

钩虫抗凝血因子的研究进展^{*}

杨玉荣

(厦门大学生命科学学院, 厦门 福建 361005)

钩虫是重要的人体寄生虫, 目前在发展中国家约超过 10 亿的人口感染这类寄生虫, 在我国即有 1.94 亿人感染钩虫 (许隆祺等, 1995)。钩虫寄生在人体肠道, 通过口囊和齿吸附在宿主粘膜上吸血, 每条钩虫每日可造成 0.2cm^3 的血损失。严重或慢性长期感染, 会引起患者长期性失血, 是造成人体缺铁性贫血、营养不良的主要原因。寄生儿童可使儿童生长迟滞、发育缓慢, 智力发育低下, 也是造成婴儿贫血症的主要原因。

长期以来人们对寄生虫的研究总是从预防和消灭的角度出发来研究各种问题, 但寄生虫在长期的进化过程中, 在适应寄生生活的同时, 必将发展出适应其生存所特有的机体结构、消化方式、生化反应和防御方式。钩虫就是这样的一类寄生虫, 它在寄生宿主肠道吸血过程中, 不断分泌出抗凝素。

钩虫在肠道进行吸血活动时分泌的抗凝素, 可使宿主被咬的伤口不易凝血, 有利于钩虫吸取血液, 同时宿主的血液自被吸附的粘膜伤口渗出, 虫体吸血多久, 伤口就渗血多久, 肠道血损失是钩虫病引起贫血症的主要原因。通常情况下人体的组织损伤和胶原暴露会引起宿主本身的凝血, 但钩虫分泌的抗凝素, 具有抗止血活性, 可使宿主的凝血时间延长, 延缓和阻止血小板的粘附聚集, 并具有溶解纤维蛋白原的酶活性。钩虫抗凝血因子的这种独特作用有可能使其成为最具潜力的抗血栓药物用于治疗心血管疾病。此外钩虫抗凝素也可能成为钩虫感染获得保护性免疫力的一种功能性抗原 (Harrison *et al.*, 2001), 对其研究具有重要的医学价值。近年来, 国外一些学者开始从利用寄生虫的角度来研究钩虫的抗凝素, 探讨其作为潜在的抗凝血和溶血栓治疗新药物的可能性, 并借此采用基因工程技术合成重组钩虫抗凝血多肽, 期望开发出具有潜力的抗凝血试剂, 作为临床使用的抗血栓治疗药物。本文对钩虫抗凝素的研究概况和进展作一简述。

1 钩虫抗凝素的发现

虽然早在近一个世纪前, Loeb 和 Smith (1904) 及 Loeb 和 Fleish (1910) 在他们的研究报告中就推测钩虫可能在取食过程中分泌抗凝血物质, 来利于其吸血和造成宿主的血液损失及营养不良, 但由于当时的技术限制, 故未做进一步的研究。

2 钩虫抗凝素活性的测定

20 世纪 60 ~ 70 年代开始有一、两篇零星的报道 (Eiff, 1966; Spellman and Nossel,

收稿日期: 2002 - 07 - 30

^{*} 本研究受厦门大学校基金资助, 编号 KD1004

1971)。Eiff (1966) 对犬钩虫头腺浸取物中的抗凝成分进行了生化测定, 发现它对胰蛋白酶、-糜蛋白酶敏感, 对胃蛋白酶不敏感, 可为固碳吸收, 在摄氏 100 度下可以耐热 10 min, 能溶解于 10% 三氯乙酸及饱和硫酸铵溶液中, 用凝胶过滤法测定的分子量范围在 20 000 ~ 50 000 之间, 说明此抗凝素是一种非酶性多肽, 并建议将其命名为钩虫素 *Ancylostomatatin*。

