

• 综述 •

## Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展

刘云杨, 蒋帅, 李谦, 孔毅

中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 211198

刘云杨, 蒋帅, 李谦, 等. Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(11): 3988-4000.

Liu YY, Jiang S, Li Q, et al. Advances of Kunitz-type serine protease inhibitors. Chin J Biotech, 2021, 37(11): 3988-4000.

**摘要:** Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂是一类普遍存在的蛋白酶抑制剂, 在体内各项生命活动中扮演着重要角色。这类抑制剂结构稳定且富有特色, 通常具有一个或几个串联存在的 Kunitz 结构域, 能够以类似底物的方式与丝氨酸蛋白酶结合, 从而抑制酶的活性。在功能方面, Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂参与凝血和纤维蛋白溶解、肿瘤免疫、炎症调节以及抵抗细菌、真菌感染等过程。文中就 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂研究进展作一综述, 为新型 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的开发提供研究思路。

**关键词:** Kunitz 结构域, 蛋白酶抑制剂, 凝血平衡, 炎症反应, 感染, 免疫调节

## Advances of Kunitz-type serine protease inhibitors

Yunyang Liu, Shuai Jiang, Qian Li, and Yi Kong

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, Jiangsu, China

**Abstract:** Kunitz-type serine protease inhibitors are a class of ubiquitous protease inhibitors, which play important roles in various life activities. The structures of such inhibitors are generally stable, and are usually characterized by the presence of one or several Kunitz domains in tandem, which are able to bind to serine proteases in a manner similar to substrate binding, thereby inhibiting enzyme activity. In terms of function, Kunitz-type serine protease inhibitors are involved in processes such as blood coagulation and fibrinolysis, tumor immunity, inflammation regulation, and resistance to bacterial and fungal infections. This article summarizes the advances of Kunitz-type serine protease inhibitors and provides new ideas for the development of novel Kunitz-type serine protease inhibitors.

**Keywords:** Kunitz domain, protease inhibitors, blood coagulation balance, inflammatory response, infection, immune regulation

蛋白酶广泛存在于从细菌到哺乳动物等几乎所有生物体中, 在生物体的正常生命活动中扮演重要的角色。蛋白酶抑制剂通过调控蛋白酶的活

性来维持机体的稳态, 生物体内主要的蛋白酶抑制剂有丝氨酸蛋白酶抑制剂、半胱氨酸蛋白酶抑制剂、天冬氨酸蛋白酶抑制剂和金属蛋白酶抑制

**Received:** December 18, 2020; **Accepted:** March 29, 2021

**Supported by:** China Pharmaceutical University, Nanjing, China Initiative Program (No. CPU2018GY15).

**Corresponding author:** Yi Kong. Tel/Fax: +86-25-83271282; E-mail: yikong@cpu.edu.cn

中国倡议计划 (No. CPU2018GY15) 资助。

网络出版时间: 2021-04-12

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210412.0946.003.html>

剂<sup>[1]</sup>。丝氨酸蛋白酶抑制剂按其底物可以分为胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶抑制剂 (P1 位点为带正电荷的 Lys/Arg 残基), 弹性蛋白酶样丝氨酸蛋白酶抑制剂 (P1 位点为弱疏水 Ala/Val 残基) 和糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶抑制剂 (P1 位点为强疏水 Phe/Tyr/Leu 残基)<sup>[2]</sup>, 根据序列同源性、高级结构特征和作用机制, 丝氨酸蛋白酶抑制剂可以分为 Kunitz、Kazal、Serpin 和 Mucus 家族<sup>[3]</sup>。Kunitz 抑制剂能以类似于底物的方式与丝氨酸蛋白酶以紧密的非共价方式结合, 在不改变构象的情况下直接阻断丝氨酸蛋白酶的活性位点从而抑制酶的活性。Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂通常含有一个<sup>[4]</sup>或多个串联的 Kunitz 结构域<sup>[5]</sup>, 在机体的血凝平衡、炎症发生和免疫调节等过程中发挥重要作用。

## 1 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的结构特征

1930 年 Kraut 发现碱性牛胰蛋白酶抑制剂 (Bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI) 可以抑制激肽酶的活性, 1936 年 Kunitz 发现 BPTI 同样可以抑制胰蛋白酶的活性, 这些发现引起了广泛的关注。随后又发现了多种与 BPTI 同源性高且高级结构类似的多肽和蛋白质, 为纪念 Kunitz 对该研究领域的杰出贡献, 把这一类具有共同结构特征的蛋白酶抑制剂称为 Kunitz 型抑制剂<sup>[6]</sup>。

这类抑制剂通常具有一个或者多个 Kunitz 结构域。Kunitz 结构域是一类包含 50–60 个氨基酸残基的多肽, 含有 4–6 个半胱氨酸残基形成 2–3 对二硫键来保持其高级结构的稳定性, 这些半胱氨酸残基之间的空间是保守的, 因此 4 个半胱氨酸残基同样能赋予它们典型的二硫键模式。二级结构主要包括 1–2 个  $\alpha$  螺旋和一对反向平行的  $\beta$  片层。对蛋白酶起抑制作用的部分氨基酸残基序列称为蛋白酶结合环 (Loop), 该分子表面有

2 个能够与蛋白酶活性中心结合的 Loop 从而实现其蛋白酶抑制活性<sup>[7]</sup> (图 1A)。

作为 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的典型代表, BPTI 由 58 个氨基酸残基组成, 包括 6 个半胱氨酸形成 3 对二硫键 Cys5 (C1)-Cys55 (C6)、Cys14 (C2)-Cys38 (C4)、Cys30 (C3)-Cys51 (C5), 其中前两对二硫键维持该结构域高级结构的保守性, 第 3 对二硫键维持结合位点的稳定性<sup>[7]</sup>。结构中存在两个  $\alpha$  螺旋, C 末端的  $\alpha$  螺旋比 N 末端的  $\alpha$  螺旋更长更规则, 结构中还存在一对反向平行的  $\beta$  片层<sup>[8]</sup> (图 1B)。该分子具有两个 Loop, 分别为残基 11TGPCCKARIIR20 和残基 34VYGGC38<sup>[9]</sup>, BPTI 主要依靠这两个 Loop 与胰蛋白酶进行广泛的相互作用。Loop1 上 P1 位点赖氨酸残基 (Lys15) 可以插入到丝氨酸蛋白酶的 S1 位点中, 是决定抑制剂特异性的关键氨基酸。Asn13、Tyr17 和 Tyr18 可以稳定和反应位点有关的 Loop1<sup>[10-11]</sup>。典型的碱性 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 BPTI 结构见图 1C 和 1D<sup>[40]</sup>。

