

蛇毒类凝血酶研究进展*

林奕心,余晓东,和七一,宋锡迅,李恒

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心,重庆 400047)

摘要 对有关蛇毒类凝血酶(SVTLEs)的分布分类、理化性质、酶学性质、结构特征、基因克隆表达、临床应用等方面的研究资料进行了概括和综述。结果发现 SVTLEs 主要分布在蝮亚科和蝰科毒蛇的毒液中,根据 SVTLEs 水解纤维蛋白原释放 FPA 和 FPB 的速度不同,可将其分为 SVTLE-AB、SVTLE-A 和 SVTLE-B 等 3 类;多数 SVTLEs 的分子量在 30~50 kD,含 6 个二硫键, pI 较低,部分 SVTLEs 的 pI 较高,SVTLEs 可水解 TAME 和 BAEE,其活性可被 DFP 和 PMSF 所抑制,但不被胰蛋白酶 trypsin 及凝血活性中心 His 的专一抑制剂 TLCK 和 EDTA 抑制;对 SVTLEs 的一级结构和二级结构研究较多,对高级结构研究有待深入,很多 SVTLEs 基因在大肠杆菌中成功获得了表达,但表达物不能被糖基化和正确折叠,故没有活性或活性不高,而其在真核表达系统中表达活性较高,部分碳水化合物具有稳定 SVTLEs 结构及提高 SVTLEs 的酶活力的作用,SVTLEs 的临床应用涉及心肌梗塞、缺血性中风、血栓性疾病等疾病的治疗。SVTLEs 未来的研究重点将集中于其在真核表达系统的表达和对其高级结构的解析。

关键词 蛇毒;类凝血酶 SVTLEs;凝血活性;蛋白结构

中图分类号:R973+.1 Q556+.9

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2009)02-0027-06

蛇毒含多种生物活性成分,其中多数为酶类和活性肽类。蛇毒类凝血酶(Snake venom thrombin-like enzymes, SVTLEs)是蛇毒中的一类丝氨酸蛋白酶,有精氨酸酯酶活性,能直接作用于纤维蛋白原释放血纤肽 A(FPA)或 B(FPB),导致纤维蛋白单体首尾聚合而凝固,所以这类酶被称为类凝血酶(Thrombin-like enzymes, TLEs)。但它在体内不激活凝血因子 XIII,并且由它水解生成的纤维蛋白不产生侧链交联,对纤溶酶的消化高度敏感,很容易被天然网状内皮系统或正常的纤溶作用所清除,因此可导致血浆中纤维蛋白原浓度显著下降,表现降纤、抗凝的效果^[1]。这些生物活性使 SVTLEs 有望成为治疗血栓性疾病的重要药物,同时也引发了人们从多种蛇毒中去筛选和获取 SVTLEs 的研发兴趣,并且已经从个别蛇毒中开发出治疗血栓性疾病的 SVTLEs 药物^[2-3]。本文就 SVTLEs 的种类、分布、理化酶学性质、结构特征、基因克隆表达及其临床应用等方面的研究进展进行综述,以期对有关研究开展有所帮助。

1 SVTLEs 的种类和分布

自 1936 年 Klobusitzki 和 Konig 首次用硫酸铵、

醋酸铅及透析法从矛头蝮蛇毒中获得 TLE 以来,迄今已从多种蛇毒中发现 40 余种 TLEs 组分^[4-5]。大量实验表明,眼镜蛇科和海蛇科毒蛇的毒液一般无 TLE 组份,而 TLE 主要分布在蝮亚科和蝰科毒蛇的毒液中^[6-7],包括尖吻蝮属(*Aghistrodon*):*A. acutus*、*A. bilineatus*、*A. caliginosus*、*A. c. contortrix*、*A. halys blomhoffii*、*A. h. pallas* 和 *A. rhodostoma*;矛头蝮属(*Bothrops*):*B. asper*、*B. atrox*、*B. barnetti*、*B. hyoprosus*、*B. insularis*、*B. jararaca*、*B. jararacussu*、*B. moojeni* 和 *B. pictus*;响尾蛇属(*Crotalus*):*C. adamanteus*、*C. atrox*、*C. durissus terrificus*、*C. h. horridus*、*C. r. ruber*、*C. v. helleri* 和 *C. v. oreganos*;巨蝮属(*Lachesis*):*L. muta*、*L. m. muta*、*L. m. noctivaga*、*L. m. rhombeata* 和 *L. m. stenophrys*;竹叶青属(*Trimeresurus*):*T. flavoviridis*、*T. gramineus*、*T. okinavensi* 和 *T. s. sumatranus*;以及真蝰亚科(*Viperinae*)的 *Cerastes cerastes*、*C. vipera* 和 *Bitis gabonica* 等。一般来说,上述毒蛇的毒液含有一种 TLE,而如美洲铜头蝮(*A. contortrix contortrix*)、菱斑响尾蛇(*C. atrox*)、矛头蝮蛇(*B. atrox moojeni*)、锯鳞蝰蛇(*Echis carinatu*)、角蝰(*C. vipera*)及白唇竹叶青(*T. albolabris*)等的毒液含有两种不同的 TLEs。根据 SVTLEs 水解纤维蛋白原释放

