

凝血因子 IX/ 凝血因子 X 结合蛋白家族的研究进展

徐小龙 刘清亮¹⁾

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要 凝血因子 IX/ X 结合蛋白家族是近来发现的 C 型动物凝集素超家族中一个亚家族. 它们存在于蝮科蛇毒中, 不具有酶活性, 通过与凝血因子 IX 或凝血因子 X 结合来延长凝血时间. 在钙离子存在下结合在凝血因子 IX/ X 分子中 γ -羧基谷氨酸区域. 它们彼此之间具有很高的序列同源性, 都是由两条同源的肽链通过一对二硫键相连. 两条肽链都具有 C 型糖识别区的二硫键构型, 各含一个钙离子结合位点. 其中 habu 凝血因子 IX/ X 结合蛋白的晶体结构已经测定, 除掉相互交叠的中心环外, 两条肽链都具有类似于鼠甘露糖结合蛋白的结构.

关键词 抗凝剂, 凝血因子 IX/ X 结合蛋白, 蛇毒, 钙离子

学科分类号 Q512

凝血因子 IX/ X 结合蛋白是一类不具有酶活性的抗凝蛋白质, 存在于蝮科蛇毒中. 它们在结构和功能上有很大的相关性, 都是由两条同源肽链通过一对二硫键连接在一起的. 分子质量都约为 30 ku. 它们通过与凝血因子 IX 或凝血因子 X (F IX/ X) 的结合来延长凝血时间. 所有这些结合反应都是依赖于钙离子的. 这些蛋白质构成了一个新的家族, 称为凝血因子 IX/ 凝血因子 X 结合蛋白 (factor IX/ factor X-binding protein, IX/ X-bp) 家族. 近 10 年来, 这方面研究取得迅速发展, 目前已成为这一领域的热点之一. 本文就这一家族的发现、结构与功能等作一简要综述.

1 凝血因子 IX/ X 结合蛋白家族的发现

蛇毒中存在多种抗凝蛋白, 它们影响凝血系统^[1]. 迄今为止, 从蛇毒中分离的抗凝组分大致可分为两类, 一类具有酶的活性, 如纤维蛋白原溶酶、蛋白 C 激酶和蛋白水解酶, 它们通过对凝血因子的降解来影响凝血过程^[2]. 另一类不具有酶的活性, 通过抑制凝血酶原的激活延缓凝血过程. 1989 年, Atoda 等^[3]从黄绿烙铁头 (*Trimeresurus flavoviridis*, habu snake) 蛇毒中纯化出一个不具有酶活性的抗凝蛋白, 并首先发现它在钙离子存在的条件下分别与凝血因子 IX (F IX)、活化凝血因子 IX (F IXa)、凝血因子 X (F X) 和活化凝血因子 X (F Xa) 形成 1:1 的复合物, 从而延长凝血时间, 因而称之为 habu 凝血因子 IX/ 凝血因子 X 结合蛋白 (habu IX/ X-bp). 1993 年, Sekiya 等^[4]从美洲矛头蝮 (*Bothrops jararaca*) 蛇毒中纯化出一个

与 habu IX/ X-bp 的结构和功能相似的抗凝蛋白 (jararaca IX/ X-bp). 1995 年, Atoda 等^[5]从黄绿烙铁头蛇毒中分离出另一个抗凝蛋白 (habu IX-bp), habu IX-bp 只能与 F IX/ F IXa 结合, 不能与 F X/ F Xa 结合. 1996 年, Chen 等^[6]从锯鳞蝮 (*Echis carinatus leucogaster*) 蛇毒中分离出与 habu IX/ X-bp 类似的抗凝蛋白 (ECLV IX/ X-bp). 1998 年, Atoda 等^[7]从尖吻蝮 (*Deinagkistrodon acutus*) 蛇毒中分离出 4 个抗凝蛋白 (X-bps), 它们对 F X 的亲性和高于对 F IX 的亲性和, 因此称之为凝血因子 X 结合蛋白.

2 结合特性

2.1 结合反应依赖于凝血因子分子中的 Gla 区

Atoda 等^[8]首先采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 定量分析 habu IX/ X-bp 与 F IX/ X 的结合性质, 发现 habu IX/ X-bp 与 F IX/ X 的亲性和表现出一定的差异. 表 1 列出由 ELISA 方法测得的 IX/ X-bp 家族成员与固相凝血因子 IX/ X 的表观解离常数.

