

蛭类动物唾液腺中一种新的抗凝剂

谭 恩 光

(中山医科大学生物教研室)

众所周知，当蚂蟥在人畜身体上叮咬吸血时，蚂蟥唾液腺分泌一种抗凝物质注入宿主动物伤口，阻止伤口血液凝固，以便不断吸血，同时该物质混合到吞下的血，阻止吸入蚂蟥消化道里的血液凝固。这种抗凝物质称为蛭素。1955年由马尔克沃德特 (Markwardt, P.)及其同事首先分离提纯了蛭素，并鉴定为一种氨基酸多肽。蛭素是使凝血酶失活而抑制血液凝

固，蛭素是由医蛭 (*Hirudo medicinalis*) 唾液腺中抽提出来的。最近，由布德辛斯琼 (Budzynski, A. Z.) 等从 *Haementeria ghilianii* 蚂蟥唾液腺中抽提出另一种新的抗凝物质，称为“Hementin”。*H. ghilianii* 属于吻蛭类，因此，笔者建议“Hementin”称为“吻蛭素”，以便区别于从水蛭中抽提出来的蛭素。*H. ghilianii* 是世界上已知最大的蚂蟥，已有报道此蚂蟥长

达 50 厘米以上。它原产于巴西和法属圭亚那。

H. ghilianii 的唾液腺位于吻的基部,被一薄膜包围住。其唾液腺分前唾液腺和后唾液腺两对。前唾液腺较大,长 20 毫米,明显地由许多直径为 0.7 毫米的大细胞组成。后唾液腺较小,只有 5 毫米长,由许多直径为 0.01 毫米的小细胞组成。

一、唾液腺抽提物的制备及其成份

(一) 唾液腺抽提物的制备

1. 前、后唾液腺的分离

采用连续人工室内饲养几代的 *H. ghilianii*。为了增加唾液腺抽提物的浓度,先把这些蚂蟥饥饿数月,然后开始解剖分离唾液腺。用乙醚麻醉蚂蟥,在蚂蟥背中线纵切开其皮肤肌肉,小心地把唾液腺周围的组织分离开,分别取出前、后唾液腺,冰冻并贮存于 -80°C 。

2. 唾液腺抽提物的制备

把从 10 条蚂蟥所分离的前、后唾液腺分别放入 1.5mol/L , $\text{pH } 7.5$ 的 0.8 毫升或 0.3 毫升的 Tris-HCl 缓冲液,用组织研磨机研成组织匀浆,在 11000 转/分的离心机中离心 10 分钟,收集上清液。用同样缓冲液抽提二次以上。将所取得的上清液混合在一起,贮存于 -80°C ,直至 6 个月无任何变质迹象者为佳。

3. 抽提物蛋白质含量的测定

用三种方法测定抽提物蛋白质浓度,即双缩脲试剂微量法,分光光度测定法和差光谱测定法。上述三种方法测定 60 条蚂蟥前、后唾液腺抽提物的蛋白质量表明,每条蚂蟥前对和后对唾液腺抽提得到蛋白质分别大约为 1.5 毫克和 0.3 毫克。

(二) 唾液腺抽提物化学成份

为了测定前唾液腺和后唾液腺抽提物化学成份是否相同,对前、后唾液腺抽提物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,结果表明,在还原条件和非还原条件下,前、后唾液腺抽提物的蛋白质的化学成份是完全不同的。蛋白质大部分含有二硫键,前唾液腺抽提物显著蛋白质分子量为 37000,在后唾液腺抽提物中有二个主要种类蛋

白质,其分子量分别为 13500 和 83000,似乎也有二硫键。

用醋酸纤维素电泳分析抽提物,也发现前、后唾液腺抽提物蛋白质完全不同,前唾液腺抽提物含有一种阴极移动性显著蛋白质,后唾液腺抽提物含有二个主要带,一个具有阴极移动性,另一个具有阳极移动性。

