

蚯蚓纤溶酶底物特异性

武金霞 赵晓瑜

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘要: 蚯蚓纤溶酶是具有较强溶栓作用的丝氨酸蛋白酶,为研究蚯蚓纤溶酶在溶栓的同时是否对其他血液蛋白有破坏作用,本实验以一些血液功能蛋白为底物,用蚯蚓纤溶酶在体外对其进行水解,采用 SDS-PAGE 检测水解前后底物成分的变化。结果显示,蚯蚓纤溶酶短时间内能完全水解纤维蛋白和纤维蛋白原,长时间作用下能部分水解牛血清白蛋白和人免疫球蛋白重链,不水解牛血红蛋白、牛血超氧化物歧化酶和牛凝血酶原。表明蚯蚓纤溶酶对血栓成分具有较强的识别和水解能力,而对其他血液蛋白作用微弱,说明蚯蚓纤溶酶作为药物使用时具有较强的溶栓和预防血栓形成的作用,且副作用较小。

关键词: 蚯蚓纤溶酶;溶栓作用;底物特异性;水解;功能蛋白

中图分类号:Q556+.3 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)04-22-07

Substrate Specificity of the Fibrinolytic Enzymes from Earthworm

WU Jin-Xia ZHAO Xiao-Yu

(College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract: It was well known that Earthworm Fibrinolytic Enzymes (EFE) were alkaline proteases with potent thrombolytic activity. To elucidate EFE's hydrolysis of other functional proteins in blood, we hydrolyzed fibrinogen, bovine serum albumen, immunoglobulin, superoxide dismutase, bovine hemoglobin and bovine thrombinogen *in vitro* by EFE, respectively, and the changes of the substrates were detected by SDS-PAGE. It was found that EFE completely hydrolyzed fibrin and fibrinogen, forming soluble fragments within two hours, however, and it partially hydrolyzed bovine serum albumen and the heavy chain of immunoglobulin if the reaction time was prolonged, while it basically did not hydrolyze superoxide dismutase, bovine hemoglobin and bovine thrombinogen. The results show that EFE has more cleavage specificity and ability for the components of thrombus than for other blood proteins, and it has little side-effect when used as preventive and therapeutic medicine.

Key words: Earthworm fibrinolytic enzyme; Thrombolytic ability; Substrate specificity; Hydrolysis; Functional proteins

血栓病是严重危害人类健康的常见多发病,死亡率高、致残率高。当体内的凝血系统和纤溶系统处于不正常的比例状态时,体内的活性纤溶酶量不足,难以分解形成的纤维蛋白(血栓的主要成分),就导致脑血栓、急性心肌梗死等心脑血管疾病^[1],此外血栓形成还与许多疾病如肾小球肾炎、糖尿病等的发病机制有关^[2]。因此,研究抑制血栓形成、溶解血栓的药物具有重要的意义。

蚯蚓俗称地龙,具清热、通络、平喘、利尿、

化痰等功效,作为药用的历史已有几千年。1983年,日本学者 Mihara 等首次从蚯蚓中提取了蚯蚓纤溶酶(earthworm fibrinolytic enzymes, EFEs)^[3],作为预防和治疗血栓疾病的酶类,较高的活力和较严格的底物特异性是我们所希望

基金项目 河北省自然科学基金(No. C2005000118)河北省生物工程重点学科资助;

第一作者介绍 武金霞,女,博士研究生,副教授,研究方向:生化药物的纯化及药理学;E-mail: wujinxia@eyou.com

收稿日期 2004-10-24,修回日期 2005-04-30

的,即具有较强的水解血栓的能力,同时又尽可能少地水解其他蛋白质。有文献报道,EFEs 既具有直接溶解纤维蛋白的纤溶酶活性,又具有类尿激酶的纤溶酶原激活活性,动物实验结果显示无明显毒副作用,无热原反应^[4,5]。为考查 EFEs 药物的安全性,作者以纤维蛋白原及血液中其他功能蛋白质为底物,比较研究了 EFEs (来自 *Eisenia foetida*) 对他们的水解作用,以说明 EFEs 对水解底物的选择性,解释了 EFEs 作为药物使用安全性的生物化学基础。