* 收稿日期 2008-09-27 修回日期 2008-12-15

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2006BA503)

作者简介:林奕心,男,硕士研究生,研究方向为药用资源动物学;通讯作者:余晓东, E-mail: yxd@cqnu.edu.cn.

FPA 和 FPB 的速度不同,可分为3类^[1,8-11]。一是 SVTLE-AB,水解释放 FPA 和 FPB 而使纤维蛋白原凝固,也可激活如 XIII,如加蓬蝰蛇(*Bitis gabonica*)蛇毒的 gabonase^[12];二是 SVTLE-A,仅切割纤维蛋白原的 A α 链,不会激活因子 XIII 或其它凝血因子,也不会导致血小板聚集;如红口蝰(*A. rhodostoma*)的 ancrod^[13]、矛头蝰(*B. atrox*)的 batroxobin^[14]、巨蝰(*L. muta muta*)的 gyroxin^[15-17]和响尾蛇(*C. adamanteus*)的 crotalase^[18];三是 SVTLE-B,仅切割纤维蛋白原 B β 链,不会激活因子 XIII,也不会导致血小板聚集,如美国铜头蝰(*A. contortrix*)的 contortrixobin^[19]。

2 SVTLEs 的理化酶学性质

多数 SVTLEs 的分子量在 30 ~ 50 kD 范围内,少数 SVTLEs 的分子量较大,如墨西哥蝰(*A. bilineatus*)的 bilineobin 分子量为 57 kD^[20]。与凝血酶的二硫键连接的双链结构不同,SVTLEs 均为 1 条肽链组成,有多个二硫键,不含游离巯基(flavoxobin 例外)。如朝鲜蝰蛇 calobin 和矛头蝰蛇的 catroxobin 含 12 个半胱氨酸残基,有 6 条二硫键^[21-22],Ancrod 含 13 个半胱氨酸残基,有 6 个二硫键^[23]。除了来自黄绿烙铁头(*T. flavoviridis*)的 flavoxobin 和来自角蝰(*C. vipera*)的 viperabin 不含糖外^[24],几乎所有的 SVTLEs 都是糖蛋白,含糖量最高可达 36%^[13]。多数 SVTLEs 的 pI 较低,有的 pI 低至 3.2,但有些 SVTLEs 的 pI 较高,如角蝰(*C. vipera*)中的类凝血酶 cerastobin 的 pI 为 7.7^[25]。

SVTLEs 对纤维蛋白原的作用较凝血酶更专一,它主要作用于纤维蛋白原的 1 条链(A α 或 B β),个别作用于 2 条链如 cabonase^[26]。SVTLEs 也不激活凝血因子 II、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII^[27]。并且 SVTLEs 即使在低浓度如 1 μ g/mL 时,其结构、功能对热也很稳定^[27]。来自热稳定性试验的数据表明,大部分的溶解纤维蛋白原的 SVTLEs 的抗热温度达 37 $^{\circ}$ C 以上^[28]。同时,SVTLEs 可水解甲苯磺酰精氨酸甲酯(TAME)和苯甲酰精氨酸乙酯(BAEE)。作为一种丝氨酸蛋白酶的功能^[29],SVTLEs 活性可被二异丙基氟磷酸酯(DFP)和苯甲基磺酰氯(PMSF)所抑制,但不被抗凝血酶 III、肝素、水蛭素等抑制剂所抑制^[27],而对胰蛋白酶及凝血活性中心 His 的专一抑制剂甲苯磺酰氯甲酮(TLCK)以及金属蛋白酶抑制剂二乙胺基四乙酸(EDTA)对其无影响。

