维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)01 - 0119 - 03

犬钩虫抗凝血肽

郑玉强 综述,叶 彬 审校

(重庆医科大学寄生虫学教研室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R382.3 【文献标识码】B 【收稿日期】2001 - 09 - 27

在热带和亚热带地区的发展中国家,钩虫感染是引起人肠道丢失血液和缺铁性贫血的主要因素之一。钩虫引起的缺铁性贫血主要是因为成虫在肠道的吸血活动以及咬附部位粘膜伤口的渗血不止引起。钩虫吸血时,其头腺分泌一种具有抗血凝活性的物质延缓血液凝固、方便其吸血。自从1904 年 Loeb 发现犬钩虫提取物有抗凝血作用以后,长久以来人们企图从犬钩虫提取分离出这种抗凝血的物质[1,2]。1983 年,Hotez 从犬钩虫分离出一种抗血凝物质,这种抗凝血物质是一种蛋白水解酶,该酶具有延长血浆凝血酶原时间(PT)、抑制血液凝固以及促进纤维蛋白溶解的作用[3]。1993 年,Cappello 等从犬钩虫提取物分离、纯化出一种 8.7KDa 的蛋白水解酶,该酶是犬钩虫头腺分泌的主要抗血凝物质,它是凝血因子 Xa 的高效特异性抑制剂,定名为犬钩虫抗凝血肽(Ancylostoma caninum anticoagulant peptide, A-cAP),又名线虫抗凝血蛋白(nematode anticoagulant proteins, NAP)[4,5]。1996 年基因重组犬钩虫抗凝血肽 rAcAP 问世,这为犬钩虫抗凝血肽的深入研究和临床应用开辟了广阔前景。本文就 AcAP 的性质及应用作如下综述。

1 rAcAP 的生化特征

AcAP 是一种 8.7KDa 的蛋白水解酶,该酶是钩虫头腺分泌的主要抗血凝物质,它是凝血因子 Xa 的高效特异性抑制剂。1996 年,Stassens 等根据测定的 AcAP 的 N 端前 30 位氨基酸顺序(KAYPECGENEWLDD(V)CGTQ(K)KPCEAKCNEEPP)构建了 AcAP 的 cDNA 文库和重组 AcAP 的表达质粒,并在 *pichia pastoris* 酵母中表达,得到 3 种重组表达产物 rAcAP5、rAcAP6 和 rAcAPc2,其结构和生物活性与天然的 AcAP 相似。由 75 至 84 个氨基酸组成,均含有 10 个半胱氨酸,形成 5 对二硫键,它们和从似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)分离的胰蛋白酶抑制物 ATI、胰蛋白酶/弹性蛋白酶抑制物 C/E - I 有 22% 的相同氨基酸序列和相似的 5 对二硫键[6,7]。

作者介绍:郑玉强,(1976 -),男,硕士生,
主要研究方向:机会性致病寄生虫病的防治。

rAcAP5 由 77 个氨基酸组成,含 10 个半胱氨酸,形成 5 对二硫键(C6 - C50, C15 - C42, C21 - C37, C25 - C69, C50 - C63),主要由二硫键决定其二级结构,从而决定其生物活性它是 Xa 因子的高效特异性抑制剂,与 Xa 的反应位区在肽 37 - 42(- C - R - S - R - G - C -),作用位点在第 40 位精氨酸和第 41 位甘氨酸之间。rAcAP6 由 75 个氨基酸组成,与 rAcAP5 相比,氨基酸组成和蛋白质结构相似,有 7 个位点(V14, K18, S26, F38, S39, P41, G42)氨基酸不同,不具有 rAcAP5 第 29、30 位的脯氨酸,与 Xa 的反应位区在肽 35 - 40(- C - R - S - F - S - C -),作用位点在第 38 位苯丙氨酸和第 39 位丝氨酸之间。rAcAP6 对 Xa 因子的特异性抑制活性弱于 rAcAP5。rAcAPc2 由 84 个氨基酸组成,其 C 端比天然的 AcAPc2 多一个脯氨酸,与 rAcAP6 和 rAcAP5 的氨基酸组成差异较大。rAcAPc2 的核磁共振 NMR 数据揭示,它是一个含 5 对二硫键(C6 - C50, C15 - C46, C20 - C41, C24 - C70, C52 - C64)、可塑性强的皱褶的球形蛋白还含有两个反向平行的折叠结构(由 E10 - D13 和 Q49 - C52, Y57 - R58 和 C64 - V65 组成)和一个短的螺旋结构(A67 - D73),二硫键立于皱褶的球形蛋白分子的核心。rAcAPc2 的构形易变,有一个结构相对稳定区和一个结构易变区,这种结构可能与它的依赖 Xa 抑制 VIIa 因子—组织因子复合物的功能有关[7,8]。

