

地鳖纤溶活性蛋白的纯化及性质研究

Purification and Biochemical Character of a Fibrinolytic Protein from *Eupolyphaga sinensis*

韩雅莉^{1*} 李张伟²

HAN Ya-Li¹ and LI Zhang-Wei²

¹ 广东工业大学轻工化工学院生物工程系, 广州 510090

² 汕头大学理学院, 汕头 515063

¹ Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China

² College of Science, Shantou University, Shantou 515063, China

摘 要 通过硫酸铵分段沉淀、DEAE-纤维素柱和 Sephadex G-75 柱层析从雌地鳖(*Eupolyphaga sinensis* walker)体内分离纯化到一种相对分子质量约为 41.3kD 的纤溶活性蛋白。纤维蛋白平板测定表明,该蛋白具有纤溶作用,经 SDS-PAGE 电泳显示为一条带,含糖量为 10.5%。其水解纤维蛋白的比活力为 547.86u/mg。该成分受蛋白抑制剂和丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 的抑制,但 EDTA 对其影响不大,提示该成分属于丝氨酸蛋白酶类。该成分在 40℃ 下基本稳定,最适温度 40℃,最适 pH 为 8.0,其激活纤维蛋白溶解酶(PLG)的机制与尿激酶(UK)有一定区别。推测其可能是一种新的地鳖纤溶酶组分。

关键词 地鳖,纤溶活性蛋白,分离纯化,性质

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0639-05

Abstract A novel of fibrinolytic protein has been separated and purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose and SephadexG-75 Column chromatography from the tissue of the female *Eupolyphaga sinensis* in the paper. The protein showed an apparent molecular weight of 41.3 kD on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis. In addition, it includes 10.5% sugar. Its specific activity to hydrolyze fibrin was 547.86u/mg. The enzyme activity was inhibited by Mg^{2+} , Ca^{2+} , protein inhibitors, such as 8mol/L urea and 1% β -mercaptoethanol, and serine protease inhibitor such as phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), but wasn't inhibited by Na^+ , K^+ and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). The protein was stable under 40℃ and it's optimal temperature was also 40℃. It's optimal pH was 8.0. It showed a different way between the activity and UK when they degrade the plasminogen. Based on all the messages the protein can be suggested to be a novel fibrinolytic protein. There have been no such component of fiberinolytic enzyme from *Eupolyphaga sinensis* walker reported yet.

Key words *Eupolyphaga sinensis* walker, fibrinolytic protein, purification, character

Received: December 19, 2005; Accepted: March 14, 2006.

This work was supported by the grants from the Guangdong Sciences Foundation of China (No. 04010984) and the Sciences Foundation of Guangdong University of Technology (No. 050009).

* Corresponding author. Tel: 86-20-31740189; E-mail: ylhan@stu.edu.cn

广东省自然科学基金项目(No. 04010984)和广东工业大学人才引进基金(No. 050009)项目资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

地鳖虫(*Eupolyphage sinensis walker*),又名土元、地鳖,属昆虫纲蜚蠊目鳖蠊科,为《中华人民共和国药典》记载的正品种药材,是传统的活血化瘀类动物药,祖国医学记载和丰富的临床经验早已证明其具有破血逐瘀、续筋接骨、消炎散结、舒经活血、疗伤止痛等重要功效^[1]。现代药理试验也充分证明,地鳖虫具有溶解静脉血栓、抑制血小板聚集、抗凝血等药用功效^[2]。目前对其主要抗凝血纤溶活性物质及其作用机制方面的研究很少,本文以新鲜地鳖为原料,采用硫酸铵分段盐析方法,经离子交换分离、分子筛以及电泳技术,并结合纤溶活性实验等方法,从地鳖体内分离纯化到一种具纤溶活性成分,并对其部分生化性质进行了研究,这为进一步探究地鳖虫活血化瘀作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