3 SVTLEs 的结构研究

第一个有关 SVTLEs 的完整氨基酸序列是由 Itoh 等^[30]从 batroxobin 的 cDNA 序列中推导出来的,同时分析了它的基因序列。结果发现, batroxobin 与胰蛋白酶和激肽释放酶的外显子/内含子结构相一致,含有 5 个外显子和 4 个内含子。5 个外显子分别含有 240、151、260、134 和 728 个碱基对,其中后 4 个外显子编码成熟酶。外显子 1 包含了 1 个 5 非编码酶的糖端外,还包含 1 个较长的 3 非编码序列,活性位点的组氨酸、天冬氨酸和丝氨酸残基分别由外显子 2、3 和 5 编码。由于类凝血酶之间表现的高度同源性,可以认为它们都属于胰蛋白酶/激肽释放酶家族。成熟的类凝血酶由 2 ~ 5 个外显子编码,其公认的催化三联体残基由独立的外显子编码^[30-31]。

迄今为止,已得到多种 SVTLEs 的全部或部分氨基酸序列。通过对它们之间进行序列和结构分析表明^[32]: 1) 它们都还有高度保守的活性中心序列,其中含有 His、Asp 和 Ser 残基组成的酶活性中心; 2) 这些丝氨酸蛋白酶与胰蛋白酶类似,并且 N 末端序列高度保守; 3) 多数类凝血酶都具有 6 对二硫键,与凝血酶相比,这使得其构象更紧密,酶的动态结构可塑性更小; 4) 大多数类凝血酶的 N 末端为 Val 残基; 5) 除了 flavoxobin 和 fontortrixobin^[33] 不含糖基外,几乎所有的类凝血酶都是糖蛋白。与凝血酶不同的是,其寡糖链多与天冬酰胺连接,而不是与丝氨酸连接^[34]。

在蛋白质高级结构方面,Helena 等^[35]根据类凝血酶与凝血酶和胰蛋白酶之间较高的同源性以及酶学相似性,用凝血酶和胰蛋白酶做模型,精细地模拟了一种类凝血酶即 LM-TL 的高级结构(见封三彩图 1),用这个三维结构模型很好地解释了类凝血酶有关催化作用和生物活性的重要氨基酸残基,为进一步的结构与功能研究奠定基础。

4 SVTLEs 的基因表达研究

从蛇毒毒液中分离纯化类凝血酶数量有限,并且常因纯度难以控制而导致其它免疫副反应。基于对经济蛇种功能蛋白资源的保护以及解析类凝血酶结构和功能的需要,利用基因工程手段制备大量高纯类凝血酶就显得尤为迫切。

基因工程技术在类凝血酶研究中首次得到应用是在 1991 年, Maeda 等^[22]从矛头蝰蛇(*B. atrox moojeni*)

cDNA 文库中分离出类凝血酶 batroxobin 的 cDNA , 通过重组克隆到大肠杆菌中,融合蛋白以包涵体形式得到表达,经重新折叠获得了部分天然活性。此后,又有很多类凝血酶基因在大肠杆菌也成功获得了表达,如 pallase^[36]、pallabin^[37]、acutin^[38]; Mucrosobin^[39]、gloshedobin^[40]等,但活性不高,这是因为绝大部分类凝血酶都是糖蛋白,由于大肠杆菌表达系统本身的局限,即缺少蛋白质翻译后修饰的功能,使得表达产物不能糖基化,而这对蛋白质的内在特性和整体生物功能的体现是至关重要的^[41]。Yang 等报道长白眉蝮类凝血酶 Gussurobin 和大连蛇岛蝮类凝血酶 gloshedobin 在毕赤酵母中获得表达^[42-43]。这两种酵母重组类凝血酶都保持了较高的酰胺裂解活性,但精氨酸酯酶活性相对较低。2006 年, Muanpasitporn 和 Rojnuekarin^[44]在毕氏酵母中表达的泰国白唇竹叶青 (*T. albolabris*) 的类凝血酶 albobifibrase 并对其理化性质等进行了鉴定,证明了重组类凝血酶 albobifibrase 具有较高精氨酸酯酶活性, Bach 等人^[45]将 ancrod 的 cDNA 利用构建的载体转到鼠成纤维细胞 C127I 中,重组的 ancrod 可以从无血清的细胞培养上清液中获得。Geyer 等为了研究重组 ancrod 的糖基化特点,也将 ancrod 的编码序列克隆到牛乳头瘤病毒表达载体中,转染鼠成纤维细胞 C127I,获得了糖基化率达 31.5% 的重组 ancrod,令人兴奋的是重组产物与天然 ancrod 具有同样的比活^[46]。

