

# 大蹼铃蟾皮肤膜联蛋白 II 相关蛋白的分离纯化及活性

张杰<sup>1,2</sup>, 韦双双<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 张英霞<sup>1</sup>, 李文辉<sup>1,\*</sup>

(1. 中国科学院昆明动物研究所 毒素研究室 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院 北京 100039)

**摘要:** 通过阴离子交换、凝胶过滤和阳离子交换层析, 从大蹼铃蟾皮肤中纯化到一个表观分子量为 33 kDa 的单链蛋白。N-末端序列比较分析显示, 该蛋白与来自非洲爪蟾、红色原鸡和人膜联蛋白 II 的 N-末端序列相同的氨基酸分别占 70%、64% 和 56%。该蛋白具有以钙依赖的方式抑制专一性血小板膜糖蛋白 VI 受体激动剂——Stejnulxin 诱导洗涤人血小板聚集的生物学功能, 最大抑制率达 48%。结合其 N-末端序列 BLAST 搜索结果及其活性的钙依赖性, 推测该蛋白是与膜联蛋白 II 相关的一类蛋白质。

**关键词:** 两栖类; 膜联蛋白 II; 大蹼铃蟾; 血小板; Stejnulxin

中图分类号: Q959.5; Q51 文献标识码: A 文章编号: 0254–5853 (2005) 04–0404–06

## Purification and Characterization of Annexin II Related Protein from *Bombina maxima* Skin

ZHANG Jie<sup>1, 2</sup>, WEI Shuang-shuang<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>,

ZHANG Ying-xia<sup>1</sup>, LEE Wen-hui<sup>1,\*</sup>

(1. Department of Animal Toxicology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** A single chain protein with an apparent molecular weight of 33 kDa was purified from skin of *Bombina maxima* by a combination of ion exchange and gel filtration chromatography steps. N-terminal amino acid sequence determination indicated that it shares 70%, 64% and 56% identity with those of annexin II from the African claw toad, red jungle fowl and human, respectively. The purified protein from *B. maxima* inhibits stejnulxin (a specific platelet agonist via platelet membrane glycoprotein VI receptor) induced platelet aggregation in a Ca<sup>2+</sup> dependent manner. Maximal inhibition rate reaches 48%. Based on the N-terminal amino acid sequence BLAST search results and the fact that its activity is strictly Ca<sup>2+</sup> dependent, the purified protein might be structurally and functionally related to the annexin protein family.

**Key words:** Amphibian; Annexin II; *Bombina maxima*; Platelet; Stejnulxin

膜联蛋白 (annexins) 是一大类在大多数真核细胞内都表达的钙依赖性磷脂结合及膜结合蛋白, 可以分为 I、II、III 等多种类型 (Rescher & Gerke, 2004)。膜联蛋白家族成员均含有 4 个或 8 个约 70 个氨基酸构成的重复结构域, 称为 annexin 核心。annexin 核心的氨基端 (N-) 区域的序列及长短是可变的, 并且可能涉及其功能 (如作为蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶的磷酸化底物在信号传导中具有特别重要的意义), 其羧基端 (C-) 区域的结构

却是高度保守的。不同来源的 annexin 核心之间的序列相似度为 40% ~ 70%。这些重复结构域形成高度  $\alpha$ -螺旋化的微弯曲的紧密盘状结构。其凸面含有钙离子结合位点, 朝向细胞膜; 凹面远离细胞膜, 是与自身的 N-末端结构域或其他胞质蛋白相结合的区域 (Seaton & Dedman, 1998)。膜联蛋白家族成员在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动, 包括囊泡运输, 胞吐作用的膜融合, 调控炎症反应, 血栓形成调节, 钙信号转

\* 收稿日期: 2005–03–23; 接受日期: 2005–05–19

基金项目: 中国科学院“西部之光”; 国家自然科学基金 (30470380); 云南省自然科学基金 (2003C0066M) 资助

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: leewh@mail.kiz.ac.cn, Tel: 0871–5194279, Fax: 0871–5191823