地鳖(*Eupolyphage sinensis walker*)成虫(雌性)活体,购自安徽滁州光明养殖场,经笔者分类鉴定,标本保存于汕头大学标本室。DEAE-DE52为Whatman产品。Sephadex-G75为Pharmacia产品。低分子量标准蛋白(1.44kD~9.74kD)为中科院上海生化所产品。牛血清白蛋白(BSA)标准品、牛血纤维蛋白溶酶原(Plg)、牛血纤维蛋白原(Fn)和尿激酶(UK)均购自中国药检所。其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 地鳖纤溶活性成分的分离纯化 选择健壮活地鳖虫数只,洗净晾干,处死称重,剪碎,按W/V=1:5加入预冷的0.01mol/L磷酸钠缓冲液(pH7.4),研磨至糜状,4℃浸提过夜。8500r/min,4℃离心15min,去沉淀,上清液加固体硫酸铵分段盐析,取40%~65%饱和度盐析组分透析浓缩,得到粗提液。将粗提液过DEAE-DE52离子交换纤维素柱纯化(2.0cm×30cm,预先用0.02mol/L pH 8.0 Tris-HCl缓冲液平衡),用含0~0.8mol/L NaCl的0.02mol/L pH 8.0 Tris-HCl缓冲液梯度洗脱,流速0.7mL/min,分部收集器收集,每管收集5.0mL,UV mini-1240型紫外可见分光光度计测 A_{280nm} 值。对各个蛋白质峰做纤溶检测实验,将纤溶活性峰组分收集并浓缩。浓缩液经Sephadex-G75柱(2.0cm×50cm,用0.02mol/L pH 8.0 Tris-HCl缓冲液平衡纯化),洗脱液洗脱,流速为0.5mL/min,每管收集3mL。收集活性峰,冻干备用。层析过程分别用分光光度法和血纤维蛋白琼脂

平板法测定 A_{280} 值和纤溶活性。

1.2.2 纤溶活性测定 参照Astrup的方法^[3]制备纤维蛋白平板,在琼脂平板上打孔(直径7.0mm),每孔加20 μ L样品,对照孔加20 μ L缓冲液,置37℃保温24h,测量溶圈两垂直直径,以UK为标准品,以两垂直直径之积求对数值制作标准曲线,将样品的纤溶圈面积换算成UK单位。

1.2.3 SDS-PAGE 测定样品纯度和分子量 :SDS-PAGE浓缩胶T=3%,分离胶T=12%,用考马斯亮蓝R-250染色。蛋白质浓度采用Bradford法^[4],以BSA为标准作标准曲线。

1.2.4 地鳖纤溶活性成分性质研究 :参照文献^[4]的方法,用0.01mol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液溶解样品冻干粉进行酶学性质测定。

(1)金属离子、变性剂和抑制剂对地鳖纤溶活性成分激酶活性的影响:取NaCl、KCl、MgCl₂、CaCl₂、尿素、巯基乙醇(BME)、乙二胺四乙酸(EDTA)和苯基甲基磺酰氟(PMSF)等分别与一定量的样品溶液混合,纤维蛋白平板法测定酶活力。

(2)温度和pH对地鳖纤溶活性成分活性的影响:将样品溶液分别置于10组(25℃~75℃)温度下处理10min,然后用纤维蛋白平板法测定其酶活力;将样品溶液稀释于不同pH值缓冲液中(pH6~pH8用磷酸缓冲液,pH8.5~pH10用甘氨酸-NaOH缓冲液,pH10.5~pH11.5用NaOH调生理盐水后),纤维蛋白平板法测定酶活力。

(3)样品含糖量测定:采用蒽酮-硫酸法测定样品含糖量。

(4)激活血纤维蛋白溶酶原(Plg)作用的测定:参考Walther等^[5]的方法,取10 μ g/ μ L牛血Plg 3 μ L,分别与8单位UK及相当于8单位的地鳖纤溶活性成分溶液混合,37℃孵育2h,各取15 μ L进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检查Plg激活情况。

(5)地鳖纤溶活性成分纤溶反应机制实验:市售的纤维蛋白原中往往含有一定的纤溶酶原,将制好的纤维蛋白平板置80℃处理30min,使其中的纤溶酶原全部失活,制成去纤溶酶纤维蛋白平板。以UK为对照,检测地鳖纤溶活性蛋白的纤溶活性。

2 结果和讨论

2.1 地鳖纤溶活性成分的分离纯化

地鳖提取液经硫酸铵分段盐析后,经检测大部分有纤溶活性物的成分存留在饱和度40%~65%
© 2006 China Biotechnology Association

盐析段内,硫酸铵浓度低于 40% 或高于 65% 盐析段内沉淀物中纤溶活性物成分含量极低,由此可以确定地鳖纤溶活性成分最佳硫酸铵盐析浓度为 40% ~ 65% (图 1)。

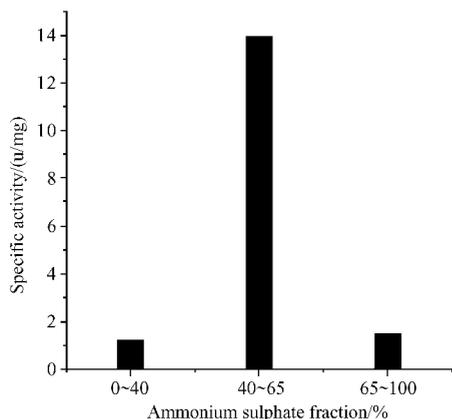


图 1 地鳖纤溶活性成分盐析浓度

Fig.1 Fractional salting out of the fibrinolytic activity protein from *Eupolyphaga sinensis*