## 2 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的功能

丝氨酸蛋白酶抑制剂在生物体中分布广泛, 近年来受到科研工作者的广泛关注。它们在脊椎动物和无脊椎动物的许多生物学过程中承担着至关重要的作用。

### 2.1 参与凝血和纤溶过程

目前鉴定得到的多种参与凝血的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂大多来源于毒蛇、昆虫、寄生虫、海葵等动物以及一些豆科植物。内源性蛋白酶抑制剂的单一 Kunitz 结构域, 由于其独特的丝氨酸蛋白酶抑制能力, 同样能参与凝血级联过程。这些抑制剂通过调节凝血酶<sup>[27]</sup>、凝血因子 XI (Factor XI, FXI)<sup>[24]</sup>、凝血因子 X (Factor X, FX)<sup>[26]</sup> 和纤溶酶<sup>[31]</sup> 等的产生来干扰凝血级联和纤溶过程。参与血凝平衡过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质详见表 1。

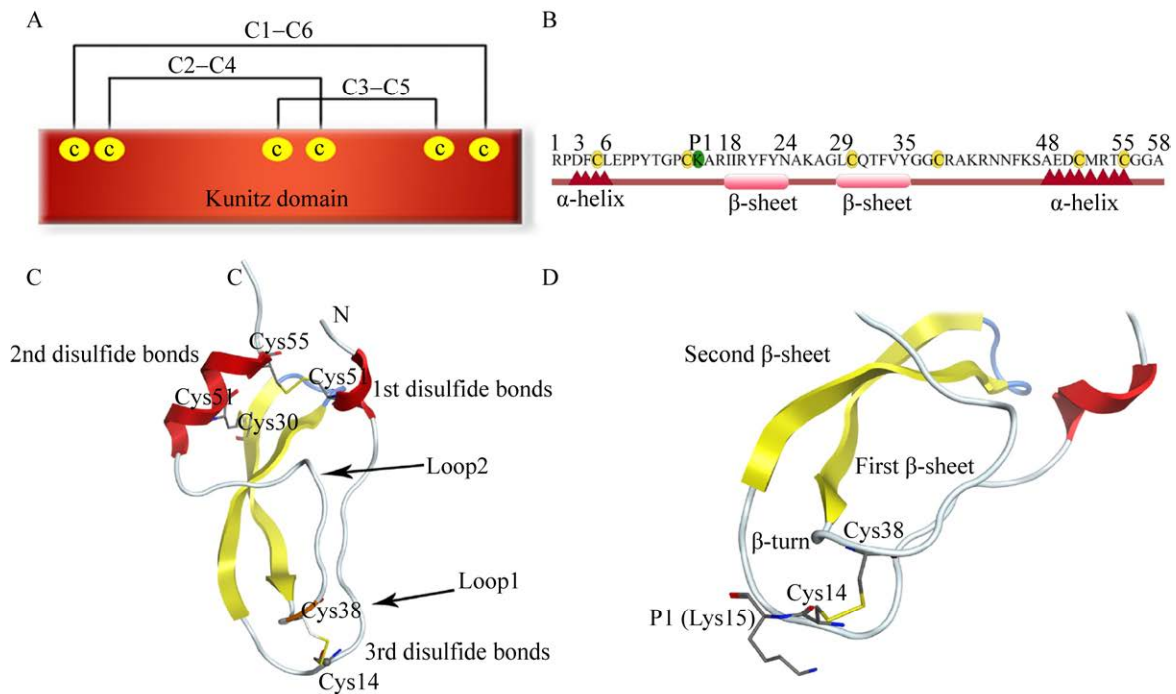


图1 Kunitz 结构域的结构

Fig. 1 Structure of Kunitz domain. (A) Schematic representation of Kunitz domain inhibitor showing the disulfide bonding pattern of C1-C6, C2-C4, C3-C5. (B) The primary structure of a typical Kunitz inhibitor BPTI. The red triangle represents the  $\alpha$ -helix, the light red rounded rectangle represents the  $\beta$ -sheet, the conservative cysteine residues are highlighted in yellow, while the P1 position (Lys15) is in green. (C) Crystal structure of BPTI (PDB: 1BPI) showing three disulfide bonds (in yellow), while the two anti-parallel  $\beta$ -sheets are in yellow and  $\alpha$ -helix are in red<sup>[40]</sup>. (D) The P1 position (Lys15) has an extended side chain that plays a vital role in loop1.

内源性 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂蛋白连接酶-2 (Protease nexin-2, PN2) 是淀粉样  $\beta$  蛋白前体 (Amyloid  $\beta$ -protein precursor, A $\beta$ PP) 的可溶形式, 从活化的血小板中释放出来, 包含一个 Kunitz 结构域, 分子量为 120 kDa<sup>[12]</sup>。PN2 的 Kunitz 结构域 (The Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2, PN2KPI) 包含 57 个氨基酸 (PN2 序列中为 Glu289-Ile345) 承担起 PN2 的全部 FXIa 抑制功能<sup>[13]</sup>。PN2KPI 通过 Loop1 (11TGPCRAMISR20) 和 Loop2 (34FYGGC38) 与 FXIa 催化结构域进行广泛的相互作用。PN2KPI 中的 Arg15(P1) 与 FXIa 的 Asp189 相互作用形成 S1 口袋中的盐桥。P1'(Ala) 与 P1 在抑制剂与蛋白酶结合上起着重要作用<sup>[14]</sup>。Cys14(P2) 和 Gly12(P4) 在 Pro13(P3) 旋转骨架的帮助下与 FXIa 的 Lys192

形成氢键, Met17(P2') 和 Ser19(P4') 与 FXIa 的 Arg37D 相互作用, 高度保守的 Phe(P18') 通过内部疏水作用稳定反应位点的结构<sup>[15]</sup> (图 2A 和 2B)。静脉注射 PN2KPI 的野生型小鼠可显著减少 FeCl<sub>3</sub> 诱导的动脉血栓形成<sup>[12,16]</sup>。另一种内源性 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂为组织因子途径抑制剂 (Tissue factor pathway inhibitor, TFPI), 它可通过阻断早期促凝刺激物而发挥抗凝活性<sup>[17]</sup>。TFPI 在人体内主要有 TFPI $\alpha$  和 TFPI $\beta$  两个同工型, 其中 TFPI $\alpha$  有 276 个氨基酸残基, 包括 3 个相连的 Kunitz 结构域(K1, Asp13-Arg78; K2, Glu92-Gly150; K3, Glu182-Lys241)<sup>[18]</sup>。K1 和 K2 分别与活化凝血因子 VII (Factor VIIa, FVIIa) 和 FXa 结合 (图 2C), 以抑制组织因子 (Tissue factor, TF) 介导的凝血, 而 K3 与辅因子蛋白 S 结合直

