DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2005.0033
第 26 卷 第 3 期 中山大学学报(医学科学版) Vol.26 No.3
2005 年 5 月 JOURNAL OF SUN YAT-SEN UNIVERSITY(MEDICAL SCIENCES) May 2005

基因重组蛇毒纤溶因子 rFII 理化特性及纤溶能力的研究

江伟健，邱鹏新，颜光美
（中山大学药理学教研室，广东 广州 510080）

摘 要：【目的】研究重组蛇毒纤溶因子的理化特性和纤溶能力。【方法】SDS-PAGE 及高效液相法分析重组蛇毒纤溶因子 rFII 相对分子质量、纯度，等电聚焦分析其等电点；纤维平板和 SDS-PAGE 检测重组蛇毒纤溶因子对纤维蛋白及纤维蛋白原的水解能力。【结果】重组蛇毒纤溶因子 rFII 是一个相对分子质量在 28 000，等电点 9.0 的碱性蛋白酶。它水解纤维蛋白原的 Aα、Bβ、γ 亚基，水解能力随时间和浓度的增加而增加。它对纤维蛋白的水解能力比相同浓度下的纤溶酶强 4 倍。【结论】rFII 是一种高效的水解纤维蛋白原和纤维蛋白的碱性蛋白酶。

关键词：蛇毒；尖吻蝮蛇；纤维蛋白原；蛋白酶
中图分类号：Q959.6; Q55; R996.3 **文献标识码**：A **文章编号**：1672-3554(2005)03-0245-05

Biochemical Characterization and Fibrinolytic Activity of rFII, a Recombinant Fibrinolytic Enzyme from *Agkistrodon acutus* Venom

JIANG Wei-jian, QIU Peng-xin, YAN Guang-mei
(Department of Pharmacology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the biochemical characterization and fibrinolytic activity of rFII. 【Method】We calculated the molecular weight by SDS-PAGE, determined the pI of rFII by isoelectric focusing and the purity by HPLC. We determined fibrinogenolytic activity by SDS-PAGE and fibrinolytic activity by fibrin plate.【Result】rFII was an alkaline proteinase which had a relative molecular mass of 28 000. It acted on the Aα, Bβ, γ chain of fibrinogen directly. The fibrinolytic activity was 4 times higher than that of plasmin in the same concentration. 【Conclusion】rFII was an alkaline proteinase which hydrolyzed fibrinogen and fibrin efficiently.

Key words: snake venom; *Agkistrodon acutus*; fibrinogen; proteinase
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3):245−249]

蛇毒是一类含有许多酶以及一些非酶的多肽的蛋白质。大量研究表明蛇毒的酶与蛇伤造成的出血、水肿、肿胀以及肌肉坏死和血凝失调等作用有密切的关系[1]。自 1963 年 Heid 报道从马来西亚红口蝮蛇毒中纯化出一种被称为“Ancrod”的抗凝血酶之后，许多学者期望从蛇毒中寻找抗血栓组分来治疗血栓性疾病[2]。Ouyang 等[3, 4]于 1976 年和 1977 年报道了对尖吻蝮蛇毒纤维蛋白溶解酶的纯化及其理化性质的研究，以后许多有关蛇毒纤维蛋白溶解酶的研究文章相继发表。据报道，尖吻蝮蛇毒中含有凝血、抗凝[5]、抗血小板聚集[6]、出血[7]和直接溶解纤维蛋白等组分[3]，其中出血组分可引起出血[7]，故大大地限制了此酶的临床应用。因此，寻找具有纤维蛋白溶解活性又无出血活性的纤维蛋白溶解酶十分必要。本课题组从尖吻蝮蛇蛇毒中分离和纯化出一种纤溶因子，具有直接的溶栓作用[8,9]。但尖吻蝮蛇来源较少，粗毒纯化较困难限制了对此纤溶因子的进一步研究，为此我们利用基因工程技术在真核细胞中重组表达了此纤溶因子，本实验对此重组表达的蛇毒纤溶因子的理化性质及此重组蛇毒纤溶因子对纤维蛋白(原)的活性进行了研究。

