

抗凝血蛋白质分子的研究现状*

赵 静^{1**} 李东风²

(中国科学院生物物理研究所视觉信息加工重点实验室 北京 100101)¹

(华南师范大学生命科学学院 广州 510631)²

摘要: 凝血酶抑制剂、纤溶酶原激活剂 (t-PA、u-PA、SK 和 SAK 等)、蚯蚓纤溶酶和蛇毒抗凝血蛋白等是血栓类疾病领域的研究重点。纤溶分子突变体的应用、纤维蛋白水解特异性的增加、溶栓效率的提高以及半衰期的延长等是溶栓剂研究的方向。

关键词: 抗凝剂, 溶栓剂, 蛋白质分子

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0094-06

RESEARCH PROGRESS ON ANTICOAGULANT PROTEIN MOLECULAR

ZHAO Jing^{1,2} LI Dong-Feng²

(*Lab of Visual Information Processing, Center for Brain and Cognition Sciences,*

Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)¹

(*School of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 130024*)²

Abstract: It is a focus to study thrombosis, such as thrombin inhibitors, plasminogen activators (t-PA, u-PA, SK, SAK

* 中国科学院视觉信息加工重点实验室基金项目 (No. 891705)

** 联系人 Tel: 010-64889876, E-mail: herq@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-08-08. 修回日期: 2002-01-03

etc) and some thrombolytic enzymes. It should be getting more progresses in applying fibrinolytics mutants, improving the specificity on fibrinolytics, increasing the efficiency of thrombolysis and prolonging half-life period of thrombolytic.

Key words: Anticoagulant, Thrombolytic, Protein molecular

血栓类疾病, 如心肌梗塞 (acute myocardial infarction, AMI)、动脉血栓和脑梗塞等, 严重危害人类的身体健康, 如何防治该类疾病是目前临床与医药科学研究的热点。生理条件下, 体内的凝血系统和纤溶系统处于动态平衡 (图 1), 一旦血栓形成, 纤溶系统被启动, 使血栓得以清除。自然界存在大量具有抗凝、溶栓效应的活性物质, 我国传统中医在治疗方面已经有了上千年的历史。但是蛋白质分子溶栓剂在临床上的应用仅仅有 40 余年, 其发展过程可大致分为 3 个阶段: 第一代溶栓剂所有底物特异性较宽的特点, 对纤维蛋白的选择性较低, 如链激酶 (streptokinase, SK) 和尿激酶 (urokinase, UK) 或称尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 等; 第二代溶栓剂具有较高的纤维蛋白选择性, 如组织型纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 和尿激酶原 (prourokinase, pro-UK) 或称单链尿激酶型纤溶酶原激活物 (single-chain urokinase PA, scu-PA) 等; 第三代是利用基因工程和单克隆抗体技术对第二代溶栓剂进行改造, 包括 t-PA 突变体、重组组织型纤溶酶原激活剂 (recombinant t-PA, rt-PA)、pro-UK 突变体、重组 PA 嵌合体、纤维蛋白单克隆抗体与 PA 的结合体 (有导向溶栓作用) 等。另外第三代溶栓剂还包括一个重要的部分, 即新来源的溶栓剂, 如葡萄球菌激酶 (staphylokinase, SAK)、蚯蚓纤维蛋白溶解酶 (earthworm fibrinolytic enzyme, EFE)、蛇毒溶栓酶以及蝙蝠唾液的纤溶酶原激活物 (DS-PA 或 bat-PA) 等^[1-2]。

1 凝血酶的抑制剂

在动脉血栓形成过程中, 凝血酶 (thrombin) 与纤维蛋白 (fibrin) 结合, 形成结合凝血酶, 且始终保持酶活性, 不能被循环系统中的抑制剂灭活, 有强烈的致血栓作用。动脉中所形成的血栓是结合凝血酶的储藏库, 因此, 抑制凝血酶的产生,