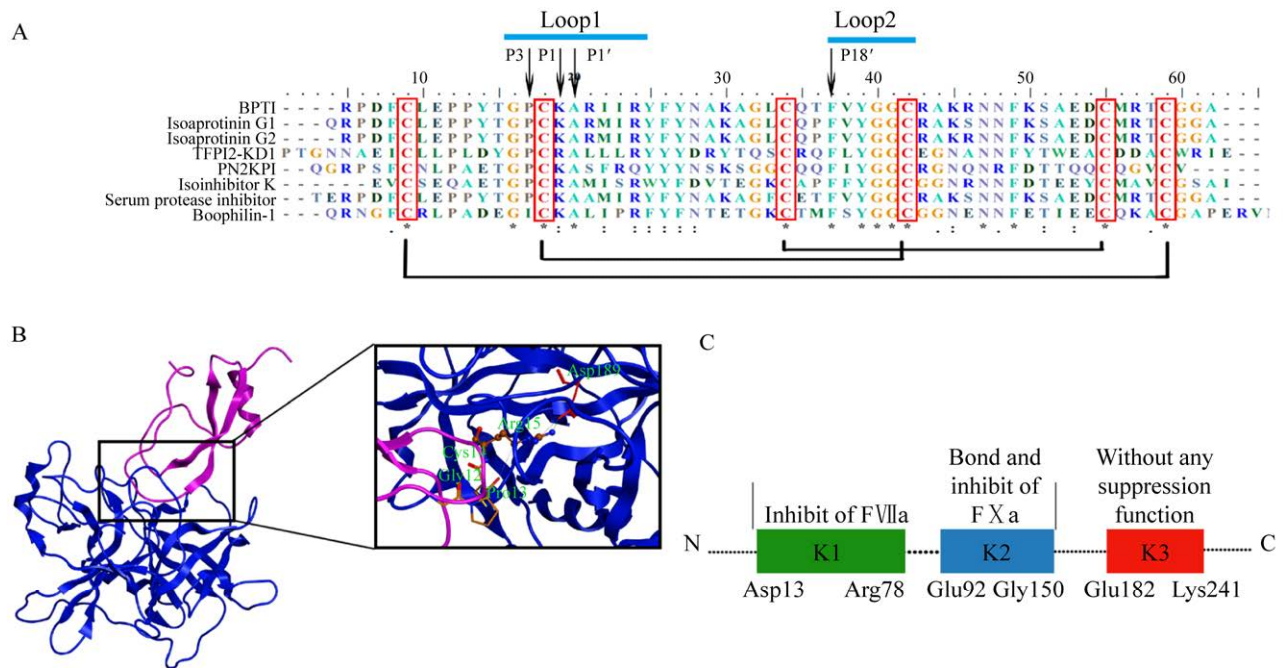


图2 参与凝血平衡的Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂

Fig. 2 The Kunitz-type protease inhibitor involved in blood coagulation homeostasis. (A) Amino acid sequence alignment of different Kunitz inhibitors: BPTI, basic pancreatic trypsin inhibitor from *Bos taurus* (P00974); isoaprotinin G1 (Q7M311); isoaprotinin G2 (S10063); TFPI2-KD1, first Kunitz domain of tissue factor pathway inhibitor (P48307); PN2KPI, Kunitz domain of PN2 (1ZJD\_B); iso inhibitor K (P00994); serum basic protease inhibitor (P00975) boophilin-1, first Kunitz domain of boophilin (CAC82583)<sup>[21]</sup>. P3, P1, P1', P18' are highlighted by black arrows, two loops are marked with short blue lines, and three pairs of disulfide bonds are connected by black lines. (B) Structure of the FXIa catalytic domain in complex with the KPI domain of PN2 (PDB: 1ZJD). The ribbon structure shown in blue is the catalytic domain of FXIa, whereas the ribbon structure shown in purple is the KPI domain of PN2, and key amino acids are shown in light green. (C) Primary structure of human TFPI. The three Kunitz domains are represented by green, blue and red respectively. K1: Asp13-Arg78; K2: Glu92-Gly150; K3: Glu182-Lys241. The K1 domain is responsible for inhibition of FVIIa, the K2 domain binds to and inhibits FXa, and K3 does not have any inhibitory function but appears to be involved in the binding of heparin-like substances.

接抑制 FXa<sup>[19]</sup>。TFPI 以一种依赖凝血因子 VIII (Factor VIII, FVIII) 和凝血因子 IX (Factor IX, FIX) 存在的方式调节 TF-FVIIa 介导的 FXa 的产生。抑制 TFPI 可减轻血友病患者的出血情况,同时血小板 TFPIa 的选择性抑制剂已被证明可以调节血友病小鼠的出血,而治疗人类血友病的药物也已提上日程<sup>[20]</sup>。

蛇毒是生物活性蛋白和多肽的丰富来源,毒素中 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂是研究最广泛的一类。Fasxiator 是从带状金环蛇 *Bungarus fasciatus* 的毒液中分离并测序得到的 Kunitz 型丝

氨酸蛋白酶抑制剂,其重组表达形式 rFasxiator 表现出与天然 Fasxiator 相似的二级结构以及对 FXIa 和糜蛋白酶的抑制作用<sup>[21]</sup>,是 FXIa 缓慢有效的抑制剂。为了提高 rFasxiator 的效力和选择性,对 rFasxiator 的 Loop1 和 Loop2 中特定残基进行定点突变得得到 rFasxiatorN<sub>17R, L19E</sub>,该突变体在最高浓度为 300 nmol/L 时能 2 倍延长活化部分凝血酶原时间 (Activated partial thromboplastin time, APTT),且在浓度为 40 μmol/L 时对人血浆凝血酶原时间 (Prothrombin time, PT) 无显著影响<sup>[21-22]</sup>。在 FeCl<sub>3</sub> 诱导的血栓形成模型中,

rFasxiatorN<sub>17R, L19E</sub> 能够延长 FeCl<sub>3</sub> 诱导血栓形成模型中小鼠的颈动脉闭塞时间<sup>[21]</sup>。Kaur 等<sup>[23]</sup>从金环蛇 *Bungarus flaviceps* 毒腺 cDNA 文库转录组中鉴定得到的 Flavikunin 也是一种 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂。野生型和突变型 Flavikunin 均能抑制纤溶酶和胰蛋白酶,但对糜蛋白酶、凝血酶、弹性蛋白酶等其他丝氨酸蛋白酶无明显抑制作用。Flavikunin 的 P1 位组氨酸参与纤溶酶抑制,具有温和的抗凝血活性。在 500 nmol/L 条件下,Flavikunin 对纤溶酶的抑制率约为 57%。

吸血寄生虫向宿主体内释放多种抗凝血物质来阻止宿主血液凝固,因此许多与凝血相关的 Kunitz 型蛋白酶抑制剂如 Ir-CPI<sup>[24]</sup>、Simukunin<sup>[25]</sup>、Ixolaris<sup>[26]</sup>、Boophilin<sup>[27]</sup>和 Desmolaris<sup>[28]</sup>等均来源于食血寄生虫。Decrem 等<sup>[24]</sup>从蜱虫 *Ixodes ricinus* 唾液腺 cDNA 文库中预测得到 Ir-CPI 与 TFPI 的第 2 个 Kunitz 结构域相似,它能够选择性抑制接触途径相关的凝血因子。Ir-CPI 具有一个典型的 Kunitz 结构域,能与入血浆 FXIa、FXIIa 和激肽释放酶特异性结合来抑制内在凝血途径,并轻微抑制体外纤维蛋白溶解。体外实验表明, Ir-CPI 能显著延长 APTT (2.0 μmol/L 时为 7.7 倍) 而不改变 PT<sup>[29]</sup>。同样来自黑蝇 *Simulium vittatum* 唾液腺

