

胱硫醚 β -合酶与动脉粥样硬化

郑 斌 温进坤 韩 梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

主题词 胱硫醚 β -合酶; 同型半胱氨酸; 动脉粥样硬化

摘 要 高同型半胱氨酸血症是动脉粥样硬化的一个独立的危险因素, 其发生与胱硫醚 β -合酶基因突变所造成的酶活性下降有关。胱硫醚 β -合酶催化蛋氨酸循环过程中产生的同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚, 在调节血液同型半胱氨酸浓度方面起重要作用。本文介绍胱硫醚 β -合酶的结构、功能和活性调节等生物化学特性及其与动脉粥样硬化发生的关系。

最近几年的研究发现, 高同型半胱氨酸血症是导致心血管疾病的一个独立危险因素^[1,2]。同型半胱氨酸是蛋氨酸和半胱氨酸代谢过程中的一个中间产物, 在正常情况下, 胱硫醚 β -合酶(cystathionine beta-synthase, CBS)可使同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚^[3], 代谢掉多余的同型半胱氨酸。当 CBS 基因突变造成该酶活性下降时, 便引起同型半胱氨酸堆积, 导致高同型半胱氨酸血症。本文着重讨论 CBS 的结构、功能和活性调节及其与动脉粥样硬化发生的关系。

1 胱硫醚 β -合酶的结构和功能

1.1 结构特性

胱硫醚 β -合酶(CBS)是一个相对分子质量为 63×10^3 的同源四聚体, 是一种吡哆醛磷酸(PLP)依赖性的酶^[4,5], 其活性发挥需要血红素的存在^[6]。早期人们认为 CBS 是异源四聚体($\alpha_2\beta_2$), 由两对相对分子质量为 52×10^3 和 72×10^3 的亚基组成。纯酶的相对分子质量在 $90 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$ 之间^[7]。后来, Kraus 等^[8]发现, 从新鲜肝组织中提取的 CBS 经 9% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 出现一条 63×10^3 的区带或 63×10^3 和 48×10^3 的两条区带。提取物放置 7 日后, 在 63×10^3 的区带消失的同时, 48×10^3 的区带加深, 而且酶活性提高 2~3 倍。这一现象说明 63×10^3 向 48×10^3 发生了转换, 同时酶从非活性形式变成了活性形式。最近的研究报道, 经葡聚糖凝胶 G200 纯化的 CBS, 其相对分子质量为 94×10^3 , 由相对分子质量为 48×10^3 的两个相同的亚基组成。据推测, 造成 CBS 相对分子质量不同的原因是该酶有与其他蛋白质形成稳定复合物的趋势, 不同的提纯方法使与 CBS 结合的蛋白质丢失程度不同的缘故。目前大多数研究者普遍接受 CBS 是 63×10^3 的同源四聚体^[9,10]。

1.2 生理功能

胱硫醚 β -合酶(CBS)参与同型半胱氨酸代谢(图 1)。同型半胱氨酸是蛋氨酸循环的中间产物, 其代谢有 3 条途径: (1) 在 CBS 的催化下, 同型半胱氨酸与丝氨酸结合, 生成胱硫醚, 后者进一步分解为半胱氨酸和 α -酮丁酸; (2) 同型半胱氨酸在 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)的催化下, 以维生素 B12 为辅助因子, 由甲基四氢叶酸提供甲基甲基化生成蛋氨酸; (3) 可与 tRNA 错配, 生成 Hcy-tRNA, 后者再甲

基化为 Met-tRNA 参与蛋白质的合成。这种情况很少发生。当人体摄入过多的蛋氨酸时, S-腺苷蛋氨酸生成增多, 后者激活 CBS, 催化同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱硫醚, 同时抑制 MTHFR 的活性, 进而阻断蛋氨酸循环, 减少同型半胱氨酸的生成, 两种酶协调保持同型半胱氨酸含量的稳定^[11~13]。

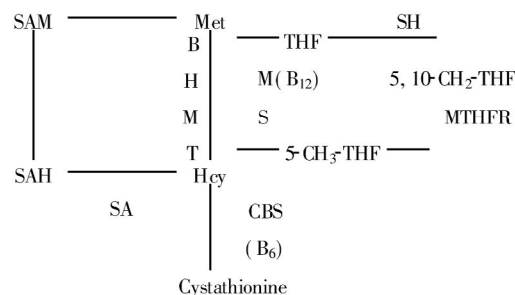


图 1. 蛋氨酸循环与同型半胱氨酸代谢

BHMT: 甜菜碱甲基转移酶; MS: 蛋氨酸合成酶; SH: 丝氨酸羧甲基转移酶; CBS: 胱硫醚 β -合酶; MTHFR: 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶

1.3 动力学特性

胱硫醚 β -合酶(CBS)发挥作用的最适温度为 37°C , 最适 pH 值范围很广, 在 pH 8.4~9.0 时活性最高, 因此在研究其动力学性质时常选这一范围。CBS 的等电点为 5.2 ± 0.1 ^[7~9,14]。纯酶在 37°C 、pH 8.6、同型半胱氨酸的浓度固定为 10 mmol/L 时, 酶与丝氨酸结合的 K_m 值为 1.15 mol/L, 如固定丝氨酸的浓度也为 10 mmol/L 时, 酶与同型半胱氨酸结合的 K_m 值为 0.59 mmol/L。但新鲜提取的 CBS 可被高浓度的同型半胱氨酸所激活, 使其对同型半胱氨酸的 K_m 值增高至 16.7 mmol/L, 这可能是因为高浓度的同型半胱氨酸存在的情况下, 酶的构象发生改变的结果^[7]。

1.4 吸收光谱

在 pH 6.5 的磷酸缓冲液中可见三个吸收峰, 分别为 280 nm、363 nm 和 427 nm(其中 363 nm 和 427 nm 的吸收峰是含 PLP 酶的特性), 1% 的纯酶溶液在 pH 6.5 时 280 nm 的吸光度为 10.35^[8]。

1.5 底物专一性

胱硫醚 β -合酶(CBS)具有胱硫醚合成酶的活性和丝氨酸转硫酶的活性。既可使同型半胱氨酸与丝氨酸缩合成胱

硫醚,又可使丝氨酸与胱硫醚缩合为半胱氨酸,纯酶胱硫醚合成的比活性为 160 ku/g,丝氨酸转硫酶的比活性为 28.1 ku/g^[14]。

1.6 酶的稳定性

该酶热稳定性好,50℃加热 5 min 酶活性无明显改变,62℃时酶活性开始下降,10 min 后酶完全失活。冷冻干燥不影响酶的活性。纯酶在 40% 甘油中或磷酸缓冲液(pH 6.8~8.0)中稳定,一般来说一个月内酶的活性不发生明显的变化^[7-9,14]。

1.7 基因定位

胱硫醚 β- 合酶(CBS)基因定位于 21q22.3,其 cDNA 已于 1992 年被克隆^[15]。大鼠 CBS 基因长 20~25 kbp,包括 17 个外显子,经转录后加工可形成四种长度不同的 mRNA (iv~Ⓢ): iv 型 cDNA 长 2 290 bp,含有一个短的 39 bp 的 5' 非翻译区,1 683 bp 的开放阅读框和 586 bp 的 3' 非翻译区,其编码 561 个氨基酸组成蛋白质,相对分子质量为 61.5×10^3 ; Ⓢ型 cDNA 长 2 248 bp,与 iv 型结构相似,仅在第 16 外显子中有 42 bp 碱基缺失。此二种形式在大鼠组织中含量丰富。Ⓢ型与 iv 型略有不同,不但 3' 和 5' 非翻译区存在差异,而且在编码区有 116 bp 的插入序列。Ⓢ与 Ⓢ型结构相似,只在 5' 非翻译区稍有不同。Ⓢ型和 Ⓢ型不是体内存在的主要形式^[16]。

从人类组织中可检出 5 种长度不同的 CBS mRNA。序列分析表明,这 5 种 mRNA 仅在 5' 非翻译区存在差异,因此其编码的 CBS 为同一类型。Northern blot 分析结果显示,CBS 基因在心、脑、胰、肺、肾、肝、骨骼肌和脾等多种组织中均有不同程度的表达,其中肝和胰脏含量最为丰富^[17]。