将 40% ~ 65% 盐析沉淀物回溶、透析后的粗提液过 DEAE-DE52 柱,出现了两个蛋白峰(图 2),实线峰样品纤溶活性极弱,主要为杂蛋白;虚线为纤溶活力峰,收集此峰后过 Sephadex-G75 柱纯化,得到两个蛋白峰(图 3);经纤溶活性检测,第一个峰无活性,第 2 个峰为纤溶活性峰,收集此活性部分,浓缩、脱盐,得到纯化的地鳖纤溶活性成分,对此成分经进行 SDS-PAGE 检测,电泳图谱显示为一条带(图 4),说明得到的地鳖纤溶活性成分为一单链多肽,相对分子质量为 41.3kD,测定其比活力为 547.86u/mg (表 1)。

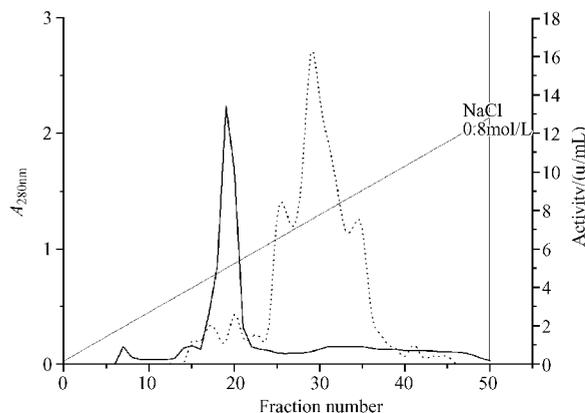


图 2 地鳖纤溶活性成分 DEAE 柱层析

Fig.2 The fibrinolytic activity protein from *Eupolyphaga sinensis* by DEAE-cellulose column chromatography
— OD_{280} ; - - - Fibrinolytic activity.

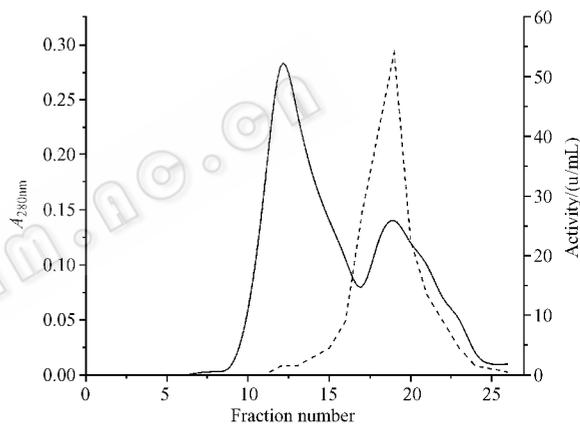


图 3 地鳖纤溶活性成分 SephadexG-75 凝胶过滤

Fig.3 The fibrinolytic activity protein from *Eupolyphaga sinensis* SephadexG-75 column chromatography
— OD_{280} ; - - - Fibrinolytic activity.

表 1 鳖纤溶活性成分的提取纯化

Table 1 The purification of the fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis*

Purification step	Total protein/mg	Total activity/u	Specific activity(u/mg)	Recovery rate/%	Purification factor
40% ~ 65%($(NH_4)_2SO_4$ precipitate	150	2095	13.96	100	1.0
DEAE-cellulose chromatography	8.65	917	106.13	43.8	7.6
Sephadex G-75 gel filtration	0.83	457	547.86	21.8	39.2

2.2 金属离子、变性剂以及抑制剂对地鳖纤溶活性蛋白的影响

用金属离子对纯化的地鳖纤溶活性物进行纤溶活力实验,结果表明(表 2), Na^+ 和 K^+ 对其纤溶活力基本无影响,而 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 则对其活力有一定的抑制作用。用变性剂尿素和巯基乙醇处理地鳖纤溶活性物表明,8mol/L 的尿素和 1% 的巯基乙醇可完全抑制其活力(表 3),这可能是由于变性剂破坏了蛋白质中二硫键,有关实验证明,某些二硫键是生物活性所必需的,另一些则在维持蛋白质构象方面起

重要作用。抑制剂 EDTA 和 PMSF 对地鳖纤溶活性成分活力影响的实验表明,不同浓度 EDTA 对地鳖纤溶蛋白影响不大,表明纤溶蛋白不属于金属酶类;而丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 则能完全抑制该蛋白的纤溶活性,表明地鳖纤溶活性蛋白可能属于丝氨酸类蛋白酶类。