5 SVTLEs 结构中的碳水化合物

在蛇毒丝氨酸蛋白酶中,碳水化合物含量占其质量的 5% ~ 30%^[47]。目前还不知道蛇毒丝氨酸蛋白酶的糖基化是否与抗热性能有关,但是碳水化合物组成成分和胰蛋白酶的相互作用显示,在胰蛋白酶的结构添加化学连接物^[48]或者在该酶的溶液中添加糖^[49]可显著性提高该酶的热稳定性, *B. jararaca* 蛇毒的一种高度糖基化和热稳定性的蛇毒丝氨酸蛋白酶 BPA 也显示了上述现象^[50], BPA 在抗 PH 值变化和维持其结构稳定过程中,碳水化合物起到了重要的作用^[50]。Hahn 等^[21]在研究 calobin 的性质时发现,当内切葡萄糖苷酶 F 作用于 calobin 后, calobin 的凝血酶活力下降到原来酶活力的 70%, 这表明糖链部分对酶起到稳定作用。直到现在,对蛇毒丝氨酸蛋白酶的碳水化合物组生化功能的充分认识的最有力证据是来自于 *A. actus* 蛇毒中两种几乎相同的酶的模式研究^[51]。这两种酶

在氨基酸序列 35 的位置是不同的,或者是 Asn 或者是 Asp,只有带有 Asn 的酶可抑制 SBTI,基于分子模型的研究,这种酶的碳水化合物组分是连接在 Asn35 上,而 Asn35 是阻断 soybean trypsin inhibitor (SBTI) 的结合位点。对 dgBJ-48 的研究表明, dgBJ-48 更易受到 SBTI 的影响,这同其模型研究是一致的,同时也表明糖基化的蛇毒丝氨酸蛋白酶有一种通用的典型抑制剂的抑制机制^[52]。

6 SVTLEs 的应用

SVTLEs 具有的生理特性表现为在体外其可作为促凝剂将纤维蛋白原转化为纤维蛋白,而在体内它们导致良性的降纤效应^[53]。因此自 1970 年以来,不论是在基础研究还是在临床应用方面, SVTLEs 都被广泛地关注。虽然 SVTLEs 的使用因其抗原性、蛇毒产量和高成本等因素而受到限制^[54],但是在临床上可用于心肌梗塞、缺血性中风、血栓性疾病等方面的治疗^[55],对肾病、红斑狼疮、病毒性肝炎及雷诺氏病等有一定疗效^[56]。一些 SVTLEs 被用于预防血栓形成及通过降低血液黏度来改善血液循环等。缺血性中风绝大部分是由脑血栓形成或脑血栓的基础上导致脑梗塞、脑动脉堵塞而引起的,用 *A. rhodostoma* 蛇毒类凝血酶 ancrod 对缺血性中风的病人进行临床研究表明:虽然稍微有出血的风险,但其疗效良好。 *B. atrox* 蛇毒的 batroxobin 在对体缺血/再灌注大鼠及临床实践方面有良好的疗效。因此, ancrod 和 batroxobin 作为治疗药物而被商业化生产。还有 3 种 SVTLEs 即 reptilase、crotalase 和 *A. contortrix* 蛇毒的 TLE 也具有商业化用途^[57]。蛇毒类凝血酶也应用于纤维蛋白原和纤维蛋白原降解产物的测定,也应用于异常纤维蛋白原血症的检测和应用于含肝素样品中的抗纤维蛋白酶 III 的测定^[58]。其他的 SVTLEs 成员作为降纤维蛋白原的试剂,也可能适用于治疗一些慢性和急性疾病。确认这些 SVTLEs 的所有底物是很重要的,因为这样将发现新的临床用途而不是如现在所知道的那样。