F IX、F IXa、F X 和 F Xa 分子中都含有 γ -羧基谷氨酸 (γ -carboxyglutamic acid, Gla) 区域, 不含 Gla 区的 F IXa β 不能与这一家族的蛋白质结合. Habu IX/ X-bp 和 habu X-bp 与固相 F X 的结合反应受溶液中 F X 分子中 Gla 区肽段 (1~44 残基) 禁阻, 而不受不含 Gla 区的 F X 影响. Habu IX/ X-

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0551) 3603214, E-mail: qliu@ustc.edu.cn

收稿日期: 1999-10-31, 修回日期: 2000-02-30

bp 和 habu IX-bp 与固相 F IX 的结合反应受溶液中 F IXa β 分子中 Gla 区肽段 (1~42 残基) 禁阻, 而不含 Gla 区的 F IXa β 则不影响它们的结合反应. Jararaca IX/ X-bp 与固相 F X 的结合反应也受溶液中含有 Gla 区的 F X 和 F Xa β 禁阻, 且 F Xa β 具有比 F X 更强的禁阻能力. 这些结果都说明, 凝血因子 IX/ X 结合蛋白与凝血因子 IX/ X 的结合反应是依赖于凝血因子分子中 Gla 区的. 凝血因子 IX/ X 结合蛋白能识别 Gla 区, 并结合在这一区域.

并非所有含 Gla 区的血浆蛋白都可以与 IX/ X-bp 结合. 虽然血浆中其他依赖维生素 K 的凝血酶原、凝血因子 VII、蛋白 C 和蛋白 Z 都含有 Gla 区, 但它们都不能与 habu IX/ X-bp、acutus X-bp 和 habu IX-bp 结合. Sekiya 等^[4]用同位素标记方法检测出 jararaca IX/ X-bp 与凝血酶原、凝血因子 VII、蛋白 C、蛋白 Z 和蛋白 S 的结合程度很小. ECLV IX/ X-bp 也可以与凝血酶原和蛋白 S 结合, 但结合程度也非常小^[6].

表 1 凝血因子 IX/ X 结合蛋白与固相凝血因子 IX/ X 的表观解离常数

蛋白质	K_d (表观解离常数) / $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
	凝血因子 IX	凝血因子 X
Habu IX/ X-bp ^{[8], 1)}	0.36 $\pm$ 0.14	1.13 $\pm$ 0.37
Jararaca IX/ X-bp ^{[4], 2)}	37 $\pm$ 9	75 $\pm$ 17
Habu IX-bp ^{[5], 1)}	0.44 $\pm$ 0.08	
ECLV IX/ X-bp ^{[6], 2)}	6.6	125
Acutus X-bp ^{[7], 2)}	3	0.4

¹⁾ 在 1 mmol/L Ca^{2+} 条件下; ²⁾ 在 5 mmol/L Ca^{2+} 条件下.

2.2 结合反应依赖于钙离子

所有这些结合反应都是依赖于钙离子的, 它们最大结合和半最大结合所需要的钙离子浓度见表 2. 从表 2 可知, 它们半最大结合所需要的钙离子

浓度基本相近; 最大结合所需要的钙离子浓度, 除 jararaca IX/ X-bp 的较大外, 其他也基本一致, 且与钙离子的生理浓度接近. Sekiya 等^[4]报道, jararaca IX/ X-bp 与 F X 和蛋白 S 的结合是绝对依赖钙离子的, Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 和 La^{3+} 都不能使它们结合. 但 jararaca IX/ X-bp 与 F IX 的结合并非绝对依赖钙离子, Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 也可以使它们结合, 而 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 和 La^{3+} 不能使它们结合. Chen 等^[6]报道, Sr^{2+} 也可以取代 Ca^{2+} 使 ECLV IX/ X-bp 与 F IX 结合, 但二者的亲和性降低了. Sr^{2+} 不能使 ECLV IX/ X-bp 与 F X 结合. Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 都不能使 ECLV IX/ X-bp 与 F IX 或 F X 结合. 但 Mg^{2+} 影响 ECLV IX/ X-bp 与 F IX/F X 结合对钙离子浓度的依赖性. Mg^{2+} 与 F IX 和 F X 的结合, 可不同程度增加 F IX/F X 与 ECLV IX/ X-bp 的亲和性.