导, 细胞分化、调亡和生长调节等 (Gerke & Moss, 2002)。

膜联蛋白本身是胞内蛋白, 缺乏信号肽, 不能通过常规的途经分泌到胞外。但是, 膜联蛋白分子的许多功能特性 (比如作为细胞或胞外基质表面受体) 是胞内蛋白不具备的。迄今为止, 膜联蛋白分子的分泌途经和调节控制仍然是该领域研究中的一大热点, 大量研究都集中在对胞外膜联蛋白分子的生物学活性上 (Raynal & Pollard, 1994)。目前的研究结果表明: 外源膜联蛋白 I 应用于几种炎症动物模型, 表现出明显的抗炎症活性, 其抗炎活性的机理是膜联蛋白 I 干扰了粒细胞的运动、迁移和在炎症部位的激活 (Perretti, 1997, 1998; Goulding et al, 1998); 膜联蛋白 II 可作为许多分子的表面结合锚, 而不是某特定配体的专一性受体 (Gerke & Moss, 2002); 膜联蛋白 V 作为抗凝蛋白可结合于活化的血小板或内皮细胞表面暴露的带负电荷的磷脂分子, 从而干扰凝血因子的附着和活化 (Raynal & Pollard, 1994)。

大蹼铃蟾 (*Bombina maxima*) 皮肤分泌物富含多种生物活性蛋白多肽。近年来, 我们实验室在大蹼铃蟾皮肤分泌物中发现多种缓激肽 (Lai et al, 2001; Lee et al, 2005a)、抗菌肽 (Lee et al, 2005b; Wang et al, 2005)、铃蟾肽 (Lai et al, 2002a)、蛋白酶抑制剂 (Lai et al, 2002b)、Bv8 肽类似物 (Lai et al, 2003)、三叶因子类似蛋白 (Zhang et al, 2005) 等。已开展的工作主要涉及大蹼铃蟾皮肤分泌物中小分子量组分的研究, 为进一步深入了解皮肤分泌物中大分子量组分的生物学功能, 我们对大蹼铃蟾皮肤匀浆物中膜联蛋白 II 相关蛋白 (BA II RP) 进行了分离、纯化和功能的初步研究。现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大蹼铃蟾采自云南省楚雄州大姚县, 浓缩正常人血小板及血浆购自昆明市中心血站。

### 1.2 生化试剂

DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-50、G-100, Mono-S 柱层析介质为 Amersham Pharmacia 公司产品; TEMED、丙烯酰胺为瑞士 Fluka 产品; 蛋白表面质量分子标准物购自上海华舜生物技术公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。血小板膜糖蛋白 VI

(GPVI) 激动剂——stejnulxin 为本实验室分离纯化样品 (Lee et al, 2003)。

### 1.3 分离纯化

1.3.1 大蹼铃蟾皮肤分泌物冻干粉的制备 大蹼铃蟾皮肤分泌物冻干粉参照 Lai et al (2001) 的方法制备。把成体大蹼铃蟾处死, 迅速剥皮, 将皮肤投入液氮中, 5 min 后取出, 包裹 2 层纱布, 用锤子砸碎冻脆的皮肤。将砸碎的皮肤组织置于含 5 mmol/L EDTA 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 中, 电动匀浆机匀浆 1 min, 间歇 10 s, 重复匀浆 6 次, 再将匀浆物在 4 °C、5 000 g 离心 30 min, 弃沉淀, 上清冻干成粉状, 待用。

1.3.2 DEAE Sephadex A-50 离子交换柱层析 将冻干粉溶解于 0.05 mol/L Tris-HCl (含 10 mmol/L EDTA, pH 7.2) 的缓冲液中, 置于分子量排阻值为 8 kDa 的透析袋内, 对 0.05 mol/L Tris-HCl (含 10 mmol/L EDTA, pH 7.2) 的缓冲液 4 °C 透析过夜。已透析好的样品经离心去沉淀后, 上预先用上述缓冲液平衡的 DEAE Sephadex A-50 阴离子交换柱, 用 0.05 mol/L Tris-HCl (含 10 mmol/L EDTA, pH 7.2) 的缓冲液过柱, 流速 30 mL/h, 每管 5 mL 自动收集并于紫外 280 nm 检测。经两个柱体积至穿透峰被完全洗脱后, 再用含 NaCl 的缓冲液进行梯度洗脱。经活性检测, 穿透峰部分含有抑制 stejnulxin 诱导的血小板聚集组分。

