

· 综述 ·

以蛋白质为基础模拟谷胱甘肽过氧化物酶*

张春秋 罗全 刘俊秋**

(超分子结构与材料国家重点实验室 吉林大学 长春 130012)

摘 要 硒元素作为一种生命体中必须的微量元素,与人类的健康和疾病息息相关. 硒元素主要以硒代半胱氨酸的形式存在于至少 25 种硒蛋白中,执行着多种生物功能. 在这 20 多种硒蛋白中,谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)作为一种主要的抗氧化酶,能够有效地利用谷胱甘肽还原氢过氧化物以防止机体的氧化损伤. 这里,我们主要介绍以蛋白质为骨架构筑 GPx 模拟物的一些策略和方法,以期于能够更好的理解硒蛋白的生物学性质,甚至开拓更为有效的技术去模拟这种抗氧化酶.

关键词 硒, 硒代半胱氨酸, 谷胱甘肽过氧化物酶

蛋白质是生命体组成的最基本物质. 长期以来,科学家对这一基本物质进行了深入细致的探索与研究. 随着生命科学的飞速发展,尤其是基因组学、蛋白质组学、代谢组学以及计算生物学的深入研究与应用,为研究蛋白质结构与功能注入了新的活力. 酶作为蛋白质执行功能的一种表现形式,它具有催化效率高、作用专一性强和反应条件温和等显著特点. 它不仅在生物体的各种化学反应中执行催化剂的功能,也在生产实践和基础理论研究中起着非常重要的作用. 因此,对酶的探索和研究,一直是生命科学研究领域中的焦点问题之一.

蛋白质是自然赋予我们的多功能生物大分子,丰富多样的蛋白质是设计和制造新的生物催化剂的理想起点. 近年来,利用定向进化、基因重组和筛选等技术制备了大量的新型生物催化剂. 除此之外,科学家利用生物和化学手段在蛋白基础上设计和制备新酶活性的研究成为新的前沿工作之一. 到目前为止,人们利用化学修饰、基因突变成功地改造和制备了多种蛋白质和酶,并获得了高活性的改造酶、抗体酶、半合成酶等人工酶.

在天然蛋白质或酶分子的基础上构筑新酶受到了科学界的特殊重视,这也体现在对硒蛋白的研究上. 通过对硒蛋白结构与功能的模拟,人们不仅可以了解硒蛋白结构与功能的关系,更重要的

是可以进一步开发与硒蛋白相关的创新药物. 长期以来,人们关注机体中重要的抗氧化酶体系,而含硒酶——谷胱甘肽过氧化物酶(GPx),作为抗氧化酶家族的重要成员之一则受到特殊关注. GPx 是在哺乳动物体内发现的第一个含硒酶,它于 1957 年被 Mills 率先发现^[1]. 但是直到 1973 年 Flohé 和 Rotruck 两个研究小组才确立了 GPx 与硒之间的联系^[2,3]. 研究表明硒是 GPx 催化反应的必要组份,它以硒代半胱氨酸(Sec)的形式发挥作用. 作为生物体中一种重要的抗氧化酶,关于它的结构、功能和催化机制等多方面的研究都取得了很大的成就. GPx 家族由一些序列同源性很高的蛋白质组成,其普遍功能是通过谷胱甘肽(GSH)催化氢过氧化物的还原反应,有效地清除氧自由基,防止氧化应激反应,保护细胞膜以及一些生物大分子的结构和功能,从而有效地抵抗氧化损伤,细胞新陈代谢的氧化调节以及细胞分化和凋亡. 研究发现,GPx 还与糖尿病、克山病、动脉粥样硬化、恶性肿瘤等多种疾病的发生、发展密切相关^[4-7].