并阻断其激活在治疗动脉血栓的过程中具有重要意义^[3]。最早发现的天然抗凝血物质是肝素, 在临床上已得到广泛使用。近年来研制的凝血酶抑制剂如水蛭素、Bivalirudin 和一些低分子量抑制剂作为肝素的替代品, 在临床实验中获得了较好的结果, 尤其与纤维蛋白溶解剂联合应用能增强疗效。

1.1 水蛭素 水蛭用于抑制凝血已有 2000 多年的历史, 1955 年 Markwardt 首先从水蛭唾液腺中分离出了水蛭素 (Hirudin, 65 或 66 个氨基酸残基), 发现具有抑制凝血酶的功能。它含有一个 Pro-Lys-Pro 单元, 不易被蛋白酶降解, 是水蛭素与凝血酶相互作用的必需氨基酸残基。不同种类水蛭所分泌的水蛭素, 尽管氨基酸序列有所不同, 但其三维结构和作用机制基本相似, 即水蛭素 C 端首先诱导凝血酶构象变化, 继而 N 端与

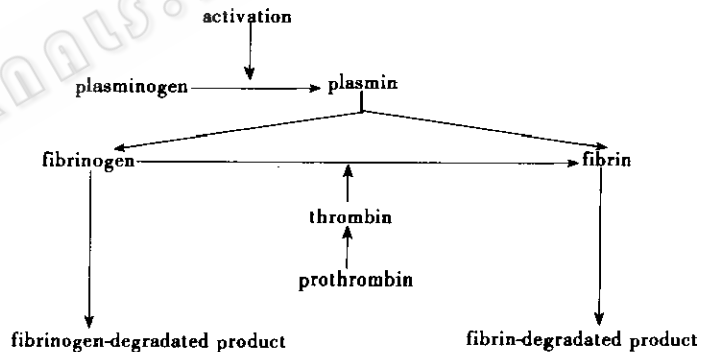


图 1 凝血和纤溶过程示意图

之结合形成稳定的复合物,抑制凝血过程。

水蛭还分泌多种影响凝血过程的蛋白质,按其作用机理与环节的不同,可分为^[4]:血小板糖蛋白(GP) IIb-IIIa拮抗剂、血小板聚集抑制物、胶原诱导的聚集抑制物、溶栓蛋白等。近年来,从欧洲医用水蛭(*Hirudo medicinalis*)中分离出十几种水蛭素的异构体,简称为HV₁、HV₂、HV₃等。HM₁、HM₂等是从亚洲水牛水蛭(*Hirudinaria manillensis*)中提取的异构体。HV₁和HV₂的基因已经被克隆,并在大肠杆菌和酵母细胞中表达。国内同行已在酵母中成功表达了水蛭素基因 hw_2 ,其表达产物具有生物学活性^[5]。

1.2 Bivalirudin Bivalirudin是由20个氨基酸残基组成的半合成多肽,能与凝血酶活性部位结合。与水蛭素一样,Bivalirudin也能同凝血酶结合形成1:1复合物,但抑制其活性的作用较为短暂^[3]。Bivalirudin还能通过激活蛋白C,水解并灭活V a、VIII a因子发挥抗凝血作用,而水蛭素没有这一作用。

Bivalirudin比水蛭素更安全、有效,应用范围更广泛。这可能与它只能短暂抑制凝血酶的活性有关。水蛭素与血栓溶解剂联合应用时必须减量,而Bivalirudin与链激酶联合应用时,血栓90min再通率明显增加,出血危险性比肝素少。Bivalirudin能降低心肌梗塞后高危病人的死亡率,比高剂量的肝素更安全,有可能提高给药剂量;剂量越大,抑制的凝血酶程度高,疗效则越好^[3]。

