

# 载脂蛋白 A-I 对基质金属蛋白酶-2 的 抑制作用机理

王钰佳, 李婉玉, 蔡雨晨, 张凌晶, 翁凌, 孙乐常, 曹敏杰

(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**[摘要]** 为了分离纯化鲢鱼基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2)的内源性抑制剂, 克隆并表达了鲢鱼 MMP-2 的催化结构域(rHm-MMP-2c), 并将其作为筛选内源性抑制剂的靶标酶。通过 60 ℃ 加热、50%~90% 的硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sepharose 和 Phenyl-Sepharose 柱层析等手段, 从鲢鱼肌肉中纯化了一种 MMP-2 内源性抑制剂, 该抑制剂相对分子质量为 28 ku, 能有效抑制 rHm-MMP-2c 在 4 ℃ 冷藏过程中对 I 型胶原的降解。质谱鉴定结果表明, 纯化的抑制剂为载脂蛋白 A-I(Apo A-I)。抑制动力学显示, Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 呈现竞争性抑制, 抑制常数  $K_i$  为 1.31  $\mu\text{mol/L}$ , 半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为 3.33  $\mu\text{mol/L}$ 。分子对接结果显示, 酶和抑制剂结合的主要作用力为氢键相互作用, 抑制原因可能是 Apo A-I 与 MMP-2 纤连蛋白结合区结合形成了空间位阻, 阻碍了底物与酶的结合。

**[关键词]** 基质金属蛋白酶-2; 鲢鱼; 载脂蛋白 A-I; 内源性抑制剂; 分子对接

**[中图分类号]** Q 556

## Inhibition Mechanism of Apolipoprotein A-I on Matrix Metalloproteinase-2

WANG Yujia, LI Wanyu, CAI Yuchen, ZHANG Lingjing, WENG Ling, SUN Lechang, CAO Minjie

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to identify the endogenous inhibitor of MMP-2 in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), the catalytic domain of MMP-2(rHm-MMP-2c) was cloned, expressed in *Escherichia coli* and purified as a target enzyme to screen endogenous inhibitor. By heating at 60 ℃, 50% -90% ammonium sulfate fractionation and column chromatographies of DEAE-Sepharose and Phenyl-Sepharose, an endogenous inhibitor of MMP-2 was purified from silver carp muscle. The molecular weight of the inhibitor was 28 ku, and it effectively inhibited the degradation of type I collagen by rHm-MMP-2c in the process of storage at 4 ℃. Mass spectrometry analysis showed that the purified inhibitor was apolipoprotein A-I(Apo A-I), which inhibited rHm-MMP-2c in a reversible competitive mode with half inhibitory concentration of 3.33  $\mu\text{mol/L}$  and inhibition constant( $K_i$ ) of 1.31  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. Molecular docking showed that hydrogen bond was the main interaction force and Apo A-I binds to the rHm-MMP-2c fibronectin II binding domain to form steric hindrance, blocking the substrate binding to the MMP-2.

**[收稿日期]** 2022-03-08

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2018YFD0901004); 国家自然科学基金项目(31772049)

**[作者简介]** 王钰佳(1997—), 女, 硕士生, 从事食品生物技术研究。通信作者: 曹敏杰(1964—), 男, 教授, 从事水产品深加工研究。E-mail: mjcao@jmu.edu.cn

**Keywords:** matrix metalloproteinase-2; *Hypophthalmichthys molitrix*; apolipoprotein A-I; endogenous inhibitor; molecular docking

## 0 引言

鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 是淡水鱼中的代表性鱼类, 由于其生命力强, 分布地域广, 是常用的研究对象<sup>[1-2]</sup>。鱼死后的生化变化直接影响鱼肉的品质和价值, 而由内源酶引起的鱼肉蛋白质降解是导致鱼肉质构软化的主要原因<sup>[3]</sup>。特别是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 由于可以降解胶原蛋白, 对肌肉软化起着重要的作用。因此, 研究其内源性抑制剂对于揭示鱼死后肌肉质构变化规律有重要意义<sup>[4]</sup>。

MMP 是一种含锌、钙依赖性的内肽酶, 它负责细胞外基质的降解, 参与胚胎发育、器官形态发生、骨重塑等许多生物学过程。在鱼类中, MMP 在胚胎发育、组织修复中发挥重要作用。在 MMP 中, MMP-2 (EC 3. 4. 24. 24) 和 MMP-9 (EC 3. 4. 24. 35) 因与明胶降解有关, 被归类为明胶酶<sup>[5-6]</sup>。在不同鱼类中已经检测到明胶酶的存在, 如太平洋岩鱼 (*Sebastes* sp.)<sup>[7]</sup>、鲷鱼 (*Seriola quinqueradiata*)<sup>[8]</sup>、大西洋鳕鱼 (*Gadus morhua*)、花狼鱼 (*Anarhichas minor*) 和大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 等<sup>[9]</sup>。明胶酶被认为参与了胶原蛋白的代谢, 使肌肉纤维蛋白降解, 导致鱼体软化<sup>[10]</sup>。在生物体内, MMP 的活性受内源性抑制剂的调控, 如组织金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)、 $\alpha_2$ -巨球蛋白、肝素和反转录富含半胱氨酸蛋白 (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs, RECK) 等<sup>[11]</sup>。

蛋白质的功能通常是通过蛋白质之间的相互作用来调节的, 蛋白质的结构决定其功能, 蛋白质晶体结构的解析为分析酶相互作用及催化机理提供了研究基础。对部分 MMP 与 TIMPs 晶体结构的分析发现, TIMPs 直接与 MMP 活性位点的催化区域的  $Zn^{2+}$  结合, 从而抑制酶的活性<sup>[12-13]</sup>。然而, 由于一些 MMP 的晶体结构难以获得, 因此它们与抑制剂的相互作用及抑制机理研究甚少。近年来, 由于生物信息学的不断发展, 对已知序列进行三维建模获得其结构的方法已非常成熟, 在探究分子间相互作用方面也已广泛使用, 为一些难以获得晶体结构的蛋白质的研究提供了新方法, 这些方法也被用于解释酶和抑制剂的相互作用关系及抑制机理<sup>[14-15]</sup>。

与哺乳动物 MMP 的研究相比, 鱼类 MMP 的研究还相当匮乏, 特别是对 MMP 内源性抑制剂的研究则更少。因此, 本研究利用分子生物学手段, 在大肠杆菌中克隆并表达了相对分子质量为 37 ku 的鲢鱼 MMP-2 催化结构域 (rHm-MMP-2c), 利用此酶进一步从鲢鱼肌肉中筛选分离了一种对 rHm-MMP-2c 有抑制作用的蛋白质, 经质谱分析鉴定, 发现该蛋白质为载脂蛋白 A-I (Apo A-I)。为探究 Apo A-I 与 rHm-MMP-2c 的相互作用机理, 对这 2 个蛋白质同源建模并进行分子对接, 探究其相互作用方式, 为研究 MMP-2 及其抑制剂提供了一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

