基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1639-03

短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白的酶学性质研究

黎渊弘[1],罗艳萍[2],廖共山[2]
(1. 广西医科大学第一附属医院药剂科,南宁 530021;2. 广西医科大学蛇毒研究所,南宁 530021)

【摘 要】目的:研究短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白(Phospholipid-binding anticoagulation protein,PBAP)的酶学性质。方法:通过对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸脂酶活性的测定,研究丝氨酸蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF)、胰蛋白酶、抑肽酶、二价金属离子(Ca^{2+}、Mg^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+})、温度、pH、金属络合剂乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)对 PBAP 的影响。结果:丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、胰蛋白酶对 PBAP 精氨酸酯酶有抑制作用,抑肽酶、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、二胺四乙酸对 PBAP 精氨酸酯酶活性无明显影响,温度在 20℃~90℃,pH 在 4.0~11.0 的条件下,PBAP 的精氨酸酯酶性质稳定。结论:丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、胰蛋白酶对 PBAP 精氨酸酯酶有抑制作用,温度在 20℃~90℃,pH 在 4.0~11.0 的条件下,PBAP 的精氨酸酯酶性质稳定。

【关键词】抗凝蛋白;精氨酸酯酶;酶学性质
【中国图书分类法分类号】R927.2;R986 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-15

Enzymatic characteristion of phospholipid-binding anticoagulation protein from Agkistrodon halys brevicaudus venom

LI Yuan-hong, et al
(*Department of Pharmacy, the First Hospital, Guangxi Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the enzymatic characteristics of phospholipid-binding anticoagulation protein (PBAP) from agkistrodon halys brevicaudus venom. *Methods*: The enzymatic characteristics of purified PBAP were studied by the effects of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), trypsin, aprotinin, bivalent metallic ion (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}), temperature, pH and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on PBAP. *Results*: PMSF and trypsin could inhibit the AEHE activity of PBAP. Aprotinin, bivalent metallic ion (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) and EDTA had no effect on the AEHE activity of PBAP. The AEHE activity of PBAP was stable within 20℃~90℃ and pH4.0~11.0. *Conclusion*: PMSF and trypsin could inhibit the AEHE activity of PBAP. The AEHE activity of PBAP was stable within 20℃~90℃ and pH4.0~11.0.

【Key words】Anticoagulation; Arginine ester hydrolysing enzyme; Enzymatic characterization

蛇毒主要成分是蛋白质,包括各种毒素、非毒性蛋白、酶以及活性多肽。如 L-氨基酸氧化酶、磷脂酶 A2、核苷酸酶、类凝血酶、纤溶酶等。黎渊弘等从短尾蝮蛇毒中分离出磷脂结合抗凝蛋白(Phospholipid-binding anticoagulation protein,PBAP)[1],并对其动物体内外的抗凝[2]、抗栓作用[3]、对血液流变学的影响[4]、作用机制[5]以及基因克隆[6]进行了研究。

本实验对纯化的短尾蝮蛇毒 PBAP 的酶学性质进行研究,旨在为该新型抗血栓制剂提供实验依据。

1 材 料

1.1 主要材料

短尾蝮蛇毒 PBAP,广西医科大学蛇毒研究所提供。

作者介绍:黎渊弘(1977-),男,副主任药师,博士,研究方向:临床药学。
通讯作者:廖共山,男,副研究员,E-mail:Lgslcc@163.com。

基金项目:广西研究生教育创新计划项目资助(编号:2006105981007D1)。

1.2 试剂

苯甲基磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF),胰蛋白酶(1:250),美国 Amresco 公司产品;抑肽酶,Roche 公司产品;苯甲酰-L-精氨酸(Benzoyl-L-arginine ethylester,BAEE),乙二胺四乙酸(Ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA);氯化钙,氯化镁,氯化钴,氯化锰等均为国产分析纯产品。

1.3 仪器

pH 计(DELTA 320),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;电子天平,余姚市金诺天平仪器有限公司;电子分析天平,美国 Ohaus Corp 公司;振荡器,常州国华仪器有限公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 短尾蝮蛇毒 PBAP 的酶活性的测定[1]

