

吸血节肢动物唾液腺来源的抗止血物质*

徐学清 赖 仞**

(中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223)

摘要 在采食脊椎动物血液能力的进化过程中, 吸血节肢动物的唾液腺形成了丰富的抗止血因子, 如血小板聚集抑制因子, 他们通过不同机制抑制 ADP、凝血酶和胶原等诱导的血小板聚集. 抗凝因子能扰乱内源性和外源性止血通路. 血管扩张因子包括储藏、运输一氧化氮的 nitrophorins, 模拟内源性血管扩张的多肽和催化或水解内源性血管收缩因子的酶. 吸血节肢动物的唾液腺蛋白可以通过直接作用或协同作用起到抗止血的效果. 复杂多样的唾液腺生物活性分子解释了吸血节肢动物成功获得血餐的分子机制, 也提供了新的抗止血药物分子.

关键词 血小板聚集抑制因子, 抗凝因子, 血管扩张因子, 唾液腺

学科分类号 Q518

节肢动物从宿主成功地获得血液需要克服一系列障碍. 首先, 它们必须找到相应的宿主. 一旦找到适宜的宿主, 为了得到血餐, 它们必须刺穿皮肤. 在随之而来的吸血过程中, 节肢动物需要快速完成吸血过程, 逃避宿主的排斥反应以及抑制宿主的凝血反应. 吸血节肢动物在与其宿主长期相互作用的过程中, 它们的吸血能力发生多次进化, 在它们的唾液腺中形成了一系列的抗止血物质如血小板聚集抑制因子、抗凝因子、血管扩张因子等, 它们通过这些生物活性分子成功地从其宿主获得血液.

1 血小板聚集抑制因子

宿主在组织损伤过程中避免血液流失的首选策略似乎是血小板聚集. 血小板被胶原、凝血酶、血栓素 A₂ 和 ADP 等激动剂活化而聚集, 同时释放血管收缩因子, 促进凝血. 该过程非常迅速, 对于止血尤为重要. 吸血节肢动物能通过不同方式抑制血小板聚集, 在血小板活化之前将激动剂清除便是

方式之一. 活化的血小板和损伤细胞所产生的 ADP 是脊椎动物体内最重要的血小板聚集激动剂. 因而在大多数吸血节肢动物的唾液腺中通常含有作用于 ADP 的分子——三磷酸腺苷双磷酸酶 (apyrase), 该酶能水解 ATP 和 ADP 形成 AMP, 阻止 ADP 在血小板聚集中发挥作用. 该酶目前至少有两种不同的类型: 埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、冈比亚按蚊 (*Anopheles gambiae*)、致倦库蚊 (*Culex quinquefasciatus*) 和骚扰锥蝽 (*Triatoma infestans*) 的唾液腺三磷酸腺苷双磷酸酶属于 5'-核苷酸酶家族^[1,2], 它们在 Ca²⁺ 或 Mg²⁺ 存在时都能水解 ADP 和 ATP,

* 国家自然科学基金资助项目(30570360).

** 通讯联系人.

Tel: 0871-5196202, E-mail: lairen72@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-02-02, 接受日期: 2008-03-18

但不能水解 AMP. 温带臭虫(*Cimex lectularius*)、长须鲁蛉(*Lutzomyia longipalpis*)和巴浦白蛉(*Phlebotomus papatasi*)的唾液腺三磷酸腺苷双磷酸酶属于另外一家族^[3~5], 该类三磷酸腺苷双磷酸酶仅在 Ca^{2+} 存在时有活性. 长红锥蝽(*Rhodnius prolixus*)的唾液腺蛋白 RPAI-1 也能作用于 ADP 分子, 但其采用不同于三磷酸腺苷双磷酸酶的方式抑制血小板聚集. 该蛋白质也能抑制低浓度的 ADP、胶原、凝血酶、convulxin 和血栓素 A2 类似物 U46619 诱导的血小板聚集, 但是在 RPAI-1 存在时, 上述血小板激动剂仍能刺激血小板脱粒和释放 ADP. 这是因为 RPAI-1 通过结合 ADP 使其不能与血小板膜上的受体结合而发挥抑制作用. RPAI-1 似乎能与长红锥蝽的三磷酸腺苷双磷酸酶发生协同作用, 三磷酸腺苷双磷酸酶将流血伤口处的 ADP 浓度降低至纳摩尔水平, 当 ADP 浓度低到酶不能将其有效水解时, RPAI-1 隔离余下的 ADP, 使浓度降到生理浓度以下而不能发挥作用^[6].

有些吸血节肢动物唾液腺来源的血小板聚集抑制因子能与血小板激动剂的受体结合, 抑制激动剂结合血小板膜上的受体而引发的血小板聚集. 非洲钝缘蜱(*Omaithodoros moubata*)唾液腺中的 moubatin 和 TAI, 长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)的 longicornin 和 *Triatoma pallidipennis* 的 pallidipin 便是这方面的典型例子. 它们都能结合胶原受体, 抑制血小板与胶原的相互作用^[7~10].