2 rAcAP 的抗凝血特性及其应用

2.1 rAcAP 的抗凝血特性

rAcAP 的抗凝血机制主要是通过影响凝血酶原酶的作用实现的。凝血酶原酶即 FXa - Va - Ca^{2+} - PF_3 复合物,凡是影响凝血酶原酶形成的物质均可影响凝血酶原活化成凝血酶,从而影响凝血酶的形成,起到抗凝血的作用。rAcAP5 和 rAcAP6 主要抑制凝血因子 Xa,直接与 Xa 的活性中心结合从而特异性抑制 Xa,阻断凝血的共同途径,达到抗凝血作用[7]。$rAcAPC_2$ 与 Xa 活性中心以外的区域结合从而改变自身构象,再同 XIIa 因子—组织因子(c)复合物结合,阻断凝血的外源途径,达到抗凝血作用。$rAcAPC_2$ 抑制 fVIIa - TF 复合物要依赖 Xa 的参与,Xa 起到担架的作用。Xa 可以提

维普资讯 http://www.cqvip.com

高 rAcAPC$_2$ 抑制 fVIIa－TF 复合物的活性几十甚至几万倍[9]。

体内和体外实验均证明，AcAP 能明显延长凝血酶原时间(PT)和部分凝血激酶时间(PTT)，这种作用呈浓度依赖关系[2,4,5]。Cappello 等体外实验比较了 rAcAP、重组水蛭素 rHIR、重组蜱抗凝肽 rTAP 对 PT、PTT 的影响。2 倍 PT、PTT 时间所需浓度为：PT，rAcAP 为 35nM、rHIR 为 410nM、rTAP 为 1256nM、PTT，rAcAP 为 85nM、rHIR 为 32nM、rTAP 为 2365nM。可见，rAcAP 对 PT 的影响远大于 rHIR 和 rTAP，而对 PTT 的影响则 rHIR 更显著。rAcAP 对 11 种丝氨酸蛋白酶(胰蛋白酶、糜蛋白酶、凝血酶、XIa、XIIa、舒血管素、血浆酶、尿激酶 tPA、Xa、钙蛋白)的特异性检测：对 Xa 的抑制率，rAcAP5 为 100%，rAcAP6，为 87%，rAcAPc2 为 18%，rAcAP5 对 XIa 抑制率 50%，除此之外，它们均对其余丝氨酸蛋白酶无明显的抑制作用。rAcAP 的动力学显示，rAcAP5 抑制游离 Xa 的解离常数为 ki＝43＋／－5Pm，抑制结合型 Xa 的解离常数为 ki＝144＋／－15Pm；rAcAPc2 抑制结合型 Xa 的解离常数为 ki＝2385＋／－283Pm，抑制 fVIIa－TF 复合物解离常数为 ki＝35＋／－5Pm。可见，rAcAP5 对游离 Xa 的亲活力较高，而 rAcAPc2 对 fVIIa－TF 复合物亲活力比较高[5]。

