行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※
※　　※
※　**類膠原蛇毒成份** TRIMUCYTIN **的研究**(1/2)　※
※　　※
※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：▒個別型計畫　　□整合型計畫

計畫編號：NSC 89－2320－B－041－001

執行期間：88 **年** 08 **月** 01 **日至** 89 **年** 07 **月** 31 **日**

計畫主持人：劉 朝 榮

共同主持人：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

□**赴國外出差或研習心得報告一份**

□**赴大陸地區出差或研習心得報告一份**

□**出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份**

□**國際合作研究計畫國外研究報告書一份**

執行單位：嘉南藥理學院藥學系

中　華　民　國 89 **年** 10 **月** 25 **日**

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

類膠原蛇毒成份 TRIMUCYTIN 的研究(1/2)

Study of trimucytin, a collagen-like snake venom protein

計畫編號：NSC 89-2320-B-041-001

執行期限：88 年 08 月 01 日至 89 年 07 月 31 日

主持人：劉朝榮　嘉南藥理學院藥學系

E-mail : czliu33@mail.tcu.edu.tw

計畫參與人員：吳定峰　嘉南藥理學院藥學系

一、中文摘要

在台灣龜殼花毒蛇的毒液中含有一強力引發血小板凝集的成份，稱之為 trimucytin。前人的研究認為 trimucytin 引發血小板凝集的作用與膠原(collagen)很相似。然而 trimucytin 作用在血小板何種受體來引發血小板凝集至今尚未清楚。目前已知血小板表面的 α2β1 integrin 是膠原 (collagen) 的結合受體,而且α2 次單元上的 I-domain (又稱之為 A-domain) 是 collagen 結合的主要部位。為了了解血小板 α2β1 integrin 的 I-domain 是否與 trimucytin 的活性相關，我們利用基因工程技術製造出 I-domain 來探討 I-domain 對於 trimucytin 引發血小板凝集活性的影響。首先我們從人類臍靜脈內皮細胞 (HUVECs) 抽取 RNA，利用 RT-PCR 我們獲得了 I-domain 的 cDNA (α2I cDNA)，將α2I cDNA 接到 pGEX-2T 載体，再送入 DH5α *E. coli* 中進行蛋白質表達。I-domain 是以α2I-GST 融合蛋白的的型式表達出來。最後使用 glutathione 親和性管柱純化α2I-GST。由 *E. coli* 製造出來的α2I-GST 具有防止 collagen 引發血小板凝集的活性，和先前的文獻報告是相同的。然而，α2I-GST 對於 trimucytin 引發血小板凝集的活性則沒有影響。這樣的結果顯示，trimucytin 對於血小板的作用與 collagen 有些不盡相同的地方。

關鍵詞：蛇毒、血小板、膠原

Abstract

Trimucytin, a powerful platelet aggregation inducer isolated from the venom of Taiwan habu snake (*Trimeresurus mucrosquamatus*), has been proposed to mimic the action of collagen. However, the receptor(s) that mediate platelet-trimucytin interaction has not yet been defined. α2β1integrin has been demonstrated to play an important role in supporting platelet adhesion to collagen and the I-domain (also called A-domain) of α2 subunit can accounts for the collagen-binding property. In this study, we use recombinant I-domain to elucidate the role of α2β1 I-domain on the platelet reactivity of trimucytin. We had cloned the I-domain of α2 subunit (α2I) by RT-PCR using the total RNA isolated from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). The α2I cDNA was inserted into pGEX-2T (a GST vector) in frame with the GST for protein expression. Recombinant α2I-GST fusion protein was expressed in DH5α *E. coli* and purified by glutathione affinity column. In accordance with other researcher's observation, our recombinant α2I-GST fusion protein was found to inhibit collagen-induced platelet aggregation. Whereas, it has no significant effect on the aggregation of platelets triggered by trimucytin. Our results indicate that there are some differences between trimucytin and collagen in triggering platelet aggregation.

Keywords: snake venom、platelet、collagen

二、緣由與目的

Integrins 是一類廣泛存在於各種細胞表面受體的總稱,它們是由α及β兩個次單

元所構成的複合体〔1〕。利用 integrins，細胞可以吸附在特定的基質（matrix）上，也可以和其他的細胞接觸。血小板是血流中最小的血球，透過 integrins 所進行的細胞黏著以及細胞之間的交互作用，血小板才能有效的展現止血的生理功能。血小板的細胞膜上存在有 5 種 integrins,分別是 α2β1、α5β1、α6β1、αvβ3、αIIbβ3〔2〕。其中α2β1 及αIIbβ3 對於血小板止血的生理功能較為重要。當血管有破損時,傷口處會暴露出 collagen，血小板利用α2β1 integrin 迅速黏著在 collagen 上，隨之血小板活化變形，同時αIIbβ3 的立体結構改變，血漿中的 fibrinogen 結合上去, 並且在不同的血小板之間形成橋樑，拉住不同的血小板,引發血小板凝集。臨床上血小板缺乏α2β1 或是αIIbβ3 的患者有容易出血的傾向〔3,4〕。說明了這兩種 integrins 的重要性。