骚扰锥蝽的唾液腺蛋白 triplatin-1 和 -2 与上述抑制剂一样, 能抑制胶原和胶原相关肽诱导的血小板聚集, 不能抑制 ADP、花生四烯酸、U₄₆₆₁₉ 和凝血酶诱导的血小板聚集, 此外, triplatin-1 还能抑制胶原诱导的 Fc 受体磷酸化. 因此, triplatins 除了作用于血小板膜上胶原受体外, 还通过阻断胶原受体对信号的传递来抑制血小板聚集^[11].

当血小板被活化后, 血小板膜上的整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 与含有 RGD(Arg-Gly-Asp)序列的纤维蛋白原结合引发血小板聚集. 因为该反应似乎是活化的血小板对大多数激动剂反应的最后步骤, 某些吸血节肢动物唾液腺来源的血小板聚集抑制因子通过阻止纤维蛋白原结合整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 来阻断血小板聚集的最后步骤. 这些血小板聚集抑制因子大都含有

RGD 序列, 且能结合 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, 如, 变异革蜱(*Dermacentor variabilis*)的 variabilin、萨氏钝缘软蜱(*Ornithodoros savignyi*)的 savignygrin 和姚虻(*Tabanus Yao Macquart*)的 Tabinhibitin 2^[12~14]; 某些缺乏 RGD 序列的蛋白质也能抑制血小板聚集, 如, 含有 Arg-Gln-Asp 的 disagregin^[15]和含有 Arg-Gly-Asn 的 chrysoptin^[16]也是纤维蛋白原结合 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 的有效抑制剂. Chrysoptin 的抑制能力要比同类型的其他抑制因子强得多, 这可能是因为 chrysoptin 有微弱的三磷酸腺苷双磷酸酶活性和存在 N- 连糖基化位点的缘故, 三磷酸腺苷双磷酸酶活性和糖基化能增加它抑制血小板聚集的能力.

除了抑制血小板聚集, 吸血节肢动物唾液腺来源的血小板聚集抑制因子还可通过与整合素 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ 、纤维蛋白原竞争结合相应的配体而使血小板从纤维蛋白原上脱落, 导致聚集的血小板解聚集. 如 savignygrin 便能使聚集的血小板解聚集. 三磷酸腺苷双磷酸酶也能在血小板活化和脱粒后使聚集的血小板解聚集, 这可能是因为清除 ADP 和随后的信号转导事件导致血小板从球形恢复到平圆形所致. 当然, 聚集的血小板也能经纤维蛋白原水解酶解聚集.

血小板聚集也可被增加血小板内环化腺苷单磷酸(cAMP)或环化鸟苷单磷酸(cGMP)的物质所抑制. 从美洲花蜱(*Amblyomma americanum*)和黑脚硬蜱(*Ixodes scapularis*)的唾液中得到前列腺素 E_2 (PGE_2)和前列环素(PGF_2)便是通过此种途径抑制血小板聚集^[17, 18]. 长红锥蝽和温带臭虫唾液腺释放的一氧化氮(NO)能活化胞浆鸟苷酸环化酶^[19, 20], 故其唾液腺内 NO 结合蛋白在某种意义上讲也能抑制血小板聚集.

凝血酶被认为是能在不同位点激活血小板的强激动剂. 凝血酶抑制剂因而能抑制凝血酶诱导的血小板聚集. 白足按蚊(*Anopheles albimanus*)唾液的 α 凝血酶抑制剂 anophelin 便是最好的例子^[21].

总之, 在长期的进化过程中吸血节肢动物形成了形式多样的机制来抑制血小板聚集(表 1). 假如第一道防御机制不能彻底抑制血小板聚集, 聚集血小板的解聚便是吸血节肢动物能用的重要补救机制.

Table 1 Platelet aggregation inhibitors from blood-feeding arthropods salivary glands
表 1 吸血节肢动物唾液腺来源的血小板聚集抑制因子

物种	组分	作用对象	分子质量 /ku	参考文献
<i>Ornithodoros moubata</i>	Moubatin	胶原受体	17	[7]
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAI	胶原受体	15	[8]
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Pallidipin	胶原受体	19	[9]
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Longicomin	胶原受体	16	[10]
<i>Triatoma infestans</i>	Triplatin-1, 2	胶原受体	17.9, 17.1	[11]
<i>Ornithodoros moubata</i>	Apyrase	ADP	ND	[22, 23]
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Apyrase	ADP	67	[22, 23]
<i>Aedes aegypti</i>	Apyrase	ADP	63	[1]
<i>Anopheles gambiae</i>	Apyrase	ADP	58.5	[22, 23]
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Apyrase	ADP	60.9	[1]
<i>Cimex lectularius</i>	Apyrase	ADP	50	[5]
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Apyrase	ADP	35.8	[4]
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Apyrase	ADP	37	[3]
<i>Triatoma infestans</i>	Apyrase	ADP	58.6	[2]
<i>Rhodnius prolixus</i>	RPAI-1	ADP	19	[6]
<i>Ornithodoros moubata</i>	Disagregin	$\alpha_{IIb}\beta_3$	6	[15]
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignygrin	$\alpha_{IIb}\beta_3$	9	[12]
<i>Dermacentor variabilis</i>	Variabilin	$\alpha_{IIb}\beta_3$	5.1	[13]
<i>Tabanus Yao Macquart</i>	Tabinhibitin1, 2	ND, $\alpha_{IIb}\beta_3$	25.9, 25.8	[14]
<i>Genus chrysops</i>	Chrysoptin	$\alpha_{IIb}\beta_3$	57.7	[16]
<i>Placobdella ornata</i>	Ornatin E	$\alpha_{IIb}\beta_3$	50	[22, 23]
<i>Macrobdeella decora</i>	Decorsin I, III	$\alpha_{IIb}\beta_3$	39, 36	[22, 23]
<i>Amblyomma americanum</i>	PGE ₂ , PGF ₂	PGE ₂ , PGF ₂ 受体	ND	[17]
<i>Ixodes scapularis</i>	PGE ₂ , PGF ₂	PGE ₂ , PGF ₂ 受体	ND	[18]