白鲢鱼购于福建省厦门市集美区菜市场 (2 ~ 3 kg/条), 即杀后取肌肉放置于冰上, 立即用于实验。

分子克隆所用引物均在厦门博瑞生物科技有限公司合成; U-Clone Master Mix, 美国 Evomic 公司; 表达载体 pET30a (+)-V29H (V29H), 美国 EMD 生物科学公司; 合成荧光底物 Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dap (Dnp)-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (MOCA), 日本 Peptide Institute 公司; TEV 酶, 美国 Sigma 公司; Ni-NTA 亲和柱、DEAE-Sepharose 和 Phenyl Sepharose, 美国 GE Healthcare 产品; 鲢鱼 I 型胶原蛋白, 集美大学海洋食品与生物工程学院实验室制备; 其他试剂均为分析级。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 rHm-MMP-2c 的克隆及表达

RNA 提取步骤参考总 RNA 提取试剂盒说明书进行, cDNA 按 PrimeScript TM II 1st Strand cDNA 合成试剂盒说明书合成。利用 DNAMAN 软件设计引物 5'-CGAGAATCTTTATTTCCAAGGTTCT-GTCGACAAGCCCAAGTGGGGACAGAAAAAC-3'和 5'-AGTTAGCTTGCGGCCGCAGAGTCGACACCATACAGCTCCTGGATGCCTTTAA-3' (引物均含有 *Sal* I 酶切位点)。构建鲑鱼 MMP-2 催化结构域克隆载体, 将测序正确的质粒和 V29H 载体质粒分别用 *Sal* I 单酶切处理, 用 U-Clone Master Mix 将截断的 rHm-MMP-2c 基因片段和线性化的质粒 V29H 在 50 °C 下连接 1 h, 并将连接产物转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中筛选阳性菌并测序, 测序正确的质粒命名为 V29H-rHm-MMP-2c。重组蛋白表达方法参考文献[16], 利用 SDS-PAGE 和明胶酶谱检测表达结果, 用 Lowry 法测定蛋白质浓度。

### 1.2.2 rHm-MMP-2c 抑制剂的纯化

将新鲜的鲑鱼敲击致死, 取肌肉 150 g, 加入 8 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH = 8.0, 用组织捣碎机捣碎, 在 12 000 r/min 下离心 20 min 并用绢布过滤。上清液 60 °C 加热 30 min, 在冰上冷却至室温后再次离心, 上清液用 50%~90% 的硫酸铵分级沉淀, 用上述缓冲液溶解沉淀并充分透析, 透析后体积为 40~50 mL。将透析后的样品依次上样于 DEAE-Sepharose 阴离子交换柱和 Phenyl Sepharose 层析柱(5 mL), 测定  $A_{280}$  值和抑制活性, 收集有抑制活性部分进行电泳分析。

### 1.2.3 抑制剂的质谱分析

纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 将样品在凝胶状态下用测序级胰蛋白酶酶解后, 用串联飞行时间质谱仪(5800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX)进行分析。质谱条件: 激光源为 335 nm 的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 2 000 V, 扫描范围为 800~4 000 u。选择信噪比大于 50 的母离子进行二次质谱(MS/MS)分析, 二次质谱(MS/MS)激光叠加 2 500 次。

### 1.2.4 rHm-MMP-2c 酶活力测定

rHm-MMP-2c 酶活力测定采用 Nagase<sup>[17]</sup> 描述的方法并略加修改, 在 900  $\mu$ L 的 20 mmol/L Tris-HCl (含 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 、1  $\mu$ mol/L  $\text{Zn}^{2+}$ 、pH = 8.0) (buffer A) 中加入 50  $\mu$ L rHm-MMP-2c 和 50  $\mu$ L 的 10  $\mu$ mol/L 合成荧光底物 MOCA, 在 37 °C 下反应 30 min 后, 加入 1.5 mL 终止液(V(甲醇): V(异丙醇): V(蒸馏水) = 35: 30: 35) 终止反应。在激发波长为 328 nm、发射波长为 393 nm 下测定反应释放的 Mca-Pro-Leu-Gly 荧光强度。酶活力单位(U)定义为每分钟释放 1 nmol Mca-Pro-Leu-Gly 所需的酶量。

### 1.2.5 抑制剂对 rHm-MMP-2c 的抑制酶活力测定

将 800  $\mu$ L buffer A、50  $\mu$ L rHm-MMP-2c(3  $\mu$ mol/L) 和 100  $\mu$ L(3  $\mu$ mol/L) 抑制剂混匀, 在 4 °C 下孵育 30 min 后加入 10  $\mu$ mol/L 合成荧光底物 MOCA, 于 37 °C 下反应 30 min, 加入 1.5 mL 终止液终止反应, 在激发波长为 328 nm、发射波长为 393 nm 下测定反应释放的 Mca-Pro-Leu-Gly 荧光强度, 抑制率 =  $(1 - A/B) \times 100\%$ , 式中:  $A$  为实验组的荧光吸收值;  $B$  为对照组的荧光吸收值。

### 1.2.6 抑制剂对 rHm-MMP-2c 的抑制动力学分析

根据节 1.2.5 活性测定方法测定内源性抑制剂的抑制活性, 分别测定抑制剂浓度为 0, 3, 5, 10  $\mu$ mol/L 的 rHm-MMP-2c 的活性(rHm-MMP-2c 浓度为 0, 3, 6, 10  $\mu$ mol/L), 并计算反应初速率, 分析抑制剂对 MMP-2 的抑制类型。参考陈清西<sup>[18]</sup> 的方法进行抑制动力学分析, 根据所得数据计算半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

### 1.2.7 抑制剂对 rHm-MMP-2c 降解 I 型胶原的抑制作用分析

rHm-MMP-2c 可有效降解胶原蛋白, 为探究抑制剂(Apo A-I)的抑制作用, 将纯化的 rHm-MMP-2c 与 I 型胶原蛋白在 4 °C 下进行孵育。反应系统总量为 150  $\mu$ L, 由 50  $\mu$ L I 型胶原蛋白(40  $\mu$ g)、50  $\mu$ L rHm-MMP-2c(20 ng) 和 50  $\mu$ L buffer A(含或不含 20 ng Apo A-I) 组成, 分别在 4 °C 孵育 0, 24, 48, 72, 96 h。阳性对照为 50  $\mu$ L I 型胶原、50  $\mu$ L rHm-MMP-2c、50  $\mu$ L buffer A(含 10 mmol/L EDTA)。阴性对照为 50  $\mu$ L I 型胶原蛋白和 100  $\mu$ L buffer A。在 4 °C 下孵育 96 h, 取样进行电泳分析。

