

学校编号: 10384  
学号: 20120051302117

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

# 大黄鱼两种半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分子特征与功能研究

Research on Functions and Molecular Characters of Two  
Kind of Cysteine Proteinases Inhibitors in Large Yellow  
Croaker(*Pseudosciaena crocea*)

作者姓名 李淑英

指导教师姓名: 陈新华 研究员

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008年7月

论文答辩时间: 2008年7月12日

学位授予日期:

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：李淑英

2008年7月16日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在            年解密后适用本授权书。

2、不保密（  ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：        年    月    日

导师签名：

日期：        年    月    日

摘要 .....	iii
Abstract .....	v
一、前言 .....	1
二、材料与方法 .....	12
2.1 实验材料 .....	12
2.2 实验方法 .....	19
三、结果与分析 .....	30
3.1 大黄鱼 cystatin (Lycs) 克隆、表达与功能分析 .....	30
3.1.1 Lycs 全长基因分析 .....	30
3.1.2 大黄鱼 cystatin 基因组结构分析 .....	34
3.1.3 Lycs 在大黄鱼各个组织中的转录水平分析 .....	34
3.1.4 在免疫刺激下肾、脾和血中 Lycs 基因的转录水平分析 .....	35
3.1.5 大黄鱼免疫相关基因 TNF- $\alpha$ 和 IL-10 的克隆 .....	37
3.1.6 pGEX-4T-2-Lycs 原核表达载体的构建 .....	39
3.1.7 Lycs-GST 融合蛋白 (rLycs (GST)) 的表达与纯化及对木瓜蛋白酶抑制活力测定 .....	39
3.1.8 rLycs (GST) 对大黄鱼 TNF- $\alpha$ 和 IL-10 基因表达水平的调节 .....	41
3.1.9 小结 .....	42
3.2 Lycstefin 克隆、表达与功能分析 .....	44
3.2.1 大黄鱼 stefin (Lycstefin) 全长基因分析 .....	44
3.2.2 大黄鱼 stefin 基因的基因组序列分析 .....	46
3.2.3 Lycstefin 在大黄鱼各个组织中的转录水平分析 .....	46
3.2.4 在免疫刺激下肾、脾和血中 Lycstefin 基因的转录水平分析 .....	47
3.2.5 pGEX-4T-2-Lycstefin 原核表达载体的构建 .....	48
3.2.6 rLycstefin(GST)融合蛋白的表达、纯化和对木瓜	

---

蛋白酶抑制活性测定 .....	49
3.2.7rLycstefin (GST) 对大黄鱼 TNF- $\alpha$ 2 和 IL-10 的转录水平调 节 .....	50
3.2.8 小结 .....	51
<b>3.3 Lycstefin 和 Lyccys 的亚细胞定位 .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 抗体制备 .....	52
3.3.2 胶体金免疫标记 .....	52
3.2.3 小结 .....	57
<b>四、讨论 .....</b>	<b>59</b>
<b>参考文献 .....</b>	<b>63</b>
<b>发表文章 .....</b>	<b>74</b>
<b>致谢 .....</b>	<b>75</b>

## Table of Content

<b>Abstract (in Chinese)</b> .....	iii
<b>Abstract (in English)</b> .....	v
<b>一、 Introduction</b> .....	1
<b>二、 Materials and methods</b> .....	12
<b>2.1 Materials</b> .....	12
<b>2.2 Methods</b> .....	19
<b>三、 Results and Analysis</b> .....	30
<b>3.1 Cloning, expression and functional analysis of Lyc cystatin</b> .....	30
3.1.1 Analysis of Lyc cystatin cDNA .....	30
3.1.2 Analysis of Lyc cystatin genomic DNA .....	34
3.1.3 Analysis of the transcript Levels of Lyc cystatin in different tissues .....	34
3.1.4 Time-course analysis of the transcript Levels of Lyc cystatin in kidney, spleen and blood .....	35
3.1.5 Cloning of cDNA of TNF- $\alpha$ and IL-10 .....	37
3.1.6 Construction of pGEX-4T-2-Lyccys expression vector .....	39
3.1.7 Expression and purification of rLyccys(GST), detection of the special inhibitory rate of rLyccys(GST) against papain .....	39
3.1.8 Time-course analysis of the transcript Levels of Lyc TNF- $\alpha$ 2 and IL-10 injection with rLyccys(GST).....	41
3.1.9 Conclusion .....	42
<b>3.2 Cloning, expression and functional analysis of Lyc stefin</b> .....	44
3.2.1 Analysis of Lyc stefin cDNA .....	44
3.2.2 Analysis of Lyc stefin genomic DNA .....	46
3.2.3 Analysis of the transcript Levels of Lyc stefin in different tissues .....	46
3.2.4 Time-course analysis of the transcript Levels of	