ND: 未确定.

2 抗凝因子

血凝级联反应由血管损伤引发，最后产生有活性的凝血酶切割纤维蛋白原生成纤维蛋白，形成凝血。来自吸血节肢动物唾液腺的抗凝组分通常作用于血凝级联反应复合体或蛋白酶，阻断或延缓血液凝块的形成。不同的吸血节肢动物各自独立进化形成多种具有抗凝作用的生物活性分子(表 2)。大多数分子作用于血凝级联反应公共通路的组分，包括 FV、FXa 和凝血酶。因为凝血酶在整个凝血级联反应中最为关键，所以针对凝血酶的抗凝因子也最多。最为广泛存在的凝血酶抑制剂是 hirudin 类，其包括 rhodniin、ornithodorin、savignin 和 anophelin 等[18, 24~26]。不同来源的该类抗凝因子尽管存在一定差异，但它们的共同特征是双头结构，即 C 端结构域与凝血酶阴离子结合部位 I 反应诱导构象变化，N 端直接结合或邻近凝血酶活性中心[17, 18]。与 hirudin 类抗凝剂不同，长角血蜱的唾液腺蛋白

madanin1 和 2 尽管也结合凝血酶阴离子结合部位 I，但是它们不结合凝血酶的活性中心，而通过和纤维蛋白原、FV、FVIII 竞争结合凝血酶部位 I 来发挥抗凝作用[27]。Triatoma pallidipennis 的唾液腺蛋白 triabin 却能不经阴离子结合部位 I 和凝血酶发生相互作用[28]。另外，有些抗凝因子可能通过其他机制抑制凝血酶产生抗凝作用，如 Xu 等[14]从姚虹唾液腺中分离出分子质量为 6 ku 的抗凝因子 tubkunin，其有 6 个半胱氨酸和 1 个 kunitz 域，能抑制凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、凝血酶和胰酶对相应发色底物的水解，并且对热稳定。抑制凝血酶的抗凝因子通常也是血小板聚集抑制因子。如从舌蝇 Morsiatans morsiatans 唾液腺中纯化得到的小分子抗凝多肽是凝血酶抑制因子，同时也对凝血酶诱导血小板聚集具有强烈的抑制作用[29]。

埃及伊蚊的唾液腺中有 FXa 抑制剂，其大小为 48 ku，为丝氨酸蛋白酶抑制剂 serpin 家族成员[30]。杂斑库蠓(Culicoides variipennis sonorensis)的

Table 2 Anticoagulants from blood-feeding arthropods salivary glands

表 2 吸血节肢动物唾液腺来源的抗凝因子

物种	组分	作用对象	分子量(ku)	参考
<i>Boophilus microplus</i>	BmTI-A	Kallikrein	18	[22, 23]
<i>Ornithodoros savignyi</i>	BSAP1, 2	TF	9.1, 9.3	[22, 23]
<i>Ornithodoros savignyi</i>	FXaI	FXa	7	[22, 23]
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	FXa	7	[22, 23]
<i>Aedes aegypti</i>	AFXa	FXa	48	[30]
<i>Culicoides variipennis sonorensis</i>	ND	FXa	28	[31]
<i>Hyalomma dromedarii</i>	ND	FXa	15	[22, 23]
<i>Ixodes scapularis</i>	Salp9Pac	FXa	9.8	[22, 23]
<i>Ixodes scapularis</i>	Penthalaris	FX, FXa	35	[32]
<i>Rhodnius prolixus</i>	Prolixin-S	FIX, FIXa	19.6	[33]
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	FVIIa/TF	15.7	[34]
<i>Amblyomma americanum</i>	Americanin	FXa, thrombin	16	[22, 23]
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignin	Thrombin	12	[26]
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornithodorin	Thrombin	12	[25]
<i>Hyalomma dromedarii</i>	NTI-1, 2	Thrombin	3.2, 15	[22, 23]
<i>Boophilus microplus</i>	Boophilin	Thrombin	60	[22, 23]
<i>Amblyomma variegatum</i>	AV 16/3	Thrombin	3.8	[22, 23]
<i>Tabanus Yao Macquart</i>	Tubkunin1	Thrombin	25.9	[14]
<i>Ixodes ricinus</i>	Ixin	Thrombin	7	[22, 23]
<i>Hyalomma longicornis</i>	Madanin 1, 2	Thrombin	7	[27]
<i>Dipetalogaster maximus</i>	Dipetalogastin I, II	Thrombin	49.8, 37.8	[22, 23]
<i>Rhodnius prolixus</i>	Rhodniin	Thrombin	11.3	[24]
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabin	Thrombin	15.6	[28]
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	TTI	Thrombin	3.53	[29]
<i>Anopheles albimanus</i>	Anophelin	Thrombin	6.5	[21]
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Chimadanin	Thrombin	1.2	[35]
<i>Haematobia irritans</i>	Thrombostasin	Thrombin	16.7	[36]
<i>Anopheles stephensi</i>	Hamadarin	F XII, kininogen	16	[37]
<i>Anopheles stephensi</i>	Anophensin	F XII, kininogen	13.6	[38]
<i>Triatoma infestans</i>	Triafestin-1, 2	F XII, kininogen	21.8	[39]

