

## CEACAM1 源性荧光多肽底物 Site 84 对 MMP-2、-7、 -9、-12 酶活性检测的研究

万雯<sup>1)</sup>, 叶雨佳<sup>1)</sup>, 杨晓娜<sup>1)</sup>, 杨理宏<sup>1)</sup>, 王华炜<sup>1)</sup>, 董玲<sup>1)</sup>, 陈丽星<sup>2)</sup>, 孟照辉<sup>1)</sup>  
(1)昆明医科大学第一附属医院心脏内一科; 2)心脏内三科, 云南昆明 650032)

[摘要] 目的 探索 CEACAM1 源性多肽合成的荧光底物 Site 84 对 MMP-2, -7, -9, -12 酶活性的检测, 并进一步探索荧光多肽底物 Site 84 在区分同属于 MMPs 明胶酶谱中 MMP-2 和 MMP-9 的应用。方法 采用荧光酶学法观察荧光多肽底物 Site 84 对 MMP-2, -7, -9, -12 酶活性的检测; 进一步观察底物 Site 84 对明胶酶谱中 MMP-2 和 MMP-9 酶活性的敏感性和特异性; 获得底物 Site 84 与 MMP-2 的酶促反应的动力学参数  $K_m$ 、 $K_{cat}$ 。结果 以 Site 84 为底物, 获得 MMP-12、-7、-2 的酶活力曲线, 但未获得 MMP-9 的酶活力曲线; 此外, 以 Site 84 为底物, 可特异性检测明胶酶谱中 MMP-2 的酶活性, 其可检测低浓度(0.6  $\mu\text{M}$ )MMP-2 的酶活性, 然而对高浓度(6  $\mu\text{M}$ )MMP-9 未见明显酶促反应; 最后, MMP-2 和底物 Site 84 的酶促反应动力学参数:  $K_m = 315 \mu\text{M}$ ,  $K_{cat}/K_m = 2565 / \text{MS}$ 。结论 以 CEACAM1 源性底物 Site 84 作为新型的荧光多肽底物, 可获得 MMP-12、-7、-2 的酶活力曲线, 且可特异性检测 MMPs 明胶酶谱中 MMP-2 的酶活性。

[关键词] Site 84; 荧光多肽底物; 酶活性; 明胶酶; CEACAM1 源性

[中图分类号] R541.4 [文献标志码] A [文章编号] 2095 - 610X(2025)02 - 0009 - 08

## Study on the Detection of MMP-2, -7, -9, and -12 Enzymatic Activity Using CEACAM1-Derived Fluorescent Peptide Substrate Site 84

WAN Wen<sup>1)</sup>, YE Yujia<sup>1)</sup>, YANG Xiaona<sup>1)</sup>, YANG Lihong<sup>1)</sup>, WANG Huawei<sup>1)</sup>,  
DONG Ling<sup>1)</sup>, CHEN Lixing<sup>2)</sup>, MENG Zhaohui<sup>1)</sup>

(1) Department 1 of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650032; 2) Department 3 of Cardiology, The First Affiliated Hospital of  
Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] Objective To explore the the detection of MMP-2, -7, -9, and -12 enzymatic activity using the CEACAM1-derived fluorescent peptide substrate Site 84, investigating the application of substrate Site 84 to distinguishing between MMP-2 and MMP-9 in the gelatinase spectrum of MMPs. Methods The fluorescent enzymatic method was employed to observe the detection of MMP-2, -7, -9, and -12 enzymatic activity using substrate Site 84; further observations were made on the sensitivity and specificity of substrate Site 84 to enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 within the gelatinase spectrum; the kinetic parameters ( $K_m$  and  $K_{cat}$ ) of the enzymatic reaction between substrate Site 84 and MMP-2 were obtained. Results Using Site 84 as a substrate, enzymic kinetics curves for MMP-12, -7, -2 were obtained, but no enzymatic activity curve for MMP-9 was

[收稿日期] 2024 - 08 - 12

[基金项目] 国家自然科学基金(82360077); 云南省基础研究计划昆医联合专项-面上项目(202201AY070001-082); 云南省基础研究计划青年项目(202201AU070063); 昆明医科大学第一附属医院“535”高层次人才(2024535Q03)

[作者简介] 万雯(1991~), 女, 江西南昌人, 医学博士, 主治医师, 主要从事心血管疾病的临床及基础研究工作。

[通信作者] 孟照辉, E-mail: zhmeng@aliyun.com

observed. Furthermore, Site 84 specifically detected the enzymatic activity of MMP-2 within the gelatinase spectrum, capable of detecting low concentration (0.6  $\mu\text{M}$ ) of MMP-2 enzymatic activity, but no obvious enzymatic reaction was observed for high concentration (6  $\mu\text{M}$ ) of MMP-9; the kinetics parameters for the enzymatic reaction between Site 84 and MMP-2 were  $K_m = 315 \mu\text{M}$ ,  $K_{cat}/K_m = 2565/\text{MS}$ . **Conclusion** The CEACAM1-derived substrate Site 84 serves as a novel fluorescent peptide substrate, enabling the acquisition of enzymatic activity curves for MMP-12, -7 and -2, and specifically detecting the enzymatic activity of MMP-2 within the MMP gelatinase spectrum.