精氨酸酯酶活性的测定采用合成底物 BAEE 法。称取 BAEE 2.8 mg,用 40 ml 0.05 mol/L Tris-HCl,pH7.8 的缓冲液

溶解(称 BAEE 底物溶液)。取 1 支试管加入 BAEE 底物溶液 2.9 ml,加入上述的溶解缓冲液 0.1 ml 混匀作为空白调零;另取试管加入 BAEE 底物溶液 2.9 ml,加入待测酶液 0.1 ml,混匀,在 253 nm 波长测定吸光度,每隔 30 s 读数 1 次,共测 3 min,以 30 s 和 3 min 的 A 值计算。

$\triangle A(A_{3min}-A_{30s})$。以每分钟吸光度上升 0.003 定义为一个活力单位。

[BAEE(U/mg)=△A/[测定样品量(mg)×反应时间(min)×0.003]。

磷脂酶 A 以 Tan 和 Tan 的酸性滴定方法测定[7];纤维蛋白(原)溶解酶,用 Ouyang 和 Teng 方法测定[8];5'-核苷酸酶以单磷酸腺苷为底物,用 Dixont 和 purdom 方法测定[9];磷酸二酯酶用 Bjork 方法测定[10];L-氨基酸氧化酶用 Wellner's 方法测定[11]。类凝血酶用 Ouyang 方法测定[12]。

测定结果表明:在 0.1 mg/ml 的浓度下,短尾蝮蛇毒PBAP具有精氨酸酯酯酶活性(比活为 382.22 U/mg),而没有磷脂酶 A、5'-核苷酸酶、L-氨基酸氧化酶、磷酸单酯酶、磷酸二酯酶、纤维蛋白(原)溶解酶及类凝血酶活性。

2.2 丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶活性的影响[13]

将 3 个终浓度分别为 2、5、10 mmol/L 的 PMSF 与终浓度为 0.325 mg/ml 的 PBAP 溶液等体积混合,以 BAEE 为底物溶液,37℃水浴 1 h 后,室温下测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力。结果如图 1、2 所示。

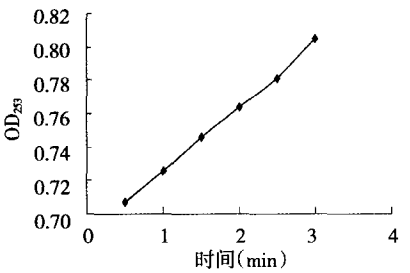
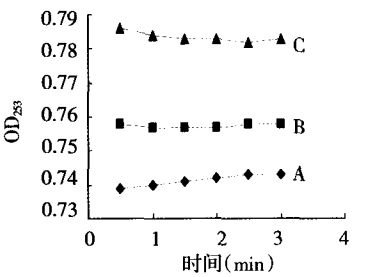


图 1 PBAP 的精氨酸酯酶活力的测定



注:(溶液终浓度)A. 2 mmol/L PMSF+0.325 mg/ml PBAP 混合液;B. 5 mmol/L PMSF+0.325 mg/ml PBAP 混合液;C. 10 mmol/L PMSF+0.325 mg/ml PBAP 混合液

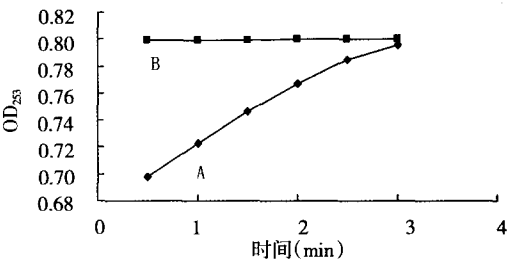
图 2 不同浓度的 PMSF 对 PBAP 的精氨酸酯酶活性的影响

图 1 为对照,当以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为0.687),终浓度为 0.325 mg/ml 的 PBAP 精氨酸酯酶活力为 402.05 U/mg。图 2 所示不同浓度 PMSF 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶活性的影响。OD_{253} 值随着时间增加无变化,精氨酸酯酶酶活力为 0 U/mg。说明丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶有抑制作用,短尾蝮蛇毒 PBAP 是丝氨酸蛋白酶类。

2.3 胰蛋白酶对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响[14]

将终浓度为 0.325 mg/ml PBAP 溶液按 1:10 的比例与终浓度为 3.25 mg/ml 胰蛋白酶溶液等体积混合,37℃水浴 4 h 后,室温下测定 BAEE 活力。

结果如图 3 所示,A 为无胰蛋白酶作用的 PBAP 溶液,以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.645)测定 PBAP 的酶活力为 402.05 U/mg。B 为胰蛋白酶与 PBAP 的混合溶液,以 BAEE 为底物溶液测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力,OD_{253} 值随着时间增加基本无变化,精氨酸酯酶活力为 0 U/mg。说明胰蛋白酶可抑制短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶活性。



