

丝氨酸蛋白酶-Corin 与心血管疾病

方朝东综述 董宁征审校

【摘要】 丝氨酸蛋白酶参与体内多种重要的病理生理过程,在食物消化、血压调节、凝血、纤溶及组织器官的发育等生理过程起重要的生物学功能。当人体血压增高或血容量增加时,A 型利钠肽(ANP)和 B 型利钠肽(BNP)从心脏释放入血,产生利尿、排钠及血管舒张的作用。Corin 是新发现的 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶,特异性分布于心脏,可将 ANP 前体和 BNP 前体转化为有活性的 ANP 和 BNP,从而降低血容量与血压,起到调节体内水钠平衡,改善心脏功能的作用。该文主要阐述 Corin 的分子结构特征、生物学功能,并介绍 Corin 的基因缺陷或者蛋白缺乏与高血压、心力衰竭等心血管疾病的相关性及其可能的参与机制,为这些疾病的预防、治疗和预后提供新的研究理论基础。

【关键词】 丝氨酸蛋白酶;Corin;利钠肽;高血压;心力衰竭

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.02.008

Corin 是新近发现的一种特异性分布于心脏的 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶,能将 A 型利钠肽前体(pro-ANP)和 B 型利钠肽前体(pro-BNP)转化为 ANP 和 BNP^[1-8]。本文将简述其结构特征、生物学功能,与心血管疾病的关系和可能的参与机制。

1 Corin 的分子结构

Corin cDNA 全长约 5 Kb,编码 1042 个氨基酸残基组成的丝氨酸蛋白酶,其蛋白结构如图 1 所示,具备 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶的基本特征^[9],包含 1 个近 N-末端的跨膜结构域(TM)、2 个卷曲状结构(Fz)、8 个重复的低密度脂蛋白受体(LDLR)、1 个清道夫样受体结构(SR)以及 C-末端胰蛋白酶样蛋白酶(Protease)区域。蛋白酶区具有 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶特有的保守结构,含组氨酸(His)、天冬氨酸(ASP)及丝氨酸(Ser)残基^[7]。

与许多丝氨酸蛋白酶类一样,Corin 以无活性的单链酶原形式合成,必须经过蛋白酶裂解活化才具有活性。人 Corin 活化位点在 801 位 Arg ↓ 802 位异亮氨酸(Ile),活化的 Corin 片段通过二硫键与前体肽相连。还原条件下,由于二硫键断裂,蛋白印

迹(Western blot)可检测到一条相对分子质量约为 40 000 的活化 Corin 蛋白条带,而在非还原条件下,该活化片段与前体肽相连,Western blot 仅显示为一条较大的条带(相对分子质量约为 170 000)。

Corin 理论分子质量相对分子质量约为 116 000,而 Western blot 分析人胚肾(HEK)293 细胞中表达的重组 Corin 蛋白,显示条带大小相对分子质量约为 170 000,其分子质量大小理论值与实际所测值的差异主要由 N-糖基化造成的。N-糖基化对于酶原本身的活化和对底物的特异性识别很重要。Corin 胞外区域含有 19 个 N-糖基化位点,用糖基化酶处理 HEK293 细胞表达的重组 Corin,证实 Corin 蛋白存在 N-糖基化。为研究糖基化对 Corin 自身活化及功能的影响,用抑制剂衣霉素(tunicamycin)阻碍 Corin 的糖基化修饰或将鼠 Corin 蛋白酶区的糖基化位点(N968S/N1087S)突变,发现 Corin 糖基化受限后其自身的活化及转化 pro-ANP 为 ANP 的功能均受影响。进一步证实 N-糖基化修饰是 Corin 发挥功能所必需^[9]。其他 II 型跨膜丝氨酸蛋白酶成员也都存在 N-糖基化位点,如蛋白裂解酶(martriptase)与肠激酶(EK)。

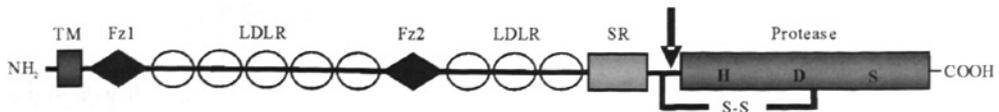


图 1 Corin 分子结构模式图

2 Corin 的组织分布

荧光原位杂交(FISH)分析显示,人类 Corin 基

因位于人染色体 4p12-13,包括 22 个外显子,跨度超过了 200 Kb,是迄今已知最长的丝氨酸蛋白酶。RNA 印迹(Northern)分析 Corin mRNA 在人体各组织的分布,发现其在心脏中特异性高表达^[7,10]。

作者单位:215123 苏州大学唐仲英血液学研究中心

最新的文献报道^[11],除心脏外 Corin 还表达于肾脏,血浆中也可检测到 Corin^[12,13]。此外在一些肿瘤细胞系,如骨肉瘤细胞系、平滑肌瘤细胞系、子宫内腺癌细胞系以及小细胞肺癌细胞等可以检测到 Corin mRNA^[14]。

