

文章编号: 1004-0374(2010)05-0449-05

纤溶酶原在金黄色葡萄球菌感染中的作用

纪智星, 韩润林*

(内蒙古农业大学血浆脂蛋白免疫学研究中心, 呼和浩特 010018)

摘要: 金黄色葡萄球菌菌体表面有多种纤溶酶原受体, 包括次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶、核糖核苷酸还原酶、 α -烯醇化酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶等, 它们均可以与纤溶酶原结合。与细菌结合的纤溶酶原可被宿主的纤溶酶原激活剂(组织型纤溶酶原激活剂和尿激酶型纤溶酶原激活剂)或葡萄球菌属的纤溶酶原激活剂(葡激酶)激活为纤溶酶。细菌表面的纤溶酶有利于其降解宿主胞外基质, 穿越组织屏障, 因此哺乳动物的纤溶酶原可能在金黄色葡萄球菌感染宿主过程中起重要作用。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 纤溶酶原; 纤溶酶; 受体

中图分类号: Q936 **文章标识码:** A

Plasminogen might be a virulence factor in *Staphylococcus aureus* infection

JI Zhi-xing, HAN Run-lin*

(Plasma Lipoprotein Immunology Research Center, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010018, China)

Abstract Several plasminogen receptors (PlgR) have been identified on the surface of *Staphylococcus aureus*. These PlgRs include inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, ribonucleotide reductase, α -enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *S. aureus*-bound Plg can be converted to plasmin by host plasminogen activator (PA) (tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator) or staphylococcal PA (staphylokinase). Plasmin generated on bacterial surface enhances bacterial migration through the extracellular matrix (ECM) as well as spread through tissue barriers. Thus, plasminogen plays an important role in *S. aureus* infection.

Key words: *Staphylococcus aureus*; plasminogen; plasmin; receptor

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)是人和动物的重要致病菌, 也是医院感染最常见病原菌之一。它可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等局部化脓感染以及败血症、脓毒症等全身感染^[1]。最近发现金黄色葡萄球菌是引起特异性皮炎^[2]以及医护人员鼻前庭感染的重要致病菌^[3]。金黄色葡萄球菌可通过多种机制侵入宿主, 其中利用宿主的纤溶酶原(plasminogen, Plg)是一个重要的机制, 本文就金黄色葡萄球菌利用Plg的机制做一综述。

酸的多肽, K5后是一个丝氨酸蛋白酶区域。Kringle结构域因其形状类似于一种叫Kringle的丹麦多层蛋糕而得名, 它是一种多态的三环结构, 由三个二硫键连接而成, 这种结构也见于与止血和纤溶有关的其他蛋白质^[4]。Plg的K1、K2、K4、K5结构域中包含赖氨酸结合位点(lysine binding site, LBS), 此位点可识别Plg受体C-末端的赖氨酸残基^[5], 而赖氨酸或赖氨酸类似物(如EACA、氨甲环酸等)可抑制Plg与其受体的结合。由此可见, Plg是通过其

1 纤溶系统

1.1 Plg和纤溶酶

Plg是一个相对分子质量为90 k的血浆酶原, 含有5个被称为Kringle结构域(K1~K5)的富含半胱氨

收稿日期: 2009-12-11; 修回日期: 2010-01-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(30860019)

*通讯作者: E-mail: han-runlin@163.com, Tel: 0471-4310523

LBS与受体结合的^[5]。Plg的N-末端为Glu残基,因此也称为Glu-Plg。Glu-Plg通过纤溶酶(plasmin, Pm)的降解作用,释放相对分子质量为8 k的激活肽段而形成N-末端为Lys残基的Lys-Plg^[6]。与Glu-Plg相比,Lys-Plg与受体、目标分子之间结合能力更强,并且更易于转变为Pm^[7]。