1.3.3 Sephadex G-100 凝胶过滤 将穿透峰冻干后, 溶解于 5 mL 0.02 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.0) 的缓冲液中, 上样于 Sephadex G-100 凝胶过滤柱 (100 cm × 2.6 cm), 用上述缓冲液洗脱, 流速 9 mL/h, 280 nm 检测, 每管 3 mL 自动收集。分别测定各个部分的抑制 stejnulxin 诱导的血小板聚集活性。

1.3.4 AKTA<sup>®</sup> Mono-S (5/5) 阳离子交换柱层析 将 G-100 凝胶过滤后的活性峰冻干, 溶于去离子水, 于分子量排阻值为 8 kDa 的透析袋内, 在 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 6.0) 缓冲液 4 °C 透析过夜。然后样品上柱, 用 0.5 mol/L NaCl 的缓冲液线性梯度洗脱。流速 1 mL/min, 280 nm 和电导检测, NaCl 梯度 0~0.3 mol/L 30min。分别测定各峰的抑制 stejnulxin 诱导的血小板聚集活性, 合并活性峰样品, 透析后用于活性及结构分析。

### 1.4 还原与非还原 SDS-PAGE

待测样品在普通电泳仪 (北京六一电泳仪厂)

上采用 Laemmli 凝胶电泳系统进行电泳, 染色方式为银染。

### 1.5 N-末端序列测定及序列分析

纯化的待测样品浓缩去盐, 然后用 Edman 降解法在氨基酸自动序列仪 (ABI 476A 型) 进行 N-末端序列测定。采用 Dialign 2.2.1 (Lassmann & Sonnhammer, 2002) 软件进行序列比较, 采用 BLAST 软件进行 (<http://ncbi.nih.gov/BLAST>) 蛋白质同源性搜索。

### 1.6 血小板抑制活性检测

1.6.1 富血小板血浆的制备 通过用同批号血浆稀释浓缩血小板至血小板的浓度为  $3 \times 10^8/\text{mL}$ 。

1.6.2 洗涤血小板的制备 将浓缩血小板以  $500 g$  离心  $10 \text{ min}$ , 弃上清。血小板团块悬浮在溶液 A ( $137 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $2 \text{ mmol/L KCl}$ ,  $0.3 \text{ mmol/L NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $12 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ ,  $0.35\%$  牛血清白蛋白,  $5 \text{ mmol/L}$  葡萄糖,  $0.2 \text{ mmol/L EGTA}$ ,  $1 \text{ mmol/L MgCl}_2$ ,  $\text{pH } 6.5$ ) 中, 在室温下两次  $460 g$  离心  $10 \text{ min}$ , 血小板被悬浮在无钙溶液 B ( $137 \text{ mmol/L NaCl}$ ,  $2 \text{ mmol/L KCl}$ ,  $0.3 \text{ mmol/L NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $12 \text{ mmol/L NaHCO}_3$ ,  $0.35\%$  牛血清白蛋白,  $5 \text{ mmol/L}$  葡萄糖,  $0.2 \text{ mmol/L EGTA}$ ,  $\text{pH } 7.35$ ) 或含钙溶液 B ( $2 \text{ mmol/L CaCl}_2$  代替  $0.2 \text{ mmol/L EGTA}$ , 其余成分同无钙溶液 B) 调至血小板终浓度为  $3 \times 10^8$  个/ $\text{mL}$ 。

1.6.3 血小板聚集抑制活性检测 在  $37^\circ\text{C}$  以  $1100 \text{ r/min}$  恒定转数转动的血小板聚集仪 (Precil Group, Beijing, China) 上进行分析, 待测样品先和血小板保温  $5 \text{ min}$ , 然后再加入血小板聚集激动剂 *stajnulxin*; 或先与 *stajnulxin* 保温  $5 \text{ min}$ , 然后再将保温后的混合物加入血小板中, 记录光吸收值的改变。

