

蚯蚓纤溶酶原激活剂的分离纯化及其性质

严宜明^{1)*}, 孔 键²⁾, 李 红²⁾, 石 男²⁾, 隋红艳²⁾

(¹⁾赣南医学院, 赣州 341000; ²⁾北京生物制品研究所, 北京 100024)

摘要 为了从赤子爱胜蚓中获得主要表现为纤溶酶原激活活性的蛋白酶, 采用盐析、离子交换层析、凝胶过滤层析和疏水吸附层析从蚯蚓组织匀浆中纯化出 6 种具有纤溶活性的酶组分 (F1、F2、F3、F4、F5 和 F6)。它们均为单一多肽链; 表观分子量分别为 28 500、29 500、26 100、26 300、14 850 和 32 800; 经非还原型 SDS-PAGE 和扫描仪扫描, 纯度分别为 100%、95.2%、96.5%、93.6%、98% 和 97.8%; 等电点 (pI) 均不高于 3; SDS-PAGE 后, 用 Schiff 试剂染色显示 F5 为糖蛋白; 纯化的 6 种酶于 20~50℃ 保温 1 h, 酶活力基本不变; F1 和 F2、F3 和 F4、F5 和 F6 分别在 pH 4~10、4~11、7~12 范围内稳定; 水解 BAEE 试验及纤溶活性抑制试验表明, F6 既是丝氨酸蛋白酶, 又是含金属离子的蛋白酶, 其它 5 种酶为胰蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶; 免疫双扩散试验结果初步表明, F1 和 F5 以及它们和其它 4 种组分之间无共同的抗原决定簇; 用纤维蛋白平板法及以 Chromozym U 和 Chromozym PL 为底物测定, 除 F1 外, 其余 5 种酶的纤溶酶原激活活性明显强于其直接纤溶活性。

关键词 赤子爱胜蚓, 纤溶酶原激活剂, 纯化, 纤溶活性, 丝氨酸蛋白酶

中图分类号 Q556

Purification and Preliminary Characterization of Plasminogen Activators in Earthworm *Eisenia foelida*

YAN Yi-Ming^{1)*}, KONG Jian²⁾, LI Hong²⁾, SHI Nan²⁾, SUI Hong-Yan²⁾

(¹⁾ Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China; ²⁾ National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024, China)

Abstract A variety of fibrinolytic enzymes has been extensively used as thrombolytic agents. However, these agents suffer from number of significant limitations. Therefore, novel thrombolytic agents with better fibrinolytic efficiency and less adverse side effects are eagerly sought. Six enzymes with fibrinolytic activity were isolated and purified from the tissue homogenate of earthworm, *Eisenia foelida*. The purification procedure involved ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephacryl Fast Flow, gel filtration on Sephacryl S-200 HR and hydrophobic interaction chromatography on Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (low substitute). According to analysis with Densitometer System after SDS-PAGE (non-reducing), the purity of each enzyme (F1, F2, F3, F4, F5, and F6) was 100%, 95.2%, 96.5%, 93.6%, 98%, and 97.8%, respectively. The apparent molecular weight of each enzyme estimated by SDS-PAGE was 28 500, 29 500, 26 100, 26 300, 14 850, and 32 800, respectively. The isoelectric point (pI) of each enzyme was not higher than 3. The enzymes are single polypeptide chains. F5 was glycoprotein proved by staining with Schiff reagent. The enzymes were stable between 20~50℃ for 1h. F1 and F2, F3 and F4, and F5 and F6 were stable from pH 4~10, 4~11, and 7~12, respectively. On the basis of enzymatic activities against BAEE and various inhibition, F6 was a serine protease and metalloprotease, and the other five enzymes were trypsin-like serine proteases. Double immunodiffusion test showed that anti-F1 serum had no cross-activities with the other five enzymes and nor did anti-F5 serum. All of the enzymes mentioned above but F1 displayed significantly stronger indirect-acting fibrinolytic activity than their direct-acting fibrinolytic activity as determined with fibrin plate method and/or using Chromozym U and Chromozym PL as specific substrates. However, the results from agar

收稿日期: 2004-09-23, 接受日期: 2004-12-27

*联系人 Tel: 0797-8269778, E-mail: yanyiming2000@tom.com

Received: September 23, 2004; Accepted: December 27, 2004

*Corresponding author Tel: 0797-8269778, E-mail: yanyiming2000@tom.com

immune-double-diffusion assay revealed that common epitopes in these enzymes still wait further elucidation.

Key words *Eisenia foelida*, plasminogen activator, purification, fibrinolytic activity, serine protease

蚯蚓又名地龙,作为活血化淤的药材,在我国有数千年的使用历史.自1983年Mihara等^[1]首次发现粉正蚓(*Lumbricus rubellus*)粗提物具有直接纤溶活性及纤溶酶原激活活性以来,国内外开展了许多这方面的研究工作.研究资料表明,蚯蚓体内的纤溶活性组分比较复杂,这主要表现为:纤溶活性成分多^[2];不同品种和同一品种蚯蚓中的不同活性成分及纤溶活性强度存在很大差别,而且这些活性组分之间的关系及其所表现出的活性种类也较复杂^[3~5].迄今从蚯蚓中获得的纤溶活性的组分绝大多数主要表现为直接纤溶活性,但此种直接纤溶活性过强往往是不利的,研究表明,这些具有较强直接纤溶活性的蚯蚓纤溶酶与人血纤溶酶相比能更快的降解人血纤维蛋白原^[6],此外还能水解免疫球蛋白和白蛋白^[7],因而易导致出血及其它一些副作用.鉴于蚯蚓纤溶酶具有的缺陷,为充分发掘蚯蚓中的有效成分,本研究侧重从赤子爱胜蚓(*Eisenia foelida*)中纯化出主要表现为纤溶酶原激活活性的组分,并对这些组分的部分性质进行鉴定.

1 材料和方法

1.1 仪器和设备

8823A型UV-Monitor购自北京新技术应用研究所;3057型记录仪购于四川仪表厂;20PR-52D高速冷冻离心机购于Hitachi公司;PIMK超滤膜购于Millipore公司;Nanosep^R Centrifugal Device购于Gelman公司;Mini 2-D电泳装置购于Bio-Rad公司;Appraise Densitometer System购于Beckman公司;UV-120-02 Spectrophotometer购自Shimadzu公司;Ultraspec2000 UV/visible Spectrophotometer购自Pharmacia公司;FMV-05型电感耦合等离子体原子发射光谱仪购于Spectro公司.