7 SVTLEs 研究展望

基因工程技术的应用使天然蛇毒资源和 SVTLEs 纯度的问题得到解决,但在以后的蛇毒研究中还需要改进表达系统,解决产物蛋白复性、后修饰及对宿主的毒性问题,这将对提高表达量和生物活性有重要意义。目前对类凝血酶结构的研究多限于

一级结构和二级结构,对其高级结构进行解析将成为未来研究重点。迄今为止,已分别得到的SVTLEs有 acuthrombin B^[59]、jararacussin^[60]、bothrombin^[61]和另外两种蛇毒丝氨酸蛋白酶^[51]结晶。因此,将可以利用晶体学等手段研究生物大分子的结构,从而从分子生物学的角度阐明其活性中心构造和酶催化机制。随着分子生物学、基因工程等生物技术的飞速发展,相信对SVTLEs的研究会越来越深入,使其能更广泛地用于基础研究并在医学领域上发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Markland F S. Snake venoms and hemostaic system[J]. *Toxicon*, 1998, 36(12) :1749-1800.
- [2] 覃公平. 中国蛇毒学[M]. 南宁 :广西科技出版社, 1998 : 507-538.
- [3] Lathan L Q, Stagger S I. Ancrod : the use of snake venom in the treatment of heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis undergoing coronary artery bypass grafting : nursing management[J]. *Heart Lung*, 1996, 25(6) :451.
- [4] Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms : an update inventory[J]. *Thromb Haemost*, 1998(79) :675-683.
- [5] Blomback B, Blomback M, Nilsson M, et al. Coagulation studies on 'Reptilase', an extract of the venom from *Bothrops jararaca*[J]. *Thromb diath haemorrh*, 1957(1) :76-86.
- [6] Pirkle H, Theodor I. Thrombin-like enzymes : structure and purification[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1990(281) :165-175.
- [7] Sandrine B, Cassian B, Anne W. Snake venom proteins acting on hemostasi[J]. *Biochimie*, 2000(82) :851-859.
- [8] Ouyang C, Teng C M, Huang T F. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation[J]. *Asia Pac J Pharmacol*, 1987(2) :169-179.
- [9] Pirkle H, Vukasin P, Theodor I, et al. Thrombin-like enzymes in the study of fibrin formation[M]//Pirkle. Marcel. New York : Dekker, 1988 :121-141.
- [10] Stocker K. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis[M]//Stocker K. Medical use of snake venom proteins. Boston : CRC Press, 1990 :97-167.
- [11] Meier J, Stocker K. Effects of snake venoms on hemostasis [J]. *Toxicon*, 1991(21) :171-182.
- [12] Gaffney P J, Marsh N A, Whalen B C. A coagulant enzyme from gaboon-viper : some aspects of its mode of action[J]. *Biochem Soc Trans*, 1973(1) :1208-1209.
- [13] Nolan C, Hall L S, Barlow G H. Ancrod, the coagulating enzyme from malayan pit viper (*Agkistrodon rhodostoma*) venom[J]. *Meths Enzymol*, 1976(45) :205-213.
- [14] Stocker K, Barlow G H. The coagulant enzyme from bothrops atrox venom (Batroxobin) [J]. *Methods Enzymol*, 1976(45) :214-223.
- [15] Da silva N D, Aird S D, Seebert C, et al. A gyroxin analogue from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*) [J]. *Toxicon*, 1989(27) :763-771.
- [16] Silveira A M V, Magalhaes A, Diniz C R, et al. Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*[J]. *Int J Biochem*, 1989(21) :863-871.
- [17] Magalhaes A, Fonseca B C B, Diniz C R, et al. The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme, gyroxin analogue from venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) [J]. *FEBS Lett*, 1993(325) :116-120.
- [18] Markland F S, Damus P S. Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake) [J]. *J Biol Chem*, 1971(246) :6460-6473.
- [19] Herzig R H, Ratnoff O D, et al. Studies of a procoagulant factor of southern copperhead snake venom : the preferential release of fibrinopeptide[J]. *Br J Lab Clin Med*, 1970(76) :451-465.
- [20] Suzukiand T, Takahashi H. Purification of two thrombin-like enzymes from the venom of *Agkistrodon caliginosus* [J]. *Toxicon*, 1984, 22(1) :29-38.
- [21] Hahn B S, Yang K Y, Park E M, et al. Purification and molecular cloning of calobin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (korean viper) [J]. *J Biochem Tokyo*, 1996, 119(5) :835-843.
- [22] Meada M, Satoh S, Suzuki S, et al. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme [J]. *J Biochem*, 1991, 109(4) :632-637.
- [23] Au C L, Lin S B, Chou J S, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for ancrod, a thrombin-like enzyme from the venom of *Calloselasma rhodostoma* [J]. *Biochem J*, 1993, 294(12) :38-389.
- [24] Asmar M F E L, Farid T M, Nasser H. Purification and partial characterization of viperabin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Cerastes vipera* (sahara sand viper) [J]. *Toxin*, 1992, 30(5) :505-510.
- [25] Farid T M, Tu A T, Farid E M, et al. Characterization of cerastobin, a thrombin-like enzyme of *Cerastes vipera* (Sahara sand viper) [J]. *Biochem*, 1989, 28(1) :371-377.
- [26] Pirkle H, Theodor I, Iyada D, et al. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*, purification, properties, and coagulant actions[J]. *J Biol Chem*, 1986(261) :8830-8835.

