

DOI:10.13350/j.cjpb.221108

• 论著 •

十二指肠钩虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分离、 表达与活性研究*

邵正¹, 邓莉¹, 崔咏诗², 卢晓湧¹, 张菊英², 卢玲玲¹, 许琴英¹, 陈传¹, 何庆丰¹, 彭礼飞^{1**}

(1. 广东医科大学寄生虫学教研室, 广东湛江 524023; 2. 广东医科大学医学技术学院)

【摘要】 目的 分离、克隆十二指肠钩虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂 AduCPI1-AduCPI4 基因, 在大肠埃希菌中进行表达, 了解重组 AduCPI1-AduCPI4 对组织蛋白酶 (cathepsin, cat) 的抑制作用。方法 根据预测的 4 种编码 AduCPI 基因序列 (GenBank No JQ762416-JQ762419) 设计引物, 采用 PCR 技术从十二指肠钩虫成虫 cDNA 中扩增 AduCPIs 成熟蛋白编码基因, 并克隆、连接到表达质粒 pET32a-sumo, 构建重组原核表达载体。重组载体转入到 *E. coli* BL21 (DE3), 用 IPTG 诱导表达融合蛋白。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化破碎菌上清中的重组融合蛋白, 在纯化柱上用 SUMO 蛋白酶酶切融合伴侣, 收集穿透液获得纯化的重组目的蛋白, 采用 SDS-PAGE 分析蛋白表达及纯化情况, 采用酶活性抑制试验检测 4 种重组 AduCPI 对 catB、catL 和 catS 的抑制作用。结果 扩增并克隆获得了 4 种 AduCPI 的成熟蛋白编码基因, 构建的重组表达载体转化大肠埃希菌后表达相应蛋白, 经纯化获得重组 AduCPI1-AduCPI4。4 种 AduCPI 抑制 catS (0.5 nmol/L) (pH 6.5 或 7.4) 的 IC₅₀ 在 (0.60±1.13) nmol/L~(2.89±1.37) nmol/L, 抑制 catL (0.5 nmol/L) (pH 5.5) 的 IC₅₀ 在 (0.50±1.06) nmol/L~(1.42±1.07) nmol/L, 抑制 catB (0.5 nmol/L) (pH 6.0 或 7.4) 的 IC₅₀ 在 (5.24±1.03) nmol/L~(68.90±1.38) nmol/L, 其中以 AduCPI4 对 3 种组织蛋白酶的抑制作用最强, 而 AduCPI2 对 catS、catB (pH7.4) 的 IC₅₀ 分别为 (0.80±1.08) nmol/L 和 (68.90±1.38) nmol/L, 抑制作用效率差异较大, AduCPI2 对 catS 具有较好的选择性抑制作用。结论 克隆表达了 4 种 AduCPI, 该 4 种蛋白对组织蛋白酶 L 和 S 均具有很强的抑制作用, 对组织蛋白酶 B 的抑制作用也较强, 研究结果为进一步了解 AduCPIs 的生物学功能及其应用奠定了基础。

【关键词】 十二指肠钩虫; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂; 原核表达; 组织蛋白酶

【中图分类号】 R383.13

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)11-1278-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Nov.; 17(11):1278-1282.]

Isolation, expression and inhibitory activity of cysteine protease inhibitors (cystatins) of *Ancylostoma duodenale*

SHAO Zheng¹, DENG Li¹, CUI Yong-shi², LU Xiao-yong¹, ZHANG Ju-ying¹, LU Ling-ling¹, XU Qin-ying¹, CHEN Chuan¹, HE Qing-feng¹, PENG Li-fei¹ (1. Department of Parasitology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 2. School of Medical Technology, Guangdong Medical University) ***

