

抗凝血酶的结构、功能、表达和演化

Structure, function, expression and evolution of antithrombin

晁叶青,张士瑾

(中国海洋大学 海洋生物系, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q349+.53

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)07-0071-04

包括人在内的哺乳动物凝血系统参与止血反应,是机体一种独特的保护性机能。凝血与溶血处于动态平衡状态,是一个精密控制的过程。血管破损血液必须快速准确地破损处凝集,阻止血液外流。如果止血反应不够迅速,将血流不止,危及生命。相反,如果止血反应一直进行下去,也会导致血栓,同样危及生命。血凝过程是一个复杂的级联过程,参与反应的多种物质被称为凝血因子,其主要成分是蛋白质。抗凝血酶,也叫抗凝血酶 (Antithrombin, AT⁻),就是这个过程中的一个关键蛋白酶。当抗凝血酶在人体血液内以一个较高浓度(2.3 μmol/L)存在时,它能够较好地维持凝血平衡,并防止血栓发生^[1]。AT⁻ 是一类分子质量约为 58 kDa 的糖蛋白,它是由肝细胞和血管内皮细胞分泌的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族(Serine Protease Inhibitor, SERPIN)重要成员之一,主要通过抑制凝血酶和其他凝血因子的活性来维持体内凝血与抗凝血的平衡,从而保持正常的生理平衡状态。在正常情况下,抗凝血酶直接的抗凝作用弱且慢,但与肝素结合后,抗凝血酶的活性和抗凝作用显著增强。遗传性抗凝血酶缺陷症是一种较常见的人类遗传性疾病,它与家族性静脉血栓形成倾向有关^[2]。抗凝血酶缺陷症的分子生物学研究对于了解遗传性抗凝血酶缺陷症的致病机制,进而采用相应的诊疗措施都有着深远的意义。除哺乳动物以外,鸟类、两栖类、硬骨鱼和软骨鱼也存在类似哺乳动物的凝血蛋白,包括 AT⁻。然而,关于 AT⁻ 的起源可以向前推进到哪一类动物,目前尚不清楚。

1 AT⁻ 的分子结构

AT⁻ 为单链糖蛋白,一般含有 4 个糖基化位点。AT⁻ 在体内以两种形式存在: 型和型。其中型抗凝血酶 Asn135 没有糖基化,只有 3 个位点

糖基化,在体内约占 AT⁻ 总量的 10%。

AT⁻ 与丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的其他成员有着极其相似的三维结构构象,包括 3 个 α -折叠(A、B 和 C)、9 个 α -螺旋(A-I)和 1 个反应中心环(RCL),还有 3 个与其空间折叠密切相关的分子内二硫键。RCL 突出于整个分子的顶部,插入 α -折叠中,其活性中心含有能够捕获目标酶的氨基酸序列^[3]。在抑制凝血酶的过程中,RCL 首先识别凝血酶的底物结合位点,其自身 Arg-Ser 肽键被分解,促进 AT⁻ 与凝血酶形成一种稳定的 1:1 共价复合物,使凝血酶失去活性,同时 AT⁻ 也因 RCL 的断裂而失去活性。

AT⁻ 与 SERPIN 家族的其他成员的一个很重要的区别是它可以通过结合肝素类分子来提高其抑制活性。肝素是一种高度硫酸化的粘多糖,被广泛用作抗凝剂。这类分子有一个独特的五糖结构,可以被 AT⁻ 识别,使 AT⁻ 分子构象发生变化暴露出反应中心环,从而大大提高其结合凝血酶的能力。肝素是已知的带负电荷密度最高的生物分子。它的高负电荷密度有利于其与抗凝血酶之间形成一种很强的静电相互作用^[4]。AT⁻ 分子上的 Lys 和 Arg 残基对它与肝素的结合有十分重要的作用^[5]。在体内存在的型和型 AT⁻ 都能有效结合肝素,但型 AT⁻ 只需要较低浓度的肝素就能达到最高活性。