1.2 材料和试剂

赤子爱胜蚓购于北京东郊农场;新西兰兔购于北京生物制品研究所动物室;Sephacryl S-200 HR、DEAE-Sephacryl Fast Flow、Phenyl-Sephacryl 6 Fast Flow (low substitute)和PhastGel (IEF 3-9)均购于Amersham Pharmacia Biotech公司;三羟甲基氨基甲烷购自Gibco公司;Chromozym PL和Chromozym U购于Roche公司;纤维蛋白原、纤维蛋白溶酶原、凝血酶和尿激酶均购自中国药品生物制品检定所;琼脂购于Difco

公司;丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS购于Sigma公司;分子质量标准蛋白、N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)购于Bio-Rad公司;Chymostatin、E-64、Tween-20和Na₂S₂O₅购自Sigma公司;二甲基亚砜(DMSO)购自J. T. Baker公司;pepstatin、aprotinin、leupeptin购自Roche公司;N-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)购自上海丽珠东风生物技术有限公司;标准钙溶液及锌溶液购自国家钢铁材料测试中心研究总院;其余试剂均为国产分析纯.

1.3 方法

1.3.1 平板法测定酶的纤溶活性 富含纤溶酶原的纤维蛋白平板(plasminogen-rich fibrin plate)的制备:按Deogny等人^[8]的方法略作修改,方法如下,在4.8 ml TBS (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl)中,加1.2 ml 纤维蛋白原溶液(15.4 mg可凝固蛋白/ml, TBS配制)和0.15 ml 纤溶酶原溶液(10酪蛋白单位/ml, TBS配制),混匀后加入6 ml 预先熔化并冷却至约50℃的2%琼脂(TBS配制)及85 μl 凝血酶溶液(30 U/ml, TBS配制),混匀,立即倾注于灭菌的细菌培养皿(φ=9 cm)中,待琼脂冷却至室温后,4℃下保存备用.无纤溶酶原的纤维蛋白平板(plasminogen-free fibrin plate)的制备:与上述平板的制备方法基本相同,但不加纤溶酶原,并将制好的平板置80℃下保温30 min,以灭活纤维蛋白原中可能残存的纤溶酶原.为方便起见,将富含纤溶酶原的平板称为标准平板,无纤溶酶原的平板称为加热平板.测活时,在平板上打孔,加入10 μl 待测样品,置37℃下保温16 h取出,量透明溶圈互为垂直的两个直径,以其积扣除孔直径的乘积作为溶圈面积,纤溶活性单位以mm²/mg表示.

1.3.2 摸索盐析条件 125 g洗净的新鲜蚯蚓加125 ml TBS,匀浆,4℃下搅拌抽提2 h,离心(10 000 × g, 30 min).分别取4 ml上清液于17支试管中,配成0.20 S、0.25 S、0.30 S...1.00 S等不同饱和度的硫酸铵溶液,并分别用相应饱和度的硫酸铵溶液补齐至10 ml,4℃下盐析过夜,离心(10 000 × g, 30 min).取0.20 S至0.80 S管内的上清液,其沉淀用2 ml TBS溶液溶解,因从0.85 S管开始,上清液中有不沉淀聚合物,故对这些上清液用0.45 μm的滤膜过滤.盐析上清液及沉淀溶解液分别用上述两种纤维蛋白平板测定纤溶活性.

1.3.3 蚯蚓纤溶酶原激活剂的分离纯化

1.3.3.1 盐析 将洗净的新鲜蚯蚓加 TBS,匀浆,4 下搅拌抽提 4 h,离心(10 000 $\times g$, 30 min),取上清液并配成 0.55 S 硫酸铵溶液,盐析过夜,离心(10 000 $\times g$, 30 min),盐析上清液用截留分子量为 10 kD 的 PIMK 超滤膜浓缩后,置 -40 冻存。将该浓缩液称为蚯蚓纤溶酶抽提物(Earthworm Fibrinolytic Enzyme Extracts,简称 EFEE)。

1.3.3.2 离子交换层析 EFEE 与等体积的起始缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5, 50 mmol/L NaCl)混匀,上样于起始缓冲液平衡的 DEAE-Sephacrose Fast Flow 柱(1.6 cm \times 17 cm),上样平衡后,用不同浓度的 NaCl(0.15 mol/L、0.23 mol/L、0.3 mol/L、0.4 mol/L ... 1.0 mol/L)进行阶梯式洗脱,流速为 60 ml/h,分部收集,用标准平板测纤溶活性,收集并浓缩各活性组分。

1.3.3.3 凝胶过滤层析 上述活性组分分别上样于 TBS 平衡好的 Sephacryl S-200 HR 柱(1.6 cm \times 97 cm),用相同缓冲液以 60 ml/h 的流速洗脱,分部收集并用标准平板测纤溶活性。各活性酶组分在 4 下对 PB1(20 mmol/L F3, pH 7.0)或 PB2(20 mmol/L PB, pH 6.0)透析平衡。

1.3.3.4 疏水吸附层析 透析平衡后的各组分均配成 1.6 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 溶液,然后分别上样于经起始缓冲液(含 1.6 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 PB1 或 PB2)平衡的 Phenyl-Sephacrose 6 Fast Flow (low substitute) 柱(1.5 cm \times 5.1 cm),上样平衡后,用不同浓度的 $(NH_4)_2SO_4$ (0.4 mol/L ~ 1.4 mol/L)进行阶梯式洗脱,流速均为 60 ml/h。分部收集并用标准平板测纤溶活性,各活性组分在 4 下对 0.15 mol/L NaCl 透析,浓缩, -40 冻存备用。

1.3.4 蛋白浓度的测定 以牛血清白蛋白(BSA)为标准,按 Lowry 法^[9]测定。

1.3.5 纯度鉴定 用非还原型 SDS-PAGE,浓缩胶为 5%,分离胶为 12.6%,考马氏亮蓝 R 250 染色^[10]。

1.3.6 分子量测定 还原型 SDS-PAGE,浓缩胶 5%,分离胶 12.6%,考马斯蓝亮 R 250 染色^[10]。

1.3.7 PAGE 参照文献^[11]进行,浓缩胶 5%,分离胶分别为 7.5%、10%、12.6%,采用 pH 8.3 电泳缓冲液。

1.3.8 等电点测定 用 PhastGel™ (IEF 3-9)按使用说明在 PhastSystem 中进行。(由清华大学测定)