Lyc stefin in kidney, spleen and blood .....	47
3.2.5 Construction of pGEX-4T-2-Lycstefin expression vector .....	48
3.2.6 Expression and purification of rLycstefin (GST), detection of the special inhibitory rate of rLycstefin (GST) against papain .....	49
3.2.7 Time-course analysis of the transcript levels of Lyc TNF- $\alpha$ 2 and IL-10 injection with rLycstefin (GST) .....	50
3.2.8 Conclusion .....	51
<b>3.3 The intracellular localization of Lycstefin and Lycstefin .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Preparation of the monoclonal antibodies .....	52
3.3.2 The results of immune colloidal gold electron microscopy .....	52
3.3.3 Conclusion .....	57
<b>四、 Discussion .....</b>	<b>59</b>
<b>References .....</b>	<b>63</b>
<b>Papers .....</b>	<b>74</b>
<b>Acknowledgment .....</b>	<b>75</b>

## 摘要

Cystatin 是一类与半胱氨酸蛋白酶紧密结合的、可逆的天然抑制剂。因为这些半胱氨酸蛋白酶存在于所有生物体内，并参与多种生物学、病理学过程，所以 cystatin 对这些蛋白酶的功能调节尤其重要。在免疫系统中，cystatin 可调节组织蛋白酶活性和抗原提呈，诱导 TNF $\alpha$ 和 IL-10 的合成，并且刺激 IFN- $\gamma$  激活的鼠巨噬细胞产生 NO。我们在前期研究中，建立了一个 poLyI: C 诱导大黄鱼脾脏 Smart cDNA 文库，从中发现了两个编码不同半胱氨酸蛋白酶抑制剂的 EST 克隆，经测序比对后确定为大黄鱼 stefin 和 cystatin 类似物，同属于 cystatin 家族。

本文首先克隆了 1 个大黄鱼 cystatin 全长 cDNA。序列分析结果表明，大黄鱼 cystatin 全长 cDNA 包括 688 个核苷酸，编码一个 118 个氨基酸的蛋白，分子量 13kDa，推测其具有一个由 21 个氨基酸组成的信号肽序列。分别与鱼类、高等脊椎动物和线虫类有 27.1-45.9 %，30.0-31.7 %和 16.3-30.6%的序列一致性，其中与 pufferfish 的序列一致性最高，为 45.9 %。与人的 cystatin C 有 30.8% 的序列一致性，与鸡蛋白 cystatin 有 31.7%的序列一致性。大黄鱼 cystatin 也含有典型的 cystatin 家族保守结构域 GLy-GLy (25, 26)，QLVAG (69-73) 和 PW (106-107)。四个半胱氨酸残基，分别为 C<sup>56</sup>、C<sup>87</sup>、C<sup>98</sup> 和 C<sup>118</sup> 可能形成两对二硫键，维持其独特的空间结构。但大黄鱼的四个半胱氨酸残基中只有 3 个是与其它物种的位置是一致的，另有一个半胱氨酸残基 (C<sup>56</sup>) 向 N-端偏移，这有可能影响其空间结构的形成。另外，大黄鱼的 cystatin 蛋白氨基酸序列中也有 S<sup>52</sup>N<sup>53</sup> 残基，可能是抑制 Legumain 的活性位点。基因组分析表明，大黄鱼 cystatin 基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成，与人、小鼠和斑马鱼的 cystatin 基因组结构基本一致。RT-PCR 分析表明该基因在肠、鳃、心、肌、脾、肝、血和肾中为组成型表达，在脾和肾中的基因转录水平最高，在鳃、肌肉和血中最低。分别用三联灭活细菌疫苗或 poLy (I: C) 刺激后，该基因的 mRNA 水平在肾和脾中上调，在血中下调，但下调幅度不大。用 pGEX-4T-2 原核表达载体构建了大黄鱼 cystatin (GST) 重组表达载体，表达并纯化了重组 Lyccys (GST) 融合蛋白。以酪蛋白为底物，检测了该融合蛋白对 papain 的抑制比活力为 40 个抑制活力单位。用胶体金免疫标记电镜技术研究了大黄鱼 cystatin 蛋白在肾、脾组织的细胞内的定位情况。经检测表明，该蛋白主要分布在细胞质中，并附着于粗面内质网 (rER)，在胞内泡状



