

蛇毒纤维蛋白原水解酶

毛建平 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

关键词 蛇毒 纤维蛋白质 凝血酶样酶 纤溶酶

许多蛇毒中含有降解纤维蛋白原或纤维蛋白的酶类,它们作用于高等动物血液循环系统,防止中毒动物血液凝固以利于其它毒素迅速扩散和生效。人类于18世纪初发现蛇毒使中毒动物血液失凝的现象,19世纪到20世纪初研究了蛇毒对动物器官特别是血液的作用,了解到更多种类的蛇毒具有破坏纤维蛋白原的功效。1937年Eagle, H.把这种功效归功于蛇毒的蛋白水解酶(proteolytic enzymes)。广泛存在于蛇毒的这种蛋白水解酶,吸引了许多研究者

的注意,它的作用随着人类对危害自身的血栓疾病的认识而愈显示其重要性。本世纪50年代,Didisheim和Lewis首次从蛇毒中寻找溶解血管内血凝块药物,发现除眼镜蛇毒外的许多其它蛇毒表现降解纤维蛋白活性,前者只存在微量作用于纤维蛋白原的物质。30多年来,人们对蛇毒中的纤维蛋白原水解酶进行了体外、体内大量实验研究,取得了可喜的成绩,国内有抗栓酶、清栓酶、去纤酶等应用于临床(见表1)

表1 试验或临床尝试的六种蛇毒纤溶酶

来源(蛇名)	酶名称	用途	报道者
铜头蝮	fibrolase	静脉血栓	Stocker K F. 1985
食鱼蝮		血栓	Stocker K F. 1990
矛头蝮	protein G	静脉血栓	Ortis et al 1987
西部菱斑响尾蛇	atroxase	血栓	Willis et al 1989
非洲沙蝰	cerastase	纤维蛋白试剂	Dauod et al 1988
地中海蝰	lebetase	血栓	Siigur, J. 1991

1 蛇毒与纤维蛋白原水解酶

蛇毒主要来自眼镜蛇科和蝰科蛇,传统上将其分为神经毒,血液毒和两者均有的混合毒。血液毒种类丰富;心脏毒、凝血毒、抗凝血毒和溶血毒等。凝血毒具有:激活凝血活素,激活凝血酶原,激活凝血因子 X,激活凝血因子 V,凝血酶样作用等;抗凝血毒含有:溶纤维蛋白原,溶纤维蛋白,激活血浆纤溶酶原(血浆素原 plasminogen),抑制促凝血因子,抗凝血酶等作用。我们将以上凝血毒的凝血酶样酶和抗凝血毒中溶纤维蛋白原和溶纤维蛋白的酶统称纤维蛋白原水解酶。这一类酶催化纤维蛋白原肽链水解,属于内肽酶。

纤维蛋白原由 A α , B β 和 γ 三对肽链组成,纤维蛋白则是 A, B 两对肽链从 A α , B β 两对链上水解下来,剩下的 ($\alpha\beta\gamma$)₂ 通过氢键聚合成可溶性纤维蛋白多聚体。上述凝血酶样作用和溶纤维蛋白原作用酶,在实验中,发现都是水解纤维蛋白原或 A α 或 B β 链,分别使纤维蛋白

原凝聚或者使其失去凝聚性质,并分别命名为凝血酶样酶(thrombin-like enzymes 或 thrombic proteases)和纤溶酶(fibrinogenases)^[1]。

1.1 蛇毒凝血酶样酶 蛇毒凝血酶样酶降解纤维蛋白原释放纤维蛋白肽(fibrinopeptide) A 或 B,在体外作为促凝剂引起血浆或纯化纤维蛋白原凝集。这一作用类似凝血酶,因而得名。在体内因为它不激活凝血因子 XII,形成的纤维蛋白块不稳定,很快会被循环血液清除,引起血浆纤维蛋白原水平降低而呈良性的去(脱)纤维蛋白状态,而表现抗凝效应。

凝血酶样酶与凝血酶(thrombin)的作用机理不甚相同,前者主要作用于纤维蛋白原的一种链,如 A α 或 B β ,而后者同时作用于纤维蛋白原 A α , B β 并释放 A, B 肽链。除此之外,前者不影响凝血因子 V, VIII, XII, 其活性也不受抗凝血酶 III(AT-III)、肝素的抑制。相似之处在于它们都是丝氨酸蛋白酶,活性位点有组氨酸的参与,酶学性质颇为相似(见表 2)^[2]。