1.3.9 糖蛋白的鉴定 样品经非还原型 SDS-PAGE 分离(浓缩胶为 5%,分离胶为 12.6%)后,用

过碘酸-Shiff 试剂对凝胶染色鉴定^[12]。

1.3.10 F6 的金属离子分析 F6 对 0.15 mol/L NaCl (用超纯水配制)充分透析后,用截留分子量为 10 kD 的 Nanosep^R 离心管浓缩。分别取 80 μ l F6 浓缩液(蛋白含量为 57 μ g)和 0.15 mol/L NaCl,加到 2 只经浓 H_2NO_3 处理过的 Eppendorf 管内,每管加 160 μ l 浓 H_2NO_3 并混匀,置室温 30 min 后,取出分别加到 5 ml 容量瓶(经浓 H_2NO_3 处理)中,并加超纯水定容至 5 ml,用电感耦合等离子体原子发射光谱仪测定 F6 和对照组 NaCl 中的 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的含量。

1.3.11 温度对酶纤溶活性的影响 每种经 50 mmol/L PB (pH 7.8) 稀释的酶溶液等量加于 6 只 Eppendorf 管内,每管 50 μ l,于不同温度(20、30、40、50、60、70)下保温 1 h 后迅速冷却,用标准平板测定酶的残余活性,每管均做复孔,37 温育 16 h ~ 18 h。

1.3.12 pH 对酶纤溶活性的影响 将每种酶组分等量加于 10 只 Eppendorf 管内,每管 10 μ l,再分别加等量不同 pH 值(pH 3 ~ 12)的广范围缓冲液,混匀,18 下放置 24 h 后,每管加 40 μ l 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0),用标准平板测定酶的残余活性,每管均做复孔,37 温育 12 h ~ 18 h。

1.3.13 蛋白酶抑制剂对酶纤溶活性的影响 待测酶用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl) 稀释。抑制剂工作液的配制: chymostatin (1 mg/ml) 用 DMSO 配制, pepstatin (1 mg/ml) 用甲醇配制, aprotinin (1 mg/ml)、EDTA- Na_2 (50 mmol/L)、E-64 (1 mg/ml) 及 leupeptin (1 mg/ml) 均用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl) 配制。每种酶分别与等量上述抑制剂、甲醇 (25%)、DMSO (25%) 及 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl) 混合,置 37 水浴温育 30 min,用标准平板测定酶的残余活性(均做复孔)。

1.3.14 水解 BAEE 活性测定 参考文献^[13]进行。

1.3.15 以 Chromozym HL 和 Chromozym U 为底物的酶活性测定 按说明书进行,但样品稀释液用 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 8.2)。在测定水解 Chromozym U 活性时,以尿激酶作对照。

1.3.16 免疫学分析 F1 和 F5 分别与等量的完全 Freund's 佐剂乳化后,在兔足掌皮内和肩髋关节处皮下免疫,每种酶抗原分别免疫两只家兔,每只家兔注射量为 0.5 mg。然后每隔 4 周用不完全 Freund's 佐剂乳化的相同抗原加强免疫 2 次,每次每只家兔注射量为 0.25 mg,末次免疫 1 周后取血,分离血清。

F1 和 F5 抗血清(1:2 稀释)分别与各种酶组分(浓度均为 0.2 mg/ml)及 EFEE(10 mg/ml)作免疫双向琼脂扩散试验。

2 结果

2.1 盐析条件的摸索

在摸索盐析条件时,用纤维蛋白平板法测定上清液和沉淀中的纤溶活性时,会出现文献^[14]中所述的四种溶圈情况:第一种是在标准平板上出现彻底透明溶圈,这种活性记为 CFPg (complete fibrinolysis in the plasminogen-rich fibrin plate);第二种是在标准平板上出现模糊溶圈(即晕圈),这种活性记为 uCFPg (uncomplete fibrinolysis in the plasminogen-rich fibrin plate);第三种是在加热平板上形成彻底透明溶圈,这种活性记为 CF (complete fibrinolysis in the plasminogen-free fibrin plate);第四种是在加热平板上出现模糊溶圈,此活性称为 uCF (uncompleted fibrinolysis in the plasminogen-free fibrin plate)。用标准平板测得的活性,包括直接纤溶活性和激活纤溶酶原而产生的间接纤溶活性(即激活活性),而用加热平板只测得直接纤溶活性。在实际测定上清液和沉淀物的纤溶活性时,只测定 CFPg 和 CF,并分别代表样品的总纤溶活性和直接纤溶活性。同一样品中的激活活性占总纤溶活性的大小,用 CFPg 与其 CF 之差除以 CFPg 得到的百分率表示。不同硫酸铵饱和度盐析的上清液和沉淀物的激活活性所占总纤溶活性的比率的分布见 Fig. 1。从图中可以看出,随着硫酸铵饱和度的增加,沉淀物的激活活性的变化不明显,尤其是从 0.35 S 到 1.00 S,其激活活性的比率均在 20 % 左右,这可能是沉淀中的纤溶酶组分多,即使沉淀中含有较强激活活性的组分,其活性也会被直接纤溶活性所掩盖。从 0.25 S 开始盐析上清中的激活活性逐渐上升,到 0.55 S 时达到最高(55.56 %),而 0.60 S 以后的盐析上清中检测不出明显的纤溶活性。这是因为主要表现为直接纤溶活性的组分逐渐被沉淀,对激活活性有抑制作用的组分也被陆续沉淀,故没有被沉淀的有较强激活活性的组分的活性呈现出来。因本研究重点在于纯化出主要表现为纤溶酶原激活活性的酶组分,故选择 0.55 S 硫酸铵盐析作为纯化的第一步。

2.2 蚯蚓纤溶酶原激活剂的分离纯化

用离子交换层析分离 EFEE,测活结果显示,在所试验的 NaCl 浓度下,只有 0.15 mol/L、0.23 mol/L 和 0.4 mol/L 的洗脱峰 D1、D2、D3、D4 和 D5 有纤溶