1 材料与方 法

1.1 材料及试剂 新鲜赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*) 采自河北大学蚯蚓养殖厂;人免疫球蛋白,华兰生物工程公司;牛血清白蛋白,中国医药公司;考马斯亮蓝 R-250、凝血酶、纤维蛋白原, Sigma 公司;牛血超氧化物歧化酶及牛血红蛋白,本研究室制备;低相对分子质量标准蛋白,包括:兔磷酸化酶 B(94 400 u)、牛血清白蛋白(66 200 u)、兔肌动蛋白(43 000 u)、牛碳酸酐酶(31 000 u)、胰蛋白酶抑制剂(20 100 u)、鸡蛋清溶菌酶(14 400 u),中国科学院上海生物化学研究所。

1.2 仪器 1 000/5 000 power supply 电泳仪电源, Bio-Rad 公司;24D 电泳槽,北京六一仪器厂。

1.3 方 法

1.3.1 蚯蚓纤溶酶的分离纯化 参考文献[6],首先提取纯化大豆胰蛋白酶抑制剂,作为亲和材料的配基;琼脂糖-4B 在碱性条件下与双功能试剂 2-硫酸酯己砷基苯氨(SESA) 在 50℃ 反应 45 min,得对氨基苯磺酰己基(ABSE) 琼脂糖,然后在酸性条件下重氮化,将重氮化琼脂糖与配基交联,制成亲和层析载体。新鲜赤子爱胜蚓在清水中养殖 1 d,使其吐净消化道内的污物,以 1:10 的比例加入 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2),匀浆 4℃, 8 000 r/min,离心 30 min,上清液经上亲和层析柱吸附,待流出液的酶活力与上柱液一致时,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)平衡液洗去未吸附杂蛋白,再

用以平衡液配制的 6 mol/L 尿素溶液洗脱 EFEs,对水透析除去尿素、冻干。

1.3.2 纤溶酶活性测定 参考文献[7],采用纤维蛋白平板法测定纤溶酶活性。将平板(7 cm×9 cm)放在水平仪上调水平,用 1 倍 pH 7.2 PBS 溶液配制 1% 的琼脂糖,取 5 ml 于 65℃ 恒温,另取等体积缓冲液 5 ml,在 25℃ 恒温箱中保温,加入纤维蛋白原和 10 U 凝血酶,使其终浓度为 3 mg/ml,两种溶液迅速混匀,趁热倒入平板中,将气泡赶至边缘,室温下凝固。用直径 3 mm 的打孔器打孔,以尿激酶为标准品,将 20、40、60、80、100 IU/ml 的尿激酶标准品与样品液在相同条件下点在孔内,37℃ 保温 3 h,观察乳白色平板上的透明圈,测定溶圈面积,以溶圈面积对尿激酶活力单位数在双对数坐标纸上作标准曲线,根据标准曲线计算样品酶活力。

1.3.3 蛋白质含量测定 采用 Lowry 法^[8],以结晶牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.3.4 天然 PAGE 检测蚯蚓纤溶酶组分 参考文献[9]并加以改进,浓缩胶质量浓度为 3.6%,分离胶质量浓度为 8%,上样品浓度为 5 μg/μl,上样量为 3 μl。样品在浓缩胶中电压为 100 V,样品进入分离胶后,电压升到 150 V,待指示剂距离胶底部约 1 cm 时停止电泳,电泳时间为 1.5 h,剥胶,0.5% 考马斯亮蓝 R-250 (含 50% 甲醇和 10% 冰乙酸)染色 10 min,7.5% 乙酸(含 5% 甲醇)脱色至蛋白带清晰。

1.3.5 蚯蚓纤溶酶对不同蛋白质底物的水解 30 μl 酶液(5 μg/μl)与 500 μl 底物溶液(30 mg/ml)混合,37℃ 水浴,分别保温 5、15、30、60、90、120、150 min,取出一定量反应液,置 -20℃ 以终止反应,底物分别是纤维蛋白原、牛血清白蛋白、人免疫球蛋白、牛血红蛋白、牛血超氧化物歧化酶和牛凝血酶原。