为了研究该酶结构与功能的关系,并试图开发出以该酶为基础的抗氧化药物,科学家们通过各种手段,包括化学合成、基因工程、抗体工程甚至纳米技术来人工模拟 GPx 的功能. 利用化学合成法,人们合成了若干小分子含硒化合物用来模

* 庆祝沈家骢院士 80 华诞专稿; 2011-05-17 收稿, 2011-06-13 修稿; 国家自然科学基金(基金号 91027023, 20874036, 20921003 和 21004028)、国家杰出青年基金(基金号 20725415)和国家基础研究发展计划(973 计划, 项目号 2007CB808006)资助项目; ** 通讯联系人, E-mail: junqiliu@jlu.edu.cn

doi:10.3724/SP.J.1105.2011.11170

拟 GPx. 但是, 他们的结构较为简单, 缺少底物识别信息, 因此表现出较低的催化活性. 对比而言, 作为大分子的蛋白质则具有较为复杂的结构, 通过蛋白质折叠获得的酶活性中心为催化提供了良好微环境, 这就为人工硒酶的研究与模拟提供了一个有效的平台. 因此, 本文拟对蛋白质作为骨架模拟 GPx 的研究进行评述.

1 硒化抗体酶

根据天然酶的结构特点, 设计并合成出具有底物结合部位及催化中心是模拟酶的基本策略. 就 GPx 的人工模拟而言, 目前人们已经发展出多种方法, 利用抗体技术制备含硒抗体模拟 GPx 便是其中一条有效途径.

抗体酶技术就是利用抗体结合抗原的高度特异性同酶与底物结合的专一性类似的特点, 将催化基团引入抗体的结合部位而使抗体具有酶的催化活性^[8]. 以往制备 GPx 抗体酶主要基于过渡态理论^[9], 将过渡态类似物作为抗原进行制备^[10]. 但是由于天然 GPx 催化的是 2 个底物的反应, 过渡态比较复杂, 设计这种过渡态制备抗体酶受到很大限制. 罗贵民研究组提出了一种叫做疏水修饰法的策略^[11], 即利用不同的疏水基团修饰底物谷胱甘肽 (GSH) 的极性基团并屏蔽电荷, 将修饰后的 GSH 作为半抗原制备抗体, 再利用化学修饰的方法将催化基团硒代半胱氨酸引入抗体的 GSH 结合位点. 这种方法获得的抗体酶不仅能特异性地结合底物, 而且还具有类似天然酶活性中心的疏水空腔, 从而表现出了良好的 GPx 活性.

基于这种疏水修饰策略, 该课题组合成出多种疏水基团修饰的 GSH 类似物, 如 GSH-S-DNPMe、GSSGMe、GSH-S-DNPBu 等. 以这些 GSH 类似物作为半抗原免疫小鼠, 并运用杂交瘤技术, 他们制备出多株能特异性结合 GSH 的单克隆抗体^[10,12]. 抗体经化学修饰引入催化基团硒代半胱氨酸, 便可获得催化活性较高的 GPx 模拟物. 其中, 以 GSH-S-DNPBu 为半抗原制备出的 2F3 抗体酶展示出了最高的 GPx 活力, 达到了 2.43×10^4 U/ μmol . 然而, 这些抗体酶的分子量大, 抗原性强, 应用受到很大限制. 为了解决这一问题, 人们开始着手制备分子量更小的抗体酶. 首先, 时成波等用胃蛋白酶水解鼠源单克隆抗体 3H4, 获得了由重链和轻链组成的抗体 Fv 片段^[13]. 随后 Ren 等利用基因工程技术, 以 2F3 为基础制备了分子

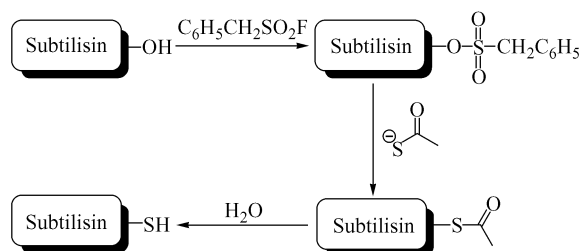
量更小的单链抗体 scFv-2F3^[14]. 此外, 魏景艳等还制备了仅仅具有抗体重链可变区的单域抗体酶模型^[15]. 这些抗体片段在引入催化基团后, 仍然表现出很高的 GPx 活性.