3 钩虫抗凝血成分的分离、测序和生化特性的测定

至 20 世纪 80 年代, Hotez (1983) 首先报告了犬钩虫 (*Ancylostoma caninum*) 分泌的具有蛋白酶水解作用的抗凝血物质。其后 (1985) 又报告了自犬钩虫成虫排泄分泌物中分离的 37kDa 蛋白酶系金属蛋白酶, 来源于食道腺, 能水解纤维蛋白原、纤维蛋白和弹性硬蛋白, 具有抗血液凝固作用。从 80 年代中期开始, 部分学者因看到钩虫抗凝素可成为潜在的最有实力最少毒性的抗血栓天然药物, 开始转入这一方向进行研究, 主要是在美国 Yale 大学 Hotez 实验室 (Hotez and Cerami, 1983, Hotez *et al.*, 1985)。1993 年他们 (Cappello *et al.*, 1993) 报道了从犬钩虫成虫分离出的可溶蛋白提取物, 在进行抗凝血活性的检测中发现其含有抗凝血活性, 可以显著延长凝血酶原时间 (PT, 该实验用于检测外源凝血途径) 和部分促凝血酶原激酶时间 (PTT, 该实验用于检测内源凝血途径), 而且用离子交换层析从中分离出的纯化提取物同样可延长凝血酶原时间 (PT) 和部分促凝血酶原激酶时间 (PTT), 以及抑制内外凝血途径的共同部分即凝血因子 Xa 的活性。1995 年他们详细报道了从犬钩虫成虫的可溶提取物中, 采用弱离子交换层析和色谱分析及反相高压液相层析系统分离纯化出一种犬钩虫抗凝血多肽的活性物质, 分子量约 8.7kDa (Capello *et al.*, 1995), 并命名为犬钩虫抗凝血肽 AcAP。此 AcAP 可延长凝血酶原时间 (PT) 和部分促凝血酶原激酶时间 (PTT), 即 35nmol/L AcAP 就可延长双倍的 PT 时间远优于重组血蛭素 (需要 410nmol/L) 和重组蛭肽 (需要 1 256nmol/L), 而 85nmol/L AcAP 就可延长双倍 PTT 时间远优于重组蛭肽 (需 2 365nmol/L), 且可特异性地抑制内外凝血途径的共同部分即凝血因子 Xa 的活性, 其抑制 98% Xa 的活性的浓度需 50nmol/L。此外, 通过测定该抗凝血肽的部分氨基酸序列和生化特性, 表明它与以前已经鉴定的抗凝血因子或蛋白酶抑制因子不同源 (Capello *et al.*, 1995)。这些研究结果表明 AcAP 是目前最有潜力的天然存在的抗凝血因子。

1995 年, 英国的 Pritchard 实验室亦开始研究美洲钩虫 (*Necator americanus*) 的抗凝血活性, 他们发现美洲钩虫的排泄分泌物 (ES 产物) 也具有蛋白酶的活性, 能够溶解血红蛋白和血纤维蛋白原, 而且酶作用活性的 pH 范围很广, 溶解血红蛋白的 pH 值从 pH 5 ~ 7, 溶解血纤维蛋白原的最大活性在 pH 3.5。结果分析进一步表明美洲钩虫的排泄分泌物存在天冬氨酸、半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶的活性。金属离子刺激也证明如此, 特别是锌离子的刺激可以显著提高蛋白酶的活性 (Brown *et al.*, 1995)。他们在进一步的抗凝血研究中发现美洲钩虫 ES 产物具有延长血液凝结时间, 包括延长凝血酶原时间 (PT) 和部分促凝血酶原激酶时间 (PTT), 即对内外源凝血途径都具有剂量依赖性的抑制效应, 并具有能抑制内外凝血途径的共同部分——凝血因子 Xa 的活性, 以及抑制血小板聚集的作用和溶解纤维蛋白原的活性 (Furmidge *et al.*, 1996)。