结合肝素后的 AT⁻,它的活力能提高近 1 000 倍。AT⁻ 与肝素结合时,肝素先与 D-螺旋结合,

收稿日期:2007-05-12;修回日期:2007-12-16

基金项目:青岛市科技发展计划项目(06-2-2-15-jch)

作者简介:晁叶青(1985-),女,山东菏泽人,硕士研究生,主要从事发育和进化生物学研究,电话:13808980469,E-mail: aileen850626@hotmail.com;张士瑾,通讯作者,男,教授,主要从事发育和进化生物学研究,电话:0532-82032787,E-mail: sczhang@ouc.edu.cn

导致一系列构象变化,包括 RCL 被挤出 A-折叠;反应中心环附近区域经过一系列的构象变化后可以捕获目标酶。肝素一方面与 AT⁻ 上的肝素结合位点紧密结合,一方面非特异地与 AT⁻ 上的阴离子结合位点结合。肝素的这种双向结合使凝血酶能够以正确的方位及构象识别 AT⁻ 的活性中心^[6]。这种作用类似于一种模板机制,肝素作为“模板”可以同时“套住”抗凝血酶和目标酶。肝素同时结合酶与抑制剂的能力取决于它的长度和分子质量大小,如同时结合 AT⁻ 与凝血酶大约需要 18 个单糖单位,而同时结合 AT⁻ 与因子 IXa、Xa 则需要至少 30 个单糖单位^[1]。

在血液中存在的低活性 AT⁻ 对保持血液正常流通有重要作用。在高浓度肝素存在下,被局部活化的 AT⁻ 可以有效防止血栓。AT⁻ 这种在一定程度上保持较低活性又可以被肝素类分子激活大大提高其活性的分子基础,使其可以比较灵活地调控体内的凝血平衡。

AT⁻ 的反应中心环位于靠近 C-末端的 30 ~ 40 个氨基酸附近的区域,含有识别凝血酶催化中心的位点,此氨基酸位点称为 P1,近 C-端与 P1 相邻的氨基酸为 P1',其余依次类推。SERPIN 家族成员的抑制特异性取决于其反应中心环 P4'-P3 位点间的氨基酸残基序列。AT⁻ 的 RCL 的 N 末端与凝血酶

的丝氨酸活性位点共价结合,通过破坏蛋白酶催化中心的丝氨酸催化位点来使酶失活。RCL 的长度与 AT⁻ 的抑制机制密切相关,它可以恰到好处地平衡 AT⁻ 的抑制效率及酶与抑制剂复合物稳定性。

AT⁻ 的反应中心环被目标酶当作底物来识别,这时 RCL 中的 Arg-Ser 活性中心能够特异性识别凝血酶,并使 AT⁻ 与凝血酶形成一个稳定的复合物—[IP]。形成复合物后,AT⁻ 活性反应中心 P1 位点的羰基碳被丝氨酸蛋白酶的丝氨酸催化位点亲核攻击,形成了一个酰基-酶媒介-[IP]*。在这个阶段凝血酶的丝氨酸催化位点与 AT⁻ 的 P1 残基的羰基碳形成一个脂键,而且 P1 与 P1' 间的肽键被切断(图 1)。接着,AT⁻ 经过了一个构象上的变化,整个 RCL 被整合到 A-折叠的第四条链,导致凝血酶移动 70Å,到达 AT⁻ 的另一极。AT⁻ 与凝血酶的复合物—IP_{CPX} 很稳定,可以保持几周,甚至几年。它的稳定性取决于 AT⁻ 与凝血酶间肽键的情况,但是最终会被解离(k5 途径),产生常态的蛋白质解离产物——被切断的 AT⁻ 和具有活性的凝血酶(I* 和 P)。如果反应中心环的插入作用不及脱酰作用迅速,将导致整个反应直接产生解离产物(k3 途径)^[7]。