另外还有一些低分子量凝血酶抑制剂,大多数作用于凝血酶的活性部位,主要包括非共价类抑制剂和可逆共价类抑制剂这二类药物。

2 纤维蛋白溶解酶原激活物

2.1 组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂 t-PA属丝氨酸类蛋白酶,在生理条件下纤溶酶原(plaminogen, PLg)是其唯一的底物。作为第三代溶栓剂的rt-PA,能较好地与血栓中的纤维蛋白结合,将其表面的PLg转化为纤溶酶(plasmin),从而促进血栓的溶解。rt-PA与天然的t-PA相似,本身对PLg激活作用很弱,而当纤维蛋白存在时,其激活PLg的作用明显加强。在血栓内,rt-PA与纤维蛋白有极高的亲和力,对纤维蛋白上的PLg也有较高亲和力。因此rt-PA纤溶过程对血栓内纤维蛋白具有特异性,仅引起一定量的PLg激活和纤维蛋白原溶解,而不会象t-PA可能造成系统性出血的危险。rt-PA上的赖氨酸结合位点与纤维蛋白结合,其激活与纤维蛋白结合的PLg作用要比激活循环中游离的PLg快千倍以上^[1,6]。

Lanetoplasin (n-PA)是野生型t-PA突变体,在非糖基部分117位增强了与纤维蛋白的结合,因而有助于溶栓效果。TNK-组织型纤溶酶原激活剂(TNK-tPA)是基因重组的t-PA,改变了t-PA 3个部位所产生的新分子^[7],半衰期较rt-PA延长约5倍,可以静脉注射,对纤维蛋白特异性更高,因而较少使PLg降解。

2.2 尿激酶 20世纪50年代初发现了人体肾细胞产生的一种碱性蛋白酶,具有溶蛋白的活性,命名为尿激酶(Urokinase)。单链尿激酶型纤溶酶原激活物(scu-PA)是双链尿激酶的前体,又称为尿激酶原(pro-UK)。pro-UK在血液循环中不被抑制物所抑制,而且对纤维蛋白具有一定的亲和力。它可选择性地激活与纤维蛋白结合的PLg而变成纤溶酶,使血栓溶解;在血栓局部pro-UK又可被激活成UK,可增强pro-UK纤溶效

果^[7]。但是, pro-UK 也有一定程度的自降解现象, 这种特性会在治疗剂量下, 导致系统性 PLg 激活, 而引起出血。目前, 我国已采用基因工程研制出重组人尿型纤溶酶原激活剂 (ru-PA), 并设计出大规模生产的工艺。

2.3 链激酶 链激酶 (streptokinase, SK) 是最早应用于临床的溶血栓蛋白分子, 由 414 个氨基酸残基组成的多结构域非酶类蛋白质。它与血浆中 PLg 结合构成 1: 1 的复合物, 使 PLg 活性口袋发生构象变化, 能够激活另一纤溶酶原成为纤溶酶, 溶解纤维蛋白 (原)。重组链激酶 (recombinant SK, rSK) 是一种非选择性纤维蛋白溶解分子, rSK 与 PLg 的复合物能激活血栓中结合的 PLg 及血浆中游离的 PLg, 不仅能溶解血栓纤维蛋白, 还可激活血浆内的 PLg, 来耗竭血中的 α_2 抗纤溶酶 (α_2 -antiplasmin), 引起高纤溶酶血症, 降解血浆纤维蛋白原及凝血因子 V、VII、VIII 等, 导致严重的出血副作用^[8]。

2.4 葡激酶 金黄色葡萄球菌含有一种使血块溶解的复合物, 称之为葡激酶 (staphylokinase, SAK)。SAK 是由 136 个残基组成的单结构域非酶类蛋白质, 不能直接使 PLg 转变成纤溶酶, 但 SAK 和 PLg 形成复合物, 此复合物与 PLg-SK 复合物不同的是: 血浆中不存在纤维蛋白时, 会很快被 α_2 -抗纤溶酶所抑制, 因此在体内循环中避免了纤溶酶原 PLg 激活和消耗周围纤溶系统。当存在纤维蛋白时, 在纤维蛋白表面可以激活 PLg, 可能是 α_2 -抗纤溶酶及纤维蛋白分子间的作用, 赋予 SAK 这种纤维蛋白独特的选择性机制。当即使有微量的纤维蛋白存在时, SAK 在纤维蛋白表面, 也可通过与纤溶酶分子的赖氨酸位点结合, 形成有活性 SAK-纤溶酶 (原) 复合物, 这是 SAK 纤维蛋白特异性的基础。

