

## 缅甸蝰蛇毒纤溶酶 F<sub>aa</sub> 的分离及生物活性

陈慧珍<sup>1</sup>, 梁秀霞<sup>2</sup>, 邱鹏新<sup>2</sup>, 陈家树<sup>2\*</sup>

(中山大学 1. 东校区教学实验中心, 广东 广州 510006; 2. 中山医学院药理学教研室, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】从缅甸蝰蛇毒中分离纯化得到纤溶酶 F<sub>aa</sub> 并研究其纤维蛋白溶解活性。【方法】缅甸蝰蛇毒纤溶酶 F<sub>aa</sub> 经过离子交换层析和凝胶层析分离程序得到, SDS-PAGE 电泳测得其分子质量, 用纤维蛋白平板法测得其纤维蛋白溶解活性, SDS-PAGE 电泳测得其纤维蛋白原和纤维蛋白水解特异性。通过小鼠背部皮下注射 F<sub>aa</sub> 测定 F<sub>aa</sub> 的局部出血活性。取昆明种小白鼠 42 只, 体质量(20 ± 2)g, 雌雄各半, 随机分成 7 组, 每组 6 只, 皮下注射 0.1 mL 的 F<sub>aa</sub> (5 个剂量组: 用生理盐水配制成浓度分别为 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 mg/mL), 生理盐水和粗毒(0.1 mg/mL)做对照。6 h 后处死小白鼠, 从皮内侧面测量出血点的大小, 计算最小出血剂量(MHD)。【结果】通过三步分离方法得到蛇毒纤溶酶 F<sub>aa</sub>, 其分子质量是 69 000 u。F<sub>aa</sub> 在纤维蛋白平板和加热纤维蛋白平板上均显示了纤维蛋白溶解活性。纤维蛋白原和 F<sub>aa</sub> (0.2 g/L) 保温后, A $\alpha$  和 B $\beta$  链分别在 5 min 和 6 h 后完全水解。 $\gamma$ -链在 24 h 后部分水解。F<sub>aa</sub> 水解纤维蛋白的过程与纤维蛋白原的水解过程相似。蛇毒纤溶酶 F<sub>aa</sub> (0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 mg/mL) 的皮内出血点直径(mm)分别为 7.7 ± 1.0、9.9 ± 1.4、10.5 ± 1.8、12.7 ± 1.4、13.5 ± 1.3。最小出血剂量(MHD)为 6.0  $\mu$ g。【结论】F<sub>aa</sub> 是一种可以直接降解纤维蛋白且具有出血活性的  $\alpha$ -纤维蛋白酶。

关键词: 纤溶酶; 蛇毒; 蝰蛇

中图分类号: R966; Q959.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)04-0513-07

### Purification and Characterization of F<sub>aa</sub>, a Fibrinolytic Enzyme from Burmese Russell's Viper (*Daboia Russelli Siamensis*)

CHEN Hui-zhen<sup>1</sup>, LIANG Xiu-xia<sup>2</sup>, QIU Peng-xin<sup>2</sup>, CHEN Jia-shu<sup>2</sup>

(1. East Campus Laboratory Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. Department of Pharmacology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To purify F<sub>aa</sub>, a fibrinolytic enzyme from Burmese Russell's Viper (*Daboia Russelli Siamensis*) venom, and investigate its fibrinolytic characterization. 【Methods】F<sub>aa</sub> was purified from Burmese Russell's Viper venom by ion-exchange chromatography and gel-filtration. Molecular weight was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Fibrinolytic activity was determined using fibrin plates technique. Specific cleavage of fibrinogen and fibrin was shown on SDS-PAGE. The local hemorrhagic activity was assayed by subcutaneous injection on the back of mouse. 42 Kunming strain mice (20 ± 2) g, bisexual each half, were randomly divided into 7 groups with 6 individual per groups. F<sub>aa</sub> (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125 g/L) were each injected subcutaneously in the back with the test samples in 0.1 mL of 0.9% saline, by control of 0.9% saline and crude venom and sacrificed after 6 hours and the diameters of hemorrhagic spots measured on the underside of the skin. 【Results】F<sub>aa</sub> was achieved by a three-step fraction with a molecular weight of 69 000. F<sub>aa</sub> showed fibrinolytic activity whether on fibrin plate or heated fibrin plate. After incubated with F<sub>aa</sub> (0.2 g/L), A $\alpha$  and B $\beta$  of fibrinogen disappeared within 5 min and 6 h respectively. The  $\gamma$ -chain was partially degraded after 24 h. The process of fibrin hydrolysis by F<sub>aa</sub> was similar to that observed with fibrinogen. F<sub>aa</sub> (0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125 g/L) was injected subcutaneously, the diameters(mm) of hemorrhagic spots measured on the underside of the skin of which were 7.7 ± 1.0, 9.9 ± 1.4, 10.5 ± 1.8, 12.7

