

# 一种新的钙依赖性磷脂结合蛋白——Annexin32 对血凝及血栓形成的影响\*

张 毅 陈蕊雯 孙树汉\*\*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 医学生物技术与分子遗传研究所, 上海 200433)

**摘要** 通过探讨一种新的钙依赖性磷脂结合蛋白 Annexin32 对家兔凝血时间和兔、大鼠血栓形成的影响, 对其主要药效学进行了研究, 并与普通肝素进行了比较. 兔、大鼠静脉给药, 检测用药后不同时间家兔白陶土部分凝血活酶时间(KPTT)、体外血栓形成和大鼠体内血栓形成的变化. 结果显示, 按 1 mg/kg 静脉注射 Annexin32 后, KPTT 明显延长( $P < 0.01$ ), 但小于肝素延长幅度, 体外血栓形成仪测定显示血栓长度、重量均明显减少( $P < 0.01$ ), 大鼠体内血栓重量明显降低( $P < 0.01$ ), 提示 Annexin32 具有抗血栓形成的功能, 并有对凝血系统影响小的特征.

**关键词** 钙依赖性磷脂结合蛋白 凝血时间 血栓形成

Annexins 家族是 20 世纪 70 年代末发现的一类新的钙结合蛋白, 因其与  $Ca^{2+}$  结合后可进一步与磷脂结合, 所以又称为钙依赖性磷脂结合蛋白<sup>[1~3]</sup>. 此类蛋白质已被阐明在诸如炎症反应、细胞骨架活动、胞吞和胞吐以及抗凝血等过程中起着重要的生理功能<sup>[4,5]</sup>. Annexin32(简称为 ANX32)是孙树汉等人<sup>[6]</sup>从猪囊尾蚴 cDNA 文库中筛选得到的一种新基因, 曾被命名为 cC1. 我们利用生物信息学工具对 cC1 进行分析, 结果显示 cC1 实际上是一种新的 Annexins 亚家族成员, 具有典型的家族结构特征. 为了进一步探讨它作为此类家族又一新成员所具备的生理功能, 本实验通过观察其对家兔凝血时间及兔、大鼠血栓形成的影响, 对其抗凝血、抑制血栓形成的药效作用进行了初步研究.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 质粒与菌种** 质粒 pGEX-5T 及含重组表达质粒 pGEX-5T-cC1 的菌种由本室保存.

**1.1.2 动物** 健康雄性新西兰白兔, 体重 2.0~3.0 kg, 健康雄性 SD 大鼠, 体重 150~250 g, 均购自海军医学研究所实验动物中心.

**1.1.3 试剂与仪器** Glutathione Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司. Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 为 Sigma 公司产品. 肝素钠注射液由上海第一生化药业公司上海生物化学制药厂生产(批号: 001006). 其他试剂为国产分析纯. S5 型体外血栓形成仪为北京普利生精密

2001-03-27 收稿, 2001-07-12 收修改稿

\* 国家“863”计划资助项目(批准号: 101-06-05-04)

\*\* 联系人, E-mail: shsun@smmu.edu.cn

仪器研究中心产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 GST-ANX32 融合蛋白与 GST 蛋白的表达与纯化** 含重组子的过夜培养物 1:50 接种于 2YT 培养基(含 100  $\mu\text{g/mL}$  AP), 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 2~3 h 至  $A_{600}$  为 0.6~0.8, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L. 37 $^{\circ}\text{C}$  诱导培养 4~5 h, 此时蛋白表达量最高, 离心收集菌体, 加 PBS 后冰浴超声破菌, 12000  $\times g$  离心收上清, 以亲和层析法(Glutathione Sepharose 4B)从上清液吸附融合蛋白, PBS 洗涤后用含有还原型谷胱甘肽的洗脱液洗脱. 同样方法纯化 GST 蛋白.

**1.2.2 蛋白质含量测定方法** 用改良 Bradford 法<sup>[7]</sup>测定.

**1.2.3 凝血指标测定** 雄性新西兰白兔随机分为 6 组, 每组 6 只, 即生理盐水组、GST 蛋白 1 mg/kg 组、ANX32 1, 0.5, 0.3 mg/kg 组(由测定得到融合蛋白的浓度, 按分子量比例估算含单一 ANX32 蛋白的浓度)、肝素钠 90 U/kg 组(各注射液均以生理盐水配制成所需浓度, 给药容积为 5.0 mL/kg). 每组分别耳缘静脉注射, 用药前心脏穿刺取血 2 mL 作自身对照, 用药后 15, 30 min 及以后 1~4 h 每小时各从心脏取血 2 mL, 3.8% 枸橼酸钠抗凝(1:9), 离心分离血浆, 按常规方法测定白陶土部分凝血活酶时间(KPTT).