## 2 结果

### 2.1 大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白的分离纯化

大蹼铃蟾皮肤匀浆物冻干粉透析后通过 DEAE Sephadex A-50 离子交换柱分离, 收集穿透峰 (图 1 箭头所表示); 穿透峰合并、冻干后, 通过 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶过滤柱分离, 收集箭头所示活性峰 (图 2); 该峰合并、透析后, 通过 AKTA Mono-S 离子交换柱分离, 收集抑制血小板聚集的活性峰 (图 3)。用 SDS-PAGE 分析, 出现一条蛋白条带, 其还原条件下的表观分子量为  $33 \text{ kDa}$  (图 3)。

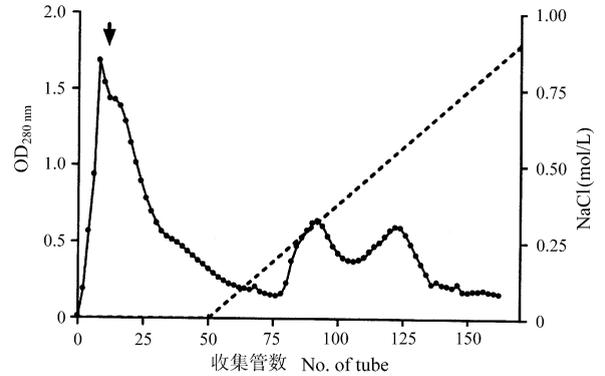


图 1 大蹼铃蟾皮肤匀浆物 DEAE Sephadex A-50 离子交换柱层析

Fig. 1 DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography of the toad *Bombina maxima* skin homogenate

箭头所示组含有抑制 *stajnulxin* 诱导的血小板聚集活性。Fractions contain inhibition activity toward *stajnulxin* induced platelet aggregation are indicated by arrow.

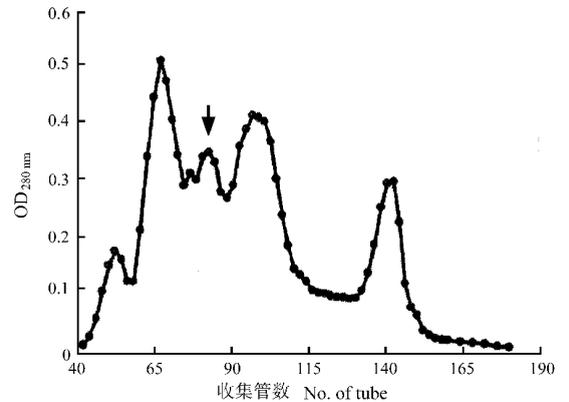


图 2 DEAE Sephadex A-50 离子交换柱层析穿透峰的 Sephadex G-100 葡聚糖凝胶过滤柱层析

Fig. 2 Sephadex G-100 gel filtration chromatography of DEAE Sephadex A-50 NaCl free fractions

箭头所示组含有抑制 *stajnulxin* 诱导的血小板聚集活性。Fractions contain inhibition activity toward *stajnulxin* induced platelet aggregation are indicated by arrow.

### 2.2 N-末端蛋白质序列测定及序列比较

纯化的大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白的 N-末端蛋白质序列为  $\text{NH}_2\text{-TVKPSTDXDEKDAAALEAAI-KTVGVDETIN}$ , 序列比较见图 4。

### 2.3 大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白的血小板活性

$5 \mu\text{g/mL}$  大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白 (BA II RP) 不能诱导人富血小板血浆 (PRP) 和洗涤血小板的聚集。当 BA II RP 先与血小板保温  $5 \text{ min}$ , 再加激动剂时, 在一定浓度范围内 ( $1 \sim 5 \mu\text{g/mL}$ ), BA II RP 一定程度地抑制 *stajnulxin* 诱导的含钙洗涤血小板的聚集, 并呈现量效关系: 对于 *stajnulxin* 诱