4 钩虫抗凝血肽的克隆及其表达

Hbetz 等人 (Stanssens *et al.*, 1996) 报道采用分子克隆构建 AcAP cDNA 克隆, 用 AcAP 的 N 末端序列合成的探针检测筛选共得到 3 个同源性很高的多肽克隆, 并在酵母中得到表达, 命名为 AcAP5 (77 个氨基酸)、AcAP6 (75 个氨基酸) 和 AcAPc2 (84 个氨基酸)。凝血分析表明 AcAP5/6 两个重组肽能够直接抑制凝血因子 Xa 的活性, 而 AcAPc2 主要抑制由凝血因子 a 和组织因子 (TF) 组成的复合物 (f a/TF) 的催化活性。这三个重组抗凝血肽序列表明它们与在人蛔虫中发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂家族有关。其后他们又报道了用 PCR 克隆并在 *E. coli* 上表达出可溶并具有活性的犬钩虫抗凝血多肽 (AcAP) (Capello *et al.*, 1996), 他们采用 PCR 从犬钩虫成虫的 cDNA 文库中分离出一个编码 AcAP 的 cDNA 克隆, 采用原核表达载体在 *E. coli* 上表达 8.7kDa 的蛋白质, 这个重组融合蛋白 (rAcAP) 采用亲和层析和反相高压液相层析纯化后, 经凝血分析发现该重组蛋白同天然蛋白一样具有抑制内外凝血途径的共同部分即凝血因子 Xa 的活性, 也具有延长凝血酶原时间 (PT) 和部分促凝血酶原激酶时间 (PTT)。

在对用酵母表达的重组钩虫抗凝血多肽 rAcAP5 的产生所需的最适温度、甘油喂食速率和 pH 值进行了研究时, 认为 pH 值是影响 rAcAP5 产量和活性的最重要因素, 甘油喂食速率对于 rAcAP5 的特异活性有显著影响, 温度则无显著影响。在最适条件下 rAcAP5 最大的产率为 1.2g/l, 测定最高产率为每克干细胞可产生 rAcAP5 11.5mg, 其最大的活性为 96% (Inan *et al.*, 1999)。同时从犬钩虫可溶蛋白提取物中还分离纯化了血小板聚集和吸附的抑制因子 (Chadderdon and Cappella, 1999), 命名为钩虫血小板抑制因子, 分子量约为 15kDa, 除可抑制血小板聚集外, 还可阻止停留的血小板吸附到血纤维蛋白原和胶原上。采用单克隆抗体检测发现, 其抑制作用主要是通过阻断了血纤维蛋白原和胶原表面结合血小板的受体, 从而使血小板无法与纤维蛋白原和胶原结合。这种广谱的抗血小板的聚集黏附活性也存在于成虫的排泄分泌物中, 提示在抗凝血过程中具有重要的生物学作用。

在进一步对犬钩虫抗凝血肽 AcAP5 进行免疫定位和离体条件下钩虫抗凝血的中和作用观察 (Harrison *et al.*, 2001) 时, 用重组的犬钩虫抗凝血肽 AcAP5 免疫兔, 通过亲和层析纯化获得多克隆的 IgG, 经免疫组化研究发现这个多克隆抗 AcAP5 的 IgG 主要分布于头腺, 证实了以前的生化研究鉴定头腺分泌物是成虫抗凝血活性的主要来源。这个抗 AcAP5 多克隆 IgG 能中和由重组和天然 AcAP 引起的凝血因子 Xa 的抑制活性。也能中和由重组和天然 AcAP 引起的激活部分促凝血酶原激酶凝血时间反应。此中和反应具种特异性, 即不能中和锡兰钩虫的抗凝血活性。这些结果显示犬钩虫抗凝血肽 AcAP5 可作为将来研究抑制成虫摄食血液的疫苗设计的靶目标。

此外, 他们还报道了采用 RT-PCR 和 3 快速扩增 cDNA 末端 (Harrison *et al.*, 2002), 从锡兰钩虫 (*Ancylostoma ceylanicum*) 的 mRNA 中得到了锡兰钩虫抗凝血肽 AceAP cDNA 克隆, 并获得了重组锡兰钩虫抗凝血肽 AceAP 的表达, 这是目前在可在人体寄生的钩虫中的抗凝血因子的首次克隆, 虽然与犬钩虫抗凝血肽 AcAP 的氨基酸序列 50% 相似, 属于同源物, 但凝血分析发现锡兰钩虫抗凝血肽 AceAP 对于凝血因子 Xa 的抑制活性和抗凝血作用远低于犬钩虫抗凝血肽 AcAP, 这与用成虫可溶蛋白提取物进行的抗凝作用分析一致,

