

不提高 PP1 和 Src 激酶间的亲和性。Src, Hck 及 Lck 之间的同源性分析表明,三者结构在 ATP 键合部位外有显著区别,但在 ATP 结合结构域内则较为相似,这说明抑制剂是结合于 ATP 结合裂口外的。因为活化的 Src 是多数癌症的一个标记,了解 PP1 对活性 Src 的抑制机制将有助于选择性 Src 激酶抑制剂的发现。目前,已经存在几种 MEK-1 的 ATP 竞争性抑制剂,但是,最近 Serono 发现在 MEK-1 分析范围内,AS701173 的抑制活性不依赖于 ATP 浓度。同样,PP1 抑制 Lck 时为 ATP 竞争性的,但是,在抑制 pp60<sup>src</sup>时却为非 ATP 竞争性的。筛选非 ATP 竞争性激酶抑制剂是一个特殊的挑战,因为分子结合机制目前还不清楚,这给合理设计带来一定困难。

### 6.2 ATP 竞争性激酶抑制物

与非 ATP 结合位点的序列变化相比,激酶的活性位点具有高度的保守性。关于底物的结合位点,酪氨酸激酶相对于丝氨酸/苏氨酸激酶具有更深的环和较小的相同区域。因此,大量的激酶抑制剂是基于妨碍底物结合的 ATP 竞争性抑制剂。它们相当于非选择性的 ATP 模拟分子或普遍存在的激酶抑制剂。ZM449829 是 ATP 竞争性 JAK3 抑制剂之一,它除了在一定程度上抑制酪氨酸激酶外,还可以抑制 T 细胞增殖。目前,还未有 JAK 激酶 ATP 结合

位点的结构信息。已经获得胰岛素受体激酶(IRK)和 BTK 等一些激酶的 ATP 结合位点结构信息。这些信息表明,一些重要的组分与活性状态构型有关,包括两裂片的闭合及 c-螺旋相对于 N 端裂片的位置。BTK 结构中的两裂片在 ATP 结合区域内采用关闭的构型。BTK 中 c-螺旋与活性位点的距离大于其在 IRK 三级复合物结构内的距离。

### 7 结语

JAK/STAT 抑制剂推动了作为抗癌、抗炎和抗移植植物排斥药物(酪氨酸激酶抑制剂)基础和临床研究的发展。目前,有几个酪氨酸激酶抑制剂已进入临床试验,但是还没有 JAK 激酶抑制剂进入临床试验的报道。一些有潜力的抑制剂,如 JAK3 抑制剂来氟米特(FK778)正处于临床前开发阶段。目前,用于 3D 结构分析的一种可选方案也为从基因组序列到直观知识的信息转换搭建平台,这可以在常规交叉性相关关系的基础上促进药物开发。抑制剂和靶标之间的结构和功能几乎没有相关性。这些相似的复合物不能通过相似的途径与靶标大分子相互作用。但是,人们期望当今快速发展的结构信息环境能为靶标蛋白结构的理论和试验性 3D 分析开创条件,这必将使药物设计变得更为轻松。

## 血小板糖蛋白 I b $\alpha$ 上血管性血友病因子结合域的研究进展

赵 莲, 苏 丽综述 王字玲审校  
(军事医学科学院输血研究所, 北京 100850)

**摘要:**血小板糖蛋白(GP) I b-IX-V 复合物与其配体、血管性血友病因子(vWf)的结合是止血和血栓形成的始动环节。GP I b-IX-V 复合物的 vWf 结合域存在于 GP I b 的  $\alpha$  亚单位的 N 端。至少有三个区域对 vWf 的结合有着重要的影响:富含亮氨酸重复序列、阴离子化的酪氨酸硫酸化序列和由 Cys209 和 Cys248 形成的二硫键环。了解 vWf 结合域对血小板代用品和抗血栓药的研究有着重要的意义,本文综述了此方面的研究进展。

**关键词:**血小板糖蛋白 I b-IX-V 复合物; 血小板糖蛋白 I b $\alpha$ ; 血管性血友病因子结合域

**中图分类号:**R331.1;Q71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2004)05-0284-04

在血管受损处形成血栓防止血液流失是机体的重要保护机制,而病理条件下的血栓形成则是不稳定性心绞痛、急性心肌梗死和中风等疾病发生的基

础。血栓形成包括两个基本过程:血小板粘附于受损血管的内皮组织及血小板的聚集。血小板糖蛋白(glycoprotein, GP) I b-IX-V 复合物与内皮组织中的血管性血友病因子(von Willibrand factor, vWf)的相互作用是以上过程的始动环节。GP I b-IX-V 复合物