1.2.8 分子对接

分子对接是一种研究蛋白质与配体相互作用的有效方法<sup>[19]</sup>。根据人 MMP-2 (PDB:1AV1) 的晶体结构, 用 Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/>) 三维建模获得了不同物种鱼类的 MMP-2c 的结构。用 I-TASSER 服务器 (<http://hdl.handle.net/1808/12854>) 预测 Apo A-I 的结构<sup>[20]</sup>。MOCA 的三维结构在 Chem3D Ultra (8.0) 中绘制得到。用 Autodock Vina (1.1.3) 进行来自不同物种的 MMP-2c 与荧光底物 MOCA 的分子对接。rHm-MMP-2c 与 Apo A-I 的对接使用 ZDOCK 服务器 (<http://zdock.umassmed.edu/>) 完成。结合力、结合能和结合位点的结果用 PDBePISA ([https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot\\_int/pistart.html](https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html)) 和 Discovery Studio (2019) 处理。

1.3 统计分析

本文中所有数据均为 3 次重复的平均值, 采用 Excel 2019 对数据进行处理并进行误差分析。制图及排版在 PowerPoint 2019 和 Adobe Illustrator CS5 上完成。

2 实验结果与分析

2.1 rHm-MMP-2c 的分子克隆

从 NCBI (GenBank:KR822184.1) 中获得鲢鱼 MMP-2 的全长 cDNA 序列 (2 792 bp), 通过 DNA-MAN (8.0) 分析得到, 其编码 332 个氨基酸残基的催化结构域 (MMP-2c), 设计引物进行克隆, 预测相对分子质量为 37.3 ku, pI 为 4.38。BLASTp 分析结果显示, 鲢鱼 MMP-2 与草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) MMP-2 同源性的 98% (GenBank:ADU34084.1), 与斑马鱼 (*Danio rerio*) MMP-2 同源性的 93% (GenBank:AAH76545.1), 与日本海参 (*Apostichopus japonicus*) MMP-2 同源性的 92% (GenBank:AYL88763.1)。在 rHm-MMP-2c 催化结构域中发现了 3 个纤连蛋白结构域 (Fibronectin II domain, Fn)。有研究表明, Fn 区对 MMP-2 的催化活性起着至关重要的作用<sup>[21]</sup>。另外, MMP-2 的 Zn<sup>2+</sup> 结构域 (ZBG) 和位于催化结构中心的序列 HFGHXLGLXHS 在不同的物种中是保守的, 序列中的 3 个组氨酸残基与 Zn<sup>2+</sup> 结合密切相关, 对酶活性的维持起着重要的作用<sup>[22]</sup>。在 rHm-MMP-2c 中, 位于催化结构中心的保守序列为 His290 到 Ser301 (HEFGHALGLEHS), 其中 3 个组氨酸 (His290、His294 和 His300) 和 ZBG 结合并发挥催化作用 (见图 1)。

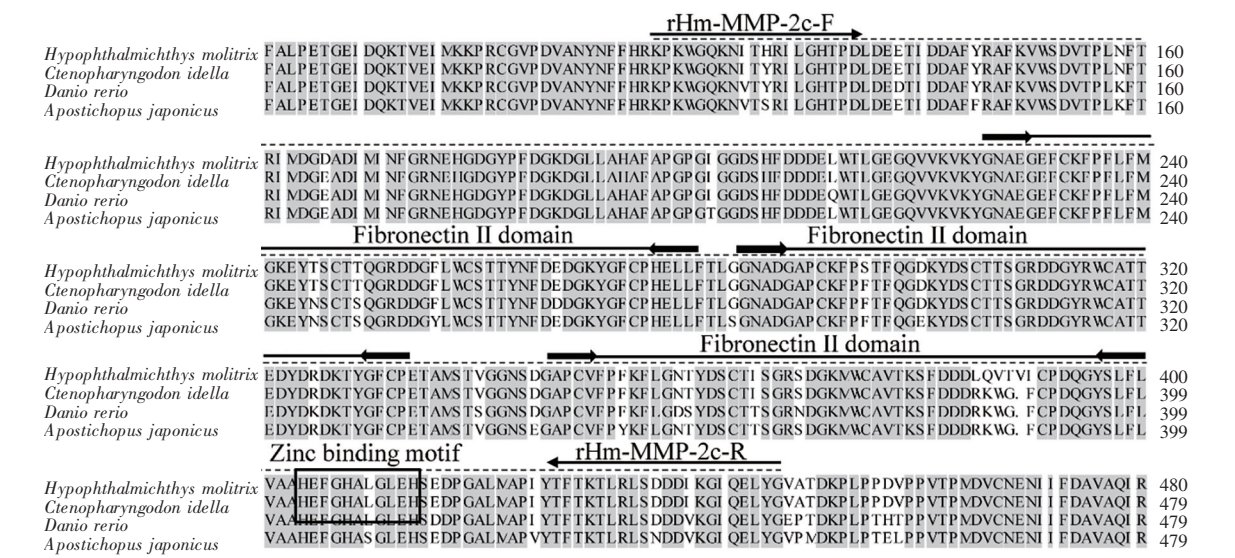
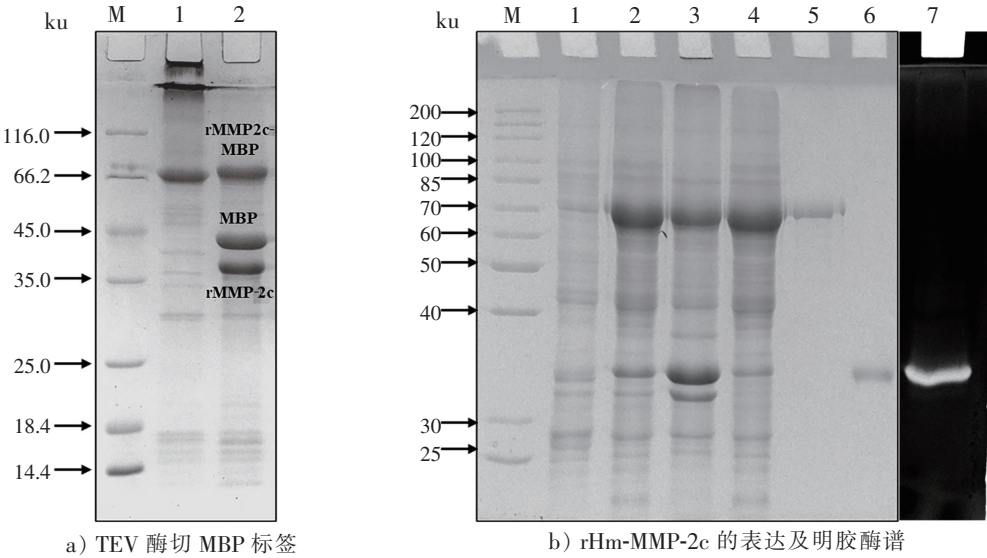


图 1 不同物种 MMP-2 的序列比对 (只显示催化结构域部分)  
Fig.1 Sequence alignment of MMP-2 in different species (only showing catalytic domain)