结构（如内质体或溶酶体）内有较多，细胞核内没有发现。用相对定量荧光 PCR 检测重组大黄鱼 cystatin 对免疫相关基因 TNF- $\alpha$  2 和 IL-10 的转录水平的调节作用。结果是大黄鱼 cystatin 能刺激大黄鱼脾和肾中 TNF- $\alpha$  2 和 IL-10 mRNA 水平的上调。因此认为大黄鱼 cystatin 可能具有与哺乳动物 cystatin 相似的免疫调节功能。

同时，我们也克隆了 1 个大黄鱼 stefin 全长 cDNA，包含 556 个核苷酸，编码一个 99 个氨基酸组成的蛋白，分子量约 11kDa。分别与鲑、牛、河豚、猪、虹鳟和斑马鱼的 stefin 蛋白有 47.5%, 47.5%, 46.1%, 42.7%, 38.0%, 38.0% 的序列同源性。与人和小鼠的 stefin A 和 B 蛋白分别有 43.0% 和 38.0%, 38.4% 和 32.0% 的一致性。编码的蛋白具有 stefin 家族的特征结构域，即 N-末端的 GLy<sup>6</sup>-GLy<sup>7</sup> 作用位点和一保守的 QLVAG (48-51) motif。基因组分析表明，大黄鱼 stefin 基因由 3 个外显子和 2 内含子组成，与人、小鼠和斑马鱼的 stefin 基因组结构基本一致。RT-PCR 分析表明该基因在肠、鳃、心、肌、脾、肝、血和肾中均有表达，其中在血和肾中的基因转录水平最高，在肠中最低。分别用三联灭活细菌疫苗或 poLy(I:C) 刺激后，该基因的 mRNA 水平在肾和脾中上调，在血中下调。用 pGEX-4T-2 原核表达载体构建了大黄鱼 stefin (GST) (Lycstefin(GST)) 重组表达载体，表达并纯化出有活性的 Lycstefin (GST) 融合蛋白。以酪蛋白为底物，检测了该融合蛋白对 papain 的抑制比活力为 42 个抑制活力单位。用相对定量荧光 PCR 检测重组大黄鱼 stefin 对免疫相关基因 TNF- $\alpha$  2 和 IL-10 的转录水平的调节作用。结果是大黄鱼 stefin 没有引起大黄鱼脾和肾中 TNF- $\alpha$  2 和 IL-10 mRNA 水平的变化。用免疫电镜技术研究了大黄鱼 stefin 蛋白在肾、脾组织的细胞内的定位情况。经检测表明，该蛋白主要散布在细胞质中，并不附着于粗面内质网 (rER)，在细胞核和胞内泡状结构（如内质体或溶酶体）内有少量分布。

关键词： 大黄鱼； stefin 基因； cystatin 基因； Papain； TNF- $\alpha$  2 基因； IL-10 基因； 细胞内定位。

## Abstract

Cystatins are natural tight-binding reversible inhibitors of cysteine proteases. Because these cysteine proteases exist in all living organisms and because they are involved in various biological and pathological processes, the control of these protease functions by cystatins is of cardinal importance. In the immune system, cystatins modulate cathepsin activities and antigen presentation. They also induce tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin 10 synthesis, and they stimulate nitric oxide production by interferon  $\gamma$ -activated murine macrophages. A spleen cDNA library of large yellow croaker was constructed by induction with poly I:C. There were two relative cysteine protease inhibitors found in two clones respectively, which were characterized to the members of the cystatin superfamily, after being sequenced and blasted. Three immune relative gene homologues of large yellow croaker were cloned from the spleen of large yellow croaker, which were tumor necrosis factor  $\alpha$ 1 (TNF- $\alpha$ 1), tumor necrosis factor  $\alpha$ 2 (TNF- $\alpha$ 2) and interleukin 10 (IL-10) homologue respectively.