【Abstract】 **Objective** To isolate, clone and overexpress AduCPI1-AduCPI4, the cysteine protease inhibitors of *Ancylostoma duodenale*, and detect their inhibitory activity on cathepsin B (catB), L (catL) and S (catS). **Methods** The primers were designed according to the predicted gene sequences encoding four AduCPIs (GenBank No JQ762416-JQ762419), and the nucleotide sequences encoding AduCPI1-AduCPI4 mature protein were PCR amplified from the *A. duodenale* cDNA, then ligated into pET32a-sumo to construct the recombinant plasmids, respectively. The 4 recombinant fusion proteins were inductively expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by IPTG, and purified by Ni-NTA affinity chromatography, respectively. The purified rAduCPI was obtained after cleavage of their fusion tag with SUMO protease on the resin bed. The protein expression and purification were analyzed by SDS-PAGE, and the inhibitory effects of rAduCPIs on catB, catL and catS were detected by microplate reader. **Results** The gene encoding 4 AduCPIs mature protein was amplified and cloned from the *A. duodenale* cDNA, respectively, and each rAduCPI was successfully expressed and purified in *E. coli*. These four AduCPIs inhibited catS (0.5 nmol/L) (pH 6.5 or 7.4) with IC₅₀ of (0.60±1.13) nmol/L - (2.89±1.37) nmol/L, inhibited catL (0.5 nmol/L) (pH 5.5) with IC₅₀ of (0.50±1.06) nmol/L -

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 31101639); 广东省高等学校特色创新科研项目 (No. 2015KTSCX050); 广东医科大学科技创新团队项目 (No. STIF201107)。

** **【通讯作者】** 彭礼飞, E-mail: lifpeng@hotmail.com

【作者简介】 邵正 (1984-), 男, 湖北黄冈人, 硕士, 实验师。研究方向: 寄生虫蛋白酶抑制剂及其应用。E-mail: shaozheng@gdmu.edu.cn

(1.42±1.07) nmol/L, and inhibited catB (0.5 nmol/L) (pH 6.0 or 7.4) with IC₅₀ of (5.24±1.03) nmol/L - (68.90±1.38) nmol/L, of which AduCPI4 was the most effective inhibitor in inhibiting cathepsin B, L and S, while the IC₅₀ of AduCPI2 on catS and catB (pH7.4) was (0.80±1.08) nmol/L and (68.90±1.38) nmol/L, respectively, which showed differences in inhibition efficiency, and AduCPI2 had a selective inhibitory effect on catS. **Conclusion** Four AduCPIs were cloned and expressed in this study, and all these AduCPIs are highly potent inhibitors of cathepsin L and S, and strong inhibitors of cathepsin B. The results of this study lay the foundation for further understanding of the biological function of AduCPIs and their application.

【Key words】 *Ancylostoma duodenale*; cystatin; prokaryotic expression; cathepsin

半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin, 或称 cysteine protease inhibitor, CPI)是一类在生物中普遍存在的蛋白质家族,其可紧密并可逆地结合半胱氨酸蛋白酶而抑制半胱氨酸蛋白酶活性^[1]。cystatin 在线虫、吸虫、绦虫、原虫等寄生虫中广泛分布,寄生虫的 cystatin 可通过抑制抗原提呈细胞中的抗原加工和呈递、调节细胞因子和一氧化氮的产生、抑制 T 细胞的增殖、抑制模式识别受体等方式参与调控宿主的免疫功能,因此, cystatin 被认为是寄生虫参与调节宿主免疫的重要因子^[2-5]。十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)是重要的人体寄生钩虫之一,其成虫可在人体小肠寄生 1 年左右,长者可达 5 年以上,目前对十二指肠钩虫体内的 cystatin 是否可能作为免疫调控因子还不了解。作者前期进行了十二指肠钩虫转录组高通量测序,分析预测成虫体内至少有 4 种十二指肠钩虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂(*Ancylostoma duodenale* cysteine protease inhibitor, AduCPI)基因(GenBank No JQ762416~JQ762419)的转录表达。本实验在此基础上进一步对各 AduCPI 基因进行分离、克隆,并制备重组 AduCPI (rAduCPI),研究 AduCPI1-AduCPI4 对人组织蛋白酶 B (cathepsin B, catB)、L (catL)和 S (catS)酶活性的抑制作用,为进一步了解 AduCPIs 的生物学功能提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株与十二指肠钩虫成虫 cDNA 大肠埃希菌(*E. coli*) DH5 α 及 *E. coli* BL21 (DE3)为本室保存;原核表达质粒 pET32a-sumo 为本室改造而成^[6];十二指肠钩虫成虫 cDNA 为本室制备并保存于-80 °C 中^[7]。