- [27] 肖昌华,孙欣.我国蛇毒凝血酶样酶的生物化学、药理学和临床应用[J].中国生化药物杂志,1991(2):13-20.
- [28] Smolka M B,Marangoni S,Oliveira B,et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, Balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*[J]. Toxicon,1998(36):1059-1063.
- [29] Pirkle H. Thrombin-like enzymes from snake venoms : an update inventory[J]. Thromb Haemost,1998(79):675-683.
- [30] Itoh N,Tanaka N,Funakoshi I,et al. Organization of the gene for batroxobin, a snake venom enzyme[J]. J Biol Chem,1988 263(16):7628-7631.
- [31] Wang Y M,Wang S R,Tsai I H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom : cloning, sequencing and phylogenetic analysis[J]. J Biochem,2001(354):161-168.
- [32] 张云,熊郁亮,王婉瑜,等.蛇毒丝氨酸蛋白酶的多样性[J].动物学研究,1994,15(4):7628-7631.
- [33] Amiconi G,Amoresano A,Boumis G,et al. A novel venom B from *Agkistrodon contortrix* : evidence for recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin[J]. Biochem,2000,39(33):10294-10308.
- [34] Peter C H,Rosemarie R H. *Dispholidus typus*(boom slang) snake venom : purification and properties of the coagulant principle[J]. Toxicon,1979,17(5):489-498.
- [35] Helena C,Dione M S,Charles C,et al. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme : thrombin and trypsin on a single catalytic platform[J]. Biochim Biophys Acta,2001,15(47):183-195.
- [36] 潘华,周元聪,杨冠珍,等.蝮蛇类凝血酶基因的分析及表达研究[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(1):79-82.
- [37] Fan C Y,Qian Y C,Yang S L,et al. Cloning of the cDNA of the thrombin-like enzyme(Pallabin) from the venom of *Agkistrodon halys pallas*[J]. Biochem Mol Biol Int,1999,47(2):217-225.
- [38] Pan H,Du X Y,Zhou Y C,et al. cDNA cloning and expression of acutin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon acutus*[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,255(2):412-415.
- [39] Guo Y W,Chang T Y,Lin K T,et al. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan habu) [J]. Protein Expr Purif,2001,23(3):483-490.
- [40] Yang Q,Li M,Xu J Q,et al. Expression of glosedobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*, in *Escherichia coli*[J]. Biotechnology,2003(25):101-104.
- [41] 许强,王克夷.异源表达系统中蛋白质糖基化[J].生物化学与生物物理学报,1999,31(2):111-115.
- [42] Yang Q,Hu X J,Xu X M,et al. Cloning, Expression and purification of gussurobin, a thrombin-like enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*[J]. Biochim Biophys Acta,2002,34(1):6-11.
- [43] Yang Q,Hu X J,Xu X M,et al. Expression, purification and partial characterization of recombinant glosedobin, a thrombin-like enzyme from the venom of *Gloydius shedaoensis*[J]. Prog Biochim Biophys,2002,29(3):390-396.
- [44] Muanpasitporn C,Rojnuckarin P. Expression and characterization of a recombinant fibrinolytic serine protease from green pit viper(*Trimeresurus albolabris*) venom[J]. Toxicon,2007,48(8):1083-1089.
- [45] Bach A,Strube K H,Koerwer W,et al. Ancrod proteins, their preparation and use : United States 6 015 685[P]. 2000.
- [46] Geyer H,Jacobi I,Linder D,et al. Glycosylation of recombinant ancrod from *Agkistrodon rhodostoma* after expression in mouse epithelial cells[J]. Eur J Biochem,1996,237(1):113-117.
- [47] Zaganelli G L,Zaganelli M G M,Magalhaes A,et al. Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacucu (*Bothrops jararacussu*) [J]. Toxicon,1996(34):807-819.
- [48] Villalonga M L,Reyes G,Fragoso A,et al. Chemical glycosidation of trypsin with O-carboxymethyl-poly-beta-cyclodextrin : catalytic and stability properties [J]. Biotechnol Appl Biochem,2005(41):217-223.
- [49] Fernandez L,Gomez L,Ramirez H L,et al. Thermal stabilization of trypsin with glycol chitosan[J]. J Mol Catal B,2005(34):14-17.
- [50] Cho S Y,Hahn B S,Yang K Y,et al. Purification and characterization of calobin II, a second type of thrombin-like enzyme from *Agkistrodon caliginosus* (Korean viper) [J]. Toxicon,2001(39):499-506.
- [51] Zhu Z,Liang Z,Zhang T,et al. Crystal structure and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteases[J]. J Biol Chem,2005(280):10524-10529.
- [52] Floriano P Silva J,Herbert L M,et al. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the *Bothrops jararacussu* venom with high selectivity for arg over lys in P1 : Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility [J]. Toxicon,2007(50):18-31.
- [53] Marsh N A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism—a consideration of their mechanisms practical