A. 无胰蛋白酶的 PBAP 溶液;B. 胰蛋白酶与 PBAP 的混合液

图 3 胰蛋白酶对 PBAP 精氨酸酯酶活的影响

2.4 抑肽酶对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响[15]

将 3 个终浓度分别为 0.25、0.5、1.0 mg/ml 的抑肽酶溶液分别与终浓度为 0.325 mg/ml 的 PBAP 溶液等体积混合,37℃水浴 1 h 后,室温下测定 BAEE 活力。

当以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.510),测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力时,不同浓度抑肽酶对短尾蝮蛇毒 PBAP 的精氨酸酯酶活力无影响。

2.5 二价金属离子对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响

将终浓度分别为 1、2、5 mol/L 的二价金属离子溶液各 1 ml 分别与终浓度 0.325 mg/ml 的 PBAP 溶液等体积混合,37℃水浴 30 min 后,室温下测定 BAEE 活力。

当以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.585)测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力时,不同浓度的二价金属离子 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+} 对短尾蝮蛇毒 PBAP 无显著影响。

2.6 温度对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响

终浓度为 0.325 mg/ml 的短尾蝮蛇毒 PBAP 在 20℃、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃各种不同温度下温育 30 min,然后让样品在冰育中置冷,室温下测定 BAEE 活力。由图 4 可知。

以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.454)测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力时,PBAP 的精氨酸酯酶活力在 20℃~90℃之

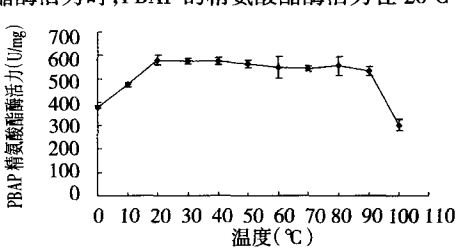


图 4 温度对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响

间相对稳定。

2.7 pH 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响

取 1 ml 终浓度为 0.325 mg/ml 的短尾蝮蛇毒 PBAP 用 100 ml 各种不同 pH 的缓冲液在 4℃透析过夜(0.02 mol/L 醋酸钠 - 醋酸缓冲液,pH3 ~ 6,0.02 mol/L Tris-Hcl 缓冲液,pH7 ~ 9,0.02 mol/L 甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液,pH10 ~ 11),室温下测定 BAEE 活力。结果如图 5 所示。

以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.510)测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力时,酶活力在 pH4 ~ 11 的范围内是稳定的,pH=3 时,短尾蝮蛇毒 PBAP 的精氨酸酯酶活力降低。

2.8 金属络合物 EDTA 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性的影响

将终浓度分别为 0.1、0.5、1、5、10 mmol/L 的 EDTA 溶液各 1 mL 分别与终浓度为 0. 325 mg/ml 的 PBAP 溶液等体积混合,37℃水浴 30 min 后,室温下测定 BAEE 活力。

由表 1 可以看出:以 BAEE 为底物溶液(OD_{253} 值为 0.454)测定 PBAP 的精氨酸酯酶活力时,金属络合物 EDTA 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶的活性无影响。

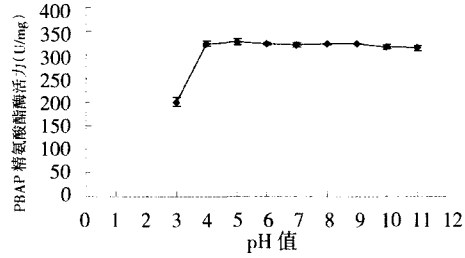


图 5 pH 对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶活性的影响

表 1 不同浓度的 EDTA 溶液对短尾蝮蛇毒 PBAP 精氨酸酯酶活性的影响

EDTA 的终浓度(mmol/L)	0.0	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0
酶活力(U/mg)	541.54	545.64	572.99	577.09	552.48	559.32