唾液腺提取物中也含有 FXa 抑制剂, 且与所有家蚊 FXa 抑制剂序列类似^[31]. 所有按蚊唾液腺都含有作用于凝血酶的抗凝因子, 同时, 所有家蚊唾液腺都含有作用于 FXa 的抗凝因子. 两类蚊子唾液腺中含有不同的抗凝因子可能反映了两个亚科成员长期独立适应脊椎动物止血系统所面临的挑战.

黑脚硬蜱的唾液腺蛋白 ixolaris 有两个 kunitz 结构域, 与组织因子途径抑制物(TFPI)有很大序列相似性. Ixolaris 可以结合 FXa 或 FX, 抑制 TF/FVIIa 复合体. 人来源的 TFPI 结合 FXa 的活性中心, 而 ixolaris 却结合 FXa 的肝素结合位点(HBE)^[34]. 尽管黑脚硬蜱的唾液腺蛋白 penthalaris 也通过结合 FXa 或 FX, 抑制 TF/FVIIa 复合体,

但 penthalaris 的结构与 ixolaris 有很大不同, 前者带有 12 个半胱氨酸和 5 个串连的 kunitz 域. 另外, penthalaris 和 ixolaris 能协同发挥抗凝作用^[32].

有些吸血节肢动物唾液腺凝血抑制因子尽管不直接与凝血共同通路的重要因子发生作用, 但却可以抑制这些因子的形成, 如长红锥蝽的 Prolixin-S 是 FXa/FVa 复合体形成的抑制剂. 在 Ca²⁺ 存在时, Prolixin-S 特异地结合 FIX/FIXa, 抑制 FIXa 与 TF/FVIIa 催化 FX 生成 FXa. 因此, Prolixin-S 能通过抑制 FIX 参与的所有凝血途径来抑制内、外凝血通路. 另外, Prolixin-S 通过识别 Gla 区的钙结合构象来结合 FIX/FIXa^[33].

史帝芬塞疟蚊(*Anopheles stephensi*)的唾液腺蛋

白 hamadarin、anophensin 和骚扰锥蝽的唾液腺蛋白 triafestin-1、triafestin-2 都能抑制血浆激肽释放酶 - 激肽系统的活化和随后的主要发炎诱导因子——缓激肽的释放。重建试验表明它们抑制 FXII 与激肽释放酶原的相互活化, 直接结合试验表明它们都能特异地识别 Zn^{2+} 诱导的 FXII 和高分子激肽原的构象变化, 抑制 FXII 和高分子激肽原结合带负电荷的表面。此外, 他们都与 FXII 的 N 端和高分子激肽原的 D₅ 结构域反应。这些结果表明, hamadarin、anophensin、triafestin-1 和 triafestin-2 靠干扰 FXII、高分子激肽原与生物活化表面结合, 抑制激肽释放酶 - 激肽系统的活化和缓激肽的释放^[37~39]。

此外, 锥猎蝽亚科臭虫的唾液腺也含有抗凝因子。像骚扰锥蝽 FV 和 FVIII 的抑制因子那样, 长须鲁岭的唾液腺中含有带糖类识别域(CRD)的蛋白质和带一个 RGD 序列的肽, CRD 蛋白和 RGD 肽似乎都涉及抗凝活性^[4]。

3 血管扩张因子

当血管被节肢动物的口器割破后, 花生四烯酸被活化的血小板释放, 血小板中相应的酶将其催化成血栓素 A₂, 导致血小板聚集、脱粒和血管收缩。活化的血小板也释放血清素使血管收缩。吸血节肢动物的唾液含有血管扩张因子或 / 和能拮抗组织损伤位点产生的血管收缩因子的分子(表 3)。长红锥蝽含有 4 种结合 NO 的亚铁血红素蛋白, 它们是唾液腺硝基扩血管物质 nitrophorin 1-4(NP1-4),