[**Key words**] Site 84; Fluorescent polypeptide substrate; Enzymatic activity; Gelatinase; CEACAM1-derived.

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类主要源自内皮细胞、成纤维细胞及平滑肌细胞等多种细胞的内肽酶家族<sup>[1]</sup>, 其主要通过降解包括弹性蛋白、胶原蛋白、纤维连接蛋白等多种成分组成的细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 在胚胎生成和发育、血管生成及伤口愈合等生理过程起着关键作用, 同时, 其在肿瘤转移、心力衰竭、血栓性疾病、高血压等多种疾病的发生发展过程中也发挥了重要作用<sup>[1-4]</sup>。通过对 MMPs 更精准地检测可进一步了解疾病的发生机制, 有助于对冠心病等多种心脑血管疾病的早期诊断和预后评估。因此, 研发出更准确的 MMPs 检测技术具有重要意义。目前, 检测蛋白酶活性的方法众多, 而基于荧光共振能量转移的荧光酶学法操作简便, 干扰因素少, 现已广泛应用于酶学研究中。有研究表明, 血小板 CEACAM1 胞外段氨基酸序列中存在多个 MMP-12 的酶切位点<sup>[5]</sup>。因此, 本研究拟在此基础上采用多肽合成、荧光酶学法等方法, 通过设计含 MMP-12 酶切位点的多肽构建荧光底物, 探索 CEACAM1 源性荧光多肽底物与 MMP-12 的酶动力学曲线, 而由于 MMPs 家族间存在底物相似性, 同时探索 CEACAM1 源性荧光多肽底物分别与 MMP-2, -7, -9 的酶动力学曲线, 有望研发出可特异性检测 MMP-2, -7, -9, -12 酶活性的新型底物。

## 1 材料与方法

### 1.1 多肽合成

前期研究中已成功表达并纯化 CEACAM1 细胞外功能区蛋白(Ser34-Thr252, 26kDa), 将 MMP-12 与 CEACAM1 胞外段在 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 通过 SDS-PAGE 获得多个酶切片段, 并通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)、质谱及测序分析, 精确定位 CEACAM1 序列中 MMP-12 的酶切位点, 并成功构建酶切产物的肽

指纹图谱<sup>[6]</sup>。

### 1.2 主要实验试剂与仪器

委托北京赛百盛生物工程公司化学合成荧光多肽底物 Site 84, 重组人 MMP-2、MMP-9 从美国 R&D Systems 公司采购获得, APMA 及荧光底物 XIV 从美国 Anaspec 公司采购获得, GM6001(广谱 MMPs 抑制剂)从美国 MCE 公司采购获得, BCA 定量试剂盒、考马斯亮蓝 R-250 染色液、染色脱色液等常用试剂购自中国上海生工公司; Assay Buffer(A)液(mM, w/v, PH 7.4): 50Tris, 10 CaCl<sub>2</sub>, 150 NaCl, 0.05% Brij-35, Assay Buffer (B)液(mM, w/v, PH 7.4): 50Tris, 20 CaCl<sub>2</sub>, 200 NaCl, 0.005% Brij-35; 荧光酶学分析仪为美国 Thermo 公司生产, 检测波长: 激发/发射(Ex/Em)波长分别为 485 nm/538 nm。

### 1.3 研究方法

**1.3.1 荧光酶学法检测 MMPs 蛋白酶活性** 目前检测蛋白酶活性的方法众多, 而基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的荧光酶学法操作简便, 干扰因素少, 可实时检测, 动态观察酶促反应进程, 现已广泛应用于量化酶促反应的反应速率或动力学参数, 研究酶与底物的结合过程, 以及用于酶活性的高通量筛选和功能研究等<sup>[7]</sup>。荧光酶学法检测 MMPs 的活性主要是通过 FRET 原理: 荧光基团和淬灭基团分别结合在 FRET 肽两端, 当 FRET 肽未受裂解时, 淬灭基团可通过淬灭荧光基团使其无法在激发波长内被检测到; 而当其经 MMPs 等活性酶裂解后, 荧光基团不受淬灭, 荧光强度即可在特定激发/发射(Ex/Em)波长下获得, 从而可检测到 MMPs 酶活性<sup>[7]</sup>。本研究将荧光基团 5-羧基荧光素(5-FAM)结合于合成多肽 N 端的第 1 位氨基酸, 以及将荧光淬灭基团 5-羧基四甲基若丹明(5-TAMRA)结合于第 11 位氨基酸, 即可形成荧光多肽底物<sup>[8]</sup>。