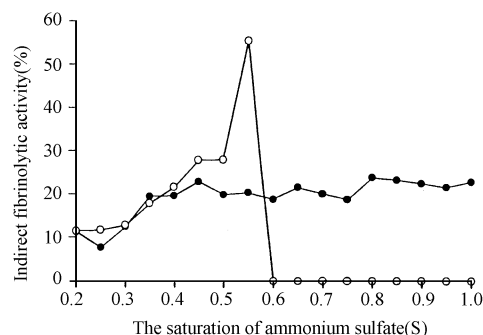


Fig. 1 Distribution of indirect fibrinolytic activity in supernatant and precipitate from different saturation of ammonium sulfate
—○— Supernatant; —●— Precipitate

活性。其中 0.15 mol/L 和 0.23 mol/L NaCl 各洗下两个活性峰,且同一盐浓度洗脱的两个活性峰用标准平板测得的晕圈直径与透明溶圈直径之差显著不同,故分别收集合并。D1 ~ D5 分别用 Sephacryl S-200 HR 作进一步分离,按上述纤溶活性判断方法收集各活性峰。共获得六个活性组分,其中从组分 D1、D2、D3 和 D5 各分离到一个活性组分,分别称为 D1-S、D2-S、D3-S 和 D5-S,从组分 D4 分离到两个活性组分 D4-S1 和 D4-S2。最后经疏水吸附层析用含不同浓度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 PB 进行阶梯式洗脱,从 D1-S、D2-S、D3-S、D4-S1、D4-S2 和 D5-S 中各纯化到一个活性组分,分别称为 F1、F2、F3、F4、F5 和 F6,其中 F1 和 F6 是分别用含 1.3 mol/L 和 0.8 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 PB1 洗脱下来的活性组分,而 F2、F3、F4 和 F5 是分别用含 0.7 mol/L、1 mol/L、0.7 mol/L 和 0.8 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 PB2 洗脱下来的活性组分(层析图谱略)。

2.3 等电点和分子量测定及纯度和寡聚体鉴定

等电聚焦电泳测定 F1 ~ F6 六种酶的等电点均不高于 3;经还原型 SDS-PAGE 测定, F1、F2、F3、F4、F5 和 F6 的表观分子量分别为 28 500、29 500、26 100、26 300、14 850 和 32 800 (Fig. 2 a)。经非还原型 SDS-PAGE 检测和电泳扫描仪扫描, F1、F2、F3、F4、F5 和 F6 的纯度分别为 100 %、95.2 %、96.5 %、93.6 %、98 % 和 97.8 % (Fig. 2 b);从 Fig. 2 可看出, F1 ~ F4 在两种电泳图谱上的区带位置无明显变化,表明 F1 ~ F4 均由单一多肽链组成。F5 和 F6 在还原型和非还原型 SDS-PAGE 图谱上都为单一条带,但位置有明显变化,为排除 F5 和 F6 为寡聚体的可能性,分别用 3 种不同分离胶浓度(7.5 %、10 %、12.6 %)的非变性 PAGE 对 F5 和 F6 进行了电泳分析,都显示单一条带(图略),表明 F5 和 F6 均为单体。

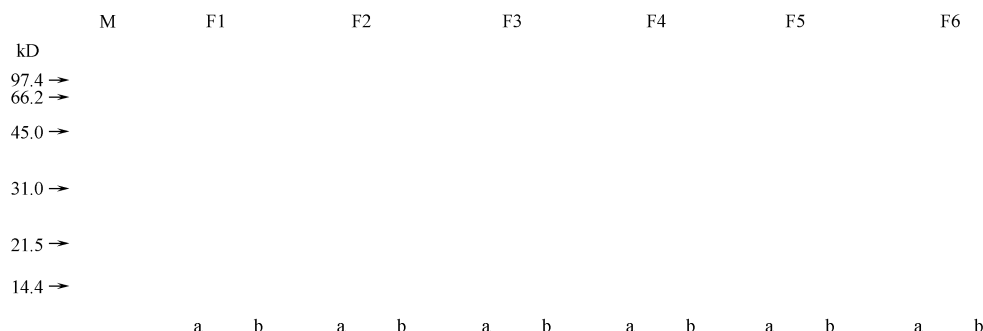


Fig. 2 SDS-PAGE of the purified enzymes F1 ,F2 ,F3 ,F4 ,F5 and F6

The purified enzymes F1 ,F2 ,F3 ,F4 ,F5 and F6 (10 ~ 12 μ g) were submitted to electrophoresis on 12.6 % gels containing SDS in presence of 2-mercaptoethanol (a) or in absence of 2-mercaptoethanol (b) .

After the electrophoresis ,proteins in the gel were visualized by Coomassie brilliant blue R250-staining .M:molecular weight marker

2.4 糖蛋白鉴定

10 ~ 12 μ g 的 F1 ~ F6 组分经非还原型 SDS-PAGE 后 ,用 Shift 试剂染色 ,F5 的电泳区带呈较明显粉红色 ,表明 F5 为糖蛋白 (见 Fig. 3) .

2.5 平板法测定酶的纤溶活性

纤溶活性测定结果显示 ,EFEE 和纯化的 6 种酶都具有激活活性和直接纤溶活性 ,但 F1 ~ F6 在纤维蛋白平板上所表现出的活性种类不完全相同 (见

Fig. 4) . F1、F2、F3 和 F4 均表现出 CFPg、uCFPg、CF 和 uCF 四种活性 ;F5 有 CFPg、CF 和 uCF 三种活性 ,无 uCFPg 活性 ;F6 只有 CFPg、uCFPg 和 uCF 三种活性 ,无 CF 活性 ;尿激酶在加热平板上无溶圈 (见 Fig. 4 B ,D 平板上的中心孔) . F1、F2、F3、F4 和 F6 在标准平板 (见 Fig. 4 A ,C 平板) 上的晕圈与其透明溶圈的直径差值分别约为 1.3 mm、5.8 mm、1.0 mm、0.8 mm 和 10 mm.