1.2 主要试剂和仪器 限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Hind* III, DNA 及蛋白分子质量标准购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 扩增和 PCR 产物纯化、DNA 凝胶回收和质粒提取试剂盒, Bradford 蛋白浓度测定试剂盒以及 pfu 酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司;镍亲和层析树脂 Ni-NTA 购自美国 GE 公司;人肝 catB 和 cat L、人 catS 以及相应荧光底物 Z-Arg-

Arg-AMC · 2HCl、Z-Phe-Arg-AMC · HCl、Mca-Gly-Arg-Trp-Pro-Pro-Met-Gly ~ Leu-Pro-Trp-Glu-Lys (Dnp)-D-Arg-NH₂ 均为德国 calbiochem 公司产品;重组 SUMO 蛋白酶为本室制备。

2 方法

2.1 PCR 引物设计与合成 根据在 GenBank 中登记的 AduCPI 基因序列(GenBank No JQ762416~JQ762419)设计表达成熟蛋白编码序列的扩增引物,其中包括扩增 AduCPI1 成熟蛋白基因所需的 1 条 5' 端巢式外引物 CPI1-3(表 1)。

表 1 表达 AduCPIs 成熟蛋白基因的 PCR 引物
Table 1 Amplification primers for expression of mature AduCPIs

目的蛋白 Protein	引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')
AduCPI1	CPI1-3	ATGCCAGAGCTTGCCCTCGTCGTC
	CPI1-1e	CCgaattcCAAGTGATGCCTGGAG
	CPI1-2e	GCaagcttCTCAAGCAGAAACGTC
AduCPI2	CPI2-1e	CCgaattcCAAGTGATGACTGGAG
	CPI2-2e	同 CPI1-2e
AduCPI3	CPI3-1e	CCgaattcCAAATGGCGGGAGGAC GCaagctt
	CPI3-2e	AAGGAGGCCGTTAGATTTG
AduCPI4	CPI4-1e	CCgaattcATGATGACCGGTGGTG
	CPI4-2e	GCaagcttAGAGTTGTTCTCCGGC

注:“gaattc”和“aagctt”分别为限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,1e 为上游引物,2e 为下游引物。

2.2 基因克隆及重组表达载体的构建与鉴定 以表 1 中对应引物分别直接从十二指肠钩虫 cDNA 中扩增 AduCPI2-AduCPI4 成熟蛋白编码序列。对 AduCPI1 而言:首先以 CPI1-3、CPI1-2e 引物配对从虫体 cDNA 中扩增获得第一轮 PCR 产物,再以第一轮 PCR 产物为模板,以 CPI1-1e、CPI1-2e 为配对引物 PCR 扩增获得 AduCPI1 成熟蛋白编码序列。PCR 反应体系总体积 50 μ L,其中包括十二指肠钩虫 cDNA 或 AduCPI1 基因第一轮 PCR 产物 1 μ L。PCR 反应条件:94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 个循环。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。成熟蛋白编码序列 PCR 产物经纯化后用 *EcoR* I 和 *Hind* III 37 °C 双酶切 2 h,酶切产物回收后连接入原核表达质粒 pET32a-sumo,连接产物转化入 DH5 α 。经测序鉴定,分别获得 4 种 AduCPI 成熟蛋白的重组表达载体。用 Clustalw 程

序对 4 种 *AduCPI* 及人胱抑素 (cystatin c) 进行氨基酸序列比对,用 Blastp 在线程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索氨基酸相似性序列。

2.3 重组蛋白的诱导表达、分离与纯化 方法参照文献[8]。经鉴定正确的重组表达载体转化 *E. coli* BL21(DE 3)后,用 IPTG 诱导表达重组融合蛋白表达。离心收集菌体,冰浴上超声破碎菌体, Ni-NTA 亲和纯化上清中的可溶性融合蛋白,在纯化融合蛋白的层析柱上加入 SUMO 蛋白酶,于 4 °C 酶切 2 h,收集穿透液以获得切割融合伴侣的目的蛋白。15% SDS-PAGE 分析蛋白表达及纯化蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度后保存于 -20 °C 备用。