表 2 凝血因子 IX/ X 结合蛋白与凝血因子 IX/ X 的结合反应与钙离子浓度的关系

蛋白质	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
	半最大结合	最大结合
Habu IX/ X-bp 与 F IX/F X ^[8]	0.39/0.35	1/1
Jararaca IX/ X-bp 与 F IX/F X ^[4]	0.7/0.7	5/5
ECLV IX/ X-bp 与 F IX/F X ^[6]	0.4/0.4	1.1/1.1
Acutus X-bp 与 F IX/F X ^[7]	0.54/0.65	1/1

3 一级结构和二硫键构型

在已发现的 IX/ X-bp 家族成员中, 其一级结构具有很高的同源性. 它们都是由分子质量相近的两条肽链通过一对二硫键连接在一起的, 两条肽链之间也具有较高的同源性. Habu IX/ X-bp 的一级结构如图 1 所示^[9], 其 A、B 链之间具有 47% 的同源性.

	10	20	30	40	50	60
Habu IX/ X-bp A 链	DCLSGWSSYEGHCYKAF	EKYKTWEDA	ERVCTEQAKGAHLV	SISSGEADFVAQLVTQ	NMKR	
Habu IX/ X-bp B 链	DCPSDWSSYEGHCYKPF	SEPKNWADA	ENFCTQQHAGGHLV	SFQSSEADFVVKLAF	QTFGH	
	70	80	90	100	110	120
A 链	LDFYIWIWGLRVQ	GKVKQCNS	EWSDGSSVSYENWIE	ESKTCLGLEKETDFR	KWVNIYCGQQNP	FVCE--A
B 链	--SIFWMGLSNVWN--	QCNWQWSNAAML	RYKAWAE--ES- YCVYF-K-STNNK	WRSRACRMM	AQFVCE	FQA

图 1 Habu IX/ X-bp 的一级结构

Habu IX/ X-bp 与 habu IX-bp^[5]、acutus X-bp^[7] 和 ECLV IX/ X-bp^[6] 相比较, 其 A 链同源性

分别为 85%、68% 和 57%; B 链的同源性高于 A 链, 分别为 100%、87% 和 59%. Jararaca IX/ X-

bp 的 A 链和 B 链的 N 端 30 个氨基酸序列与 habu IX/ X-bp 的 A 链和 B 链的 N 端之间分别有 67% 和 70% 的同源性。

Habu IX/ X-bp^[10] 和 ECLV IX/ X-bp^[6] 的二硫键构型已经测定, 它们具有相同的构型, 都是由两条同源肽链通过一对二硫键连接在一起的, 每条肽链都具有类似于 C 型糖识别区 (CRD) 的结构 (图 2)。C 型糖识别区的关键结构特征是, 链内含有 3 对二硫键, 由此构成 N 端一个小环和另一个在 C 端大环内的小环。因此 IX/ X-bp 家族是 C 型动物凝集素超家族中的一个亚家族。

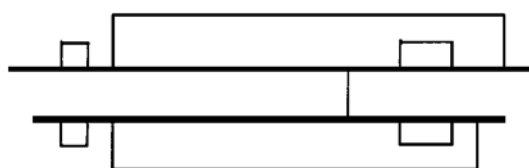


图 2 Habu IX/ X-bp 和 ECLV IX/ X-bp 的二硫键构型

4 Ca^{2+} 结合位点

目前已发现 habu IX/ X-bp、habu IX-bp 和 acutus X-bp 分子中都存在两个独立的 Ca^{2+} 结合位点, 它们对 Ca^{2+} 的亲合性不同, 其中一个为高亲和性位点, 另一个为低亲和性位点。它们与 Ca^{2+} 之间的解离常数列于表 3。Sekiya 等^[11] 研究了 pH 对 habu IX/ X-bp 分子中 Ca^{2+} 的解离常数和 habu IX/ X-bp 与 F IX/ X 的结合反应的影响, 并推测 habu IX/ X-bp 结合两个钙离子所引起的构象变化是其识别凝血因子分子中 Gla 区的必要条件。Chen 等^[6] 从 Ca^{2+} 对 ECLV IX/ X-bp 的荧光影响的结果推测 ECLV IX/ X-bp 与 Ca^{2+} 的结合是其识别 F IX 的必要条件。