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 广东省科技计划项目(2004B33001003)

作者简介: 陈慧珍, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 蛇毒蛋白酶, E-mail: chenhz5@mail.sysu.edu.cn; \* 通信作者: 陈家树, 博士生导师, 研究方向: 蛇毒蛋白酶, E-mail: chenjsh@mail.sysu.edu.cn

$\pm 1.4$ , and  $13.5 \pm 1.3$  mm, respectively. The minimum hemorrhagic dose (MHD) of F<sub>aa</sub> was 6.0  $\mu\text{g}$ . [Conclusion] F<sub>aa</sub> was a  $\alpha$ -fibrinogenase that hydrolyzed fibrin directly with hemorrhagic activity.

**Key words:** fibrinolytic enzyme; snake venoms; Russell's viper

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2010, 31(4): 513-519]

许多蛇毒特别是蝰科的蝰亚科和蝮亚科中含有能够具有生物活性的蛋白酶,它们作用于高等动物的血液凝固或者纤溶系统<sup>[1]</sup>。蛇毒中能够直接或者间接水解纤维蛋白(原)的酶有凝血酶样酶(thrombin-like enzymes)、血浆纤溶酶原激活物(Plasminogen activators)和纤维蛋白(原)溶解酶(以下简称纤溶酶),三者统称纤维蛋白原水解酶<sup>[2]</sup>。这些酶中只有纤溶酶能够直接降解纤维蛋白和纤维蛋白酶原。目前大约有 70 多种具有或者不具有出血活性的纤溶酶被分别从 *Agkistrodon acutus*<sup>[3]</sup>、*Agkistrodon contortrix*<sup>[4]</sup>、*Cerastes cerastes*<sup>[5]</sup>、*Trimeresurus mucrosquamatus*<sup>[6]</sup>、*Vipera lebetina*<sup>[7]</sup>、*Crotalus atrox* 等<sup>[8]</sup>蛇毒中分离出来并进行了性质研究。蝰蛇是世界上的主要毒蛇之一,蝰蛇(缅甸亚种)属于蝰科蝰亚科,主要分布于东南亚的十几个国家和地区<sup>[9]</sup>。蝰蛇毒中含有丰富的血液毒素,至今已从其中分离出多种凝血毒素,如凝血因子 激活剂(RVV- )、凝血因子 激活剂(RVV- )<sup>[10-12]</sup>和凝酯酶 A2<sup>[13-15]</sup>和出血蛋白酶<sup>[16]</sup>、蛋白酶抑制剂<sup>[17]</sup>。目前国内外均未见同种蛇毒纤溶酶的研究报道。仅 Chakrabarty 等<sup>[16]</sup>从蝰蛇(缅甸亚种)毒中分离出一种具有纤溶活性和酯酶活性的出血因子 VRR-73,其通过激活纤溶酶原降解纤维蛋白,因此其降解方式是间接的。本文第一次从蝰蛇(缅甸亚种)毒中分离出一种大分子质量的具有纤维蛋白溶解活性的蛋白组分 F<sub>aa</sub>,并进一步探讨了 F<sub>aa</sub> 的生物活性特点。F<sub>aa</sub> 是一种新的蛇毒纤溶酶,既可降解纤维蛋白原,又可降解纤维蛋白,其作用方式是直接的, F<sub>aa</sub> 具有较强的出血活性。我们试图进一步开发新的蛇毒资源。缅甸亚种蝰蛇中毒死亡率高,目前对其研究有限,本文为阐明蛇伤中毒机制以及临床对其抗毒素的制备和应用研究提供了理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

冻干的蝰蛇(缅甸亚种)粗毒从广州医学院蛇

毒研究所购买。CM-Sephadex C-50, Superdex™ 75 和 DEAE-Sephadex A-50 均购自 Pharmacia 公司。牛纤维蛋白原,纤溶酶,分子质量标准蛋白购自美国 Sigma 公司。人凝血酶购自珠海经济特区生物化学制药厂。其它试剂均为国产分析纯。实验动物:昆明种小白鼠(No. 2004A087, 二级),雌雄各半,体质量(20  $\pm$  2) g,由中山大学北校区动物中心提供。

### 1.2 F<sub>aa</sub> 的分离纯化

F<sub>aa</sub> 的分离纯化步骤均在 4  $^{\circ}\text{C}$  下进行,在 280 nm 处测定其吸光度。每一个分离步骤结束后进一步测定所有成分的纤溶活性(具体方法见后)。