这些 NPs 属于纤维醇磷酸酯酶家族, 有典型的 lipocalin 折叠结构, 能作为 NO 的载体。通过对不同 pH 环境下(pH 5 和 pH 7.4)NPs 的晶体结构研究, 人们现已发现了他们结合、释放 NO 的机制。在没有 NO 的任何一种 pH 环境中, NPs 的远端袋状结构域张开, 允许 NO 和水分子自由结合在袋内。然而在 pH 5 的环境条件下, 远端袋状结构域疏水, 而 NO 本身也是疏水分子, NO 结合 NPs 后在远端袋内形成疏水的环境, 导致溶剂分子被排斥出远端袋, 同时袋上的 AB 环与 GH 环倒塌在 NPs 分子表面使远端袋闭合, NO 分子被捕捉到正确位置。pH 5 是唾液腺维持的 pH 环境, 在吸血过程中, 唾液被注入到 pH 变为 7.4 的皮肤内, AB 环和 GH 环上的数个残基在该环境中带电, 允许水分子进入远端的袋, 导致 AB 环和 GH 环远离 NPs 分子表面, 恢复开放状态, NO 轻易扩散。序列分析表明 4 种 NPs 属于两个亚类, 彼此有 56% 序列相似性, NP1 和 NP4 属于一类, 而 NP2 和 NP3 属于另一类。相对于 NP2/NP3, NP1/NP4 能更快地释放 NO, 在 pH 7.4 环境中, 前者的释放率为 $0.08 \sim 0.12 \text{ s}^{-1}$, 后者为 $2.2 \sim 2.6 \text{ s}^{-1}$ 。这表明在一种昆虫内 NPs 可能有数种功能: NP1/NP4 在叮咬位点附近释放 NO 形成血管舒张, 而 NP2/NP3 则扩散到相对远些的位置释放 NO 以便得到稀释。这种协作导致血管舒张因子能延伸更远的距离^[20, 40]。另外, NPs 在高浓度时以多聚体形式存在, 并且这种多聚体对于 NO 的有效储存和释放也有促进功能^[41]。

Table 3 Vasodilators from blood-feeding arthropods salivary glands

表 3 吸血节肢动物唾液腺来源的血管扩张因子

物种	组分	作用对象	分子质量 /ku	参考文献
<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitrophorin1-4	NO	20	[20, 40]
<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitrophorin7	NO	20	[42]
<i>Cimex lectularius</i>	Nitrophorin	NO	65	[43]
<i>Culicoides variipennis</i>	ND	ND	22.45	[22, 23]
<i>Aedes aegypti</i>	Sialokinins	速激肽受体	1.4	[44]
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Maxadilan	PACAP 受体	7	[45]
<i>Simulium vittatum</i>	SVEP	ATPase	15.4	[46]
<i>Hybomitra bimaculata</i>	Vasotab	ATPase	7	[47]
<i>Tabanus Yao Macquart</i>	Vasotab TY	ATPase	6	[14]
<i>Phlebotomus papatasi</i>	胺、腺苷和 AMP	血管内皮细胞	16	[48]
<i>Amblyomma americanum</i>	PGE ₂ , PGF ₂	血管内皮细胞	ND	[17]
<i>Ixodes dammini</i>	PGE ₂ , PGF ₂	血管内皮细胞	ND	[18]
<i>Anopheles albimanus</i>	Myeloperoxidase	儿茶酚胺、去甲肾上腺素和血清素	65	[49]
<i>Rhodnius prolixus</i>	ABP	羟色胺、肾上腺素、去甲肾上腺素	20	[50]

ND: 未确定。

在另一种半翅类臭虫——温带臭虫唾液腺中也发现了储藏和释放 NO 的 NPs, 序列分析表明, 该 NPs 与多磷酸肌醇-5-磷酸酶同源, 与长红锥蝽的 NPs 没有同源性。很明显, 两类半翅目昆虫都独立进化形成了非常类似的分子以便在脊椎动物体内形成血管扩张效果。温带臭虫的 NPs 的晶体中存在类似多磷酸肌醇-5-磷酸酶的折叠结构, 它们以独特的方式可逆结合两个 NO 分子。在低 NO 浓度时, NO 进入疏水的远端孔, 通过铁离子中心结合 NPs。该过程产生的 Fe^{3+} -NO 复合体将铁离子推向远端, 削弱了铁离子和半胱氨酸间的作用。在出现更高浓度 NO 时, 另一个 NO 能进入 NPs 近端, 并与 Cys_{60} 的硫形成亚硝酰基-硫醇键, 打破了铁离子和 Cys_{60} 间的作用。在此过程中, 铁离子被还原, 开始形成的 Fe^{3+} -NO 复合体变成更稳定的 Fe^{2+} -NO 键。在皮肤里, 当 pH 变得更高时, NO 从 Cys_{60} 解离, Cys_{60} 接着与最接近的铁离子重新反应, 氧化亚铁血红素中的铁到三价, 允许第二个 NO 分子释放。目前该储藏和释放两个 NO 分子的系统在其他生物中未曾发现^[43]。