2 胱硫醚 β- 合酶的活性调节

2.1 酶原的活化

胱硫醚 β- 合酶(CBS)活化后生成 48×10^3 的二聚体。用胰酶消化 CBS 的氨基端,首先在 lys30、36 和 39 处发生断裂,生成 58×10^3 的四聚体。此种形式的酶极不稳定,但可被 S-腺苷蛋氨酸所激活^[10,12]。用胰酶处理羧基端,往往在 Arg413 处断开,形成 45×10^3 的亚基,此时四聚体解聚, 45×10^3 的两个亚基形成 85×10^3 的二聚体。这种结构相当稳定,可结合脂蛋白酯酶和血红素,并不再被 S-腺苷蛋氨酸激活。用胰酶消化过程中,CBS 的二级结构无明显改变,仍然存在 UV 和可见光的吸收光谱,但酶的催化活性明显增强,二聚体酶为四聚体的 2~3 倍。胰酶消化不改变 CBS 对丝氨酸的亲合力,但对含硫基底物同型半胱氨酸的 K_m 值却降低了 3 倍。另外这种结构的 CBS 对热的敏感性增强,在 50℃~65℃时,血红素吸收光谱显著下降,当温度进一步升高时,酶变性沉淀,而且是不可复性的^[15,10]。

酶的氨基端无保守性,在全酶中不起重要作用。人的 CBS 的氨基端是蛋氨酸,胰酶切除后不影响与 S-腺苷蛋氨酸、PLP 和血红素的结合,不改变吸收光谱。但羧基末端却起着重要的作用,它具有高度的保守性,可能与维持酶的四聚体形式和酶的活性调节有关,并有可能是 S-腺苷蛋氨酸的

激活位点^[10]。

2.2 酶活性的调节

S-腺苷蛋氨酸是蛋氨酸循环的重要调节物,可激活 CBS,使活性增强 3 倍,并可反馈抑制 MTHFR 的活性,从而抑制蛋氨酸循环,减少同型半胱氨酸的生成。同时,S-腺苷蛋氨酸通过提高 CBS 对丝氨酸和同型半胱氨酸的亲合力,加快同型半胱氨酸的清除。S-腺苷蛋氨酸浓度为 100 μmol/L 时 CBS 的活性最高,但是 S-腺苷蛋氨酸对由于基因突变所引起活性下降的 CBS 无明显的激活作用^[12]。

吡哆醛磷酸(PLP)是胱硫醚 β- 合酶(CBS)不可缺少的辅助因子^[4,5],在该酶的活性调节中起着重要的作用。已经证明,血浆中同型半胱氨酸的水平与维生素 B6 的浓度呈负相关,用维生素 B6 治疗高同型半胱氨酸血症可取得明显的疗效。

血红素是 CBS 的功能亚基,在 CBS 各亚基的折叠、结合及维持酶的空间结构方面起重要的作用。1 mol 63×10^3 的 CBS 与 1 mol 的血红素结合^[5,6,14],各亚基与血红素结合后才能发生折叠并与 PLP 结合,从而使酶激活。因此凡是影响血红素合成的因素均可以间接影响 CBS 的活性^[6]。

金属离子尤其是 Hg^{2+} 对 CBS 的活性有明显的抑制作用,10 μmol/L 的 Hg^{2+} 可使酶活性下降 53%,其它金属离子如 Cd^{2+} 、 Fe^{2+} 也对酶活性有明显抑制作用^[7]。

羟基胺对 CBS 活性有明显的抑制作用,1 mmol/L 的羟基胺可抑制 63% 的酶活性。金属螯合剂只有 PHYAN 对 CBS 有轻微的抑制作用,EDTA、次氨基三乙酸、8-羟基喹啉无抑制作用。对氯高汞苯甲酸是 CBS 的强效抑制剂,1 mmol/L 的对氯高汞苯甲酸可使酶活性下降 82%,但对 CBS 的抑制作用可被谷胱甘肽或二硫苏糖醇所缓解^[7]。

3 胱硫醚 β- 合酶与动脉粥样硬化

胱硫醚 β- 合酶(CBS)基因突变可导致 CBS 活性明显降低,引起高同型半胱氨酸血症。高同型半胱氨酸血症通过损伤血管内皮细胞^[19]、改变血液系统的凝固状态和血小板功能^[20]、刺激血管平滑肌细胞增殖^[21]和促进低密度脂蛋白氧化等参与动脉粥样硬化的发生发展过程。