取粗毒 1.0 g 溶解在 5 mL 蒸馏水中,在 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 值 6.8 的醋酸铵缓冲液中透析,4  $^{\circ}\text{C}$  下 3 000  $\times$  g 离心低温离心 10 min。将 CM-Sephadex C-50 离子交换柱(2.6  $\times$  80 cm)用上述缓冲液平衡,取离心过的粗毒上清液上样,用上述缓冲液洗脱,待非吸附成分完全洗脱出来后,改用分别含有不同浓度的 NaCl (0.5 mol·L<sup>-1</sup> 和 1.0 mol·L<sup>-1</sup>) 的上述缓冲溶液共 1 000 mL 进行联合梯度洗脱,洗脱液用分部收集器收集,每管 3 mL,流速 12 mL·h<sup>-1</sup>。

具有纤溶活性的成分进一步透析、冻干并进行下一步 Superdex™ 75 (1.6 cm  $\times$  80 cm) 的分离。分离柱用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 值 6.8 的醋酸铵缓冲液平衡,流速 4 mL·h<sup>-1</sup>。

将 Superdex™ 75 所得到的纤溶活性成分透析、冻干,用 DEAE-Sephadex A-50 (1.6 cm  $\times$  80 cm) 进一步分离。DEAE-Sephadex A-50 用 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液进行平衡,用含有不同浓度的 NaCl (从 0.1 mol·L<sup>-1</sup>  $\sim$  0.7 mol·L<sup>-1</sup>) 和不同 pH 值(pH 从 8.0  $\sim$  7.0) 的该缓冲溶液共 1 000 mL 进行直线梯度洗脱,流速 12 mL·h<sup>-1</sup>。

### 1.3 蛋白定量测定

根据 Bradford 法,用含有考马斯蓝 G-250 的试剂进行蛋白质浓度测定<sup>[18]</sup>,牛血清白蛋白作为标准蛋白。

### 1.4 分子质量测定

参照 Laemmli (1970)<sup>[19]</sup> 的方法,采用 SDS-

PAGE 垂直平板式电泳测定分子质量。相对分子质量标准蛋白质采用  $\beta$ -牛乳糖(175 000), 副肌球蛋白(83 000), 谷氨酸脱氢酶(62 000), 醛缩酶(47 500), 磷酸丙糖异构酶(32 500),  $\beta$ -乳球蛋白 A(25 000), 溶菌酶(16 500), 抑肽酶(6 500)。

### 1.5 纤溶蛋白原溶解活性的测定

取 F<sub>aa</sub> (150  $\mu$ L, 1 g/L) 加入纤维蛋白原(溶解在 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵溶液, pH 8.0 乙酸铵缓冲液中) 溶液 450  $\mu$ L 中, 于 37  $^{\circ}$ C 温育。分别在 5 min、15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、24 h 各取 20  $\mu$ L 的反应液, 立即加入 5  $\mu$ L 的等量的电泳上样缓冲液, 100  $^{\circ}$ C 水浴 3 min, 以 4% 的浓缩胶和 12% 分离胶作 SDS-PAGE。同样以 50 U·L<sup>-1</sup> 的人纤溶酶作对照<sup>[20-22]</sup>。

### 1.6 纤溶蛋白溶解活性的测定

纤溶蛋白溶解活性用纤维蛋白平板法<sup>[23-24]</sup>测定。取 20  $\mu$ L 不同浓度的纤溶酶 F<sub>aa</sub> 于平板表面, 每一样品加三点, 37  $^{\circ}$ C 保温 24 h, 观察透明圈的形成测量其直径并计算面积(mm<sup>2</sup>)。同样, 在将标准平板于 85  $^{\circ}$ C 加热 1 h 制作成的“加热平板”上重复上述试验。用生理盐水作阴性对照, 尿激酶作阳性对照。

纤维蛋白降解产物同样经过 SDS-PAGE 分析<sup>[5,25]</sup>。取纤维蛋白原(100  $\mu$ L, 10 g/L)和 100  $\mu$ L 凝血酶(10 kU·L<sup>-1</sup>)混合并于 37  $^{\circ}$ C 下温育 30 min。形成的蛋白凝块用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 的乙酸铵缓冲液(pH 8.0)洗涤 3 次。加入 F<sub>aa</sub> (100  $\mu$ L, 2 g·L<sup>-1</sup>) 继续 37  $^{\circ}$ C 温育, 分别在 0.5、1、3、6、12、24、48 h 取样加入电泳上样缓冲液终止反应, 作 SDS-PAGE 分析。以 50 U·L<sup>-1</sup> 的人纤溶酶作对照。