2.4 抑制组织蛋白酶活性测定 参照文献[9]和[10]。100 μL 反应体系中包括 10 μL Buffer 或 *rAduCPI*, 50 μL 组织蛋白酶 B、L 或 S (37 °C 孵育 15 min,终浓度为 0.5 nmol/L), 40 μL 荧光底物 (37 °C 孵育,终浓度 4 μmol/L)。检测组织蛋白酶 B、L 或 S 蛋白酶活性用的底物分别为: Z-Arg-Arg-AMC · 2HCl, Z-Phe-Arg-AMC · HCl, Mca-Gly-Arg-Trp-Pro-Pro-Met-Gly ~ Leu-Pro-Trp-Glu-Lys (Dnp)-D-Arg-NH₂, 激发波长 (λ_{ex}) 分别为 380、380、340 nm, 发射波长 (λ_{em}) 分别为 460、425、405 nm, 反应体系 Buffer 的 pH 值分别为 6.0、5.5、6.5, 或三者同为 7.4。操作方法:加入底物混合后于 Cytation 5 型多功能酶标仪 (Bio Tek, 美国) 分别检测 λ_{em}, 5min 后再次检测 λ_{em}, 两次 λ_{em} 的差值即为 5 min 的反应速度。V₀ 为对照组反应速度, V 为加入各 *rAduCPI* 后的反应速度, 每个反应速度均平行检测 3 孔。检测不同浓度下 (7~8 个浓度) 的 *rAduCPI* 对组织蛋白酶活性的抑制作用,用 GraphPad Prism 5 进行分析和拟合曲线,作图并求各 *rAduCPI* 抑制相应组织蛋白酶的 IC₅₀。

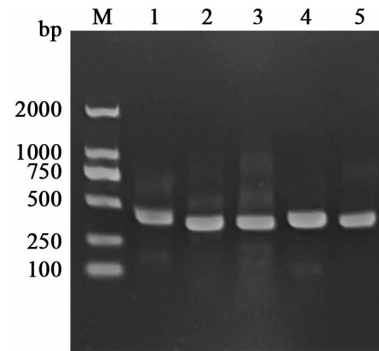
结 果

1 *AduCPIs* cDNA 序列的扩增

从十二指肠钩虫 cDNA 中扩增的 *AduCPI1*-*AduCPI4* 的 PCR 产物凝胶电泳见图 1, 其中各 *AduCPI* 成熟蛋白的 cDNA 大小均约为 360 bp, 以 *AduCPI1* 的巢式外引物 *CPI1-3* 与下游引物 *CPI1-2e* 配对扩增获得第一轮 PCR 产物大小约为 400 bp, 扩增产物大小均与预期相符。

2 *AduCPIs* 氨基酸序列

连接入重组质粒的 *AduCPI1*-*AduCPI4* 基因编码的蛋白氨基酸序列见图 2。 *AduCPI1* 和 *AduCPI2* 成熟蛋白由 118 个氨基酸组成, *AduCPI3* 和 *AduCPI4* 成熟蛋白由 123 个氨基酸组成。



M DNA 标志物 (DL2000) 1 *AduCPI1* 第一轮扩增 cDNA 2 *AduCPI1* 3 *AduCPI2* 4 *AduCPI3* 5 *AduCPI4*

图 1 从十二指肠钩虫 cDNA 中扩增 *AduCPIs* 成熟蛋白编码基因
M DNA marker (DL2000) 1 The 1st round PCR products for amplification of *AduCPI1* 2 *AduCPI1* 3 *AduCPI2* 4 *AduCPI3* 5 *AduCPI4*

Fig. 1 Amplification of the genes encoding *AduCPIs* mature protein from the *A. duodenale* cDNA

