

·学科进展·

tPA、PAI-2 的生物学特性及其在皮肤角朊细胞分化中的研究进展

宋川 杨恬 连小华

(第三军医大学细胞生物学教研室,重庆 400038)

[摘要] 综述了 tPA、PAI-2 的生物学特性及其参与皮肤 KC 分化的最新进展。

[关键词] tPA(组织型纤溶酶原激活剂)、PAI-2(纤溶酶原激活剂抑制物二型)、KC(角朊细胞)、细胞分化

组织型纤溶酶原激活剂(tissue type plasminogen activator, tPA)、纤溶酶原激活剂抑制物二型(plasminogen activator inhibitor 2, PAI-2)属于纤溶酶原激活剂/纤溶酶原激活剂抑制物系统(plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 简称 PA/PAI),在这一系统中还包括尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator, uPA)和纤溶酶原激活剂抑制物一型(plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1),它们均属于丝氨酸蛋白酶超家族(serpin)成员。在血浆及细胞基质中,tPA 和 uPA 均可催化同一反应,即通过水解掉纤溶酶原上的 1 个肽键使其转化成纤溶酶,启动对多种细胞外基质蛋白的水解,同时还可直接裂解纤粘素、胶原酶 IV 和肝细胞生长因子等,从而直接或间接参与纤溶、炎症、细胞迁移、排卵、肿瘤浸润与转移等许多生理病理过程^[1]。PAI-1 和 PAI-2 均可抑制上述两型激活剂的作用。以往文献认为 PAI-1 主要抑制 tPA,PAI-2 则是 uPA 更为特异的抑制物^[2]。对为何机体需要 2 套分解同样反应(纤溶酶原→纤溶酶)、但编码基因和生化特性均不相同的水解酶(tPA、uPA)的抑制物(PAI-1、PAI-2),近来提出新的思考和认识。1993 年 Jensen P J. 提出了角朊细胞(keratinocyte, KC)中 PA/PAI 作用的假说:uPA/PAI-1 在皮肤 KC 迁移、增殖中起重要作用;tPA/PAI-2 则主要作用于分化中的 KC,特别是分化终末阶段。从此,tPA/PAI-2 在皮肤 KC 分化中的研究日益深入和拓展。本文结合本实验室的工作,汇总了 tPA/PAI-2 的生物学特性及其在皮肤 KC 分化

中的研究新进展。

1 tPA 的结构与功能

tPA 是分子量为 67 000 的单链多肽,由 527 个氨基酸组成,人血中浓度为 0.1 nmol/L。在纤溶酶及胰蛋白酶作用下水解 Arg²⁷⁵~Ile²⁷⁶ 肽键,形成由二硫键连接的双链结构。氨基末端在重链(H 链),羧基末端在轻链(L 链)。H 链有指形区(F),生长因子样区域(EGF),及 2 个三角区(k1、k2)结构,L 链含有由 His³²²、Asp³⁷¹、Ser⁴⁷⁸ 组成的酶活性中心。它像其他血浆蛋白一样,是由结构和功能不同的区域组成的 mosaic 蛋白。

tPA 有 2 个重要特征。一是与纤维蛋白有较高亲和力,二是它的纤溶酶原激活作用受纤维蛋白的刺激而增强。其机理被认为是在纤维蛋白中存在着对 tPA 有高亲和力的部位,tPA 与纤维蛋白和纤溶酶原结合形成了一种有序的复合物,产生了高效的纤溶酶原激活作用^[3]。tPA 与纤维蛋白结合的特征是由 F 和 K2 决定的,K2 所起的作用最大。

tPA 活性中心含有 3 个保守的氨基酸 His³²²、Asp³⁷¹、Ser⁴⁷⁸。在催化过程中,这些残基构成一个功能反应单位,对键的形成与裂解起作用,通过 Ser⁴⁷⁸ 亲核攻击底物的羧基碳使底物水解^[4],Ser⁴⁷⁸ 不仅参与活性中心,而且与 tPA 结合 PAI-1 形成稳定的复合物有关。