3.1 胱硫醚 β- 合酶基因突变对酶活性的影响

利用聚合酶链反应-限制片长多态性等技术研究发现,CBS 基因中的突变位点至少有 80 个,它们多数分布在第 3 和第 8 外显子中,如 C341→T、G374→A、C434→T、C699→T、T1080→C、T833→C 和 G919→A 等,不同部位的突变对 CBS 活性的影响不尽相同。Gaustadnes 等^[15]通过对 CBS 基因突变杂合子进行限制片长多态性分析发现,CBS T833→C 和 C699→T 位点的突变往往同时发生,位于第 287 密码子的 T833→C 的突变,使其编码的异亮氨酸代替了苏氨酸,造成酶蛋白分子中 PLP 结合位点的构象变化,从而影响了酶与 PLP 的结合,在临床上表现为患者对维生素 B6 治疗不敏感。T1080→C 突变和第 4 外显子中 22 bp 的碱基丢失往往共存,后者引起的无义突变可使 CBS 活性完全丧失。第 307 密码子 G919→A 突变,使甘氨酸取代了丝氨酸,也可影响酶的活

性。总之, CBS 基因突变可引起剪切位点的改变、mRNA 稳定性的下降和酶蛋白构象的改变, 均可引起 CBS 活性下降或丧失, 导致高同型半胱氨酸血症, 后者参与了动脉粥样硬化的形成。

3.2 对动脉壁的毒性作用

各种原因造成的 CBS 活性下降, 均可使同型半胱氨酸代谢受阻而蓄积, 造成高同型半胱氨酸血症。高浓度的同型半胱氨酸可引起血管内皮损伤和以线粒体退化性变为特征的中层细胞的退化^[22], 造成这一病理变化的原因可能与过氧化物及氧自由基的产生、NAD⁺ 水平的下降^[19]、DNA 合成受阻以及花生四烯酸代谢的改变有关。已知同型半胱氨酸可在金属离子(Cu²⁺ 或 Fe³⁺) 存在下自身氧化产生 H₂O₂, 后者激活多(ADP-核糖) 聚合酶体系, 使 NAD⁺ 的水平下降, 进一步使内皮细胞的功能受损甚至死亡。因此, 正常活性的 CBS 对血管内皮具有保护作用, 从而阻止了动脉粥样硬化的发生。

3.3 与血液凝固性的关系

胱硫醚 β- 合酶(CBS) 活性下降所导致的高同型半胱氨酸血症可激活因子 vi 和因子 (v), 提高血液凝固性, 促进血栓的形成。高浓度的同型半胱氨酸可抑制内皮细胞血栓调理素活性, 使蛋白激酶 C 不能被活化, 降低了其清除因子 (v) 和因子 (II) 的能力, 使细胞抗凝功能下降。凝血- 抗凝系统的平衡失调, 可使血液出现血栓形成的倾向。另外, 同型半胱氨酸还可抑制 ADP 酶, 使 ADP 增多, 从而增强血小板的聚集能力, 提高血液粘稠性。它还可以抑制和干扰内皮细胞对硫酸肝素的合成, 使内皮细胞抗凝作用明显减弱^[20]。

3.4 与血管平滑肌细胞增殖

血管平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化的主要病理过程, 同型半胱氨酸可以诱导 c-fos、c-myc 基因和细胞周期调节蛋白(cd-c2) 的基因表达, 促进血管平滑肌细胞从 G₀ 期向 S 期转化。在体外培养的血管平滑肌细胞培养基中加入 0.1~1.0 mol/L 的同型半胱氨酸, 细胞的 c-fos 原癌基因表达明显增强, 同时 DNA 合成也明显增加^[21]。由于 CBS 可促进同型半胱氨酸的代谢, 因此, 可间接抑制血管平滑肌细胞的增殖。

综上所述, 发生突变的 CBS 基因可能是诱发动脉粥样硬化的易感基因。目前, 科研工作者已通过聚合酶链反应- 限制片长多态性等方法发现近 80 个 CBS 基因突变位点^[15], 这为动脉粥样硬化的基因治疗提供了新的线索。CBS 基因表达的调控机制目前还不甚明了, 高脂、高胆固醇是否可影响 CBS 基因的表达、其基因表达调控发生在什么水平、高脂饮食与高同型半胱氨酸血症致动脉粥样硬化之间有无相关性, 以及高同型半胱氨酸在致动脉粥样硬化中的地位, 这些都有待于进一步研究。