二、抗凝活性作用机理

唾液腺抽提物抗凝作用。首先观察到,人血浆、猪血浆的凝血酶的凝固时间,和人血纤维蛋白原的凝固时间,都由于前、后唾液腺抽提物的存在而延长(如图 1)。

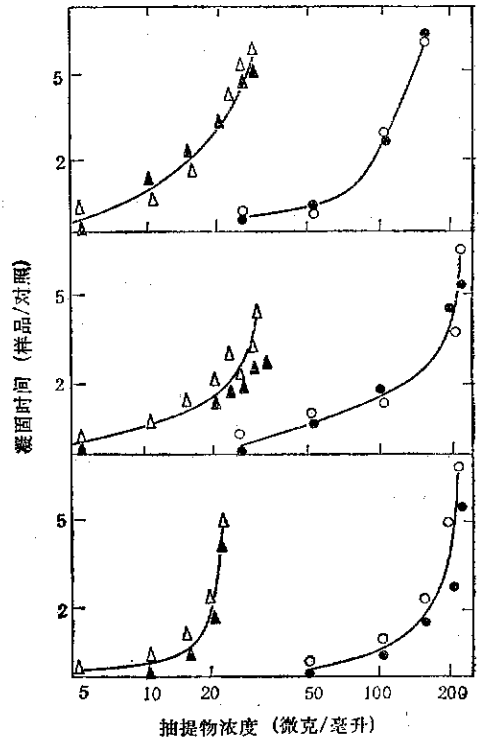


图 1 前(○)后(△)唾液腺抽提物对人血浆(上)、人纤维蛋白原(中)和猪血浆(下)的抗凝作用。凝血酶的凝固时间是在钙离子缺乏(△、○)和 5mmol/L CaCl_2 存在(▲、●)下测定(来自 Budzynski, A. Z.)

从图 1 中看出,后唾液腺抗凝活性比前唾液腺抗凝活性高。当抽提物浓度渐渐变高时,它们变为不能凝固。为了估计钙离子对抗凝活性的影响,在类似上述试验中加入 5mmol/L 氯化钙,结果表明,钙离子对二种唾液腺抽提物

抗凝特性没有任何影响。线性回归分析表明,在钙离子存在或不存在的凝固时间之间没有显著差异($p < 0.1$)。

蛭素的抗凝作用是使凝血酶失活而抑制血液凝固。吻蛭素是否也有类似的作用呢?许多试验材料表明,抗凝活性不是由于抽提物使凝血酶失活,人的 α -凝血酶与抽提物一起在 37°C 温育10分钟,没有引起任何另外的凝血时间的延长。腺体抽提物没有抗凝血酶能力。 α -凝血酶分别与定量的前唾液腺和后唾液腺抽提物温育之后,凝血酶酰胺活性保持不变。

多方面的试验证明吻蛭素对血纤维蛋白有溶解活性。

首先,由于凝血酶对人或猪的球蛋白的作用而形成纤维蛋白的凝块。这些凝块在氯化钙 5 mmol/L 离子存在下在 37°C 温育。当没有腺体抽提物时这些凝块自然地不溶解。加入抽提物时,凝块溶解。当凝块蛋白质浓度为 2.5 毫克/毫升,加入前唾液腺抽提物浓度为 1 毫克/毫升,自加入抽提物至凝块完全溶解的确切时间,人和猪的分别是 51 和 47 分钟,表明人和猪纤维蛋白被前唾液腺溶解的易感性相似。当用浓度为 0.2 毫克/毫升的后唾液腺抽提物时,发现有类似的纤维蛋白溶解活性。在相同条件下,纤维蛋白溶酶需用 60 分钟和 1000 分钟时间水解人和猪血的凝块。