目前認為血小板主要是利用 α2β1 integrin α2 次單元上一段大約200個胺基酸所組成的 I-domain (又可稱之為 A-domain) 吸附在 collagen 上〔5〕。利用基因工程製造出來的 I-domain 能和 collagen 結合也証實了這樣的說法〔6〕。最近透過立体結構的解析，更從分子層次進一步的了解到α2β1 integrin 的 I-domain 如何與 collagen 結合〔7-9〕。

台灣毒蛇龜殼花（*Trimeresurus mucrosguamatus*）的毒液中存在有一能引起血小板凝集的成份，經純化後命名為 trimucytin。先前的研究認為 trimucytin 引發血小板凝集的作用和膠原（collagen）很像〔10〕。但是至今仍無任何直接証據証明 trimucytin 是經由結合到 collagen 受体來引發血小板凝集。為了釐清 trimucytin 是否和 collagen 一樣會與血小板α2β1 integrin 的 I-domain 結合，我們利用基因工程技術製造出的 I-domain 當作工具來探討 I-domain 與 trimucytin 引發血小板活化凝集的相關性。

三、結果與討論

利用抽取細胞 total RNA 的 kit (QIAGEN®)，我們成功的從人類臍靜脈內皮細胞（HUVECs）抽取到 total RNA。依據 Tuckwell 等人的方法[6]，使用含有 *Eco*RI 及 *Bam*HI 限制酵素切點的兩個引子（primer）進行 RT-PCR。從 DNA 電泳膠上顯示在 600 到 700 bp 之間有一符合α2I cDNA 大小的 DNA 片段。將此一 DNA 片段定序後我們確定獲得了 I-domain 的 cDNA（α2I cDNA）。我們從 HUVECs 反轉錄到的 cDNA 與 1995 年 Tuckwell 等人從 fibroblast RNA 反轉錄到的 cDNA 雖然有幾個 neucleotides 不一樣，但是它們所對應的氨基酸都一樣。

將α2I cDNA 接到 pGEX-2T 載體後，我們將此載體送入 DH5α *E. coli* 中進行蛋白質的表達。由於 pGEX-2T 是一種帶有 Glutathione S-transferase (GST) gene 的基因融合表現載體，因此α2 I-domain 是以α2I-GST 融合蛋白的型式表達出來。為了抑制自發性的蛋白質表達，我們在高濃度 glucose（20 mM）存在下培養菌體，等到菌數夠多的時候再加入 IPTG 刺激菌體表達α2I-GST 融合蛋白。經過 SDS-PAGE 的分析我們可以看到在 50 kDa 的位置有大量的蛋白出現, 從 Western blot 的結果顯示這就是α2I-GST 融合蛋白。

菌體收集後用高壓將菌體打破，高速離心後的上清液部分依然有大量的α2I-GST 存在, 顯示大部分表達出來的α2I-GST 並沒有形成 inclusion body。將上清液過濾後通過 glutathione 親和性管柱，結合在管柱內的α2I-GST 再用高濃度的 glutathione 沖洗出來。α2I-GST 經過透析濃縮後測試它對 collagen 及 trimucytin 引發血小板凝集的影響。

隨著 collagen 或是 trimucytin 加入濃度的增加，懸浮在 Tyrode's 溶液中的血小板（3×10^8/ml）凝集的程度越好。Collagen 及 trimucytin 分別在 5 μg/ml 及 1.0 μg/ml 的濃度時可以引發血小板凝集達到最大的程度。我們測定α2I-GST 對於引發血小板凝集程度達 90%的 collagen（3 μg/ml）及 trimucytin（0.8 μg/ml）活性的影響。隨著α2I-GST 存在濃度的增加，collagen（3 μg/ml）引發血小板凝集的能力逐漸變差。在 6.6 μM 的濃度時，α2I-GST 能完全抑制 collagen（3 μg/ml）所引起的血小板

凝集。這和其他研究室所觀察到的是相同的的結果[11]。然而，α2I-GST 對於 trimucytin（0.8 μg/ml）所引起的血小板凝集則完全沒有作用。α2I-GST 對於 collagen 及 trimucytin 引發血小板凝集活性具有差異性的影響顯示：trimucytin 對於血小板的作用和 collagen 有一些不完全相同的地方。