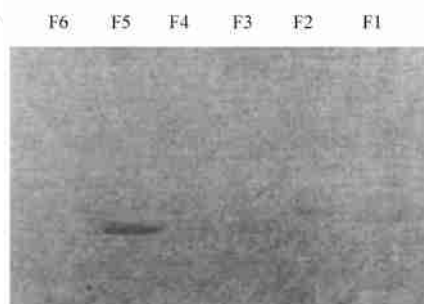


Fig. 3 Glycoprotein identification of the purified enzymes After SDS-PAGE (non-reducing type) , glycoprotein of the purified enzymes were identified using Shift reagent

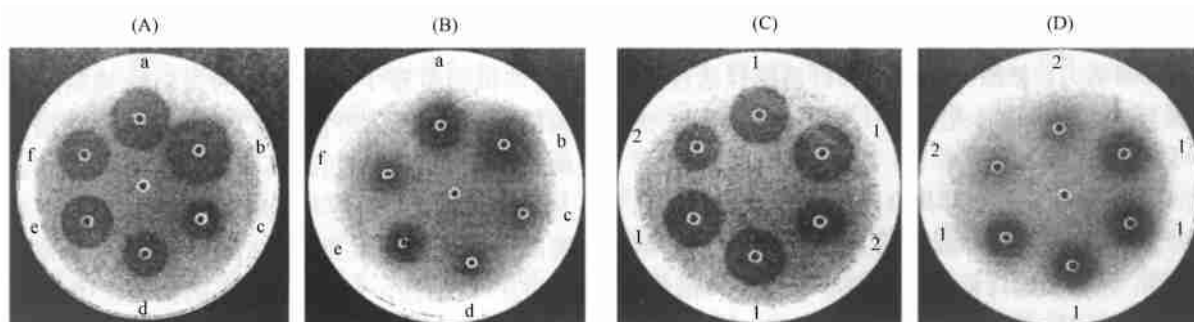


Fig. 4 Fibrinolytic activities of EFEE and the purified enzymes F1 ,F2 ,F3 ,F4 ,F5 and F6

(A) and (C) are plasminogen-rich fibrin plates. (B) and (D) are plasminogen-free fibrin plates.

The purified enzymes were separately placed on plate A and plate B : (a) 6.3 μ g of F1 ; (b) 5.5 μ g of F2 ; (c) 1.4 μ g of F6 ; (d) 6.4 μ g of F4 ; (e) 7.2 μ g of F5 ; (f) 9.3 μ g of F3 .

EFEE and F6 were separately placed on plate C and plate D : (1) 36.0 μ g of EFEE ; (2) 2.3 μ g of F6 .

Urokinase (41.5 U) was added to the central wells of plate B and plate D

测定 EFEE 和 F1 ~ F6 的总纤溶活性、直接纤溶活性和激活活性时,以 CFP_g 代表总纤溶活性,CF 代表酶的直接纤溶活性,激活活性为其 CFP_g 与 CF 的差值,结果见 Table 1. 由该表可知:6 种酶的总纤溶活性明显高于 EFEE. EFEE 的激活活性占总纤溶活性的 57.2 %,与盐析条件摸索试验结果基本一致;F1 和 F2 的激活活性分别占总纤溶活性的 47.1 % 和 47.5 %;F3、F4 和 F5 的激活活性明显强于其直接纤溶活性,分别占总纤溶活性的 84.8 %、90.38 % 和 62.8 %;在标准平板上,F6 的两种测试剂量(1.4 μg、2.3 μg)都仅表现出 uCF 而无 CF 活性,故 F6 的激活活性几乎占总纤溶活性的 100 %.

2.6 以 BAEE、Chromozym U 和 Chromozym PL 为底物的酶活性测定

通过测定 F1、F2、F3、F5 和 F6 水解 BAEE、Chromozym U 和 Chromozym PL 的能力,可以了解它们的酯酶活力、尿激酶样活性和纤溶酶样活性(因 F4 的量较少,故未进行此试验),结果见 Table 2. 由该表可知:F1、F2、F3 和 F5 都能水解 BAEE,而 F6 则不能,故除 F6 外,其余 4 种酶都具有胰蛋白酶样活性;测定的 5 种酶均有尿激酶样活性和纤溶酶样活性,且尿激酶样活性明显强于纤溶酶样活性;测定的 5

种酶中,F5 的 3 种活性均最高. 与尿激酶比较计算,每 mg 的 F1、F2、F3、F5 和 F6 的尿激酶样活性分别为 35 U(U 为尿激酶活性单位)、553 U、1 620 U、45 800 U 和 590 U.

2.7 温度对酶纤溶活性的影响

结果见 Fig. 5 A,从图中可以看出,F2、F3 和 F4 经 60 °C 保温 1 h,纤溶活性无明显变化;F1、F5 和 F6 经 60 °C 保温 1h 后,活性降低较明显;70 °C 保温 1 h 后,F1、F2、F3、F4 和 F5 的纤溶活性完全丧失,而 F6 仍保留 29 % 的活性;6 种酶组分在 20 ~ 50 °C 保温 1 h 后,纤溶活性无明显变化.

2.8 pH对酶纤溶活性的影响

实验结果(Fig. 5 B)显示,F1 和 F2、F3 和 F4、F5 和 F6 之间的酸碱稳定性非常相似,分别在 pH 4 ~ 9、pH 4 ~ 10、pH 7 ~ 12 范围内稳定.

2.9 蛋白酶抑制剂对酶纤溶活性的影响

本实验考察了 6 种不同的蛋白酶抑制剂对 6 种酶的纤溶活性(CFP_g 活性)的影响,所使用的蛋白酶抑制剂的浓度都超过其有效浓度,结果见 Table 3. 从表中可看出:甲醇和 DMSO 在测试浓度下对 6 种酶的纤溶活性均无影响;aprotinin 完全抑制 F5 和 F6 的纤溶活性,对 F4 有较强的抑制作用,对 F1、F2 和

Table 1 Fibrinolytic activity of EFEE and the purified enzymes

Types of activity	Fibrinolytic activity/10 ³ mm ² mg ⁻¹						EFEE
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
Total fibrinolytic activity	65.51	83.95	30.31	31.28	41.95	86.94	8.62
Direct-acting fibrinolytic activity	34.63	44.05	4.62	3.01	15.61	0	3.67
Indirect-acting fibrinolytic activity	30.88	39.90	25.69	28.27	26.34	86.94	4.95

Table 2 Comparative enzyme activities of the purified enzymes

Substrates	Activity (A)/min ⁻¹ g ⁻¹						Activity (A)/min ⁻¹ U ⁻¹
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Urokinase
BAEE	200.0	27.5	33.3	ND	400.0	0	ND
Chromozym PL	10.0	54.3	597.5	ND	3062.5	52.8	ND
Chromozym U	21.8	345.0	1010.0	ND	28580.0	368.8	6.243 ×10 ⁻⁴

