

蛋白聚糖酶和骨关节炎

李 超¹, 曹永平², 关振鹏³, 黄德勇⁴, 葛子钢^{1△}

(1. 北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871; 2. 北京大学第一医院骨科; 3. 北京大学人民医院关节病诊疗研究中心; 4. 北京积水潭医院矫形骨科)

[关键词] 蛋白聚糖酶; 骨关节炎

[中图分类号] R684.3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-167X(2009)05-0611-03

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2009.05.026

骨关节炎是以关节软骨进行性破坏为主要特点的、最常见的老年疾病,70岁以上的人群患病率超过80%。骨关节炎是导致老年人丧失生活自理能力的主要病因之一,仅在美国就有十分之一的人口受到骨性关节炎困扰,80%的患者有一定程度的自主活动受限,25%的患者生活不能自理,每年造成直接经济损失约600亿美元。令人担忧的是,迄今为止尚无十分理想的治疗方法,对于骨关节炎的病因以及发病机制的研究有待进一步深入^[1-2]。

骨关节炎的发病是多因素综合作用的结果,这些因素包括:(1)先天性遗传因素;(2)力学上的重负以及炎性因子的干扰;(3)关节软骨细胞基因表达的变异;(4)发育缺陷、骨折等后天性病变引起。尽管迄今仍然未能证实哪种因素直接导致了骨关节炎,但科学家一致认为关节软骨细胞外基质的丢失是导致退行性骨关节炎和其他炎性关节炎的共同特征^[3-4]。关节软骨细胞基质主要由II型胶原和蛋白聚糖组成,它们占到细胞外基质干重的90%以上。II型胶原主要以三螺旋结构形式存在,从而为关节软骨提供骨架和弹性。蛋白聚糖富含很多亲水性的支链(如COO⁻等),能够吸引大量水和自由的金属离子,起到润滑和抗压作用^[5],并且蛋白聚糖像一把刷子一样覆盖在网状结构II型胶原的表面,从而起到保护II型胶原的作用。在体外只有在蛋白聚糖降解后II型胶原才开始缓慢降解^[6-7]。

基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)和蛋白聚糖酶(aggreganases)在关节软骨中对蛋白聚糖有降解作用,其中蛋白聚糖酶属于一类新的锌离子依赖的金属蛋白酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)家族。对蛋白聚糖起作用的基质金属蛋白酶包括MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13和MT1-MMP(MMP-14),这些酶都能在体外切断蛋白聚糖核心蛋白的Asn³⁴¹和Phe³⁴²位点^[8],同时基质金属蛋白酶MMPs还能降解关节软骨中的II型胶原;蛋白聚糖酶可以断裂蛋白聚糖核心蛋白球间区(即G1和G2区之间)的Glu³⁷³和Ala³⁷⁴位点,已有文献报道在骨关节炎患者的滑液中

能检测到Glu³⁷³和Ala³⁷⁴位点断裂的碎片^[9-12]。

ADAMTS-4和ADAMTS-5是主要的蛋白聚糖酶,在蛋白聚糖的丢失中起主要作用,可以认为它们在骨关节炎发病的过程中有着显著的作用。1999年Tortorella等^[13]克隆并纯化了ADAMTS-4/5,以后的大量研究表明,白细胞介素1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF α)可以调节ADAMTS-4的活性,然而近期研究发现,在体外培养缺失ADAMTS-5基因的小鼠时,加入诱导骨关节炎发生的因素后并未发生骨关节炎,从而证明ADAMTS-5在骨关节炎发病机制中起着更为重要的作用^[14]。本文主要对ADAMTS-4/5进行简要的回顾,并且总结它的调控机制,为治疗骨关节炎提供一定的理论基础。

1 ADAMTS-4/5的结构

ADAMTS-4/5是ADAMTS家族酶中最简短的两种酶,其结构主要包括前肽区、催化区、解聚素样区、血小板凝血酶敏感蛋白样序列1区(thrombospondin type-1 motif, TSP-1)、半胱氨酸富含区以及间隔区,而ADAMTS-5比ADAMTS-4多了1个血小板凝血酶敏感蛋白样序列2区(thrombospondin type-2 motif, TSP-2)^[15-16]。前肽区由约200个氨基酸残基构成,在接近前肽区C端有一个保守的半胱氨酸残基Cys,目前认为其可能构成“半胱氨酸开关”,与维持酶的非活性状态有关。在前肽区C端,还存在一个保守的RXK/RR序列,它可以被某些蛋白水解转化酶(如Furin等)识别,从而导致ADAMTS-4/5在细胞内即被激活。催化区大约由225个氨基酸残基构成,其中包含一段HEXGHXXGXXHD序列和一个锌原子,目前认为是它们构成了ADAMTS的催化中心。解聚素样区由约80个氨基酸残基构成,对这一区域的功能并不是很清楚。血小板凝血酶敏感蛋白样序列1区由约20个氨基酸残基构成,其中包含W(S/G)XW序列,该序列可以和肝素、硫酸角质素、硫酸软骨素等糖胺聚糖链结合,从而认为该系列为ADAMTS-4/5的结合位点。半胱氨酸富含区以及间隔区位于血小板凝血酶敏感蛋白样序列1区(thrombospondin type-1 motif, TSP-1)的C端,约含有10个保守的

