

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 蛇毒中低分子量抗凝血成分之研究(II)

### Study on the small molecular anticoagulant of snake venom (II)

計畫編號：NSC 88-2314-B-041-004

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：劉朝榮 嘉南藥理學院藥學系

#### 一、中文摘要

利用陽離子交換及膠質過濾層析，我們從 *Crotalus atrox* 蛇毒中分離出一個具有抗凝血活性的蛋白成分，並命名為 croatroxase。它的分子量經由 SDS-PAGE 測定為 27 kDa。在 50 μg/ml 的 croatroxase 前處理 30 分鐘之後，純化的 fibrinogen 不再具有形成 clot 的活性。另外隨著 croatroxase 存在量的增加，血漿加鈣後引發血漿凝固的時間亦隨之延長。4 μg/ml 的 croatroxase 即可使得加鈣的血漿在 10 分鐘內無法凝固。Croatroxase 延長血漿加鈣凝固時間的作用與其和血漿先行作用時間的長短並無相關性。當 4 μg/ml 的 croatroxase 完全抑制血漿凝固的同時，ADP (10 μM) 所引發血漿中血小板的凝集則不受影響。這樣的結果顯示 croatroxase 只干擾血液凝固並不會影響血小板的凝集功能。

關鍵詞：蛇毒、血液凝固、抗凝血劑

#### Abstract

A protein with anticoagulant activity was purified from snake venom of *Crotalus atrox* by cation-exchange in SP Sepharose column and gel-filtration in Sephadryl S-100 column. This protein was called croatroxase and its molecular weight was estimated to be 27 kDa by SDS-PAGE. After 30 min pretreatment, croatroxase rendered purified fibrinogen incoagulable at 50 μg/ml. Croatroxase was also active in human plasma. It prolonged plasma recalcification time in a dose-dependent manner. At 4 μg/ml, croatroxase prevented clot formation longer

than 10 min, however, it had no significant effect on platelet aggregation induced by ADP (10 μM) in platelet-rich plasma. These results indicated that croatroxase as an anticoagulant without effect on platelet aggregation.

**Keywords:** Snake venom, Coagulation, Anticoagulant

#### 二、緣由與目的

目前已知血液凝固系統及血小板不僅在止血的生理功能扮演重要角色，它們也參與病理血栓的形成(1,2)。目前用來對抗血栓的藥物主要有三種：(I) 抑制血小板功能的藥物 (II) 干擾凝血系統的藥物 (III) 促進血栓溶解的藥物。這些藥物要不是藥效不佳，就是副作用大。因此，開發既有效又安全性高的藥物對於血栓的治療將有莫大的助益。

出血性毒蛇的毒液中多存在有干擾止血功能的成分。這些成分的作用機轉涵蓋上述三種藥物的作用機轉(3-6)。因此，從蛇毒中找尋並研究影響止血功能的成分對於抗血栓藥物的開發將有所助益。目前已知 disintegrins 蛇毒成分的研究對於抗血小板藥物的開發提供了相當寶貴的資訊(7)。Thrombin-like 的蛇毒成分甚至直接臨床使用來對抗血栓(8)。最近有些報告顯示從蛇毒純化所得的 fibrinogenase 可能具有臨床應用的價值(9)。因此，蛇毒中具有抗凝血活性的 fibrinogenase 可能是找尋抗血栓藥物的新方向。

#### 三、結果與討論

配合加鈣引發血漿凝固的篩選方法。*Crotalus atrox* 蛇毒在陸續經過陽離子交換管柱以及依照分子量大小分離的膠質過濾管柱後，純化出一個具有抗凝血活性的成分。命名為 *croatroxase*。它的分子量從 SDS-PAGE 測得為 27 kDa

隨著 *croatroxase* 存在濃度的增加 (1-4  $\mu\text{g/ml}$ )，加鈣引發血漿凝固的時間亦隨之延長 (Table I)。當有 4  $\mu\text{g/ml}$  的 *croatroxase* 存在時可使得加鈣的血漿在 10 分鐘內無法凝固 (Table I)。*Croatroxase* 延長血漿加鈣凝固時間的作用與其和血漿先行作用時間的長短並無相關性(未列數據)。當 4  $\mu\text{g/ml}$  的 *croatroxase* 完全抑制血漿凝固的同時，ADP (10  $\mu\text{M}$ )所引發血漿中血小板的凝集則不受影響。這樣的結果顯示 *croatroxase* 只干擾血液凝固並不會影響血小板的凝集功能。另外，隨著 *croatroxase* 與純化 *fibrinogen* 作用劑量的增加及時間的加長，*thrombin* 則越不容易引發 *fibrinogen* 形成 *fibrin clot* (Table II)。然而，*croatroxase* 必須使用 50  $\mu\text{g/ml}$  的高濃度先行和 *fibrinogen* 在 37°C 溫浴 30 分鐘才能有效的防止 *fibrin clot* 的產生。顯示 *croatroxase* 雖然具有干擾 *thrombin* 引發 *fibrinogen* 形成 *fibrin clot* 的能力，但是並不是很強。*Croatroxase* 在 50  $\mu\text{g/ml}$  的高濃度對於 plasma prothrombin time 並無明顯的影響(未列數據)。

