpha_1I_3$ 和二聚体人PZP的蛋白酶抑制活性十分重要，一旦出现其它类似甲胺的竞争性亲核分子使得上述共价反应被抑制时， $\alpha Ms$ -蛋白酶复合物的形成也被完全抑制， $\alpha_1I_3$ 和人PZP的抑制蛋白酶水解活性的能力完全丧失<sup>[3]</sup>。

在无法与酶分子发生共价连接的情况下，四聚体 $\alpha Ms$ 依然能有效地结合蛋白酶。即， $\alpha Ms$ 与蛋白酶分子间的共价连接对于四聚体 $\alpha Ms$ 捕获蛋白酶并不是必需的。这也许是因为，四聚体 $\alpha Ms$ 由两个二聚体组成，代表了一种高度的复杂性和精确性，具有更为准确有效的“捕获”能力。因此，四聚体 $\alpha Ms$ 不需依靠共价连



接,蛋白酶本身的结构和构象已提供了足够的识别指令。即使是目标蛋白酶含有很少 Lys 残基,仍然能被有效捕获,但这种捕获是不牢固的。被四聚体  $\alpha$  Ms 非共价结合的蛋白酶可被其它蛋白酶分子所取代。四聚体  $\alpha$  Ms 在蛋白酶或甲胺作用后,构象变化显著,电泳迁移率加快。二聚体与单体  $\alpha$  Ms 反应前后的构象变化则不显著,但细微的变化仍可通过一些免疫化学手段和物理方法检测。

在  $\alpha$  Ms 家族中还有一类不含有内酯键的成员,至今只发现合于输卵管、存在于鸡蛋清中的 Ovostatin。其主要的抑制对象是胶原酶<sup>[4]</sup>。Ovostatin 也是四聚体,它的抑制机理类似于人  $\alpha_2$  M 的“捕获”原理。由于不含硫酯键, Ovostatin 在结合蛋白酶时不与酶分子发生共价连接,因而甲胺的处理不会导致 Ovostatin 的蛋白酶抑制活性丧失。

#### 4 $\alpha$ Ms 的细胞受体

$\alpha$  Ms-蛋白酶复合物在循环系统中可被迅速清除。循环系统中的  $\alpha$  Ms-酶复合物浓度很低,半衰期只有 2~5 min。 $\alpha$  Ms 的受体一般位于成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞和合胞体滋养层。哺乳动物  $\alpha$  Ms 的细胞受体之间并无区别,且受体结合不受  $\alpha$  Ms-蛋白酶复合物性质的影响。但哺乳动物来源的  $\alpha$  Ms 的细胞受体无法识别 Ovostatin。人  $\alpha_2$  M 的受体识别位点由 C 端 138 个氨基酸残基组成,它的受体是一个 600kDa 分子量的位于细胞表面的糖蛋白,称为低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP/ $\alpha_2$ R)<sup>[10]</sup>。

#### 5 $\alpha$ Ms 与补体因子的密切关系

$\alpha$  Ms 家族的大部分成员与补体因子  $C_3$ 、 $C_4$  都含有  $\beta$ -色氨酸- $\gamma$ -谷

氨酰胺的分子内硫酯键。补体因子不具有抑制蛋白酶活性的能力,但它同样由 185 kDa 的前体物质合成。两者在单核-巨噬细胞上都存在受体。最值得关注的是,  $\alpha$  Ms 与补体共有许多相似的生理功能。 $\alpha$  Ms 能清除血中多余的内源性蛋白酶,抑制病原体 and 寄生虫入侵机体时释放的外源蛋白酶,对某些病毒也有抵抗作用。而补体在活化过程中生成的一些中间产物,对抗原抗体有很强的亲和力,可共价结合到免疫复合物上,使复合物被抑制或清除。补体的溶细胞反应不仅可以抗菌,也可抵抗其它微生物及寄生虫的感染。

