钙II)对尖吻蝮蛇毒抗凝血因子 I的抗凝血活性的影响

徐小龙 刘清亮*

(中国科学技术大学化学系,合肥 230026)

皖南尖吻蝮蛇毒抗凝血因子 I (ACF I)不具有酶的活性,通过与活化凝血因子 X (FXa)结合成 1:1 的复合物来延长凝血时间。用高效液相色谱分析方法,发现 ACF I与 FXa 的结合反应依赖于 Ca²⁺浓度,ACF I与 FXa 的 最大结合反应所需要的 Ca²⁺浓度为 1mmol·L⁻¹。稀土和过渡金属离子对 ACF I的荧光有淬灭作用,相反,Ca²⁺ 对 ACF I的荧光有增强效应。Ca²⁺对维持 ACF I的特定构象起着重要作用。Ca²⁺诱导的 ACF I构象变化可能是 ACF I与 FXa 结合的必要条件。

关键词: 结合蛋白 抗凝血因子 I 活化凝血因子 X 钙离子 分类号: Q51

蛇毒中存在多种抗凝蛋白,它们影响凝血系统^[1]。路阳等^[2]从皖南尖吻蝮(Agkistrodon acutus)蛇毒中分离出一个抗凝血因子 ACF(Anticoagulation factor),本实验室对 ACF 的结构和性质已作过一些报道^[3-4]。最近我们从该蛇毒中纯化出一个新的抗凝血因子 ACF II (Anticoagulation factor II)^[5],因而将前者重新命名为抗凝血因子 I (Anticoagulation factor I)。ACF I不具有酶的活性,它具有独特的抗凝机理,通过与活化凝血因子 X (Activated coagulation factor X,FXa)的结合来抑制凝血反应,因而表现出显著的抗凝血活性^[6]。因此 ACF I属于新近发现的凝血因子 IX/凝血因子 X 结合蛋白家族,这一家族的共同特点是,它们都是通过与凝血因子 IX/活化凝血因子 IX 或凝血因子 X/活化凝血因子 X 的结合来抑制凝血反应^[7]。ACF I没有出血活性和毒性,是一种潜在的高效蛇毒抗栓药物。本文用高效液相色谱分析方法,对ACF I与 FXa 的结合反应进行了进一步研究,发现 ACF I与 FXa 的结合反应中所起的作用。

1 实验部分

1.1 材料

尖吻蝮蛇毒冻干粉购于安徽屯溪蛇伤研究所, DEAE-Sephadex A-50、Sephadex C-75 和 CM-Sephadex C-50 为 Pharmacia 公司产品, FXa 为中科院生态环境中心赵超先生惠赠, 其他试 剂均为国产分析纯, 所有试剂均用 Milli-Q 超纯水配制。

1.2 方法

1.2.1 ACF I的分离纯化

ACF I的分离纯化,采用 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-75 和 CM-Sephadex C-50 三步层 析方法^[5]。将纯化的 ACF I溶液对 0. 02mol・L⁻¹ Tris-HCl pH 7. 6(内含 5mmol・L⁻¹ EDTA)溶液

收稿日期:2000-08-31。收修改稿日期:2000-11-12。

安徽省自然科学基金资助项目(No. 00044428)。

*通讯联系人。E-mail: qliu@ ustc. edu. cn。

第一作者:徐小龙,男,36岁,博士,讲师;研究方向:生物无机化学。

第2期

透析 24 h 后,再对 Milli-Q 超纯水透析 48 h,以制备脱钙 ACF I(apo-ACF I)。

1.2.2 高效液相色谱分析

先将 0. 5nmol FXa、0. 5nmol ACF I和两者混合物在 0~2mmol・L⁻¹ Ca²⁺的条件下作用 30min,然后分别将它们加入到 5060 型高效液相色谱(Varian,美国)的凝胶过滤分离柱(G2000 SW,0.75×30cm)中。进样量均为 100µL,洗脱液为 0.02mol・L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 缓冲液,内 含 0. 1mol・L⁻¹ NaCl 和 0~2mmol・L⁻¹ CaCl₂,流速均为 1.0mL・min⁻¹, UV-100 在 280nm 处 检测。