Plg可被纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA)激活而转变为有活性的丝氨酸蛋白酶Pm^[8],其激活过程是PA切断Plg分子的Arg560~Val561之间的肽键,形成两条多肽链(一条重链;一条轻链),彼此由两个二硫键连在一起。重链包含5个K结构域,轻链包含Ser740、Asp645、His602形成的丝氨酸蛋白酶催化活性位点^[9]。Pm可降解纤维蛋白和多种细胞外基质成分,例如层黏连蛋白、纤连蛋白,是哺乳动物纤溶系统中的一个重要组份。Pm也参与某些激素原和生长因子的激活^[10]。可见,Pm具有极强的蛋白水解能力,这一点也可以被致病菌利用来感染宿主。

1.2 Plg的激活剂、抑制剂

Plg在哺乳动物体内含量较高,在成人血浆中Plg的浓度为180~200 μg/mL。在体内,由专门的纤溶酶原激活剂和抑制剂调节Plg的激活及Pm的活性。哺乳动物有两种纤溶酶原激活剂:组织型Plg激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)和尿激酶型Plg激活剂(urokinase-type plasminogen activator, uPA)。tPA主要由内皮细胞产生,是Plg的主要激活剂^[9]。tPA包含两个Kringle区域、一个类生长因子区、一个氨基末端区。tPA的结构决定了其对纤维蛋白具有高亲和性^[11]。uPA由各种正常以及恶性细胞产生,可与细胞表面的uPA受体(uPAR)结合,从而激活Plg^[12],它主要参与细胞在发炎、伤口愈合、组织再生及肿瘤细胞迁移过程中的胞外基质降解^[9]。

纤溶系统的主要抑制剂属于丝氨酸蛋白酶抑制剂,专门抑制水解蛋白酶的活性^[13]。主要的纤溶酶原激活剂的抑制剂是PAI-1、PAI-2等,可抑制tPA和uPA的活性,此外还有PAI-3,但其抑制作用比PAI-1和PAI-2弱^[14]。Pm主要的体内抑制剂是 α_2 -抗纤溶酶(α_2 -antiplasmin, AP)^[15]。Pm和受体的结合位点与Pm和AP的结合位点为同一个结合位点——Pm的赖氨酸结合位点,因此Pm和受体的结合可被AP抑制^[9]。在血浆中,含量最高的Pm抑制剂是广谱蛋白酶抑制剂 α_2 -巨球蛋白,然而,仅在

体内或局部AP浓度明显降低时,Pm才被 α_2 -巨球蛋白抑制^[13]。

2 金黄色葡萄球菌和纤溶酶原的相互作用

金黄色葡萄球菌可通过其表面的Plg受体与Plg结合,并由宿主分泌的纤溶酶原激活剂或病菌本身分泌的激活剂激活为Pm,从而有利于病菌穿越组织屏障^[6]。

Kuusela和Saksela^[6]的研究表明:金黄色葡萄球菌(Cowan I)和Plg或者金黄色葡萄球菌和tPA共孵育均不能检测到底物颜色的变化,但是当金黄色葡萄球菌和Plg、tPA一起培养时,就可以检测到Pm的活性。用血浆代替Plg和金黄色葡萄球菌培养时也发现:没有加入tPA时,观察不到Pm的产生,当加入tPA时,检测到了Pm的活性;但是用蛋白酶处理过的金黄色葡萄球菌就观察不到它和Plg结合,当金黄色葡萄球菌不存在时,也观察不到tPA对Plg的激活,可见,金黄色葡萄球菌表面的Plg激活是其受体和激活剂共同作用的结果。