從上述的結果顯示 *croatroxase* 可能有 *fibrinogenase* 的活性，因為 *croatroxase* 對於 *thrombin* 引發 *fibrinogen* 形成 *fibrin clot* 有抑制作用，但是作用很弱。*Croatroxase* 在血漿的抗凝血作用較強，並且與血漿先行作用的時間長短無關。這種現象並不是單純的 *fibrinogenase* 活性可以加以解釋的。因為 *fibrinogenase* 在血漿中的作用通常無法有效展現。似乎意味著有其他的機轉貢獻 *croatroxase* 的抗凝血活性。其中一個可能是 *phospholipase A<sub>2</sub>* 活性。從前人的研究得知具有 *phospholipase A<sub>2</sub>* 的抗凝血蛇毒成分在血漿中具有明顯的作用(10)，但是對於

*thrombin* 直接引起 *fibrinogen* 形成 *fibrin clot* 則無顯著的作用。由於單一機轉並無法解釋 *croatroxase* 的抗凝血活性，目前我們所純化所得的 *croatroxase* 可能純度不夠高，必須進一步提高純度，再進行機轉的探討。

#### 四、計畫成果自評

先前的研究計劃提及 *Crotalus viridis* 蛇毒中可能存在有一低分子量的抗凝血成分。然而在純化的過程中，卻找尋不到此一低分子量的抗凝血成分。很可能此一抗凝血成分在純化的過程中失去了活性，另一個可能性是抗凝血成分的量很少，純化過程的損失導致最後獲得的量太少，無法測到活性。由於最近有些報告提及分離自特定蛇毒的 *fibrinogenase* 可能有臨床應用的價值(9)，但是大部份的 *fibrinogenase* 在血漿中的活性很難看到，因此我們進行抗凝血活性篩選時在血漿進行，希望能找到在血漿中有活性的成分。從 *Crotalus atrox* 蛇毒中我們篩選並分離到 *croatroxase*，*Croatroxase* 在血漿中對於 recalcification time 有明顯的延長，顯示 *croatroxase* 在血漿中有作用。*Croatroxase* 對於 *thrombin* 引發 *fibrinogen* 形成 *fibrin clot* 也有抑制的作用。*Croatroxase* 進一步的機轉探討將可以告訴我們 *croatroxase* 是如何在血漿中干擾凝血的機轉。另外，先前有些研究指出 *Crotalus atrox* 蛇毒中存在有幾個抗凝血成分，這些純化自 *Crotalus atrox* 蛇毒的抗凝血成分的分子量和 *croatroxase* 的分子量有明顯的不同。顯示 *croatroxase* 是存在於 *Crotalus atrox* 蛇毒中另一個新的抗凝血成分。而且 *croatroxase* 在血漿中是有活性的抗凝血成分。經由研究 *croatroxase*，可能對於新的抗血栓藥物研發會有所助益。

#### 五、參考文獻

1. Schafer AI and Handin RI (1979) The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 22: 31-52.

2. Hachman RL and Silverstein R (1993) Hypercoagulable states. Ann Intern Med 119: 819-827.
3. Ouyang C and Teng CM (1976) Fibrinogenolytic enzymes of *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. Biochim Biophys Acta 420: 298-308.
4. Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ and Niewiarowski S (1990) Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. Proc Soc Exp Bio Med 195: 168-171.
5. Janet DK and Frederick JW (1986) Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). Biochemistry 25: 4175-4179.
6. Zhang Y, Wisner A, Xiong Y and Bon C (1995) A novel plasminogen activator from snake venom. J Biol Chem 270: 10246-10255.
7. Weller T, Alig L, Muller MH, Kouns WC and Steiner B (1994) Fibrinogen receptor antagonists: a novel class of promising antithrombotics. Drugs Future 19: 461-476.
8. Bell WR, Bolton G and Pitney WR (1968) The effect of Arvin on blood coagulation factors. Br J Haematol 15: 589-602.
9. Willis TW, Tu AT and Miller CW (1989) Thrombolysis with a snake venom protease in a rat model of venous thrombosis. Thromb Res 53: 19-29.
10. Teng CM, Kuo YP, Lee LG and Ouyang C (1987) Characterization of the anticoagulants from taiwan cobra (*Naja naja attra*) snake venom. Toxicon 25: 201-210.

**Table I Effect of croatroxase on the recalcification time of human plasma.**

Treatment	Recalcification time (min)
Buffer (as control)	5.7±0.47
Croatroxase (ug/ml)	
1	6.2±0.62
2	7.0±0.41
3	8.8±1.0
4	> 10

Sodium citrate anticoagulated plasma (0.45 ml) was preincubated with buffer or various doses of croatroxase (2 ul) at 37°C for 3 min. Then, 50 ul of CaCl<sub>2</sub> (100 mM) was added and clot formation was examined at an interval of 30 seconds. Data was expressed as mean±STD. (n=3)

**Table II Effect of croatroxase on thrombin-induced fibrin clot formation.**

Treatment	Clot formation
Buffer	+
Croatroxase (ug/ml)	
10	+
20	+
50	-

Fibrinogen in Tyrode solution (pH 7.35, containing 1mM CaCl<sub>2</sub>) at a concentration of 0.5 mg/ml was preincubated with buffer or various doses of croatroxase at 37°C for 30 min. Then, bovine thrombin, at a final concentration of 0.1 U/ml was added and clot formation was determined after incubation for 10 min at 37°C.

+ : clot formation

- : no clot formation