1.3.6 SDS-PAGE 法检测蚯蚓纤溶酶对不同蛋白质底物的水解程度 参考文献[9],以未水解的蛋白质做对照,取不同水解时间的各底物样品水解液 5 μl(稀释到蛋白质含量为 3 μg/μl)与还原样品液等体积混合,沸水浴加热 3 min,上样,除凝胶和电极缓冲液中含有 0.1% SDS 外,

其余条件同 1.3.4。

2 结果

2.1 亲和层析纯化蚯蚓纤溶酶 采用以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的琼脂糖亲和层析,从蚯蚓匀浆液中分离出全部蚯蚓纤溶酶,亲和层析图谱上只出现一个洗脱峰,如图 1,纯化结果见表 1。

蚯蚓纤溶酶是一组具有类胰蛋白酶性质的蛋白水解酶,因此采用大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的琼脂糖可以将蚯蚓匀浆液中的所有纤溶酶组分吸附,而杂蛋白不被吸附,用平衡液洗出,再用 6 mol/L 尿素溶液可将吸附在柱上的蚯蚓纤溶酶组分洗脱下来。将洗脱液对水透

析,浓缩后聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果如图 2 所示。

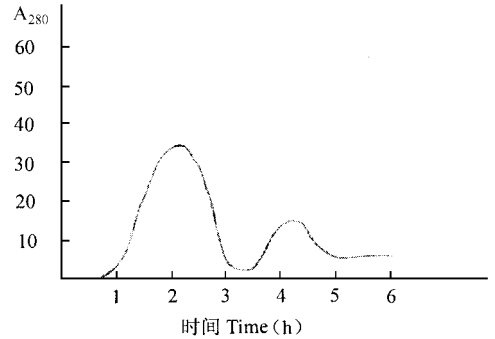


图 1 蚯蚓纤溶酶亲和层析图谱

Fig.1 Affinity chromatography diagram of EFEs

表 1 蚯蚓纤溶酶的纯化

Table 1 Purification of EFEs by affinity chromatography

步骤 Purification process	总体积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (u)	比活 Specific activity (u/mg)	纯化倍数 Purification multiple	活力回收 Activity recovery (%)
匀浆液 Homogenate	1 000	400	1 700 000	4 250	1	100
亲和层析 Affinity chromatography	200	30	760 000	25 330	5.96	44.7

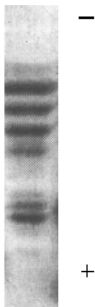


图 2 蚯蚓纤溶酶全组分的 PAGE 图谱

Fig.2 PAGE of all the EFEs components

由图 2 可知,蚯蚓纤溶酶具有多组分性,本实验条件下至少可以从匀浆液中分离到 8 个纤溶酶组分,这与文献报道一致。

2.2 纤溶酶活性测定 纤维蛋白是血栓的主要成分,人工由凝血酶催化纤维蛋白原形成的纤维蛋白板是乳白色不透明的,经亲和层析纯化的 EFES 在纤维蛋白平板上能产生清晰的透明圈,

说明 EFES 具有强烈的纤维蛋白水解活性,能彻底降解纤维蛋白,该法能检测的最小量约为 0.5 μg EFES,活力单位数相当于 6 U,如图 3。

2.3 EFES 对纤维蛋白原的水解 纤维蛋白原 (fibrinogen)由 Aα、Bβ 和 γ 3 对肽链组成,相对分子质量分别为 66 000 u、51 000 u、45 000 u。标准纤维蛋白原经 SDS-PAGE 电泳后,分为 3 个区带,从上至下分别为 α、β、γ。在水解 5 min 时,纤维蛋白原的 Aα、Bβ 和 γ 3 对肽链基本被水解成为分子量在 32 ku 以下大小不等的 9 个肽片段。随着时间的延长,这些肽片段继续被水解,可见 EFES 对纤维蛋白原的 α、β、γ 链有较强的亲和力和水解能力,能在多个切点水解纤维蛋白原的 3 条链,而且对降解产物仍有较强的识别、水解能力。见图 4。