在葡萄菌属的Plg激活剂葡激酶(staphylokinase, SAK)激活Plg实验中发现:仅有Plg、SAK、AP的反应体系中,AP可有效抑制Pm的形成。当加入完整的金黄色葡萄球菌细胞时发现AP失去了抑制作用,而且在加入金黄色葡萄球菌的体系中发现:同样用S-2251底物检测的Pm活性随着细菌浓度增加而增加;金黄色葡萄球菌结合Plg的能力越强,Plg就越容易被SAK激活,用溶菌酶处理金黄色葡萄球菌细胞后,使Plg受体游离出来,同样也加强了SAK对Plg的激活。并且与金黄色葡萄球菌或其表面Plg受体结合的Pm均不受AP抑制^[16]。这和tPA对Plg的激活机制相似,在血浆中,tPA和纤维蛋白结合后可以激活Plg,tPA也可以直接激活与受体结合的Plg。当tPA与菌体表面结构结合后,PAI-1也对其失去抑制作用^[6],并且结合于病菌表面的Plg更易被tPA激活。这也证实了金黄色葡萄球菌Plg受体在利用Plg中的重要作用。

由此可见,和游离的Plg相比,与金黄色葡萄球菌受体结合的Plg更易被PA或SAK激活^[16],和病菌结合的Pm不受AP的抑制,而且还可以水解基底膜、细胞外基质从而穿越组织屏障。当金黄色葡萄球菌不存在时,游离的Plg不会转变为有活性的Pm,也不能侵染宿主组织。金黄色葡萄球菌表面结合的Plg激活如图1。

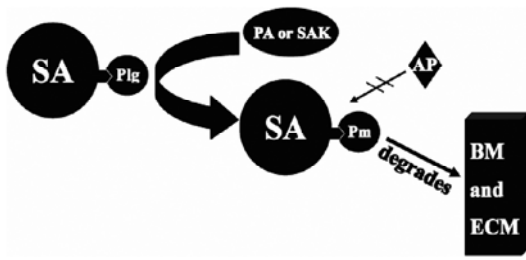


图1 与金黄色葡萄球菌表面结合的Plg的激活

注: SA: 金黄色葡萄球菌; Plg: 纤溶酶原; PA: 宿主产生的纤溶酶原激活剂; SAK: 葡萄球菌分泌的纤溶酶原激活剂; Pm: 纤溶酶, 具有极强的蛋白水解能力; AP: α_2 -抗纤溶酶, 是Pm主要的体内抑制剂; Degrade: 降解; BM: 基底膜; ECM: 细胞外基质

表1 金黄色葡萄球菌表面的Plg受体及其特性

受体	相对分子质量(k)	C-末端赖氨酸残基	特性
IMPDH(次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶)	53.0	无	嘌呤核苷酸生物合成中的关键酶
核糖核苷酸还原酶	37.5	有	将核苷酸转变为脱氧核苷酸
α -烯醇化酶	47.0	有	糖酵解关键酶
GAPDH	36.0	有	糖酵解关键酶

GAPDH 是糖酵解途径中的另一种关键酶。它可逆性地催化 3-磷酸甘油醛转化成 1, 3-二磷酸甘油酸^[18]。核糖核苷酸还原酶、 α -烯醇化酶和 GAPDH 的 C-端都有 Lys(K) 残基^[16], Plg 的 LBS 可识别受体 C-末端的 Lys 残基。虽然目前还没有 Plg 和这些受体结合机制的报道, 但是从理论上可推测: 核糖核苷酸还原酶、 α -烯醇化酶和 GAPDH 可能是通过 C-末端的 Lys 残基和 Plg 结合^[19]。

3 SAK 激活 Plg 的机制

SAK 可由一些金黄色葡萄球菌的溶源性菌株表达^[20]。SAK 本身没有蛋白酶活性, 但是能和 Pm 形成 1:1 的复合物, 此复合物即为纤溶酶原的激活剂, 而且易激活与受体结合的 Plg^[21]。

3.1 SAK 的结构

SAK 是一个由 136 个氨基酸构成的无二硫键的单链蛋白, 其三维结构包括 1 个 α -螺旋, 5 个 β 折叠, 与中间 β 折叠相对还有 2 个较短的 β 折叠^[22]。 α -螺旋包含 SAK 与 Plg 相互作用的主要区域。这个区域的突变会导致 SAK 激活 Plg 能力完全丧失。SAK 的 N-末端区域(尤其 Pm 水解形成的 N-端 Lys11)参与 SAK 对 Plg 和 Pm 的识别、SAK 与 Plg 和 SAK 与 Pm 复合物的形成, 以及有激活 Plg 活性的复合物的形成, N-末端的 Met26 可能也参与了 Plg 与 SAK 的

