

中华硬蜱凝血酶抑制剂的分离纯化与活性

王利菊¹, 高国富¹, 柏士平¹, 刘至刚³, 梁建国¹, 张克云¹, 赖 仞^{1,2,*}

(1. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223;
3. 深圳大学 生命科学学院, 广东 深圳 518060)

摘要: 通过凝胶过滤和反相高压液相色谱, 从 200 只半饱吸血的中华硬蜱 (*Ixodide sinensis*) 唾液腺中分离纯化得到一凝血酶抑制剂。用飞行质谱测定其分子量为 6.356 kDa, 与其他蜱类来源的凝血酶抑制剂分子量不同, 提示为一新蛋白分子。该抑制剂对凝血酶有强烈的抑制活性, 对激活的第 X 因子和胰蛋白酶有微弱的抑制活性。其发现将为发展疫苗、生物控制中华硬蜱提供资料和目标抗原。

关键词: 中华硬蜱; 凝血酶抑制剂; 丝氨酸蛋白酶; 唾液腺

中图分类号: Q959.226; Q51; R93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254–5853 (2005) 03–0328–04

A Thrombin Inhibitor from Ixodid Tick, *Ixodide sinensis*

WANG Li-ju¹, GAO Guo-fu¹, BAI Shi-ping, LIU Zhi-gang³, LIANG Jian-guo¹,
ZHANG Ke-yun¹, LAI Ren^{1,2,*}

(1. Nanjing Agriculture University; Nanjing 210095, China; 2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China; 3. Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: A novel thrombin inhibitor was identified and purified from salivary glands of ixodid tick, *Ixodide sinensis* by gel filtration and RP-HPLC. The molecular weight was 6.356 kDa determined by MALDI-TOF mass spectra. It was different from any known serine protease inhibitors identified from ixodid ticks. This inhibitor inhibited thrombin with strong potency, and exhibited no obvious effects on factor Xa and trypsin. The thrombin inhibitor may be used as a candidate to develop vaccine to control ticks.

Key words: *Ixodide sinensis*; Thrombin inhibitor; Serine protease; Salivary gland

蜱类是对家畜危害最大的一类吸血寄生虫, 对人类而言, 是仅次于蚊子的第二大类病原体媒介生物。经蜱类传播的病原体有细菌、真菌、病毒、螺旋体、立克次氏体和原虫。蜱类及经蜱传播的疾病给家畜带来了巨大的经济损失, 据统计, 仅硬蜱每年给畜牧业带来的经济损失就达 70 亿美元。如蜱类传播的莱姆病 (又称“第二艾滋”)、森林出血热等动物和人类疾病 (Law et al, 1992), 已经严重威胁人类的身体健康 (据不完全统计, 中国每年至少有一万例以上的莱姆病患者)。鉴于蜱对畜牧业和人类健康的巨大危害, 寻找有效、安全的蜱类防治措施是一个十分迫切的问题。但目前主要通过“毒

死蜱”等化学农药控制, 这又会引起环境污染、食品安全问题以及抗药性问题。为寻找有效的蜱类控制策略, 需要从分子水平上深入了解蜱类、病原体与宿主之间的相互关系。

硬蜱须要吸附在宿主皮肤上连续吸血 7~14 d 才能完成其血餐过程, 完成血餐的硬蜱体重比吸血之前增加了至少 100 倍 (Law et al, 1992)。在这么长的吸血周期中, 宿主有足够长的时间激活先天和后天免疫反应, 硬蜱将遭遇到宿主的防疫和免疫排斥反应 (Law et al, 1992)。蜱在长期进化过程中发展形成了一系列的免疫逃避机制, 以顺利完成在宿主身上的吸血过程。从蜱类的唾液腺中已经发现了

* 收稿日期: 2005–03–07; 接受日期: 2005–04–29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200044, C01040101)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: rlai@mail.kiz.ac.cn rlai72@njau.edu.cn