收稿日期:2004-02-24

基金项目:国家“863”基金资助项目(2001AA216051)

表达在血小板表面(约 25 000 个拷贝/血小板),它并不能自发地识别 vWf。在流体系统中,该复合物仅在高切应力条件下(如动脉狭窄部位)由切应力诱导其与 vWf 结合;在非流体系统中,GP I b-IX-V 复合物与 vWf 的结合需要有诱导剂存在,或者 vWf 粘着在固体表面(如内皮组织)。目前认为,GP I b-IX-V 复合物与 vWf 的相互作用发生在 GP I b $\alpha$  的氨基端胞外段和 vWf 的 A1 区之间。这一区域除包含 vWf 的结合位点外,还包含 Mac-1、P-选择素(selectin)、 $\alpha$ -凝血酶(thrombin)、凝血因子 XI/II 和高分子量激肽原(kininogen)等的结合位点,所以是研究的重点。本文将从 GP I b $\alpha$  与 vWf 相互作用的角度出发,综述此方面的研究进展。

## 1 血小板 GP I b $\alpha$ 的结构和功能

GP I b $\alpha$  是 GP I b-IX-V 复合物的组成部分。表达于血小板膜的 GP I b-IX-V 复合物由 4 个不同的基因产物构成:以二硫键相连的 GP I b $\alpha$  和 GP I b $\beta$ ,以及非共价结合的亚单位 GPIX 和 GPV。这 4 种糖蛋白都属于富含亮氨酸蛋白家族,胞外区含一个或数个富亮氨酸重复序列,它们在血小板膜上的表达比例为 2:2:2:1。

GP I b $\alpha$  自 N 端开始,首先是一个球状区(His<sup>1</sup>-Glu<sup>282</sup>),其中包含 8 个富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeats, LRR),其两端分别是由二硫键形成的保守侧翼区(flank)<sup>[1,2]</sup>,与球状区相连的是一个类粘液素的巨糖蛋白区,之后是跨膜区和 100 个氨基酸残基的胞内段。紧邻 C 端侧翼区的下游有 3 个酪氨酸残基(276, 278, 279 位),它们在血小板受体复合物形成及哺乳动物细胞表达重组 GP I b $\alpha$  时在高尔基体中进行硫酸化。这些酪氨酸存在于一个带负电的阴离子序列中,使其适合在高尔基体中进行硫酸化。

GP I b-IX-V 复合物的主要功能是通过与 vWf 的结合引起血小板粘附,进而改变细胞骨架,引起血小板变形、移动、分泌、聚集和收缩等一系列变化。GP I b $\alpha$  是复合物中直接与 vWf 发生作用的部分。它们的相互作用是以上变化的始动环节。在病理性的和高切应力的条件下(如动脉硬化),这种相互作用则能引起血栓性疾病。

## 2 血小板 GP I b $\alpha$ 上与 vWf 结合相关的重要区域

以往的大量研究主要是为了寻找 vWf 的精确结合位点,GP I b $\alpha$  氨基端晶体结构及其与 vWf A1 区

共结晶结构的发现成为该领域的重要进展<sup>[1,2]</sup>。GP I b $\alpha$  与 vWf 直接接触的部位位于 N 端侧翼区(Ser<sup>11</sup>, His<sup>12</sup>, Glu<sup>14</sup>, Asn<sup>16</sup>)、富含亮氨酸重复序列区(His<sup>37</sup>, Glu<sup>128</sup>, Lys<sup>152</sup>, Asp<sup>175</sup>, Thr<sup>176</sup>, Phe<sup>199</sup>)和 C 端侧翼区(Glu<sup>225</sup>, Asn<sup>226</sup>, Tyr<sup>228</sup>, Ser<sup>241</sup>)。

### 2.1 富含亮氨酸重复序列区

LRR 是含一个或几个随机拷贝的保守区,每个随机拷贝中有 22~28 个氨基酸残基,其中亮氨酸残基的位次排列有一定的规律。GP I b $\alpha$  的 N 端 19~204 个残基内含有 8 个 LRR。研究表明,它们对 GP I b $\alpha$  与 vWf 的相互作用非常重要。