第一代溶栓剂不能溶解富含血小板的血栓, 但是 SAK 对富含血小板的血栓及血浆中机械性挤压形成的血块都有溶解作用^[7], 这是 SAK 极为重要的优越性。重组葡激酶 (recombinant SAK, rSAK) 对凝血功能和纤溶系统的影响较 rSK 小, 发生出血的危险较小; 但是 rSAK 来源于微生物, 其抗原性强, 故使用受到一定的限制^[8]。

3 降解纤维蛋白 (原) 的溶解酶

3.1 蚯蚓纤维蛋白溶解酶 (蚓激酶) 蚯蚓体内存在即可水解纤维蛋白也可激活 PLg 的蛋白质, 统称为蚯蚓纤溶酶 (EFE), 对体内外血栓和纤维蛋白原均有显著的降解作用。

EFE 是一组丝氨酸蛋白水解酶。蚯蚓的种类不同, 由粉正蚓 (*Lumbricus rubellus*) 分离出来的酶含量和活性也不同。EFE 含有 6 个同功酶 (20, 000 ~ 40, 000D), 其中 EFE-III-1 和 EFE-III-2 被表征为胰蛋白酶类型, 底物特异性较宽^[9]; EFE-I-0、EFE-I-1、EFE-I-2 为胰凝乳蛋白酶类型; EFE-II 尚未确定其蛋白酶的类型^[10]。

这些组分都表现出体外溶纤活性, 但其溶纤效力与底物或抑制剂的专一性却存在差异。因为 EFE 中存在的抗凝成分, 可能是一类与肝素不同的耐热短肽或含双键的化合物, 具有不依赖抗凝血酶 III 而发挥抗凝作用。研究表明, 有活性的 EFE-III-1 还可被消化道完整吸收到血液循环中^[11]。EFE 还对器官移植导致的血栓形成有抑制作用, 提高移植器官适应性和存活率。它与抗癌剂合用时, 由于它能溶解癌细胞周围的纤维蛋白, 使得抗癌剂更易进入细胞, 提高杀伤癌细胞的能力, 所以 EFE 也是具有应用前景的抗癌辅助治疗剂。

3.2 蛇毒 蛇毒成份极为复杂, 其中有一类物质影响凝血和血小板凝聚系统。1963 年

Reid发现被马来亚红口蝮蛇(*Agkistrodon rhodostoma*)咬伤的病人,都有共同的特点,即凝血机能丧失,经研究表明蛇毒中含有与凝血酶相似的活性物质,在人体内将纤维蛋白原降解为不稳定的纤维蛋白微粒,最终在血液中迅速消失,而使血液呈低凝状态。此后,以蛇毒为原料的药物制剂陆续问世,但蛇毒的成分因其种类的不同而有差异^[12,13]。

(1) 红口蝮蛇毒素:是一种新型的蛇毒抗凝剂,主要降低血液中纤维蛋白原的浓度,降低全血和血浆的粘度、血小板数,从而防止血栓的形成和抑制继发性血栓,但不能溶解已形成的血栓。

(2) 巴曲抗栓酶(batroxobin, DF-521):由巴西蝮蛇毒中提取的单一成分,有分解纤维蛋白原、诱发t-PA释放、抑制血栓形成及分解血栓的作用。

(3) 类狼疮抗凝蛋白(Lupus Anticoagulants Like Protein, LALP):中国短尾蝮蛇蛇毒中存在着一种类似系统性红斑狼疮患者血浆中出现的狼疮性抗凝物(Lupus Anticoagulant, LA)。体内抗凝研究结果显示, LALP抗凝作用主要是通过磷脂的作用而干扰内源性凝血系统的抗凝物质,而无明显的溶栓活性和血小板聚集抑制作用。

(4) 抗凝血因子(anticoagulant factor, ACF):尖吻蝮蛇毒中富含一类影响凝血和血小板聚集的活性物质。现已分别从台湾尖吻蝮蛇毒和皖南尖吻蝮蛇毒中纯化出抗凝血因子ACFI和ACF II,二者具有显著的抗凝血活性。