3 讨 论

精氨酸酯酶是指能够水解精氨酸所形成的肽键或酯键的酶,它分为三类:第一类只作用于合成的精氨酸酯底物,如 P- 甲苯磺酰 -L- 精氨酸甲酯(Na-P-Tosyl-L-arginine methye ester hydrochloride,TAME)和 BAEE;第二类为作用于纤维蛋白原等血液因子的的酶,它们进入体内后促进或抑制血液的凝固;第三类是激肽释放酶,能够在体内水解血浆中的激肽原而释放出舒缓激肽或类似物,具有降压,血细血管通透性增加和产生疼痛等生理作用。它们都是丝氨酸蛋白酶,能被丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 所抑制。由于:①磷脂结合抗凝蛋白能够水解合成的精氨酸酯底物 TAME[1]和 BAEE。②已知蝮蛇毒中具有精氨酸酯酶活性的酶是类凝血酶、激肽释放酶和纤维蛋白(原)溶解酶[16]。PBAP 没有蝮蛇毒中具有的 3 种酶的活性。③丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 对 PBAP 有抑制作用,胰蛋白酶可降解 PBAP,抑肽酶、二价阳离子 Ca^{2+}、Mg^{2+}、Co^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、EDTA 对 PBAP 精氨酸酯酶无明显影响。④温度在 20℃ ~ 90℃,pH 在 4.0 ~ 11.0 的条件下,PBAP 的精氨酸酯酶性质稳定。⑤它不仅抑制凝血因子Ⅸ的活性,对凝血因子Ⅷ、Ⅺ、Ⅻ因子的活性都有不同程度的抑制[5]。⑥抗凝作用的机理可能是直接与磷脂结合,阻止了磷脂类物质参与凝血过程的作用有关[1]。

因此它是一种具有精氨酸酯酶活性的新型抗凝蛋白。

参 考 文 献

[1] 黎渊弘,黎肇炎,林发全,等.短尾蝮蛇毒中磷脂结合抗凝蛋白的分离纯化及鉴定[J].中国药理学通报,2006,22(7):257-261.

[2] 黎渊弘,黎肇炎,林发全,等.短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白体内外对凝血因子的影响[J].中国药理学通报,2008,24(3):420-421.

[3] 黎渊弘,黎肇炎,黄丙轮,等.短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白对动物血栓的抗栓作用[J].中国生化药物杂志,2007,28(1):34-36.

[4] 黎渊弘,钟小斌,龙奕霄,等.短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白对家兔血液流变学的影响[J].中国生化药物杂志,2008,29(1):46-48.

[5] 黎渊弘,黎肇炎,林发全,等.短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白的抗凝作用及其机理研究[J].广西医科大学学报,2007,24(2):254-256.

[6] 黎渊弘,林文珍,臧 宁,等.短尾蝮蛇毒磷脂结合抗凝蛋白 β 亚基的基因克隆和序列分析[J].广西医科大学学报,2010,27(2):204-207.

[7] Tan N H,Tan C S.Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension substrate[J].Analyt Biochem,1988,170(2):282-288.

[8] Ouyang C,Teng C M. Fibrinogenolytic enzymes of Trimeresurus mucrospuammatus venom[J]. Biophys Acta,1976,420(2):298-308.

[9] Dixon T F,Purdom M.Serum 5-Nucleotidase[J].J Clin Pathol,1954,7(4):341-343.

[10] Bjork W.Purification of phosphodiesterase from Bothrops atrox venom with special consideration of the elimination of monophosphatases[J].J Biol Chem,1963,238(9):2477-2486.

[11] Wellner D,Lichtenberg L A.Assay of amino acid oxidase[M].New York:Academic press.1971.593-596.

[12] Ouyang C,YEH H I,Huang T F.Purificatiom and characterization of a platelet aggregation inducer from Calloselasma Rhodostoma (Malayan pit viper)snake venom[J].Toxicon,1986,24(7):633-643.

[13] 王雪英,伍晓斌,徐凤彩.蚯蚓纤溶酶的分离纯化及其部分酶学性质的研究[J].药物生物技术,2003,10(2):88-91.

[14] 刘美艳,张双全,张 健.蚯蚓纤溶酶的纯化及 pH 值、温度和胰蛋白酶对其纤溶活性的影响[J].中国生化药物杂志,2003,24(4):167-170.

[15] Chudzinski-Tavassi A M,Kelen E M,de Paula Rosa A P,et al.Fibrino(geno)lytic properties of purified hementerin,a metalloproteinase from the leech Haementeria depressa[J].Thrombosis and haemostasis,1998,80(1):155-160.

[16] 覃公平,郝文学.中国蝮蛇毒的临床应用[J].北京:光明日报出版社.1986.23-29.

(责任编辑:关蕴良)