收稿日期：2004-12-27
基金项目：广东省科技计划资助项目 (2003A10905)
作者简介：江伟健 (1977−)，男，广东广州人，博士生；颜光美，教授，博士生导师，研究方向：神经药理学. E-mail: ygm@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 材 料

重组蛇毒纤溶因子 rFII 由本实验室提供,人纤维蛋白原,牛纤维蛋白原,人纤溶酶(无纤溶酶原)购自美国 Sigma 公司。凝血酶购自珠海经济特区生物化学制药厂。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 重组蛇毒纤溶因子 rFII 的相对分子质量、纯度和等电点鉴定

纯度、相对分子质量采用还原性和非还原性 SDS-PAGE (40 g/L 浓缩胶,120 g/L 分离胶)及高效液相法(HPLC)测定。等电点测定在上海中科院细胞与生化研究所完成。HPLC 在广州拜迪医药公司完成。

1.3 Western blot 鉴定重组蛇毒纤溶因子

本实验室先前制备了尖吻蝮蛇蛇毒纤溶因子单克隆抗体[10],用此抗体通过 Western blot 免疫印迹技术检测重组蛇毒纤溶因子的同源性。将标准蛋白、纯化的重组纤溶因子加入到 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中,电泳后转移到硝酸纤维膜上。用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,再加入按 1:1 000 稀释的单抗 4 ℃孵育过夜后,用TBST液洗3次, 然后加1:1 000 HRP 兔抗鼠 IgG 孵育 1 h,用 TBST 液洗 3 次。加入发光剂后用 X 线片记录结果。

1.4 水解人纤维蛋白原活性

参照文献[11]的方法,稍作修改。人纤维蛋白原溶解在反应缓冲液中(0.05 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mol/L NaCl),37 ℃温育,加入不同浓度的重组蛇毒纤溶因子 rFII (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 μg/mL), 继续 37 ℃温育,在不同的时间(0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 6, 12, 24 h)取 20 μL 的反应液,加入等量的变性剂(8 mol/L 尿素, 40 g/L β-巯基乙醇和 40 g/L SDS) 室温过夜。SDS-PAGE (40 g/L 浓缩胶,120 g/L 分离胶)分析水解产物。

1.5 水解牛纤维蛋白活性

用纤维蛋白平板法。参照文献[8]的方法制造纤维蛋白平板。30 mg 的牛纤维蛋白原溶解于 20 mL 缓冲液中 (用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液配制),抽气 30 min,加入 100 μL 100 U/mL 的凝血酶, 置室温形成凝胶后,即成"标准平板"。将标准平板于 85 ℃温箱中加热 60 min 后取出即成"加热平板"。滴加 20 μL 不同浓度的重组纤溶因子 rFII, 37 ℃保温 6 h, 以相同浓度的纤溶酶作为阳性对照, 观察透明圈的形成并以游标卡尺测量透明圈的直径。

2 结 果

2.1 重组蛇毒纤溶因子 rFII 的纯度、相对分子质量和等电点

rFII 在含有和不含有还原剂 DTT 的条件下 SDS-PA GE 均呈单一区带, 在还原性 SDS-PA GE 测定其相对分子质量为 28 000(图 1);经 HPLC 分析,rFII 呈单一峰,表明其纯度极高(图 2)。等电聚集电泳显示其等电点在 9.0 左右(图 3)。

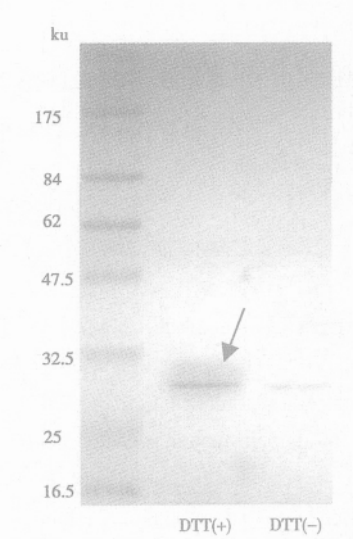


图 1 重组蛇毒纤溶因子 rFII 纯度、相对分子质量的分析

Fig.1 Analysis of relative molecular mass of rFII (SDS-PAGE)