凝血酶对纤维蛋白原的作用,是断裂 4 个 Arg-Gly 肽键,从 Aα 链释放 A 肽,从 Bβ 链释放

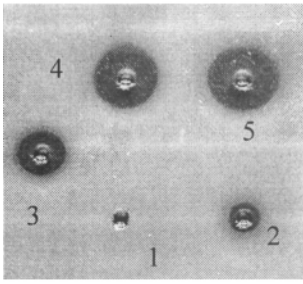


图3 EFEs的纤维蛋白水解活性

Fig.3 Fibrin hydrolytic activity of EFEs

1~5. 分别上样 5 μ l 缓冲液 0.5、2.1、3.1、4.2 μ g 纤溶酶。

1-5 0 0.5 2.1 3.1 4.2 μ g EFEs was dropped onto the wells respectively.

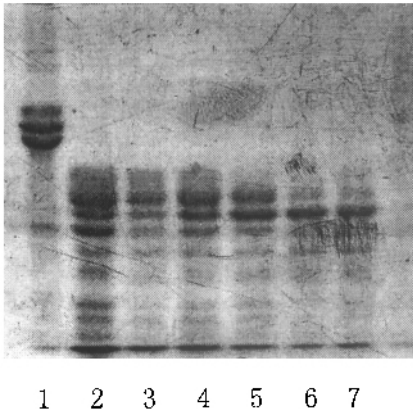


图4 SDS-PAGE 检测 EFEs 对纤维蛋白原的水解

Fig.4 SDS-PAGE of fibrinogen after being hydrolyzed by EFEs

1. 纤维蛋白原 ; 2~7. 水解 5、15、30、60、90、120 min 的纤维蛋白原。

1. fibrinogen ; 2-7. fibrinogen hydrolyzed by EFEs for 5, 15, 30, 60, 90 and 120 min respectively.

B 肽, 剩余部分为血纤维蛋白单体, 自发地聚集成有序的纤维状排列, 即纤维蛋白, 是构成血栓的主要成分。图 4 表明, EFEs 对纤维蛋白原的作用与凝血酶不同, 他能将纤维蛋白原水解为小的肽片段, 再进一步彻底降解这些小肽片段, 而不形成纤维状的不溶性纤维蛋白, 因此有预防血栓形成的作用。

2.4 EFEs 对牛血清白蛋白(BSA)的水解 血清白蛋白是血液中含量最丰富的蛋白质, 由 585 个氨基酸残基组成的单链蛋白质, 分子量约为 66 500 u。未水解的 BSA 显示 1 条带, 在

水解 5 min 时, EFEs 将 BSA 水解下一个小的片段, 水解后显示 2 条带, 但随着保温时间的延长, EFEs 没有继续对小片段水解, 见图 5 的第 2 至第 8 泳道, 推测 BSA 上只有一个 EFEs 水解位点。

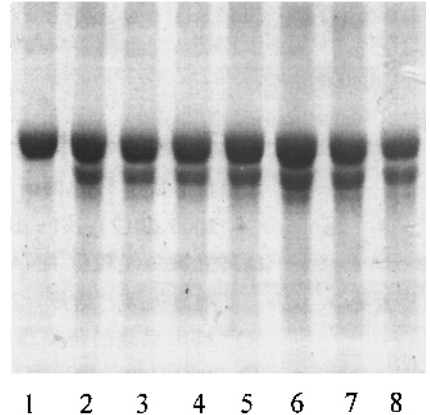


图5 SDS-PAGE 检测 EFEs 对牛血清白蛋白的水解

Fig.5 SDS-PAGE of bovine serum albumin after being hydrolyzed by EFEs

1. 牛血清白蛋白 ; 2~8. 水解 5、15、30、60、90、120、150 min 的牛血清白蛋白。

1. BSA ; 2-8. BSA hydrolyzed by EFEs for 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 min respectively.

2.5 EFEs 对免疫球蛋白 G 水解 免疫球蛋白 (immunoglobulin, Ig) 具有抗体活性, 能与相应的抗原发生特异性结合反应的球蛋白, 是脊椎动物在对抗原刺激的免疫应答中, 由淋巴细胞产生, 普遍存在于哺乳动物的血液、组织液、淋巴液和体外分泌液中的一类蛋白质。IgG 由 4 条肽链构成, 2 条重链 (53 000 u) 和 2 条轻链 (22 500 u), 在 SDS-PAGE 上显示重链、轻链 2 条主带, 见图 6。