锡兰钩虫成虫可溶蛋白提取物的抗凝血活性远差于犬钩虫成虫可溶蛋白提取物。这表明不同虫种可能具有不同的吸血能力。

5 结语

一般人体正常的凝血途径包含内外源凝血途径,两个凝血途径开始的阶段不同,但从 Xa 因子激活开始,内外源凝血反应过程变得完全一样,成为共同途径。外源性凝血途径的启动是以人体微血管受损伤时内皮细胞和血管细胞释放出组织因子和循环蛋白及 a 结合形成复合体,从而激活 X 酶,使 Xa 因子激活而进入共同途径。内源性凝血途径则以血小板内的物质激活 a 以及血小板和 a 结合通过 a 激活 Xa 因子而进入共同途径。同时血小板和 a 结合也激活了外源性凝血途径。目前钩虫抗凝血因子凝血机理研究发现钩虫抗凝血作用主要抑制内外源两个途径的起始阶段和它们的共同途径,如AcAPc2抑制了外源凝血途径的起始阶段,AcAP5/6抑制内外源凝血共同途径的 Xa 因子的活性,而钩虫血小板抑制因子则抑制内源性凝血途径起始阶段。

目前国外对寄生虫抗凝血素的研究除以钩虫为材料外,还有以异尖线虫(Perteguer *et al.*, 1996)、蚤类、蜱(Zhu *et al.*, 1997)和锥蝽等吸血昆虫为材料,但多限于对其所具有的抗凝血活性的检测报道,除Nienaber和Gaspar等人(1999)从蜱唾液腺中分离出抗凝血酶的抑制因子,采用弱离子交换和反相层析等方法纯化,测得该抑制因子的分子量为72 430外,还对抗凝血物质作进一步提纯分离,并用于生化性质鉴定和测定氨基酸序列的研究。此外Joubert等人(1998)报道了采用基因工程技术获得重组的抗凝血蜱肽。

我国目前尚未见任何对钩虫抗凝血因子的研究报道,因此国内急需开展这方面的研究。钩虫病在我国分布广泛,部分地区对人体的感染率高达61.9%(陈焱等,1994)。而犬钩虫的感染率更高。随着社会的发展,生活的富裕,宠物的增多,犬钩虫有可能成为新的人畜共患病。对钩虫这一生物学研究已很清楚的重要寄生虫,急需运用生物化学和分子生物学技术对它的抗凝血机理进行深入的研究。钩虫抗凝血因子的这种独特作用可能有希望成为具有潜力的抗凝血试剂和抗血栓药物,用于治疗心血管疾病。我们期望不久的将来我国也能就此方面开展一些具有自主知识产权的研究,并最终走向天然药物的开发和产业化。

参 考 文 献

- 许隆祺, 蒋则孝, 余森海等. 1995. 寄生虫病防治在预防保健中的地位和策略. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 13 (4): 264.
- 陈焱, 杨发柱, 郑国斌等. 1994. 福建省钩虫病的流行现状. 中国寄生虫与寄生虫病杂志, 12 (4): 291 ~ 293.
- Brown, A., M. J. Burleigh, E. E. Billett *et al.* 1995 An initial characterization of the proteolytic enzymes secreted by the adult stage of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology*, 110: 555 ~ 563.
- Capello, M., L. P. Clyne, P. Mcphedran *et al.* 1993 Ancylostoma Factor Xa Inhibitor: partial purification and its identification as a human hookworm-derived anticoagulant in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 1474 ~ 1477.
- Capello, M., G. P. Vlasuk, P. W. Bergum *et al.* 1995 *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6152 ~ 6156.
- Cappello, M., J. M. Hawdon, B. F. Jones *et al.* 1996 *Ancylostoma caninum* a anticoagulant peptide: Cloning by PCR and ex-