In the present study, it was reported that a cloning from the spleen cDNA library from the large yellow croaker is a cystatin homologue (Lyccys), with 688 nucleotides (nt) encoding a protein of 118 amino acids (aa) with a 21aa signal peptide, 13kDa. The deduced protein shared 27.1-45.9%, 30.0-31.7% and 16.3-30.6% sequence identity to the sequences found in other fishes, some high vertebrates and some nematodes. The highest sequence identity of 45.9% was achieved by Lyccys and a cystatin from pufferfish. It shared 30.8%, 31.7% sequence identity to the sequences of human cystatin C and chicken egg white cystatin. The Lyccys contains typical conserved motifs of cystatin superfamily, a N-terminal Gly-Gly (25, 26), QLVAG (69-73) and a C-terminal PW (106-107) known to interact with the active site of family C1 cysteine peptidases. There was a conserved S<sup>52</sup>N<sup>53</sup> which may be the reactive site of Legumain, a cysteine endopeptidase causing limited proteolysis of precursor proteins and protein splicing. It had the structural arrangement of four conserved cysteine residues (C<sup>56</sup>, C<sup>87</sup>, C<sup>98</sup> and C<sup>118</sup>) with two disulfide bonds

towards the carboxyl terminus found in large known cystatins, however there is a cysteine residue (C<sup>56</sup>) in the different location from the others, which was removed to N-terminus. This may be affected the space structure and its biological functions. The genomic DNA sequence of Lycys was cloned and sequenced, constituting of three exons and two introns, sharing the similar genomic structure with human cystatin C, mouse cystatin C and zebrafish cystatin. Tissue expression profile analysis with reverse transcription-PCR showed that Lycys gene was constitutively expressed in all eight tissues (intestine, gill, heart, muscle, spleen, liver, blood and kidney) examined, although at a different level. The highest level of Lycstefin mRNA was detected in spleen and kidney, and the lowest in gill, muscle and blood. The transcript level of Lycys was increased in kidney and spleen, but decreased in blood after induction with polyI:C or inactivated trivalent bacterial vaccine, analysis by relative quantitative real-time PCR. The recombinant Lycys(GST) (rLycys(GST)) was expressed in *E.coli* BL-21, and purified. The inhibitory specific activity of rLycys(GST) against papain with the substrate casein was detected to be 40 U/mg. The intracellular localization of Lycys in kidney and spleen cells with immune colloidal gold electron microscopy was suggested that Lycys was only distributed in cytoplasm, mainly attached to rough endoplasmic reticulum (rER), large in vesicles (endosome or lysosome), not found in nuclei. The transcript levels of TNF- $\alpha$ 2 and IL-10 were increased in kidney and spleen of large yellow croaker by injection with rLycys(GST) through relative quantitative real-time PCR. It is speculated that the cystatin homologue of large yellow croaker probably play a cardinal immunomodulatory role similar to that of mammals.

On the other hand, we reported the cloning of a stefin gene homologue from the spleen cDNA library of large yellow croaker (*Pseudosciana crocea*), an economically important marine fish (Lycstefin). The full length cDNA of Lycstefin is 556 nucleotides (nt) encoding a protein of 99 amino acids (aa), with a putative molecular weight of 11 kDa. The deduced protein shares 47.5%, 47.5%, 46.1%, 42.7%, 38.0%, 38.0% sequence identity to the sequences found in pufferfish, cattle, takifugu, pig, rainbow trout and zebrafish, respectively; and 43.0%, 38.0%, 38.4% and

32.0% sequence identity to the sequences of human stefin A, human stefin B, mouse stefin A and mouse stefin B respectively. The deduced Lycstefin contains conserved activation Localization of N-terminal GLY<sup>6</sup>-GLY<sup>7</sup>, a conserved QLVAG(48-51) motif, which were found in all stefins. The Lycstefin genomic DNA sequence was cloned and sequenced, constituting of three exons and two introns, sharing the similar genomic structure with human stefin A, mouse stefin A and zebrafish cystatin B. Tissue expression profile analysis with reverse transcription-PCR (RT-PCR) showed that Lycstefin gene was constitutively expressed in all eight tissues (intestine, gill, heart, muscle, spleen, liver, blood and kidney) examined, although at a different level. The highest level of Lycstefin mRNA was detected in blood and kidney, and the lowest in intestine. The transcript level of Lycstefin was increased in kidney and spleen, but decreased in blood after induction with poly:I:C or inactivated trivalent bacterial vaccine, analysis by relative quantitative real-time PCR. The recombinant Lycstefin(GST) (rLycstefin(GST)) was expressed in *E.coli* BL-21, and purified. The inhibitory specific activity of rLycstefin(GST) against papain with the substrate caseins was detected to be 42 U/mg. The intracellular localization of Lycstefin in kidney and spleen with immune colloidal gold electron microscopy was suggested that Lycstefin was mainly distributed diffusely throughout the cytoplasm, and not attached to rough endoplasmic reticulum (rER). Little was found in nuclei and vesicles (endosome or lysosome). The transcript levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 were not changed in kidney and spleen of large yellow croaker by injection with rLycstefin(GST) through relative quantitative real-time PCR. So it is suggested that the stefin homologue of large yellow croaker couldn't modulate the transcript levels of TNF- $\alpha$  and IL-10.