半胱氨酸,目前还不清楚该区域的功能。

已有体外实验证明 ADAMTS-5 的活性明显高于

ADAMTS- 4^[17]。ADAMTS 对蛋白聚糖有 3 个主要的断裂位点(图 1)。

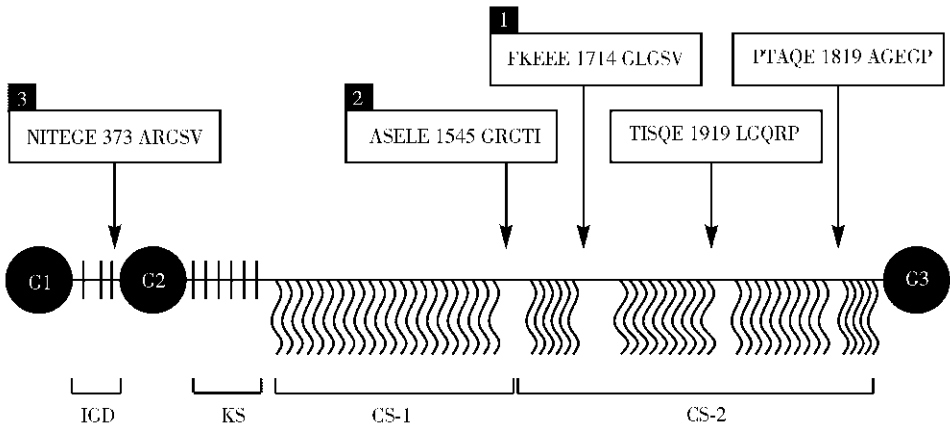


图 1 人蛋白聚糖酶对蛋白聚糖核心蛋白的断裂位点^[9-11,18]

Figure 1 Human's aggrecanase cleavage sites in the aggrecan core protein^[9-11,18]

ADAMTS- 4/5 最适宜的 pH 值为 7.0 ~ 9.0,离子浓度的改变也会影响 ADAMTS 的活性。随着离子浓度的改变,ADAMTS带正电荷的半胱氨酸结合区与蛋白聚糖带负电的硫酸软骨素区的结合会受到影响,从而改变了 ADAMTS 的降解活性。其中 ADAMTS- 4 的最佳 Na⁺浓度是 50 ~ 150 mmol/L,而 ADAMTS-5 的最佳 Na⁺浓度是 50 ~ 500 mmol/L。ADAMTS除了能够降解蛋白聚糖外,还证实能够降解 bioglycan 和 fibronectin 等小分子蛋白聚糖^[17]。

2 ADAMTS- 4/5 的调节

目前体外实验一般采用牛鼻软骨来判断蛋白聚糖酶的活性,因为牛鼻软骨中 80%的干重均为蛋白聚糖,便于蛋白聚糖的提取^[19],且其断裂位点跟人的断裂位点一致。然而体内 ADAMTS- 4/5 存在不同的调节机制,如抑制 TNF α 可以控制 ADAMTS- 4 的表达,但并不影响 ADAMTS-5 的表达^[20]。诱导分泌 ADAMTS-5 可能与细胞的种类、培养环境和各种炎症因子(如 1L-1 α 和 1L-1 β)、抑瘤素 M(oncostatin M, OSM)、TNF α 等有关。

除了细胞因子外,其他分子也可以调控 ADAMTS-5 的表达。半乳糖凝集素-3(galectin-3)是一种外源凝集素,可以在人软骨细胞形成时对 ADAMTS-5 的表达起很微弱的刺激作用^[21]。黏多糖也可以调控蛋白聚糖酶的活性,去糖基化的蛋白聚糖比蛋白聚糖难以被蛋白聚糖酶降解^[17],可以说明黏多糖对于酶的活性有影响,并且硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)和硫酸角质素(keratan sulfate, KS)可能就是蛋白聚糖酶的外结合位点区。虽然迄今为止未见报道糖基化对于 IGD 区域断裂位点的影响,但已有研究表明去糖基化明显降低了富含 CS 区域降解位点的降解^[17]。同时很多研究指出外源的黏多糖以及 CS 的聚合物可以抑制 IGD 区的降解^[22],尽管如此,KS 和 CS 具体怎样影响蛋白聚糖酶的活性还需要进一步的研究。