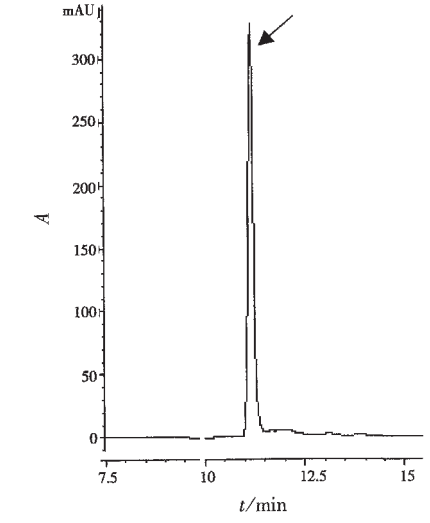


图 2 重组蛇毒纤溶因子 rFII 纯度分析

Fig.2 Analysis of the purity of rFII (HPLC)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

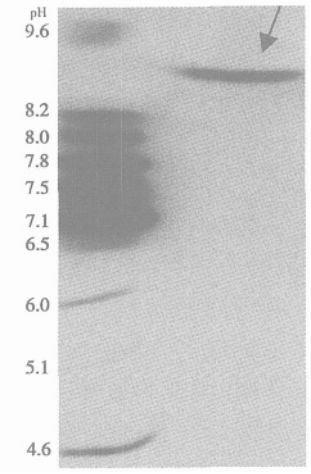


图 3　重组蛇毒纤溶因子 rFII 等电点

Fig.3　The isoelectric point of rFII (Isoelectirc focusing)

pI≈9.0

2.2　同源性鉴定

Western blot **结果显示** rFII **可以与天然的纤溶因子单克隆抗体结合，并且只有** 1 **条结合带，说明** rFII **与天然的纤溶因子高度同源并且纯度极高(图** 4)。

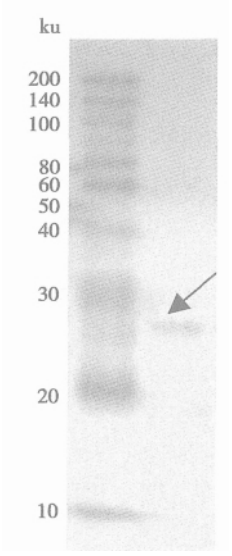


图 4　重组蛇毒纤溶因子 rFII 鉴定

Fig.4　Analysis of rFII by Western blot

2.3　重组蛇毒纤溶因子 rFII 水解人纤维蛋白原的活性

rFII **浓度固定时，**rFII **水解人纤维蛋白原的能力呈时间依赖性增高(图** 5A)，**人纤维蛋白原的** α **链在** 15 min **内被完全降解，**β **链在** 6 h **内完全降解，**γ **链在** 24 h **内几乎被完全降解。当孵育的时间固定时，**rFII **水解人纤维蛋白原的能力呈浓度依赖性增高(图** 5B)，**当** rFII **质量浓度达** 1.0 μg/mL **时，人纤维蛋白原的** γ **链在** 30 min **内几乎被完全降解。**