由于上述提到的抗体酶都是基于鼠源获得的抗体, 这些抗体酶在应用于人体时会具有一定的免疫原性. 尽管通过各种手段可减少这些鼠源抗体的分子量, 但是其免疫原性的存在, 仍然使这种抗体酶的使用受到了很大的限制. 因此, 齐小杰等应用噬菌体展示技术, 从人单链抗体库中筛选出单链抗体 3B10, 并运用化学修饰引入硒代半胱氨酸, 获得了人源化的含硒抗体酶^[16]. 随后, Wei 等再次利用该技术获得了两株具有 GSH 结合能力的单链抗体 scFv-B3 和 scFv-2D8, 经化学修饰后它们表现出较高的 GPx 活性^[15,17].

2 半合成人工硒酶

计算机技术的快速发展为蛋白质结构的研究提供了良好的技术手段, 这使得我们能够通过生物信息学的手段来精确地改造天然蛋白质. 另一方面, 随着化学合成手段的日渐成熟, 又能够让化学生物学家对蛋白质的表面进行选择性的修饰, 以赋予其新的生物功能. 在这里, 我们所提到的半合成方法, 就是对天然蛋白质中氨基酸进行最小的化学修饰或者改变, 从而赋予这种该蛋白硒酶的活性.

早期的蛋白质半合成技术源于 Polgar 和 Bender 两位科学家的一种方法, 即采用枯草杆菌蛋白酶作为骨架, 将其活性位点的羟基化学突变成巯基^[18] (如示意图 1). 这种半合成的巯基化枯草杆菌蛋白酶能够催化水解一系列的底物, 但它的活性要比天然的枯草杆菌蛋白酶活性低^[19,20].

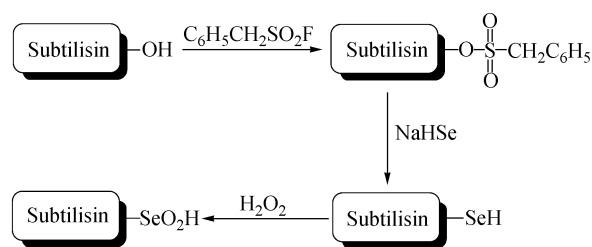


Scheme 1 Chemical conversion of subtilisin to thiolsubtilisin

随后, Yokosawa 等将链霉菌胰岛素活性位点的丝氨酸转变成半胱氨酸残基. 这种突变的巯基化胰岛素对典型的胰岛素底物 *N*-磺酰化精氨酸甲酯

表现出非常低的催化活性,而对活性酯底物对硝基苯酚酯衍生物只表现出一定的催化活性^[21].

受这些研究工作的启发,Hilvert 等制备出第一个半合成硒蛋白 GPx 模拟物,即通过转变枯草杆菌蛋白酶的活性中心丝氨酸残基成硒代半胱氨酸(如示意图 2),获得硒代枯草杆菌蛋白酶^[22]. 由于天然的枯草杆菌蛋白酶活性中心为 3 个协同作用的氨基酸,Asp32, His64 和 Ser221,构成的催化“三联体”,它能有效增强催化残基 Ser221 的亲核进攻能力,以提高其催化效率. 因此,受催化三联体微环境的影响,这种半合成的硒代枯草杆菌蛋白酶表现出了明显的 GPx 活性,并且能够催化多种氢过氧化物的还原反应.