<i>AduCPI1</i> .pro	-----QVHSGVMTQDPSPDPEYMKKAWKAATVLTNEK-SNLN-YLWVPIKVEKADTQVAVGKRYTF	58
<i>AduCPI2</i> .pro	-----QVHSGVMTQDPSPDPEYMKKAWKAATVLTNEK-SNLN-YLWVPIKVEKADTQVAVGKRYTF	58
<i>AduCPI3</i> .pro	-----QVHSGVMTQDPSPDPEYMKKAWKAATVLTNEK-SNLN-YLWVPIKVEKADTQVAVGKRYTF	59
<i>AduCPI4</i> .pro	-----QVHSGVMTQDPSPDPEYMKKAWKAATVLTNEK-SNLN-YLWVPIKVEKADTQVAVGKRYTF	59
Cystatin c.pro	SSPGKPPRLVSGPMDASVEE-EGVRRALDFAVGEYKASND-MYHSRALQVVRARQIVAGVNYFL	64
<i>AduCPI1</i> .pro	EVLFGQSECNKGGDVEPIKLTATANCQLIPMSRRLYKVELWEKFWNFQYTVTKIKDVA	118
<i>AduCPI2</i> .pro	EVLFGQSECNKGGDVEPIKLTATANCQLIPMSRRLYKVELWEKFWNFQYTVTKIKDVA	118
<i>AduCPI3</i> .pro	EVLFGSECKKGGQVLDLSSANQLKANGSRALYKIELWEKFWNFQYTVTKIKDVA	123
<i>AduCPI4</i> .pro	EILFGSECKKGGQVLDLSSANQLKANGSRALYKIELWEKFWNFQYTVTKIKDVA	123
Cystatin c.pro	DVELGRTTCTKTQPNLDCPFHDQPHLKR--KAFCSFQIYAVWQGTMLLSKSTQDA	120

图 2 *AduCPIs* 及人 cystatin c 成熟蛋白氨基酸序列及比对
Fig. 2 Amino acid sequence and alignment of mature protein of *AduCPIs* and human cystatin c

如图 2, 4 种 *AduCPI* 成熟蛋白均有靠近 N 端的“GG”保守序列, *AduCPI1*、*AduCPI3* 和 *AduCPI4* 具有“QVAVG”和“PW”保守结构, 但 *AduCPI2* 对应序列为“QVAVGG”和“LW”。两两间氨基酸序列比较: 4 种 *AduCPI* 与人 cystatin c 序列一致性在 20.4%~24.8%; 除 *AduCPI1* 与 *AduCPI2* 之间序列一致性最高为 86.4% 外, 其他的 *AduCPI* 之间序列一致性为 55.6%~69.4%。与其他物种的 *CPI* 比较, *AduCPI1*、*AduCPI3* 和 *AduCPI4* 与预测的犬钩虫 (*A. caninum*) cystatin 结构蛋白 GenBank No RCN52890、GenBank No RCN47443 和 GenBank No RCN52887 具有最大一致性, 分别为 100/118 (85%)、122/123 (99%) 和 112/123 (91%), *AduCPI2* 与预测的锡兰钩虫 (*A. ceylanicum*) cystatin 结构蛋白 GenBank No EPB70528 具有最大一致性, 为 103/118 (87%)。

3 重组蛋白的表达、分离与纯化

测序结果表明编码 *AduCPI1*-*AduCPI4* 成熟蛋白的基因均成功连接入表达质粒, 即表达各 *AduCPI* 的原核表达载体构建正确。重组原核表达质粒转染 *E. coli* BL21 (DE3) 用 IPTG 诱导表达, 菌体超声破碎上清中检测到约 40 ku 的融合蛋白 (图 3)。Ni-NTA 柱亲和纯化的融合蛋白在层析柱上用 SUMO 蛋白酶酶

切除去融合伴侣后,收集穿透液得到的目的蛋白 rAduCPI1~rAduCPI4 大小约 14ku,融合标签大小约为 29.0 ku,分子质量与预期一致(图 3)。AduCPI3 和 AduCPI4 的分子质量略大于 AduCPI1 和 AduCPI2,与该两个蛋白的氨基酸序列较后两者多了 5 个氨基酸残基的特性相符。