Day 等在 1970 年首次发现甲壳类的 *Limulus polyphemus* 的血浆具有溶解绵羊红细胞的活性。经过不断的实验, Engild 在 *L. polyphemus* 的血浆中找到一种含有分子内硫酯键的二聚体  $\alpha$ -巨球蛋白,命名为 Limac,兼具有抑制蛋白酶活性和溶解绵羊红细胞两种能力。经甲胺处理后的血浆完全丧失以上两种活性<sup>[3]</sup>。由于甲胺破坏的是 Limac 分子中的硫酯键,因而硫酯键对于 Limac 的溶细胞与蛋白酶抑制活性至关重要。Limac 被蛋白酶活化后,能与外来的血细胞结合,这与人  $C_3$  与绵羊红细胞的结合完全类似。与人的补体激活替代途径一样, *L. polyphemus* 的细胞溶解系统也可被外来的红细胞所激活。凝胶柱填料 Sepharose 可使这种溶细胞活性丧失,而人的补体替代途径也能被 Sepharose 激活,导致几种溶细胞因子的完全耗尽。上两种溶细胞活性都可通过 Sepharose 导致丧失,也许由同一个机制在起作用。研究发现, *L. polyphemus* 的溶细胞系统与哺乳

动物的补体替代途径还共享以下特性:(1) 血浆的溶解红细胞能力都能被 EDTA 所消除;(2) 能被外来红细胞所激活;(3) 都依赖于含有硫酯键的蛋白(分别是 Limac 与  $C_3$ )。

Sottrup-Jensen 1990 年报道, Limac、人  $\alpha_2$  M 和  $C_3$  三者含有硫酯键的氨基酸区域顺序具有一定相似性<sup>[11]</sup>。其中, Limac 与人  $C_3$  的相似性比人  $\alpha_2$  M 与  $C_3$  之间的略高。这表明, Limac 与人  $\alpha_2$  M 相比较,与补体系统有着更密切的联系。

抑制蛋白酶水解大分子底物与溶解红细胞这两种活性今天在大多数动物体内已经相互独立,但在无脊椎动物 *L. polyphemus* 血液中发现一种共同具有上述两种特性的  $\alpha$ -巨球蛋白——Limac。这表明,在蛋白质进化的某一时期,这两种活性可能是共同存在的。因此,  $\alpha$ -巨球蛋白与补体系统之间存在千丝万缕的联系,它们可能来自同一种古老的防御系统并发挥着重要的生理作用。

也有报道提出 *L. Polyphemus* 体内的溶血系统的调节因子是一种可以结合唾液酸的凝集素——Limulin,它的溶血活性可以由被硫酯键激活的 Limac 所抑制。这是因为被蛋白酶或甲胺激活了硫酯键的 Limac 能够结合 Limulin,从而消除血浆的溶血功能。因此,有学者认为是 Limac 与 Limulin 两种蛋白质共同调节了 *L. Polyphemus* 的溶血系统<sup>[12]</sup>。

目前,已在多种无脊椎动物中发现了  $\alpha$ -巨球蛋白,如软体动物头足类的 *Loligo pealii* 和真蛸(*Octopus vulgaris*)、腹足类双脐螺属的 *Biomphalaria glabrata*。甲壳



动物,如美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*)、河螯虾 (*Astacus astacus*) 以及 *Pacifastacus leniusculus*。节肢动物如钝缘蜱属的 *Ornithodoros moubata*<sup>[13]</sup>等。据 Bender<sup>1996</sup> 年报道,目前发现的无脊椎动物来源的  $\alpha$  Ms 绝大部分是二聚体<sup>[14]</sup>。Bowen 1997 年报道,只有上述 *Limulus polyphemus* 体内的 Limac 可以以四聚体与二聚体两种形式同时存在<sup>[15]</sup>。对于它们的结构、内肽酶抑制机理、受体结合等性质也进行了一定的研究。无脊椎动物血浆中  $\alpha$  Ms 的发现,是无脊椎动物体中以  $\alpha$  Ms 为基础的免疫系统存在的一个证明<sup>[13]</sup>。Fryer 和 Armstrong 于 1996 年分别就  $\alpha$  Ms 在这个免疫系统中的具体功能<sup>[16,17]</sup>,如抑制内源和外源蛋白酶的活性、抗病毒感染等进行了报道,对其进一步的研究对于探讨无脊椎动物抗病力的机制具有重要意义。