2.2 rHm-MMP-2c 的原核表达与鉴定

rHm-MMP-2c 在上清液中表达, 由于载体含有可溶标签麦芽糖结合蛋白 (MBP), 需经 TEV 酶酶解切掉 MBP 才能得到目的蛋白(见图 2a), 用 Ni-NTA 亲和层析柱即可除去 MBP<sup>[23]</sup>。纯化得到目的蛋白 rHm-MMP-2c, 其相对分子质量为 37 ku(见图 2b 的第 6 泳道), 与理论值 37.3 ku 一致。明胶酶谱验证了酶的活性(见图 2b 的第 7 泳道), 显示了其降解明胶的活性。



a) TEV 酶切 MBP 标签  
The cleavage of MBP by TEV enzyme

b) rHm-MMP-2c 的表达及明胶酶谱  
Expression and gelatin zymography of rHm-MMP-2c

说明: 图 a 中, M—标准蛋白; 泳道 1—诱导后细菌裂解液上清液; 泳道 2—TEV 酶酶切结果。图 b 中, M—标准蛋白; 泳道 1—未加转化子的 V29H 空载; 泳道 2—IPTG 诱导 V29H-rHm-MMP-2c 质粒转化细胞; 泳道 3—诱导后细菌裂解液上清液; 泳道 4—诱导后细菌裂解液的沉淀; 泳道 5—纯化 rHm-MMP-2c-MBP; 泳道 6—纯化 rHm-MMP-2c; 泳道 7—rHm-MMP-2c 明胶酶谱

Note: In figure a, M—protein marker; lane 1—supernatant of bacterial lysates after induction; lane 2—effect of TEV digestion. In figure b, M—protein marker; lane 1—cells transformed with empty V29H; lane 2—cells transformed with V29H-rHm-MMP-2c plasmid induced by IPTG; lane 3—supernatant of bacterial lysates after induction; lane 4—precipitation of bacterial lysates after induction; lane 5—purified rHm-MMP-2c-MBP; lane 6—purified rHm-MMP-2c; lane 7—gelatin zymography of rHm-MMP-2c

图 2 rHm-MMP-2c 的表达、纯化及明胶酶谱分析

Fig.2 Expression, purification and gelatin zymography of rHm-MMP-2c

由于鱼肌肉中 MMP-2 的含量很少, 而天然 MMP-2 的纯化又非常困难, 因此对 MMP-2 的研究大多是通过对其进行克隆和表达来进行的<sup>[24]</sup>。此前, Wang 等<sup>[25]</sup>对鲤鱼 MMP-2 的催化结构域进行了克隆和表达。然而, 鲤鱼 MMP-2 的催化结构域表达在沉淀中进行, 复性过程繁琐复杂, 不利于大量纯化和应用。在本研究中, rHm-MMP-2c 可以在上清液中高效表达并有活性, 易于分离纯化, 有利于筛选其内源性抑制剂。

2.3 rHm-MMP-2c 抑制剂的纯化

为除掉样品中大部分杂蛋白质, 对鲢鱼肌肉样品 60 ℃ 加热后进行 50%~90% 硫酸铵盐析, 根据目标蛋白的特性采用柱层析纯化。预处理后的样品经透析后上样于 DEAE-Sephrose 阴离子交换柱, 活性峰出现在 0~0.2 mol/L 的 NaCl 阶段洗脱处, 如图 3a 所示, 抑制酶活力呈单一峰型, 收集活性部分进行下一步层析。当硫酸铵浓度为 2 mol/L 时, 样品能有效吸附在 Phenyl-Sephrose 疏水层析柱上, 降低盐浓度可以将目的蛋白洗脱下来。由图 3b 可以看出, 大部分的杂蛋白在流洗部分被除去, 目的蛋白在硫酸铵浓度为 0.5 mol/L 左右被洗脱下来, 抑制酶活性峰与蛋白质峰一致。收集具有抑制活性部分, 用 buffer A 透析后保存, 进行电泳处理及后续抑制活性测定。2 次柱层析之后, 抑制剂已经被高度纯化, 得到相对分子质量为 28 ku 的单一蛋白质条带(见图 3c 的泳道 4)。