### 1.7 局部出血活性测定

出血活性的测定参照 Kondo<sup>[26]</sup> 的方法进行。取昆明种小白鼠 42 只, 体质量(20  $\pm$  2)g, 雌雄各半, 随机分成 7 组, 每组 6 只, 清洁背部皮肤并去毛后, 分别皮下注射 0.1 mL 的 F<sub>aa</sub> (5 个剂量组: 用生理盐水配制成浓度分别为 0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 mg/mL)、生理盐水和粗毒(0.1 mg/mL)。6 h 后处死小白鼠, 取其背部皮肤, 从皮内侧面测量出血点的大小, 以引起平均直径为 10 mm 的出血点所需的剂量为最小出血剂量(MHD), 以此来判断有无出血活性。

### 1.8 统计学方法

数据表示为  $\bar{x} \pm s$ , 统计分析采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 F<sub>aa</sub> 的分离纯化

F<sub>aa</sub> 组分经过 3 步分离纯化程序得到。粗毒经过 CM-Sephadex C-50 阳离子交换层析得到 11 个蛋白峰(图 1), 其中第 2(F<sub>I</sub>) 和 6 峰(F<sub>VI</sub>) 具有较高的纤溶活性。F<sub>VI</sub> 进一步经 Superdex 75 凝胶层析得到 3 个蛋白峰(图 2), 其中主峰即 F<sub>II</sub> 具有纤溶活性, 将其再经过 DEAE-Sephadex A-50 阴离子交换层析得到 3 个蛋白峰(图 3), 其中第 1 峰(F<sub>aa</sub>) 具有较强的纤溶活性。

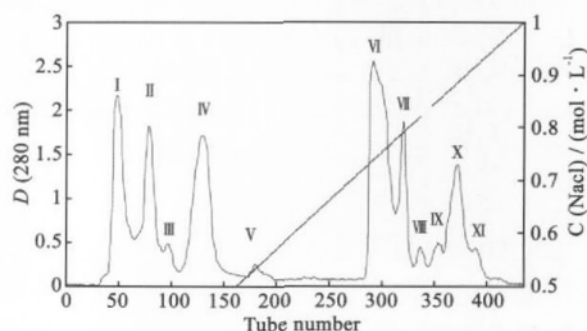


图 1 粗毒经过 CM-Sephadex C-50 阳离子交换层析图  
Fig.1 CM-Sephadex C-50 ion exchange chromatograph of Russell's viper venom

CM-Sephadex C-50 (2.6 cm  $\times$  80 cm) was pre-equilibrated with 0.1 mol·L<sup>-1</sup> (pH 6.8) ammonium acetate. Russell's viper venom 1.0 g in a 5 mL volume was applied and eluted with the same solution. After uncombined fractions were washed out, a gradient of NaCl from 0.5 mol·L<sup>-1</sup> to 1.0 mol·L<sup>-1</sup> was used at a flow rate of 12 mL·h<sup>-1</sup>, 3 mL·tube<sup>-1</sup>.

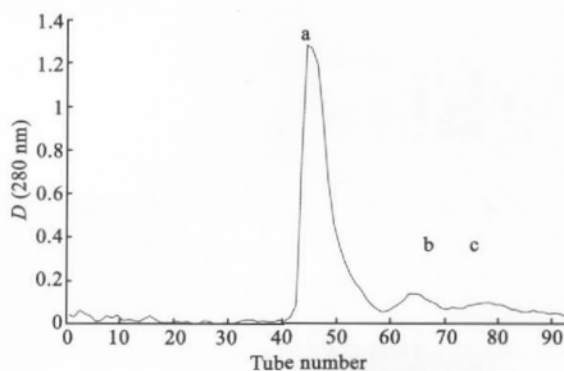


图 2 F<sub>II</sub> 经 Superdex™ 75 凝胶层析图  
Fig.2 Superdex™ 75 gel filtration

Superdex™ 75 (1.6 cm  $\times$  80 cm) was pre-equilibrated with 0.1 mol·L<sup>-1</sup> (pH 6.8) ammonium acetate. F<sub>II</sub> (29 mg) was applied in a 8 mL volume and eluted with the same solution at a flow rate of 4 mL·h<sup>-1</sup>, 2 mL·tube<sup>-1</sup>.