天然 tPA 含 14 对二硫键,轻重链间通过二硫键连接。Cys²⁶⁴ 用 Gly 替代的突变分子失去双链间二

本文于 1999 年 8 月 16 日收到。

硫键,其活性只有 tPA 的 2%,说明 tPA 分子中轻链和重链的恰当连接是保持其活性的重要因素。

tPA 基因位于第 8 号染色体,由 13 个内含子分隔为 14 个外显子,每一个内含子 5'端以 G-T 开始,3'端以 A-C 结束。14 个外显子分别编码 tPA 各个功能区域。Exon I,位于 tPA 基因的 5'端,编码 mRNA 非翻译区。Exon II,编码信号肽及其下游区的 1—3 个氨基酸。Exon III,编码前导肽样结构。tPA 分子 35~1 氨基酸属于信号肽和前导肽。其中前 20—23 个氨基酸组成疏水的信号肽,与 tPA 分泌有关,后 12—15 个组成亲水的前导肽。Exon IV,编码重链“指形区”。tPA 的重链“指形区”是 tPA 与纤维蛋白亲和结合的位点,并涉及到粘附结合功能。Exon V,编码生长因子样区域。Exon VI-VII,编码重链 2 个三角区部位。tPA 重链含有 2 个三角区,两者之间仅有二硫键连接。在 tPA 的指形区和三角区都存在纤维蛋白结合位点。这两个部位对于 tPA 与纤维蛋白的结合是十分重要的。Exon X-XXI,编码轻链部分。

2 PAI-2 的结构和功能

PAI-2 于 1968 年由 Kawano 等首先在胎盘中发现。滋养层细胞、单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞、表皮 KC 等都可合成 PAI-2。PAI-2 存在糖基化形式(分子量约 58—70 kD)和非糖基化形式(分子量约 43—47 kD)^[5-7]。正常人血液中检测不到 PAI-2,孕妇血浆中有 PAI-2,含量约为 100 μg/L。PAI-2 是由 415 个氨基酸残基组成的具有多个结构域的糖蛋白。兼具 N、O 型糖化形式,Cys⁵ 与 Cys⁴⁰⁴ 形成 1 对二硫键,Arg³⁵⁸ 与 Thr³⁵⁹ 之间可特异性裂解,螺旋 C、D 间的 Gln⁸³,Gln⁸⁴ 和 Gln⁸⁵ 可受谷氨酰胺转移酶(TG)的作用,与 PAI-2 和其他物质的交联有关。

PAI-2 具有十分规则的 α-螺旋,β-片层以及转角结构。螺旋(A-I)A、B、C 的 N 端和 C 端为 3₁₀ 螺旋,这些螺旋全部或部分被包埋。β-片层(A-C)除 1A、1C 外均为反平行结构,它们十分规则,仅被突出的 5A 和 5B 间断 2 次。转角中多数为 β-发夹结构,另有一些较尖锐或宽松的转角。8 个 α-螺旋与 3 组 β-片层折叠成致密的构象。活性中心位于外露的环状结构中,通过构象的转换来调节其功能的发挥^[8,9]。

PAI-2 与 Oval, geneY, SCCA, EI 和 CAP 一起构成 Serpin 家族中的一个分枝:OV-Serpin 家族。它们的显著特点是缺乏信号肽和 N、C 端的延伸区。与 α-At 相比,N 端以 Met-23 起始,C 端以 Pro-391 结尾,螺旋 C、D 间可变程度很大,PAI-2 此区最长,由 37 个

氨基酸组成。Colin 等认为抑制活性主要来自两个方面:一是在酶与底物的反应中,抑制物——酶复合物类似于 Michaelis 复合物,具有的能量很低,阻碍了水解的进行;另一是酶与抑制物产物间的过渡态(EI*)具有很高的能量,处于“热力点”上,使酶与抑制物作用后不易形成产物,这是由于抑制物具有内在的张力不易回到四面体过渡态引起的。