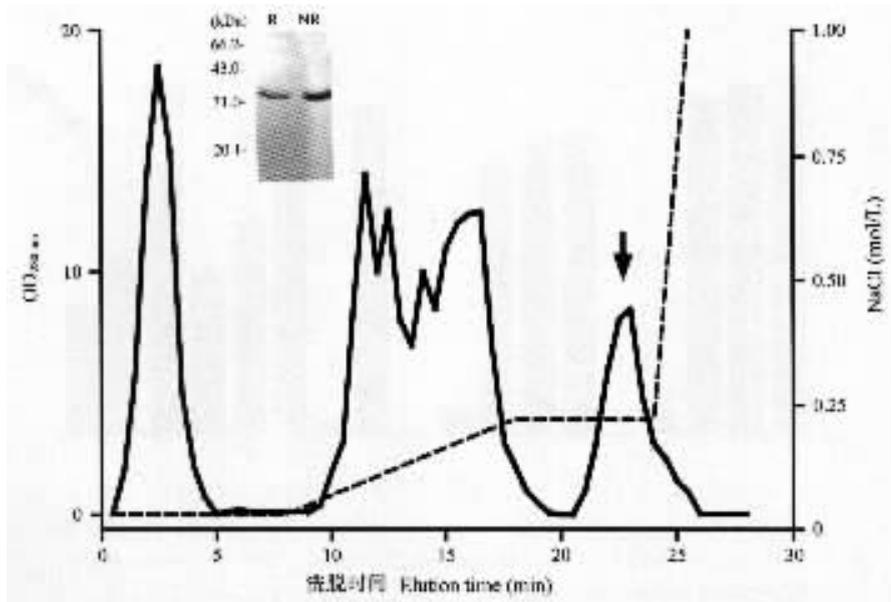


图 3 大蹼铃蟾皮肤膜联蛋白 II 相关蛋白的 AKTA<sup>®</sup>Mono-S 离子交换柱层析与 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 AKTA<sup>®</sup> Mono-S ion exchange chromatography and SDS-PAGE of bombina annexin II related protein from *Bombina maxima* skin homogenate  
虚线为 NaCl 梯度, 箭头位置所示为纯化的 BA II RP; R: 还原条件; NR: 非还原条件。  
NaCl gradient is indicated by dash line, purified BA II RP is indicated by arrow. R: under reducing conditions; NR: under non-reducing conditions.

大蹼铃蟾	<i>B. maxima</i>	-----T	V	K	P	S	T	D	X	D	-	E	K	D	A	A	A	L	E	A	A	I	K	T	V	G	V	D	E	-	T	I																										
非洲爪蟾	<i>X. laevis</i>	M	A	L	I	H	E	I	L	G	K	L	S	L	E	G	N	Q	S	C	A	R	Q	S	A	L	G	T	V	K	A	S	T	N	F	D	A	E	K	D	A	A	A	I	E	T	A	I	K	T	K	G	V	D	E	L	T	I
红色原鸡	<i>G. gallus</i>	M	S	T	V	H	E	I	L	S	K	L	S	L	E	G	D	H	S	-	L	P	P	S	A	Y	A	T	V	K	A	Y	S	N	F	D	A	D	R	D	A	A	A	L	E	A	A	I	K	T	K	G	V	D	E	V	T	I
人	<i>H. sapiens</i>	M	S	T	V	H	E	I	L	C	K	L	S	L	E	G	D	H	S	T	P	P	-	S	A	Y	G	S	V	K	A	Y	T	N	F	D	A	E	R	D	A	L	N	I	E	T	A	I	K	T	K	G	V	D	E	V	T	I

图 4 大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白与非洲爪蟾、红色原鸡和人膜连蛋白 II 的序列比较

Fig. 4 Sequence alignment of bomina annexin II related protein with annexin II from Africa claw toad, junglefowl and human

灰框表示氨基酸残基完全一致。

Identical amino acid residues are boxed in grey.