发育中的小鼠胚胎,E9.5 期的心脏即可检测到 Corin 的表达,E11.5~E13.5 期,Corin mRNA 的表达更加丰富。原位杂交显示 Corin 广泛表达于小鼠的心房和心室心肌细胞,但心房表达量高于心室。此外,在肾脏、妊娠子宫和骨骼系统也发现 Corin 的表达^[7]。

3 Corin 的生物学功能

ANP 和 BNP 是心脏中调节血压及心功能的肽类激素^[5,15]。血压增高或血容量增加时,ANP 和 BNP 从心室、心房释放,在靶器官如肾脏及外周血管,与其特异性受体(利钠肽受体)结合,通过细胞环磷酸鸟苷(cGMP)途径发挥生理作用,产生利尿、排钠及血管舒张,从而降低血容量和血压,改善心功能。此外,ANP 和 BNP 还能抑制肾素及血管紧张素的释放。BNP 还具有抗心肌纤维化作用^[5]。许多研究证实,ANP 介导的通路对维持正常血压非常重要。ANP 或其受体缺乏的小鼠发生高血压和心肌肥厚,从而表明 ANP 途径在体内具有重要作用。目前在人类也发现 ANP 基因启动子序列的单核苷酸多态性(SNPs)及 ANP 受体基因启动子区基因缺失与高血压及心肌肥厚的发生相关^[16],这些结果表明 ANP 途径的缺陷与人类心血管疾病相关。

在心肌细胞中,ANP 是以利钠肽原前体(prepro-ANP)的形式合成,去除信号肽后变成 pro-ANP,后者通过蛋白酶裂解转换成有活性的 ANP。这个激活机制对于 ANP 活性调控至关重要。经过多年研究,直到发现特异性分布于心脏的跨膜丝氨酸蛋白酶-Corin,人们才逐步了解 pro-ANP 的激活机制。

对 Corin 大量的研究显示,Corin 以酶原及活性形式和 pro-ANP 共同表达于心肌细胞;功能上 Corin 可使 pro-ANP 转化成有活性的 ANP^[17,18];在培养的心肌细胞内,通过表达无活性的突变 Corin 或采用 RNA 干扰(RNAi)抑制 Corin 表达都能阻断 pro-ANP 的加工^[19];Corin 基因敲除小鼠体内,pro-ANP 的转化加工过程完全缺失^[20]。证实 Corin 就是 pro-ANP 转化酶。

4 Corin 与高血压

Corin 对血压调控以及维持心脏形态的作用已在 Corin 基因敲除小鼠得到证实^[20]。Corin 基因敲

除小鼠的收缩压、舒张压及平均动脉压显著增高。高盐饮食下,血压的升高也显著高于对照小鼠,另外还可发生心肌肥厚。此外,该种小鼠妊娠期的血压显著升高,妊娠后期还出现蛋白尿,提示妊娠期血容量增加,Corin 的血压调节作用具有重要意义。因 Corin 缺陷而发生心肌肥厚的改变也见于天然突变的 Kit^{W^{sj}}小鼠,其 Corin 基因由于基因倒置而被破坏^[21]。

在人类 Corin 基因 SNPs(T555I/Q568P)在美国非洲裔中出现频率显著高于高加索人,流行病学调查发现这两个 SNPs 增加了高血压及高血压导致心肌肥厚的风险^[22,23]。细胞水平研究发现,将 Corin T555I/Q568P 突变体转染 HEK293 细胞,T555I/Q568P 突变不影响 Corin 的表达,但影响了 Corin 的活化,显著抑制 pro-ANP 的转化^[24]。

这些结果都表明 Corin 在调节血压和心脏形态方面具有重要生理意义。

5 Corin 与心力衰竭

研究使用 ELISA 方法检测了 198 名正常人、291 例心力衰竭患者、73 例急性心肌梗死(AMI)患者血浆中 Corin 的含量。结果显示 AMI 患者血浆中 Corin 水平与正常人无显著差异,心力衰竭患者则显著低于正常人[(259~365) pg/ml 对 (260~690) pg/ml, $P < 0.001$],且 Corin 水平与心力衰竭的分级负相关^[12]。提示 Corin 缺乏可能是心力衰竭发生机制之一,血浆中可溶性 Corin 可作为心力衰竭的新标志物而用于诊断。

以中重度心力衰竭患者为研究对象发现,SNPs(T555I/Q568P)影响了患者体内 pro-BNP 向 BNP 的转化,与患者的临床预后密切相关,增加了死亡率和严重心力衰竭发生率^[22]。表明 Corin 缺乏或基因缺陷可能导致人类高血压及心力衰竭的发生。

6 Corin 与其他疾病

肾脏疾病患者常伴有蛋白尿及水钠滞留,提示可能由于上皮细胞钠通道及 Na⁺,K⁺-ATP 酶表达上调,钠吸收调节障碍。利钠肽是调节血容量的重要机制之一,Corin 可能与肾脏疾病发生机制有关。Polzin 等^[25]建立了肾病综合征和急性肾小球肾炎的大鼠模型,通过生物芯片技术和免疫组化的方法检测到模型鼠肾脏组织中 Corin 的表达水平降低,ANP 的蛋白水平显著下降,且 Corin 与 ANP 的表达部位一致,而 pro-ANP 的蛋白量反而增加。据此推测,Corin 可能参与了肾小球肾炎的病理机制。