2.2 rAcAP 的抗血栓的作用

1997 年，Rebello 等在电损伤左冠状动脉诱导血栓形成的狗身上单独皮下注射 rAcAP 观察其抗血栓效果。rAcAP5 有三个剂量组：0.03mg/kg(n＝6)，0.1mg/kg(n＝6)，0.3mg/kg(n＝5)；以生理盐水为对照组(n＝10)，在电损伤诱导血栓前 1h 皮下用药。结果生理盐水组在电损伤后 79＋／－9min 发生动脉堵塞，其中 5 只因心室纤颤卒死。0.03 mg/kg 组发生动脉堵塞的时间为 163＋／－62 min，0.1 mg/kg 组为 327＋／－62 min，0.3 mg/kg 组 8h 也未发生堵塞。0.03 和 0.1mg/kg 组对出血时间 BT、PT 无明显影响，0.3mg/kg 组延长 4 倍的 BT、2 倍的 PT。在电损伤狗颈静脉诱导血栓的实验中，使用 0.1mg/kg 的剂量，rAcAP5 也能明显延长血栓形成的时间，减轻形成的血栓重量，rAcAP5 组血栓重 9.55＋／－1.4lmg，与生理盐水对照组(38.35＋／－6.2mg)相比有显著性差异($P<0.05$)。rAcAP5 对血小板的聚集功能和血小板记数没有显著影响[10]。2000 年，Rebello 等将 rAcAP5 与组织纤溶酶原激活物(t－PA)联合用于狗的抗栓、溶栓实验，结果显示，单独皮下注射 rAcAP 也能起到持续有效的抗栓效果[11]。

2.3 AcAP 的抗肿瘤转移的作用

1998 年，Donnelly 等报道了 rAcAP 具有在体内抗肿瘤细胞转移的作用。Donnelly 实验小组用剂量为 0.01～0.2mg/只的 rAcAP 皮下注射严重联合免疫缺陷病(SCID)小鼠，然后从小鼠尾静脉注射 LOX 人类黑色素瘤细胞。结果显示，肺部转移的黑色素瘤与 rAcAP 的剂量呈负相关。Donnelly 等进一步探讨了 rAcAP 在体内抗肿瘤细胞转移的作用机制，认为 LOX 瘤细胞转移与 Xa 的介导有关，LOX 结合 Xa 的活性中心，而 rAcAP 是 Xa 的特异性抑制物，可与 LOX 竞争性结合 Xa 的活性中心，从而抑制瘤细胞转移[12]。不过，rAcAP 的抗肿瘤转移的性质和机制仍需继续深入研究。

3 rAcAP 的应用前景展望

rAcAP 的抗凝血抗血栓性质以及抗肿瘤细胞转移作用为我们展示了其很好的应用前景。有报道认为，Xa 抑制剂抗血栓效果好于凝血酶抑制剂的抗血栓效果。Xa 抑制剂在凝血酶的上游阻断凝血进程，抑制凝血酶的产生，进而抑制凝血酶引发的正反馈效应和凝血酶激活 Ⅴ、Ⅷ以及 Ⅹ Ⅲ因子，抑制血栓的形成[13]。Sitko 等在狗的冠状动脉血栓模型的实验中也证实了 Xa 抑制剂的抗栓、溶栓作用强于水蛭素和肝素[14]。Xa 抑制剂已被广泛用于临床上心血管疾病的抗血栓治疗，并且取得很好疗效[15]。凝血酶抑制剂可以结合凝血酶，但不能阻止凝血酶的产生，因而其抗栓效果受血药浓度局限。肝素作为临床上应用的抗血栓药物有许多不足，比如出血、过敏、血小板减少症、必须进行药物临测等。低分子量肝素虽然克服了这些缺点，但它多用于静脉血栓治疗。rAcAP 作为 Xa 的高效特异抑制剂对血小板聚集功能影响小，用于抗血栓治疗时引发出血的危险性小。在动物实验中显示了有效的抗血栓作用，仅皮下注射小剂量 rAcAP 就能起到有效抗栓作用。因而，它有可能成为临床上一种新的抗凝剂和抗血栓治疗药物。但是，目前对 rAcAP 的研究还处于动物试验阶段，其抗血栓效果还需要在大量的临床实践中加以验证。

参 考 文 献

[1] Spellman GG, Nossell HL. Anticoagulant activity of dog hookworm[J]. Am J Physiol, 1971; 4: 922－927.