**1.3.2 MMP-2, -7, -9, -12 酶原的活化及蛋白浓度的定量** MMP-2、-9 酶原分别加入 1mM

APMA, 37 °C 下各孵育 1 h 及 24 h 进行活化, 而后采用 BCA 蛋白定量法分别获得 rhMMP-2、-9 以及本实验室纯化而得的 rhMMP-7、-12 的酶浓度; 通过 BCA 蛋白法定量, 在获得标准曲线后, 计算样品中的蛋白浓度。

**1.3.3 MMPs 酶活性浓度的测定** DynaFit 是一款用于处理生物学或化学中涉及复杂反应动力学的模拟和统计分析的计算软件, 可用于研究生化或化学反应的进展, 可模拟酶促反应中实验数据, 拟合酶促反应中速率常数, 使大多原本在理论上可行的计算方法成为现实, 同时, 可用数值方法准确求出无解的动力学问题<sup>[9]</sup>。

本研究采用与 MMPs 紧密结合的可逆性广谱抑制剂 GM6001 进行酶活性位点滴定获得 rhMMP-2、-7、-9、-12 的酶活性浓度, 通过将不同浓度 GM6001 抑制 MMPs 对荧光底物的酶促反应, 采用(抑制剂浓度; 残余酶活性)数据组代入 DynaFit4 软件拟合方程<sup>[9]</sup>。具体实验步骤如下: 加入不同体积的 rhMMP-2, -7, -9, -12 溶液至 96 孔板(黑色不透明)孔内, 终体积 45  $\mu\text{L}$ ; 每孔分别加入等体积(45  $\mu\text{L}$ )的反应缓冲液或以等比稀释的抑制剂 GM6001 溶液, 并与底物 Site 2 或 XIV 工作液分别置于 37 °C 温育 1 h; 分别加入 10  $\mu\text{L}$  含不同浓度底物 XIV 或 Site 2 的缓冲液, 获得 100  $\mu\text{L}$  反应体系, 酶与底物混匀后立即放入荧光酶标仪, 37 °C 下用 Ex/Em=485 nm/538 nm 的滤光片读取荧光强度, 每半分钟识别 1 次, 共识别 1000 次; rhMMP-2, -7, -9, -12 酶活性浓度通过 DynaFit 4 软件得出。以上实验每组重复 3 次, 相对荧光强度( $\Delta\text{RFU}$ )以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**1.3.4 MMP-2、-7、-9、-12 与底物 Site 84 的酶促反应** 在黑色不透明 96 孔板中加入 50  $\mu\text{L}$  反应缓冲液或相同酶活性浓度的 rhMMP-2、-7、-9、-12 的溶液, 分别在 37 °C 下与荧光多肽底物 Site 84 孵育 30 min; 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  孵育后的 Site 84 工作液, 获得 100  $\mu\text{L}$  反应体系, rhMMPs 酶活性浓度为 5  $\mu\text{M}$ , Site 84 终浓度为 50  $\mu\text{M}$ ; 酶与底物混匀后立即放入荧光酶标仪, 37 °C 下用 Ex/Em=485 nm/538 nm 的滤光片读取荧光强度, 每半分钟识别 1 次, 共识别 1000 次; 绘制 MMP-2, -7, -9, -12 与 Site 84 反应的折线图。以上实验每组重复 3 次, 相对荧光强度( $\Delta\text{RFU}$ )以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**1.3.5 MMP-2 及 MMP -9 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应** 在 96 孔板(黑色不透明)中加入

50  $\mu\text{L}$  反应缓冲液或不同酶活性浓度(0.6、3、6  $\mu\text{M}$ )的 rhMMP-2、rhMMP-9 溶液, 分别在 37 °C 下与荧光多肽底物 Site 84 孵育 30 min; 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  孵育后的 Site 84 工作液, 获得 100  $\mu\text{L}$  反应体系, Site 84 终浓度为 50  $\mu\text{M}$ ; 酶与底物混匀后立即放入荧光酶标仪, 37 °C 下用 Ex/Em=485 nm/538 nm 的滤光片读取荧光强度, 每半分钟识别一次, 共识别 1000 次; 分别绘制 MMP-2、MMP-9 与 Site 84 反应的折线图。以上实验每组重复 3 次, 相对荧光强度( $\Delta\text{RFU}$ )以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

**1.3.6 MMP-2 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应** 在 96 孔板(黑色不透明)中加入 50  $\mu\text{L}$  反应缓冲液或不同酶活性浓度(0、0.15、0.3、0.6、1.2、3、6  $\mu\text{M}$ )的 rhMMP-2 溶液 50  $\mu\text{L}$ , 分别在 37 °C 下与荧光多肽底物 Site 84 孵育 30 min; 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  孵育后的 Site 84 工作液, 获得 100  $\mu\text{L}$  反应体系, Site 84 终浓度为 50  $\mu\text{M}$ ; 酶与底物混匀后立即放入荧光酶标仪, 37 °C 下用 Ex/Em=485 nm/538 nm 的滤光片读取荧光强度, 每半分钟识别一次, 共识别 1000 次; 绘制不同浓度 MMP-2 对 Site 84 水解效率的折线图; 绘制 MMP-2 与 Site 84 酶动力学曲线, 并通过 DynaFit 4 软件计算出 MMP-2(3  $\mu\text{M}$ )对荧光多肽底物 Site 84 的酶动力学参数  $K_m$ 、 $K_{cat}/K_m$ 。以上实验每组重复三次, 相对荧光强度( $\Delta\text{RFU}$ )以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CEACAM1 源性荧光多肽底物 Site 84 的合成