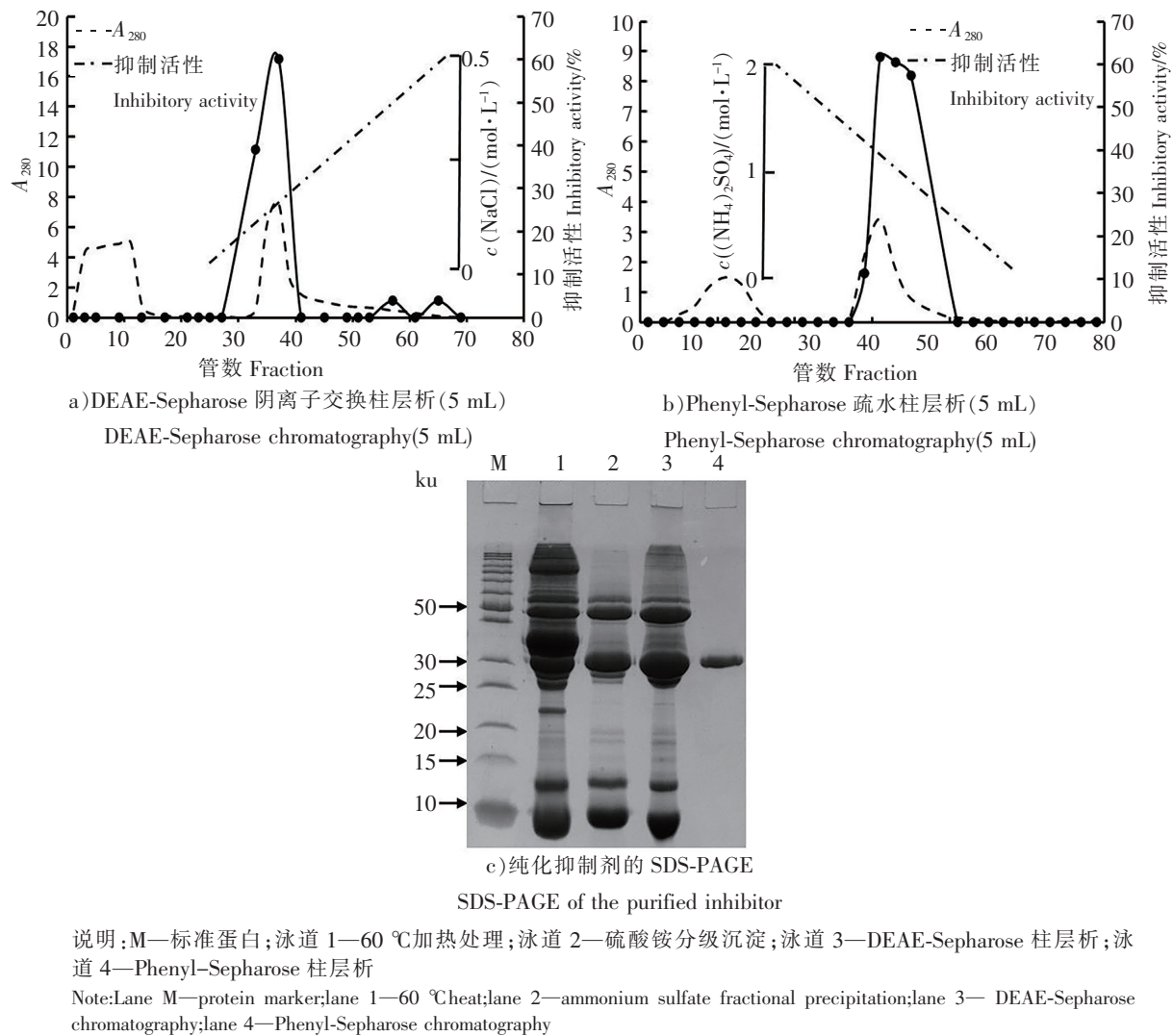


图 3 MMP-2 抑制剂的纯化及 SDS-PAGE  
Fig.3 Purification and SDS-PAGE of MMP-2 inhibitor

2. 4 rHm-MMP-2c 抑制剂的质谱鉴定

为了获得抑制剂的一级结构信息，对蛋白质进行了质谱分析。选择信噪比大于 50 的肽段进行质谱分析，二级质谱分析结果如图 4a 所示，共得到 11 个含有 146 个氨基酸残基的多肽（见表 1）。将质谱/质谱分析结果与 NCBI 数据库中的蛋白质序列进行比较（见图 4b），得到的序列与鲢鱼的 Apo A-I 序列（gi|295314922）相似性为 100%，证明纯化后的蛋白质为 Apo A-I。Apo A-I 是一种主要的载脂蛋白，可以参与机体内脂蛋白的代谢，维持正常血脂代谢的平衡<sup>[26-27]</sup>。本研究获得的 Apo A-I 相对分子质量为 28 ku，与鲤鱼中纯化

表 1 二级质谱所得抑制剂的肽段序列

Tab. 1 Peptide sequences of inhibitor obtained from MS/MS		
起止位点 Start-end sites	肽段序列 Peptide sequences	
22-32	DEAPSLDHVK	
33-43	TALQLYLDQMK	
60-78	DYKEFLGQSVDNLHGYFEK	
79-98	AFETITPVGAQVLEATAPQR	
111-120	QIEPMRAELR	
126-146	HOEEYTEELKPFVDDYMV	
167-175	IGPNWEETK	
189-196	VTEYLQDVKVR	
197-213	TKLEPTIQEYKDQMEK	
231-244	MTDLGEQVKPHFEK	
246-251	FEAVQK	

的 Apo A-I(27.5 ku)一致。研究表明, 在虹鳟鱼、大西洋鲑、日本鳗鲡、红鳍东方鲀等硬骨鱼中发现有 2 个亚型 Apo A-I, 这些不同亚型的出现可能是由于一些特征谱系的硬骨鱼类和鳐鳍鱼类进化中全基因组复制导致, 而 Apo A-I 的许多亚型在不同的组织中有不同的调节方式<sup>[28-29]</sup>。

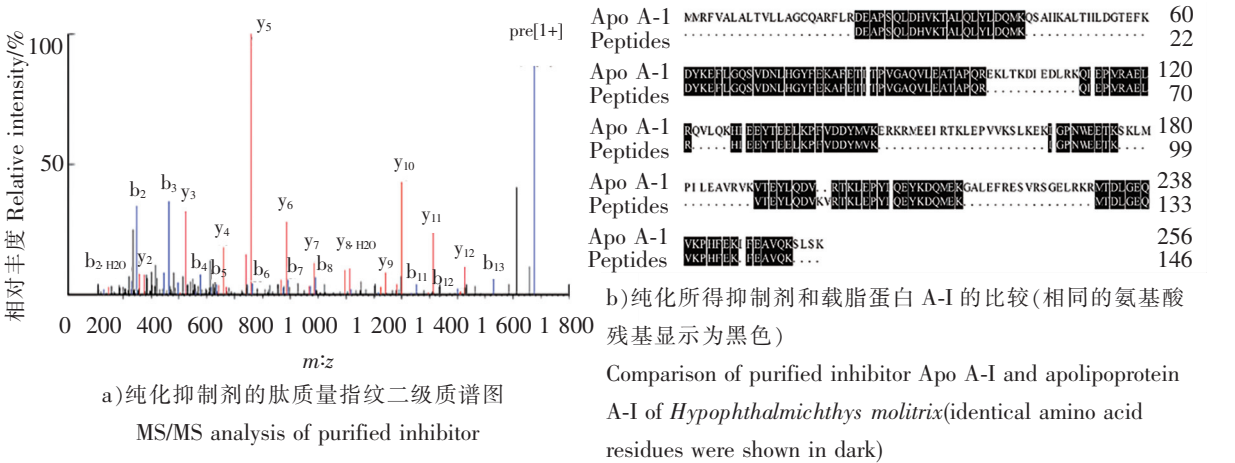


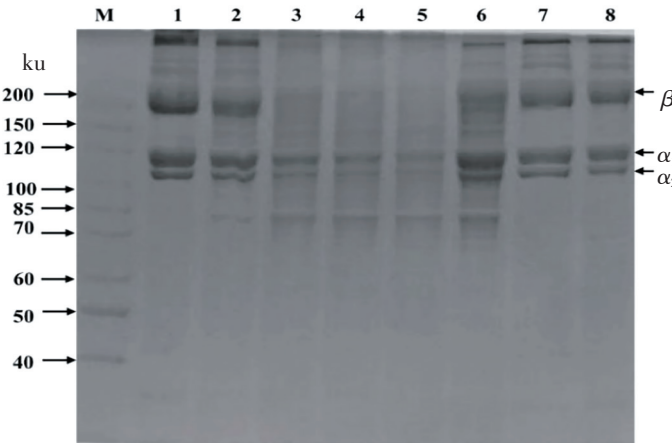
图4 rHm-MMP-2c 抑制剂的质谱鉴定

Fig.4 Mass spectrum identification of inhibitor toward rHm-MMP-2c

2.5 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 降解 I 型胶原的抑制

将鲢鱼 I 型胶原和 rHm-MMP-2c 置于 4 ℃ 孵育 96 h, 检测冷藏时酶对 I 型胶原蛋白的降解情况, 结果显示, 酶能消化 I 型胶原蛋白的  $\beta$  链、 $\alpha_1$  链和  $\alpha_2$  链(见图 5 泳道 1~5)。金属蛋白酶抑制剂 EDTA 可完全抑制 rHm-MMP-2c 的酶活性(见图 5 泳道 8)。在 Apo A-I 存在下, rHm-MMP-2c 对 I 型胶原蛋白的降解被抑制 70%(见图 5 泳道 6)。Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制力较 EDTA 弱, 主要原因可能是其分子量大, 但这也证明了 Apo A-I 可以有效抑制由该酶引起的胶原蛋白在 4 ℃ 下的降解。