犬的 GP I b $\alpha$  在正常情况下不结合人的 vWf,所以利用人-犬嵌合蛋白可以研究 GP I b $\alpha$  不同区域的功能。用中国仓鼠卵巢癌(CHO)细胞表达 GP I b $\alpha$  的人-犬嵌合蛋白发现,第 2, 3 和 4 个 LRR 对 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合非常重要<sup>[3]</sup>。进一步的研究表明,第 1 个 LRR 对 GP I b $\alpha$  与 vWf 的粘附是重要的,但不是必需的,而第 2 个 LRR 是必不可少的,提示其可作为新型抗血栓药的靶标<sup>[4]</sup>。Cauwenberghs 等<sup>[5]</sup>发现,处于 GP I b $\alpha$  LRR 的 1~81 位残基与该区域以外的 201~268 位残基的相互作用对调节 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合是必不可少的。人血小板抗原(HPA)-2 是 GP I b $\alpha$  第 145 位氨基酸的突变,对其多态性与功能之间相互关系的研究发现<sup>[6]</sup>,该突变影响 N 端侧翼区和第一个 LRR 的构象,进而影响 vWf 的结合。Shimizu 等<sup>[7]</sup>应用突变技术发现, Glu<sup>125</sup> 与单克隆抗体的结合可以阻止 vWf 与 Glu<sup>128</sup> 的结合,提示新的结合位点的发现。

巨血小板综合征(Bernard-Soulier syndrome, BSS)是一种罕见的隐性遗传病,表现为轻中度血小板减少,巨大血小板和出血时间延长,其原因是 GP I b-IX-V 复合物或量上的缺陷。已报道的很多病例中 GP I b-IX-V 复合物的遗传学缺陷与 BSS 的表型相关,为认识 GP I b-IX-V 复合物的合成及功能提供了重要的信息。其中,GP I b $\alpha$  的遗传缺陷中有的与 LRR 的破坏有关。例如, LRR 中的氨基酸替换,如 A156V 和 L129P<sup>[8,9]</sup>,或氨基酸的缺失,如 169~180 位残基的缺失破坏了 LRR 的连续性<sup>[8]</sup>,成为 BSS 的发病原因。董京飞等<sup>[10]</sup>研究表明, A156V 突变的 GP I b $\alpha$  可以在 CHO 细胞中表达,其表达水平与野生型 GP I b $\alpha$  无明显差异。但抗体结合实验表明,突变使 N 端 35 个氨基酸残基的三维结构发生变化,导致突变型 GP I b $\alpha$  与固定的 vWf 间的结合较

野生型 GP I b $\alpha$  具有更快的解离速度,提示 LRR 中的氨基酸替换影响了 GP I b $\alpha$  与 vWf 的相互作用。

来自基因型为 Phe<sup>57</sup> 患者的血小板在利托菌素 (ristocetin) 诱导下聚集减弱,而突变并不影响 GP I b $\alpha$  的表达水平。而 L70F 作为与 L57F 邻近且类似的突变,却没有表现出利托菌素诱导下的聚集减弱<sup>[11]</sup>。研究者分析认为,突变是否影响 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合可能还与其在 LRR 上的位置有关,似乎  $\beta$ -片层结构比  $\alpha$ -螺旋结构对生理性止血中 vWf/GP I b $\alpha$  的相互作用影响更大。

除了亮氨酸保守的间隔排列外,几乎所有的 LRR 连贯序列的第 6 位都是天冬氨酸。Afshar-Kharghan 等<sup>[12]</sup> 研究发现,天冬氨酸在 GP I b $\alpha$  LRR 区的保守对多肽结构与功能的维持是重要的。其中第 1 个 LRR 中的天冬氨酸对 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合影响更为重要,说明 N 端的 LRR 可能更多地参与到 vWf 的结合中。

## 2.2 酪氨酸硫酸化区

酪氨酸硫酸化是 GP I b-IX-V 复合物发挥功能必不可少的翻译后修饰,能够加强和稳定切应力诱导的构象变化。三个酪氨酸残基分布于有利于硫酸化的 Glu<sup>269</sup>-Glu<sup>287</sup> 阴离子区域。276, 278 和 279 位酪氨酸在重组蛋白中发生完全硫酸化,在血小板的多肽中也基本上全部硫酸化,硫酸化与否在重组蛋白的表达中对 GP I b-IX-V 复合物的生成、聚合及膜表面的表达几乎没有影响,但在利托菌素和 botrocetin 诱导的 vWf 结合中是必不可少的<sup>[13, 14]</sup>。