Scheme 2 Chemical conversion of subtilisin to selenosubtilisin

为了进一步研究半合成的硒代枯草杆菌蛋白酶与天然 GPx 的动力学相关性,一系列的过氧化物被合成出来作为它的催化底物. 研究表明,这种半合成的硒代谷草杆菌蛋白酶的催化动力学与天然 GPx 在许多方面是相似的. 这主要是由于它们都具有相同的催化中心——硒代半胱氨酸,它的引入赋予了枯草杆菌蛋白酶新的催化活性^[23]. 我们研究组借鉴该研究方法将胰蛋白酶活性位点的丝氨酸转变成硒代半胱氨酸,制备出了一种硒化胰蛋白酶^[24]. 对于这种硒蛋白来说,尽管谷胱甘肽不是其最适底物,但是它的成功为设计其它硒蛋白质提供了一个新手段.

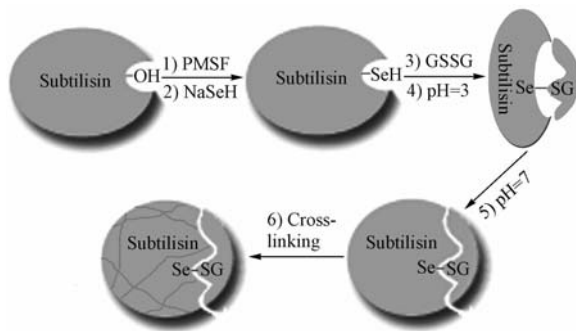
虽然硒代枯草杆菌蛋白酶和硒化胰蛋白酶都表现出 GPx 的相关性质,但是它们都不能很好的结合底物 GSH,也因此没有表现出高的催化活力. 为了解决这一问题,罗贵民等选用具有谷胱甘肽底物结合位点的谷胱甘肽转硫酶(GST)作为 GPx 模拟物的骨架^[25,26]. GST 和 GPx 同属于硫氧还蛋白超家族,都具有谷胱甘肽结合位点,甚至某些天然的 GST 本身就具有一定的 GPx 活性. 因此,采用制备硒代枯草杆菌蛋白酶的方法所制备的硒化 GST,由于其催化和识别高度协同,能够有效地催化过氧化物的还原反应,其催化活力甚至

高于某些天然的 GPx.

3 生物印迹硒蛋白

分子印迹技术是构筑人工酶的另外一种有效方法^[27~29]. 它利用聚合物或者生物大分子为基础,通过印迹的方法设计出具有底物选择性识别的活性位点,并成为仿酶的重要手段之一. 其中,生物印迹技术主要是利用蛋白质或者其它生物分子作为骨架,以底物或者过渡态类似物作为模板分子而进行的仿酶研究^[30].

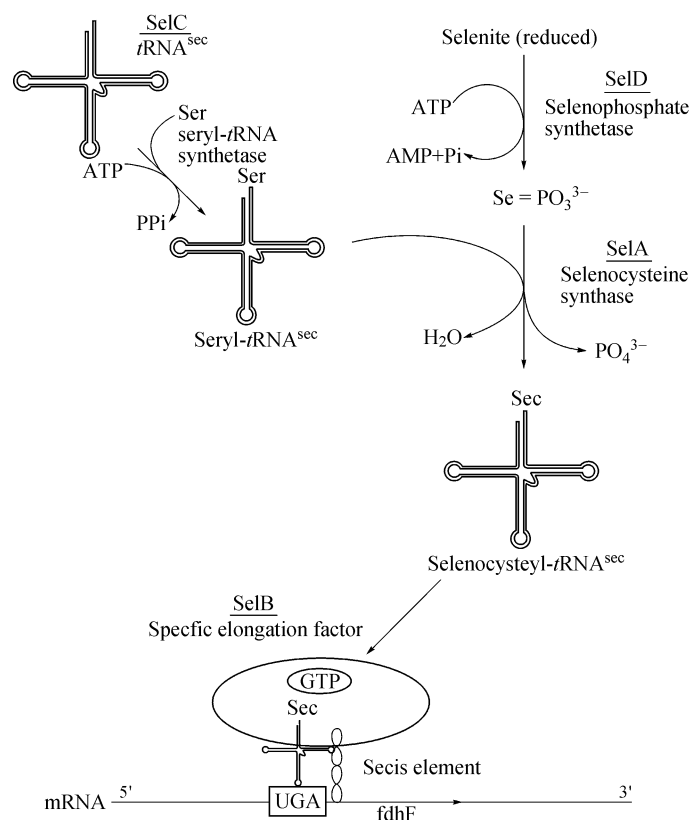
通过半合成方法制备的大多数硒蛋白往往催化效率不高,其主要原因是它们缺乏特异性底物的识别能力. 为了克服这个缺点,人们通过生物印迹和半合成的手段制备出了一种全新的生物印迹酶,并发现该酶表现出较高的 GPx 活性^[31]. 但是,这种方法存在缺陷,即很难将天然 GPx 催化残基硒代半胱氨酸引入到印迹分子的底物结合位点中. 为了改进和优化这种方法,我们研究组采用 Se-S 键共价交联模板分子 GSH 的方法,制备出了具有高催化活性的硒代枯草杆菌蛋白酶^[32](如示意图 3). 该方法的优越性在于最大限度地使底物与催化基团硒代半胱氨酸在空间上匹配. 催化动力学的研究表明,这种通过生物印迹手段得到的硒代枯草杆菌蛋白酶具有与天然 GPx 非常相似的催化性质.