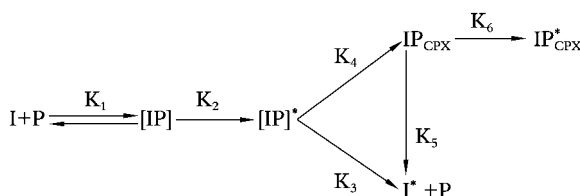


图 1 AT⁻ 的抑制过程及机理

I. 抑制剂;P. 蛋白酶;IP. 酶与抑制剂的复合物

AT⁻ 暴露于整个分子表面的反应中心环,易受某些非目标酶攻击,导致抑制活性丧失。中性粒细胞弹性蛋白酶就可以水解反应中心环活性位点,导致 AT⁻ 分子变为“松弛”构象,丧失抑制活性。脓血症患者的 AT⁻ 活性降低可能就跟抗凝血酶的这种失活现象有关。一些蛇毒蛋白酶也能使 AT⁻ 失活。肝素在低离子强度下,会导致 AT⁻ 的一些目标蛋白酶如凝血酶和因子 Xa 作用于 AT⁻,使其水解失活,但其机制尚不清楚^[8-10]。

2 AT⁻ 的基因结构及体外表达

人 AT⁻ 基因位于 1q23 ~ 25,全长为 13.4 kb (EMBL Accession No: X68793,包括从转录起始位点到多聚尾加尾信号),由 7 个外显子及 6 个内含子组成,外显子 1 和外显子 2 的一部分编码信号肽,外显子 2 的另一部分及外显子 3 编码肝素结合部位,外显子 6 则编码结合及抑制丝氨酸蛋白酶的结构域^[11]。在 AT⁻ 基因的内含子中有 9 个全长 Alu 重复序列和 1 个部分长度 Alu 重复序列。在人 AT⁻

中,Alu 占内含子的 22%,比其他基因中 Alu 的比例(约 5%)高得多。除内含子 4 的 Alu6 外,其余 Alu 方向均与基因方向相反。Alu 的同源重组会导致 A T⁻ 基因突变而发生疾病。Alu5 和 Alu8 含有由 A T T 重复序列组成的尾巴,其 A T T 拷贝数存在着多态性。人 A T⁻ 还存在许多限制性内切酶位点多态性^[12],如 Pst⁻ (核苷酸 7 626,外显子 3)、Nhe⁻ (核苷酸 7 987,内含子 4)和 Dde⁻ (核苷酸 9 893,内含子 5)。

A T⁻ 基因在转录起始位点上游的 25~30 碱基对处不存在 T A T A 盒,但是有一些短序列被发现与免疫球蛋白基因的 *Jk-Ck* 增强元件类似。当把 A T⁻ 的增强元件与氯霉素乙酰基转移酶连接转染到细胞内,氯霉素乙酰基转移酶在亚历山大肝细胞瘤 (Alexander hepatoma) 和 Cos-1 细胞(肾)内的表达活性得到提高。因此,这个增强元件可能与 A T⁻ 基因的组织特异性表达有关。

A T⁻ 基因已经发现存在两种多态性现象:一个是基因内的多态性,由第 305 个密码子的 A 转变为 G 所致,使基因翻译沉默;另一个是基因 5 端的多态性现象,由翻译起始密码子上游 345 bp 处有 32 bp 或 108 bp (易变片段)的非同源核酸序列的存在所致,但这种多态性现象不影响人的 A T⁻ 表达^[13]。

A T⁻ 基因已经在大肠杆菌、Hela 细胞、Cos-1 细胞、酵母细胞和幼仓鼠卵巢细胞中成功表达。Bock 等^[14] 1982 年最早报道 A T⁻ 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达,所产生的蛋白没有糖基化修饰,也没有能检测到功能活性。不久,Wasley 等^[15] 和 Stephen^[16] 1987 年分别成功地在中国仓鼠 (*Cricetulus sp.*) 卵细胞系 (CHO) 和 Cos-1 细胞系中获得 A T⁻ 基因的高水平表达,前者检测到 5%~10% 活性,后者检测到 80% 以上活性。新近, Mochizuki 等把人的 A T⁻ 在酵母 (*Pichia pastoris*) 中重组表达,获得具有生物活性的产物^[17]。