FXa 结合 ACF I后,分子量增大,洗脱峰的位置前移,峰的面积增大。洗脱峰面积增大的部 分是结合在 FXa 上的 ACF I所贡献,因此, FXa 与 ACF I结合前后的洗脱峰面积差值反映出结 合在 FXa 上 ACF I的量。已结合的 ACF I与 FXa 的比值(r)可由下式计算:

$$r = \frac{\left[\operatorname{Area}_{\operatorname{peakl}} - \operatorname{Area}_{\operatorname{FXa}}\right] \left[A \frac{1\%}{280} (\operatorname{FXa})\right] \left[Mr(\operatorname{FXa})\right]}{\left[\operatorname{Area}_{\operatorname{FXa}}\right] \left[A \frac{1\%}{280} (\operatorname{ACF I})\right] \left[Mr(\operatorname{ACF I})\right]}$$
(1)

式中, Area_{FXa} 为 0. 5nmol FXa 的洗脱峰面积, Area_{peak1} 为 0. 5nmol FXa 与 0. 5nmol ACF I混合物 的 HPLC 图谱中第一洗脱峰面积, 该峰是由 FXa-ACF I复合物和未结合的 FXa 所共同贡献。 A \ [5](FXa)为 FXa 的 280nm 紫外吸收系数, A [5](ACF I)为 ACF I的 280nm 紫外吸收系数, *M*r(FXa)和 *M*r(ACF I)分别为 FXa 和 ACF I的分子量。

1.2.3 荧光光谱分析

采用 850 型荧光分光光度计(日立),液池光径 1cm,激发波长 280nm,滤光片波长 310nm, 蛋白质浓度 1µmol・L⁻¹。

1.2.4 ACF I和 FXa 的浓度测定

采用 280nm 紫外吸收方法, A 添(ACF I) = 30, A 添(FXa) = 10, Mr(ACF I) = 29600, Mr (FXa) = 45300。

2 结果与讨论

2.1 Ca²⁺对 ACF I与 FXa 结合反应的影响

我们曾用电泳和抗凝血活性实验方法,发现 ACF I与 FXa 结合生成 1:1 的复合物。这里我 们进一步用 HPLC 方法分析 ACF I与 FXa 之间的结合反应。ACF I、FXa 和 ACF I与 FXa 混合物 的 HPLC 图谱见图 1。在 1mmol·L⁻¹ Ca²⁺条件下,ACF I和 FXa 分别呈现单峰(图 1(A),3,2); 而 ACF I和 FXa 的混合物 (摩尔比 1:1)经过 HPLC 分离后,呈现一个主峰,且峰位较 FXa 的峰 位前移(图 1(A),1),另外,在对应于 ACF I峰位上,还有一个小峰,这是部分未结合的 ACF I所 致。这说明,ACF I和 FXa 在 1mmol·L⁻¹ Ca²⁺的条件下形成了复合物。由于复合物的分子量比 FXa 大,经过凝胶过滤分离柱后,复合物的峰位较 FXa 的峰位前移。相反,在无 Ca²⁺条件下, ACF I和 FXa 混合物 (摩尔比 1:1) 经过 HPLC 分离后,呈现两个峰(图 1(B),1),分别对应于 ACF I和 FXa 的洗脱峰(图 1(B),3,2)。这说明 ACF I和 FXa 在无 Ca²⁺条件下不能形成复合物, 因此 Ca²⁺在结合反应中起重要作用。

我们用 HPLC 定量分析了在不同钙离子浓度下,ACF I与 FXa 的结合反应。由(1)式可计算 已结合的 ACF I与 FXa 的比值(r)。从图 2 中可见,随着 Ca²⁺的浓度增大,r 逐渐增大,说明 ACF I与 FXa 的结合反应依赖于 Ca²⁺的浓度。在 1mmol・L⁻¹ Ca²⁺的条件下,r 值接近于 1,表明 ACF I在此条件下基本上全部与 FXa 结合成 1:1 的复合物。