- applications and biological significance[J]. *Blood Coag Fibrinol* ,1994(5) :399-410.
- [54] Warkentin T E. Limitations of conventional treatment options for heparin-induced thrombocytopenia[J]. *Semin Hematol* ,1998(35) :17-25.
- [55] Herzig R H ,Ratnoff O D ,Shainoff J R. Studies on a procoagulant fraction of southern copperhead snake venom :the preferential release of fibrinopeptide b[J]. *J Lab Clin Med* ,1970(76) :451-465.
- [56] 韦世秀. 蛇毒中凝血酶样酶的研究[J]. *蛇志* ,1996 ,8 (2) :21-24.
- [57] Bell W R J. Defibrinogenating enzymes[J]. *Drugs* ,1997 (54) :30-31.
- [58] Stocker K F. Research ,diagnostic and medicinal uses of snake venom enzymes[M]/Bailey G S. *Enzymes from snake venom*. Boca Raton :CRC Press ,1998 :705-772.
- [59] Liu S J ,Huang Q Q ,Zhu X Y ,et al. Purification , characterization , crystallization and preliminary X-ray diffraction of acut thrombin-B ,a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon acutus venom*[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* ,1999(55) :1193-1197.
- [60] Bortoleto R K ,Murakami M T ,Watanabe L ,et al. Purification , characterization and crystallization of jararacussin-I ,a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*[J]. *Toxicon* ,2002 (40) :1307-1312.
- [61] Watanabe L ,Vieira D F ,Bortoleto R K ,et al. Crystallization of bothrombin , a fibrinogen-converting serine protease isolated from the venom of *Bothrops jararaca*[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* ,2002 (58) :1036-1038.