Scheme 3 Preparation process of the bioimprinted selenosubtilisin

4 生物合成硒蛋白

在生物体中,硒代半胱氨酸的生物合成途径以及硒蛋白的表达得到了广泛而深入的研究. 在大肠杆菌中,编码硒代半胱氨酸的是一种终止密码子 UGA,而另外 4 个主要的基因产物 SelA, SelB, SelC 和 SelD 在硒蛋白的翻译过程中也起到了至关重要的作用(如示意图 4)^[33].



Scheme 4 Biosynthetic pathway for co-translational selenocysteine incorporation

由于编码硒代半胱氨酸的是终止密码子 UGA,使得人们很难通过传统的重组 DNA 技术制备硒蛋白.到目前为止,最为有效的生物合成硒蛋白的手段就是营养缺陷性表达技术,这个技术的发展主要得力于 Cowie 和 Cohen 两个人早期的工作^[34].他们利用甲硫氨酸营养缺陷性表达菌株,在蛋白质表达的过程中成功地将硒代甲硫氨酸引入到蛋白质中的甲硫氨酸位点.硒代甲硫氨酸的掺入并没有导致蛋白质的表达异常,也没有改变蛋白质的结构与功能.紧接着, Moroder 和 Budisa 发展了这种方法,将硒代甲硫氨酸,碲代甲硫氨酸以及其它的氨基酸类似物引入到蛋白质中,目前的蛋白质 X 射线衍射分析蛋白质晶体结构的手段都是得力于这一技术的改革和发展^[35,36].随后, Böck 等利用相似的营养缺陷性表达系统将硒代半胱氨酸引入到硫氧还蛋白中^[33].

罗贵民等利用半合成的化学修饰手段成功地制备出具有高 GPx 催化活性的 Se-GST^[25,26].但是,这种方法的一个弊端是催化位点缺乏特异性,多数 GST 蛋白表面的羟基不可避免地都会被突变成硒氢基.这对于蛋白质结构与功能的研究是有一定的影响的,而基因工程的定点突变技术确

能弥补这一缺陷.因此,我们研究组通过基因工程定点突变技术和营养缺陷性表达体系,表达并纯化出了一种果蝇属的 Se-GST^[37].将这种 GST 活性位点的 Ser9 突变成半胱氨酸,然后在硒代半胱氨酸存在的条件下,利用半胱氨酸的营养缺陷性表达体系制备出所期望的 Se-GST.这种利用营养缺陷型菌株表达出的 Se-GST 具有很高的催化活力,甚至达到了天然 GPx 的催化水平.通过同样的方法,我们将另一种半胱氨酸的模拟物——碲代半胱氨酸成功引入到果蝇的 GST 蛋白中,制备出首例具有高 GPx 催化活性的碲代 GST (Te-GST).作为这种方法的扩展,我们研究组将另一种同属硫氧还蛋白超家族的鼠源 Grx 作为模拟 GPx 的骨架,并仍采用硒代半胱氨酸营养缺陷性表达系统,将硒代半胱氨酸引入到 Grx 的 GSH 结合位点,同样获得了与天然酶活力相当的 GPx 模拟物^[38].