合成的多肽 Site 84 具备完整的氨基酸序列, 经 HPLC 验证其纯化纯度  $> 98\%$ , MS 验证其分子量(molecular weight, MW)1906 Da(图1)。而后, 将 5-羧基荧光素(5-FAM)荧光基团结合于 N 端第 1 位缬氨酸氨基, 并将 5-羧基四甲基若丹明(5-TAMRA), 即荧光猝灭基团结合于第 11 位赖氨酸氨基, 形成荧光多肽底物 Site84。

### 2.2 rhMMP-2, -7, -9, -12 酶活性浓度的测定

采用不同浓度 GM6001 抑制 rhMMP-2, -7, -9, -12 对荧光底物的酶促反应, 采用(抑制剂浓

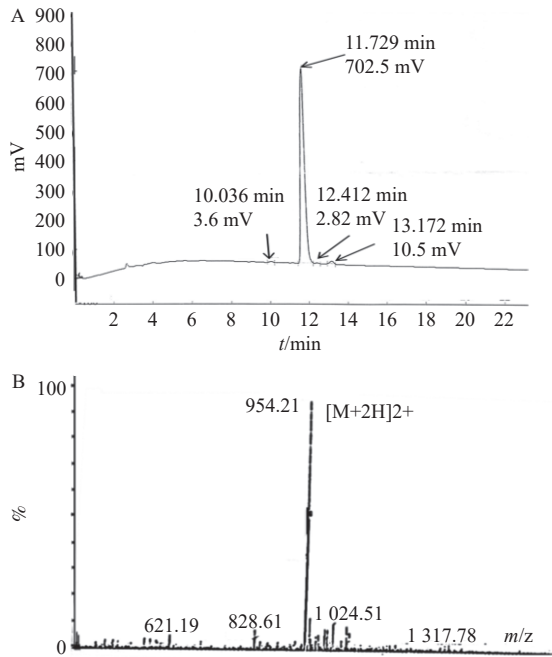


图 1 Site84 的高效液相色谱 (HPLC) 分析图和质谱分析图

Fig. 1 HPLC analysis and mass spectrometry analysis of Site 84

A: HPLC 纯化图, 波峰即为 Site 84; B: 图 A 中波峰的二次质谱图。

度; 残余酶活性)数据组代入DynaFit4 软件拟合方程, 并求出各 rhMMPs 的酶活性浓度。经 DynaFit 4 软件处理后, 各 rhMMPs 酶活性浓度滴定曲线拟合良好, 经计算后, rhMMP-2、-7、-9、-12 的酶活性浓度分别为  $(600 \pm 137)$  nM,  $(701 \pm 38)$  nM,  $(1200 \pm 171)$  nM,  $(2640 \pm 160)$  nM(图2)。

### 2.3 MMP-2、-7、-9、-12 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

为明确各 MMPs 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应, 本研究将各 MMPs 的酶活性浓度维持在均一状态后, 再分别评估 MMP-2、-7、-9、-12 与 Site 84 的酶动力学反应。通过分别将相同酶活性浓度的 MMP-2、-7、-9、-12 ( $5 \mu\text{M}$ ) 与等浓度的荧光多肽底物 Site 84 ( $50 \mu\text{M}$ ) 在  $37^\circ\text{C}$  下反应, 发现 MMP-12、MMP-7、MMP-2 均可裂解荧光多肽底物 Site 84, 并获得酶活力曲线, 发现对 Site 84 的裂解效率分别是  $\text{MMP-12} > \text{MMP-7} > \text{MMP-2}$ ; 而等酶活性浓度的 MMP-9 与 Site 84 反应未获得酶活力曲线(图3)。

### 2.4 明胶酶(MMP-2 及 MMP-9)与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

上述研究发现, 以 Site 84 为底物, 可获得 MMP-2 的酶活力曲线, 而未获得 MMP-9 的酶活

力曲线。因此, 为明确底物 Site 84 对明胶酶谱活性的特异性检测, 本研究将不同酶活性浓度的明胶酶 MMP-2 或 MMP-9 与底物 Site 84 反应, 发现 Site 84 可用于检测低浓度( $0.6 \mu\text{M}$ )MMP-2 的酶活性, 然而对高浓度( $6 \mu\text{M}$ )MMP-9 未见明显酶促反应(图4)。由此可见, 荧光多肽底物 Site 84 与明胶酶反应时可特异性检测 MMP-2 的酶活性。