目前已发现, 金黄色葡萄球菌表面的 Plg 受体有: 次黄嘌呤单核苷酸脱氢酶(inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH)、核糖核苷酸还原酶(ribonucleotide reductase, RNR)、 α -烯醇化酶(α -enolase, SAEN)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)等四种^[16](表 1)。IMPDH 是嘌呤核苷酸生物合成中的关键酶, 可催化次黄苷 5'-单磷酸为黄苷 5'-单磷酸。另一种 Plg 受体是核糖核苷酸还原酶, 可以将核苷酸类转变为脱氧核苷酸类。 α -烯醇化酶是糖酵解途径的一种关键酶^[16], 它是一种含金属离子的酶, 可以将 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸^[17]。

结合^[23]。C-末端区域以及其空间构象也影响 SAK 与 Plg 的作用^[20]。

3.2 SAK 对 Plg 的激活

SAK 对纤维蛋白具有高选择性, 是动脉血栓患者有效的溶栓剂^[24]。在血浆中, SAK 和游离的 Plg 或 Pm 亲和性很低, 但是与纤维蛋白结合的 Plg 或微量 Pm 具有高亲和性^[25]。在血浆中, SAK 对 Plg 的激活起始于微量的 Fibrin·Pm 水解 SAK N-末端 Lys10-Lys11 之间的肽键^[26](N-末端截短的 SAK 标记为 SAK*), 然后形成等分子量的 Fibrin·Pm·SAK* 复合物。该复合物可激活 Fibrin·Plg·SAK 为 Fibrin·Pm·SAK*, Fibrin·Plg 为 Fibrin·Pm。最终的激活结果是所有 Plg 都转变为 Pm, 所有的 SAK 都转变为 SAK*^[21]。

在 SAK 激活 Plg 过程中, Plg 的 K 结构域不参与 Plg 和 SAK 的相互作用, 据报道: Plg 的 Arg719 和 SAK 的 α -螺旋、Met26 参与 Plg 和 SAK 的结合^[27]。SAK 截短的 N-末端区域对于形成有激活活性的 Pm·SAK* 复合物很重要^[28], 尤其 SAK N-末端的残基 Lys11, Lys11 缺失或用 Cys 代替, 就会导致复合物激活功能的丧失^[9]。SAK 分子疏水基团和亲水基团呈不对称分布对于其激活功能也很重要^[29]。

3.3 AP 的抑制机制

如果血浆中不存在纤维蛋白, AP 就会与 Pm 形

成无活性的 Pm·AP 复合物, 该复合物不能水解 SAK, 也无法产生 SAK* 和 Pm·SAK* 复合物, 因此 Plg 就不能转变为 Pm。无活性的 Pm·AP 复合物也失去了降解纤维蛋白的功能^[30]。如果血浆中存在纤维蛋白, 微量的 Pm 可以经由赖氨酸结合位点与纤维

蛋白结合形成 Fibrin·Pm, 而且 AP 对其没有抑制作用。因此, SAK 可与 Fibrin·Plg、Fibrin·Pm 形成复合物, 然后转变为 Fibrin·Pm·SAK* 复合物, 从而激活 Plg, 在此过程中, AP 失去了抑制作用^[21](图 2)。