数种吸血节肢动物也用肽或小蛋白与宿主内源性血管扩张因子的受体反应。在埃及伊蚊中, sialokinins 模拟内源性速激肽, 与速激肽受体反应刺激 NO 产生^[44]。尽管 sialokinins 与脊椎动物的速激肽结构非常相似, 尤其在与受体反应的 C 端区, 但对编码 sialokinin 的基因分析表明, 这些肽与脊椎动物的速激肽不同源, 可能是通过趋同演化形成。新大陆白蛉——长须鲁蛉唾液腺的 maxadilan 目前是活性最强的血管扩张因子, 大小为 6.5 ku, 它的血管扩张活性不依赖内皮细胞和平滑肌细胞中 cAMP 浓度的增加, 而是靠结合垂体腺苷酸环化酶激活肽 (PACAP) 的 I 型受体, 但 maxadilan 和 PACAP 间没有任何结构相似性^[45]。

尽管带蚋 (*Simulium vittatum*) 的唾液腺带蚋红斑蛋白 (SVEP) 与 maxadilan 有相似的血管扩张活性, 但 SVEP 却不与任何已知蛋白质有结构相似性, 它的作用机制涉及对 ATP 依赖的钾通道反应的控制^[46]。 *Hybomitra bimaculata* 唾液腺血管扩张肽^[47]和姚虻唾液腺血管扩张肽^[44]也都能抑制 ATP 酶活性, 但不同的是, 后两种血管扩张肽都具有丝氨酸蛋白酶抑制剂活性。因此, 与钠钾通道反应的血管扩张因子的作用机制可能与它们的丝氨酸蛋白酶抑制活性有关。

不同于伊蚊, 疟蚊的唾液腺中含有带儿茶酚氧

化酶/超氧化酶活性的髓过氧化物酶, 该酶可以在体内催化 H_2O_2 的形成, 导致重要的内源性血管收缩分子——儿茶酚胺、去甲肾上腺素和血清素被破坏, 宿主的内源性血管收缩物质最终被清除或被抑制^[49]。

有些节肢动物尽管没有上述各种血管扩张因子, 但它们能在唾液腺中积累直接扩张血管的分子, 如旧大陆白蛉——巴浦白蛉在唾液腺中积累了具有药理活性浓度的血管扩张物质 (如生物胺、腺苷和 AMP)^[48], 硬蜱的唾液腺含有 PGE_2 和 PGF_2 ^[17, 18]。这些例子表明, 未被发现的血管扩张因子可能比我们从前吸血群体推断的数目要大。

4 吸血节肢动物唾液腺抗止血分子的复杂性

为逃避宿主体内复杂而大量存在的止血系统, 吸血节肢动物进化形成多种生物活性分子使它们能克服相关障碍而成功获得血液。生物进化的结果是这些吸血节肢动物唾液腺含有极其多样的抗止血分子, 这种多样性在血小板聚集抑制因子、抗凝因子和血管扩张因子中都有很好的体现。就血管扩张因子而言, 不同物种间有很大差别。尽管长红锥蝽和温带臭虫都能通过 NO 来扩张血管, 但两者用不同的 NPs 来稳定和运输 NO。长红锥蝽的 NPs 是纤维醇磷酸酯酶家族的成员, 温带臭虫的 NPs 是肌醇磷酸酯酶家族成员; 蜱唾液腺用许多 PGE_2 和 PGF_2 ^[17, 18]; 旧大陆白蛉用腺苷^[48]; 新大陆白蛉用 maxadilan^[45]; 带蚋用 SVEP 蛋白^[46]; 牛虻用 vasotab^[14, 47]; 埃及伊蚊有 sialokinin^[44]; 而疟蚊有抑制血管收缩的过氧化物酶^[49]。在所研究的 500 多个属的 15 000 种吸血节肢动物中^[22], 唾液腺血管扩张因子的类别包括 NO、前列腺素、多肽和蛋白质。即使同科成员间也有不同的血管扩张因子, 这在前文所述的长须鲁蛉和巴浦白蛉或者伊蚊和疟蚊间都有典型体现。

人们从吸血节肢动物的唾液腺 cDNA 文库信息中发现了更多新活性物质, 例如, 人们发现在长须鲁蛉中除普遍存在的三磷酸腺苷双磷酸酶外^[4], 还有水解 AMP 到腺苷的 5'-核苷酸酶^[51]。5'-核苷酸酶在使 AMP 转变为促血管扩张和抑制血小板聚集的物质中有重要作用。

另一能体现吸血节肢动物唾液腺来源抗止血分子多样性的事实是: 同一物种中有具有相同活性的不同物质。黑脚硬蜱有许多特定的蛋白酶抑制剂且

它们的生化活性已被证实. 这些形式多样的抑制剂都能抑制血凝级联反应. 就非洲钝缘蜱而言, 它有三磷酸腺苷双磷酸酶、moubatin、TAI 和 disagregin 等血小板聚集抑制因子, 它们分别作用于 ADP、胶原受体和 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 来抑制血小板聚集.