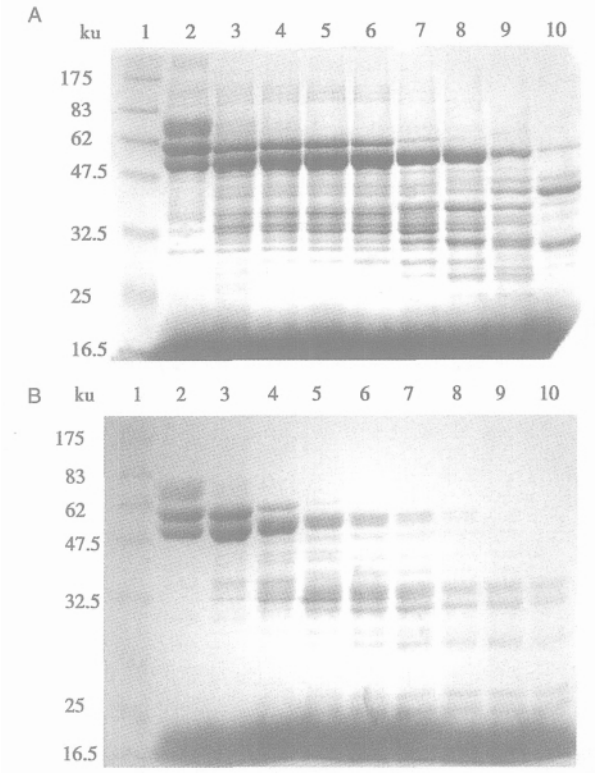


图 5　SDS-PAGE 分析重组蛇毒纤溶因子 rFII 水解人纤维蛋白原产物

Fig.5　SDS-PAGE analysis of reduced human fibrinogen after digestion with rFII

Lane 1, mixture of marker proteins MBP-beta-galactosidase 175 ku, MBP-paramyosin 83ku, glutamic dehydrogenase 62 ku, aldolase 47.5 ku, triosephosphate isomerase 32.5 ku, beta-lactoglobulin A 25 ku, lysozyme 16.5 ku, Lane 2, fibrinogen control without rFII, Lanes 3-10, fibrinogen and rFII A: Incubation with rFII (0.2 μg/mL) in different time: 0.25, 0.5, 0.75, 1, 3, 6, 12, 24 h and B: Incubation (30 min) with rFII in different dose: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 μg/mL respectively

2.4　重组蛇毒纤溶因子 rFII 水解牛纤维蛋白的活性

从图 6 **可以看到，相同蛋白浓度的情况下重组的纤溶因子** rFII **溶解纤维蛋白的能力比纤溶酶要强。当蛋白质量浓度是** 32 μg/mL **时纤溶酶产生的透明圈的直径是** 0.4 cm，**与此同时** rFII **产生的透明圈直径已经达到** 1.8 cm，**二者之间相差超过** 4 **倍。而且值得注意的是在蛋白质量浓度低于** 32 μg/mL **时，纤溶酶几乎没有溶解纤维蛋白，但** rFII **已经溶解纤维蛋白，这说明重组的蛇毒纤溶因子溶解纤维蛋白的能力高于相同浓度的纤溶酶。**

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

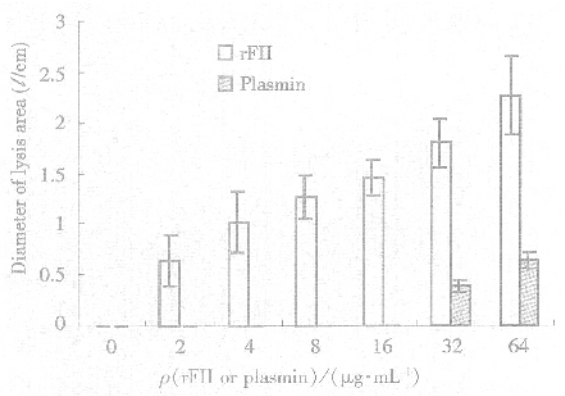


图 6 重组蛇毒纤溶因子 rFII 和纤溶酶溶解纤维蛋白活性

Fig.6 Fibrinolytic activity of rFII and plasmin

The diameter of lysis area was determined after 6 h incubation in 37℃; Plasmin was used as control; The data are given as means±S. D., n=3