Key words: Large yellow croaker (Lyc); Large yellow croaker stefin (Lycstefin); Large yellow croaker cystatin (Lycstefin); papain; Large yellow croaker tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Large yellow croaker interleukin 10 (IL-10); intracellular localization.

## 一、前言

### 1. 大黄鱼简介

大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* (Richardson), 属鲈形目, 石首鱼科, 俗名黄瓜鱼、黄花鱼, 为广温广盐性集群洄游鱼类, 是中国特有的地方性鱼种, 广泛分布于北起黄海南部, 经东海、台湾海峡, 南至南海雷州半岛以东。由于大黄鱼肉质细嫩、味道鲜美, 倍受消费者的欢迎, 是我国最重要的海水经济鱼类之一。近十多年来, 在科技工作者的不断努力和探索下, 先后成功突破了大黄鱼人工繁育、网箱养殖等难关, 使大黄鱼人工养殖得到迅速发展, 养殖生产规模不断扩大, 大黄鱼已成为我国海水网箱养殖数量最大的鱼种。然而随着大黄鱼养殖规模的扩大、养殖密度的提高、养殖环境的污染以及养殖管理相对滞后, 病害问题也就相继出现, 已成为制约大黄鱼养殖业持续稳定发展的主要因素。每年由各类病害造成的经济损失达数亿元人民币。到目前为止, 养殖大黄鱼的主要疾病有寄生虫病、细菌病和病毒病。目前主要使用抗生素。大量、盲目使用抗生素造成了药物残留、耐药性增加、污染环境等一系列不良后果[1]。所以从大黄鱼自身的抗病能力入手, 通过提高鱼体的自身免疫力来抵御病原微生物的侵袭是一个很好的途径, 本论文试图通过分析鉴定两种半胱氨酸蛋白酶抑制剂的对免疫系统的调节功能, 为探讨大黄鱼的免疫机制提供必要数据和初步研究。

### 2. 半胱氨酸蛋白酶

半胱氨酸蛋白酶是一组水解蛋白酶, 通过催化位点的活性半胱氨酸裂解肽链[2, 3]。有内肽酶和外肽酶两类。研究得最好的内肽酶是植物的木瓜蛋白酶(papain)。其它相关的酶有溶酶体组织蛋白酶B、H和L, 它们在胞内蛋白转换中起主要作用, 在不同的病理过程(如发炎和肿瘤浸润)中会从溶酶体中释放出来。半胱氨酸外肽酶有组织蛋白酶C, 也是在溶酶体中发现的。一般地, 半胱氨酸蛋白酶涉及胞内多肽和蛋白的代谢[4]、酶原和激素前体的加工[5, 6]、骨胶原的降解[7]和骨质的重吸收[8]。它们可能在肿瘤浸润和转移中恶性细胞[9]和感染中的微生物[10]所引起的组织渗透和破坏中起调节作用。半胱氨酸蛋白酶的蛋白水解过程还参与调节许多病毒蛋白的组装[11, 12], 如HIV-1病毒[13]。最近的研究表明, 它们还参与许多重要的细胞过程, 如抗原提呈[14]、凋亡、蛋白质加工[15], 以及几种病变如癌细胞扩散[16]、发炎[17]和神经退行性变[18]。这些过程中的蛋

白酶活性在蛋白表达水平受到高度调节，是通过调节酶原活性和内源抑制剂的表达来调节的。抑制半胱氨酸组织蛋白酶的天然抑制剂有cystatin、thyrophins 和一些丝氨酸蛋白酶抑制剂serpins[19-21]。