导的血小板聚集, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BA II RP, 开始有抑制作用; 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最大抑制率达 48%; 随着 BA II RP 的浓度再升高, 抑制率不再变化。对于 *stajnulxin* 诱导的 PRP 和无钙洗涤血小板的聚集, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BA II RP 则无抑制作用; 当 BA II RP 先与激动剂 *stajnulxin* 保温 5 min, 再将保温后的混合物加入血小板时, *stajnulxin* 诱导的 PRP 和无钙洗涤血小板聚集无变化。在有钙情况下, BA II RP 先与血小板保温; 或 BA II RP 先与 *stajnulxin* 保温, 相应浓度的 BA II RP (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对 *stajnulxin* 诱导的含钙洗涤血小板的聚集的抑制率分别为 40% 和 48% (图 5), 二者无显著差异。

### 3 讨论

通过阴离子交换、凝胶过滤和阳离子交换层析, 我们从大蹼铃蟾皮肤匀浆物中纯化了一个表观分子量为 33 kDa 的单链蛋白。该蛋白具有钙依赖性的抑制 *stajnulxin* 诱导人血小板聚集的生物学功能。N-末端序列比较分析显示, 它与非洲爪蟾、红色原鸡和人膜联蛋白 II 的 N-末端序列相同的氨基酸分别占 70%、64% 和 56%。结合该蛋白质 N-末端序列 BLAST 搜索结果及钙离子对其活性影响, 推测它是来自大蹼铃蟾皮肤分泌物的与膜联蛋白 II 相关的一类蛋白质。

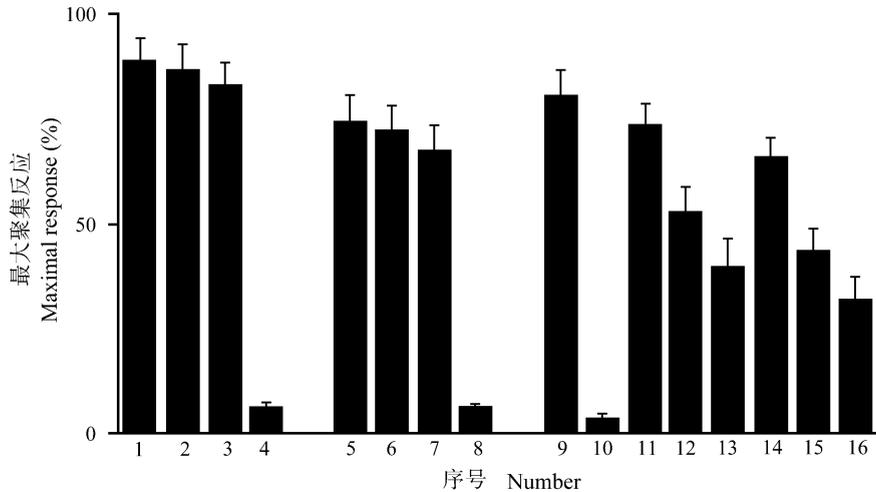


图 5 大蹼铃蟾膜联蛋白 II 相关蛋白对 stejnulxin 诱导的人血小板聚集的抑制作用  
Fig. 5 The inhibitory effects of bombina annexin II related protein on human platelet aggregation induced by stejnulxin

实验数据为 5 次实验的平均值  $\pm$  标准误 (Data are expressed as means  $\pm$  SEM of five measurements)

1—4. 人富血小板血浆 (Normal human platelets):

1. 只加 15 ng/mL stejnulxin (15 ng/mL stejnulxin alone);

2. 5  $\mu$ g/mL BA II RP 先与血小板保温, 再加入 15 ng/mL stejnulxin (5  $\mu$ g/mL BA II RP incubated with platelets then 15 ng/mL stejnulxin was added);

3. 5  $\mu$ g/mL BA II RP 先与 15 ng/mL stejnulxin 保温, 再将混合物加入血小板中 (5  $\mu$ g/mL BA II RP incubated with 15 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets);

4. 只加 5  $\mu$ g/mL BA II RP (5  $\mu$ g/mL BA II RP alone)

5—8. 无钙离子洗涤血小板 (Washed platelets in  $Ca^{2+}$ -free buffer):

5. 只加 40 ng/mL stejnulxin (40 ng/mL stejnulxin alone);