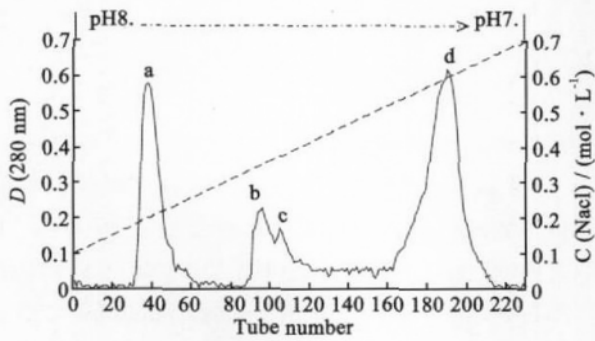


图 3 F II a 经过 DEAE-Sephadex A-50 阴离子交换层析图

Fig.3 DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatograph

DEAE-Sephadex A-50 (1.6 cm × 80 cm) was pre-equilibrated with 0.01 mol/L Tris-HCl (pH 8.0). F II a (100 mg) was applied in a 2 mL volume and eluted with the same solution contained a combined gradient of NaCl (from 0.1 mol·L<sup>-1</sup> to 0.7 mol·L<sup>-1</sup>) and pH (from pH 8.0 to pH 7.0) at a flow rate of 12 mL·h<sup>-1</sup>, 3 mL·tube<sup>-1</sup>.

在 SDS-PAGE F aa 显示单一条带(图 4),通过标准蛋白质的分子质量对数及相对迁移率绘得的标准曲线(图 5),通过标准曲线计算得相对分子质量是 69 000。从 1.0 g 粗毒能分离出 17.7 mg 的 F aa。

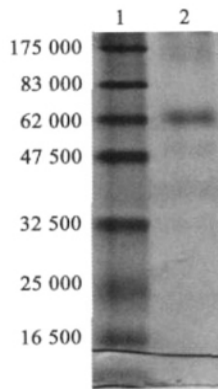


图 4 SDS-PAGE 分析 F II aa 相对分子质量

Fig.4 SDS-PAGE analysis of F II aa

SDS-PAGE was performed in 12% separation gel (pH 8.8) and 4% concentration gel (pH 6.8). lane 1: Molecular weight protein standards, MBP-β-galactosidase (175 000), MBP-paramyosin (83 000), Glutamic dehydrogenase (62 000), Aldolase (47 500), Triosephosphate isomerase (32 500), β-Lactoglobulin A (25 000), Lysozyme (16 500); lane2: F II aa.

2.2 F aa 的纤维蛋白原溶解作用

SDS-PAGE 结果显示,F aa 对纤维蛋白酶原

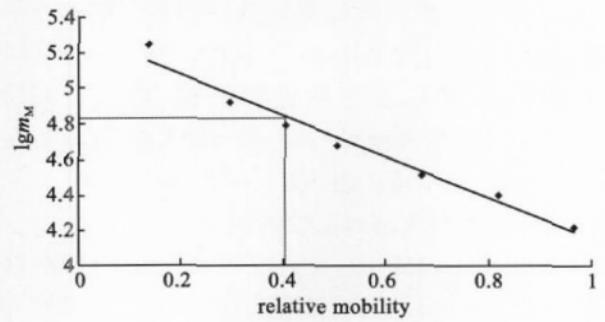


图 5 SDS-PAGE 测定 F II aa 分子质量

Fig.5 Determination of the molecular mass of F II aa by SDS-PAGE

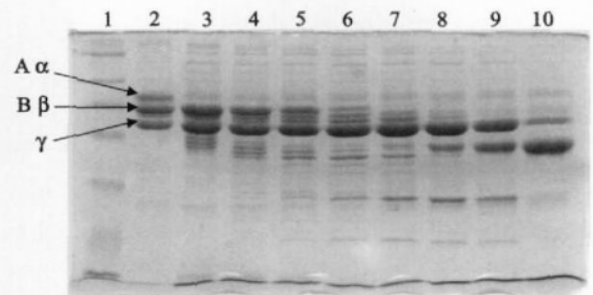


图 6 SDS-PAGE 分析 F II aa 对纤溶蛋白原的降解作用

Fig.6 SDS-PAGE analysis of cleaved fibrinogen

Lane 1: Molecular weight protein standards; Lane 2: fibrinogen; Lane 3-10: fibrinogen + F II aa incubated for 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h.

的 Aα 链、Bβ 链和 γ 链均有裂解作用(图 6),Aα 链在 5 min 内几乎完全降解,接下来 Bβ 链在 2 h 内消失,γ 链对 F aa 的作用不敏感,γ 链在温育 24 h 后仅部分降解。当纤溶蛋白酶与人纤溶酶温育,Aα 链、Bβ 链均在 5 min 内消失,γ 链在 1 h 内降解,主要的降解片断产物也不同于 F aa,这些显示 F aa 有不同的作用位点(图 7)。人纤溶酶对纤维蛋白原的作用结果见图 7。

2.3 F aa 的纤维蛋白活性

采用纤维蛋白平板法测定 F aa 纤溶活性。不同浓度(0.25, 0.5, 1.0, 2.0 g·L<sup>-1</sup>)的 F aa 20 μL 加到纤维蛋白平板表面。结果显示 F aa 能够溶解纤维蛋白而且具有量效关系(图 8)。F aa 能够溶解加热的纤维蛋白平板,而尿激酶不能。