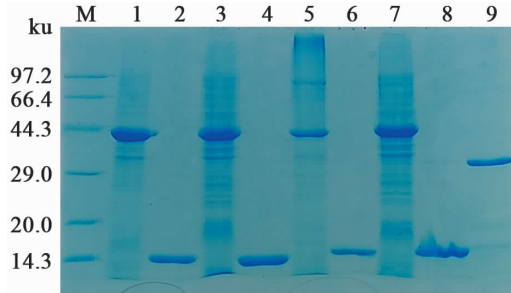


图 3 重组表达的 AduCPIs 及纯化的 rAduCPIs SDS-PAGE 分析
M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导的 pET32a-sumo/AduCPI1 转化菌的上清 2 纯化的 rAduCPI1 3 IPTG 诱导的 pET32a-sumo/AduCPI2 转化菌的上清 4 纯化的 rAduCPI2 5 IPTG 诱导的 pET32a-sumo/AduCPI3 转化菌的上清 6 纯化的 rAduCPI3 7 IPTG 诱导的 pET32a-sumo/AduCPI4 转化菌的上清 8 纯化的 rAduCPI4 9 融合标签

图 3 重组表达的 AduCPIs 及纯化的 rAduCPIs SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 Supernatant of pET32a-sumo/AduCPI1
2 Purified rAduCPI1 3 Supernatant of pET32a-sumo/AduCPI2
4 Purified rAduCPI2 5 Supernatant of pET32a-sumo/AduCPI3
6 Purified rAduCPI3 7 Supernatant of pET32a-sumo/AduCPI4
8 Purified rAduCPI4 9 fusion tag

Fig. 3 Expression of AduCPIs and purified rAduCPIs

4 rAduCPIs 的酶活性检测

酶活性检测显示,4 种 AduCPI 对人 catB、catL 和 catS 的抑制作用均呈剂量依赖关系,其中对 catL 和 catS 有非常强的抑制作用,对 catB 有较强的抑制作用,以 AduCPI4 对该 3 种组织蛋白酶的抑制作用为最强(图 4)。

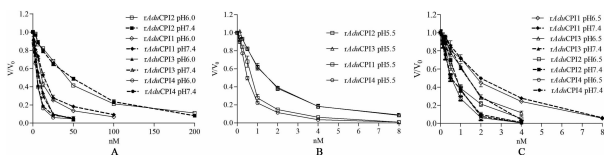


图 4 AduCPIs 对组织蛋白酶的抑制作用

A Cathepsin B B Cathepsin L C Cathepsin S

Fig. 4 Inhibitory effect of AduCPIs on cathepsin B, L and S

人 catB、catL 和 catS 分别在 pH 6.0、5.5 和 6.5,以及 catB 和 catS 在 pH 7.4 的反应体系中均有较快反应速度,但 catL 在 pH 7.4 时无明显反应速度(表 2)。catB 在 pH 7.4 时的反应速度约为其在 pH 6.0 时的 68.3%,catS 在 pH 7.4 时的反应速度约为其在 6.5 时的 81.3%。在设定的 pH 值下,AduCPI4 抑制 catL 和 catS(0.5 nmol/L)的 IC₅₀ 均低于(0.66 ± 1.27)nmol/L,抑制 catB(0.5 nmol/L)的 IC₅₀ 低于 6

nmol/L(表 2)。4 种 AduCPI 对 catB、catL 和 catS 的抑制效率有所不同,其中 AduCPI2 对 catS 的抑制作用效率远强于其对 catB 的抑制作用,在 pH 7.4 时,AduCPI2 抑制 catB 的 IC₅₀ 是其抑制 catS 的 80 多倍,而 AduCPI1 则对 catL 的抑制效率则高于其抑制 catB 和 catS 的效率。

表 2 AduCPIs 抑制组织蛋白酶的 IC₅₀
Table 2 IC₅₀ of AduCPIs on cathepsin B, L and S

组织蛋白酶 Cathepsin (0.5 nmol/L)	pH	空白组反应 速度 control (λem/min)	IC ₅₀ (nmol/L)			
			AduCPI1	AduCPI2	AduCPI3	AduCPI4
人组织蛋白酶 B	6.0	3087.87±14.95	12.14±1.06	40.72±1.09	8.59±1.04	5.24±1.03
人组织蛋白酶 L	7.4	2110.33±21.81	13.81±1.07	68.90±1.38	7.44±1.20	5.56±1.04
人组织蛋白酶 S	5.5	2765.13±22.79	0.71±1.07	1.42±1.07	1.32±1.07	0.50±1.06
人组织蛋白酶 B	7.4	10.27±16.59	/	/	/	/
人组织蛋白酶 S	6.5	616.20±30.30	2.28±1.24	0.83±1.20	1.32±1.16	0.60±1.13
人组织蛋白酶 S	7.4	500.87±6.50	2.89±1.37	0.80±1.08	1.50±1.13	0.66±1.27