人 PAI-2 基因定位于染色体 18q21—23,单拷贝,长约 16.5 kb,由 8 个外显子与 7 个内含子组成,外显子与内含子连接处均遵循“GT-AG”规则,并具 Mount 一致顺序。第 5、第 6 个外显子与内含子的连接方式属 I 型,其余属 O 型。第 1 个外显子编码 5'非翻译区(5'-NTR),第 6 个外显子编码的氨基酸最多。PAI-2 的基因结构与鸡卵清蛋白的基因结构十分相似。PAI-2 转录起始点上游 22 bp 处,存在真核基因一致顺序 TATAAAA。5'端无典型的 CAAT 盒与佛波酯顺式调控元件,但在 -207—-221 之间存在一个倒置的 CAAT 盒。-215—-91 间的一段顺序为其组成型合成及佛波酯诱导所必需。该区存在 4 个蛋白质结合位点,已知其一为 CRE 一致顺序(TGACCTCA),位于 -184—-182 之间,在 -103—-97、-115—-109 之间还存在两个 AP-1 一致顺序,分别为(TGAATCA)与(TGAGTAA)。增强子位于 -3500、-1400—-900 和 +2800(第 1 个内含子内)3 个区域中。此外,3'端非翻译区(3'-NTR)与炎症的介导有关,-1390—-1100、-870—-580 间还存在 2 个倒置的 Alu 顺序,有人认为该种顺序中包含了负调节元件^[10]。PAI-2 和合成受到激素、生长因子、细胞因子等许多因素的调节。CRE 结合蛋白(CREB)可与 CRE 一致顺序结合,使 PAI-2 的表达受 cAMP 的调控,PMA 则通过 AP-1 一致顺序促进 PAI-2 表达,c-fos、c-jun 等一组转录也可结合于该区。分子量 27—92 kD 的 11 种 U937 细胞的核蛋白可与 3 个增强子结合,其中已确定的 2 种蛋白属于 GAP 蛋白家族(γ-干扰素 DNA 结合蛋白),揭示 GAF 蛋白的磷酸化可能不仅仅限于 γ、α 干扰素的调控,PMA 也可对之进行诱导。此外,内毒素,α-肿瘤坏死因子(α-TNF),霍乱毒素和登革热病毒等均可促进其表达。地塞米松则可抑制其表达^[11]。

3 tPA、PAI-2 在皮肤 KC 中研究进展

tPA/PAI-2 在皮肤 KC 中研究始于 80 年代末,正常成人表皮中可检测到 PA/PAI 的 mRNA 及蛋白产物,其中以 uPA、PAI-2 为主,tPA 和 PAI-1 几乎检测

不到。在表皮分化异常的皮肤病(如银屑病、天疱疮、大疱性类天疱疮等)病人受损表皮中,tPA含量明显增高,其mRNA及蛋白产物呈阳性,并且tPA酶活性增高^[12-15]。而uPA含量明显降低。但在上述皮肤病人未受损表皮中PA、PAI的含量及分布同于正常皮肤^[16]。P.J. Jensen用免疫细胞化学和原位杂交技术在皮肤等同物(skin equivalent)的定位研究中发现tPA mRNA及其抗原分布在分化程度高的表皮浅层KC内;uPA mRNA及抗原主要分布在分化程度最低的基底层,在基底层下也有部分分布,PAI-1分布类似于uPA,PAI-2分布于皮肤等同物全层,但主要位于浅层^[17]。这一发现揭示不同分化状态下的KC分泌不同PA/PAI产物。在人KC体外培养研究中,贴在培养皿底的分化程度低的KC中,tPA含量低,uPA含量高,及tPA/uPA值小,而经培养3—5周后,自行脱落的KC-高分化KC中,tPA含量高,uPA含高低,tPA/uPA值大,亦即tPA/uPA值随着KC分化程度的增高而增大,揭示tPA参与KC分化^[18]。

PAI-2是正常成人表皮和皮肤病(银屑病等)病人受损表皮中主要的PAI形式,其mRNA和蛋白主要存在于表皮颗粒层细胞胞浆周边^[19]。正常皮肤这一层中PA酶活性检测不到。银屑病受损表皮处tPA、PAI-2含量增高,而PAI-1却检测不到,因此,PAI-2与tPA的共存并非仅仅是对于PA丝氨酸蛋白水解酶作用的调控,而是另有作用。在皮肤KC体外培养中,随着培养基中Ca²⁺浓度增加(30 μM→1.0 mM),细胞从单层分化为复层,绝大多数PAI-2均分布于分化程度高的上层KC胞浆周边或细胞间,而不是被分泌到培养基中,PAI-2的表达量也随Ca²⁺浓度增高而增高^[20]。因此PAI-2被认为是表皮分化中的一个重要标志物^[21,22]。

在皮肤KC体外培养中,TNF-α等细胞因子抑制细胞增殖而促进细胞分化,最终导致细胞过度成熟而死亡。同时TNF-α增强KC中PAI-2 mRNA及蛋白的表达,这一作用在高钙(1.0 mM)条件下更明显^[23]。Larker. R. M对毛囊循环周期研究发现PAI-2 mRNA及蛋白在毛发生长期存在于正在分化的外根鞘及髓质细胞中,在毛囊退化期明显增高。休止期PAI-2只局限于有丝分裂后期的外根鞘细胞中,直接毗连毛根。在指甲中PAI-2存在于有丝分裂后期终末分化前的成熟母质和甲床细胞中。此时细胞中TNF-α表达量增高,揭示PAI-2作用是保护正在分化中的KC,对抗TNF-α介导的细胞凋亡^[24-26]。