当 Plg 或 Pm·SAK 复合物结合纤维蛋白时, 或

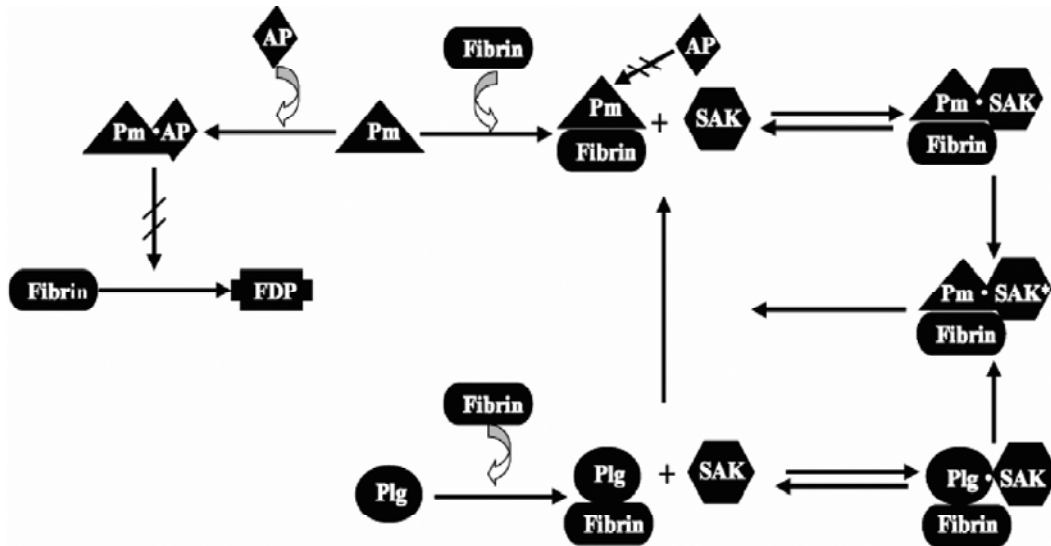


图 2 SAK 对 Plg 的激活机制

注: SAK: N-末端为 Ser-Ser-Ser 序列的完整 SAK 形式; SAK*: Pm 水解 SAK Lys10-Lys11 之间的肽键产生的 N-末端为 Lys-Gly-Ala 截短序列的形式; Plg·SAK: Plg 和 SAK 形成的分子量为 1:1 的复合物; Pm·SAK: Pm 和 SAK 形成的复合物; Pm·SAK*: Pm 和 SAK* 形成的复合物, 可激活 Plg; Pm·AP: Pm 和 AP 形成无活性的复合物; Fibrin: 纤维蛋白; FDP: 纤维蛋白降解产物

者是经由 Plg /Pm 的赖氨酸结合位点结合其他目的分子时, AP 就失去了抑制作用, 最可能的原因是赖氨酸结合位点被占据, 阻止了 AP 和复合物的结合从而保护了 Pm 的活性。这与早期的研究即 Plg 与完整的金黄色葡萄球菌或分离出来的其表面 Plg 受体结合不仅使 AP 失去抑制作用, 而且加强了激活剂激活 Plg 的结论一致^[16]。在葡萄球菌属感染小鼠导致败血症的实验中发现: 敲掉 SAK 基因即不分泌 SAK 的菌株与分泌 SAK 的菌株导致的小鼠的死亡率和重量变化没有差异^[20], 然而, 敲掉 SAK 基因的金黄色葡萄球菌的感染能力还待研究。

总之, 金黄色葡萄球菌的 Plg 受体可能在其致病过程中起重要作用。与金黄色葡萄球菌表面的受体结合的 Plg 可以被 SAK、tPA、uPA 等激活为 Pm, 金黄色葡萄球菌表面的 Pm 协助其破坏宿主的胞基质、激活基质金属蛋白酶, 穿透基底膜, 在宿主内扩散。

[参考文献]