由于高同型半胱氨酸血症作为动脉粥样硬化的一个独立的致病因素, 这一理论已为大家所共识, 所以关于 CBS 的研究会越来越引起科研工作者的兴趣, 自 70 年代初兴起的 CBS 研究将会兴起一个新的高潮。

参考文献

- 1 Glueck CJ, Shaw P, Lang JE, et al. Evidence that homocysteine is an independent risk factor for atherosclerosis in hyperlipidemic patients. *Am J Cardiol*, 1995, **75**: 132- 136
- 2 Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 1991, **324**: 1149- 1155
- 3 Finkelstein JD, Martin JJ. Methionine metabolism in mammals. *J Biol Chem*, 1984, **259** (15): 9508- 513
- 4 Camp VM, Chipponi J, Faraj BA, et al. Radioenzymatic assay for direct measurement of plasma pyridoxal 5'-phosphate. *Clin Chem*, 1983, **29** (4): 642- 644
- 5 Kery V, Bukovaskat G, Kraus JP, et al. Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate. *J Biol Chem*, 1994, **269** (41): 25283- 288
- 6 Kery V, Elleder D, Greenberg DM, et al. 5-Aminolevulinate increases heme saturation and yield of human cystathionine β- synthase expressed in escherichia coli. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **316** (1): 24- 29
- 7 Kashiwamata S, Greenberg DM. Studies on cystathionine synthase of rat liver properties of the highly purified enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **212**: 488- 500
- 8 Kraus JP, Rosenberg LE. Cystathionine β- synthase from human liver: improved purification scheme and additional characterization of the enzyme in crude and pure form. *Arch Biochem Biophys*, 1983, **222** (1): 44- 52
- 9 Skovby F, Kraus JP, Rosenberg LE. Biosynthesis and proteolytic activation of cystathionine β- synthase in rat liver. *J Biol Chem*, 1984, **259** (1): 588- 593
- 10 Kery V, Poneleit L, Kraus JP. Trypsin cleavage of human cystathionine β- synthase into an evolutionarily conserved active core: structure and functional consequences. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **355** (2): 222- 232
- 11 Engbersen AMT, Franken DG, Boers GHJ, et al. Thermolabile 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet*, 1995, **56**: 142- 150
- 12 Kluijtmans LAJ, Boers GHJ, Stevens EMB, et al. Defective cystathionine β- synthase regulation by S-adenosylmethionine in a partially pyridoxine responsive homocystinuria patient. *J Clin Invest*, 1996, **98** (2): 285- 289
- 13 Kang SS, Wong PWK, Zhou JM, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. *Metabolism*, 1988, **37** (7): 611- 613
- 14 Kraus JP, Packman S, Fowler B, et al. Purification and properties of cystathionine β- synthase from human liver. *J Biol Chem*, 1978, **253** (18): 523- 528
- 15 Gaustadnes M, Kluijtmans LAJ, Jensen OK, et al. Detection of a novel deletion in the cystathionine β- synthase (CBS) gene using an improved genomic DNA based method. *FEBS letters*, 1998, **431**: 175- 179
- 16 Swaroop M, Bradley K, Ohura T, et al. Rat cystathionine β- synthase gene organization and alternative splicing. *J Biol Chem*, 1992, **267** (16): 11455- 461

- 17 Bao L, Vlcek C, Paces V, et al. Identification and tissue distribution of human cystathionine β - synthase mRNA isoforms. *Arch Biochem Biophys*, 1998, **350** (1): 95- 103
- 18 Tais MY, Garg U, Key NS, et al. Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria. *Atherosclerosis*, 1996, **122**: 69- 77
- 19 Blundell G, Jones BG, Rose FA, et al. Homocysteine mediated endothelial cell toxicity and its amelioration. *Atherosclerosis*, 1996, **122**: 163- 172
- 20 Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K, et al. Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 1381- 1386
- 21 陈光慧, 朱燕青, 张晨晖, 等. 同型半胱氨酸/ 半胱氨酸诱导血管平滑肌细胞中的新 cDNA. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14** (1): 8- 14
- 22 Matthias D, Becker CH, Riezler R, et al. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis*, 1996, **122**: 201- 216
- (此文 1999- 02- 12 收到, 1999- 07- 02 修回)
- (此文编辑 胡必利)