表 3 凝血因子 IX/ X 结合蛋白与 Ca^{2+} 的表现解离常数

蛋白质	K_d (表现解离常数) / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
	高亲和位点	低亲和位点
Habu IX/ X-bp (pH 7.5) ^[11]	25 ± 12	202 ± 110
Habu IX/ X-bp (pH 6.5) ^[11]	50 ± 19	约 2000
Habu IX-bp (pH 7.5) ^[5]	14 ± 4	130 ± 100
Acutus X-bp (pH 8.0) ^[7]	16 ± 0.7	103 ± 10

5 空间结构

Mizuno 等^[12] 于 1991 年成功生长出 habu IX/ X-bp 晶体, 并于 1997 年^[13] 报道了 habu IX/ X-bp

的晶体结构 (图 3)。它的两条肽链相互盘绕, 除掉相互交叠的中心环外, 每条链都具有类似于鼠甘露糖结合蛋白 (rat mannose-binding protein) 的折叠结构。两条链的骨架结构十分相似, 且呈对称关系。A 链的 N 端 (Asp1~ Cys13) 含有一对二硫键 (Cys2~ 13), 随后的 Tyr14~ Arg71 肽链含有 2 段 α 螺旋和 2 条 β 折叠股, 接着肽链伸出 A 链的表面形成一个大环, 与相邻的 B 链的大环相互交叠, 大环于 Ser99 处折回 A 链主体, 再通过三条 β 折叠股到达 C 端。B 链的结构与 A 链相似, 通过垂直于分子长轴的对称轴与 A 链呈对称关系。分子中存在两个钙离子结合位点。两条交叠的肽链在分子中部形成一个凹形表面, 它与 Gla 区的空间结构相吻合^[14], 可能是凝血因子分子中 Gla 区的结合位置。处于凹形表面的 B 链的碱性氨基酸 Lys100、Lys105、Arg107、Arg109、Arg112 和 A 链的碱性氨基酸 Lys100 指向溶液, 可能参与形成与 Gla 区的酸性氨基酸之间的盐桥键。



图 3 Habu IX/ X-bp 的骨架结构

6 展 望

目前对凝血因子 IX/ X 结合蛋白家族研究较为前沿的实验室, 主要集中于日本、美国和中国, 特别是日本明治药科大学生物化学系和国家农业生物资源研究所。Lu 等^[15] 于 1987 年从皖南尖吻蝮蛇毒中分离出一种抗凝血因子 (ACF I), 近来我们从该蛇毒中分离出一种新的抗凝血因子

(ACF II)^[16], 并发现它们都能在钙离子存在下与活化凝血因子 X 形成 1:1 的复合物, 因而它们也是凝血因子 IX/ X 结合蛋白家族的成员^[17, 18].

目前已发现的凝血因子 IX/ X 结合蛋白都存在于蝰科蛇毒中, 其他蛇毒是否含有这类蛋白质? 这些结构与功能相关的蛋白质是否拥有共同的祖先蛋白质? 这一家族成员为什么不能很好地识别其他含有 Gla 区的血浆蛋白? Ca^{2+} 在结合反应中是通过诱导构象变化起着“钥匙与锁”的作用, 还是在它们之间起着“桥”的连接作用? 目前, 这些方面的研究正在深入进行. 未来的研究重点还应包括通过凝血因子 IX/ X 结合蛋白, 进一步认识凝血因子分子中 Gla 区的结构与功能, 这将会大大促进凝血机制理论研究的进展.