ND, not detected

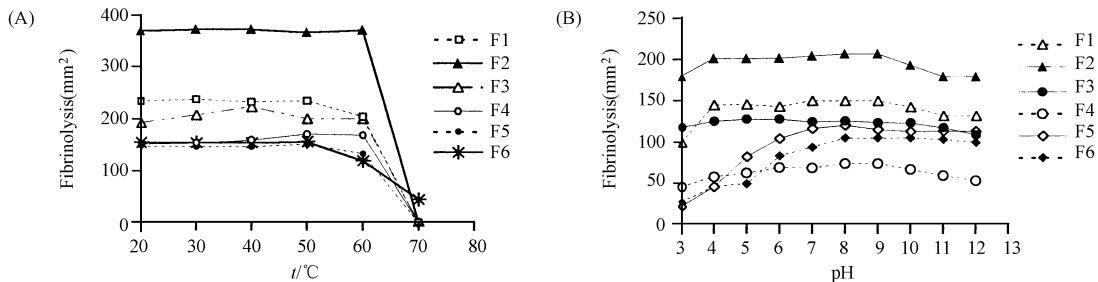


Fig. 5 Effects of various temperatures (A) and pH (B) on fibrinolytic activity of the purified enzymes

Table 3 Effects of various inhibitors on the purified enzymes

Inhibitors	Inhibition rate (%)					
	F1 (0.05 mg/ml)	F2 (0.1 mg/ml)	F3 (0.15 mg/ml)	F4 (0.1 mg/ml)	F5 (0.1 mg/ml)	F6 (0.1 mg/ml)
None	0	0	0	0	0	0
Aprotinin (0.50 mg/ml)	31.58	29.55	35.4	61.43	100	100
Chymostatin (0.50 mg/ml)	0	0	0	12.13	18.2	0
EDTA-Na ₂ (0.25 mol/L)	0	0	0	0	0	100
E-64 (0.50 mg/ml)	0	0	0	0	0	0
Leupeptin (0.50 mg/ml)	11.71	22.48	9.61	32.89	85.79	43.62
Pepstatin (0.50 mg/ml)	0	0	0	0	0	0

None : methanol control and DMSO control

F3 也有一定的抑制作用;leupeptin 几乎完全抑制 F5 的纤溶活性,对其余 5 种酶也有不同程度的抑制作用;EDTA-Na₂ 仅完全抑制 F6 的纤溶活性;chymostatin 只对 F4 和 F5 有轻微的抑制作用;pepstatin 和 E-64 对 6 种酶的纤溶活性均无影响. 从本试验结果可初步认为这 6 种酶均属丝氨酸蛋白酶,而 F6 同时还是一种金属蛋白酶.

2.10 F6 中的金属离子测定

因 6 种酶中仅 F6 的纤溶活性被 EDTA-Na₂ 抑制,且 70 ℃ 保温 1 h 后仍保留 29 % 的活性,考虑到蛋白水解酶中有一大类属含金属离子的蛋白酶,主要是锌蛋白酶,但也有像 thermolysin、meperin 此类同时

含有 Zn²⁺ 和 Ca²⁺ 的金属蛋白酶,它们中的 Zn²⁺ 参与构成酶的活性中心,而 Ca²⁺ 对酶的热稳定性起作用^[15],故测定 F6 中是否含 Zn²⁺ 和 Ca²⁺. 结果显示:每 mg 的 F6 中,Zn²⁺ 和 Ca²⁺ 的含量分别为 1.22 μg、1.19 μg.

2.11 免疫学分析

将抗 F1 和抗 F5 血清分别与 F2、F3、F4、F6 和 EFEE 进行免疫双扩散试验,结果如 Fig. 6 所示,抗 F1 血清只与 F1 和 EFEE 形成相互吻合的沉淀线 (Fig. 6 a, b),抗 F5 血清只与 F5 和 EFEE 形成相互吻合的沉淀线 (Fig. 6 c, d),该结果初步表明,F1 和 F5 之间及与其它 4 种酶之间无共同的抗原决定簇.

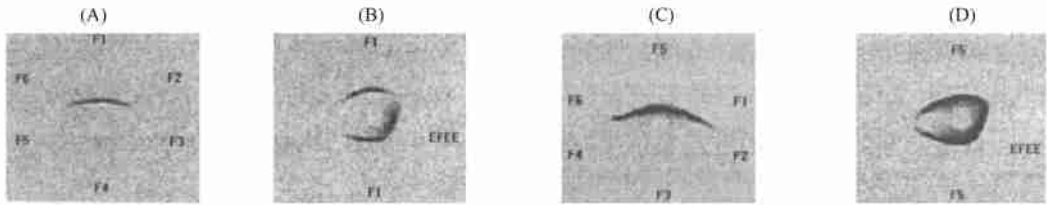


Fig. 6 Double diffusion patterns of EFEE and the purified enzymes

- (A) The center well contained 10 μl anti-F1-serum (1:2 dilution), and the surrounding wells contained 2 μg of F1, F2, F3, F4, F5, and F6, respectively.
- (B) The center well contained 10 μl anti-F1-serum (1:2 dilution), and the surrounding wells contained 2 μg of F1 and 10 μg of EFEE.
- (C) The center well contained 10 μl anti-F5-serum (1:2 dilution), and the surrounding wells contained 2 μg of F1, F2, F3, F4, F5, and F6, respectively.
- (D) The center well contained 10 μl anti-F5-serum (1:2 dilution), and the surrounding wells contained 2 μg of F5 and 10 μg of EFEE.

3 讨论

本研究纯化的 6 种酶 (F1 ~ F6) 均为酸性蛋白质,都具有很好的热稳定性,F1 ~ F4 的酸碱稳定性好,这些与文献^[4,16~18]报道基本相同. F5 和 F6 只在中性和碱性条件下稳定,这与以往报道不同. F5 的表观分子量仅为 14 850,这是迄今为止从蚯蚓中所获得的分子量最小的单一纤溶活性组分.