**1.2.4 体外血栓形成实验** 雄性新西兰白兔 36 只, 按上述方法随机分为 6 组, 同上给药, 用药前及用药后 1/4, 1/2, 1, 2, 3 h 分别心脏穿刺取血 1.8 mL, 按照 Chandler 法<sup>[8]</sup>立即将血液注入硅化胶管, 于体外血栓形成仪恒温(37  $\pm$  1 $^{\circ}\text{C}$ )旋转 15 min 后倾出血栓, 生理盐水洗涤, 测长度, 称湿重, 将血栓条置 60 $^{\circ}\text{C}$  烘箱 3 h, 恒重后称干重.

**1.2.5 大鼠下腔静脉血栓模型** 取大鼠禁食过夜(不禁水), 随机分为 4 组, 每组 10 只, 即生理盐水组、GST 蛋白 1 mg/kg 组、融合蛋白中 ANX32 含量 1 mg/kg 组、肝素钠 100 U/kg 组(各组均以生理盐水配成所需浓度, 尾静脉给药, 给药容积为 3.0 mL/kg). 大鼠给药后 1 h, 以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 仰卧位固定后腹部消毒, 腹正中切开腹壁, 暴露并分离下腔静脉, 于左肾静脉下方用粗丝线结扎下腔静脉, 缝合腹壁. 由于结扎造成血管壁损伤, 血流阻断, 血栓形成. 于结扎后 3 h 再次麻醉动物, 重新开腹, 在结扎下方 2 cm 处用止血钳夹住下腔静脉, 取出此段血管迅速纵行剖开管腔, 在滤纸上取出血栓, 蘸干多余血迹, 60 $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥 3 h, 恒重后称干重.

**1.2.6 统计方法** 用  $t$  检验以均数  $\pm$  标准差(mean  $\pm$  SD)表示.

## 2 结果

### 2.1 GST-ANX32 融合蛋白与 GST 蛋白的表达与纯化

纯化后蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 有 26 ku 的 GST 蛋白条带以及 64 ku 的单一蛋白条带, 后者分子量与 GST-ANX32 融合蛋白预计值相符.

### 2.2 ANX32 对凝血指标的影响

与用药前所设自身对照相比, 静脉注射 ANX32 1 mg/kg 剂量组, 注射后 15 min 即延长 KPTT 约 20 s( $P < 0.01$ ), 药效可持续 2 h, 3 h 后又逐渐恢复到正常水平. 静脉注射肝素钠 90 U/kg 对照组, 15 min 时所测 KPTT 较用药前延长约 90 s( $P < 0.01$ ), 1 h 后很快恢复到用药前水平. ANX32 0.5 mg/kg 剂量组用药后 15~30 min 期间可测到 APTT 略有升高, 随后很快恢复到用药前水平, 而生理盐水对照组、GST 蛋白组、ANX32 0.3 mg/kg 组与用药前 KPTT 相比无显著性

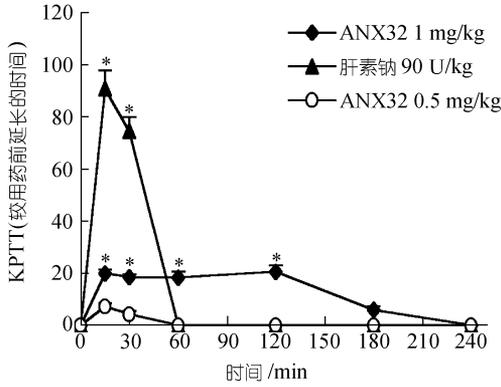


图 1 静脉注射 ANX32 与肝素后 KPTT 较用药前延长的时间(mean ± SD)  
n = 6, \*P < 0.01(与用药前比较)

差异(图 1).

### 2.3 ANX32 对体外血栓形成影响

ANX32 用量为 1 mg/kg 时, 30 min 后血栓湿重、干重、长度分别较用药前相应指标减少了(78.3 ± 8.7) mg, (19.7 ± 3.9) mg, (2.17 ± 0.10) cm (P < 0.01). 静脉注射肝素钠 90 U/kg, 30 min 后所测指标分别比用药前减少了(94.6 ± 7.6) mg, (25.0 ± 3.2) mg, (2.46 ± 0.12) cm (P < 0.01). ANX32 用量为 0.5 mg/kg 时, 抗血栓能力较高剂量组降低, 而生理盐水对照组、GST 蛋白组、ANX32 0.3 mg/kg 组与用药前各指标相比无显著性差异(图 2).