## 参考文献

- 1 鲍玉洲、陈勤等。 $\alpha_2$ -巨球蛋白的研究进展,国外医学输血及血液学分册,1996,19:34~37
- 2 郑远旗、贾一平。亲和层析法分离纯化猪血浆  $\alpha_2$ -M,生物化学杂志,1992,8(2):251~256
- 3 Enghild J.J., Thøgersen I.B., Salvesen G. et al..  $\alpha$  Macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system, *Biochem.*, 1990, 29: 10 070 ~ 10 080
- 4 Nielsen K.L. and Sottrup-Jensen L.. Evidence from sequence analysis that hen egg-white ovomacroglobulin (ovostatin) is devoid of an internal  $\beta$ -Cys-gamma-Glu thiolester, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1993, 1162 (1~2): 230 ~ 232

- 5 Sottrup-Jensen L..  $\alpha$  Macroglobulin: Structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation, *J. Biol. Chem.*, 1989, 264: 11 539 ~ 11 542
- 6 Qazi U., Gettins P.G., Stoops J.K.. On the structural changes of native human  $\alpha_2$  macroglobulin upon proteinase entrapment. Three-dimensional structure of the half-transformed molecule, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 8 987 ~ 8 993
- 7 Qazi U., Gettins P.G., Strickland D.K. et al.. Structural details of proteinase entrapment by human  $\alpha_2$  macroglobulin emerge from three-dimensional reconstructions of Fab labeled native, half-transformed, and transformed molecules, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(12): 8 137 ~ 8 142
- 8 Dodds A.W. and Law S.K.. The phylogeny and evolution of the thioester bond-containing proteins C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> and  $\alpha_2$  macroglobulin, *Immunol Rev.*, 1998, 166: 15 ~ 26
- 9 Bowen M.E., Armstrong P.B., Quigley J.P. et al.. Comparison of *Limulus*  $\alpha$  macroglobulin with human  $\alpha_2$  macroglobulin: thiolester characterization, subunit organization, and conformational change, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 337(2): 191 ~ 201
- 10 Armstrong P.B. and Quigley J.P..  $\alpha_2$  Macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system, *Developmental and Comparative Immunology*, 1999, 23: 375 ~ 390
- 11 Sottrup-Jensen L., Borth W., Hall M. et al.. Sequence similarity between  $\alpha_2$  macroglobulin from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*, and proteins of the  $\alpha_2$  macroglobulin family from mammals, *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 1990, 96(3): 621 ~ 625
- 12 Swarnakar S., Asokan R., Quigley J.P. et al.. Binding of  $\alpha_2$  macroglobulin and limulin: regulation of the plasma hemolytic system of the American horseshoe crab, *Limulus*, *Biochem. J.*, 2000, 347: 679 ~ 685
- 13 Kopacek P., Weise C., Saravanan T. et al.. Characterization of an  $\alpha$  macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*, *Eur. J. Biochem.*, 2000, 267: 465 ~ 475
- 14 Bender R.C. and Bayne C.J.. Purification and characterization of a tetrameric  $\alpha$  macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*, *Biochem. J.*, 1996, 316: 893 ~ 900
- 15 Bowen M.E., Armstrong P.B., Quigley J.P. et al.. Comparison of *Limulus*  $\alpha$  macroglobulin with human  $\alpha_2$  macroglobulin: thiolester characterization, subunit organization, and conformational change, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 337(2): 191 ~ 201
- 16 Fryer S.E., Bender R.C., Bayne C.J.. Inhibition of cysteine proteinase from *Schistosoma mansoni* larvae by  $\alpha$  macroglobulin from the plasma of *Biomphalaria glabrata*, *J. Parasitol.*, 1996, 82(2): 343 ~ 347
- 17 Armstrong P.B. and Quigley J.P.. Immune function of  $\alpha_2$  macroglobulin in invertebrates, *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 1996, 15: 101 ~ 130

(本文编辑: 刘珊珊)