### 2.5 MMP-2 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

为明确荧光多肽底物 Site 84 对 MMP-2 酶活性检测的有效性, 本研究将不同酶活性浓度的 MMP-2 与底物 Site 84 进行反应, 发现随着 MMP-2 酶活性浓度的增加, 酶促反应速率也随之增快(图5A), 符合酶动力学规律。而后, 将底物 Site 84 与 MMP-2 进行酶促反应, 到达平台期后, 使用 DynaFit4 软件求出 MMP-2 和底物 Site 84 的酶促反应动力学参数:  $K_m$  为  $315 \mu\text{M}$ ,  $K_{cat}/K_m=2565/\text{MS}$ (图5B), 由此可推测, 底物 Site 84 作为新型的荧光多肽底物, 可有效检测 MMP-2 的酶活性。

## 3 讨论

### 3.1 MMPs 及其分类

基质金属蛋白酶可广泛表达于多种组织及细胞, 而血小板也可表达和分泌多种 MMPs, 由血小板释放及心血管系统其他细胞产生的 MMPs 均可调节血小板功能, 在血小板粘附、聚集等过程中发挥重要作用, 从而影响冠心病的进程<sup>[10-12]</sup>。MMPs 家族成员结构具有相似性, 一般由 5 个功能不同的结构域组成<sup>[13-14]</sup>。MMPs 可分为六大类, 分别是包含 MMP-1、MMP-8、MMP-13、MMP-18 的胶原酶, 包含 MMP-2、MMP-9 的明胶酶, 包含 MMP-3、MMP-10、MMP-11 的间质溶解酶, 包含 MMP-7、MMP-26 的基质溶解因子, 以 MMP-14、MMP-15 为主的膜型基质金属蛋白酶, 以及以 MMP-19、MMP-21 为主的其他分泌型 MMPs<sup>[13]</sup>。

### 3.2 MMP2、-7、-9、-12 与冠心病的相关性

MMP-7 是最小的 MMPs 家族成员, 主要表达于心肌细胞和巨噬细胞, 血小板也可表达 MMP-7。MMP-7 可降解 ECM 中的大部分蛋白, 还可活化其他的 MMPs 及  $\text{TNF-}\alpha$ <sup>[15]</sup>。此外, 有研究发现, MMP-7 可能与动脉粥样硬化斑块的易损性密切相关, 且在梗死心肌处高表达, 可能参与梗死后心室重塑, 诱导心衰形成<sup>[15-16]</sup>。而在冠心病血清中也发现 MMP-7 的高表达, 预示 MMP-7 可能参与动脉粥样硬化血栓的形成<sup>[17]</sup>。