F aa 降解纤维蛋白的过程与纤维蛋白原相似(图 9)。SDS-PAGE 结果显示,F aa 对纤维蛋白的 α 链、β 链和 γ-γ 二聚体均有水解作用,对 α 链最敏感,β 链其次,而对 γ-γ 二聚体的水解

作用较弱。

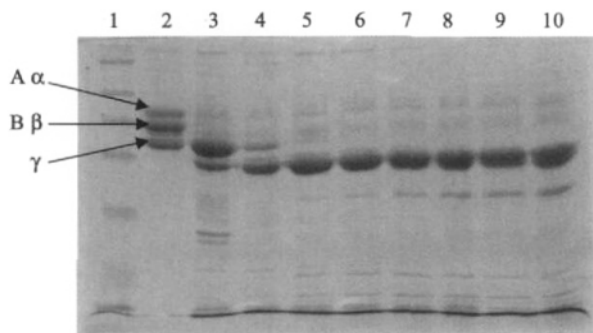


图 7 SDS-PAGE 分析人纤溶酶原对纤维蛋白原的降解作用

Fig.7 SDS-PAGE analysis of fibrinogen cleavage by plasmin

Lane 1: mixture of marker proteins; Lane 2: fibrinogen; Lane 3 ~ 10: fibrinogen incubated with plasmin in different time intervals (5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h).

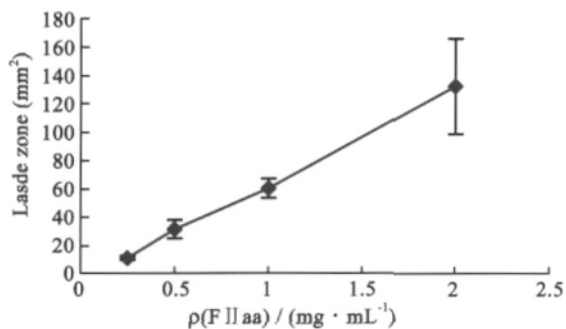


图 8 F II aa 的纤维蛋白溶解活性

Fig.8 Fibrinolytic activity of F II aa

The lysed area was obtained by fibrin plate technique. The activities were expressed as the diameter product (mm<sup>2</sup>) of the lysed zone ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ).

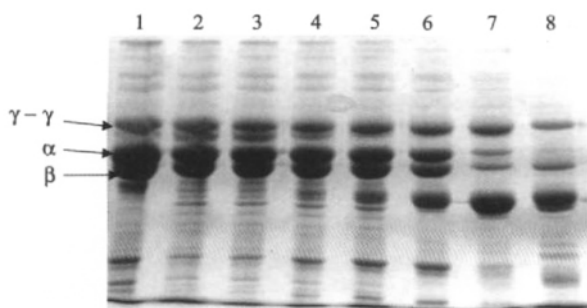


图 9 F II aa 纤维蛋白水解活性 SDS-PAGE 分析图

Fig.9 SDS-PAGE analysis of cleaved fibrin by F II aa

Lane 1: fibrin; Lane 2 ~ 8: fibrin + F II aa incubated for 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, and 48 h.

### 2.4 F<sub>II aa</sub> 的局部出血活性

F<sub>II aa</sub> (0.025、0.05、0.075、0.1、0.125 g · L<sup>-1</sup>) 0.1 mL 皮下注射,6 h 后取皮并测量皮内侧面出血点直径(mm)分别为 7.7 ± 1.0、9.9 ± 1.4、10.5 ± 1.8、12.7 ± 1.4、13.5 ± 1.3(mm)。最小出血剂量(MHD)为 6.0 μg(图 10)。

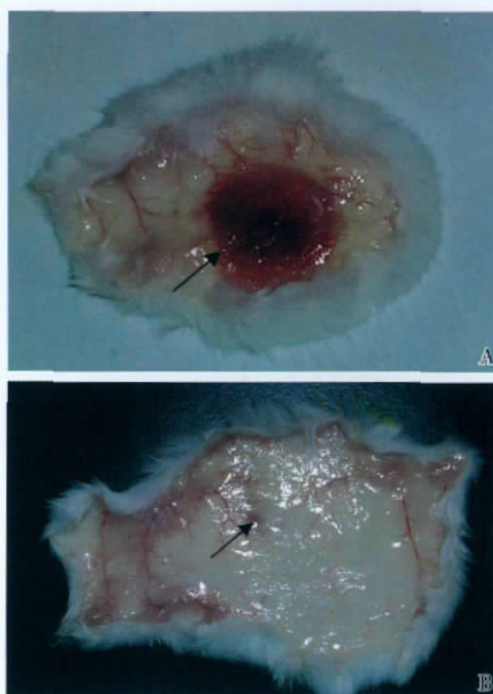


图 10 F II aa 的小鼠皮下局部出血活性

Fig.10 Local hemorrhagic activity of F II aa on mouse skin

A: F II aa (10 μg in 0.1 mL normal saline) was injected subcutaneously on dorsal skin of Kunming strain mice produced a spot of 12.7 mm in diameter. The skin was removed and hemorrhagic spots were visualized on the inner surface. B: In a negative control experiment, 0.1 mL of NS was injected under identical conditions. The point of injection has been marked by an arrow.