5 结束语

基于 GPx 的重要生物学功能和潜在的药用价值,人工模拟 GPx 有着十分重要的理论意义和潜在的应用前景.到目前为止,人们将有机合成,

基因工程,噬菌体抗体库展示技术甚至纳米技术等多种手段应用到这一领域,并成功制备出结构与天然 GPx 相似的硒蛋白 GPx 模拟物.天然蛋白质分子作为人工酶的骨架不仅提供了类酶催化中心而且提供了催化中心所需要的三维空间结构,这样的人工酶均表现出较高的催化活性.人工酶

可以克服天然酶在纯化和贮存方面的困难,以及操作条件苛刻和价格昂贵等方面的不足;蛋白质与生俱来的良好生物相容性也为这些生物活性物质在体内的应用提供了有利条件.因此,利用天然蛋白质作为模拟酶的研究工具,对于人工酶的研究与开发都具有十分重要的价值.

REFERENCES

- 1 Mills G C. *J Biol Chem*, 1957, 229: 189 ~ 197
- 2 Porter D J. *J Biol Chem*, 1980, 255: 7362 ~ 7370
- 3 Gibson Q H, Swoboda B E, Massey V. *J Biol Chem*, 1964, 239: 3927 ~ 3934
- 4 Davis R L, Lavine C L, Arredondo M A. *Int J Exp Diabetes Res*, 2002, 3(3): 185 ~ 192
- 5 Burke M P, Opeskin K. *Med Sci Law*, 2002, 42(1): 10 ~ 13
- 6 Forgione M A, Cap A, Liao R. *Circulation*, 2002, 106(9): 1154 ~ 1158
- 7 Power J H, Blumbergs P C. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(1): 63 ~ 73
- 8 Tramontano A, Janda K D, Lemer R A. *Science*, 1986, 234: 1566 ~ 1570
- 9 Pauling L. *Am Sci*, 1948, 36: 51 ~ 58
- 10 Luo G M, Zhu Z Q, Ding L. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 198: 1240 ~ 1247
- 11 Ding Lan(丁兰), Zhao Daqing(赵大庆), Liu Zi(刘仔), Luo Guimin(罗贵民). *Science China Life Sciences (Science in China Series C) (中国科学 C 辑: 生命科学)*, 1998, 28: 108 ~ 114
- 12 Su D, Ren X J, You D L, Mu Y, Yan G L, Zhang Y, Luo G M, Xue Y, Shen J C. *Arch Biochem Biophys*, 2001, 395: 177 ~ 184
- 13 Shi Chengbo(时成波), Liu Junqiu(刘俊秋), Luo Guimin(罗贵民). *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2000, 21: 566 ~ 569
- 14 Ren X J, Gao S J, You D L. *Biochem J*, 2001, 359: 369 ~ 374
- 15 Xu J J, Song J, Su J M, Wei J Y. *J Mol Recognit*, 2010, 23: 352 ~ 359
- 16 Qi Xiaojie(齐小杰), Wang Lin(王琳), Fang Fang(方芳). *Chemical Journal of Chinese Universities (高等学校化学学报)*, 2001, 22: 1976 ~ 1978
- 17 Huo R, Wei J Y, Xu J J. *J Mol Recognit*, 2008, 21: 323 ~ 328
- 18 Polgar L, Bender M L. *J Am Chem Soc*, 1996, 88: 3153 ~ 3154
- 19 Polgar L, Bender M L. *Biochemistry*, 1967, 6: 610 ~ 620
- 20 Neet K E, Koshland D E Jr. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1966, 56: 1606 ~ 1611
- 21 Yokosawa H, Ojima S, Ishii S. *J Biochem*, 1997, 82: 869 ~ 876
- 22 Wu Z P, Hilvert D. *J Am Chem Soc*, 1990, 112: 5648 ~ 5649
- 23 Bell I M, Fisher M L, Wu Z P, Hilvert D. *Biochemistry*, 1993, 32: 3754 ~ 3762
- 24 Liu J Q, Jiang M S, Luo G M, Yan G L, Shen J C. *Biotechnol Lett*, 1998, 20: 693 ~ 696
- 25 Ren X J, Jemth P, Board P G, Luo G M, Mannervik B, Liu J Q, Zhang K, Shen J C. *Chem Biol*, 2002, 9: 789 ~ 794