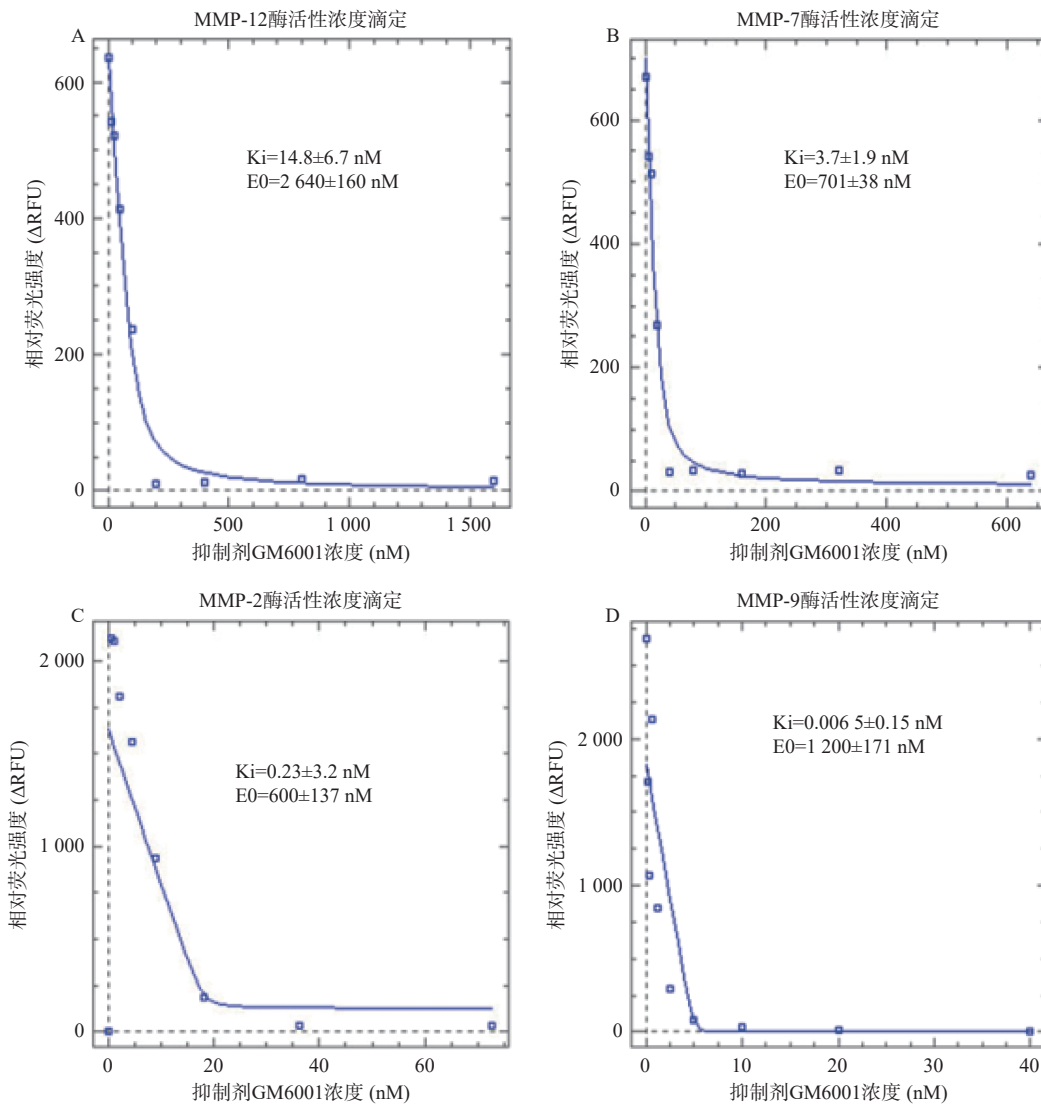


图2 rhMMPs 酶活性位点滴定

Fig. 2 Titration of enzymatic activity sites of rhMMPs

A: MMP-12 的酶活性浓度; B: MMP-7 的酶活性浓度; C: MMP-2 的酶活性浓度; D: MMP-9 的酶活性浓度。

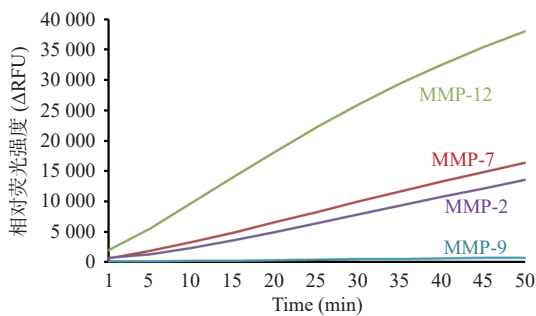


图3 MMP-2/-7/-9/-12 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

Fig. 3 Enzymatic reactions of MMP-2/-7/-9/-12 with fluorescent peptide substrate Site 84

MMP-12 除主要在巨噬细胞和平滑肌细胞表达, 血小板同样也能产生并释放 MMP-12, 而 MMP-12 的释放可通过裂解血小板表面 CEACAM1

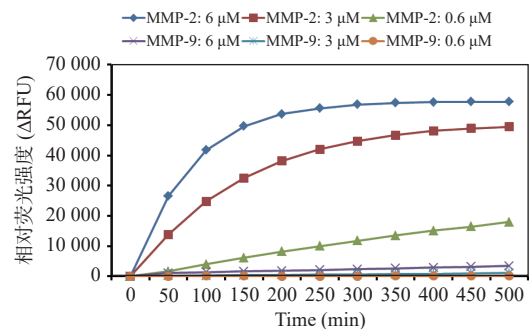


图4 明胶酶 (MMP-2 及 MMP-9) 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

Fig. 4 Enzymatic reactions of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) with fluorescent peptide substrate Site 84

从而降低 CEACAM1 对血小板因胶原刺激后活化和聚集等反应的抑制效果<sup>[6]</sup>。另外有研究发现, MMP-12 也可能与粥样硬化斑块不稳定密切相

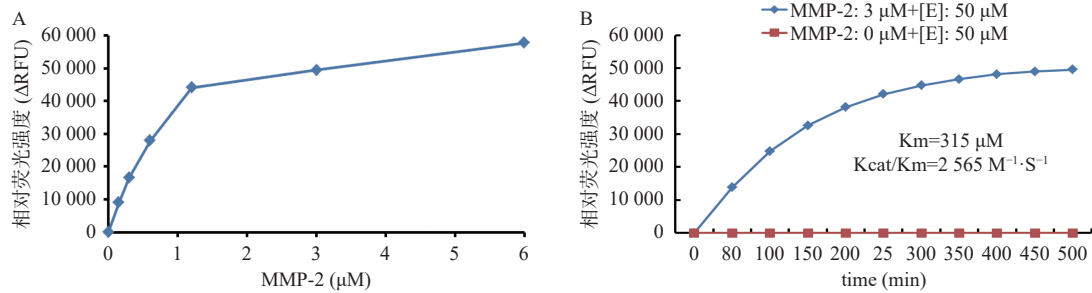


图 5 MMP-2 与荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应

Fig. 5 Enzymatic reaction of MMP-2 with fluorescent peptide substrate Site 84

A: 荧光多肽底物 Site 84 对 MMP-2 酶活性的检测; B: MMP-2 和荧光多肽底物 Site 84 的酶促反应动力学参数  $K_m$  和  $K_{cat}/K_m$ 。