## 3 讨论

### 3.1 F<sub>II aa</sub> 的理化特性

蝰亚科和腹亚科含有丰富的生物活性蛋白<sup>[8]</sup>。本文从蝰亚科(缅甸亚种)用 CM-Sephadex C-50 离子交换法分离出两种纤维蛋白酶(F<sub>I</sub> 和 F<sub>II</sub>)。有些蛇毒含有不止一种纤溶活性酶如: 烙铁头蛇毒<sup>[6]</sup>和 Eastern cottonmouth moccasin 蛇毒<sup>[21]</sup>。本文将 F<sub>I</sub> 进一步分离纯化得到具有出血活性的 F<sub>II aa</sub>,其相对分子质量为 69 000。F<sub>I</sub> 分离成分

更为复杂且纤溶活性低于 F<sub>aa</sub>, 其分离正在进一步进行之中。

根据其既能水解纤维蛋白原的 A $\alpha$  链, 又能水解 B $\beta$  链, F<sub>aa</sub> 可命名为  $\alpha$ - 或者  $\beta$ - 纤维蛋白原溶解酶。将 F<sub>aa</sub> 划分为  $\alpha$ - 纤维蛋白原溶解酶的原因是 A $\alpha$  链对 F<sub>aa</sub> 最敏感, 延长温育时间  $\gamma$  链也能够部分水解。鲜有报道仅对  $\gamma$  链产生直接裂解作用的纤维蛋白原溶解酶, 仅 Nikai 等<sup>[27]</sup>从蛇毒中西部菱斑响尾蛇蛇毒中分离出一种出血毒素 f, 对  $\gamma$  链产生直接裂解作用而对 A $\alpha$  链和 B $\beta$  链都没有影响。

F<sub>aa</sub> 的纤维蛋白(原)水解活性产物不同于人纤溶酶, 提示两者水解方式不同。F<sub>aa</sub> 可以水解加热平板, 而尿激酶不行。尿激酶水解的方式是间接通过激活纤溶酶原变成纤溶酶的, 但是纤溶酶原可以被加热破坏。这就证实了 F<sub>aa</sub> 的直接纤维蛋白溶解活性。

纤溶酶是由纤溶酶原在其激活物的作用下转变而成的, 对纤维蛋白(原)的降解作用是通过精-赖氨酸键的裂解作用, 纤维蛋白(原)在纤溶酶的作用下产生的降解产物统称为纤维蛋白(原)降解产物。蛇毒纤溶酶产生的降解产物与人纤溶酶不同, 提示其水解机制, 作用位点也不同<sup>[28]</sup>。另外, 蛇毒纤溶酶还通过抑制凝血因子影响正常凝血酶的生成, 能够水解酪蛋白<sup>[29]</sup>, 还可能对凝血系统的其他因子和血小板系统也可能产生影响。其作用机制还有待进一步的研究。

### 3.2 展望

人们利用蛇毒纤溶酶的直接作用纤维蛋白(原)特点用于抗血栓治疗, 蛇毒纤溶酶治疗中风效果显著, 人们正致力于其开发应用以及减少其副作用的研究<sup>[30]</sup>。因为间接作用方式需要激活人血纤溶酶, 容易引起出血和凝血系统失平衡等各种并发症和大出血, 而直接作用方式可以避免这些并发症。F<sub>aa</sub> 在开发应用上也有这方面的潜能。

缅甸蝰蛇的毒性剧烈, 而人们对其复杂的毒性成分特别是纤溶活性和出血活性的研究报道不多, 本文能够为其基础和临床研究均可提供一定的参考价值。

参考文献:

[1] Markland FS. Snake venom and the hemostatic system

[J]. *Toxicon*, 1998, 36(2): 1749-1800.