在 1 h 之内, IgG 的重链和轻链都没有明显被水解的迹象, 1.5 h 后, 重链浓度明显变小, 而轻链变化不明显, 见图 6 的第 2 泳道, 在原来重链、轻链 2 条主带的基础上, 出现另外一些条带, 主要为重链的 EFEs 水解产物。随着水解时间的延长, 重链逐步被完全水解, 轻链被水解的速度较慢。说明 EFEs 在短时间内对 IgG 的水解作用较轻, 如果延长作用时间, EFEs 会先水

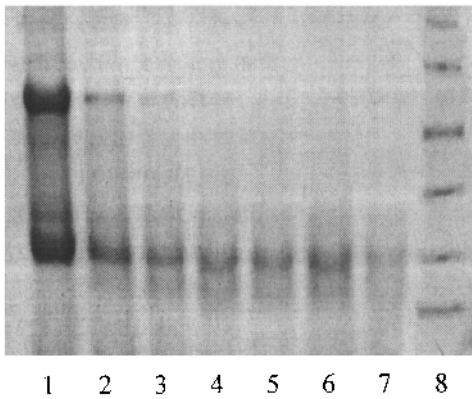


图 6 SDS-PAGE 检测 EFes 对免疫球蛋白水解
Fig.6 SDS-PAGE of immune globulin G after being hydrolyzed by EFes

1. 免疫球蛋白 G ; 2~7. 水解 1.5、5.5、23.5、33.5、48、72 h 的免疫球蛋白 G ; 8. Marker。
1. IgG ; 2-7. IgG hydrolyzed by EFes for 1.5、5.5、23.5、33.5、48、and 72 h respectively ; 8. Marker.

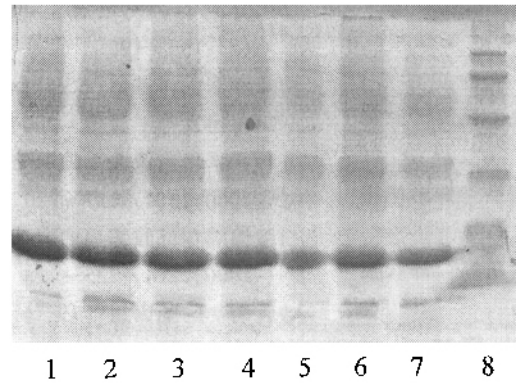


图 7 SDS-PAGE 检测 EFes 对 SOD 的水解
Fig.7 SDS-PAGE of bovine superoxide dismutase after being hydrolyzed by EFes

1. 未水解的 SOD ; 2~7. 水解 5、15、30、60、90、120 min 的 SOD ; 8. Marker。
1. SOD ; 2-7. SOD hydrolyzed by EFes for 5、15、30、60、90、and 120 min respectively ; 8. Marker.

解重链,而对轻链的水解能力较弱。说明 EFes 对 IgG 重链和轻链的识别能力不同。

2.6 EFes 对牛血超氧化物歧化酶的水解 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 由蛋白质和金属离子组成, 参与清除体内自由基, 在防御机体衰老及生物分子损伤等方面有极为重要的作用。牛血 SOD 分子由双亚基构成, 分子量为 17 ku。图 7 显示 SOD 样品有杂蛋白带, 但 SOD 主带很清晰, 水解 5~120 min, 样品的电泳谱带没有变化, SOD 主带的浓度也没有变浅, 说明 EFes 基本不水解 SOD。

2.7 EFes 对牛血红蛋白的水解 血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 是血细胞的主要成分, 血细胞的主要功能是通过血红蛋白运输氧气和二氧化碳以及维持体内酸碱平衡。Hb 是由 2 条 α 链 (141 aa 残基) 和 2 条 β 链 (146 aa 残基) 组成的四聚体。水解不同时间后, 样品的电泳谱带与未水解时的电泳谱带一致, 说明牛血红蛋白不被 EFes 水解。因此, EFes 不会对血液中的 Hb 造成损伤, 如图 8 所示。