[2] Hotez PJ, Letrang A. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookwrm Ancylostoma caninum[J]. J Biol Chemi, 1985; 260: 7343－7348.

[3] Hotez PJ, Cerami A. Secretion of a proteolytic anticoagulant by Ancylostoma hookworms[J]. J Exp Med, 1983; 157: 1594－1603.

[4] Cappello M, Clyne LP, McPhedran P, et al. Ancylostoma factor Xa inhibitor: partial purification and its identification as a major hookworm－derived anticoagulant in vitro[J]. J Infect Dis, 1993; 167: 1474－1477.

[5] Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, et al. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide: a hookworm－derived inhibitor of human coagulation factor Xa[J]. Proc Natl Acad Sci USA,

维普资讯 http://www.cqvip.com

1995;92:6152－6156.

[6] Hotez PJ, Cappello M, Hawdon JM. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide: cloning by PCR and expression of soluble, active protein in E. coli[J]. Mol Biochem Parasitol, 1996; 80:113－117.

[7] Stanssens P, Bergum PW, Gansemans Y, et al. Anticoagulant repertoire of the hookworm Ancylostoma caninum[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996;93:2149－2154.

[8] Duggan BM, Dyson HJ. Inherent flexibility in a potent inhibitor of blood coagulation, recombinant nematode anticoagulant protein c2[J]. Eur J Biochem, 1999;265:539－548.

[9] Bergum PW, Cruikshank A, Maki SL, et al. Role of zymogen and activated factor X as scaffolds for the inhibition of the blood coagulation factor VIIa－tissue factor complex by recombinant nematode anticoagulant protein c2[J]. J Biol Chem, 2001;276(13):10063－10071.

[10] Rebello SS, Blank HS, Rote WE, et al. Antithrombotic efficacy of a recombinant nematode anticoagulant peptide (rNAP5) in canine models of thrombosis after single subcutaneous administration[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997;283:91－99.

[11] Rebello SS, Blank HS, Lucchesi BR. Antithrombotic efficacy of single subcutaneous administration of a recombinant nematode anticoagulant peptide (rNAP5) in a canine model of coronary artery thrombolysis[J]. Thromb Res, 2000;98(6):531－540.

[12] Donnelly M, Bromderg ME, Milstone A, et al. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide blocks metastasis in vivo and inhibits factor Xa binding to melanoma cells in vitro[J]. Thromb Haemost, 1998;79:1041－1047.

[13] Semple JE, Levy OE, Minami NK, et al. Novel, potent and selective chimeric FXa inhibitors featuring hydrophobic P1－ketoamide moieties[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2000; 10(20):2305－2309.

[14] Sitiko GR, Ramjit DR, Stabilito. II, et al. Conjunctive enhancement of enzymatic thrombolysis and prevention of thrombotic reocclusion with the selective factor Xa inhibitor, tick anticoagulant peptide. Comparison to hirudin and heparin in a canine model of acute coronary artery thrombosis[J]. Circulation, 1992;85(2):805－815.

[15] Spencer FA, Becker RC. Novel inhibitors of factor X for use in cardiovascular diseases[J]. Curr Cardiol Rep, 2000;2(5):395－404.

重庆医科大学学报第五届编辑委员会名单

主任委员 金先庆

副主任委员 邱宗荫 陈运贞 王亚平

主　　编 陈运贞

副 主 编 安 洪 牟家雄

编辑委员会(以姓氏笔划为序) * 常务编委

王丕龙*	王亚平*	王应雄	王润华	王智彪	汤为学	任 红*
安 洪*	牟家雄*	孙善全	朱道银	米 粲	李少林	李荣亨
杨锡强*	吴小翎	吴家廉	汪恕萍	张定凤*	张 能	陈运贞*
陈 源	陈雅棠	邱宗荫*	金先庆*	周歧新	周雅德	姚榛祥
唐文渊	唐承薇	顾美礼	涂植光	董为伟	董 志*	曾昭淳
雷 寒	蔡方成					