的 Simukunin 也具有典型的 Kunitz 蛋白结构特征。Simukunin 的作用可能类似于 BPTI, P1 位的 Lys 深入到胰蛋白酶的 S1 特异性口袋并与带负电荷的 Asp189 侧链形成极性相互作用<sup>[25]</sup>。重组 Simukunin (rSimukunin) 显著抑制 FXa 和 FXIa, 但不抑制凝血酶或 FXIIa 的活性。此外, rSimukunin 还能强烈抑制弹性蛋白酶、纤溶酶、激肽释放酶、胰蛋白酶和组织蛋白酶 G<sup>[30]</sup>。Jedličková 等<sup>[31]</sup>从日本双身虫 *Eudiplozoon nipponicum* 转录组中鉴定出一种有效的分泌型抗凝血剂和补体抑制剂 EnKT1, 它与抗出血性蛇毒因子 Textilinin-1 在氨基酸序列上具有 69% 的相似度。EnKT1 通过抑制 FXa 产生抗凝作用,但对纤溶作用无明显影响。此外, EnKT1 还可能通过抑制 FXa 激活的 C3 和 C5 转化酶而削弱补体功能,这是破坏补体功能的寄生虫 Kunitz 抑制剂的第一个实例<sup>[31]</sup>。

此外, Salu 等<sup>[32]</sup>从植物凤凰木 *Delonix regia* 和南非金合欢 *Acacia schweinfurthii* 中分离得到两种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂 DrTI 和 AsTI。它们通过干扰前激肽释放酶对内在凝血途径的蛋白发挥水解作用,从而导致血栓的改善。在体外实验中, DrTI (21 μmol/L) 和 AsTI (15.4 μmol/L) 能 2 倍延长 APTT 且对 PT 没有显著影响,而在研究

表 1 参与凝血平衡过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质

Table 1 Origins and properties of Kunitz type serine protease inhibitors involved in the blood coagulation homeostasis

Organism	Peptide/protein	Physical and chemical properties	Enzymes inhibited	References
Human	PN2KPI	57 aa	FXIa (K <sub>i</sub> =0.81 nmol/L); trypsin (K <sub>i</sub> =0.03 nmol/L)	[13]
Human	TFPI	M <sub>w</sub> : 43 kDa	FXa (K <sub>D</sub> =20.2 nmol/L); TF-FVIIa	[17,19]
<i>Bungarus fasciatus</i>	Fasxiator	M <sub>w</sub> : 7 kDa	FXIa (IC <sub>50</sub> =1.5 μmol/L); chymotrypsin	[12,21]
<i>Bungarus flaviceps</i>	Flavikunin	M <sub>w</sub> : ~7 kDa	Plasmin (IC <sub>50</sub> =0.48 μmol/L); trypsin	[20]
<i>Ixodes ricinus</i>	Ir-CPI	—	PK; FXIIa; FXIa	[24]
<i>Simulium vittatum</i>	Simukunin	83 aa, M <sub>w</sub> : 9.63 kDa pI: 9.93	FXIa (IC <sub>50</sub> =5.20 nmol/L); elastase (K <sub>D</sub> =0.4 nmol/L, IC <sub>50</sub> = 4.90 nmol/L); FXa (K <sub>D</sub> = 3.07 nmol/L)	[25]
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	—	FXa; FX	[26]
<i>Boophilus microplus</i>	Boophilin	M <sub>w</sub> : ~6.5 kDa	Thrombin; trypsin; plasmin	[27]
<i>Desmodus rotundus</i>	Desmolaris	M <sub>w</sub> : 21.5 kDa	FXIa (K <sub>D</sub> =0.63 nmol/L); FXa; kallikrein	[28]
<i>Eudiplozoon nipponicum</i>	EnKT1	M <sub>w</sub> : 10.12 kDa pI: 8.3	FXa; trypsin; plasmin; PK	[31]
<i>Delonix regia</i>	AsTI	M <sub>w</sub> : 20 kDa	PK; FXa	[32]
<i>Aschcia schweinfurthii</i> <i>var schweinfurthii</i>	DrTI	—	PK; FXIIa; FXIa	

小鼠动脉血栓和出血时间模型中, DrTI 和 AsTI 浓度分别为 1.3  $\mu\text{mol/L}$  和 0.96  $\mu\text{mol/L}$  时, 小鼠颈动脉完全闭塞的时间较对照组延长了约 50%。同时, 相较于肝素, DrTI 和 AsTI 引起的出血时间并未延长。

凝血级联蛋白功能失调与心脑血管疾病密切相关, 而 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂展现出治疗血栓性疾病的巨大潜力。它们来源广泛, 对其表征及结构相关鉴定也在陆续开展, 但该类蛋白酶的结构与功能关系还有待于深入研究。

## 2.2 抗感染功能

抗生素的发现彻底改变了对感染的控制。然而, 耐药性的产生同样限制着抗生素的发展。寻找具有新型作用机制的抗菌剂控制细菌和真菌感染越来越引起人们的重视。Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在对抗各种感染中表现出卓越优势。目前, 人们已从多种动植物中成功分离出 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 并对其生物学功能进行了深入研究。

存在于植物种子和块茎中的蛋白酶抑制剂在植物抵御昆虫、真菌和其他病原细菌攻击的防御系统中发挥着重要作用。目前已从植物中分离出许多具有抗菌活性的蛋白酶抑制剂, 并对其进行了详细的鉴定。Cai 等<sup>[33]</sup>从药用植物太子参新鲜根中分离出 Kunitz 型抑制剂 PHTI。抑制动力学研究表明, PHTI 是一种竞争性抑制剂, 具有抗真菌的作用, 可通过破坏细胞膜而抑制炭疽菌和尖孢镰刀菌。

De Oliveira 等<sup>[34]</sup>从青皮象耳豆 *Enterolobium timbouva* 种子中分离得到一种双功能 Kunitz 蛋白酶抑制剂 EtTI。与典型的 Kunitz 结构域不同, EtTI 分子中有 4 个半胱氨酸残基形成两对链间二硫键来连接异源二聚体。EtTI 对白色念珠菌、布氏念珠菌和热带念珠菌均有抗菌活性, 可能通过细胞凋亡引起质膜完整性紊乱和形态改变 (表 2)。Dib 等<sup>[35]</sup>首次从巴西水葫芦中纯化出一种胰蛋白酶抑制剂 IETI。它通过改变酵