吸血节肢动物唾液中不但含有许多相同活性的不同物质, 而且也存在具有多种活性的多功能分子. 最为典型的例子是唾液蛋白 nitrophorin 7 (NP7)^[42]. 像 NPs 家族的其他成员一样, NP7 能可逆结合 NO 分子, 并有很强的组胺吸附能力. 其也可通过阻断小泡和活化血小板膜上的磷脂结合位点来抑制凝血酶原活化. 作为 NO 复合体, NP7 抑制胶原和 ADP 诱导的血小板聚集, 它还能诱导聚集的血小板解聚集. 因此, 该蛋白质在凝血系统中可以发挥血管扩张、抗组胺、抗血小板聚集和抗凝等多种功能.

考虑到各个吸血节肢动物的宿主特异, 生存环境独特. 它们在长期的独立适应性进化过程中形成了一系列有利于各自生存的物质. 这些物质的独特性就体现在今天我们看到的唾液腺来源的抗止血分子的多样性和复杂性. 因此, 我们要想彻底弄清这些吸血节肢动物的唾液腺组分还需要与其他相关学科相联系. 另外, 将这些吸血节肢动物唾液腺的功能作为一个整体的充分理解可能有助于发现对付这些吸血节肢动物所传播的疾病的新方法和提供许多新的药物分子.

参 考 文 献

- 1 Champagne D E, Smartt C T, Ribeiro J M, *et al.* The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(3): 694~698
- 2 Faudry E, Lozzi S P, Santana J M, *et al.* *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J Biol Chem*, 2004, **279**(19): 19607~19613
- 3 Valenzuela J G, Belkaid Y, Rowton E, *et al.* The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol*, 2001, **204** (Pt2): 229~237
- 4 Charlab R, Valenzuela J G, Rowton E D. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (26): 15155~15160
- 5 Ribeiro J M, Schneider M, Isaias T, *et al.* Role of salivary antihemostatic components in blood feeding by triatomine bugs (Heteroptera). *J Med Entomol*, 1998, **35** (4): 599~610
- 6 Francischetti G, Ribeiro J M, Donald C, *et al.* Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*, 2000, **17**(28): 639~12650
- 7 Waxman L, Connolly T M. Isolation of an inhibitor selective for collagen stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem*, 1993, **268** (8): 5445~5449
- 8 Karczewski J, Waxman L, Endris R G, *et al.* An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **208** (2): 532~541
- 9 Noeske J C, Krätzschmar J, Haendler B, *et al.* An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem*, 1994, **269**(7): 5050~5053
- 10 Yuan G C, Hou Y W, De C L. An inhibitor for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. *Science China (Ser C)*, 1999, **42**(2): 457~464
- 11 Akihiro M, Haruhiko I, Yuki O. Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. *FEBS J*, 2006, **273** (13): 2955~2962
- 12 Mans B J, Louw A I, Neitz A W, *et al.* Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J Biol Chem*, 2002, **277** (24): 21371~21378
- 13 Wang X, Coons L B, Taylor D B, *et al.* Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein II b- III a and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J Biol Chem*, 1996, **271** (30): 17785~17790
- 14 Xu X, Yang H, Ma D, *et al.* Toward an understanding of the molecular mechanism for successfully blood-feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horse fly salivary glands. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(3): 582~590
- 15 Karczewski J, Endris R, Connolly T M. Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem*, 1994, **269** (9): 6702~6708
- 16 Reddy V B, Kounga K, Mariano F, *et al.* Chrysoptin is a potent glycoprotein II b/ III a fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. *J Biol Chem*, 2000, **275** (21): 15861~15867
- 17 Bowman A S, Sauer J R, Zhu K, *et al.* Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem Mol Biol*, 1995, **25** (6): 735~741
- 18 Sá-Nunes A, Báfica A, Lucas D A, *et al.* Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol*, 2007, **179**(3): 1497~1505
- 19 Valenzuela J G, Walker F A, Ribeiro J M. A salivary nitrophorin (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *J Exp Biol*, 1995, **198** (Pt 7): 1519~1526
- 20 Montfort W R, Weichsel A, Andersen J F. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1482**(1-2): 110~118