其次,使用纤维蛋白带方法已证实前、后唾液腺抽提物有溶解血纤维蛋白的活性。一个 1 微升抽提物样本用到温育纤维蛋白带,溶解的纤维蛋白的一个环形区扩展开来。溶解区域(或其直径范围面积)和溶解纤维蛋白的活性,根据如下关系,随唾液腺抽提物浓度增加而增加:

$$\log \cdot D = k \cdot \log a \cdot C$$

D 是溶解区的直径, C 是抽提物的浓度, k 和 a 是常数。

上述说明唾液腺抽提物对血纤维蛋白有溶解作用,这种溶解作用的实质是什么呢?是否抽提物里含有血纤维蛋白溶酶原激活剂呢?为了检测抽提物中是否人的血纤维蛋白溶酶原

激活剂存在,将纤维蛋白带放入丰富的纤维蛋白溶酶原或缺乏纤维蛋白溶酶原的底质中,再都分别加进前、后唾液腺抽提物,结果抽提物对纤维蛋白溶酶原丰富带和纤维蛋白溶酶原缺乏带,以同样的速度进行水解,表明不论前唾液腺或后唾液腺均不含血纤维蛋白溶酶原激活剂。

人的血纤维蛋白溶酶原与链激酶温育是有活性和较大的酰胺活性。然而,同量的血纤维蛋白溶酶原制剂与前或后唾液腺抽提物温育,只能测出小部份活性和较小的酰胺活性。这些结果支持这样的结论,前、后唾液腺抽提物也不转化人血纤维蛋白溶酶原成为一种有活性的酶。

那么,吻蛭素抗凝作用机理到底是什么呢?唾液腺抽提物对血浆和血纤维蛋白溶酶原的抗凝作用,是否可以解释为吻蛭素的活性直接转化血纤维蛋白溶酶原为不溶的衍生物呢?为了考察这种可能性,他们作了如下试验:用已提纯的人血纤维蛋白溶酶原分别与前、后唾液腺抽提物以不同时间消化。消化产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳在还原和非还原条件下特化。为了使加到反应混合物中血纤维蛋白溶酶原在 37°C 温育24小时后完全降解,必须选择消化条件。结果表明,如果后唾液腺抽提物浓度是前唾液腺抽提物浓度 $1/5$,则前、后唾液腺具有相同的消化模式。唾液腺抽提物使血纤维蛋白溶酶原降解,形成类似于已很好特化的血浆素(血纤维蛋白溶酶)的衍生物是没有根据的。血浆素使血纤维蛋白原降解的衍生物为: X 碎片分子量为 250000 , Y 碎片分子量为 150000 , D 碎片分子量为 103000 和 E 碎片分子量为 45000 。唾液腺抽提物所形成的血纤维蛋白溶酶原衍生物几个类群分子量在 $130000-300000$,其中一种显著分子量为 250000 。长时间消化后存在的最终产物分子量为 680000 。血纤维蛋白溶酶原中 A_n 多肽首先被吻蛭素显著裂解,跟着 γ 链被裂解。在消化过程中被观察到的主要多肽碎片的分子量为 61000 、 48000 、 40000 和 18000 等。

吻蛭素的抗凝作用来源于血纤维蛋白溶酶

原的降解,为了提供直接支持证据,用 ^{125}I 标记人血纤维蛋白溶酶原补充到人的血浆里去,与抽提物一起,用不同时间温育,然后测定凝固时间,用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析放射性部分。结果表明,血纤维蛋白溶酶原降解与凝血时间延长有关,消化 3 分钟引起凝固时间增加 8.6 倍,消化 8 分钟后血浆变成不能被凝血酶凝固。标记的血纤维蛋白溶酶原的裂解产生几个中间区带,放射性降解产物的电泳模式非常类似于人的未标记的血纤维蛋白溶酶原消化的电泳模式,说明唾液腺抽提物确实使血纤维蛋白溶酶原降解。当前,后唾液腺抽提物浓度为 4.2 毫克/毫升和 0.045 毫克/毫升时,发现前、后唾液腺抽提物有相同的电泳模式和血纤维蛋白溶酶原有相同的降解顺序。

吻蛭素也能使血纤维蛋白降解,为了比较吻蛭素对血纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白的亲合力,进行了二组试验,一组是检定血浆中血纤维蛋白溶酶原的降解,二组加入凝血酶之后测定血浆凝块的溶解,通过测定计算,结果表明,吻蛭素对纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白有同样的亲合力。