母细胞膜通透性来表现其抗真菌活性, 具有作为抗真菌药物的潜在用途。

已有越来越多的研究证明海洋动物体内存在的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂具有免疫防御能力。病毒或细菌感染会显著上调对虾、扇贝、梭子鱼和鲫鱼中该类型抑制剂 mRNA 的表达<sup>[36]</sup>。Xu 等<sup>[36]</sup>从日本比目鱼中鉴定出一种含有 2 个 Kunitz 结构域的丝氨酸蛋白酶 PoKspi。重组表达的 PoKspi 能够同时抑制革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。PoKspi 还是一种调理素, 可下调肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 和 IL-1 $\beta$  的表达, 保护组织免受促炎因子引起过度的炎症反应。蛋白酶抑制剂是软体动物贝壳有机基质中的常见成分, 通常与免疫相关 (表 2)。Jin 等<sup>[37]</sup>从三角帆蚌中分离到一种 Kunitz 丝氨酸蛋白酶抑制剂 HcKuPI, 该分子能在珍珠形成过程中发挥抗菌作用, 这些发现扩展了我们对蛋白酶抑制剂在免疫系统和贝壳生物矿化中的作用的认知。

在蚕茧中已经鉴定出一系列具有不同功能的 Kunitz 蛋白酶抑制剂<sup>[38]</sup>, 其中 BmSPI51 含量最高, 占蚕茧蛋白酶抑制剂的 67%。体外抑制试验表明, BmSPI51 对白色念珠菌、球孢白僵菌以及酿酒酵母菌 3 种真菌的孢子生长均有明显的抑制作用。BmSPI51 通过与细胞壁多糖、甘露聚糖和  $\beta$ -葡聚糖结合来抑制真菌生长<sup>[39]</sup>。参与抗感染过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质详见表 2。

与一般抗生素不同, Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂具有广谱抗菌性、不易引起耐药性等优势, 已经得到广泛的关注, 有望被开发成新一代肽类抗生素。但是其生产成本较高、溶血毒副作用强、治疗指数低等缺点, 成为目前临床上应用的主要障碍, 限制了其进一步发展。为了改善这一劣势, 科研人员对其结构进行改造并已取得相应理论依据, 在不久的将来, Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂将会成为临床上解决耐药问题的重要生物制剂。

表 2 参与抗感染过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质

Table 2 Origins and properties of Kunitz-type serine protease inhibitors involved in the anti-infection process

Organism	Peptide/protein	Physical and chemical properties	Microorganisms inhibited	Enzymes inhibited	References
<i>Pseudostellaria heterophylla</i>	PHTI	M <sub>w</sub> : 20.5 kDa	<i>Phytopathogens; Colletotrichum gloeosporioides; Fusarium oxysporum</i>	Trypsin (K <sub>i</sub> =3.01×10 <sup>-9</sup> mol/L)	[33]
<i>Enterolobium timbouva seeds</i>	EtTI	M <sub>w</sub> : 19 kDa	<i>C. albicans, C. buinensis; C. tropicalis</i>	Trypsin (K <sub>i</sub> =0.5 nmol/L)	[34]
<i>Inga edulis</i>	IETI	M <sub>w</sub> : 19 kDa	<i>C. buinensis; C. tropicalis</i>	Trypsin (K <sub>i</sub> =6.2 nmol/L)	[35]
<i>Paralichthys olivaceus</i>	PoKspi	M <sub>w</sub> : 56.5 kDa pI: 5.44	Gram-negative; Gram-positive	Trypsin	[36]
<i>Hyriopsis cumingii</i>	HcKuPI	M <sub>w</sub> : 9.5 kDa pI: 9.96	Gram-positive; Gram-negative	Trypsin	[37]
<i>Silkworm cocoon</i>	BmSPI51	M <sub>w</sub> : 6.03 kDa	<i>Candida albicans; Beauveria bassiana; Saccharomyces cerevisiae</i>	–	[39]

### 2.3 炎症调节作用

蠕虫寄生虫中存在的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂与对炎症反应的保护有关<sup>[40]</sup>。目前已在人体多种组织粘膜中发现内源性丝氨酸蛋白酶抑制剂 Bikunin。Bikunin 能通过抑制脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的肿瘤坏死因子发挥抗炎作用, 是治疗炎症和感染性休克的候选药物<sup>[41]</sup>。Falcón 等<sup>[42]</sup>从肝片形吸虫 *Fasciola hepatica* 的肠道和外皮分离得到 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 Fh-KTM, 该分子能够与宿主免疫防御系统密切接触并通过下调 LPS 诱导的树突状细胞成熟来参与炎症调节和免疫反应。Ranasinghe 等<sup>[43]</sup>从曼氏血吸虫成虫和卵的排泄物中分离得到一种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂 rSmKI-1, 该分子与 TFPI-2 具有 57% 氨基酸序列相似性<sup>[44]</sup>。rSmKI-1 免疫的小鼠分泌干扰素  $\gamma$ , 白

介素 (Interleukin, IL)-10 和 IL-6 增加, 在保护寄生虫免受宿主防御攻击方面起着特殊作用<sup>[43-44]</sup>。此外, 在日本血吸虫的热休克蛋白 60 中分离到一种名为 SJMHE1 的小分子多肽, 它同样具有抗凝和抗炎的特性。SJMHE1 可抑制过敏性小鼠的气道炎症, 减少肺和支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的浸润, 调节过敏性小鼠脾细胞和肺组织中促炎因子的产生, 抑制小鼠迟发型超敏反应和胶原诱导性关节炎, 在治疗哮喘和其他过敏性或炎症性疾病药物开发过程中提供新思路<sup>[45]</sup>。参与炎症调节过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质详见表 3。

Kunitz 丝氨酸蛋白酶抑制剂是炎症病理学研究的主要贡献者, 作为治疗炎症性疾病药物已经引起了人们的浓厚兴趣。特别是来自曼氏血吸虫的 SmKI-1 已被证明能够干扰中性粒细胞弹性蛋

表 3 参与炎症调节过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质

Table 3 Origins and properties of Kunitz-type serine protease inhibitors involved in the process of inflammation regulation

Organism	Peptide/protein	M <sub>w</sub>	Enzymes inhibited	Activity	References
<i>Fasciola hepatica</i>	Fh-KTM	~10 kDa	Neutrophil elastase	Hydrolase	[42]
<i>Schistosoma mansoni</i>	SmKI-1	16 kDa	Neutrophil elasta (K <sub>i</sub> =56 nmol/L); PK (K <sub>i</sub> =112 nmol/L)	Trypsin	[43-44]
<i>Schistosoma japonicum</i>	SJMHE1	–	–	Trypsin	[45]
<i>Boophilus microplus</i>	rBmTI-6	~8 kDa	Trypsin (K <sub>i</sub> =1.7 nmol/L)	–	[46]
Human	Bikunin	43 kDa	Neutrophil elastase	–	[41]

白酶的活性, 在不同炎症性疾病模型中减少炎症发生, 可能是未来作为疫苗或药物靶标进行评估的良好候选物。

## 2.4 抗肿瘤转移和迁徙

内皮细胞迁移和血管生成导致肿瘤转移。近年来, 有效的蛋白酶抑制剂作为潜在的抗癌药物得到了广泛的研究。

内源性丝氨酸蛋白酶抑制剂的单一 Kunitz 结构域如肝细胞生长因子激活抑制剂 1 型 (Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1, HAI-1)<sup>[47]</sup>和 TFPI-2<sup>[48]</sup>即可表现出良好的抗肿瘤转移和迁徙作用。