3 讨 论

本研究证实了经基因重组表达的蛇毒纤溶因子 rFII 的相对分子质量、等电点和对纤维蛋白(原)水解能力的高低。结果发现重组蛇毒纤溶因子 rFII 是一个相对分子质量为 28 000、等电点 9.0 左右的碱性蛋白酶。重组蛇毒纤溶因子 rFII 可以直接降解纤维蛋白原 α、β、(亚基,并且其溶解纤维蛋白的能力比相同蛋白浓度的纤溶酶要高。

血栓类疾病,如心肌梗死、动脉血栓和脑梗死等,严重危害人类的身体健康。生理条件下,体内的凝血系统和纤溶系统处于动态平衡,一旦血栓形成,纤溶系统被启动,使血栓得以清除。自然界存在大量具有抗凝、溶栓效应的活性物质,其中有多种便存在于蛇毒中。蛇毒含有多种成分,其中两种蛋白水解酶和血凝失调有关,一种是类凝血酶,另一种是金属蛋白酶家族。纤溶酶属于金属蛋白酶家族的成员,它作用在人的纤维蛋白酶原或纤维蛋白,引起血凝块溶解。因此,蛇毒类的溶栓制剂已引起了学者的广泛注意。几乎所有的蛇毒纤溶酶均既能降解纤维蛋白原,又能降解纤维蛋白,只是其溶解活力可能不同。蛇毒纤溶酶主要作用于纤维蛋白的 α 和 β 链,大多数蛇毒纤溶酶对纤维蛋白的 γ 链无作用,根据其优先水解纤维蛋白原的不同分为 α-纤溶酶和 β-纤溶酶。钱小红等[12]首次从湖南产尖吻蝮蛇蛇毒 (*Agkistrodon acutus venom*) 中分离、提纯出一种碱性纤维蛋白溶酶(Alkaline fibrinolytic enzyme, AFE),可以直接降解纤维蛋白 α、β、γ 亚基。他的发现与本研究中的重组纤溶因子 rFII 相类似,在浓度和时间达到一定值时,rFII 可以水解纤维蛋白原的 Aα、Bβ、γ 亚基。

目前临床使用的溶栓药主要是链激酶、尿激酶、组织型纤溶酶原激活物,它们的作用机制是将内源性无活性纤溶酶原激活为纤溶酶,后者水解血栓中纤维蛋白而起到溶栓作用。这类药物的共同特点是间接作用,因此起效慢。本研究中的重组纤溶因子 rFII 在经过加热的平板上也能溶解纤维蛋白的现象说明它的溶纤作用是直接的,不依赖纤溶酶原,因此可以快速有效的溶解纤维蛋白。

利用基因工程的方法研究五步蛇蛇毒纤溶酶的基因结构是近年来热门的课题[13-16],杜晓燕等[13]首次报道皖南五步蛇蛇毒纤溶酶一种大约 600 bp 的金属蛋白酶的核苷酸序列,并在大肠杆菌中得到表达。我们利用基因工程的方法在真核细胞中表达重组的纤溶因子 rFII,解决了蛇毒来源短缺的问题,为进一步研究提供了基础。本研究结果显示重组的纤溶因子 rFII 有较强的纤溶能力,对临床上治疗血栓性疾病有较高的应用价值,但是 rFII 与血浆中的凝血因子和血小板之间的相互作用仍有待进一步的研究。

参考文献:

[1] 覃火平,郝文学. 中国腹蛇毒的临床应用[C]. 北京:光明日报出版社, 1986. 21-4.

[2] Stocker K. Thrombin-like venom proteinases [J]. Toxicon, 1982, 20(1): 265-73.

[3] Ouyang CH, Huang TF. Purification and characterization of the fibrinolytic principle of Agkistrodon acutus venom [J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 439(2):146-53.

[4] Ouyang CH, Huang TF. The properties of the purified fibrinolytic principle from Agkistrodon acutus snake venom[J]. Toxicon, 1977, 15(2):161-67.

[5] Cheng HC, Ouyang CH. Isolation of coagulant and anticoagulant from the venom of Agkistrodon acutus [J]. Toxin, 1967, 4(3):235-42.