- [2] Liang XX, Zhou YN, Chen JS, et al. Enzymological characterization of FIIa, a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(12): 1474-1478.
- [3] Ouyang C, Huang T. Purification and characterization of the fibrinolytic principle of *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 439(1): 146-153.
- [4] Retzios AD, Markland FS. A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems [J]. *Thromb Res*, 1988, 52(2): 541-552.
- [5] Daoud E, Tu AT, el-Asmar MF. Mechanism of the anticoagulant, cerastase F-4 isolated from *cerastes cerastes* (*Egyptian sand viper*) venom [J]. *Thromb Res*, 1986, 41(6): 791-799.
- [6] Ouyang C, Teng CM, Chen YC. Physicochemical properties of  $\alpha$ - and  $\beta$ - fibrinogenases from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1977, 481(2): 622-630.
- [7] Siigur E, Mahar A, Siigur J.  $\beta$ - fibrinogenase from the venom of *vipera lebetina* [J]. *Toxicon*, 1991, 29(1): 107-118.
- [8] Willis TW, Tu AT. Purification and biochemical characterization of Atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from *western diamondback rattlesnake* venom [J]. *Biochemistry*, 1988, 27(13): 4769-4777.
- [9] Hung DZ, Wu ML, Deng JF, et al. Russell's viper snakebite in Taiwan: differences from other Asian countries [J]. *Toxicon*, 2002, 40(9): 1291-1298.
- [10] Kisiel W. Molecular properties of the factor V-activating enzyme from Russell's viper venom [J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(23): 12230-12234.
- [11] Furukawa Y, Matsunaga Y, Hayashi K. Purification and characterization of a coagulant protein from the venom of Russell's viper [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 453(1): 48-61.
- [12] Takeya H, Nishida S, Miyata T, et al. Coagulation factor activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-): A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)- like and C-type lectin-like domains [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(20): 14109-14117.
- [13] Tsai IH, Lu PJ, Su JC. Two types of Russell's viper revealed by variation in phospholipases A2 from venom of the subspecies [J]. *Toxicon*, 1996, 34(1): 99-

- 109.
- [14] Thwin MM, Gppalakrishnakone P, Yuen R, et al. A major lethal factor of the venom of Burmese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*): isolation, N-terminal sequencing and biological activities of Daboiatoxin [J]. *Toxicon*, 1995, 33(1): 63-76.
- [15] Liu KF, Chiou SY, Lee B. Study on snake venoms and their utilization. Identification of physiological effects and enzymatic activities in the venom of *Vipera russelli siamensis* (from Fukien) after fractionation by chromatography [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1980, 12: 153-157.
- [16] Chakrabarty D, Datta K, Gomes A, et al. Haemorrhagic protein of Russell's viper venom with fibrinolytic and esterolytic activities [J]. *Toxicon*, 2000, 38(11): 1475-1490.
- [17] Takahashi H, Iwanaga S, Kitagawa T, et al. Snake venom proteinase inhibitor II: Chemical structure of inhibitor- II isolated from the venom of Russell's viper (*V. russelli*) [J]. *J Biochem*, 1974, 76(4): 721-733.
- [18] Read SM, Northcote DH. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein [J]. *Anal Biochem*, 1981, 116(1): 53-64.
- [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [20] Siigur J, Samel M, Tonismagi K, et al. Biochemical characterization of Lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera Lebetina* Snake Venom [J]. *Thromb Res*, 1998, 90(1): 39-49.
- [21] Hahn BS, Chang IM, Kim YS. Purification and characterization of piscivorase and the fibrinolytic enzymes from *Eastern cottonmouth moccasin* venom (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*) [J]. *Toxicon*, 1995, 33(7): 929-941.
- [22] 江伟建, 邱鹏新, 颜光美. 基因重组蛇毒溶酶 rF 理化特性及纤溶能力的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(3): 245-249.
- [23] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1952, 40(2): 346-351.
- [24] Chen JS, Sun JJ, Liang LG. Isolation and pharmacodynamic characterization of the fibrinolytic fraction of *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Chn Pharmacol Bull*, 1993, 9: 22-25.
- [25] Siigur E, Siigur J. Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1074(2): 223-229.
- [26] Kondo H, Kondon S, Ikenzawa H. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of *Habu* snake venom [J]. *Jpn J Med Sci Biol*, 1960, 13: 43-52.
- [27] Nikai T, Mori N, Kishida M, et al. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox* (*Western Diamondback Rattlesnake*) [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1984, 231(2): 309-319.
- [28] 符民桂, 管锦霞. 蛇毒纤维蛋白(原)溶解酶的研究进展 [J]. *蛇志*, 1996, 8(4): 33-36.
- [29] 张箴波, 张学荣, 舒雨雁. 蛇毒纤溶酶的性质及应用研究 [J]. *蛇志*, 2005, 17(3): 174-176.
- [30] 马涛, 邱鹏新, 颜光美. C 端序列的删除对非出血重组蛇毒纤溶酶的影响 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(4): 404-408.

(编辑 孙慧兰)