Ranasinghe 等<sup>[49]</sup>从犬绦虫中鉴定出的一种有效的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 EgkI-1。该分子能显著抑制小鼠模型中黑色素瘤的生长, 并且对周围正常组织没有毒性, 在体内显示出有效的抗癌活性。此外, EgKI-1 能显著降低腋窝淋巴结引流部位生存素的表达水平, 增加了 CD8<sup>+</sup>T 细胞的数量。EgKI-1 不仅可以作为黑色素瘤的局部治疗药物, 还能以直接或间接诱导肿瘤细胞凋亡的方式控制肿瘤迁徙和转移, 是一个很有开发前景的多肽分子, 进一步评估 EgKI-1 抗肿瘤潜力并确定其杀死癌细胞的机制可能对未来抗肿瘤药物的开发提供新的思路。Amblyomin-X 是成年昆虫唾液腺转录组中鉴定得到的丝氨酸蛋白酶抑

制剂<sup>[50]</sup>, 体内实验表明, 它可以通过调节尿激酶型纤溶酶原激活剂受体信号减少基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP) 的释放, 特异性地针对肿瘤细胞转移而对正常细胞影响较小。Amblyomin-X 还可以使 Bcl-2 家族蛋白失衡诱导癌细胞凋亡。在黑色素瘤动物模型中 Amblyomin-X 选择性诱导肿瘤细胞凋亡, 促进体内肿瘤缩小, 在小鼠原位肾肿瘤模型中显著减少肺转移<sup>[51]</sup>。目前 Amblyomin-X 作为一种新的潜在的抗肿瘤药物已进行临床前研究<sup>[52]</sup>。

许多研究表明, 植物 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂可能是一种很有前途的新型抗癌药物的来源。Yang 等<sup>[53]</sup>从甘薯中分离出 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂 Sporamin, 可减弱肝细胞内蛋白质的合成以及炎性细胞向肝脏的浸润, 在小鼠模型中, Sporamin 显著减少了腹腔中形成的肿瘤结节的数量和重量<sup>[53]</sup>。Fang 等<sup>[54]</sup>首次从紫荆花种子中发现一种新的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂并命名为 BvvTI, 该分子具有显著的抗 HIV-1 逆转录酶活性和抗鼻咽癌 CNE-1 活性。参与肿瘤免疫过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质详见表 4。

通过探索更多新颖的 Kunitz 抑制剂, 并研究它们与肿瘤细胞的相互作用关系, 对抗癌药物的发现具有深远的影响。

表 4 参与肿瘤免疫过程的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂的来源和性质

Table 4 Origins and properties of Kunitz-type serine protease inhibitors involved in tumor immune process

Organism	Peptide/protein	M <sub>w</sub>	Tumor model	Enzymes inhibited	References
<i>Echinococcus granulosus</i>	EgkI-1	—	Breast cancer; melanoma	Neutrophil elastase	[49]
<i>Amblyommacajennense</i>	Amblyomin-X	15 kDa	Melanoma; pediatric anaplastic ependymoma	Matrix metallo proteinases	[50-52]
<i>Ipomoeabatatas</i>	Sporamin	—	Colorectal cancer; tongue carcinoma; pancreatic cancer	Liver β-catenin; vascular endothelial growth factor	[53]
<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>	BvvTI	21 kDa	Anti-HIV-1 reverse transcriptase	Trypsin (K <sub>i</sub> =0.1×10 <sup>-9</sup> mol/L); Chymotrypsin (K <sub>i</sub> =250.5×10 <sup>-9</sup> mol/L)	[54]
<i>Flowcytometry</i>	APPI-4M	—	Colon, gastric; lung; ovarian cancers	Kallikrein	[55]



## 2.5 其他功能

除上述功能, De Medeiros 等<sup>[56]</sup>还从罗望子种子中分离纯化得到胰蛋白酶抑制剂 pTTI。pTTI 表现出抗 TNF $\alpha$  活性, 能够降低大鼠血脂异常和肥胖引起的脂蛋白水平提高<sup>[57]</sup>。Liao 等<sup>[58]</sup>利用大规模测序和数据分析相结合的策略, 结合转录组学和蛋白质组学鉴定得到 Kunitz 型多肽 ZoaKuz1, 该分子可以减缓甚至阻止离子通道过度活动介导的神经退行性病变来缓解神经功能障碍。Smith 等<sup>[59]</sup>还通过分离纯化手段得到一种 58 kDa 的绵羊关节软骨丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可以保护软骨表面成分不被蛋白质降解, 保持关节功能。

## 3 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂药物的开发研究

从天然动植物中获取的先导分子一直是药物开发和疾病治疗的重要来源。Kunitz 结构域在蛋白质工程领域获得了极大关注, 利用噬菌体展示技术发现了许多含 Kunitz 结构域的多肽, 其中有些多肽已被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市。这些药物中第一个上市的是激肽释放酶抑制剂 Ecallantide<sup>[60]</sup>, 该药于 2009 年获批, 商品名为 Kalbitor, 用于皮下注射, 适用于治疗 16 岁以上患者遗传性血管水肿急性发作<sup>[61]</sup>。Ecallantide 通过噬菌体展示技术发现并由毕赤酵母重组表达, 由 60 个氨基酸组成, 含有 3 对分子内二硫键, 与人 TFPI 的氨基酸序列相差 7 个氨基酸, 能参与激肽释放酶-激肽系统, 选择性且高效可逆地抑制人血浆激肽释放酶, 从而抑制高分子激肽原产生缓激肽。1992 年, Dunlevy 等同样利用噬菌体展示技术从 BPTI 突变体文库中筛选特异性结合弹性蛋白酶的 Kunitz 多肽, 产生的工程化分子 Depelestat<sup>[62]</sup>能够抑制囊性纤维化患者痰中人嗜

中性粒细胞弹性蛋白酶的活性, 在 2007 年, 该药已通过 II 期临床试验, 用于治疗急性呼吸窘迫综合征<sup>[63]</sup>。此外, 从胰腺中提取的 BPTI 对胰蛋白酶、糜蛋白酶、溶血纤维蛋白酶及各种组织或血浆激肽释放酶有较好的抑制能力, 因此被用于减少心脏和肝脏手术等复杂手术中的出血<sup>[64]</sup>。

## 4 总结与展望

Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂来源广泛, 种类丰富, 主要获取方式有以下几种: 1) 天然产物分离纯化; 2) 转录组学和蛋白质组学鉴定; 3) 噬菌体表面展示技术筛选等。目前, 通过结构功能预测及生物学验证, 已获得上百种具有特定功能的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂。其分子量小, 具有广泛的温度和 pH 稳定性, 不易被各种酶降解, 半衰期较长, 其中抗炎、抗癌、调节蛋白酶和细胞因子等作用正在不断地应用于临床, 引起了人们对其作为疾病治疗药物的浓厚兴趣。但是分析目前鉴定得到的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 也存在一些问题: 1) 专属性不够理想。比如具有调节血凝平衡的 PN2KPI 不仅能抑制 FXIa 还能以更强的能力抑制胰蛋白酶, 作为抗栓药物可能会带来脱靶效应和副作用。2) 抗感染机制研究不够充分。多数具有抗感染作用的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 对其各种真菌和细菌的抑制能力进行了充分的探索和验证, 但是具体抑制机制尚不明确。3) Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂多采用注射给药, 这可能会影响患者的用药顺应性。4) Kunitz 多肽在免疫调节、抗炎和抗癌方面仅有初步的研究, 其作用机制及临床应用还有待进一步研究。