参 考 文 献

- 1 Tu A T. Venom: Chemistry and Molecular Biology. New York: John Wiley and Sons, 1977. 329~ 360
- 2 Morita T, Atoda H, Sekiya F. Structure and functions of coagulation factor IX/ factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. In: Singh B R, Tu A T, eds. Natural Toxins II. New York: Plenum Press, 1996. 187~ 196
- 3 Atoda H, Morita T. A novel blood coagulation factor IX/ factor X-binding protein with anticoagulant activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake): isolation and characterization. J Biochem, 1989, **106** (5): 808~ 813
- 4 Sekiya F, Atoda H, Morita T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. Biochemistry, 1993, **32** (27): 6892~ 6897
- 5 Atoda H, Ishikawa M, Yoshihara E, et al. Blood coagulation factor IX-binding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: purification and characterization. J Biochem, 1995, **118** (5): 965~ 973
- 6 Chen Y L, Tsai I H. Function and sequence characterization of coagulation factor IX/ factor X-binding protein from the venom of *Echis carinatus leucogaster*. Biochemistry, 1996, **35** (16): 5264 ~ 5271
- 7 Atoda H, Ishikawa M, Mizuno H, et al. Coagulation factor X-binding protein from *Deinagkistrodon acutus* venom is a Gla domain-binding protein. Biochemistry, 1998, **37** (50): 17361~ 17370
- 8 Atoda H, Yoshida N, Ishikawa M, et al. Binding properties of the coagulation factor IX/ factor X-binding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Eur J Biochem, 1994, **224** (2): 703~ 708
- 9 Atoda H, Hyuga M, Morita T. The primary structure of coagulation factor IX/ factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. J Biol chem, 1991, **266** (23): 14903~ 14911
- 10 Atoda H, Morita T. Arrangement of the disulfide bridges in a blood coagulation factor IX/ factor X-binding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. J Biochem, 1993, **113** (2): 159~ 163
- 11 Sekiya F, Yamashita T, Morita T. Role of calcium (II) ions in the recognition of coagulation factors IX and X by IX/ X-bp, an anticoagulant from snake venom. Biochemistry, 1995, **34** (31): 10043~ 10047
- 12 Mizuno H, Atoda H, Morita T. Crystallization and preliminary X-ray study of blood coagulation factor IX/ factor X-binding protein with anticoagulant activity from habu snake venom. J Mol Biol, 1991, **220** (2): 225~ 226
- 13 Mizuno H, Fujimoto Z, Koizumi M, et al. Structure of coagulation factor IX/ factor X-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains. Nat Struct Biol, 1997, **4** (6): 438~ 441
- 14 Seshadri T P, Tulinsky A, Ewa S J, et al. Structure of bovine prothrombin fragment 1 refined at 2.25 Å resolution. J Mol Biol, 1991, **220** (2): 481~ 494
- 15 Lu Y, Huang W Z, Wang C, et al. Purification and double chain structure of anticoagulant factor from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. In: Pirkle H, Markland F S Jr, eds. Hemostasis and Animal Venoms. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. 349 ~ 360
- 16 Xu X L, Liu Q L, Xie Y S, et al. Purification and characterization of anticoagulation factors from the venom of *Agkistrodon acutus*. Toxicon, 2000, **38** (11): 1517~ 1528
- 17 Xu X L, Liu Q L, Wu S D. The binding of the anticoagulation factor I from the venom of *Agkistrodon acutus* with activated factor X. Chin Sci Bull, 2000, **45** (14): 1296~ 1300
- 18 徐小龙, 刘清亮, 吴双顶. 尖吻蝮蛇毒抗凝血因子 II 与活化凝血因子 X 的结合性质. 生物化学与生物物理进展, 2000, **27** (5): 516~ 520
Xu X L, Liu Q L, Wu S D. Prog Biochem Biophys, 2000, **27** (5): 516~ 520

Progress in Research of the Coagulation Factor IX/ Factor X-binding Protein Family. XU Xiao-Long, LIU Qing-Liang (Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract The recently discovered coagulation factor IX/ factor X-binding protein family is widely present in the venom of viperidae snake, which is an unique subfamily in the C-type animal lectin superfamily. The proteins of this family are non-enzymatic anticoagulants that bind to the Gla-domain regions of factor IX or factor X and form 1:1 complexes with factor IX or factor X in the presence of Ca^{2+} ions. They are heterodimeric proteins consisting of two highly homologous peptide chains linked by a single disulfide bridge. Each chain contains one Ca^{2+} -binding site and an intrachain disulfide-bonding pattern similar to those of C-type carbohydrate recognition domain. The amino acid sequences of this family exhibit high homology amid them. The crystal structure of habu coagulation factors IX/ X-binding protein has been determined. It is an intertwined dimer with a central loop projecting into the adjoining chain. Excluding this loop, each chain has a fold similar to rat mannose-binding protein.

Key words anticoagulant, coagulation factor IX/ factor X-binding protein, snake venom, calcium ion