

文章编号: 1002-2694(2004)01-0068-03

吸血昆虫抗凝血活性物质的研究进展

杨玉荣, 王彦海

中图分类号: R384 文献标识码: A

近年来国外报道了吸血昆虫的多种抗凝血新蛋白, 部分已经纯化、测序并进行了克隆, 其潜在的药用价值正在评估中。我们相信吸血昆虫抗凝血活性物质在不久的将来必将成为最具潜力的抗凝血试剂和最有潜力的新的溶血栓药物, 用于治疗心脑血管疾病。本文对近年来吸血昆虫抗凝血活性物质的研究进展作一介绍, 期望能起到抛砖引玉的作用, 借此引起我国科研工作者的兴趣, 开展具有我国自有知识产权的研究工作, 同时对吸血昆虫唾液腺抗凝血活性物质作用途径和作用机理的研究有助于了解吸血昆虫的吸血消化机理, 对于寄生虫学研究也具有重要的理论和医学价值, 不仅可以填补我国寄生虫研究领域的空白, 开辟新研究方向, 而且其继续研究具有深远和巨大的经济效益, 可为潜在的抗凝血试剂来源及临床使用的抗血栓治疗药物研制和开发提供基础和依据。

1 吸血昆虫抗凝血活性物质的研究概况

国外对吸血昆虫抗凝血活性物质的研究, 可以分为两个阶段:

(1) 吸血昆虫吸血消化机制及抗凝血现象的初步检测研究

对吸血昆虫吸血消化过程的观察较早就开始了, 但对吸血昆虫抗凝血现象的研究则始于 20 世纪 60 年代, 但由于技术和仪器的限制, 长期以来发展缓慢, 仅限于抗凝血活性的测定和报道 (Hellmann K. et al., 1964, 1965), 发现 *Rhodnius prolixus* 具有抗凝血和溶纤活性, 并发现存在两种抗凝血因子命名为: Prolixin S 和 Prolixin G。在微小牛虻 (*Boophilus microplus*) 唾液腺检测到前列腺素 (Higgs GA et al 1976), 采采蝇唾液腺分泌物中存在着抗凝血和溶纤活性 (Parker, K, R et al 1979) 对其他种类的抗凝血活性和成分少有较深入的研究, 在此期间 (60~70 年代) 对蚊、蚤等多种血食昆虫的吸血活动和研究方法进行了深入探讨。

(2) 吸血昆虫抗凝血肽的测序、克隆及其表达

20 世纪 80 年代以来吸血昆虫唾液腺分泌物的这种独特作用再次吸引了科学家的兴趣, 对多种吸血昆虫的唾液腺分泌物进行了研究, 加上 90 年代以来新的生物技术的蓬勃兴起, 使抗凝血药物的研究兴起了新的高潮。近年来报道了吸血节肢动物的多种抗凝血新蛋白, 部分已经纯化、测序并进行了克隆, 它们潜在的药用价值正在评估中。这期间主要研究的吸血昆虫类群有以下几类:

① 虻: Waxman L 等人 (1990) 报道了从非洲钝缘虻 (*Ornithodoros moubata*) 提取的虻抗凝血肽 (TAP) 可以抑制 Xa 因子的活性, 并测定了部分 N 端和 C 端的序列。A Vande-

locht 等人 (1996) 报告了从该种虻中发现了抗凝血酶的活性并进行了分离提纯。JR Gordon 等人 (1991) 对革虻 (*Derma-centor andersoni*) 的抗凝血活性进行了测定发现具有抗 V 和 VII 复合物的活性。从具尾扇头虻 (*Rhipicephalus appendiculatus*) 只检测到较弱的抑制 Xa 因子活性 (Moses K. Limó, et al, 1991), 而从美洲花虻 (*Amblyomma¹ americanum*) 检测到前列腺素 PGE₂、PGF₂ 的活性 (Ribeiro JMC. et al 1992) 及抑制 Xa 因子和凝血酶的活性 (Zhu KC et al, 1997)。从萨氏钝缘虻 (*Ornithodoros savignyi*) 中检测到抑制血小板聚集因子的活性 (Mans BJ. et al 1998) 和凝血酶的抑制活性 (J Nienaber et al 1999) 并采用弱离子交换等方法进行纯化、生化性质鉴定和氨基酸序列分析; 对抑制 Xa 因子活性的蛋白进行了提纯、测序、克隆和在大肠杆菌表达 (Am Joubert et al 1998)。IM Francischetti 等人 (2002) 对肩突硬虻 (*Ixodes scapularis*) 抑制 VIIa 和组织因子复合物的活性成分进行了克隆并在昆虫细胞中表达。迄今为止国外主要研究了 6 种虻, 对其中 2 种凝血抑制因子进行了克隆和表达。从报道的表达结果看, 重组蛋白无论从真核或原核表达都具有天然蛋白的活性。