### 3. Cystatins

半胱氨酸蛋白酶的活性受自然存在的抑制蛋白如  $\alpha$ 2-巨球蛋白和 cystatin 抑制。这些抑制剂具有保护宿主组织免受来自宿主本身、细菌和病毒的半胱氨酸蛋白酶的破坏性水解[22]。第一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂是从鸡蛋白中分离并加以确认的。已表明该抑制剂能抑制 ficin、papain[23, 24]和组织蛋白酶 B、C[25]。‘cystatin’这一名称开始用于这种蛋白[26]。现已表明，该蛋白是木瓜蛋白酶超家族内其它半胱氨酸蛋白酶（如组织蛋白酶 H、L）的有效抑制剂[27]。随后，陆续从人和动物的组织和体液中[28, 29]、从植物（如水稻[30]和大豆[31]）中分离到 cystatin 蛋白。Cystatin 与半胱氨酸蛋白酶形成可逆的、紧密结合的等摩尔的复合体。这些特征被应用于利用 S-羧甲基化 papain 亲和层析法分离纯化 cystatin。

Cystatin超家族成员根据其定位、大小和多肽链的复杂性分为三个家族。Family 1（即stefin）主要在细胞内，有98个左右氨基酸（大小11kDa左右），没有二硫键，也没有糖基化侧链。人的cystatin A、B和鼠的cystatinA、B是这一家族的代表。Family 2（又称为cystatin）主要在体液中，但也存在于组织中。一般有120个左右氨基酸（大小在14kDa左右），有两个链内二硫键，并有一在胞外定位的信号肽[32]。cystatin C、D、E/M、F、S、SN、SA和鸡蛋白cystatin都属于该家族。有些II型cystatin（C、E/M和F）还能抑制哺乳动物的Legumain[33]，Legumain是一种天冬酰胺内肽酶（asparaginyl endopeptidase, AEP），cystatin 对该酶的作用位点不同于酶家族C1。已有研究表明AEP参与MHC II 约束的抗原提呈。Family 3（即kininogen）发现于血浆和哺乳动物的分泌物中。一般由三个cystatin 类结构域组成，这是由基因复制造成的。它们含有另外的二硫键，并有糖基化。

#### 3.1 cystatin 结构域：

有关cystatin的活性所需的精确结构是建立在鸡蛋白cystatin生物物理学研究的基础上的。在cystatin超家族中，反应位点通过非共价键结合并阻断蛋白酶活性位点，有3个较保守结构域与其对半胱氨酸蛋白酶抑制性有关。分别是：1)

N-末端的 Gly-Gly 或 Gly-Ala, 2) 中间部分的位于  $\beta$ -发夹环的 QXVXG (Glu-X-Val-X-Gly) 区域 (有些是 QXXXG 序列), 3) 位于 C-末端的第二个发夹环内的 PW (Pro-Trp) 残基。鸡蛋白 cystatin 已得到结晶, 其三维空间结构已得到阐明 [34]。一带状立体示意图表明: cystatin 分子主要有一个直接的 5 个弯曲  $\alpha$ -螺旋, 一个 5 股反向平行的  $\beta$ -折叠呈螺旋状环绕着  $\alpha$ -螺旋, 以及部分  $\alpha$ -螺旋几何形状的阑尾状片段 [35]。

鸡蛋白 cystatin X-射线晶体结构及 papain 绑定模型揭示了相互作用的可能模式 [34, 36]。在该模型中, cystatin 的三个结构域 (N-末端和两个发夹环 (hairpin Loop)) 在空间上相互靠近, 形成一个露出的楔形边缘, 靠近 papain 的作用位点, 并与其互补。后来确定的 stefin B (第一类 cystatin 抑制剂) 晶体结构, 在抑制剂与羧甲基化的木瓜蛋白酶 (papain) 形成的复合体中, 证实了该抑制剂一般模型, 并提供了更多的信息, 这包括抑制剂在结合位点的氢键和分子主链构象的细节 [37]。