On the Study of Progresses of Thrombin-like Enzymes from Snake Venom

LIN Yi-xin , YU Xiao-dong , HE Qi-yi , SONG Xi-xun , LI Heng

(Chongqing Key Laboratory of Animal Biology , Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance , Biological Science , Chongqing Normal University , Chongqing 400047 , China)

Abstract : The study data of SVTLEs which is collected by the methods of biochemistry , molecular biology , bioinformatics and so on is summarized systematically in this article. Furthermore , SVTLEs' categories and distribution , physic-chemical properties , enzymatic properties , structure features , gene cloning and expressions , and clinical application and so on have been reviewed in the paper. We can find that SVTLEs mainly distribute between the venom of *Viperidae* and *Crotalidae*. SVTLEs are divided into three categories , namely , SVTLE-AB , SVTLE-A and SVTLE-B according to the different speeds of releasing fibrinopeptide A and fibrinopeptide B when SVTLEs hydrolyze fibrinogen. Many SVTLEs molecular weights are between 30 kD and 50 kD and have 6 disulfide bonds. Meanwhile , pI of most SVTLEs are lower and some are higher. SVTLEs can hydrolyze TAME and BAEE. Their activity can be inhibited by DFP and PMSF , but their activity could not be inhibited by TLCK and EDTA—the specific inhibitors of trypsin and blood coagulation active center-histidine active center. Meanwhile , Primary structure and secondary structure are more researched , and the higher structure will be the study emphasis in future. Meanwhile , Most genes of SVTLEs are successfully expression in *Escherichia coli* , but they can not be glycosylated and rightly folded. Therefore , SVTLEs' biological activity is either lower or not active in the *Escherichia coli* expression system , but they are higher in the Eukaryotic expression system. Some carbohydrates can be a stable structure and improve activity of SVTLEs and so on ; SVTLEs have been extensively used in patients victims of myocardium infarct , ischemia stroke , thrombosis and so on. So we can make a conclusion that the expression of SVTLEs in the Eukaryotic expression system and the study of their higher structures will be the research emphasis in future.

Key words : snake venom ; thrombin-like enzymes ; SVTLEs coagulation activity ; protein structure

(责任编辑 方 兴)

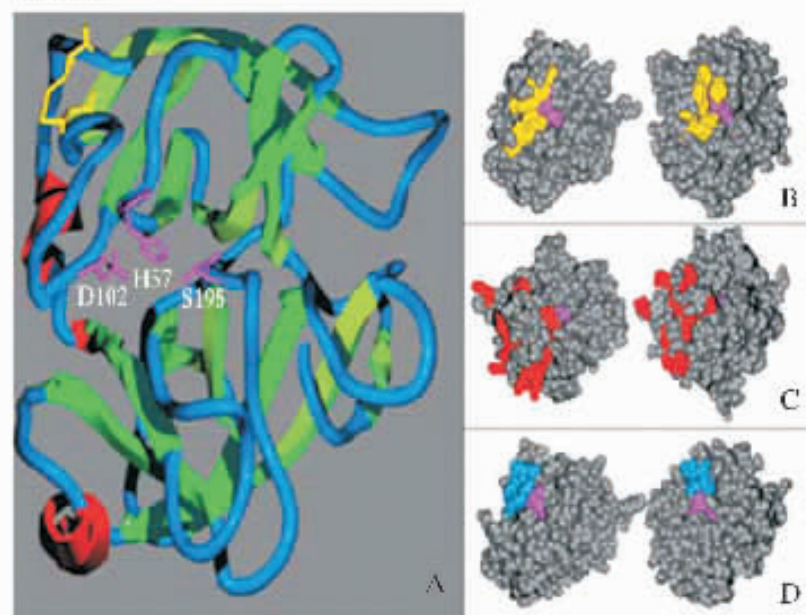


图1 以叶林蝎蛇(Lachesis muta)的SVTLE(LM-TL) 3D模型为代表的SVTLEs结构特征

Fig. 1. Structure and features of SVTLEs represented by the 3.3 model of LM-TL, a thrombin-like enzyme from *Lachesis muta*^[1]

④ (H+) 级结构——其具的螺旋氨基酸(亮氨酸/异亮氨酸和缬氨酸, 亮氨酸, 丙氨酸, 丝氨酸)组成的催化三联体(粉红色); 活性区域(蓝色); 二硫键(黄色); 磷酸化(紫色)和作为稳定的毒蛋白标志的半胱氨酸(棕色); B-D 二硫键的位置(以和凝血酶的结构(1)比较, 其中二硫键位置(黄色)比较, 显示LM-TL的活性区域(蓝色)和凝血酶的结合位点(红色); ⑤ (H+) ⑥ (H+) 环(棕色)和凝血酶307-318环(蓝色);