7 小结

在细胞水平上,高血压和心肌肥厚患者的

Corin SNPs 可影响到 Corin 的结构以及对 pro-ANP 和 pro-BNP 催化的生物活性。在生理病理方面, Corin 的缺乏有可能导致高血压、心力衰竭等疾病的发生, 间接起到调节血压以及增强心脏功能的作用。随着对 Corin 的进一步研究, 有助于了解能够活化 Corin 的蛋白酶及高血压和心肌肥厚等重大心血管疾病的分子机制, 为这些疾病的预防或治疗提供新策略。

参 考 文 献

[1] Bugge TH, Antalis TM, Wu Q. Type II transmembrane serine proteases[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (35):23177-23181.

[2] Szabo R, Bugge TH. Type II transmembrane serine proteases in development and disease [J]. *J Biochem Cell B*, 2008, 40(6-7):1297-1316.

[3] Enshell-Seiffers D, Lindon C, Morgan BA. The serine protease Corin is a novel modifier of the Agouti pathway[J]. *Development*, 2008, 135 (2):217-225.

[4] Folgueras AR, de Lara FM, Pendas AM, et al. Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis[J]. *Blood*, 2008, 112 (6): 2539-2545.

[5] Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, et al. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (8):4239-4244.

[6] Okumura Y, Takahashi E, Yano M, et al. Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, Proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication[J]. *J Virol*, 2010, 84(10):5089-5096.

[7] Yan W, Sheng N, Seto M, et al. Corin, a mosaic transmembrane serine protease encoded by a novel cDNA from human heart [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274 (21):14926-14935.

[8] Yan W, Wu F, Morser J, et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97 (15):8525-8529.

[9] Gladysheva IP, King SM, Houng AK. N-glycosylation modulates the cell-surface expression and catalytic activity of corin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373 (1): 130-135.

[10] Gladysheva IP, Robinson BR, Houng AK, et al. Corin is co-expressed with pro-ANP and localized on the cardiomyocyte surface in both zymogen and catalytically active forms[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44 (1):131-142.

[11] Ichiki T, Huntley BK, Heublein DM, et al. Corin is present in the normal human heart, kidney, and blood, with pro-B-type natriuretic peptide processing in the circulation[J]. *Clin Chem*, 2011, 57 (1):40-47.

[12] Dong N, Chen S, Yang J, et al. Plasma soluble corin in patients with heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2010, 3 (2): 207-211.

[13] Dong N, Dong J, Liu P, et al. Effects of anticoagulants on human plasma soluble corin levels measured by ELISA[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411 (23-24):1998-2003.

[14] Wu F, Wu Q. Corin-mediated processing of pro-atrial natriuretic peptide in human small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (23):8318-8322.

[15] Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339 (5):321-328.

[16] Rubattu S, Bigatti G, Evangelista A, et al. Association of atrial natriuretic peptide and type a natriuretic peptide receptor gene polymorphisms with left ventricular mass in human essential hypertension[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48 (3):499-505.

[17] Knappe S, Wu F, Madlansacay MR, et al. Identification of domain structures in the propeptide of corin essential for the processing of proatrial natriuretic peptide[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (33):34464-34471.

[18] Knappe S, Wu F, Masikat MR, et al. Functional analysis of the transmembrane domain and activation cleavage of human corin: design and characterization of a soluble corin[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (52):52363-52370.

[19] Wu F, Yan W, Pan J, et al. Processing of pro-atrial natriuretic peptide by corin in cardiac myocytes[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (19):16900-16905.

[20] Chan JC, Knudson O, Wu F, et al. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102 (3):785-790.

[21] Nigrovic PA, Gray DH, Jones T, et al. Genetic inversion in mast cell-deficient (W (sh)) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173 (6):1693-1701.

[22] Rame JE, Tam SW, McNamara D, et al. Dysfunctional corin i555(p568) allele is associated with impaired brain natriuretic peptide processing and adverse outcomes in blacks with systolic heart failure: results from the Genetic Risk Assessment in Heart Failure substudy[J]. *Circ Heart Fail*, 2009, 2 (6):541-548.

[23] Rame JE, Drazner MH, Post W, et al. Corin I555(P568) allele is associated with enhanced cardiac hypertrophic response to increased systemic afterload[J]. *Hypertension*, 2007, 49 (4):857-864.

[24] Wang W, Liao X, Fukuda K, et al. Corin variant associated with hypertension and cardiac hypertrophy exhibits impaired zymogen activation and natriuretic peptide processing activity [J]. *Circ Res*, 2008, 103 (5):502-508.

[25] Polzin D, Kaminski HJ, Kastner C, et al. Decreased renal corin expression contributes to sodium retention in proteinuric kidney diseases[J]. *Kidney Int*, 2010, 78 (7): 650-659.

(收稿:2010-12-21 修回:2011-01-25)

(本文编辑:金谷英)