笔者所在研究团队充分结合转录组、蛋白质组和多肽组从五步蛇、银环蛇和水蛭中共鉴定得到 33 条具有抑制 FXIa 能力的 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂。其中从五步蛇毒腺转录组数据库中

挖掘得到的 Kunitz 型多肽对 FXIa、胰蛋白酶和激肽释放酶具有较好的抑制作用，从水蛭中鉴定到的 Kunitz 型多肽也被成功克隆表达及活性分析，这些多肽同样具有显著的 FXIa 抑制活性。相信随着认识的不断深入，Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂在医药领域将会有更加广泛的应用，为人类健康带来更多的福音。

## REFERENCES

- [1] Boon L, Ugarte-Berzal E, Vandooren J, et al. Protease propeptide structures, mechanisms of activation, and functions. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2020, 55(2): 111-165.
- [2] Leung D, Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem*, 2000, 43(3): 305-341.
- [3] Harish BS, Uppuluri KB. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107: 1373-1387.
- [4] Ranasinghe S, McManus DP. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Dev Comp Immunol*, 2013, 39(3): 219-227.
- [5] Wei XM, Yang JL, Yang JM, et al. A four-domain Kunitz-type proteinase inhibitor from *Solen grandis* is implicated in immune response. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(6): 1276-1284.
- [6] Kunitz M, Northrop JH. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol*, 1936, 19(6): 991-1007.
- [7] Mishra M. Evolutionary aspects of the structural convergence and functional diversification of Kunitz-domain inhibitors. *J Mol Evolut*, 2020, 88(7): 537-548.
- [8] Bendre AD, Ramasamy S, Suresh CG. Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 933-943.
- [9] Moiola M, Memeo MG, Quadrelli P. Stapled peptides—a useful improvement for peptide-based drugs. *Molecules*, 2019, 24(20): 3654.
- [10] Cohen I, Coban M, Shahar A, et al. Disulfide engineering of human Kunitz-type serine protease inhibitors enhances proteolytic stability and target affinity toward mesotrypsin. *J Biol Chem*, 2019, 294(13): 5105-5120.
- [11] Grzesiak A, Helland R, Smalås AO, et al. Substitutions at the P1' position in BPTI strongly affect the association energy with serine proteinases. *J Mol Biol*, 2000, 301(1): 205-217.
- [12] Sheffield WP, Eltringham-Smith LJ, Bhakta V. Fusion to human serum albumin extends the circulatory half-life and duration of antithrombotic action of the Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 772-782.
- [13] Navaneetham D, Sinha D, Walsh PN. Walsh. Mechanisms and specificity of factor XIa and trypsin inhibition by protease nexin 2 and basic pancreatic trypsin inhibitor. *J Biochem*, 2010, 148(4): 467-479.
- [14] Navaneetham D, Wu WM, Li HB, et al. P1 and P2' site mutations convert protease nexin-2 from a factor XIa inhibitor to a plasmin inhibitor. *J Biochem*, 2013, 153(2): 221-231.
- [15] Su YC, Miller TN, Navaneetham D, et al. The role of factor XIa (FXIa) catalytic domain exosite residues in substrate catalysis and inhibition by the Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2. *J Biol Chem*, 2011, 286(36): 31904-31914.
- [16] Wu WM, Li HB, Navaneetham D, et al. The Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis. *Blood*, 2012, 120(3): 671-677.
- [17] Vadivel K, Ponnuraj SM, Kumar Y, et al. Platelets contain tissue factor pathway inhibitor-2 derived from megakaryocytes and inhibits fibrinolysis. *J Biol Chem*, 2014, 289(45): 31647-31661.
- [18] Petersen LC. Hemostatic properties of a TFPI antibody. *Thromb Res*, 2012, 129(Suppl 2): S44-S45.
- [19] Chowdary P. Anti-tissue factor pathway inhibitor (TFPI) therapy: a novel approach to the treatment of haemophilia. *Int J Hematol*, 2020, 111(1): 42-50.

- [20] Peterson JA, Maroney SA, Mast AE. Mast Targeting TFPI for hemophilia treatment. *Thromb Res*, 2016, 141(Suppl 2): S28-S30.
- [21] Chen W, Carvalho LP, Chan MY, et al. Fasxiator, a novel factor XIa inhibitor from snake venom, and its site-specific mutagenesis to improve potency and selectivity. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(2): 248-261.
- [22] Van Der Beelen SHE, Agten SM, Suylen DPL, et al. Design and synthesis of a multivalent catch-and-release assay to measure circulating FXIa. *Thromb Res*, 2021, 200: 16-22.
- [23] Kaur S, Devi A, Saikia B, et al. Expression and characterization of Flavikunin: a Kunitz-type serine protease inhibitor identified in the venom gland cDNA library of *Bungarus flaviceps*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(4): e22273.
- [24] Decrem Y, Rath G, Blasioli V, et al. Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med*, 2009, 206(11): 2381-2395.
- [25] Al-Horani RA, Desai UR. Factor XIa inhibitors: a review of the patent literature. *Exp Opin Ther Pat*, 2016, 26(3): 323-345.
- [26] De Paula VS, Sgourakis NG, Francischetti IMB, et al. NMR structure determination of ixolaris and factor X(a) interaction reveals a noncanonical mechanism of Kunitz inhibition. *Blood*, 2019, 134(8): 699-708.
- [27] Macedo-Ribeiro S, Almeida C, Calisto BM, et al. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS ONE*, 2008, 3(2): e1624.
- [28] Ma DY, Mizurini DM, Assumpção TCF, et al. Desmolaris, a novel factor XIa anticoagulant from the salivary gland of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) inhibits inflammation and thrombosis *in vivo*. *Blood*, 2013, 122(25): 4094-4106.
- [29] Pireaux V, Tassignon J, Demoulin S, et al. Anticoagulation with an inhibitor of factors XIa and XIIa during cardiopulmonary bypass. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 74(17): 2178-2189.
- [30] Al-Horani RA, Afosah DK. Recent advances in the discovery and development of factor XI/XIa inhibitors. *Med Res Rev*, 2018, 38(6): 1974-2023.
- [31] Jedličková L, Dvořák J, Hrachovinová I, et al. A novel Kunitz protein with proposed dual function from *Eudiplozoon nipponicum* (Monogenea) impairs haemostasis and action of complement *in vitro*. *Int J Parasitol*, 2019, 49(5): 337-346.
- [32] Salu BR, Pando SC, Brito MV, et al. Improving the understanding of plasma kallikrein contribution to arterial thrombus formation using two plant protease inhibitors. *Platelets*, 2019, 30(3): 305-313.
- [33] Cai XX, Xie XL, Fu NY, et al. Physico-chemical and antifungal properties of a trypsin inhibitor from the roots of *Pseudostellaria heterophylla*. *Molecules*, 2018, 23(9): 2388.
- [34] De Oliveira CFR, Oliveira CT, Taveira GB, et al. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium timbouva* with activity against *Candida* species. *Int J Biol Macromol*, 2018, 119: 645-653.
- [35] Dib HX, De Oliveira DGL, De Oliveira CFR, et al. Biochemical characterization of a Kunitz inhibitor from *Inga edulis* seeds with antifungal activity against *Candida* spp.. *Arch Microbiol*, 2019, 201(2): 223-233.
- [36] Xu X, Liu JX, Wang YJ, et al. Kunitz-type serine protease inhibitor is a novel participator in anti-bacterial and anti-inflammatory responses in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 80: 22-30.
- [37] Jin C, Liu XJ, Li JL. A Kunitz proteinase inhibitor (HcKuPI) participated in antimicrobial process during pearl sac formation and induced the overgrowth of calcium carbonate in *Hyriopsis cumingii*. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 89: 437-447.
- [38] Li YS, Liu HW, Zhu R, et al. Protease inhibitors in *Bombyx mori* silk might participate in protecting the pupating larva from microbial infection. *Insect Sci*, 2016, 23(6): 835-842.
- [39] Zhang XL, Guo KY, Dong ZM, et al. Kunitz-type