正常成人表皮KC中tPA及PAI-2含量较低,用

常规技术方法难以检测,这严重制约了表皮中tPA及PAI-2功能的研究。我室利用人胚胎皮肤这一新的表皮分化模型,研究原位和离体培养的KC中tPA/PAI-2变化,发现早期人胚胎(3个月)表皮已表达tPA/PAI-2 mRNA和蛋白,表达量明显高于生后期,tPA/PAI-2 mRNA及蛋白在表皮分布具有极性:(1)主要分布于表皮浅层KC胞浆周边,基底层表达量少;(2)主要位于基上层KC胞浆周边,紧靠胞膜。胚胎中期(6个月),tPA/PAI-2 mRNA及蛋白表达量达到高峰,在表皮分布存在同样极性。胚胎晚期(9个月),tPA/PAI-2蛋白表达量减少,而mRNA表达量则较高。胚胎期表皮KC增殖、分化活动极为活跃,此时tPA/PAI-2表达增多,并且随表皮KC成熟分化而出现,说明其参与了表皮KC的分化,可能作用是保护分化细胞,对抗细胞凋亡。同时,tPA/PAI-2蛋白分布于KC胞膜周边并和细胞外基质蛋白结合,有可能还与多种细胞因子相互作用,调控表皮KC的分化^[27,28]。

tPA/PAI-2系统对皮肤KC分化及其调控的研究仅从最近几年才开始,但新近的研究结果和Dr. Jensen的假说在近年全美皮肤科年会上均获得热切的兴趣和关注。目前在此领域内尚有许多有待进一步研究的问题。如PAI-2怎样中止和调控tPA的水解作用?PAI-2是否确实与KC的程序性死亡有关?PAI-2在表皮分化中从细胞内向细胞外重定位的规律和意义何在?另外已知在KC外的多种细胞中PA/PAI为某些细胞因子和生长因子所调节,但由于因子作用和细胞类型差异,不能直接推论它们在KC中对PA/PAI的作用。那么表皮中已有的重要细胞因子和生长因子中那些可能是tPA/PAI-2的调节者?它们之间的关系如何?是否存在一个我们正在研究的自分泌环调控方式?目前对tPA/PAI-2系统对表皮分化调控的详细机理所知甚少,有待众多的学者进行更深层次的、更全面的研究。

参 考 文 献

- [1] Mikus P, Urano T, Liljestrom P et al. Plasminogen activator inhibitor type 2 is a spontaneously polymerising SERPIN. *Eur. J. Biochem.*, 1993, **218**:1 071—1 082.
- [2] 田显,朱运松. 纤溶酶原激活剂抑制物2型的结构与功能. 国外医学分子生物学分册, 1997, **19**(1):31—33.
- [3] Kalyan N K, Lee S C, Wilhelm J et al. Structure-function analysis with tissue-type plasminogen activator. Effect of deletion of NH2-terminal domains on its biochemical and biological properties. *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**:3 971—3 978.