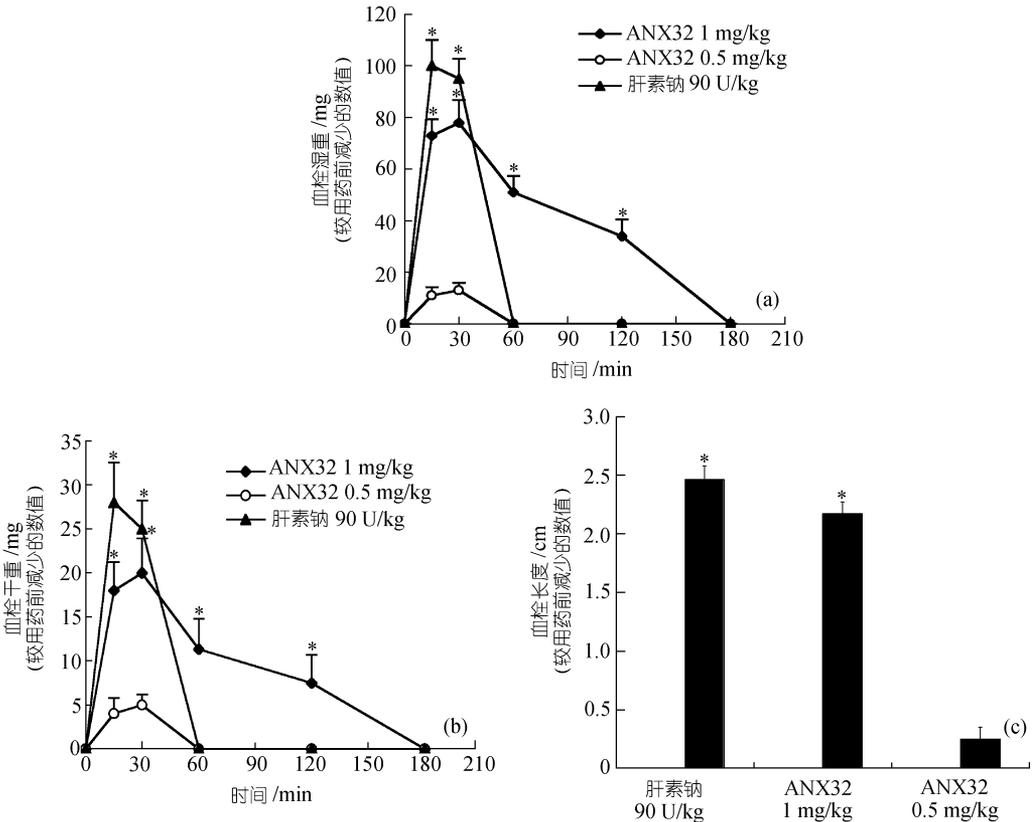


图 2 静脉注射 ANX32 与肝素后血栓湿重((a)、干重((b))及 1/2 h 时血栓长度((c))较用药前减少的数值(mean ± SD)  
n = 6, \*P < 0.01(与用药前比较)

### 2.4 对大鼠体内静脉血栓形成的影响

与生理盐水组血栓干重(6.1 ± 0.23) mg 相比, 肝素钠 100 U/kg 组血栓干重为(1.9 ± 0.19) mg

( $P < 0.01$ ), ANX32 1 mg/kg 组( $2.1 \pm 0.18$ ) mg ( $P < 0.01$ ), 而 GST 蛋白 1 mg/kg 组与生理盐水组相比无显著性差异(图 3)。

### 3 讨论

抗血栓在冠心病、脑卒中、肺栓塞等临床重症的防治中有着十分重要的意义。有关血栓形成的基本条件及机制有许多,其中血小板起了很重要的作用。正常静息状态下,血小板膜两侧磷脂分布不均一,像磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)主要排列在膜内侧的磷脂层,当血小板受到凝血酶、胶原等刺激活化时,血小板膜脂质发生翻转,内侧的 PS 转至外侧,从而在血小板表面形成一种可供凝血蛋白酶及辅因子装配到适宜位置的“促凝舞台”,使凝血过程以瀑布式进行。这种膜磷脂的重新排列被看作是血小板促进凝血的一个重要机制<sup>[9,10]</sup>。既然活化的血小板膜表面阴性磷脂的暴露在血栓形成的起始以及延伸阶段起着很重要的作用,由此可给抗血栓治疗提供一个新的方向<sup>[11]</sup>。