蚯蚓纤溶酶组分在纤维蛋白平板上有些同时表现直接纤溶活性和激活活性,而有些仅有其中一种活性. Nakajima 等^[4]从粉正蚓中纯化的 6 种纤溶酶仅有直接纤溶活性,双体酶 e-PA 主要表现为激活活性^[14],更多的实验室获得的是有直接纤溶活性和激

活活性的单体酶,但激活活性只占总活性的 1/6 ~ 2/5 不等^[16,17,19,20]. 本研究纯化的 6 种酶都具有直接纤溶活性和激活活性,除 F1 和 F2 的激活活性与直接纤溶活性相当外,其余四种酶的激活活性明显强于其直接纤溶活性. F1、F2、F3、F5 和 F6 水解纤溶酶底物 Chromozym PL 及尿激酶底物 Chromozym U 的试验结果显示,它们都具有类似尿激酶活性和纤溶酶活性,且每种酶的尿激酶样活性显著大于其纤溶酶样活性. 综合这两种方法的测活结果,纯化的 6 种酶中至少有 5 种 (F2 ~ F6) 的纤溶活性主要表现为激活纤溶酶原的活性,直接纤溶活性则相对较弱,而 F2、F3、F5 和 F6 有尿激酶样的激活活性.

水解胰蛋白酶底物 BAEE 的试验结果显示,除 F6 外,F1、F2、F3 和 F5 都能水解 BAEE,故 F1、F2、F3 和 F5 属于胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶. 未测定 F4 水解 BAEE 的活性,但它的纤溶活性抑制试验的结果与 F1、F2、F3 和 F5 类似,推测其也可能属于胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶. 目前已知的蚯蚓纤溶酶组分降解 BAEE 的活性大多较弱^[2,4],F2 和 F3 与此相似;有的和 F6 一样无此活性^[2~4],而鲜见像 F5 和 F1 如此强的降解 BAEE 的报道,仅双体酶 e-PA 能较好的降解 BAEE^[21].

本研究纯化的 6 种酶中,F1 ~ F4 均表现出 CFPg、uCFPg、CF 和 uCF 四种活性;F5 有 CFPg、CF 和 uCF 活性,无 uCFPg 活性;F6 只有 CFPg、uCFPg 和 uCF 活性,无 CF 活性;F1 ~ F4 及 F6 的透明溶圈直径与晕圈直径的差值各不相同. 这些结果说明它们之间在结构上存在明显差异. Tang 等^[22]从赤子爱胜蚓中纯化的 EFEa 在纤维蛋白平板上出现透明溶圈和晕圈,他们对 EFEa 进行了结晶蛋白空间结构的模拟研究,初步认为 EFEa 在纤维蛋白平板上出现晕圈是因其弹性蛋白酶样活性所致. 我们在实验中发现,F1、F2、F3、F5 和 F6 水解 Chromozym HL 和 BAEE 的活性与它们在标准平板上有无晕圈以及晕圈与其透明溶圈的直径差值大小关系密切,因为当这两种水解活性都很强时则无晕圈(如 F5);其中一种活性强则两种溶圈直径差值小(如 F1、F3);如果两种活性均较弱,则两种溶圈直径差值就大(如 F2、F6). 本研究纯化到既有无 uCFPg 活性的 F5,也有表现 uCFPg 活性但其活性大小明显不同的 F1、F2、F3、F4 和 F6,因此为进一步研究蚯蚓纤溶活性组分的结构与功能之间的关系提供了条件.

琼脂免疫双扩散法测定结果表明 F1 和 F5 之间以及它们与其它 4 种酶之间无共同的抗原决定簇,因此 F1 并非纯化过程中 F2 和 F6 的降解物,F5 也不是其余 5 种酶的降解物. F2、F3、F4 和 F6 之间是否存在有共同的抗原决定簇,还有待进一步试验.

参考文献 (References)

- Mihara H, Sumi H, Akazawa K, Yoneta T, Mizumoto H. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm. *Thromb Haemost*, 1983, **50**:258 ~ 263
- 赵晓瑜, 静天玉. 蚯蚓纤溶酶组分的分离纯化及分析. 生物化学与生物物理进展 (Zhao Xiao-Yu, Jing Tian-Yu. Separation, purification and analysis of the components of earthworm fibrinolytic enzymes. *Prog Biochem Biophys*), 2001, **28**(2): 34 ~ 37
- 路英华, 金汝成. 蚯蚓纤溶酶的提取、性质鉴定和溶解血栓的研究. 兰州大学学报(自然科学版) (Lu Ying-Hua, Jin Ru-Cheng. The purification and characterization of fibrinolytic enzymes from *Amyntas dancatala*. *J Lanzhou Univ (Natural Sciences)*), 1986, **22**(1): 95 ~ 100
- Nakajima N, Mihara H, Sumi H. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993, **57**(10): 1726 ~ 1730
- 谢江碧, 郭振泉, 翁宁, 王洪涛, 江冠群, 茹炳根. 一种凋亡相关蚯蚓丝氨酸蛋白酶的纯化、活性鉴定及部分性质研究. 生物化学与生物物理进展 (Xie Jiang-Bi, Guo Zhen-Quan, Weng Ning, Wang Hong-Tao, Jiang Guan-Qun, Ru Bing-Gen. Purification, identification and partial characterization of an apoptosis-related serine protease from earthworm. *Prog Biochem Biophys*), 2003, **30**(3): 453 ~ 460
- Nakajima N, Ishihara K, Sugimoto M, Sumi H, Mikuni K, Hamada H. Chemical modification of earthworm fibrinolytic enzyme with human serum albumin fragment and characterization of the protease as a therapeutic enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**(2): 293 ~ 300
- Wu Xue-qin, Wu Ce, He Rong-qiao. Immobilized earthworm fibrinolytic enzyme IIF1 with carbonyldiimidazole activated-agarose. *Protein Pept Lett*, 2002, **9**: 75 ~ 80
- Deogny L, Weidenbach A, Hampton J W. Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements: use of bentonite precipitation and agar solidification. *Clin Chim Acta*, 1975, **60**:85 ~ 89
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275
- Bollag D M, Rozycki M D, Edelstein S J. Gel electrophoresis under denaturing conditions. *Protein Methods*, 2nd ed. New York: J Wiley, 1996: 107 ~ 128
- Bollag D M, Rozycki M D, Edelstein S J. Gel electrophoresis under nondenaturing conditions. *Protein Methods*, 2nd ed. New York: J Wiley, 1996: 155 ~ 168
- Leach B S, Collawn J F Jr, Fish W W. Behavior of glycopolypeptides with empirical molecular weight estimation methods. 1. In sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry*, 1980, **19**:5734 ~ 5741
- 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(二部). 北京: 化学工业出版社 (The Pharmacopoeia Committee of People's Republic of China. *The Pharmacopoeia of People's Republic of China* (Section2). Beijing: Chemical Industry Press), 2000, 734 ~ 735
- 杨嘉树, 李令媛, 茹炳根. 蚯蚓体内一种纤溶酶原激活剂(e-PA)的分离纯化. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Jia-Shu, Li Ling-Yuan, Ru Bing-Gen. Purification and plasminogen activator from *Eisenia foetida*. *Chin J Biochem Mol Biol*), 1998, **14**(2): 156 ~ 163
- Butler P E, McKay M J, Bond J S. Characterization of meprin, a membrane-bound metalloendopeptidase from mouse kidney. *Biochem J*, 1987, **241**: 229 ~ 235
- 周元聪, 朱洪, 陈远聪, 陶宗晋. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia foetida*) 纤溶酶的分离纯化. 生物化学与生物物理学报 (Zhou Yuan-Cong, Zhu Hong, Chen Yuan-Cong, Tao Zong-Jin. Purification and biochemical characterization of the fibrinolytic enzyme from earthworm *Eisenia*