② 长红猎蝽 (*Rhodnius prolixus*) 为材料, 对其抗凝血活性作了研究, 发现 *prolixus* 具有抗五羟色氨和抗组织胺的活性 (Ribeiro JMC. et al 1982) 以及腺苷三磷酸双磷酸酶活性 (Ribeiro JMC. et al 1980) 和抗血小板聚集的活性 (Ribeiro JMC et al 1980, 1981)。此外还具有抗凝血酶的活性并进行了分离提纯克隆和表达 (T. Fridrich et al, 1993) 以及对抑制 VIII 因子介导的 Xa 因子的活性进行了检测、分离并测定了部分氨基酸序列 (Jose M. C Ribeiro, et al 1995)。

③ 采采蝇: 从采采蝇唾液腺分泌物中检测到的两种血小板聚集抑制物在离体条件下对凝血酶和血小板的聚集有抑制影响 (Mant, M, J, 1981) 以及存在着抑制凝血酶的活性 (Michael Cappello, et al 1998)。

④ 蚊类: 主要对几种按蚊唾液腺的腺苷三磷酸双磷酸酶活性进行了研究, 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的抗血小板活性主要来自该酶 (Ribeiro JMC et al 1982)。致倦库蚊中存在着抗血小板活性 *Culex quinquefasciatus* (Ribeiro JMC et al 1982~2001)。

⑤ 蠓类: 迄今为止只研究了一种 *Culicoides variipennis sonorensis*, 研究发现其唾液腺中含有抗 Xa 因子的活性的抑制剂 (Deleon AAP. et al 1998)。

* 本项目受福建省青年科技人才创新项目基金资助 (2002J051)

作者单位: 厦门大学生命科学院, 厦门 361005

作为未来抗凝血试剂和溶栓活性的药用材料的来源,科学家也对吸血昆虫抗凝血机理进行了研究。

2 吸血昆虫抗凝血活性物质的抗凝机理

目前对吸血昆虫抗凝血因子凝血机理研究发现其作用主要抑制内外源凝血途径的起始阶段和它们的共同途径,如 Prolixin-S 可抑制 XIII 及 IXa 因子的活性(Haruhiko Isawa, 2000), TAP(蛭抗凝血肽)抑制 Xa 因子的活性(Waxman L, 1990)Ixolaris 抑制组织因子复合物,而 savignyi 抑制凝血酶的活性。目前从不同唾液腺发现的抑制血液凝固的活性物质有所不同,分别可抑制不同的凝血因子:如抑制共同途径 Xa 活性的抑制物,外源途径的 V 和 VII 的抑制物,凝血酶抑制因子,抗内源途径的磷脂酶 A2S(PIA2),以及抑制血小板

聚集因子和前列腺素 PGE2、PGD2 等引起血管扩张,血流加速,从而有利于取食。

3 目前已研究的吸血昆虫种类和抗凝血活性物质的种类与性质

不同的吸血动物产生的抗凝血因子不同,其分子量和抗凝血机理也存在显著差异。吸血动物在吸血过程中要抗凝,首先要分泌一些抑制血液凝固的物质,如血小板聚集抑制因子、抗凝血酶 III 或凝血因子 X 抑制剂等,也可以分泌纤溶酶或纤溶酶原激活物,通过纤溶过程分解纤维蛋白来抗凝或溶解已形成的血栓。目前已经探明抗凝血活性物质的种类参看表 1。