Annexins 钙依赖性磷脂结合蛋白理论上可在钙离子存在的条件下与活化的血小板膜表面的阴性磷脂结合,从而竞争性地阻抑凝血过程,起到抗凝抗血栓的功能。ANX32 作为我们克隆到的新的 Annexins 亚家族,在做磷脂结合性实验时,其融合蛋白 GST-ANX32 在  $20 \mu\text{mol/L}$  时就与 PS 有较强的结合。本实验表明,ANX32 具有明显的抑制血栓形成作用,1 mg/kg 的 ANX32 在体外、体内抗血栓作用略低于 90~100 U/kg 的肝素,但是维持时间较肝素长(图 2)。在 KPTT 检测中,与肝素 15 min 后即比对照升高了 90.7 s 相比,1 mg/kg 的 ANX32 只比用药前升高了约 20 s(图 1)。同时也注意到,在做体内静脉血栓模型时,一般的手术钝性分离,对于肝素 100 U/kg 组稍不小心就会造成比较严重的出血不止,而在 ANX32 的使用中没有见到这种现象。因此与肝素相比,ANX32 的抗栓作用虽略弱,但对凝血系统影响较小,是一种很有发展前途、安全有效的抗栓新药。但是目前它还存在一些不足,如 ANX32 抗血栓作用有明显的量的依赖性:1 mg/kg 高剂量组抗栓作用明显,维持时间也较长;0.5 mg/kg 剂量组虽有抗栓作用,但已明显不如高剂量组;0.3 mg/kg 剂量组在体外血栓形成实验中有关血栓的各指标与用药前相比已无显著性差异。针对用量偏大这一问题,我们可采取相应措施,如对 ANX32 进行基因改造,保留发挥药理作用的功能区,切除无效部分,有关这方面工作已在进行中。另外,因为活化血小板是动脉血栓的主要成分,而 ANX32 对活化血小板有很高的亲和力,因此是否可以由 ANX32 进一步用于血栓的导向显像,或以此为发展血栓靶向性的溶栓药物,这部分工作有待进一步开展。

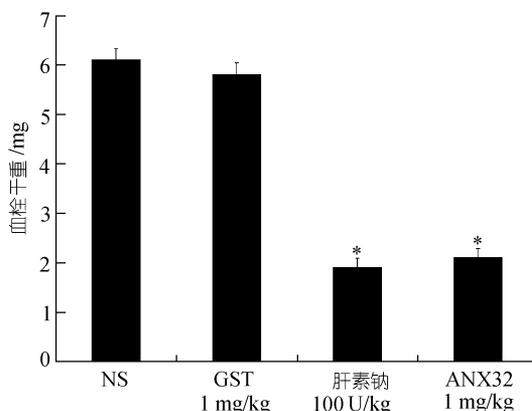


图 3 ANX32 和肝素对大鼠体内血栓形成的影响 (mean ± SD)

$n = 10$ , \* $P < 0.01$ (与生理盐水比较), NS 示生理盐水组

### 参 考 文 献

1 Geisow M J, Walker J H, Boustead C, et al. Annexins-new family of  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated-phospholipid binding protein. Biosci Rep,

- 1987, 7(4): 289~298
- 2 Klee C B.  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipid-(and membrane-)binding proteins. *Biochemistry*, 1988, 27(18): 6645~6653
  - 3 Burgoyne R D, Geisow M J. The annexin family of calcium-binding proteins. *Cell Calcium*, 1989, 10(1): 1~10
  - 4 Raynal P, Pollard H B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1197 (1): 63~93
  - 5 Donato R, Russo Marie F. The annexins: structure and functions. *Cell Calcium*, 1999, 26 (3-4): 85~89
  - 6 孙树汉, 王俊霞, 陈蕊雯, 等. 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 的分子克隆. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1997, 15(1): 15~20
  - 7 Loffler B M, Kunze H. Refinement of the coomassie brilliant blue G assay for quantitative protein determination. *Anal Bio*, 1989, 177: 100~102
  - 8 吴望一, 钱民全. 形成人工血栓的 Chandler 圆环内的流动分析. *中国科学*, 1981, 12: 1458~1466
  - 9 Kalafatis M, Swords N A, Rand M D, et al. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1227 (3): 113~129
  - 10 Chang C P, Zhao J, Wiedmer T, et al. Contribution of platelet microparticle formation and granule secretion to the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J Biol Chem*, 1993, 268 (10): 7171~7178
  - 11 Thiagarajan P, Benedict C R. Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation*, 1997, 96(7): 2339~2347