[6] Ouyang CH, Huang TF. Platelet aggregation inhibitors from Agkistrodon acutus snake venom [J]. Toxicon, 1986, 24(11-12):1099-1106.

[7] 刘广芬.尖吻蝮蛇毒的柱层析分离及各组分生化药理特性的测定[J] 两栖爬行动物学报,1982, 1(1):69-75.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[8] 陈家树,孙家钧,梁陆光. 五步蛇毒纤溶组分Ⅱ的分离和若干药效学的特征[J]. 中国药理学通报,1993, 9(1):22-5.

[9] Xiuxia Liang, Jiashu Chen, Yingna Zhou, *et al*. Purification and biochemical characterization of F II(a), a fibrinolytic enzyme from Agkistrodon acutus venom[J]. Toxicon, 2001, 39(8):1133-9.

[10] 邱鹏新,黎明涛,苏兴文,等,尖吻蝮蛇蛇毒纤溶因子单克隆抗体的制备[J]. 中山医科大学学报,1999, 20(1):16-9.

[11] Ouyang CH,Teng CM. Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrosquamatus venom [J]. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 420(2):298-308.

[12] 钱小红, 马立人, 张庆宇. 尖吻蝮蛇毒纤维蛋白溶解活性组分的纤溶作用[J]. 中华血液学杂志,1993, 14(10):512-5.

[13] Du XY, Pan H, Jin Y, *et al*. Purification, cDNA cloning and molecular characteristic of a fibrinolytic enzyme from the venom of Agkistrodon acutus[J]. J Nat Toxins, 1998, 7(2):159-72.

[14] Liu QD, Xu WH, Cheng X, *et al*. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding hemorrhagic toxin acutolysin A from Agkistrodon acutus[J]. Toxicon, 1999, 37(11):1539-48.

[15] Gong WM , Zhu XY, Liu SJ , *et al*. Crystal structure of acutolysin A , a three-disufide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom Agkistrodon acutus[J]. J Mol Biol, 1998, 283(3):657-8.

[16] 范春阳, 钱友存, 沈　雁, 等. 五步蛇毒血小板凝集抑制因子 cDNA 的克隆及表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999, 31(5):531-6.

(编辑　黄小延)

(上接第 244 页　from page 244)

参考文献:

[1] Agarwal DP.Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes[J]. Pathol Biol, 2001, 49(9): 703-9.

[2] Helander A,Tottmar O. Effects of disulfiram, cyanamide and 1-aminocyclopropanol on the aldehyde dehydrogenase activity in human erythrocytes and leukocytes[J]. Pharmacol Toxicol, 1988, 63(4): 262-5.

[3] Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, *et al*. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping [J]. Pharmacogenetics, 1999, 9(4): 421-34.

[4] Yokoyama A, Maramatau T, Ohmori T, *et al*. Multiple primary esophaged and concurrent upper aerodigestive tract cancer and the alcoholics[J]. Cancer, 1996, 77(10): 1986-90.

[5] Chrostek L, Jelski W, Szmitkowski M, *et al*. Alcohol dehydrogenase (ADH) Isoenzymes and aldehyde dehydrogense(ALDH) activity in the human pancreas[J]. Dig Dis Sci, 2003, 48(7): 1230-3.

[6] Tott mar O. Assay of brain aldehyde dehydrogenase activity using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. Anal Biochem, 1986, 158(1): 6-11.

[7] Cheung C, Davies NG, Hoog JO. Species variations in cutaneous alcohol dehydrogenases and aldehyde dehydrogenases may impact on toxicological assessments of alcohols and aldehydes[J] Toxicology, 2003, 184(2-3): 97-112.

[8] Maruyama K, Takahashi H, Matsushita S, *et al*. Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in relation to alcoholic chronic pancreatitis in Japan[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1999, 23(4 Suppl): 85S-91S.

(编辑　张敏瑞)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net