- protease inhibitor BmSPI51 plays an antifungal role in the silkworm cocoon. *Insect Biochem Mol Biol*, 2020, 116: 103258.
- [40] De Magalhães MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, et al. Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microbes Infect*, 2018, 20(9/10): 606-609.
- [41] Lepedda AJ, De Muro P, Capobianco G, et al. Role of the small proteoglycan bikunin in human reproduction. *Hormones (Athens)*, 2020, 19(2): 123-133.
- [42] Falcón CR, Masih D, Gatti G, et al. *Fasciola hepatica* Kunitz type molecule decreases dendritic cell activation and their ability to induce inflammatory responses. *PLoS ONE*, 2014, 9(12): e114505.
- [43] Ranasinghe SL, Fischer K, Gobert GN, et al. Functional expression of a novel Kunitz type protease inhibitor from the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Parasit Vectors*, 2015, 8: 408.
- [44] Ranasinghe SL, Duke M, Harvie M, et al. Kunitz-type protease inhibitor as a vaccine candidate against schistosomiasis mansoni. *Int J Infect Dis*, 2018, 66: 26-32.
- [45] Zhang WZ, Li L, Zheng Y, et al. *Schistosoma japonicum* peptide SJMHE1 suppresses airway inflammation of allergic asthma in mice. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(11): 7819-7829.
- [46] Duran AFA, Neves LDP, Da Silva FRS, et al. rBmTI-6 attenuates pathophysiological and inflammatory parameters of induced emphysema in mice. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 1214-1221.
- [47] Hong ZB, De Meulemeester L, Jacobi A, et al. Crystal structure of a two-domain fragment of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1: functional interactions between the Kunitz-type inhibitor domain-1 and the neighboring polycystic kidney disease-like domain. *J Biol Chem*, 2016, 291(27): 14340-14355.
- [48] Xu CD, Deng F, Mao ZH, et al. The interaction of the second Kunitz-type domain (KD2) of TFPI-2 with a novel interaction partner, prosaposin, mediates the inhibition of the invasion and migration of human fibrosarcoma cells. *Biochem J*, 2012, 441(2): 665-674.
- [49] Ranasinghe SL, Fischer K, Zhang WB, et al. Cloning and characterization of two potent kunitz type protease inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(12): e0004268.
- [50] Schmidt MCB, Morais KLP, De Almeida MES, et al. Amblyomin-X, a recombinant Kunitz-type inhibitor, regulates cell adhesion and migration of human tumor cells. *Cell Adh Migr*, 2020, 14(1): 129-138.
- [51] Bouffleur P, Sciani JM, Goldfeder M, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of amblyomin-X, a novel antitumor protein drug in healthy mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(1): 111-120.
- [52] Maria DA, Will SEAL, Bosch RV, et al. Preclinical evaluation of amblyomin-X, a Kunitz-type protease inhibitor with antitumor activity. *Toxicol Rep*, 2019, 6: 51-63.
- [53] Yang C, Zhang JJ, Zhang XP, et al. Sporamin suppresses growth of xenografted colorectal carcinoma in athymic BALB/c mice by inhibiting liver  $\beta$ -catenin and vascular endothelial growth factor expression. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(25): 3196-3206.
- [54] Fang EF, Wong JH, Bah CSF, et al. *Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: from isolation to potential medicinal applications. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(4): 806-811.
- [55] Sananes A, Cohen I, Shahar A, et al. A potent, proteolysis-resistant inhibitor of kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) for cancer therapy, developed by combinatorial engineering. *J Biol Chem*, 2018, 293(33): 12663-12680.
- [56] De Medeiros AF, Costa IDS, De Carvalho FMC, et al. Biochemical characterisation of a Kunitz-type inhibitor from *Tamarindus indica* L. seeds and its efficacy in reducing plasma leptin in an experimental model of obesity. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33(1): 334-348.

- 
- [57] Ribeiro JADNC, Serquiz AC, Silva PFDS, et al. Trypsin inhibitor from *tamarindus indica* L. seeds reduces weight gain and food consumption and increases plasmatic cholecystokinin levels. Clinics (Sao Paulo), 2015, 70(2): 136-143.
- [58] Liao QW, Gong GY, Poon TCW, et al. Combined transcriptomic and proteomic analysis reveals a diversity of venom-related and toxin-like peptides expressed in the mat anemone *Zoanthus natalensis* (Cnidaria, Hexacorallia). Arch Toxicol, 2019, 93(6): 1745-1767.
- [59] Smith SM, Melrose J. A retrospective analysis of the cartilage Kunitz protease inhibitory proteins identifies these as members of the inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor superfamily with potential roles in the protection of the articular surface. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 497.
- [60] Lehmann A. Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery. Expert Opin Biol Ther, 2008, 8(8): 1187-1199.
- [61] Zuraw B, Yasothan U, Kirkpatrick P. Ecallantide. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(3): 189-190.
- [62] Dunlevy FK, Martin SL, De Courcey F, et al. Anti-inflammatory effects of DX-890, a human neutrophil elastase inhibitor. J Cyst Fibros, 2012, 11(4): 300-304.
- [63] Attucci S, Gauthier A, Korkmaz B, et al. EPI-hNE4, a proteolysis-resistant inhibitor of human neutrophil elastase and potential anti-inflammatory drug for treating cystic fibrosis. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 318(2): 803-809.
- [64] Mahdy AM, Webster NR. Perioperative systemic haemostatic agents. Br J Anaesth, 2004, 93(6): 842-858.

(本文责编 郝丽芳)