关<sup>[16, 18]</sup>, 且 MMP-12 可促进血栓中平滑肌细胞增殖, 导致血管管腔变窄<sup>[19]</sup>。

明胶酶主要降解变性胶原(明胶)和IV型胶原, 主要由 MMP-2、MMP-9 组成, 其在心力衰竭、血栓性疾病等病理过程中发挥重要作用<sup>[20-24]</sup>。MMP-2 主要以酶原形式存在于静息血小板胞质中, 血小板活化后, MMP-2 酶原从胞质中转移到血小板表面而后释放出大量活性形式的 MMP-2。血小板 MMP-2 可分解蛋白酶活化受体 1 (protease-activated receptor, PAR1), 从而调控血小板受体信号转导, 促进血小板聚集<sup>[25-26]</sup>; 血小板 MMP-2 的释放也可增强剪切应力诱导的血小板活化, 并增强血小板在胶原上的粘附作用<sup>[27-28]</sup>。此外, MMP-2 可通过神经-体液调节机制参与心衰的形成, 且通过检测血清 MMP-2 水平, 对初发心力衰竭患者心衰早期的 MACE 事件具有重要的预测价值<sup>[14, 29]</sup>。MMP-9 则主要存在于静息和活化状态血小板的  $\alpha$  颗粒中<sup>[30]</sup>, 可抑制凝血酶、胶原等激动剂诱导的血小板凝集<sup>[31]</sup>。MMP-9 在缺血性心力衰竭的发展中扮演着角色, 且可选择性抑制梗死后心肌重塑, 而血清 MMP-9 水平对于心梗后心血管死亡或心衰进展程度具有重要的预测价值<sup>[32-34]</sup>。

由此可知, MMPs 在多种心血管疾病的进展中发挥重要的作用, 因此, 测定 MMPs 的酶活性对冠心病等疾病的预测、诊断或预后有很大帮助。本研究将经 MMP-12 剪切 CEACAM1 胞外段后含 (A83/I84) 酶切位点相邻两段氨基酸序列合成多肽, 并在其两端分别加上荧光基团和淬灭基团合成荧光多肽底物, Site 84, 探索其与 MMP-2、-7、-9、-12 的酶促反应情况。研究发现, 以 Site 84 为底物, 可获得 MMP-12、-2、-7 的酶活力曲线, 而未获得 MMP-9 的酶活力曲线。其中, MMP-12 对 Site 84 裂解效率最强, 符合其为 MMP-12

剪切 CEACAM1 胞外段后所获得的酶切位点的特点。因此可推测, CEACAM1 胞外段源性多肽合成的荧光底物 Site 84 可能用于检测 MMP-12、-2、-7 的酶活性。

### 3.3 荧光多肽底物 Site 84 可特异性区分明胶酶

MMP-2 及 MMP-9 同属于明胶酶, 但二者在某些疾病的病理生理过程中所起作用并不完全一致。因此, 检测明胶酶谱各成员酶活性, 对明确疾病的病理生理过程, 及其分别发挥的作用至关重要。但是, 由于 MMPs 家族成员之间具有相似的底物特异性, 目前报道的多种荧光多肽底物对明胶酶活性检测特异性较低。因此, 构建具有高度敏感, 同时对于明胶酶谱可特异性检测出 MMP-2 活性的底物, 对于深入研究明胶酶的功能至关重要。本研究首次发现, 荧光多肽底物 Site 84 可检测到低酶活性 ( $0.6 \mu\text{M}$ ) 浓度的 MMP-2, 然而却未获得与高酶活性浓度 ( $6 \mu\text{M}$ ) MMP-9 的酶活力曲线, 且 MMP-2 与 Site 84 酶促反应动力学参数:  $K_m = 315 \mu\text{M}$ ,  $K_{cat}/K_m = 2565/\text{MS}$ , 表明底物 Site 84 作为新型的荧光底物, 可特异性检测 MMPs 明胶酶谱中 MMP-2 的酶活性。可能有助于临床样本 MMP-2 酶活性的检测。然而, 本研究尚未将 Site 84 用于临床样本 MMP-2 酶活性的检测, 下一步将优化反应条件, 继续观察底物 Site 84 在冠心病等临床样本中检测 MMP-2 酶活性的应用, 以及其在 MMP-2 抑制剂筛选中的应用。可为进一步研究冠心病等疾病中 MMP-2 酶活性的变化和作用机制提供新的方向, 以及为研发 MMP-2 靶向治疗提供更可靠的思路。