得到這樣的結果令我們很意外，因為我們的研究發現具有 collagen 結合能力的蛇毒蛋白 crovidisin〔12〕以及結合在 α2β1 integrin I-domain 的單株抗体 6F1〔13〕對於 collagen 及 trimucytin 引發血小板凝集的活性均有抑制作用〔unpublished data〕。這似乎意味著 trimucytin 和 collagen 在結構上有相同的地方，而且對於血小板的作用和 collagen 應該極為相似。然而，我們利用基因工程製造出來的 I-domain（α2I-GST）對於 trimucytin 引發血小板凝集的作用卻沒有影響。我們推測 trimucytin 和 collagen 的結構在某些地方不一樣，trimucytin 可能缺少可以和 I-domain 結合的部位，導致α2I-GST 無法與 trimucytin 結合。所以 trimucytin 對於血小板的作用，才不受α2I-GST 的影響。關於 collagen 引發血小板凝集的過程，目前認為 collagen 先與血小板 α2β1 integrin α2 次單元上的 I-domain 接觸，然後再利用其他部位作用到血小板其他地方，進而活化血小板、引發凝集[5]。而 trimucytin 引發血小板凝集的作用可能無需先與 I-domain 接觸，它可以直接作用到 collagen 活化血小板的受體上，引發血小板活化、凝集。

四、計畫成果自評

在一年的時間內，我們的研究進展還算不錯。不僅獲得了α2β1 integrin I-domain 的 cDNA，我們還利用 *E. coli* 將 I-domain 成功的表現出來，而且是具有下降 collagen 引發血小板凝集活性的 I-domain。同時我們發現 trimucytin 雖然能模擬 collagen 對於血小板的作用，但是它引發血小板凝集的作用機轉和 collagen 還是有些不同的地方。目前我們所使用的是α2I-GST 融合蛋白，進一步我們將使用 I-domain 進行相關的研究。

經由蛋白立體結構的分析，目前有關於 I-domain 與 collagen 之間如何相互結合的分子機轉已逐漸的清楚〔7-9〕。但是 collagen 在與 I-domain 結合之後如何來活化血小板進而引發血小板凝集的分子機轉則尚無定論。我們的研究顯示類膠原蛇毒成分 trimucytin 在無需與 I-domain 結合的情況下能模擬 collagen 對於血小板的作用。因此，進一步研究 trimucytin 引發血小板凝集的分子機轉將有助於了解 collagen 在與 I-domain 結合之後引發血小板活化、凝集的分子機轉。這些研究結果不僅可發表在國際學術性期刊，從研究結果所獲得的一些資料將有助於相關藥物的研發。

五、致謝

感謝國立成功大學醫學院生化所吳華林教授慷慨提供人類臍靜脈內皮細胞（HUVECs）及其實驗室張麗琴小姐在蛋白質表達技術上的協助。

六、參考文獻

[1] Hynes RO. (1987) Integrins：a family of cell surface receptors. Cell 48: 549-554

[2] Ginsberg MH, Loftus JC and Plow EF (1988) Cytoadhesions, integrins, and platelet adhesion. Thromb Haemostas 59: 1-6

[3] George JN, Caen JP and Nurden AT (1990) Glanzmann's thrombasthenia：the spectrum of clinical disease. Blood 75: 1383-1395

[4] Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WPM and Sixma JJ（1985）Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. Nature 318: 470-472

[5] Barnes MT, Knight CG and Farndale RW（1998）The collagen–platelet interaction. Curr Opin Hematol 5: 314

[6] Tuckwell D, Calderwood DA, Green LJ and Humphries MJ（1995） Integrin α2 I-domain is a binding site for collagen. J Cell Sci 108: 1629-1637

[7] Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ and Liddington RC.（2000）Structural basis of collagen recognition by integrin α2β1. Cell 100: 47-56

[8] Smith C, Estavillo D, Emsley J, Bankston LA, Liddington RC and Cruz MA（2000）Mapping the collagen-binding site in the I domain of the glycoprotein Ia/IIa（integrin α2β1） J Biol Chem. 275: 4205-4209

[9] Knight CG, Morton LF, Peachey AR, Tuckwell DS, Farndale RW and Barnes MJ（2000） The collagen–binding A-domain of integrin α1β1 and α2β1 recognize the same amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens. J Boil Chem 275: 35-40

[10] Teng C M, Ko FN, Tsai IH. Hung ML, and Huang TF （1993） Trimuncytin: a collagen–like aggregating inducer isolated from *Trimeresurus mucrosqusmatus* snake venom. Thromb Haemostas 69: 286-292

[11] Depraetere H, Will C, Gansemans Y, Stanssens P, Lauwereys M, Baruch D, De Reys S and Deckmyn H（1997）The integrin alpha 2 beta 1（GPIa / IIa）-I-domain inhibits platelet–collagen interaction. Thromh Haemostas 77: 981

[12] Liu CZ and Huang TF.（1997）Crovidisin, a collagen–binding protein isolated form snake venom of *Crotalus viridis*, prevents platelet–collagen interaction. Arch Biochem Biophys 337: 291-299

[13] Coller BS, Beer JH, Scudder LE and Steinberg MH （1989）Collagen-platelet interactions: evidence for a direct interaction of collagen with platelet GPIa/IIa and an indirect interaction with platelet GPIIb/IIIa mediated by adhesive proteins. Blood 74: 182-192