表 2 蛇毒凝血酶样酶

蛇毒来源	酶名称	分子量(kD)	含糖	水解纤原肽	评价
蝰亚科					
尖吻蝮	Acutin	34 - 37	13%	A	Ser, His 活性中心
韩国蝮蛇		42 - 43			
箭毒蝮	venzyme	60 - 67	+	B(A)	Ser 活性中心
短尾蝮		39			
蝮蛇		43	+	B(A)	
红口蝮	Ancrod, Arvin	35	36%	A	Ser, His 活性中心, 临床去纤药剂
矛头蝮	Batroxobin, Reptilase-Reagent	42	+	A	止血药, 测血凝试剂
矛头蝮	Asperase	30	+	A	与 Batroxobin 相似
海岛矛头蝮		45	22%	A, B	不激活 XII 因子
美洲矛头蝮	Boirase	71			止血药
迈阿密矛头蝮	Batroxobin, Defibrase	36	26.7%	A	序列已知, Ser 活性中心
巨蝮				A, B	不激活 XII 因子
巨蝮	Clotase	36			
东部菱斑响尾蛇	Crotalase	33	5.4%	A	Ser, His 活性中心
南美恐布响尾蛇		34		A	对鼠纤原优先
	Gyroxin	33 - 35			凝纤维蛋白原, 有神经毒性
响尾蛇	Defibrzyme	30(20)	+	A	
黄绿烙铁头	Flavoxobin	23.5(65 - 70)		A	已测序, 对免纤原特异
棕点竹叶青		29.5	25%		Ser 活性中心
冲绳烙铁头		34	6%		Ser 活性中心
蝰亚科					
加蓬噬蝰	Gabonase	30.6	20.3%	A, B	激活 XII 因子
非洲沙蝰	Cerasobin				凝纤维蛋白原, 激活血小板
游蛇科					
游蛇科					
暴击游蛇	Boomslang	55 - 67			

表3 蛇毒纤溶酶的物化性质比较

来源	酶名称	氨基酸 残基数	分子量 (kD)	等电 点	含糖	最适 pH	金属离子 影响
尖吻蝮		208	24.1	3.8	<1%	7.4	
铜头蝮	Fibrolase	203	23	6.8	+	7.5	
北方铜头蝮			22.9			6-8	Zn ²⁺
蝮蛇						8.5	Ca ²⁺ + Mg ²⁺
短尾蝮		106	39.2	4.12			
食鱼蝮		306	33.5	4.5	6%	2-10	
红口蝮		226	25.4	>10	<1%		
矛头蝮	Protein G	166	18		1%	9.5	Ca ²⁺ + Mg ²⁺
西部菱斑响尾	Protease I	176	20	<7	-	7	
	Protease IV	406	46		+	7	
	Atroxase	206	23.5	9.6	-	9	
		272	33.7	4.6	1.5%	6	
			22.9	4.6			
	Protease II	204	31		+	8.5	
	Protease III	198	24			10.5	
红菱斑响尾蛇		207	25	5.2			Na ⁺
		221	25.5	9.6			Zn ²⁺
		402	60	5.8			Na ⁺ Ca ²⁺
棕点竹叶青	HR1	203	23.5	>10	4%	7.4	
		211	25	4.5	7%	9	
烙铁头		203	22.4	8.1	2%	7.4	
		229	26	5.7	2%	8.5	
	HT-a	131	15	4.72			
	HT-b	239	27	8.9			
	proteinase 1	195	23	8.1	-		
	proteinase 2	196	23.5	9.2	-		
	proteinase 3	194	23	9.8	-		
	TMVFG	181	26	4.7	6.4%		
	ME-1	249	27	5.95	0.4%		
	ME-2	271	29.8	5.62	0.2%		
	ME-3	300	33	6.93	6.4%		
	ME-4	263	28.5	5.31	1.3%		
非洲沙蛙	Cerastase F ₄	193	22.5	5.2	6.1%	10	
角蛙			05	4			Ca ²⁺ + Zn ²⁺
锯棱蛙	Ecarin		57	4.4	17%	8-8.5	
地中海蛙			52.5	3	23%		
		214	23.7	4.5-5.5			
黑颈眼镜蛇	Proteinase F ₁	515	58	<7		8-10	Zn ²⁺