鱼肉冷藏过程中胶原蛋白的降解是其软化的重要原因, 而胶原蛋白的降解与鱼体内存在的内源酶密切相关<sup>[30]</sup>。有研究表明, 在鱼死后的冷藏过程中都能检测到 MMP 活性, MMP 对胶原蛋白的降解作用是导致鱼类肌肉在冷藏过程中软化的主要原因<sup>[31]</sup>。本研究表明, 在冷藏过程中, rHm-MMP-2c 对 I 型胶原蛋白有降解作用, 而 Apo A-I 作为内源性抑制剂可以在一定程度上抑制其降解进程。



说明:M—标准蛋白;泳道 1—0 h;泳道 2—24 h;泳道 3—48 h;泳道 4—72 h;泳道 5—96 h;泳道 6—加入酶和 Apo A-I 96 h;泳道 7—无酶处理 96 h(阴性对照);泳道 8—加入酶和 EDTA 处理 96 h(阳性对照)  
Note: Lane M—protein marker;lane 1—0 h;lane 2—24 h;lane 3—48 h;lane 4—72 h;lane 5—96 h;lane 6—sample with the addition of enzyme and Apo A-I for 96 h;lane 7—sample without enzyme for 96 h(negative control);lane 8—sample with enzyme and EDTA for 96 h (positive control)

图5 rHm-MMP-2c 在 4 ℃时降解 I 型胶原及抑制剂的作用

Fig.5 Degradation of type I collagen by rHm-MMP-2c at 4 ℃ and the effects of inhibitors

2.6 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制动力学

抑制动力学研究可以阐释抑制剂与酶的相互作用机制。如图 6a 所示，不同浓度的 Apo A-I 对不同浓度 rHm-MMP-2c 的抑制曲线均交于原点，表明 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制是可逆的。利用不同浓度的抑制剂 Apo A-I、底物 MOCA 与 rHm-MMP-2c 测定反应初速率，以底物浓度的倒数为横坐标，初速率的倒数为纵坐标，绘制 Lineweaver-Burk 双倒数图，根据曲线的交点可知其抑制类型。如图 6b 所示，不同浓度的线性回归曲线交于 Y 轴的正半轴，表现为竞争抑制，即不改变酶的最大反应速度  $v_m$ ，酶的  $K_m$  随着抑制剂浓度的增加而增加。用二次作图法求出双倒数图的斜率，计算得出 Apo A-I 的抑制常数  $K_i$  为  $1.31\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

根据 rHm-MMP-2c 抑制活性检测方法，测定不同浓度的特异性抑制剂 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制率。如图 6c 所示，以不同浓度的 Apo A-I( $0,3,5,10\text{ }\mu\text{mol/L}$ )为横坐标，以抑制率为纵坐标，计算出 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的半抑制浓度( $IC_{50}$ )为  $3.33\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。Sarker 等<sup>[32]</sup>从人类血清中发现，纤维蛋白原是 MMP-2 的反竞争抑制剂，其与 MMP-2 之间的  $IC_{50}$  为  $6.76\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。而 Apo A-I 的  $IC_{50}$  值与之相比更小，说明 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制作用优于纤维蛋白原。

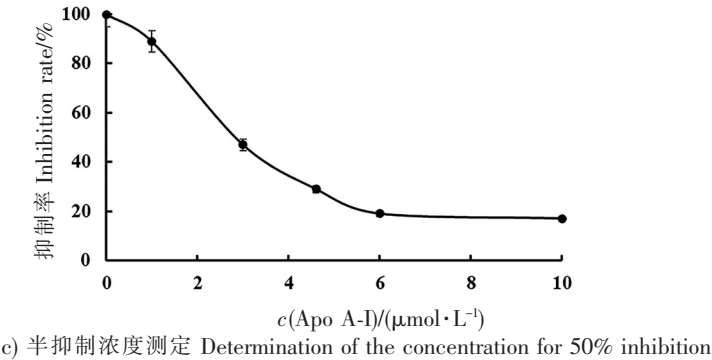
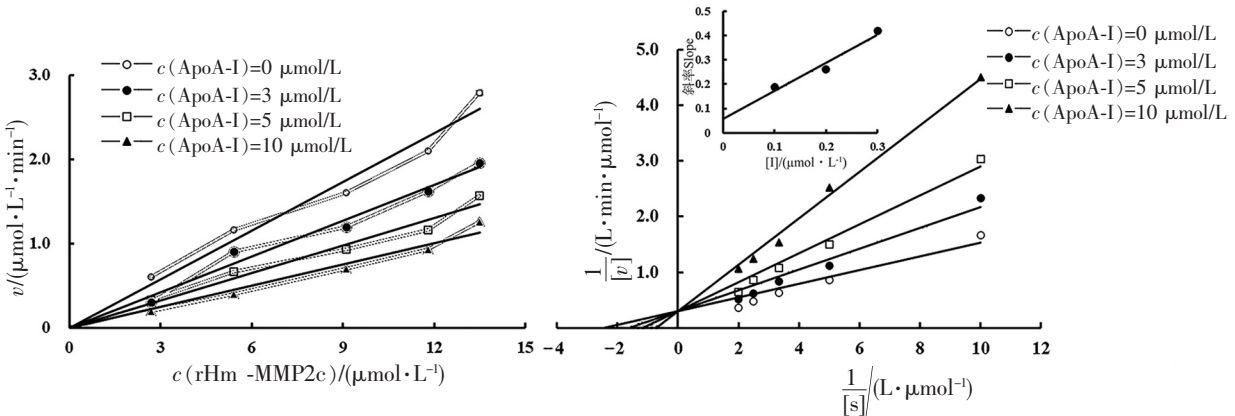


图 6 Apo A-I 对 rHm-MMP-2c 的抑制动力学及  $IC_{50}$  测定

Fig.6 Inhibition kinetics and concentration for 50% inhibition of Apo A-I toward rHm-MMP-2c

2.7 分子对接

分子对接可以直观地展示 rHm-MMP2c-MOCA 体系和 rHm-MMP2c-Apo A-I 体系之间的结合方式。rHm-MMP-2c-MOCA 体系对接的结合自由能为  $-36\text{ kJ/mol}$ ，rHm-MMP2c-Apo A-I 体系最佳对接结果的自由能为  $-49.4\text{ kJ/mol}$ ，这表明，Apo A-I 与 rHm-MMP2c 的结合比 MOCA 更强，亲和力更高。

为了探究 MOCA 与不同物种 MMP-2 催化结构域的结合位置，由 NCBI 检索可知，草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、日本海参 (*Apostichopus japonicus*) 与鲢鱼 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 的序列相似性均在 92% 以上，用人 (*Homo sapiens*) MMP-2c 的晶体结构 (PDB:1EAK) 为模板对 MMP-2c 进行建模后，采用 Autodock vina (1.1.3) 对酶和底物进行分子对接。将不同物种 MMP-2c 与