3 分类与进化

学术界最初根据人抗胰蛋白酶 (human antitrypsin)、抗凝血酶和鸡卵白蛋白 (chicken ovalbumin) 的序列和结构上的相似性,确立了一个新的蛋白质家族即 SERPIN 家族。到 1987 年,就已发现这个家族有 20 个成员,它们的结构都与其家族原型 1-antitrypsin 极其相似。随着对 SERPIN 家族研究的

深入,又有越来越多的新成员被发现。根据丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员间的系统发生关系,其成员分为 16 类,分别用字母 A~P 表示。另外,还有一类孤儿蛋白酶 (orphans),无法归到上述任何一类中。A T⁻ 属于 SERPIN 家族的 C 类成员^[18]。

A T⁻ 在哺乳类动物中研究比较多,如人,鼠等^[19,20]。此外,在其他脊椎动物中也发现有 A T⁻ 存在,例如软骨鱼类^[21]、硬骨鱼类^[22]、爬行类^[23] 和鸟类^[24]。

系统进化分析表明鸟类、爬行类、两栖类和鱼类的 A T⁻ 与人 A T⁻ 有较大差别。人与鸵鸟 (*Struthio camelus*)、海龟 (*Panholops hodgsoni*) 的 A T⁻ 分别有 72% 和 71% 的相似性,大约有 120 个氨基酸不同。其中,鸵鸟和海龟的 A T⁻ 都缺少天冬氨酸糖基化位点。爪蟾 (*Xenopus laevis*) 的 A T⁻ 与人 A T⁻ 同源性只有 67%,约有 140 个氨基酸与人 A T⁻ 不相同。鲑鱼 (*Oncorhynchus nerka*) A T⁻ 在近肝素结合位点的区域存在一个糖基化位点的缺失,仅与人 A T⁻ 有 62% 的相似性,其与肝素结合的能力和抑制活性均与人 A T⁻ 相似^[23]。新近,梁等^[25,26] 发现处于由无脊椎动物到脊椎动物进化节点的原索动物文昌鱼体内也存在着类似 A T⁻ 分子和纤溶酶原 (plasminogen),并且它们在类似于脊椎动物肝脏的组织肝盲囊表达。作者还从文昌鱼中克隆到类似 A T⁻ 基因,其体外表达产物与人 A T⁻ 具有类似功能,也可以通过与凝血酶形成一个稳定的复合物来抑制凝血酶的活性。这些结果显示文昌鱼体内可能存在类似脊椎动物样凝血系统的一些成分。当然,这还需要进行深入系统研究。

参考文献:

- [1] Johnson D J D, Li W, Huntington J A, et al. Antithrombin - S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation[J]. **EMBO J**, 2006, **25** (9): 2 029-2 037.
- [2] Abildgaard U. Antithrombin -early prophecies and present challenges [J]. **Thromb Haemost**, 2007, **98**: 97-104.
- [3] Quinsey N S, Greedy A L, Whisstock J C, et al. Antithrombin: in control of coagulation[J]. **Int J Biochem Cell Biol**, 2004, **36**(3): 386-389.
- [4] Seyrek E, Dubin P L, Henriksen J. Non-specific electrostatic binding characteristics of the heparin-an-