- 26 Zheng K Y, Board P G, Fei X F, Sun Y, Lv S W, Yan G L, Liu J Q, Shen J C, Luo G M. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40: 2090 ~ 2097
- 27 Turner N W, Jeans C W, Brain K R, Allender C J, Hlady V, Britt D W. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 1474 ~ 1489
- 28 Wulff G. *Chem Rev*, 2002, 102: 1 ~ 28
- 29 Murakami Y, Kikuchi J I, Hisaeda Y, Hayashida O. *Chem Rev*, 1996, 96: 721 ~ 758
- 30 Wulff G. *Angew. Chem Int Ed Engl*, 1995, 34: 1812 ~ 1832
- 31 Liu J Q, Luo G M, Gao S J, Zhang K, Chen X F, Shen J C. *Chem Commun*, 1999, 199 ~ 200
- 32 Liu L, Mao S Z, Liu X M, Huang X, Xu J Y, Liu J Q, Luo G M, Shen J C. *Biomacromolecules*, 2008, 9: 363 ~ 368
- 33 Muller S, Senn H, Gsell B, Vetter W, Baron C, Böck A. *Biochemistry*, 1994, 33: 3404 ~ 3412
- 34 Cowie D B, Cohen G N. *Biochim Biophys Acta*, 1957, 26: 252 ~ 261
- 35 Budisa N, Steipe B, Demange P, Eckerskorn C, Kellermann S, Huber R. *Eur J Biochem*, 1995, 230: 788 ~ 796
- 36 Budisa N, Minks C, Medrano F J, Lutz J, Huber R, Moroder L. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 1998, 95: 455 ~ 459
- 37 Yu H J, Liu J Q, Beck A, Li J, Luo G M, Shen J C. *J Biol Chem*, 2005, 280: 11930 ~ 11935
- 38 Ge Y, Qi Z H, Wang Y, Liu X M, Li J, Xu J Y, Liu J Q, Shen J C. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 900 ~ 906

DESIGN OF GLUTATHIONE PEROXIDASE MIMICS BASED ON PROTEIN SCAFFOLDS

ZHANG Chunqiu, LUO Quan, LIU Junqiu

(*State Key Laboratory of Supramolecular Structure and Materials, Jilin University, Changchun 130012*)

Abstract Selenium (Se), known as an essential trace elements, is closely related to human health and diseases. This essential trace element exists in at least 25 selenoproteins in the form of selenocysteine residue, which performs a variety of biological functions. Among these selenoproteins, glutathione peroxidase (GPx) is a well-known antioxidant, since it catalyzes the reduction of harmful peroxide by glutathione and protects cells against oxidative damage. Herein, some strategies and methods are presented to construct GPx mimics based on protein scaffolds. Through these studies, we expect to gain better understanding of the biological properties of selenoprotein, and even develop more effective approaches to create new selenoprotein mimics.

Keywords Selenium (Se), Selenocysteine, Glutathione peroxidase (GPx)