表 4 蛇毒纤溶酶的酶学性质比较

来源	酶名称	纤原	底物 纤蛋 酸蛋白	酯酶 活性	酰胺 水解	温度 稳定	出 抑 血 剂	金属 酶	丝氨 酸酶	报道者	
尖吻蝮		A	+	+	-	-	+	EDTA	+	Ouyang, C. 1976	
铜头蝮	Fibrolase	+	+		-	-		EDTA	+	Markland FS. 1983	
北方铜头蝮		A	+	-	-	-		EDTA	+	Morgan JB. 1981	
蝮蛇		A, B	+		-	-		EDTA	+	叶智彰 1980	
短尾蝮		+								Qian XH 1991	
食鱼蝮		B			+		+	AT III	+	Nikai T. 1988	
红口蝮		A	+	+	-		+	EDTA, Cys	+	Ouyang, C. 1983	
矛头蝮	Protein G	A>B	+	+	-	-	-	EDTA, Cys	+	Aragon F. 1978, 87*	
西部菱斑响尾	Protease I	A>B, γ	+	+	-		-	EDTA	+	Pandya BV. 1984	
	Protease IV	A>B, γ					-	EDTA	+	同上	
	Atroxase	A, B	+				-	EDTA	+	Willis TW. 1988, 89*	
		B	-	-	+		-	PMSF	+	Nikai T. 1983	
		B>A					-	PMSF	+	Sapru ZZ. 1983	
Protease II	B						-	PMSF	+	Pandya BV. 1984	
	Protease III	B					-	PMSF	+	Retzios AD. 1988	
	红菱斑响尾蛇	A			-		+	EDTA	+	Mori 1986	
	A									同上	
A									同上		
A									同上		
A									同上		
棕点竹叶青	HR1	A	+	+	-			EDTA, Cys	+	Ouyang C 1979	
		B	+	+	+		+	PMSF	+	同上	
烙铁头		A	+	+	-		+	EDTA, Cys	+	Ouyang, C 1976, 77*, 79*	
		B		+	+		+	PMSF	+	同上	
	HT-a	B					-	EDTA	+	Nikai T. 1985	
	HT-b	A					+	EDTA	+	同上	
	Proteunase1	B					-	EDTA	+	Sugihara H. 1985	
	Proteunase2	A>B					-	EDTA	+	同上	
	Proteinase3	A>B					-	EDTA	+	同上	
	TMVFG	B			+			PMSF	+	Zhang Y. 1991	
	ME-1	B>A	+				+			Sugihara H. 1986	
	ME-2	B>A	+				+			同上	
ME-3	A=B	+				+			+	同上	
ME-4	A=B	+				+			+	同上	
非洲沙蛙	CerastaseF4	A>B	+	+	-		-	EDTA	+	Daoud 1988	
角蛙		A								El-Asmar 1989	
锯棱蛙	Ecarin	A, B			-			EDTA, Cys	+	Dyr et al. 1989	
地中海蛙		B			+		+			+	Siigur, E. 1991
		A	+	+	-		-	EDTA	+	同上	
黑颈眼镜蛇	FroteinaseF1	A						EDTA	+	Evans, H. J 1984	

注: 纤原-纤维蛋白原; 纤蛋-纤维蛋白; A, B, γ -分别代表纤维蛋白原的 A α , B β 和 γ 肽链; > 和 = 分别表示优先作用和同等作用; EDTA, PMSF 和 Cys 见文中所述, AT III-抗凝血酶 3; + 代表 1987、1989、1977 和 1979 年。

表 2 总结了 20 多种凝血酶样酶制剂及其部分物化性质。值得注意的是, 无论它们优先降解纤维蛋白原 A α 还是 B β 肽链, 几乎都具有酯酶活性, 受二异丙基氟磷酸 (DFP)、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的抑制, 性质稳定。凝血酶样酶有较多的应用, 已注册作为诊断和药用的有 7 个纯酶。

关于蛇毒凝血酶样酶的命名, 以往出现纤维蛋白肽释放酶 (fibrinopeptide releasing enzymes)、纤维蛋白原凝固蛋白酶 (fibrinogen coagulant proteinases)、纤维蛋白促成酶 (fibrin-promoting enzyme)、纤维蛋白原凝集酶 (fibrinogeno-clotting enzyme)、纤维蛋白肽酶 (fibrin-peptidases)、纤维蛋白凝块形成酶 (fibrin clot-forming enzymes) 和凝血酶样酶 (thrombin-like enzyme)^[1,3] 等。