2.2 金属离子对 ACF I荧光光谱的影响

色氨酸残基(Trp)是蛋白质内源荧光发色 团, ACF I分子中含有 14 个 Trp 残基, 因而具 有很强的内源荧光。纯化的 ACF I的最大激发 和最大发射波长分别在 280nm 和 335nm(见图 3,1)。游离的 Trp 荧光最大发射峰波长为 355nm^[8], ACF I的最大发射峰波长相对游离 Trp 最大发射峰波长蓝移了 20nm, 说明 ACF I 中部分 Trp 残基处于疏水环境中。这与 N- 溴 代丁二酰亚胺(NBS)修饰的结果一致,NBS 修 饰 ACF I的结果表明, ACF I分子中有 14 个 Trp 残基,其中有6个 Trp 残基位于分子内部 的疏水环境^[5]。纯化的 ACF I分子中含有一个 钙离子,当过量钙离子存在时,可再结合一个 钙离子^[4]。图 3 显示,纯化的 ACF I在 1mmol· L-1 Ca2+的条件下结合另一个钙离子后, 荧光 强度上升 5.5% (图 3,3)。纯化的 ACF I在脱去 分子中一个钙离子后, 荧光强度下降 5.8%。 因此 ACF I与两个钙离子的结合,都使 ACF I



图 2 ACF 1与 FXa 的结合反应与钙离子浓度的依赖关系

Fig. 2 Dependence of the binding of ACF I to FXa on the concentration of Ca²⁺ ions
The moles of bound ACF I/mol of FXa (r) were obtained in the presence of Ca²⁺ ions of various concentrations from equation 1.
Each point represents the average of triplicate determinations.

荧光加强。这说明,钙离子与 ACF I结合后,诱导了 ACF I的构象变化,可能使一些能引起 Trp 荧光淬灭的基团发生了位移,使得它们对 Trp 荧光淬灭作用减少,导致 ACF I的荧光增大;或者 由于钙离子诱导的构象变化,使部分 Trp 残基疏水性增加,导致 ACF I荧光增强。相反,脱钙 ACF I(apo-ACF I)在重组稀土和过渡金属离子后,荧光强度不同程度地降低(图 3,4~9)。说明 稀土和过渡金属离子与 ACF I的结合,可能使 Trp 残基疏水性不同程度地降低,或者使一些能

· 225 ·

Nd

32

引起 Trp 荧光淬灭的基团发生了位移,使得它们对 Trp 荧光淬灭作用增强,导致 ACF I荧光的 淬灭。

2.3 金属离子的离子势对 ACF I的荧光影响

我们曾报道,上述金属离子对游离 Trp 荧光没有影响^[8],这表明这些金属离子不与 Trp 发 生直接的碰撞淬灭,也不与Trp形成不发光的复合物,因此,它们对ACF I的荧光影响是由于金 属离子与蛋白质结合所致。金属离子与蛋白质结合后可通过诱导蛋白质构象变化影响其荧光 发射。我们分析 ACF I的荧光强度与金属离子离子势(Z/r)之间的关系,发现随着金属离子 Z/r的增大,ACF I的荧光强度大致呈下降趋势(见图 4)。这说明,金属离子对 ACF I荧光光谱 的影响与它们的离子势之间可能有内在联系。金属离子的离子势越大,它诱导 ACF I构象变化 作用越大,导致对 ACF I荧光淬灭作用加大。这进一步说明 ACF I荧光光谱的变化是金属离子 诱导 ACF I的构象变化引起的。与稀土和过渡金属离子对 ACF I的荧光淬灭作用相反, Ca²⁺对 ACF I的荧光有增强效应,说明它对维持 ACF I特定的构象起着独特的作用。



ACF I + Ca^{2+} ; 4, apo-ACF I + Mn^{2+} ; 5, apo-ACF I + Zn^{2+} ; 6, apo-ACF I + Co^{2+} ; 7, apo-ACF I + Cd^{2+} ; 8, apo-ACF I + Nd^{3+} ; 9, apo-ACF I + Eu^{3+} . The concentrations of all metal ions are 1 mmol . L-1.