### [参考文献]

[1] Wang X, Khalil R A. Matrix metalloproteinases, vascular

- remodeling, and vascular disease[J]. *Advances in Pharmacology*, 2018, 81: 241–330.
- [2] Kampoli A M, Tousoulis D, Papageorgiou N, et al. Matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes: Current perspectives[J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2012, 12(10): 1192–1205.
- [3] Wang J, Tan G J, Han L N, et al. Novel biomarkers for cardiovascular risk prediction[J]. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 2017, 14(2): 135–150.
- [4] Dabek J, Kulach A, Gasior Z. The role of matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes[J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2007, 18(6): 463–466.
- [5] Ye Y, Wan W, Wang J, et al. The CEACAM1-derived peptide QLSN impairs collagen-induced human platelet activation through glycoprotein VI[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2020, 84(1): 85–94.
- [6] Wang J, Ye Y, Wei G, et al. Matrix metalloproteinase 12 facilitated platelet activation by shedding carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 486(4): 1103–1109.
- [7] Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1978, 47: 819–846.
- [8] 孟照辉, 叶雨佳, 谢月辉, 等. 一种检测人基质金属蛋白酶-12活性的荧光多肽底物 [P]. 云南省: CN201410450501.X, 2017–02–01.
- [9] Kuzmič P. DynaFit—a software package for enzymology[J]. *Methods in Enzymology*, 2009, 467: 247–280.
- [10] Santos-Martín M J, Medina C, Jurasz P, et al. Role of metalloproteinases in platelet function[J]. *Thrombosis Research*, 2008, 121(4): 535–542.
- [11] Gresele P, Falcinelli E, Sebastiano M, et al. Matrix metalloproteinases and platelet function[J]. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2017, 147: 133–165.
- [12] Seizer P, May A E. Platelets and matrix metalloproteinases[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2013, 110(5): 903–909.
- [13] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry[J]. *Circulation Research*, 2003, 92(8): 827–839.
- [14] Creemers E E, Cleutjens J P, Smits J F, et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? [J]. *Circulation Research*, 2001, 89(3): 201–210.
- [15] Lindsey M L, Escobar G P, Mukherjee R, et al. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2006, 113(25): 2919–2928.
- [16] Johnson J L, George S J, Newby A C, et al. Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(43): 15575–15580.
- [17] L. N, L. J, J. N, et al. Increased plasma concentration of matrix metalloproteinase-7 in patients with coronary artery disease [J]. *Clinical Chemistry*, 2006(8): 1522–1527.
- [18] Morgan A R, Rerkasem K, Gallagher P J, et al. Differences in matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 transcript levels among carotid atherosclerotic plaques with different histopathological characteristics[J]. *Stroke*, 2004, 35(6): 1310–1315.
- [19] Y. -B. Z, W. L, L Q. Y, et al. Expression changes and roles of matrix metalloproteinases in a rat model of traumatic deep vein thrombosis[J]. *Chinese Journal of Traumatology – English Edition*, 2010(3): 188–192.
- [20] Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis[J]. *Nature Cell Biology*, 2000, 2(10): 737–744.
- [21] O'Reilly M S, Wiederschain D, Stetler-Stevenson W G, et al. Regulation of angiostatin production by matrix metalloproteinase-2 in a model of concomitant resistance[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(41): 29568–29571.
- [22] Hannocks M J, Zhang X, Gerwien H, et al. The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes[J]. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 2019, 75: 102–113.
- [23] Kurzepa J, Kurzepa J, Golab P, et al. The significance of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in the ischemic stroke[J]. *The International Journal of Neuroscience*, 2014, 124(10): 707–716.
- [24] Shevchenko A V, Golovanova O V, Konenkov V I, et al.

- Analysis of the gene polymorphism of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with coronary heart disease[J]. *Terapevticheski Arkhiv*, 2010, 82(1): 31-34.
- [25] Trivedi V, Boire A, Tehemychev B, et al. Platelet matrix metalloproteinase-1 mediates thrombogenesis by activating PAR1 at a cryptic ligand site[J]. *Cell*, 2009, 137(2): 332-343.
- [26] Sebastiano M, Momi S, Falcinelli E, et al. A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2-mediated PAR1 biased signaling[J]. *Blood*, 2017, 129(7): 883-895.
- [27] Gresele P, Falcinelli E, Loffredo F, et al. Platelets release matrix metalloproteinase-2 in the coronary circulation of patients with acute coronary syndromes: possible role in sustained platelet activation[J]. *European Heart Journal*, 2011(3): 316-325.
- [28] Martinez A, Salas E, Radomski A, et al. Matrix metalloproteinase-2 in platelet adhesion to fibrinogen: interactions with nitric oxide[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical research*, 2001(4): 646-651.
- [29] Sanchis L, Andrea R, Falces C, et al. Prognosis of new-onset heart failure outpatients and collagen biomarkers[J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2015, 45(8): 842-849.
- [30] Sheu J R, Fong T H, Liu C M, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2004, 143(1): 193-201.
- [31] Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, et al. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2[J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, 82(6): 1730-1735.
- [32] Dini F L, Buralli S, Bajraktari G, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 better predicts outcome than N-terminal protype-B natriuretic peptide in patients with systolic heart failure and a high prevalence of coronary artery disease[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2010, 64(5): 339-342.
- [33] Wagner D R, Delagardelle C, Ernens I, et al. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction[J]. *Journal of Cardiac Failure*, 2006, 12(1): 66-72.
- [34] Kelly D, Khan S Q, Thompson M, et al. Plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-9: novel indicators of left ventricular remodeling and prognosis after acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2008, 29(17): 2116-2124.