- foetida*. *Acta Biochim Biophys Sin* ,1988 ,**20** (1) :35-41
- 17 徐建明,张国桢,陈松鹤,等. 赤子爱胜蚓纤维蛋白溶解酶的亲和层析纯化和生化特性. 上海医科大学学报 (Xu Jian-Min, Zang Guo-zhen, Chen Shong-He, et al. Affinity chromatography and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Eisenia foetida*. *Acta Acad Med Shanghai*), 1991 ,**18** (4) :252 ~ 255
- 18 刘美艳,张双全. 蚯蚓纤溶酶的分离纯化及性质鉴定. 徐州师范大学学报 (自然科学版) (Liu Mei-Yan, Zhang Shuang-Quan. Purification and characterization of fibrinolytic enzymes from earthworm. *J Xuzhou Normal Univ (Natural Sciences)*), 2002 ,**20** (3) : 64 ~ 67
- 19 程牛亮,牛勃,张祖洵,赵景亥,单鸿仁. 双胸蚓纤溶酶的纯化及性质. 生物化学杂志 (Cheng Niu-Liang, Niu Bo, Zhang Zü-Xun, Zhao Jing-Hai, Shan Hong-Ren. Purification of some properties of fibrinolytic enzyme from Bimastos. *Chin Biochem J*), 1990 , **6** (2) :186 ~ 190
- 20 吴蓉,罗柚泉,陈石根. 双胸蚓纤溶酶的纯化及性质研究. 药物生物技术 (Wu Rong, Luo Xiu-Quan, Chen Shi-Gen. Isolation and characterization of one fibrinolytic enzyme from *Lumbricidae bimastos*. *Pharm Biotechnol*), 1998 ,**5** (2) :84 ~ 88
- 21 杨嘉树,李令媛,茹柄根. 蚯蚓体内一种纤溶酶原激活剂 (e-PA) 对 BAEE 的降解. 中国生物化学与分子生物学报 (Yang Jia-Shu, Li Ling-Yuan, Ru Bing-Gen. Degradation of benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) by a plasminogen activator from *Eisenia foetida* (e-PA). *Chin J Biochem Mol Biol*), 1998 ,**14** (4) :412 ~ 416
- 22 Tang Y, Liang D, Jiang T, Zhang J, Gui L, Chang W. Crystal structure of fibrinolytic enzyme component A: Revealing the structural determinants of its dual fibrinolytic activity. *J Mol Biol*, 2002 , **321** :57 ~ 68

治疗血友病药物 rF a 用于治疗脑出血

目前对大脑出血尚无有效的紧急治疗方法. 在罹患所谓出血性卒中的病人中,粗略估计有 60 % 的病人会在 1 年内死亡. 一项新的国际研究指出,有一种加速血凝的药物,若及时用于出血性卒中的病人,便可以减少死亡率与致残率. 有一项关于卒中后脑组织将如何发生损害的预测说明,该药物能减少受血液渗漏所损害的脑组织数量. 大脑出血杀死出血范围内的神经细胞和其它脑细胞,并威胁出血区周围的细胞. 如果医师能限制出血,则病人便有更好的恢复机会. 研究者在北美洲、欧洲、亚洲及大洋洲,用称为重组活化因子 (rF a) 的药于,静脉注射了 303 位出血性脑卒中病人. 该药物是血友病病人所用,商品名为 NovoSeven. 研究者将安慰剂静脉注射于其他 96 位出血性卒中病人. 这些病人在入院 24 h 后都施行了计算断层照相脑扫描以探测脑出血情况. 在入院后的第 2 d,接受该药物的病人比接受安慰剂的病人,脑出血少了一半. 在该项研究中,接受 3 种剂量中最大剂量的病人脑出血最少. 研究者在 2005 年 2 月 24 日的 *New England Journal of Medicine* 上作了报道. 在 3 个月后,接受安慰剂的病人中有 69 % 的人已死亡或严重致残,而接受 rF a 的病人中有 53 % 的人已残废或严重致残. 该药物有一个严重的副作用,会在某些病人的脑和心脏动脉中引起有害的血凝块. 在临床试验的中途发现的这个安全问题,使研究者对有凝血疾病史的病人,诸如以前曾有心脏病发作、胸痛或小腿静脉阻塞者,采取停药 rF a. 卒中治疗的成功在于尽快将卒中病人送往医院. 参与该项研究的卒中病人,全部都在 4 h 之内接受 rF a 治疗. 过了这个时间,自然凝血已中止了大部分出血,而给药凝血剂则有险无益. 有的医师建议,对大脑出血施行外科引流术,则可以减少出血性卒中病人的大脑损害. 但是,在 2005 年 1 月 29 日的 *Lancet* 上,有一个国际研究组的研究者报道,在出血性卒中病人中随机指定施行外科引流术者,其疗效不见得比不施行外科引流术的类似病人更好.

(李潇摘译 N. Seppa : *Science News* ,Feb 26 ,2005 ,Vol. 167 ,p. 133)