MOCA 的对接结果进行叠加发现, 鲢鱼 MMP-2c(Hm-MMP-2c)与 MOCA 的对接位置与其他 3 种不同, Hm-MMP-2c 与 MOCA 的结合位点位于其催化腔的催化区域(见图 7a)。从图 7b 中可以看到, Gly76、Leu78、Tyr282、Ala309、Pro310、Tyr312 可以与 MOCA 形成氢键, 维持整个体系的稳定性。在鲢鱼中, 与 MOCA 相互作用的残基来自催化结构域和 ZBG 区域, 而其他 3 种鱼的 MMP-2c 则通过 Fn 结合区域与 MOCA 结合。以草鱼 MMP-2c(Ci-MMP-2c)和 MOCA 为例(见图 7c), 位于 Fn 区域的 Gly227 和 Asp94 分别与 MOCA 形成氢键, 而 Glu162、Asp188、Ser189 等 Fn 区域的残基和 MOCA 主要以范德华力为主。由鲢鱼、草鱼 MMP-2c 与 MOCA 的对接结果可知, 虽然酶的一级、二级结构相似, 但它们与同一底物的结合可能存在较大差异。对比 rHm-MMP-2c 与 Apo A-I 对接的结果, 该抑制剂主要通过氢键作用于 rHm-MMP-2c 的 Fn 区, 包括 Asp75、Leu78、Leu286、His300、Glu302、Ile311、Tyr312、Thr313、Lys316、Leu77、His290 和 Val287(见图 7e)。Apo A-I 与 rHm-MMP-2c 在 MOCA 结合的催化区域发生相互作用, 以往报道表明, 催化腔内的残基在抑制剂结合中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。可以推测, Apo A-I 形成的空间位阻堵住了底物的入口, 从而抑制了 rHm-MMP-2c 的活性。