- tithrombin interaction [J]. **Biopolymers**, 2007, 86: 249-259.
- [5] Bock S C, Olson S T, Bjork I, *et al.* Roles of N-terminal region residues Lys11, Arg13, and Arg24 of antithrombin in heparin recognition and in promotion and stabilization of the heparin-induced conformational change. **Biochemistry**, 2004, 43 (3): 675-683.
- [6] Carrell R, Skinner R, Whisstock J, *et al.* Antithrombin and heparin[J]. **Mol Med Today**, 1995, 1(5): 226-231.
- [7] Zhou A, Carrell R W, Huntington J A. The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop [J]. **J Biol Chem**, 2001, 276: 27 541-27 547.
- [8] Jordan R E, Nelson R M, Kilpatrick J, *et al.* Inactivation of human antithrombin by neutrophil elastase. Kinetics of the heparin-dependent reaction [J]. **J Biol Chem**, 1989, 264(18): 10 493-10 500.
- [9] Duswald K H, Jochum M, Schramm W, *et al.* Released granulocytic elastase: an indicator of pathobiochemical alterations in septicemia after abdominal surgery[J]. **Surgery**, 1985, 98: 892-899.
- [10] Olson S T. Heparin and ionic strength-dependent conversion of antithrombin III from an inhibitor to a substrate of alpha-thrombin[J]. **J Biol Chem**, 1985, 260: 10 153-10 160.
- [11] Bock S C, Harris J F, Balazs I, *et al.* Assignment of the human antithrombin III structural gene to chromosome 1q23-25[J]. **Cytogenet Cell Genet**, 1985, 37: 32-41.
- [12] Olds R J, Lane D A, Chowdury V, *et al.* (ATT) Trinucleotide repeats in the antithrombin gene and their use in determining the origin of repeated mutations[J]. **Hum Mutat**, 2005, 4: 31-41.
- [13] Bock S C, Levitan D J. Characterization of an unusual DNA length polymorphism 5' to the human antithrombin III gene [J]. **Nucleic Acids Res**, 1983, 11 (24): 8 569-8 582.
- [14] Bock S C, Wion K L, Vehar G A, *et al.* Cloning and expression of the cDNA for human antithrombin III [J]. **Nucleic Acids Res**, 1982, 10: 8 113-8 125.
- [15] Wasley L C, Attra D H, Bauer K A *et al.* Expression and characterization of human antithrombin III synthesized in mammalian cells[J]. **J Biol Chem**, 1987, 262: 14 766-14 772.
- [16] Stephens A W, Siddiqui A, Hirs C H W. Expression of functionally active human antithrombin III[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1987, 84: 3 886-3 890.
- [17] Mochizuki S, Hamato N, Hirose M, *et al.* Expression and characterization of recombinant human antithrombin III in *Pichia pastoris* [J]. **Protein Expression Purif**, 2001, 23: 55-65.
- [18] Gettins P G. Serpin structure, mechanism, and function[J]. **Chem Rev**, 2002, 102: 4 751-4 803.
- [19] Kurachi K, Schmer G, Hermodson M A *et al.* Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III[J]. **Biochemistry**, 1976, 15: 368-373.
- [20] Mak P, Enghild J J, Dubin A. Hamster antithrombin III: purification, characterization and acute phase response [J]. **Comp Biochem Physiol B**, 1996, 115: 135-41.
- [21] Doolittle R F. Angiotensinogen is related to the antitrypsin-antithrombin-ovalbumin family [J]. **Science**, 1983, 222: 417-419.
- [22] Andersen O, Flengsrud R, Norberg K *et al.* Salmon antithrombin has only three carbohydrate side chains, and shows functional similarities to human antithrombin[J]. **Eur J Biochem**, 2000, 267: 1 651-1 657.
- [23] Backovic M, Gettins P G. Insight into residues critical for antithrombin function from analysis of an expanded database of sequences that includes frog, turtle, and ostrich antithrombins [J]. **J Proteome Res**, 2002, 1: 367-373.
- [24] Frost C L, Naud R J, Muramoto K. Ostrich antithrombin III: kinetics and mechanism of inhibition of ostrich thrombin[J]. **J Biol Chem**, 2002, 277: 1 164-1 171.
- [25] Liang Y, Zhang S, Lun L *et al.* Presence and localization of antithrombin and its regulation after acute lipopolysaccharide exposure in amphioxus, with implications for the origin of vertebrate liver[J]. **Cell Tissue Res**, 2006, 323: 537-541.
- [26] Liang Y, Zhang S. Demonstration of plasminogen-like protein in amphioxus with implications for the origin of vertebrate liver[J]. **Acta Zoologica**, 2006, 87: 141-145.

(本文编辑:梁德海)