注:“/”表示未检测。

讨论

寄生虫 cystatin 可能参与调节宿主的免疫作用,近年来得到了较大的关注。本研究对预测的 4 种 AduCPI 编码基因进行克隆,并表达、纯化获得了相应 rAduCPI。活性检测结果表明 4 种 AduCPI 均对人 catL 和 catS 有很强的抑制作用,IC₅₀ 在(0.60 ± 1.13) nmol/L~(2.89 ± 1.37) nmol/L;对 catB 有较强的抑制作用,IC₅₀ 在(5.24 ± 1.03) nmol/L~(68.90 ± 1.38) nmol/L。rAduCPI4 对 3 种组织蛋白酶酶活性的抑制作用均为最强,但 rAduCPI2 有较好的酶抑制作用选择性,其能高效抑制 catS 的酶活性,而对 catB 的抑制作用则弱得多,rAduCPI1 对人 catL 的抑制效率最高,而对 catB 和 catS 的抑制作用较弱。

cystatin 依据蛋白结构可分为 3 个亚家族,即 stefins(也称 1 型 cystatins),cystatins(也称 2 型 cystatins)和 kinogens(激肽原,也称 3 型 cystatins)。Stefins 由约 100 个氨基酸残基组成,无信号肽。2 型 cystatins 为约 120 个氨基酸组成的分泌性蛋白。3 型 cystatins 为由 3 个 2 型 cystatins 结构域组成的分泌性蛋白,长约 350 个氨基酸残基^[2-3]。cystatin c(也称胱抑素 c)是人体组织中表达最丰富的 2 型 cystatins 之一,线虫来源的 cystatin 多为 2 型 cystatins^[2],本研究中的 4 种 AduCPI 具有 2 型 cystatins 的保守结构特征。各 AduCPI 之间具有较高的序列同源性,而检索与 AduCPI 同源性最高的其他物种蛋白均为钩口线虫属的 cystatin 结构蛋白,提示钩口线虫属的 cystatin 具有较高的序列保守性。AduCPI1 和 AduCPI2 同源性最高,利用扩增 AduCPI1 成熟蛋白的引物(表 1)从虫体 cDNA 中直

接扩增的序列主要为 *AduCPI2* 编码基因,因此本研究设计了外引物 *CPI1-3*,进行两轮 PCR 扩增而获得了 *AduCPI1* 成熟蛋白编码基因。虽然 4 种 *AduCPI* 之间具有较高的序列同源性,但它们对 *catB*、*catL* 和 *catS* 的抑制作用效率却有明显差异,即具有一定的抑制选择性,影响上述抑制选择性的关键结构尚不清楚,值得进一步研究。

寄生线虫 cystatin 通常可抑制 *catB*、*catL* 和 *catS* 的酶活性^[2,11-13]。组织蛋白酶不仅在细胞内溶酶体发挥抗原呈递、蛋白质降解、蛋白质和脂质代谢、自噬、细胞应激信号和溶酶体介导的细胞死亡等生理功能,而且可通过溶酶体胞吐作用分泌到细胞外环境介导基质蛋白降解、细胞信号传导作用^[14-15]。大多数半胱氨酸类组织蛋白酶仅在弱酸性条件下具有酶活性,在中性和碱性环境中容易丧失活性,但 *catS* 在较宽泛的酸碱度下(pH 4.5~8)内均有较好的酶活性^[15]。本研究中的 4 种 *rAduCPI* 在 pH 6.5 和 pH 7.4 的条件下均对 *catS* 具有强抑制作用,也提示 *rAduCPI* 在正常人体生理 pH 7.35~7.45 下可发挥高效的抑制 *catS* 作用。在人体内,*catS* 与炎症、自身免疫性疾病、癌症、心血管疾病等的发生发展密切相关^[16],因此寻找针对 *catS* 的选择性抑制剂在 *catS* 相关疾病防治中具有应用前景。cystatin 通常可抑制多种半胱氨酸组织蛋白酶,即对组织蛋白酶的抑制选择性较差,而本研究中的 *AduCPI2* 能在一定程度上选择性抑制 *catS* 的特性可能使其在应用于 *catS* 相关疾病防治中具有优势。虽然对寄生虫 cystatin 可调节宿主免疫的作用已有大量研究,但 *AduCPIs* 在十二指肠钩虫寄生人体肠道过程中是否可能参与调节宿主的免疫功能,这 4 种 *AduCPIs* 是否具有不同的生物学功能,还需要深入研究。