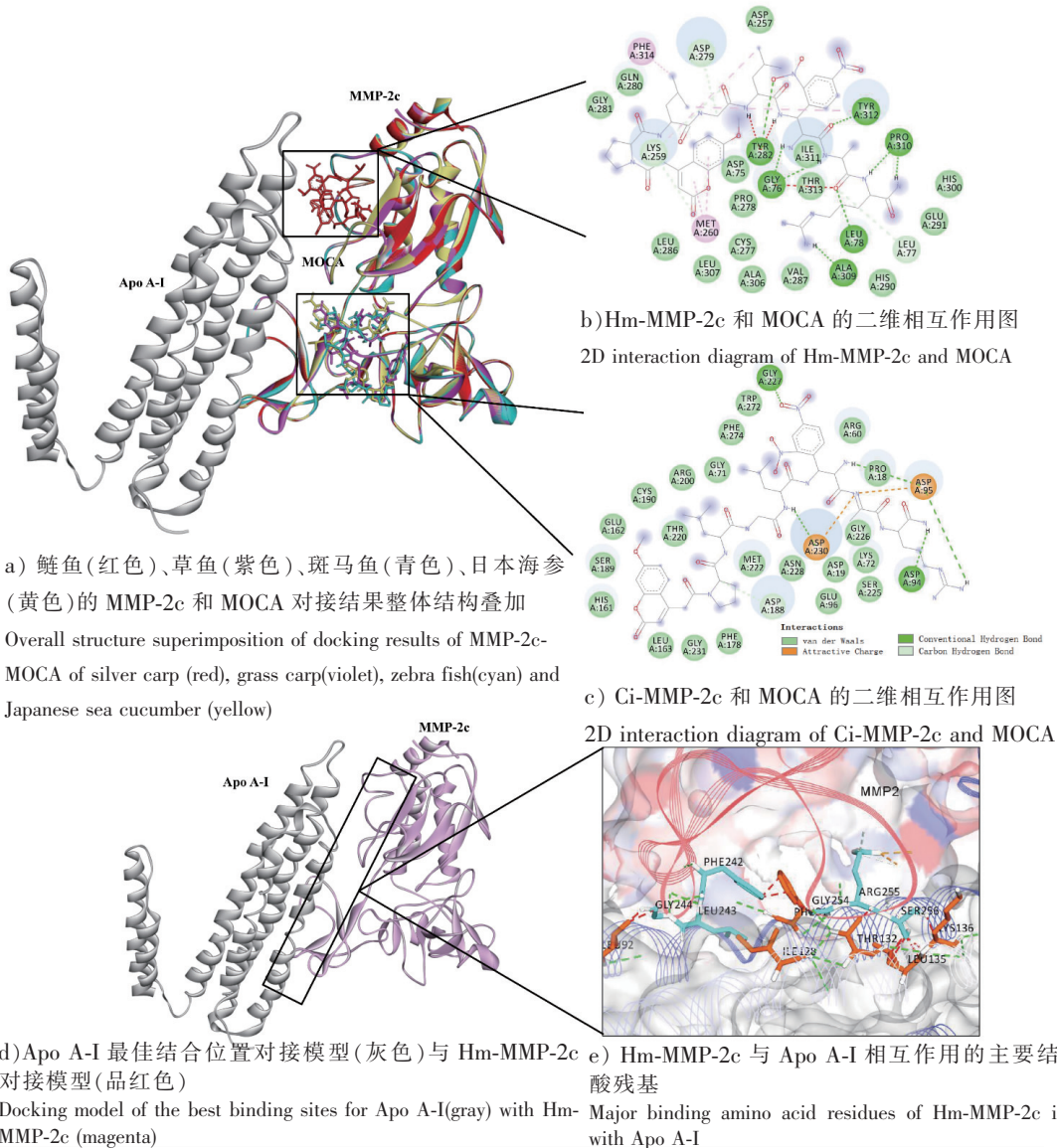


图 7 MMP-2c 和 MOCA 抑制剂的分子对接  
Fig.7 The docking of MMP-2c with MOCA and inhibitor

### 3 结论

本研究以鲢鱼为对象,在大肠杆菌中高效表达并纯化了 MMP-2 的催化结构域(rHm-MMP-2c)。以 rHm-MMP-2c 为靶标,从鲢鱼肌肉中筛选并纯化了一种内源性抑制剂,质谱分析鉴定为载脂蛋白 A-I (Apo A-I)。Apo A-I 为 rHm-MMP-2c 的竞争型抑制剂,其抑制常数( $K_i$ )为  $1.31 \mu\text{mol/L}$ ,半抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )为  $3.33 \mu\text{mol/L}$ 。rHm-MMP-2c 在  $4^\circ\text{C}$  时降解 I 型胶原蛋白, Apo A-I 的加入可有效抑制其降解速率。分子对接结果表明, Apo A-I 和 rHm-MMP-2c 主要以氢键相互作用为主, Apo A-I 形成的空间位阻阻碍了底物与酶催化活性中心接近,从而抑制酶的活性。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1]王谦,焦熙栋,闫博文,等. 鲢鱼背肌组织蛋白酶 L 的初步分离及蛋白层析纯化方法[J]. 中国食品学报, 2022,22(3): 111-119.
- [2]刘瑞,李睿智,王嵬,等. 碱性蛋白酶降解鲢鱼肌原纤维蛋白的组学分析[J]. 中国食品学报, 2021,21(3): 43-52.
- [3]YASUTAKA S,MASASHI A,KAYOKO H,et al. Possible degradation of type I collagen in relation to yellowtail muscle softening during chilled storage[J]. Fisheries Science, 2004,70(4): 703-709. DOI:10.1111/j.1444-2906.2004.00860.x.
- [4]WU J L,WANG S,SUN X Y,et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of a matrix metalloproteinase from the skeletal muscle of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) with collagen degradation activity[J]. Process Biochemistry, 2016,51(7): 854-864. DOI:10.1016/j.procbio.2016.04.004.
- [5]KESSENBROCK K,PLAKS V,WERB Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment[J]. Cell, 2010,141(1): 52-67. DOI:10.1016/j.cell.2010.03.015.
- [6]ROBERT P S,SAMANTHA A O,SUNEEL S A. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks[J]. Genome Biology, 2003,4(6): 1-11.
- [7]BRACHO G E,HARRD N F. Identification of two matrix metalloproteinases in the skeletal muscle of Pacific rockfish (*Sebastes* sp.) [J]. Journal of Food Biochemistry, 1995,19(4): 299-319. DOI:10.1111/j.1745-4514.1995.tb00536.x.
- [8]KUBATA S,TOYOHARA H,SAKAGUCHI M. Occurrence of gelatinolytic activities in yellowtail tissues[J]. Fishiers Science, 1998,64(3): 439-442. DOI:10.2331/fishsci.64.439.
- [9]LODEMEL J B,OLSEN R L. Gelatinolytic activities in muscle of atlantic cod (*Gadus morhua*), spotted wolffish (*Anarhichas minor*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Journal of the Science of Food Agriculture, 2003,83(10): 1031-1036. DOI:10.1002/jsfa.1501.
- [10]SAITO M,SATO K,KUNISAKI N,et al. Characterization of a rainbow trout matrix metalloproteinase capable of degrading type I collagen [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(23): 6943-6950. DOI:10.1046/j.1432-1033.2000.01807.x.
- [11]CABRAL-PACHECO G A,GARZA-VELOZ I,CASTRUITA-DE LA R C,et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020,21(24): 9739-9794. DOI:10.3390/ijms21249739.
- [12]BATRA J,ROBINSON J,SOARES A S,et al. Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2 [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012,287(19): 15935-15946. DOI:10.1074/jbc.M112.341156.
- [13]EKATERINA M,ULRICH B,KARL T. Structural insight into the complex formation of latent matrix metalloproteinase 2 with tissue inhibitor of metalloproteinase 2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002,99(11): 7414-7419. DOI:10.1073/pnas.102185399.
- [14]SONG X,HU X,ZHANG Y,et al. Inhibitory mechanism of epicatechin gallate on tyrosinase inhibitory interaction, conformational change and computational simulation[J]. Food Function, 2020,11(6): 4892-4902. DOI:10.1039/d0fo00003e.
- [15]祝学卫,陈保生. 人载脂蛋白 Apo A-I 的高级结构模型和主要功能域的确定[J]. 生命的化学, 2003,23(4): 281-283.
- [16]何欣蓉,杨阳,张敏霞,等. 拟穴青蟹细丝蛋白 C 的生物信息学分析及重组表达[J]. 集美大学学报(自然科学版),

2021,26(1):14-21.

- [17] NAGASE H, FIELDS C G, FIELDS B G. Design and characterization of a fluorogenic substrate selectively hydrolyzed by stromelysin 1 (matrix metalloproteinase-3) [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(33): 20952-20957. DOI:10.1016/s0021-9258(17)31914-2.
- [18] 陈清西. 酶学及其研究技术[M]. 厦门:厦门大学出版社, 2015.
- [19] WALLQVIST A, COVELL D G. Docking enzyme-inhibitor complexes using a preference-based free-energy surface[J]. Proteins, 1996, 25: 403-419.
- [20] 马文峰, 丁满生, 张梅芳, 等. 利用大肠杆菌高效表达人载脂蛋白 AI 及其性质分析[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 198-293.
- [21] CHENG D H, SHEN Q, NAN F J, et al. Purification and characterization of catalytic domains of gelatinase A with or without fibronectin insert for high-throughput inhibitor screening[J]. Protein Expression and Purification, 2003, 27(1): 63-74. DOI:10.1016/S1046-5928(02)00530-2.
- [22] MASKOS K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors[J]. Biochimie, 2005, 87(3/4): 249-263. DOI:10.1016/j.biochi.2004.11.019.
- [23] 刘士毓, 霍晨敏, 辛静, 等. MBP-PTP19 融合蛋白载体构建及蛋白纯化[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2017, 41(3): 256-263.
- [24] 伍久林, 卢宝驹, 杜明华, 等. 鲤鱼红色肉中金属蛋白酶的分离纯化与性质分析[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2008, 13(4): 289-294.
- [25] WANG C, ZHAN C L, CAI Q F, et al. Expression and characterization of common carp (*Cyprinus carpio*) matrix metalloproteinase-2 and its activity against type I collagen[J]. Journal of Biotechnology, 2013, 177(1): 45-52. DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.02.019.
- [26] VILLARROEL F, BASTIAS A, CASADO A, et al. Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish[J]. Fish Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 197-209. DOI:10.1016/j.fsi.2006.10.008.
- [27] VAN LENTEN B J, NAVAB M, SHIH D, et al. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation[J]. Trends in Cardiovascular Medicine, 2001, 11: 155-161. DOI:10.1016/S1050-1738(01)00095-0.
- [28] KIM K Y, CHO Y S, BANG I C, et al. Isolation and characterization of the apolipoprotein multigene family in *Hemibarbus mylodon* (Teleostei: Cypriniformes) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2009, 152(1): 38-46. DOI:10.1016/j.cbpb.2008.09.084.
- [29] CHOUDHURY M, OKU T, YAMADA S, et al. Isolation and characterization of some novel genes of the apolipoprotein A-I family in Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Central European Journal of Biology, 2011, 6(4): 545-557. DOI:10.2478/s11535-011-0042-8.
- [30] VAN DOREN S R. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin[J]. Matrix Biology, 2015, 44/46: 224-231. DOI:10.1016/j.matbio.2015.01.005.
- [31] WU J L, CHEN S F, CAI Z X, et al. Partial characterization of gelatinolytic proteinases from the skeletal muscle of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2012, 36(6): 648-656. DOI:10.1111/j.1745-4514.2011.00579.x.
- [32] SARKER H, HARDY E, HAIMOUR A, et al. Identification of fibrinogen as a natural inhibitor of MMP-2 [J]. Science Reports, 2019, 9(1): 1-13. DOI:10.1038/s41598-019-40983-y.
- [33] AHMAD A, SAYED A, GINNEBAUGH K R, et al. Molecular docking and inhibition of matrix metalloproteinase-2 by novel difluorinatedbenzylidene curcumin analog[J]. American Journal of Translational Research, 2015, 7(2): 298-308.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)