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med, 1998, 339 (8): 520-32
- [2] Tiurin IuA, Dolbin DA. Role of pathogenicity factors of *Staphylococcus aureus* in development of atopic dermatitis. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2008, (4): 105-10
- [3] Baliga S, Bansil R, Suchitra U, et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in medical students. J Hosp Infect, 2008, 68 (1): 91-2
- [4] Peisach E, Wang J, de los Santos T, et al. Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. Biochemistry: Mosc, 1999, 38 (34): 11180-8
- [5] Redlitz A, Plow EF. Receptors for plasminogen and t-PA: an update. Bailliere's Clin Haematol, 1995, 8 (2): 313-27
- [6] Kuusela P, Saksela O. Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus* increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. Eur J Biochem, 1990, 193 (3): 759-65
- [7] Claeys H, Vermeylen J. Physico-chemical and proenzyme properties of NH₂-terminal glutamic acid and NH₂-terminal lysine human plasminogen. Influence of 6-amino-hexanoic acid. Biochim Biophys Acta, 1974, 342 (2): 351-9

- [8] Novokhatny V. Structure and activity of plasmin and other direct thrombolytic agents. *Thromb Res*, 2008, 122 Suppl 3: S3-8
- [9] Lahteenmaki K, Kuusela P, Korhonen TK. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev*, 2001, 25 (5): 531-52
- [10] Lijnen HR, Collen D. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Bailliere's Clin Haematol*, 1995, 8 (2): 277-90
- [11] Verheijen JH, Caspers MP, Chang GT, et al. Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin. *EMBO J*, 1986, 5 (13): 3525-30
- [12] Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J Cell Biol*, 1985, 100 (1): 86-92
- [13] Travis J, Salvesen GS. Human plasma proteinase inhibitors. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52: 655-709
- [14] Rijcken DC. Plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors: biochemical aspects. *Bailliere's Clin Haematol*, 1995, 8 (2): 291-312
- [15] Wiman B, Collen D. On the mechanism of the reaction between human α 2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem*, 1979, 254 (18): 9291-7
- [16] Molkanen T, Tyynele J, Helin J, et al. Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Lett*, 2002, 517 (1-3): 72-8
- [17] Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58 (7): 902-20
- [18] Zhu H, Zhu Z, Cui Y, et al. GAPDH activity and immunogenicity of *Staphylococcus aureus* recombinant GapC protein. *Chn J Biotechnol*, 2008, 24 (5): 754-9
- [19] Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, et al. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem*, 1995, 227 (1-2): 407-15
- [20] Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38 (4): 504-9
- [21] Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. *Nat Med*, 1998, 4 (3): 279-84
- [22] Ohlenschlager O, Ramachandran R, Guhrs KH, et al. Nuclear magnetic resonance solution structure of the plasminogen-activator-protein-staphylokinase. *Biochemistry: Mosc*, 1998, 37 (30): 10635-42
- [23] Schlott B, Hartmann M, Guhrs KH, et al. Functional properties of recombinant staphylokinase variants obtained by site-specific mutagenesis of methionine-26. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1204 (2): 235-42
- [24] Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G, et al. Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation*, 1995, 92 (8): 2050-7
- [25] Sakharov DV, Lijnen HR, Rijcken DC. Interactions between staphylokinase, plasmin(ogen), and fibrin. Staphylokinase discriminates between free plasminogen and plasminogen bound to partially degraded fibrin. *J Biol Chem*, 1996, 271 (44): 27912-8
- [26] Schlott B, Guhrs KH, Hartmann M, et al. Staphylokinase requires NH₂-terminal proteolysis for plasminogen activation. *J Biol Chem*, 1997, 272 (9): 6067-72
- [27] Kim SH, Chun HS, Han MH, et al. A novel variant of staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Thromb Res*, 1997, 87 (4): 387-95
- [28] Schlott B, Guhrs KH, Hartmann M, et al. NH₂-terminal structural motifs in staphylokinase required for plasminogen activation. *J Biol Chem*, 1998, 273 (35): 22346-50
- [29] Jespers L, Vanwetswinkel S, Lijnen HR, et al. Structural and functional basis of plasminogen activation by staphylokinase. *Thromb Haemost*, 1999, 81 (4): 479-85
- [30] Lijnen HR, Van Hoef B, De Cock F, et al. On the mechanism of fibrin-specific plasminogen activation by staphylokinase. *J Biol Chem*, 1991, 266 (18): 11826-32