- pression of soluble active protein E-coilin. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **80** (1): 113 ~ 117.
- Chadderdon, R. C. and M. Cappello 1999 The hookworm platelet inhibitor: Functional blockade of integrins GPIIb/IIIa (Alpha (IIb) beta (3)) and GPIa/IIa (Alpha (2) beta (1)) inhibits platelet aggregation and adhesion in vitro. *Journal of Infectious Diseases*, **179** (5): 1235 ~ 1241.
- Deleon, A. A. P., J. G. Valenzuela and W. J. Tabachnick 1998 Anticoagulant activity in salivary glands of the Insect vector *Culex tritaeniorhynchus* by an inhibitor of factor Xa. *Experimental Parasitology*, **88** (2): 121 ~ 130.
- Eiff, J. A. 1966 Nature of an anticoagulant from the cephalic glands of *Ancylostoma caninum*. *Journal of Parasitology*, **52**: 833 ~ 847.
- Fricker, J. 1998 Hookworm anticoagulant safe in humans. *Molecular Medicine Today*, **4**: 1 ~ 4.
- Furmidge, B. A., L. A. Horn and D. I. Pritchard 1996 The anti-haemostatic strategies of the human hookworm *Necator americanus*. *Parasitology*, **112**: 81 ~ 87.
- Harrison, L. M., J. L. Córdova and M. Cappello 2001 *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide 5: immunolocalization and in vitro neutralization of a major hookworm anti-thrombotic. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **115**: 101 ~ 107.
- Harrison, L. M., A. Nerlinger, R. D. Bungiro *et al.* 2002 Molecular characterization of *Ancylostoma* inhibitors of coagulation factor Xa. Hookworm anticoagulant activity in vitro predicts parasite bloodfeeding in vivo. *J. Biol. Chem.*, **277** (8): 6223 ~ 6229.
- Hotez, P. J. and A. Cerami 1983 Secretion of a proteolytic anticoagulant by *Ancylostoma* worms. *Journal of Experimental Medicine* **157**: 1594 ~ 1603.
- Hotez, P. J., Letrang and A. Cerami 1985 Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the adult hookworm *Ancylostoma caninum*. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 7343 ~ 7348.
- Inan, M., V. Chiruvolu, K. M. Eskridge *et al.* 1999 Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, **24** (7): 438 ~ 445.
- Joubert, A. M., A. I. Louw, F. Joubert *et al.* 1998 Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Experimental & Applied Acarology*, **22** (10): 603 ~ 619.
- Loeb, L. and A. J. Smith 1904 The presence of a substance inhibiting the coagulation of the blood in *Ancylostoma*. *Proceedings of the Pathological Society*, 173 ~ 187.
- Loeb, L. and M. S. Fleisher 1910 The influence of extracts of *Ancylostoma caninum* on the coagulation of the blood haemolysis. *Journal of Infectious Diseases*, **7**: 625 ~ 631.
- Nienaber, J., A. R. M. Gaspar and A. W. H. Neitz 1999 Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology*, **93** (2): 82 ~ 91.
- Perteguer, M. J., R. Raposo and C. Cuellar 1996 In vitro study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. *International Journal for Parasitology*, **26** (1): 105 ~ 108.
- Spellman, G. G. and H. L. Nossell 1971 Anticoagulant activity of dog hookworm. *American Journal of Physiology*, **4**: 922 ~ 927.
- Stanssens, P., P. W. Bergum, Y. Gansemans *et al.* 1996 Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 2149 ~ 2154.
- Zhu, K. C., J. R. Sauer, A. S. Bowman *et al.* 1997 Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.) *Journal of Parasitology*, **83** (1): 38 ~ 43.

PROGRESS OF THE STUDIES ON ANTICOAGULANT OF HOOKWORM

Yang Yurong

(Life science school, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005)