3 ADAMTS- 4/5 的抑制剂

ADAMTS-5 的抑制剂可以分为内源性抑制剂和外源性

抑制剂两大类,其中内源性抑制剂主要包括基质金属蛋白酶抑制因子-3(tissue inhibitor of metalloproteinases-3, TIMP-3)和 α 2-巨球蛋白(α 2-macroglobulin)。TIMP-3 是 ADAMTS- 4/5 强有效的抑制剂,虽然 TIMP-1, TIMP-2 和 TIMP-4 并不能够有效抑制蛋白聚糖酶,但是 TIMP-3 能够抑制 1L-1 α 和维甲酸刺激的蛋白聚糖酶活性^[23]。TIMP-3 能够紧密结合带负电荷的黏多糖,原因在于它的电性比蛋白聚糖酶强,从而与蛋白聚糖结合更紧密。同样 α 2-巨球蛋白也是一种内源性抑制剂,它是通过自身被蛋白聚糖酶 ADAMTS- 4/5 降解后,其降解产物结合蛋白聚糖酶从而抑制其活性^[24]。

正是由于 ADAMTS-5 的重要性,从而激发了大量科研工作者从事抑制剂的合成工作。30 年前人们普遍认为 MMPs 是破坏细胞外基质的主要酶,于是开发设计了一系列的抑制剂,但因为都伴随有较多的副作用,未取得成功。在蛋白聚糖酶被分离后,又出现了一系列的 ADAMTS-5 的抑制剂,有些可以作为 MMPs 的抑制剂同样也能够有效地抑制 ADAMTS-5 的活性,说明它们的催化中心可能具有相似性。一系列针对 ADAMTS 的抑制剂(如合成化学螯合剂)也正在开发中^[25],也有研究表明特定片段的多肽能够有效地结合 ADAMTS- 4/5,从而抑制酶的活性。

4 展望

骨关节炎的发病与蛋白聚糖酶的异常表达密切相关。从上游的信号通路调控到基因表达再到酶的表达,任何一个环节被阻断都有可能对关节炎的治疗有所帮助。在酶的表达这一环节来对抗骨关节炎应从 3 个方面着手:(1)深入理解各降解酶的作用时间、靶点、协同和调控因子;(2)开发特异性和阶段性对抗酶活性的制剂;(3)有效应用酶活性对抗技术。

ADAMTS- 4/5 作为两个最为重要的蛋白聚糖酶,已经成为科学家研究如何治疗骨关节炎的关键。软骨再生研究的领军人物、美国国立卫生研究所软骨和骨科研究部门负责人 Rocky Tuan 教授认为:如果预想组织工程软骨用于骨关节炎患者软骨缺损治疗具有更广泛的使用范围和更持久的修复

效果,突破性进展应该集中在软骨细胞前体细胞的使用和生物功能化的生物材料研究上,核心就是在传统软骨再生技术(细胞移植)基础上,将生物活性因子(如能找到对抗ADAMTS-4/5的特异性抑制剂)加入到传统支架材料中,制备出功能性的细胞支架,从而对抗骨关节炎对新生软骨的进一步破坏。希望能如 Rocky Tuan 教授所说的那样,最终将近年来有关骨关节炎的科学研究转化成为治疗手段,尽快在骨关节炎的治疗中取得突破。

参考文献

[1] 李思远,曹峻岭,师钟丽,等. 多聚蛋白聚糖酶与骨关节疾病[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 55-58.

[2] 沈继. 骨关节炎与基质金属蛋白酶及其抑制剂的关系[J]. 国外医学·骨学科分册[J]. 2002, 23(3): 152-154.

[3] Aigner T, Sachse A, Gebhard PM, et al. Osteoarthritis: Pathobiology-targets and ways for therapeutic intervention[J]. Adv Drug Delivery Rev, 2006, 58(2): 128-149.

[4] Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2006, 20(5): 1003-1025.

[5] Maroudas A. Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage[J]. Nature, 1976, 260(5554): 808-809.

[6] Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS-5: The story so far[J]. Eur Cell Mater, 2008, 15(1): 11-26.

[7] Pratta MA, Yao WQ, Decicco C, et al. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage[J]. J Biol Chem, 2003, 278(46): 45539-45545.

[8] Lee ER, Lamplugh L, Leblond CP, et al. Immunolocalization of the cleavage of the aggrecan core protein at the Asn(341)-Phe(342) bond, as an indicator of the location of the metalloproteinases active in the lysis of the rat growth plate[J]. Anat Rec, 1998, 252(1): 117-132.