大量的具有生理、药理活性的生物活性分子。这些生物活性分子主要分为以下几大类：1. 前列腺素 (Ribeiro et al, 1992; Bowman et al, 1995); 2. 组织胺结合蛋白 (Arocha-Pinango et al, 1999; Bowman et al, 1997); 3. 血小板聚集抑制剂 (Mans et al, 2002a, b); 4. 抗血液凝固因子 (如凝血酶抑制剂) (Iwanaga et al, 2003; Nienaber et al, 1999; Waxman et al, 1990; Gaspar et al, 1996; Joubert et al, 1998; Francischetti et al, 2002); 5. 抗菌多肽 (Lai et al, 2004); 6. 阿片肽类似物 (Liang et al, 2005)。但来源于中华硬蜱的凝血酶抑制剂目前还未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

200 只半饱吸血的中华硬蜱 (*Ixodide sinensis*) (30 ~ 80 mg) 采于野兔皮肤表面, 保存于 26 °C、湿度 > 95% 的昆虫培养箱。

1.2 中华硬蜱唾液腺的解剖和处理

沿中华硬蜱背盖边沿将整个蜱打开分为两半, 小心去掉背盖、中肠以及吸食的宿主血液, 分离摘取唾液腺, 保存于 -80 °C。将 200 只中华硬蜱的唾液腺置于 5 mL pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液, 用玻璃匀浆器匀浆, 离心去除沉淀, 保留上清液用于分离纯化。

1.3 分离纯化

将唾液腺匀浆上清液上 100 cm × 2.6 cm 的 Sephadex G-50 凝胶过滤柱 (经过 pH 7.8 的 Tris-HCl、0.1 mol/L NaCl 缓冲液平衡), 同时用 pH 7.8 的 Tris-HCl 缓冲液 0.1 mol/L NaCl 缓冲液洗脱, 用自动部分收集器收集洗脱液; 试管收集, 每 10 min 一管, 每管收集 3 mL; 收集液用紫外 - 可见分光光度计于 280 nm 测定光吸收值; 分别测定分离峰的丝氨酸蛋白酶抑制活性。对有活性的分离峰进一步用高效液相 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分离纯化; 对 HPLC 分离峰于 280 nm 监测光吸收值, 同时进行丝氨酸蛋白酶抑制活性跟踪。有活性的分离峰再次用 HPLC 分离纯化, 收集保存有丝氨酸蛋白酶抑制活性的分离峰。

1.4 丝氨酸蛋白酶抑制剂的活性检测

胰蛋白酶、凝血酶、激活的 X 因子购于 Sigma 公司。胰蛋白酶、凝血酶用小肽底物 S-2238 (H-D-Phe-Pip-Arg-pNA, Kabi Vitrum, Stockholm, Swe-

den) 检测; 激活的 X 因子用 B-7020 (N-Benzoyl-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA, Sigma) 检测。反应体系是: 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, 室温; 胰蛋白酶、凝血酶、激活 X 因子的最终浓度分别为 10、21 和 20 nmol/L。不同浓度的待测样品与上述丝氨酸蛋白酶分别于室温保温 5 min, 最后分别加入小肽底物启动反应, 于 405 nm 处监测酶动力学反应 (Lambda Bio 4.0, PE)。相关的动力学参数用配套的酶动力学分析软件包分析 (Dixon, 1953)。在反应体系中加入同样体积的样品溶解液即为空白对照。

1.5 复钙时间测定

在 0.1 mL 家兔柠檬酸钠血浆中分别加入 0.1 mL 溶解于生理盐水的不同浓度的样品, 37 °C 保温 5 min; 加入 0.1 mL 2.5×10^{-2} mol/L 的 CaCl_2 溶液, 记录血液凝固时间。对照加入同样体积的生理盐水。

1.6 分子量测定和纯度检验

纯化的凝血酶抑制剂的分子量和纯度用 Bruker Reflex 公司的飞行质谱仪 [matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry] 测定。用 100% 的乙睛作为溶解液, 其中含有 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA)。

2 结果

2.1 中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂的纯化

中华硬蜱唾液腺匀浆上清液在 280 nm 光吸收的总 OD 为 300 左右 (图 1a); 经过 Sephadex G-50 分离以后, 得到对凝血酶显示抑制作用的分离峰 (图 1a 箭头所示), 总 OD 为 30 左右; 该活性峰经过 2 步 HPLC 纯化 (图 1b, 图 1c 箭头所示), 最后得到纯化的中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂。