总而言之,本研究从十二指肠钩虫成虫 cDNA 中克隆获得了 4 种 *AduCPI* 基因,通过原核表达系统制备了 *rAduCPIs*,通过体外活性实验明确了 *rAduCPIs* 对 *catL* 和 *catS* 具有很强抑制作用,对 *catB* 具有较强抑制作用,研究结果为进一步了解 *AduCPIs* 的生物学功能及应用奠定了基础。

【参考文献】

[1] Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins

[J]. *Biochem Soc Symp*,2003,(70):179-179.

- [2] Khatri V, Chauhan N, Kalyanasundaram R. Parasite cystatin: immunomodulatory molecule with therapeutic activity against immune mediated disorders[J]. *Pathogens*,2020,9(6):431.
- [3] 王泽祥,孙晓林. 寄生虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. *甘肃畜牧兽医*,2020,50(8):5-9.
- [4] Klotz C, Ziegler T, Dani? owicz-Luebert E, et al. Cystatins of parasitic organisms[J]. *Adv Exp Med Biol*,2011,712:208-221.
- [5] Gregory WF, Maizels RM. Cystatins from filarial parasites: evolution, adaptation and function in the host-parasite relationship [J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2008,40(6-7):1389-1398.
- [6] 崔宏娣,邵正,邓莉,等. Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 IsKuI-1 的原核表达、纯化及活性研究[J]. *中国生物工程杂志*,2014,34(12):30-35.
- [7] 陈耀哲,邓莉,邵正,等. 十二指肠钩虫抗凝肽 *AduNAP1* 的原核表达及其抗凝活性研究[J]. *中国病原生物学杂志*,2016,11(7):611-614.
- [8] 李海舰,赵曰霞,邓莉,等. 美洲钩虫纤溶酶抑制剂 *NaKuI10* 的表达与活性鉴定[J]. *中国病原生物学杂志*,2018,13(7):724-728.
- [9] Br? mme D, Steinert A, Friebe S, Biochem, et al. The specificity of bovine spleen cathepsin S. A comparison with rat liver cathepsins L and B[J]. *Biochem J*,1989,264(2):475-481.
- [10] Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, et al. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles[J]. *Neoplasia*,2008,10(5):481-488.
- [11] Mei G, Dong J, Li Z, et al. Structural basis for the immunomodulatory function of cysteine protease inhibitor from human roundworm *Ascaris lumbricoides*[J]. *PLoS One*,2014,9(4):e96069.
- [12] Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, et al. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing[J]. *Curr Biol*,2001,11(6):447-451.
- [13] 祝程诚,李宝钊,李舒婷,等. 重组广州管圆线虫半胱氨酸蛋白酶抑制剂(AcCystatin)的理化性质研究[J]. *热带医学杂志*,2013,13(6):669-673.
- [14] Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response [J]. *Nat Rev Cancer*,2015,15(12):712-729.
- [15] Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, et al. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions[J]. *Biochimie*,2008,90(2):194-207.
- [16] Smyth P, Sasiwachirangkul J, Williams R, et al. Cathepsin S (CTSS) activity in health and disease - A treasure trove of untapped clinical potential[J]. *Mol Aspects Med*,2022,88:101106.

【收稿日期】 2022-07-01 【修回日期】 2022-09-27