表 1 已查明吸血昆虫的抗凝血活性物质的种类与性质

已查明抗凝血活性物质性质	节肢动物种类	报告人(时间)	
Xa 抑制因子	<i>Ornithodoros moubata</i>	Waxman L et al(1990)	
	<i>Culicoides variipennis sonorensis</i>	AAP Deleon et al 1998	
	<i>Ornithodoros savignyi</i>	Am Joubert et al 1998	
	<i>Rhodnius prolixus</i>	T. Fridrich et al 1993	
V VII抑制物	<i>Dermacentor andersoni</i>	JR Gordon et al(1991)	
腺苷三磷酸双磷酸酶	<i>Rhodnius prolixus</i>	Jose M. C Ribeiro et al 1980	
血小板聚集抑制物	<i>Ornithodoros savignyi</i>	BJ Mans et al (1998)	
凝血酶抑制物	<i>Ornithodoros moubata</i>	A Vandeloht et al (1996)	
		A Betz et al(1997)	
	<i>Ornithodoros savignyi</i>	J Nienaber et al 1999	
	<i>Boophilus microplus</i>	F Horn, et al 1999	
	<i>Rhodnius prolixus</i>	Jose M. C Ribeiro et al 1995	
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Jose M. C Ribeiro et al 2001	
	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Michael Cappello, et al 1998	
	<i>Amblyomma americanum</i>	KC Zhu et al(1997)	
	前列腺素 PGE2、PGF2	<i>Amblyomma americanum</i>	JMC Riberino et al 1992
		<i>Boophilus microplus</i>	Higgs G. A. et al 1976
VIIa 组织因子复合物抑制剂	<i>Ornithodoros scapularis</i>	IMFrancischetti et al(2002)	
抗血小板因子	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	Moses K. Limo et al 1991	
	<i>Aedes aegypti</i>	Kenneth R. et al 1998	
IXa 抑制因子	<i>Rhodnius prolixus</i>	Haruhika Isawa et al 2000	
血小板激活因子抑制物	<i>Dipetalogaster maximus</i>	U Lange, W Keilholz et al 1999	
Xa 抑制因子(经 VIII)	<i>Dipetalogaster maximus</i>	Katrin Mende et al 1999	

从国外研究可以看出,吸血昆虫分泌的凝血抑制因子因种类不同而不同,不同种类的吸血昆虫运用的抗凝机制大不相同,所分泌的抑制血凝物质也不一样,同一种类有时同时分泌多种类型的抗凝血因子,同时抑制内外源凝血途径。说明寄生虫在长期进化过程中,发展出适合本物种的摄食抗凝机制,从而有利于生存。这也为科研人员开发研制新的抗凝血试剂和溶栓药物提供了各种可能和多种选择。

4 展望

由于天然来源的吸血昆虫分泌的凝血有效成分含量很少,限制了其广泛应用,而目前广泛应用的重组基因工程技

术则为开展吸血昆虫抗凝血因子的应用开辟了方向,利用基因重组工程技术可以将吸血昆虫的抗凝血肽进行原核或真核细胞表达,从而获得大量的重组抗凝血因子用于进一步的动物模型试验或临床试验。2002 年国外也对部分有关的重组抗凝血因子的活体动物模型试验进行了报道。主要是在狒狒和狗体上进行的动静脉血栓溶栓试验,试验结果显示有效率达到 90% 以上,这显示重组抗凝血因子在未来将有广泛的应用前景,并将创造出巨大的经济效益。

目前国内对吸血昆虫抗凝血物质的研究较少,远远滞后于国外的水平,因此急需开展这方面的研究工作。同时对蛭

等吸血昆虫唾液腺抗凝活性物质作用途径和作用机理的研究,也有助于了解吸血昆虫的吸血消化机理。对于病媒吸血昆虫的防治研究具有重要的理论和实际意义。我国的吸血昆虫种类多,来源广泛,南北类群差异很大,具有丰富的种群和种类资源。我们相信必然可以从中筛选出我国特有种类吸血昆虫的凝血抑制因子,并最终用于开发新的抗凝溶栓药物,造福人类。

参考文献:

- [1] Hellmann, K Hawkins, R I. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* [J]. *Stal Nature* 1964 201: 1008—9.
- [2] Hellmann, K Hawkins, R I. Prolixin-S and Prolixin G: two anticoagulants from *Rodnius prolixus* [J]. *Stal Nature* 1965 207: 265—267.
- [3] Higgs, G. A. Vano, J. R Hart, R I Porter, C, Wilson, R G. Prostaglandins in the saliva of the cattle tick, *Boophilus microplus* (anestrini) (Acarina Ixodidae) [J]. *Bull. Entomol Rev.* 1976 66: 665—70.
- [4] AM Joubert, AI Louw, F Joubert, AWH Neitz. Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* [J]. *Experimental & Applied Acarology* 1998 22(10): 603—619.
- [5] J Nienaber, ARM Gaspar, AWH Neitz Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acani; Argasidae) [J]. *Experimental Parasitology* 1999 93: (2): 82—91.
- [6] T Friedrich, B Kroger, S Biabjan, HG Lemaire, HW Hoffken, P Reuschenbach, M Otte, and J Dodt. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus* [J]. *J. Biol Chem*, Aug 1993; 268: 16216—16222.
- [7] José M. C. Ribeiro and Ivo M. B Francischetti. Platelet-activating factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus* [J]. *J. Exp. Biol.*, Nov 2001; 204: 3887—3894.
- [8] JG Valenzuela, Y Belkaid, E Rowton, and JM Ribeiro. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases [J]. *J. Exp. Biol.*, Jan 2001; 204: 229—237.
- [9] F Hom, PC dos Santos, and C Termignoni *Boophilus microplus* anticoagulant protein; an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva [J]. *Arch Biochem Biophys*, Dec 2000; 384(1): 68—73.
- [10] S Narasimhan, RA Koski, B Beaulieu, JF Anderson, N Ramamoorthi, F Kantor, M Cappello, and E Fikrig. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis* [J]. *Insect Mol Biol*, Dec 2002; 11(6): 641—50.
- [11] Ben J. Mans Abraham I. Louw, and Albert W. H. Neitz Savignin, 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*, 2002; 77: 21371—21378.
- [12] U Lange, W Keilholz, GA Schaub, H Landmann, F Markwardt, and G Nowak Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*. [J]. *Haemostasis*, Jan 1999; 29(4): 204—11.
- [13] Hanhiko Isawa, Masao Yuda, Kentaro Yoneda, and Yasuo Chinzei. The Insect Salivary Protein, Prolixin-S, Inhibits Factor IXa Generation and Xase Complex Formation in the Blood Coagulation Pathway [J]. *J. Biol Chem*, Feb 2000; 275: 6636—6641.
- [14] Michael Cappello, Song Li, Xiaoi Chen, Chang-Ben Li, Lisa Harrison, Sukanya Narashimhan, Charles B. Beard, and Serap Aksoy Tsetse thrombin inhibitor; Blood meal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans* [J]. *PNAS*, Nov 1998; 95: 14290—14295.
- [15] A Betz, GP Vlasuk, PW Bergum, S Krishnaswamy. Selective inhibition of the prothrombinase complex; Factor Va alters macromolecular recognition of a tick anticoagulant peptide mutant by factor Xa. [J]. *Biochemistry* 1997 36(1): 181—191.
- [16] BJ Mans, ARM D Gaspar, AI Louw, AWH Neitz. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acani; Argasidae) [J]. *Experimental & Applied Acarology* 22; 6 (1998): 353—366.
- [17] AAP Deleon, JG Valenzuela, WJ Talachnick Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an inhibitor of factor Xa [J]. *Experimental Parasitology* 88; 2 (FEB 1998): 121—130.
- [18] J Yuan, AS Bowman, M Aljamaik, MR Payne, JS Tucker, JW Dillwith, RC Essenberg, and JR Sauer. Prostaglandin E(2)-stimulated secretion of protein in the salivary glands of the lone star tick via a phosphoinositide signaling pathway. [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, Nov 2000; 30(11): 1099—106.
- [19] Kenneth R Stark and Anthony A James Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti* [J]. *J. Biol Chem*, Aug 1998; 273: 20802—20809.
- [20] Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. 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 (Blood)* 2002 May 15; 99(10): 3602—12.
- [21] KC Zhu, JR Sauer, AS Bowman, JW Dillwith. Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.) [J]. *Journal of Parasitology* 83; 1 (FEB 1997): 38—43.

收稿日期: 2003-02-17; 修回日期: 2003-09-26