- [4] Huber R, Carrell R W. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry*, 1989, **23**:8 951—8 966.
- [5] Antalis T M, Dickinson J L. Control of plasminogen activator inhibitor type 2 gene expression in the differentiation of monocytic cells. *Eur. J. Biochem.*, 1992, **205**:203—209.
- [6] Arndt A D, Gohill J, Rankin D et al. Differentiation-linked expression of the plasminogen activator inhibitor type 2 gene in the human HC60 promyelocytic cell line. *Exp. Cell. Res.*, 1989, **185**:473—481.
- [7] Belin D. Biology and facultative secretion of plasminogen activator inhibitor type 2. *Thromb. Haemostasis.*, 1993, **70**:144—147.
- [8] Huber R, Carrell R W. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry*, 1989, **23**:8 951—8 966.
- [9] Stein P E, Leslie A G, Finch J T et al. Crystal structure of ovalbumin as a model for the reactive centre of serpins. *Thromb. Haemostasis.*, 1990, **67**:125—129.
- [10] Schleuning W D, Medcalf R L, Hession C et al. Plasminogen activator inhibitor 2: regulation of gene transcription during phorbol ester-mediated differentiation of U-937 human histiocytic lymphoma cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**:4 564—4 567.
- [11] Antalis T M, Godbolt D, Donnan K D et al. Southern blot mapping of potential regulatory proteins binding to the DNA encoding plasminogen activator inhibitor type 2 of psoriatic plaques: effect of dithranol, PUV, tretinoin and hydroxyurea regimens. *Gene.*, 1993, **134**:201—208.
- [12] Grøndsgård-Hansen et al. Immunohistochemical localization of urokinase- and tissue-type plasminogen activators in psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1987, **88**:23—32.
- [13] Jensen P J, Baird J, Belin D et al. Tissue plasminogen activator in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.*, 1990, **95**:13—14.
- [14] Baird J, Lazarus G S, Belin D et al. mRNA for tissue-type plasminogen activator is present in lesional epidermis from patients with Psoriasis, Pemphigus, or Bullous Pemphigoid, But is not detected in normal epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 1990, **95**:548—552.
- [15] Gissler H M, Frank C, Kramer M. Immunohistochemical characterization of the plasminogen activator system in psoriatic epidermis. *Br. J. Dermatol.*, 1993, **128**:612—618.
- [16] Jensen P J, Baird J, Morioka S et al. Epidermal plasminogen activator is abnormal in cutaneous lesions. *J. Invest. Dermatol.*, 1988, **90**:777—782.
- [17] Chen C S, Lyons-Giordano B, Lazarus G S et al. Differential expression of plasminogen activators and their inhibitors in an organotypic skin coculture system. *J. Cell. Sci.*, 1993, **106**:45—53.
- [18] Jensen P J. Urokinase and tissue type plasminogen activators in human keratinocyte culture. *Exp. Cell. Res.*, 1990, **187**:162—169.
- [19] Lyons-Giordano B, V Loskutoff, Dy Chen CS et al. Expression of plasminogen activator inhibitor type 2 in normal and psoriatic epidermis. *Histochemistry.*, 1994, **101**:105—112.
- [20] Jensen P J et al. Plasminogen Activator Inhibitor Type 2: An Intracellular Keratinocyte Differentiation Product That Is Incorporated into the Cornified Envelope. *Exp. Cell. Res.*, 1995, **217**:65—71.
- [21] Wang Y, Jensen P J. Regulation of the level and glycosylation state of plasminogen activator inhibitor type 2 during human keratinocyte differentiation. *Differentiation.*, 1998, **63**:93—99.
- [22] Lavker R M, Risse B, Jensen P J. Localization of Plasminogen Activator Inhibitor Type 2 in Hair and Nail: Implications for Terminal Differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, 1998, **110**:917—922.
- [23] Catherine A, Call M C, Cohen J J. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes: role of endogenous endonuclease. *J. Invest. Dermatol.*, 1991, **97**:111—114.
- [24] Polakowska R R, Piacentini M, Bartlett r et al. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. *Develop. Dynamics.*, 1994, **199**:176—188.
- [25] Yu D W, Yang T, Söhda T et al. Message of nexin 1, a serine protease inhibitor, is accumulated in the follicular papilla during anagen of the hair cycle. *J. Cell. Sci.*, 1995, **108**:38—67.
- [26] Dickinson J L, Bates E J, Ferrante a et al. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor α -induced apoptosis. *J. Biochem.*, 1995, **270**:27 894—27 904.
- [27] Bachmann F. The enigma PAI-2 Gene expression, evolutionary and functional aspects. *Thromb Haemost.*, 1995, **74**:172—179.
- [28] Kawata Y, Minuro J, Kaneko M et al. Expression of plasminogen activator inhibitor 2 in the adult and embryonic mouse tissues. *Thromb Haemost.*, 1996, **76**:569—576.

BIOLOGICAL ASPECTS AND PROGRESS OF TPA/PAI-2 DURING DIFFERENTIATION OF DERMATIC KERATINOCYTE

Song Chuan Yang Tian Lian Xiaohua

(Division of Cell Biology, The Third Military Medical University Chongqing 400038)

Abstract Biological aspects and progress of tPA/PAI-2 during differentiation of dermatic keratinocytes is reviewed in this paper.

Key words tPA (tissue type plasminogen activator), PAI-2 (plasminogen activator inhibitor type 2), KC (keratinocytes), cell differentiation