1.2 蛇毒纤溶酶 蛇毒纤溶酶常被称为纤维蛋白(原)溶解酶 [fibrin(ogen)olytic proteinases 或 enzymes]。它们直接降解纤维蛋白原的 A α 和或 B β 肽链, 使其即使在凝血酶存在下也不能凝固, 大多数可以溶解纤维蛋白。1976 年 Ouyang 等首次研究蛇毒纤溶酶, 报道了烙铁头 (*Trimeresurus mucrosquamatus*) 的 2 个纤溶酶和 1 个尖吻蝮 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒纤溶酶。此后的研究工作层出不穷, 关于蛇毒纤溶酶的命名也异彩纷呈: 纤维蛋白溶解组分 (fibrinolitic principle)、纤维蛋白溶解酶 (fibrinolytic enzyme)、纤维蛋白溶解蛋白酶 (fibrinolytic protease)、纤维蛋白原溶解酶 (fibrinogenolytic enzyme)、纤维蛋白原裂解酶 (fibrinogensplitting enzyme)、抗凝蛋白酶 (anticoagulant protease)、纤溶酶样酶 (plasmin-like enzyme) 和纤溶酶 (fibrinogenase)^[4-6]。现在趋向于用纤溶酶 (fibrinogenases) 代表纤维蛋白(原)溶解酶。Ouyang 将优先降解纤维蛋白原 A α 和 B β 肽链的纤溶酶分别称为 α -纤溶酶、 β -纤溶酶 (α 、 β -fibrinogenases) (见表 3 和表 4)。

表 3、4 总结了大部分蛇毒纤溶酶, 比较了它们的物化性质及酶学性质。通过比较可以总结以下几点: α -纤溶酶大都是金属蛋白酶(需

要金属离子作为其功能基团), 受乙二胺四乙酸 (EDTA) 抑制, 有的受半胱氨酸 (Cys) 的抑制, 活性对热不稳定。 β -纤溶酶除个别 (2 例) 以外都是丝氨酸蛋白酶, 分子量范围 23-35kD。其活性中心有丝氨酸的参与, 受 DFP 或 PMSF 抑制, 有酯水解活性, 活性对热稳定, 不依赖金属离子。此类酶与凝血酶样酶类作用性质有相似之处。

2 蛇毒纤维蛋白原水解酶与出血毒

临床应用凝血酶样酶遇到的第一个问题是出血副作用。纤溶酶表现的出血性质也很普遍, 因此有些纤溶酶称之为出血毒素 (见表 3, HT, HR 等), 这是因为大多数纤溶酶都能引起实验动物皮下出血, 造成出血的原因是纤溶酶广泛的蛋白水解性能, 它们能摧毁细胞间的基质蛋白。不同的纤溶酶造成不同程度的出血, 将出血效应强的蛋白酶称出血毒, 从南美铜头蝮、北美铜头蝮和矛头蝮等蛇毒中分离纯化的纤溶酶却没有出血活性^[7-10]。据已有的实验报道, 出血毒素与纤溶酶有许多相似之处: 大部分出血毒素水解纤维蛋白原 A α 链, 而对 B β 链作用微弱, 受 EDTA 抑制, 无酯酶活性, 对热不稳定, 大多是酸性蛋白等等。出血活性似乎与来自蝮亚科的蛇毒 α -纤溶酶一类金属蛋白酶更有密切联系。许多实验表明出血活性和水解酶活性在酶组纯化过程及性质测定中平行存在。也有报道认为水解酶活性大小, 不反应出血活性的高低。研究发现在体外有出血作用的酶使血管内血栓溶解而不引起器官出血现象。可能不同的纤维蛋白原溶解酶对不同的底物的降解机制各不相同, 作用专一性也不一样。