2.8 EFes 对凝血酶原的水解 凝血酶原 (thrombinogen) 是分子量约为 66 ku 的糖蛋白, 是凝血酶的前体, 在激酶催化下断裂 N-端肽

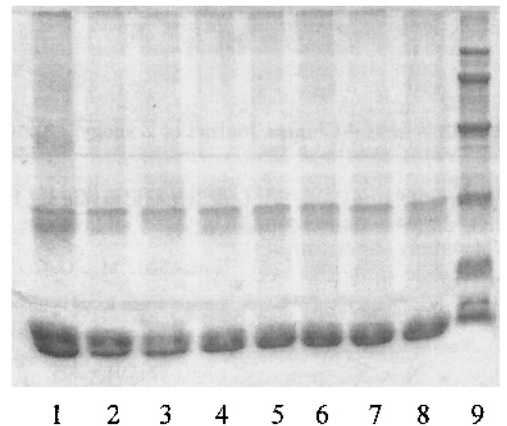


图 8 SDS-PAGE 检测 EFes 对牛血红蛋白水解
Fig.8 SDS-PAGE of bovine hemoglobin after being hydrolyzed by EFes

1. 牛血红蛋白 ; 2~8. 水解 5、15、30、60、90、120、150 min 的 Hb ; 9. Marker。
1. bovine hemoglobin ; 2-8. bovine hemoglobin hydrolyzed by EFes for 5、15、30、60、90、120、and 150 min respectively ; 9. Marker.

段, 形成有活性的凝血酶, 催化纤维蛋白原形成纤维蛋白。凝血酶原样品不纯, 但分子量为 66 ku 的主带很明显, EFes 作用不同时间后, 凝血酶原主带的位置与深度没有发生变化, 说明 EFes 基本不水解凝血酶原, 见图 9。

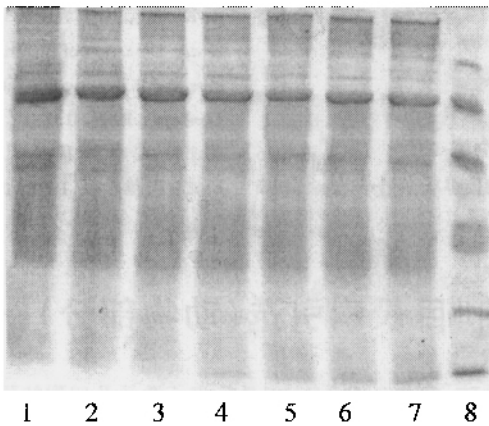


图9 SDS-PAGE 检测 EFEs 对牛凝血酶原的水解

Fig.9 SDS-PAGE of thrombinogen after being hydrolyzed by EFEs

1.牛凝血酶原;2~7.水解5、15、30、60、90、120 min 的凝血酶原;8. Marker。

1. bovine thrombinogen; 2-7. bovine thrombinogen hydrolyzed by EFEs for 5, 15, 30, 60, 90, and 120 min respectively; 8. Marker.

3 讨论

研究利用本实验室自制的大豆胰蛋白酶抑制剂作配基,亲和层析制备的 EFEs,对血液系统中纤维蛋白、纤维蛋白原、血清白蛋白、免疫球蛋白、超氧化物歧化酶、血红蛋白及凝血酶原的水解情况,发现 EFEs 对上述蛋白的识别、亲和及水解能力不同。EFEs 的最适作用底物是纤维蛋白,0.5 μg EFEs 就能在纤维蛋白平板上产生明显的透明圈,即能将不溶性的纤维蛋白水解为可溶性小片段;EFEs 对纤维蛋白原也有很强的水解能力,但 EFEs 对纤维蛋白原的水解不同于凝血酶, EFEs 能将纤维蛋白原水解成小肽段,并将小肽段继续水解成更小片段,而不使之转化为不溶性纤维蛋白;另外,在较长时间的作用下, EFEs 能水解免疫球蛋白的重链,并部分水解其轻链,但在较短时间内水解作用较弱,轻链较重链抗水解能力强;EFEs 对牛血清白蛋白只有一个切点;EFEs 对超氧化物歧化酶、血红蛋白及凝血酶原原则上基本不能水解。