2.3 温度、pH 对地鳖纤溶活性蛋白稳定性的影响

图 5 为温度对地鳖纤溶活性蛋白的影响。35℃ 下地鳖纤溶活性蛋白活性基本稳定,温度高于 35℃ 时其活力迅速下降,在 55℃ 温育 30min 或在 75℃ 下

10min 其活力完全丧失。实验表明地鳖纤溶活性蛋白的最适反应温度约为 40℃(图 6),最适 pH 为 8.0(图 7)。

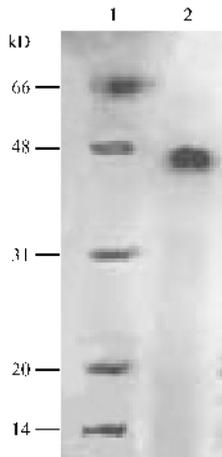


图 4 SDS-PAGE 测定纤溶活性蛋白分子量

Fig.4 Estimation of molecular weight of the fibrinolytic activator protein on fibrin plate

1: protein marker; 2: the purified protein.

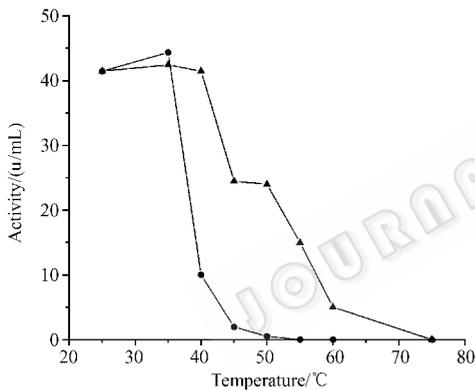


图 5 温度对地鳖纤溶活性蛋白的影响

Fig.5 The effect of temperature on the fibrinolytic protein

from *Eupolyphaga sinensis*

—●— 30min; —▲— 10min.

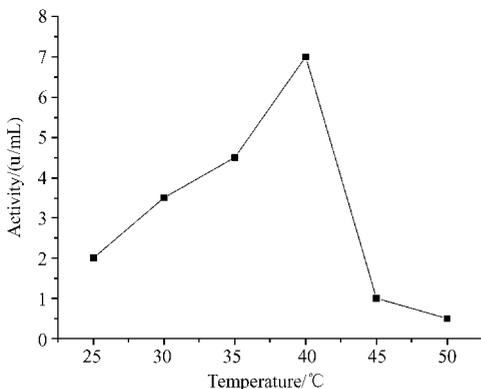


图 6 地鳖纤溶活性蛋白的反应温度曲线

Fig.6 The reactive temperature of the fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis*

表 2 各种金属离子对地鳖纤溶活性蛋白的影响

Table 2 The effect of various metal ions on the activity of the fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis*

Metal salt	Concentration (mg/mL)	Residual activity (u/mL)	Recovery rate/%
NaCl	80	6.0	94
KCl	80	6.0	94
MgCl ₂	80	3.0	47
CaCl ₂	80	2.5	39
Control	-	6.4	100

表 3 抑制剂对地鳖纤溶活性蛋白的影响

Table 3 The effect of inhibitors on the activity of the fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis*

Inhibitors	Concentration	Residual activity (u/mL)	Recovery rate/%
urea	4mol/L	5.5	86
	8mol/L	0	0
BME	0.5%	0.6	9
	1%	0	0
EDTA	0.75mg/mL	4.6	72
	1.5mg/mL	3.5	55
PMSF	1mg/mL	0	0
	2mg/mL	0	0
Control	—	6.4	100

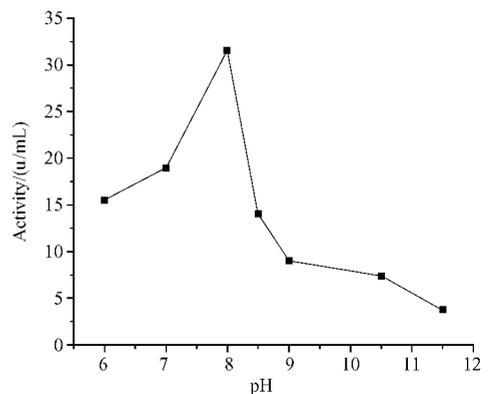


图 7 地鳖纤溶活性蛋白反应的最适 pH

Fig.7 The reactive pH of the fibrinolytic protein from *Eupolyphaga sinensis*

2.4 地鳖纤溶活性蛋白纤溶机制

通过加热平板法对样品的测定(图 8),中 1 号样品为 0.2u 的 UK;2 号样品为 5 μ g 纯化的地鳖纤溶活性物;3 号样品为对照,以溶解平板纤维蛋白的面积计算酶的活性,可以看到 2 号溶纤的面积远远大于 1 号 UK。表明从地鳖中分离出的 41.3kD 蛋白质(2 号样品)具有很强的纤溶活性,然后采用 SDS-PAGE 电泳分别对该纤溶活性蛋白和 UK 进行激活,PL 比较(图 9),发现两者作用方式有所差