2.2 分子量

经飞行质谱仪测定 (图 2), 中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂的 M^+ 为 6 357, 提示该抑制剂的实际分子量为 6.356 kDa; 为高纯度蛋白峰。

2.3 丝氨酸蛋白酶抑制剂活性

中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂强烈抑制凝血酶 (表 1), 根据配套的酶动力学分析软件包分析 (Dixon, 1953) 得到的 K_i 为 (0.017 ± 0.003) $\mu\text{mol/L}$ (SD, $n = 5$); 对胰蛋白酶和激活的 X 因子无显著影响。

2.4 复钙时间

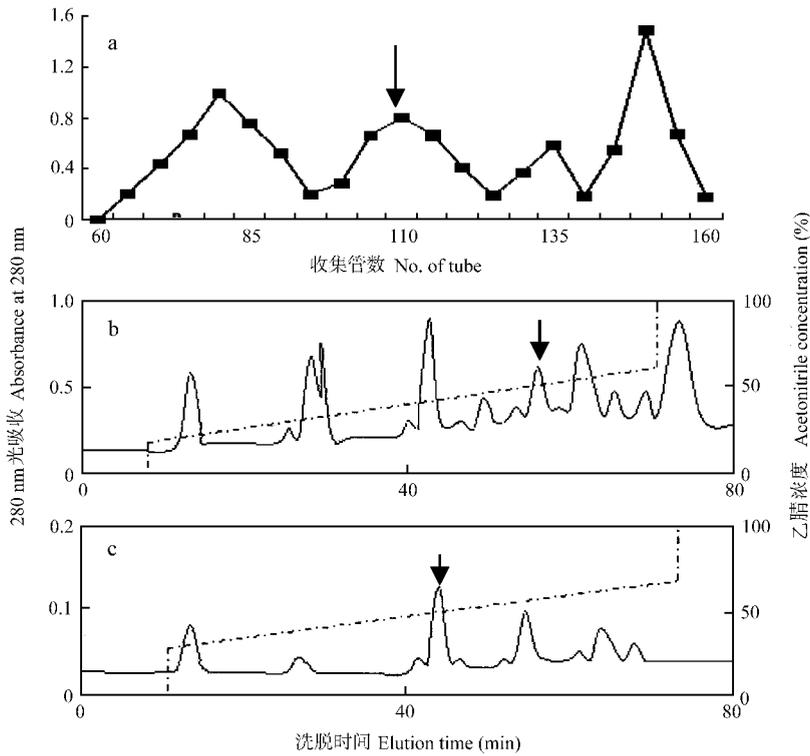


图 1 Sephadex G-50 凝胶过滤和 2 步反相高压液相纯化中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂流程图

Fig. 1 The purification of thrombin inhibitor from *Ixodide sinensis* salivary glands by Sephadex gel filtration and two steps of RP-HPLC

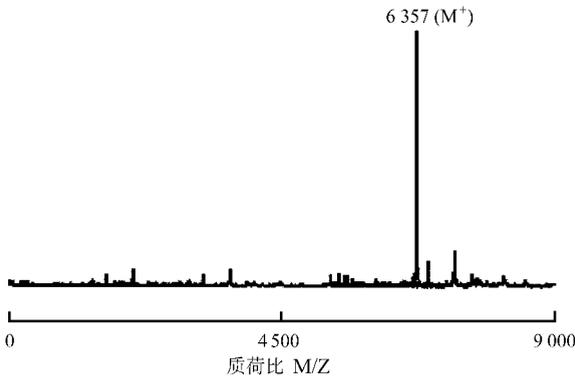


图 2 中华硬蜱凝血酶抑制剂的飞行质谱图

Fig. 2 Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

空白对照组的血浆凝固时间平均为 5 min 左右, 而加入中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂以后, 24 h 内都未发现血液凝固, 延长了复钙时间。