EFEs 对免疫球蛋白和血清白蛋白有部分水解作用,这是 EFEs 作为药物使用所不希望的

性质,但相对于纤维蛋白和纤维蛋白原来说,对这些蛋白的水解作用较轻,即副作用较小。本实验所用 EFEs 是亲和层析制备的全组分,这些组分的生化性质有明显不同^[6],其底物特异性也可能存在差异,对免疫球蛋白和血清白蛋白的部分水解作用,很有可能是某个组分作用的结果,这需要将所有组分纯化,分别做底物特异性研究才能确定。同时, EFEs 不会对超氧化物歧化酶、血红蛋白及凝血酶原造成任何损伤。此结论与 EFEs 临床应用研究的结论相符^[10]。

EFEs 属于丝氨酸蛋白酶家族,对作用底物的选择性不是绝对专一,有人研究了其中一种蚯蚓纤溶酶的空间结构^[11],发现底物结合部位的特异性口袋被其分子中 Val₂₁₇ 之后的特定插入序列(S-S-G-L)所拉长,表现为底物特异性降低,即 EFEs 的底物特异性是由其本身的空间构象所决定的。EFEs 具有多组分性,许多作者也提取纯化了不同组分,他们的生化性质和酶学性质既相似又有差异^[12]。EFEs 具有来源广泛、溶栓效率高的优点,在已临床应用的溶栓药物中,副作用较小,如果采用定点突变的手段改造那些对底物选择性差的组分,使其底物结合部位的构象向提高底物结合的专一性方向发生改变,或将 EFEs 全组分中少数底物特异性差的组分分离除去,将对 EFEs 研制成为价廉、高效和专一性强的溶栓药物将会有很大帮助。

参 考 文 献

- [1] Reddy D S. Newer thrombolytic drugs for acute myocardial infarction. *Indian J Exp Biol*, 1998, **36**: 1~15.
- [2] 姜东胜, 张国祺, 王宝珍等. 赤子爱胜蚓纤溶酶的药理性质探讨. *上海医科大学学报*, 1993, **20**(1): 16~20.
- [3] Mihara H, Sumi H, Akazawa T, et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *Thromb Haemostas*, 1983, **50**: 258~263.
- [4] 王光明, 欧阳卓志, 李革等. 蚓激酶主要药效的实验研究. *现代应用药学*, 1990, **7**(5): 1~3.
- [5] 赵炜明, 许超千, 何树庄等. 蚓激酶溶栓作用的实验研究. *哈尔滨医科大学学报*, 2002, **36**(3): 183~185.
- [6] 赵晓瑜, 静天玉. 蚯蚓纤溶酶的成分分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14**(4): 407~411.
- [7] 武金霞, 赵晓瑜. 纤维蛋白平板法检测蚯蚓纤溶酶活

- 性.自然杂志 2004 (3):184 ~ 185.
- [8] Lowry O H ,Rosebrough H J ,Farr A L. Protein measurement with the Folinpheno lreagent. *J Biol* ,1951 ,193 ~ 265.
- [9] 李建武 ,萧能庚 ,余瑞元等.生物化学实验原理和方法.北京 北京大学出版社 ,1994 ,189 ~ 195 216 ~ 223.
- [10] 郭怀芳 ,何执中 ,张莉.蚓激酶的临床应用进展.药物生物技术 2001 (1) 57 ~ 60.
- [11] Tang Y ,Liang D ,Jiang T ,*et al* . Crystal structure of earthworm fibrinolytic enzyme component a : revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity. *J Mol Biol* , 2002 **321**(1) 57 ~ 68.
- [12] Nkajima N , Sujimoto M , Ishihara K , *et al* . Further characterization of earthworm serine protease : cleavage specificity against peptide substrates and on autolysis. *Bioscience ,Biotechnology and Biochemistry* ,1999 ,**63**(11) : 2 031 ~ 2 033 .