3.3 虻虫溶纤活性蛋白 虻虫是一味传统昆虫中药,同水蛭一样都是吸血动物。我国同行从华广虻(*Tabanus amaenus* Walker)中提取出溶纤活性蛋白(fibrinolytic protein, TAFP),并发现TAFP不仅可以对血纤维蛋白(原)进行直接分解,还可以激活PL_g纤溶酶原间接分解纤维蛋白(原)^[14]。

另外,从纳豆中分离出的一种纳豆激酶(nattokinase),属丝氨酸蛋白酶,在体内的半衰期较长并具有良好的溶栓效果^[15]。来自米曲霉的米曲溶栓酶,也能够分解血凝块中的纤维蛋白和降低血浆中纤溶酶抑制物的浓度。

4 展望

我国已在溶栓和抗凝蛋白质分子的研究中取得令人瞩目的成绩,但是溶栓剂在应用上仍有一些问题尚未解决,包括最佳剂量、与血小板抑制剂的相互作用、与其它药物如低分子量肝素的联合应用,以及如何提高疗效等。在临床实际应用中,理想溶栓剂应具有以下主要的特征:可以有效地溶解陈旧血栓;能够以静脉注射的形式使用;具有高度的纤维蛋白选择性;颅骨内以及全身性出血的发病率低;没有促进凝血的作用;重新栓塞的几率小;对血压没有影响;价格合理等^[1]。

今后纤溶研究的方向和方向主要集中在:(1)进一步研究纤溶过程及病理生理意义,可能还会发现调节纤溶过程新的物质,现代纤溶的概念已远远超过了单纯的纤维蛋白溶解范畴。(2)新技术(特别是分子生物学和蛋白质工程的新技术)要更广泛地推广和应用,基因敲除及基因定点诱变已成为纤溶系统结构和功能研究的重要手段。(3)新的溶栓药物和溶栓疗法会进一步提高溶栓效果和特异性;抗凝剂和溶栓剂的联合应用,会减少出血的危险。因此,对新型溶栓剂开发和研制还有很大的空间和潜力。

致谢 我的导师赫荣乔博士对此文进行悉心审校,特此感谢!

参 考 文 献

- [1] Verstraete M. *Am J Med*, 2000, 109 (1): 52 ~ 58.
- [2] 张彦斌, 徐长法. 北京大学学报 (自然科学版), 2000, 36 (2): 286 ~ 294.
- [3] 李为民, 韩 薇, 傅世英. 心血管病学进展, 2000, 21 (2): 84 ~ 87.
- [4] 周 育, 朱圣庚. 中华血液学杂志, 1998, 19 (9): 497 ~ 499.
- [5] 周 靛, 姜 葵, 赫荣乔, 等. 生物物理学报, 1997, 13 (4): 531 ~ 535.
- [6] 李 岩, 那开宪, 李天潢, 等. 中国危重病急救医学, 1999, 1: 21 ~ 23.
- [7] 陈在嘉. 现代诊断与治疗, 2000, 11 (1): 1 ~ 3.
- [8] 秦智勇, 陈衍城, 葛汝村, 等. 中国危重病急救医学, 1999, 11 (3): 131 ~ 134.
- [9] Wu X Q, Wu C, He R Q. *Protein and Peptide Letter*, 2002, 9 (1): 75 ~ 80.
- [10] Nakajima N, Mihara H, Sumi H. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57 (10): 1726 ~ 1730.
- [11] Fan Q, Wu C, Li L, *et al.* *Biochimica et Biophysica Acta*, 2001, 1526: 286 ~ 292.
- [12] 麦炜颐, 曾群英, 李玉杰, 等. 临床心血管病杂志, 1999, 15 (1): 9 ~ 12.
- [13] 徐小龙, 刘清亮. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32 (1): 84 ~ 86.
- [14] 杨星勇, 和惊秋, 裴 炎, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (4): 580 ~ 583.
- [15] 张淑梅, 张云湖, 赵晓祥, 等. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (6): 912 ~ 915.