3 讨论

血液凝固反应是宿主启动自身免疫反应的一个

表 1 中华硬蜱唾液腺凝血酶抑制剂对 3 种丝氨酸蛋白酶水解酶活性的影响

Tab. 1 Effects of inhibitor isolated from *Ixodide sinensis* on hydrolytic activity of three serine proteases

蛋白酶 Protease	残留活性 Residual activity (%) (n = 5)
凝血酶 Thrombin	26 ± 2.2 *
激活的第 X 因子 FXa	87 ± 2.5
胰蛋白酶 Trypsin	89 ± 2.9
对照 Control	100

* $P < 0.05$ [t 检验, 与对照相比 (t -test, compared with control)]

重要步骤, 蜱类生物为了抑制宿主免疫反应和保障吸血的血液处于新鲜不凝固状态, 需要通过相应的生物化学机制抑制血液凝固。在蜱类生物中已经发现了一系列的凝血因子抑制剂和血小板聚集抑制剂, 通过这些分子抑制血液凝固和血块形成。目前除了源自长角血蜱 (*Haemaphysalis longicornis*) 凝血酶抑制剂的分子量为 7 kDa 外, 其他蜱类来源的凝血酶抑制剂的分子量都大于 10 kDa (Iwanaga et al, 2003)。本文分离纯化的来源于中华硬蜱的凝血酶抑制剂分子量为 6.356 kDa, 与其他蜱类来源

的凝血酶抑制剂分子量不同，提示该抑制剂为一新蛋白分子。该凝血酶抑制剂的发现将为发展疫苗、

生物控制中华硬蜱提供资料和目标抗原。有关该抑制剂的结构和基因信息研究工作正在进行。

参考文献：

- Arocha-Pinango CL, Marchi R, Carvajal Z, Guerrero B. 1999. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism [J]. *Blood Coagul. Fibrin.*, **10** (2): 43 - 68.
- Bowman AS, Sauer JR, Zhu K, Dillwith JW. 1995. Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* [J]. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **25** (6): 735 - 741.
- Bowman AS, Coons LB, Needham GR, Sauer JR. 1997. Tick saliva: Recent advances and implications for vector competence [J]. *Med. Vet. Entomol.*, **11** (3): 277 - 285.
- Dixon M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants [J]. *Biochem. J.*, **55** (1): 170 - 171.
- Franzischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: Identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex [J]. *Blood*, **99** (10): 3602 - 3612.
- Gaspar AR, Joubert AM, Crause JC, Neitz AW. 1996. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae) [J]. *Exp. Appl. Acarol.*, **20** (10): 583 - 598.
- Iwanaga S, Okada M, Isawa H, Morita A, Yuda M, Chinzei Y. 2003. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis* [J]. *Eur. J. Biochem.*, **270** (9): 1926 - 1934.
- Joubert AM, Louw AI, Joubert F, Neitz AW. 1998. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* [J]. *Exp. Appl. Acarol.*, **22** (10): 603 - 619.
- Lai R, Lomas LO, Jonczy J, Turner PC, Rees HH. 2004. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum* [J]. *Biochem. J.*, **379** (Pt. 3): 681 - 685.
- Law JH, Ribeiro JM, Wells MA. 1992. Biochemical insights derived from insect diversity [J]. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**: 87 - 111.
- Liang JG, Zhang J, Lai R, Rees HH. 2005. An opioid peptide from synganglia of the tick, *Amblyomma testudinarium* [J]. *Peptides*, **26** (4): 603 - 606.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW. 2002a. Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold [J]. *J. Biol. Chem.*, **277** (24): 21371 - 21378.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW. 2002b. Evolution of hematophagy in ticks: Common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros* [J]. *Mol. Biol. Evol.*, **19** (10): 1695 - 1705.
- Nienaber J, Gaspar AR, Neitz AW. 1999. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae) [J]. *Exp. Parasitol.*, **93** (2): 82 - 91.
- Ribeiro JM, Evans PM, MacSwain JL, Sauer J. 1992. *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Exp. Parasitol.*, **74** (1): 112 - 116.
- Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP. 1990. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa [J]. *Science*, **248** (4955): 593 - 596.