三、意 义

吻蛭素是一种到目前为止还未描述过的一种酶。吻蛭素和蛭素不同。蛭素的作用是使凝血酶失活而抑制血液凝固,吻蛭素的作用是直接对血纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白的溶解作用,这是二种不同的抗凝作用机制。这种抗凝机理上的差异可能与两种抗凝剂来源于不同蚂蟥类群和与两种蚂蟥取食方式有关,说明两种蚂蟥早期进化上的趋异。蛭素是从颚蛭目 (Ganthobdellid) 的医蛭 (*Hirudo medicinalis*) 唾液腺中抽提出来的。吻蛭素是从吻蛭目 (Rhynchobdellid) 的 *H. ghilsonianii* 唾液腺中抽提出来的。从蛭纲的进化系统来说,蛭类动物最原始的是棘蛭目 (Acanthobdellid),由它分出有吻与无吻两支:一支为吻蛭目,另一支又分为颚蛭目和咽蛭目。因此,吻蛭目与颚蛭目在系统进化早期已开始向不同方向发展。吻蛭

类较原始,有肌内质的吻,吻是从口吸盘长出的一个可以伸长的装置,通过吻吮吸宿主动物的血。适应于吸取热带沼泽地区偶蹄动物、鱼类、两栖爬行动物的血。颚蛭类较高级,在口腔内有颚片,颚片上有锐齿。当蚂蟥吸住宿主动物皮肤时,由于颚片来回移动,其上的锐齿把皮肤磨破,通过吸盘,咽部肌肉不断收缩,把宿主伤口的血抽入口腔内。因此,它是以颚的装置、吸盘、咽部肌肉配合共同完成吸血的。颚蛭目分为水蛭科和山蛭科。前者适应于广泛的淡水领域(池塘、湖泊、水库等)中吸食人畜、鱼类、水鸟和两栖爬行动物的血。后者适应于广大热带、亚热带丛林里吸食人畜,各种野生动物的血。

吻蛭素对血纤维蛋白溶酶原和血纤维蛋白有直接水解作用。没有发现唾液腺抽提物含有凝血酶失活剂和入血纤维蛋白溶酶原激活剂。试验也表明 Ca^{++} 不是吻蛭素抗凝作用驱动器。由于吻蛭素在人和猪的血浆和人的纯血纤维蛋白溶酶原中有抗凝作用,这个发现具有一定的价值。首先,像蛭素一样,它可作为研究血液凝固机制的一种工具。其次,吻蛭素对存在于血浆中的蛋白质水解酶抑制剂不敏感,这是已知的独一无二的血纤维蛋白水解酶。它在溶解凝血酶制剂方面具有理想的特性,在临床上用于溶解血凝块,治疗由血凝块引起的一些疾病如血栓等具有潜在的价值。

H. ghilsonianii 是已知最大的蛭类,每条蚂蟥的前、后唾液腺能抽提到蛋白质 1.5 和 0.3 毫克。与其它较小的蛭类比较,能提供较多的抗凝剂来源。如医蛭,1000 条医蛭的头才能抽提出干蛭素 20 毫克。它比医蛭含的抗凝物质高 90 倍。

参 考 文 献

- [1] 宋大祥 1983 年蛭纲的系统演化 进化论选集 138. 科学出版社。
- [2] Budzynski, A. Z., et al. 1981 Composition of salivary gland extracts from the leech *Haementeria ghilsonianii*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 168. 259.
- [3] Budzynski, A. Z., et al. 1981 Anticoagulant and fibrinolytic properties of salivary protein from the leech *haementeria ghilsonianii*. *Proc. Soc. Exp. Biol.*

Med. 168. 266.

[4] Mann, K. H., 1961 Leech (Hirudinea). their structure, Physiology, Ecology and Embryology. Perga-

mon press. p. 36. Oxford.

[5] Markwardt, F., 1970 Hirudin as an inhibitor of thrombin. *Methods in enzymology*. Vol. 19. 924.