Fig. 4 Plot of the intensity of the fluorescence of ACF I against the metal ionic potential (Z/r)

ACF I与 FXa 的结合反应依赖于钙离子的浓度, ACF I在无钙离子存在时, 不能与 FXa 发 生结合反应,其最大结合反应所需要的钙离子浓度为1mmol·L⁻¹。我们最近的平衡透析结果 表明,在 1mmol·L⁻¹ 钙离子条件下,ACF I分子中两个钙离子结合位点都结合上钙离子。由此 推测, ACF I结合上两个钙离子可能是其与 FXa 结合的前提条件, 可能由于两个钙离子独特的 诱导作用使 ACF I产生合适的空间结构, 与 FXa 的空间结构相匹配, 从而发生结合反应。

参考文献

- [1] Kornalik F. Snake Toxin, Harvey A. L. (Ed.), Pergamon Press: New York, 1991, p323.
- [2] Lu Y., Huang W. Z., Wang C. et al Hemostasis and Animal Venoms, Pirkle H., Markland F. S. Jr. (Ed.), Marcel Dekker, Inc: New York, 1987, p349.
- [3] LIU Qing-Liang(刘清亮), XU Xiao-Long(徐晓龙), WANG Chun(王 淳) Shengwu HuaxueYu Shengwu Wuli Xuebao(Acta Biochim. Biophys. Sin.), 1993, 25(3), 281.
- [4] LIU Qing-Liang(刘清亮), XU Xiao-Long(徐晓龙), YU Hua-Ming(余华明) et al Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.), 1993, 9(1), 71.
- [5] Xu X. L., Liu Q. L., Xie Y. S. et al Toxicon, 2000, 38(11), 1517.
- [6] Xu X. L., Liu Q. L., Wu S. D. Chin. Sci. Bull., 2000, 45(14), 1296.
- [7] Morita T., Atoda H., Sekiya F. Natural Toxins II, Singh B. R., Tu A. T. (Ed.), Plenum Press: New York, 1996, p187.
- [8] LIU Qing-Liang(刘清亮), XU Xiao-Long(徐晓龙), WANG Chun(王 淳) et al Zhongguo Xitu Xuebao(J. Chin. Rare Earth Soci.), 1992, 10(2), 106.

The Effect of Calcium (II) on the Anticoagulant Activity of Anticoagulation Factor I from the Venom of *Agkistrodon Acutus*

XU Xiao-Long LIU Qing-Liang

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Anticoagulation factor I(ACF I) from the venom of Agkistrodon acutus is a non-enzymatic anticoagulant and forms a 1:1 complex with activated coagulation factor X(FXa), and thereby prolongs the clotting time. It has been discovered from HPLC that the binding of ACF I with FXa is dependent on the concentration of Ca^{2+} ions and the maximal binding of ACF I to FXa occurs at concentration of Ca^{2+} ions of 1 mmol $\cdot L^{-1}$. It is evident from the observation of metal ion-induced changes in the intrinsic fluorescence of ACF I that ACF I undergoes conformational changes upon binding of metal ions. In general, the intensity of fluorescence of ACF I decreases with the increases of ionic potentials (Z/r) of bound metal ions in this protein. The lanthanide and transition metal ions give quenching effects on the fluorescence of ACF I, while Ca^{2+} ions enhance the fluorescence of ACF I. It can be deduced, from these results, that Ca^{2+} ions are essential for the specific conformation of ACF I and the conformational rearrangement of ACF I induced by Ca^{2+} ions might be necessary for the binding of ACF I with FXa.

Keywords:

binding-protein calcium ion anticoagulation factor I

activated coagulation factor X