### 3.2 人的 Cystatin C

Cystatin C 是木瓜蛋白酶家族的半胱氨酸蛋白酶尤其是组织蛋白酶 B、H、L、S 和某些溶酶体 caspases 如 Legumain 的强抑制剂, 其生化特征已得到很好的阐明。Cystatin C 在不同的组织都有广泛分布, 同时在胞外体液中普遍存在。而其与目标蛋白酶相关的繁杂功能预示着在蛋白水解相关的生物学过程中的多种作用, 最有可能是组织调节功能的基础 [38]。Cystatin C 在人的体液中为生理浓度, 是脑脊液中主要的半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 在脑的脉络丛中有较高的表达水平 (超过血液中的浓度的 5 倍)。尽管有大量的生化数据与其抑制剂特征有关, Cystatin C 在生理过程中所起的特殊作用已被证明的很有限。同样地, 据推测 Cystatin C 在骨的再吸收、动脉管壁的重塑、氧化压力诱导的神经细胞凋亡的调节中起作用 [38]。在非病理条件下, Cystatin C 在眼中以前体片段定位于不同的眼组织中, 在睫毛上皮细胞中的含量最高, 推测可能是这种蛋白在眼部体液中的主要来源。在较晚期的眼中, Cystatin C 主要专一地由视网膜色素上皮合成。在 mRNA 水平和蛋白质水平含量都很丰富, 且以成熟形式组成性的分泌 [39]。视网膜色素上皮分泌 Cystatin C 在体外达到极化水平, 这说明 Cystatin C 在玻璃膜 (Bruch's membrane, BM) 内或其周围至少有部分细胞外功能 [39]。

成熟的 Cystatin C 能通过三维结构域中的一个  $\beta$ -hairpin Loops 交换形成二

聚体或寡聚体，从而使其失去抑制剂活性。在体内，当出现该蛋白的N-末端缺失时，这种过程会得到加强；在体外，在变性前也会出现这种现象。Cystatin C的寡聚化有助于形成高度稳定的淀粉样纤维，这些淀粉样纤维主要沉积于脑动脉，与老年人的多种病理有关；尤其与患有阿尔茨海默病的病人脑中的淀粉斑块（amyloid plaques）的 $\beta$ 样淀粉前体蛋白一起。尽管很稀少，自然出现地L68Q突变体会显著加速含Cystatin C的淀粉体形成，而且是遗传性淀粉样变性病的脑出血的常染色体显性体的病因。除去这种构象相关的疾病，Cystatin C在其它中枢神经系统退变性过程（如帕金森氏病Parkinson's disease），还有血管疾病尤其是动脉硬化症和动脉瘤中的作用可归因于该抑制剂表达的变化，主要反应在其与目标组织蛋白酶的比例不均衡[38]。Cystatin C与眼睛病理学的惊人联系揭示一种Cystatin C参与发病机理的新机制[40]。

### 3.3 人的滤泡树突状细胞（FDC）中的stefin A

现已从表皮、多核粒细胞、肝和脾中分离出人的stefin A[41-44]。基因表达系列分析研究（SAGE）表明，在单核细胞中，受LPS刺激stefin A的合成下调[45]。在人的扁桃腺的生发中心（germinal centres, GC）的FDC细胞中也存在stefin A。与提呈抗原到T细胞的抗原提呈细胞不同，FDC并不内化、加工然后提呈抗原到MHC II上，而是提呈完整抗原到它们细胞表面[46, 47]。GC在二级淋巴器官的淋巴滤泡中形成，为T-细胞依赖的体液免疫应答提供一个基本的微环境[48, 49]。在GC内，抗原特异的B细胞高效地经历单克隆扩增、同体转化、体突变和亲和性成熟，最后产生浆细胞和记忆细胞[50-52]。只有具有最高亲和力B细胞受体（B cell receptor, BCR）的B细胞能结合FDC表面的完整抗原，并从FDC获得存活信号，而具有低亲和力BCR的B细胞和自身反应性B细胞克隆将通过凋亡途径清除[51]。GC B-细胞的凋亡主要由死亡受体途径诱导，通过caspase-8在CD95的死亡诱导信号复合体（death-inducing signaling complex, DISC）水平快速激活[53-55]。GC B-细胞的凋亡不仅依赖caspase还有内切核酸酶[56]和组织蛋白酶[57]。Van Nierop等人认为人的GC B-细胞的凋亡与溶酶体的去稳定有关，这由caspase-8的活性控制。CD40的络合能抵抗溶酶体去稳定化，还有结合了高亲和力的B-细胞的FDC能阻止溶酶体的泄漏和GC B-细胞的凋亡[58]。因此，他们推测除去caspase-8的抑制外，在附着于GC的B淋巴细胞内还存在另外机制抑制溶酶体的去稳定化：正如Van Eijk等所提出的，stefin A在FDC内高表达，可能在抑制凋亡上起作用[57, 59]。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库