- 21 Francischetti I M, Valenzuela J G, Ribeiro J M. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 1999, **38** (50): 16678~16685
- 22 Donald E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2005, **34**(4-5): 221~227
- 23 Bruno B, Clarissa R, Aldina B, *et al.* Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc*, 2005, **77**(4): 665~693
- 24 Friedrich T, Kröger B, Bialojann S, *et al.* A kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*, 1993, **268** (22): 16216~16222
- 25 Van D L, Stubbs M T, Bode W. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?. *EMBO J*, 1996, **15** (22): 6011~6017
- 26 Nienaber J, Gaspar A R, Neitz A W, *et al.* Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Parasit*, 1999, **93** (2): 82~91
- 27 Iwanaga S, Okada M, Isawa H, *et al.* Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur J Biochem*, 2003, **270** (9): 1926~1934
- 28 Fuentes P P, Noeske J C, Donner P, *et al.* Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (22): 11845~11850
- 29 Cappello M, Bergum P W, Vlasuk G P, *et al.* Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**(5): 475~480
- 30 Stark K R, James A A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem*, 1998, **273** (33): 20802~20809
- 31 Pérez A A, Valenzuela J G, Tabachnick W J. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis* sonorensis by an inhibitor of factor Xa. *Exp Parasitol*, 1998, **88**(2): 121~130
- 32 Francischetti I M, Mather T N, Ribeiro J M. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb Haemost*, 2004, **91**(5):886~898
- 33 Gudderra N P, Ribeiro J M, Andersen J F. Structural determinants of factor IX (a) binding in nitrophorin 2, a lipocalin inhibitor of the intrinsic coagulation pathway. *J Biol Chem*, 2005, **280** (26): 25022~25028
- 34 Monteiro R Q, Rezaie A R, Bae J S, *et al.* Ixolaris binding to factor X reveals a precursor state of factor Xa heparin-binding exosite. *Protein Sci*, 2008, **17**(1): 146~153
- 35 Nakajima C, Imamura S, Konnai S, *et al.* A novel gene encoding a thrombin inhibitory protein in a cDNA library from *Haemaphysalis longicornis* salivary gland. *J Vet Med Sci*, 2006, **68**(5): 447~452
- 36 Zhang D, Cupp M S, Cupp E. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32** (3): 321~330
- 37 Isawa H, Yuda M, Orito Y, *et al.* A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. *J Biol Chem*, 2002, **277** (31): 27651~27658
- 38 Isawa H, Orito Y, Iwanaga S, *et al.* Identification and characterization of a new kallikrein-kinin system inhibitor from the salivary glands of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2007, **37**(5): 466~477
- 39 Isawa H, Orito Y, Jingushi N, *et al.* Identification and characterization of plasma kallikrein-kinin system inhibitors from salivary glands of the blood-sucking insect *Triatoma infestans*. *FEBS J*, 2007, **274**(16): 4271~4286
- 40 Andersen J F, Ding X D, Balfour C, *et al.* Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. *Biochemistry*, 2000, **39** (33): 10118~10131
- 41 Ambrus A, Friedrich K, Somogyi A. Oligomerization of nitrophorins. *Anal Biochem*, 2006, **352** (2): 286~295
- 42 Andersen J F, Gudderra N P, Francischetti I M, *et al.* Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect. *Biochemistry*, 2004, **43**(22): 6987~6994
- 43 Weichsel A, Maes E M, Andersen J F, *et al.* Heme-assisted S-nitrosation of a proximal thiolate in a nitric oxide transport protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (3): 594~599
- 44 Champagne D E, Ribeiro J M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (1): 138~142.
- 45 Moro O, Lerner E. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem*, 1997, **272** (2): 966~970
- 46 Cupp M S, Ribeiro J M, Champagne D E. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. *J Exp Biol*, 1998, **201** (Pt 10): 1553~1561
- 47 Takác P, Nunn M A, Mészáros J, *et al.* Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. *J Exp Biol*, 2006, **209**(Pt 2): 343~352
- 48 Ribeiro J M, Modi G. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *J Parasitol*, 2001, **87** (4): 915~917
- 49 Ribeiro J M, Valenzuela J G. Purification and cloning of the salivary peroxidase/catechol oxidase of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J Exp Biol*, 1999, **202** (Pt 7): 809~816
- 50 John F, Ivo M, Jesus G, *et al.* Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding. *J Biol Chem*, 2003, **278**(7): 4611~4617
- 51 Ribeiro J M, Rowton E D, Charlab R. The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, **30** (4): 279~285

Antihemostatic Molecules From Saliva of Blood-Feeding Arthropods*

XU Xue-Qing, LAI Ren**

(*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China*)

Abstract The ability to feed on vertebrate blood has evolved many times in various arthropod clades. Consequently, saliva of blood-feeding arthropods has proven to be a rich source of antihemostatic molecules. A variety of platelet aggregation inhibitors antagonize platelet responses to wound-generated signals, including ADP, thrombin, and collagen. Anticoagulants disrupt elements of both the intrinsic and extrinsic pathways. Vasodilators include nitrophorins (nitric oxide storage and transport heme proteins), a variety of peptides that mimic endogenous vasodilatory neuropeptides, and proteins that catabolize or sequester endogenous vasoconstrictors. Multiple salivary proteins may be directed against each component of hemostasis, resulting in both redundancy and in some cases cooperative interactions between antihemostatic proteins. The complexity and redundancy of saliva ensures an efficient blood meal for the arthropod, but it also provides a diverse array of novel antihemostatic molecules for the pharmacologist.

Key words platelet aggregation inhibitors, anticoagulants, vasodilators, salivary gland

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570360).

**Corresponding author .

Tel: 86-871-5196202, E-mail: lairen72@yahoo.com.cn

Received: February 2, 2008 Accepted: March 18, 2008