[9] Hills R, Mazzarella R, Fok K, et al. Identification of an ADAMTS-4 cleavage motif using phage display leads to the development of fluorogenic peptide substrates and reveals matrilin-3 as a novel substrate[J]. J Biol Chem, 2007, 282(15): 11101-11109.

[10] Lee V, Chen LW, Paiwand F, et al. Cleavage of the carboxyl tail from the G3 domain of aggrecan but not versican and identification of the amino acids involved in the degradation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(25): 22279-22288.

[11] Tortorella MD, Pratta M, Liu RQ, et al. Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1 (ADAMTS-4) [J]. J Biol Chem, 2000, 275(24): 18566-18573.

[12] Zeng WL, Corcoran C, Collins-Racie LA, et al. Glycosaminogly-

can-binding properties and aggrecanase activities of truncated ADAMTS: Comparative analyses with ADAMTS-5, -9, -16 and -18 [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1760(3): 517-524.

[13] Tortorella MD, Burn TC, Pratta MA, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1; A member of the ADAMTS family of proteins [J]. Science, 1999, 284(5420): 1664-1666.

[14] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis [J]. Nature, 2005, 434(7033): 644-648.

[15] Jones GC, Riley GP. ADAMTS proteinases: A multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): 160-169.

[16] Porter S, Clark IM, Kevorkian L, et al. The ADAMTS metalloproteinases [J]. Biochem J, 2005, 386(1): 15-27.

[17] Gendron C, Kashiwagi M, Lim NH, et al. Proteolytic activities of human ADAMTS-5-Comparative studies with ADAMTS-4 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(25): 18294-18306.

[18] Sandy JD, Neame PJ, Boynton RE, et al. Catabolism of aggrecan in cartilage explants-identification of a major cleavage site within the interglobular domain [J]. J Biol Chem, 1991, 266(14): 8683-8685.

[19] Hascall VC, Sajdera SW. Proteinpolysaccharide complex from bovine nasal cartilage-function of glycoprotein in formation of aggregates [J]. J Biol Chem, 1969, 244(9): 2384-2396.

[20] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(6): R187.

[21] Guevremont M, Martel-Pelletier J, Boileau C, et al. Galectin-3 surface expression on human adult chondrocytes; A potential substrate for collagenase-3 [J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(6): 636-643.

[22] Munteanu SE, Ilic MZ, Handley CJ. Highly sulfated glycosaminoglycans inhibit aggrecanase degradation of aggrecan by bovine articular cartilage explant cultures [J]. Matrix Biol, 2002, 21(5): 429-440.

[23] Gendron C, Kashiwagi M, Hughes C, et al. TIMP-3 inhibits aggrecanase-mediated glycosaminoglycan release from cartilage explants stimulated by catabolic factors [J]. FEBS Lett, 2003, 55(3): 431-436.

[24] Tortorella MD, Arner EC, Hills R, et al. alpha(2)-Macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes [J]. J Biol Chem, 2004, 279(17): 17554-17561.

[25] Bursavich MG, Gilbert AM, Lombardi S, et al. Synthesis and evaluation of aryl thioxothiazolidinone inhibitors of ADAMTS-5 (Aggrecanase-2) [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2007, 17(5): 1185-1188.

(2009-05-08 收稿)
(本文编辑:刘淑萍)

Aggrecanases and osteoarthritis

LI Chao¹, CAO Yong-ping², GUAN Zhen-peng³, HUANG De-yong⁴, GE Zi-gang^{1Δ}

(1. Department of Biomedical Engineering, Peking University College of Engineering, Beijing 100871, China; 2. Department of Orthopedics, Peking University First Hospital; 3. Arthritis Clinic and Research Center, Peking University People's Hospital; 4. Department of Orthopedics, Beijing Jishuitan Hospital)

SUMMARY Osteoarthritis is mainly caused by the degenerative changes of cartilage and cartilage extracellular matrix, while Aggrecanases degrade Proteoglycans which are the major components of cartilage. This review includes three aspects: (1) We have concluded the major enzymes (ADAMTS-4 and ADAMTS-5) which regulate the metabolism of cartilage extracellular matrix. Meanwhile, we have summarized the structure of aggrecanases (ADAMTS-4 and ADAMTS-5) and introduced the function of each regional structure; (2) We have concluded the way cytokines and glycosaminoglycans regulate the metabolism of aggrecanases, and discussed the regulation and control principle of cytokines and glycosaminoglycan; (3) We have summarized the majority of inhibitors to the aggrecanases, introduced the endogenous inhibitors, and put our emphasis on the extrinsic inhibitors (chelating agents, polypeptides and so on). Through deeper research on the enzymes, it will help us further understand the pathogenesis of osteoarthritis, and open up new avenues to clinical treatment.

KEY WORDS Aggrecanases; Osteoarthritis