异,UK 将 PL_g 的 A 亚基分解为 D 和 E 两个片段,从而将无活性的纤溶蛋白酶原(PL_g)激活成为具有活性的纤溶蛋白酶,后者具有水解纤维蛋白的作用。而地鳖纤溶活性蛋白则将 PL_g 的 A、B 和 C 三个亚基水解成为更小的片段,在电泳图谱上几乎没有显示出明显的条带。这一结果表明地鳖纤溶活性物纤溶作用方式与 UK 不同。提示地鳖纤溶活性物有可能作为纤溶酶而直接作用于纤维蛋白而使其溶解。



图 8 纤维蛋白平板测定提取物的纤溶活性

Fig.8 The fibrinolytic activity of the enzyme by protein from *Eupolyphaga sinensis* by SDS-PAGE

1 : 0.2u UK ; 2 : 5µg enzyme ; 3 : control.

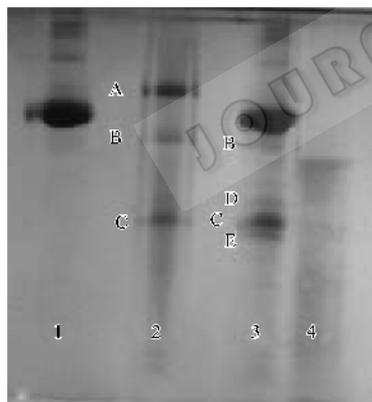


图 9 用 SDS-PAGE 检测 PLG 的降解作用

Fig.9 The degradation of PLG showed by SDS-PAGE

1 : UK 2 : PLG 3 : PLG + UK 4 : PLG + enzyme.

2.5 糖量测定

参照文献 [4] 用 Molish 反应测定了纯化后地鳖纤溶活性蛋白的含糖情况,实验结果为阳性,即样品溶液与浓硫酸两液面出现紫色环。再通过蒽酮-硫酸法测定地鳖纤溶活性物质中含糖量,以葡萄糖为标准,测得地鳖纤溶活性物质中糖含量为 10.5%。表明地鳖纤溶活性蛋白可能是一种糖蛋白。

本研究从地鳖中所得到的纤溶活性蛋白与李卫星等 [6] 从地鳖中分离得到一种类似纤溶活性蛋白存在显著差异,二者分子量也完全不同,李卫星等得到的蛋白相对分子质量为 6.8kD,而本研究得到的纤溶蛋白相对分子质量为 41.3kD,此外,经检测前者仅具有纤维蛋白溶酶原激活物的作用,而本实验得到的活性物具有直接纤溶活性,因此,这两种溶纤物质不是同一种蛋白质。本实验得到的纤溶活性物是目前国内尚未见报道的一种新的纤溶酶组分。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yang YK (杨耀芳), Yang XW (杨谢雯), Wang SQ (王赛前) *et al.*. Study the pill of *Eupolyphaga sinensis* on analgesia effect, invigorate the circulation of blood and erythrocyte immunity. *Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药), 2003, **25**(6) : 496 - 498
- [2] Wang Y (王怡), Weng WL (翁维良), Liu JG (刘剑刚). Comparison research on effect of animality promoting blood circulation to remove blood stasis (PBCRS) traditional Chinese medicine on hemorheology. *Chinese Journal of Herbal Pharmacology and Therapeutics* (中药药理与临床), 1997, **13**(3) : 1 - 4
- [3] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs Biochem Biophys*, 1952, **40** : 346 - 351
- [4] Li JW (李建武). *Biochemistry Experiment Principle and Method* (生物化学实验原理和方法). Beijing : Beijing University Press, 1994, pp. 216 - 223
- [5] Walther PJ. Activation of human plasminogen by urokinase. Parial characterization of a pre-activation peptide. *J Biol Chem*, 1974, **249** : 1173
- [6] Li WX (李卫星), Wang ZK (王中枢). Studies on the plasminogen activator-like component of *Eupolyphaga sinensis* Walker. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 1989, **21**(4) : 299 - 306