另外,酪氨酸硫酸化发生的环境往往包含酸性较高的残基。对成熟 GP I b $\alpha$  蛋白的 Asp<sup>249</sup>-Asp<sup>287</sup> 高酸性区进行研究,发现这一区域对 botrocetin 诱导的 vWf 结合是必不可少的<sup>[14]</sup>。

## 2.3 二硫键环

Cys<sup>209</sup> 和 Cys<sup>211</sup> 分别与 Cys<sup>248</sup> 和 Cys<sup>264</sup> 相连,构成两个二硫键环,分隔了 LRR (His<sup>1</sup>-Ala<sup>200</sup>) 和带负电的酪氨酸硫酸化区域 (Asp<sup>269</sup>-Glu<sup>282</sup>)。人们对这一区域功能的认识与血小板型假性血友病 (platelet-type von Willebrand's disease, PT-vWD) 发病机制的揭示有关。该病是常染色体显性遗传病,患者出血时间延长,伴发性血小板减少。与 BSS 不同的是,突变型的 GP I b $\alpha$  表现出对 vWf 更强的亲和力,使患者的血小板在利托菌素诱导下聚集增强。已报道的两个突变型 G233V 和 M239V 均发生在二硫键环。Dong 等<sup>[15]</sup> 模拟天然突变进行人工突变,发现 Asn<sup>226</sup>-Ala<sup>244</sup> 区域调

节 GP I b $\alpha$  与 vWf 的亲和力。此外,在 BSS 的病例报道中,Cys<sup>209</sup> 突变为 Ser 破坏了二硫键的形成,影响了蛋白的正确折叠,使 GP I b $\alpha$  容易发生降解<sup>[16]</sup>。这些研究表明,二硫键及其形成的二硫键环,至少 Cys<sup>209</sup> 和 Cys<sup>248</sup> 形成的二硫键环对 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合是重要的。

## 3 结语

综上所述,GP I b $\alpha$  上不仅存在与 vWf 直接接触的部位,还有至少三个区域对调节 GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合是重要的:LRR,带负电的酪氨酸硫酸化区及 Cys<sup>209</sup> 和 Cys<sup>248</sup> 形成的二硫键环。GP I b $\alpha$  与 vWf 的结合是止血和血栓形成的始动环节,所以这些区域是新药开发的重要靶标。一方面,可以开发血小板代用品,治疗出血性疾病;另一方面,可以开发抗血栓药,有着极其广泛的应用前景。在该领域的研究中,需要进一步建立合适的研究体系模拟配体-受体的相互作用,以及血小板的粘附和滚动等活动。相信伴随 GP I b $\alpha$  晶体结构的逐步揭示,vWf 的结合域会越来越受到关注。

## 参考文献

- [1] Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, et al. Structures of glycoprotein I b $\alpha$  and its complex with von Willebrand factor A1-domain[J]. *Science*, 2002, 297(5584):1176 - 1179.
- [2] Uff S, Clemetson JM, Harrison T, et al. Crystal structure of the platelet glycoprotein I b $\alpha$  N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(38):35657 - 35663.
- [3] Shen Y, Romo GM, Dong JF, et al. Requirement of leucine-rich repeats of glycoprotein (GP) I b $\alpha$  for shear-dependent and static binding of von Willebrand factor to the platelet membrane GP I b-IX-V complex [J]. *Blood*, 2000, 95(3):903 - 910.
- [4] Arya M, Lopez JA, Romo GM, et al. Measurement of the binding forces between von Willebrand factor and variants of platelet glycoprotein I b $\alpha$  using optical tweezers[J]. *Lasers Surg Med*, 2002, 30(4):306 - 312.
- [5] Cauwenberghs N, Vanhoorelbeke K, Vauterin S, et al. Epitope mapping of inhibitory antibodies against platelet glycoprotein I b $\alpha$  reveals interaction between the leucine-rich repeat N-terminal and C-terminal flanking domains of glycoprotein I b $\alpha$ [J]. *Blood*, 2001, 98(3):652 - 660.
- [6] Ulrichs H, Vanhoorelbeke K, Cauwenberghs S, et al. von