出血作用限制了这一类酶继续使用于试验和临床。人们在寻找无出血作用的纤维蛋白原溶解酶, 从分子水平探讨纤维蛋白原降解活性和出血活性的机制。

3 讨论

迄今为止作用于纤维蛋白原 γ 链的蛇毒蛋白酶, 有 1 例报道。概而言之, 无论是主要或优

先作用于纤维蛋白原 A α 链还是 B β 链, 如果引起凝集反应, 即为凝血酶样酶, 则在酶学性质上都为丝氨酸蛋白酶。而溶纤酶只有优先作用于纤维蛋白原 B β 链的纤溶酶(β -纤溶酶)为丝氨酸蛋白酶, 可优先降解纤维蛋白原的 A α 链的纤溶酶(α -纤溶酶)为金属蛋白酶, 然而近来的研究表明有第三类, 即优先降解纤维蛋白的 A α 链而被 DFP 或 PMSF 抑制, 具酯酶活性的纤溶酶和第四类优先水解纤维蛋白原的 B β 链受 EDTA 抑制的金属蛋白酶见于报道^[11]。

蛇毒凝血酶样酶和纤溶酶本质上是一类酶; 分类编号为 EC. 3. 4. 21. 28., 是因为它们对纤维蛋白原作用效应上的不同而已。事实上凝血酶样酶活性和纤溶活性有时能同时体现在同一酶上, 两者没有绝然界限, 如首先形成不完全的纤维蛋白体现凝集活性, 然后溶解纤维蛋白。

凝血酶样酶应用于临床存在的另一问题是, 快速大剂量注射会造成大面积栓塞甚至导致死亡危险发生, 起始剂量宜小且要求缓慢注射。而且再次使用会引起抗药性, 应更换其它药物使用。纤溶酶的应用似乎更为复杂, 易造成血液纤维蛋白原含量过少而引起出血。然而主要的问题还是它们对纤维蛋白原的特异性不强, 易造成其它因子的损害, 活性不稳定等。因此应寻找特异性稳定性好的纤溶酶。

许多研究者试图从蛇毒中寻找血浆纤溶酶原激活酶, 尽管血浆纤溶酶原激活活性在吸血动物、昆虫、细菌和真菌中甚至豆制品都有发现(如目前国内的蚓激酶), 蛇毒中存在血浆纤溶酶原激活酶原激活作用近来已有报道^[12]。随着分析方法的改进, 相信会有更多的发现。

随着蛋白酶对纤维蛋白原作用机制日益明了, 找寻分子小、特异性好、高效低毒副作用的深纤药物, 人工生产更理想的模拟酶或工程酶将不是困难的事情。

参 考 文 献

- 1 Stocker, K. F. In Medical Uses of Snake Venom Proteins. CRC Press 1990, 366 - 390.
- 2 Marsh, N. A. and B. C. Whaler Separation and partial characterization of a coagulant enzyme from *Bitis gabonica* venom. *Br. J. Haematol* 1974, **26**:295.
- 3 Dyr, J. E., J. Suttmar and H. Fortova. The action of fibrin-promoting enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix* on rat fibrinogen and plasma. *Toxicon*, 1990, **28** (11):1364 - 1367.
- 4 Sugur, E., Mahar, A. and J. Sugur, β -fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. *Toxicon*, 1991, **29** (1): 1381 - 1386
- 5 Qian, X. H. and L. R. Ma, Fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon halys brevicaudus* (Korean mamushi) *Toxicon*, 1991, **29**(1):1381 - 1386
- 6 Sugur, E., Mahar, A. and J. Sugur, Fibrinogen-splitting enzymes from *Viper lebetina* venom. *Toxicon*, 1991, **29** (3): 296
- 7 Markland, F. S. Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venom. *Thrombosis and Haemostasis*. 1991, **65** (4): 438 - 443.
- 8 Willis, T. W. and T. Tu A. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry*, 1988, **27**:4769 - 4777.
- 9 Soto, J. G., J. C. Perez and A. Minton. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. *Toxicon*, 1988, **26**(9):875 - 882.
- 10 Aragon-Ortiz, F. and F. Gubensek. Characterization of a metallo-proteinase from *Bothrops asper* (Teciopelo) snake venom. *Toxicon*, 1987, **26**(7):759 - 766.
- 11 Mao, J. P. and Y. L. Xiong. A New fibrinogenase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Chinese habu snake), *Asiatic Herpetology Research*. 1994, **5** (4): 408 - 415
- 12 Zhang, Y., B. Cassian, and Y. L. Xiong, A snake venom plasminogen activator (sv-PA) from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. *Toxicon*, 1993, **31** (6): 539 - 545