6. 5  $\mu$ g/mL BA II RP 先与血小板保温, 再加入 40 ng/mL stejnulxin (5  $\mu$ g/mL BA II RP incubated with platelets then 40 ng/mL stejnulxin was added);

7. 5  $\mu$ g/mL BA II RP 先与 40 ng/mL stejnulxin 保温, 再将混合物加入血小板中 (5  $\mu$ g/mL BA II RP incubated with 40 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets);

8. 只加 5  $\mu$ g/mL BA II RP (5  $\mu$ g/mL BA II RP alone)

9—16. 含钙离子洗涤血小板 (Washed platelets in buffer with 2 mmol/L  $Ca^{2+}$ ):

9. 只加 30 ng/mL stejnulxin (30 ng/mL stejnulxin alone);

10. 只加 5  $\mu$ g/mL BA II RP (5  $\mu$ g/mL BA II RP alone);

11—13. 不同浓度 (11: 1  $\mu$ g/mL; 12: 2  $\mu$ g/mL; 13: 5  $\mu$ g/mL) 的 BA II RP 先与血小板保温, 再加入 30 ng/mL stejnulxin (Different concentrations of BA II RP incubated with platelets then 30 ng/mL stejnulxin was added; 11: 1  $\mu$ g/mL; 12: 2  $\mu$ g/mL; 13: 5  $\mu$ g/mL);

13—16. 不同浓度 (14: 1  $\mu$ g/mL; 15: 2  $\mu$ g/mL; 16: 5  $\mu$ g/mL) 的 BA II RP 先与 30 ng/mL stejnulxin 保温, 再将混合物加入血小板中 (Different concentrations of BA II RP incubated with 30 ng/mL stejnulxin, then the mixture was added to platelets; 14: 1  $\mu$ g/mL; 15: 2  $\mu$ g/mL; 16: 5  $\mu$ g/mL)

Stejnulxin 主要通过结合血小板膜糖蛋白 GPVI 受体诱导血小板的活化和聚集 (Lee et al, 2003)。Stejnulxin 诱导血小板的活化和聚集是不依赖于胞外钙离子的。Stejnulxin 结合到血小板膜 GPVI 受体后, 血小板膜表面有比较复杂的变化, 如受体成簇 (本实验室未发表资料), 这种膜表面变化对于血小板活化和聚集的意义以及它对血小板活化信号传导通路的影响, 由于没有适当的研究模型, 是很难弄清楚的。我们分离纯化的大蹼铃蟾膜联蛋白 II 相关蛋白在有钙离子存在的条件下, 无论先与血小板或是先与 stejnulxin 保温, 均能抑制 stejnulxin 诱导的人

洗涤血小板活化和聚集, 在同样浓度下, 两种保温方式无显著差别, 这提示其作用机制可能涉及大蹼铃蟾膜连蛋白 II 相关蛋白结合钙离子后, 以一种目前未知的方式锚到细胞膜上或嵌合在膜内, 膜形态和流动性受到影响, 干扰了 stejnulxin 与血小板膜上 GPVI 分子的结合, 影响其信号传导通路; 或者是结合了钙离子的膜联蛋白 II 相关蛋白直接与 stejnulxin 分子相互作用, 使得 stejnulxin 分子与血小板膜 GPVI 受体的结合受到一定程度的影响, 从而抑制 stejnulxin 分子对人血小板的活化和聚集。在无钙离子的条件下, 大蹼铃蟾膜联蛋白 II 相关蛋白既

不能与血小板膜结合,也不与 *stejnulxin* 分子结合,所以对 *stejnulxin* 诱导的人血小板活化和聚集无影响(图 5)。

有证据表明:在无钙离子的条件下,annexin 分子无规卷曲的 N-末端与 annexin 核心结合,annexin 核心不能与膜上的磷脂分子相互作用。即使 N-末端比较短的 annexin II 分子,空间结构也如此。annexin 分子功能的多样性与其 N-末端高度可变有很大关系。在存在钙离子的条件下,annexin 分子的 annexin 核心结合钙离子,N-末端与 annexin 核心脱离,一方面释放出 annexin 核心与带负电荷的磷脂相结合的位点,annexin 分子在结合钙离子后,暴露的 annexin 核心除了可结合膜上带负电