- Willebrand factor but not alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein I b $\alpha$  is influenced by the HPA-2 polymorphism [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(7): 1302 - 1307.
- [7] Shimizu A, Matsushita T, Kondo T, *et al.* Identification of the amino acid residues of the platelet glycoprotein I b (GP I b) essential for the von Willebrand factor binding by clustered charged-to-alanine scanning mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(16): 16285 - 16294.
- [8] Margaglione M, D' Andrea G, Grandone E, *et al.* Compound heterozygosity (554-589 del, C515-T transition) in the platelet glycoprotein I b $\alpha$  gene in a patient with a severe bleeding tendency [J]. *Thromb Haemost*, 1999, 81(4): 486 - 492.
- [9] Antonucci JV, Martin ES, Hulick PJ, *et al.* Bernard-Soulier syndrome: common ancestry in two African American families with the GP I b $\alpha$  Leu<sup>129</sup>Pro mutation [J]. *Am J Hematol*, 2000, 65(2): 141 - 148.
- [10] 董京飞, Li C, Schade AJ, 等. 血小板糖蛋白 I b $\alpha$  因子突变(A156V)导致其与血管性血友病因子相互作用缺陷 [J]. *中华血液学杂志*, 2000, 21(9): 453 - 456.
- [11] Matsubara Y, Murata M, Moriki T, *et al.* A novel polymorphism, <sup>70</sup>Leu/Phe, disrupts a consensus Leu residue within the leucine-rich repeat sequence of platelet glycoprotein I b $\alpha$  [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 87(5): 867 - 872.
- [12] Afshar-Kharghan V, Gineys G, Schade AJ, *et al.* Necessity of conserved asparagine residues in the leucine-rich repeats of platelet glycoprotein I b $\alpha$  for the proper conformation and function of the ligand-binding region [J]. *Biochemistry*, 2000, 39(12): 3384 - 3391.
- [13] Dong JF, Berndt MC, Schade A, *et al.* Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein GP I b-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions [J]. *Blood*, 2001, 97(1): 162 - 168.
- [14] Tait AS, Dong JF, Lopez JA, *et al.* Site-directed mutagenesis of platelet glycoprotein I b $\alpha$  demonstrating residues involved in the sulfation of tyrosine 276, 278, and 279 [J]. *Blood*, 2002, 99(12): 4422 - 4427.
- [15] Dong J, Schade AJ, Rome GM, *et al.* Novel gain of function mutations of platelet glycoprotein I b $\alpha$  by valine mutagenesis in the Cys<sup>209</sup>-Cys<sup>248</sup> disulfide loop. Function analysis under static and dynamic conditions [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(36): 27663 - 27670.
- [16] Gonzalez-Manchon C, Larrucea S, Pastor AL, *et al.* Compound heterozygosity of the GP I b $\alpha$  gene associated with Bernard-Soulier syndrome [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(6): 1385 - 1391.

## 基于 PPAR 抗糖尿病药物的研究进展

张莉静<sup>1</sup>, 卢 曦<sup>2</sup> 综述

(1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2. 北京费森尤斯卡比医药有限公司, 北京 100004)

**摘要:** 过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)是核受体超家族成员,在控制脂肪的贮藏和分解代谢方面起着重要作用,其中,PPAR $\gamma$ 参与调节脂质的合成、碳水化合物的代谢及脂肪细胞的分化。基于PPAR $\gamma$ 的结构进行药物设计,开发了噻唑烷二酮(TZD)类抗糖尿病药物,该类药物中罗格列酮和吡格列酮均已上市,并获得了良好的效益。多种具有PPAR $\alpha$ /PPAR $\gamma$ 双重激动作用的化合物也合成出来,其中如TZD类的KRP-297,非TZD类的muraglitazar和naveglitazar等均在临床试验中表现出较好的降糖作用并具有调节血脂的作用,但此类化合物多处于临床试验阶段。另外,还开发了一些PPAR $\gamma$ 部分激动剂和部分拮抗剂,但对此类化合物的研究还处于初期研究阶段,它们的有效性和安全性还有待进一步的考察。

**关键词:** 过氧化物酶体增殖激活受体; 2型糖尿病

**中文分类号:** R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0287-05

过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是核受体超家族成员,

在控制脂肪的贮藏和分解代谢方面起着重要作用, PPAR存在3种亚型,即PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$ 和PPAR $\gamma$ ,通过结合特异的DNA序列来调节基因的表达。PPAR $\alpha$ 参与调节脂质分解酶的表达,而PPAR $\gamma$ 参与调节脂