荷的磷脂外,还可结合其他许多胞内及胞外配体分子;另一方面,N-末端自身可被磷酸化的氨基酸残基(如酪氨酸)暴露。这些构象转变明显提示 annexin 分子与细胞信号传导关系密切(Rescher & Gerke, 2004)。

相对于 *stejnulxin* 诱导人血小板活化和聚集的浓度(40 ng/mL),我们纯化的蛋白质抑制血小板活化和聚集的浓度较高(5  $\mu$ g/mL),而且最大抑制仅约 50%。这种较弱的抑制作用间接说明大蹼铃蟾膜联蛋白 II 相关蛋白是以一种非特异的方式干扰 *stejnulxin* 与血小板膜糖蛋白 GPVI 受体的结合。但其确切机制,有待于深入研究。

## 参考文献:

- Gerke V, Moss SE. 2002. Annexin: From structure to function [J]. *Phys. Rev.*, **82**: 331 - 371.
- Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK, Perretti M. 1998. Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation [J]. *Inflamm. Res.*, **47** (suppl. 3): S158 - S165.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2001. A novel bradykinin-related peptide from skin secretions of toad *Bombina maxima* and its precursor containing six identical copies of final product [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**: 259 - 263.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002a. A novel proline rich bombesin-related peptide (PR-bombesin) from toad *Bombina maxima* [J]. *Peptides*, **23**: 437 - 442.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2002b. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red belly toad *Bombina maxima* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **131**: 47 - 53.
- Lai R, Liu H, Lee WH, Zhang Y. 2003. Two novel Bv8-like peptides from skin secretions of the toad *Bombina maxima* [J]. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **134**: 509 - 514.
- Lassmann T, Sonnhammer EL. 2002. Quality assessment of multiple alignment programs [J]. *FEBS Letters*, **529**: 126 - 130.
- Lee WH, Du XY, Lu QM, Clemetson KJ, Zhang Y. 2003. Stejnulxin, a novel snake C-type lectin-like protein from *Trimeresurus stejnegeri* venom is a potent platelet agonist acting specifically via GPVI [J]. *Thromb. Haemos.*, **90**: 662 - 671.
- Lee WH, Liu SB, Shen JH, Jin Y, Zhang Y. 2005a. Cloning of bradykinin precursor cDNAs from skin of *Bombina maxima* reveals novel bombinakinin M antagonists and a bradykinin potential peptide [J]. *Regul. Pept.*, **127**: 207 - 215.
- Lee WH, Li Y, Lai R, Li S, Zhang Y, Wang W. 2005b. Variety of antimicrobial peptides in the *Bombina maxima* toad and evidence of their rapid diversification [J]. *Eur. J. Immunol.*, **35**: 1220 - 1229.
- Perretti M. 1997. Endogenous mediators that inhibit the leukocyte-endothelium interaction [J]. *Trends Pharmacol. Sci.*, **18**: 418 - 425.
- Perretti M. 1998. Lipocortin 1 and chemokine modulation of granulocyte and monocyte accumulation in experimental inflammation [J]. *Gen. Pharmacol.*, **31**: 545 - 552.
- Raynal P, Pollard HB. 1994. Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1197**: 63 - 93.
- Rescher U, Gerke V. 2004. Annexins: Unique membrane binding proteins with diverse functions [J]. *J. Cell Sci.*, **117**: 2631 - 2639.
- Seaton BA, Dedman JR. 1998. Annexin [J]. *BioMetals*, **11**: 399 - 404.
- Wang T, Zhang J, Shen JH, Jin Y, Lee WH, Zhang Y. 2005. Maximins S, a novel group of antimicrobial peptides from toad *Bombina maxima* [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**: 945 - 951.
- Zhang J, Zhang Y, Wan SG, Wei SS, Lee WH, Zhang Y. 2005. Bm-TFF2, a trefoil factor protein with platelet activation activity from frog *Bombina maxima* skin secretions [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**: 1027 - 1033.