

我国产日本医蛭水蛭素的分离和纯化

杨 潼 李建秋 尹 平¹⁾

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

¹⁾ (武汉大学生物化学系, 430072)

提 要

采用离子交换柱层析与凝胶过滤柱层析的方法对从我国产的日本医蛭 [*Hirudo nipponica* (whitman)] 活体中提取出的唾液腺分泌物进行分离和纯化, 获得了较纯净的水蛭素 (Hirudin)。测定结果表明: 日本医蛭唾液腺分泌物提取液中水蛭素含量为 4AT-U/ml; 纯化总得率为 15%; 纯化后的产物比活力为 6708AT-U/mg 蛋白。

关键词 水蛭素, 阴离子交换柱层析, 凝胶过滤柱层析, 凝血酶滴定法。

1884年 Haycraft 首先发现了医用水蛭的咽部具有水溶性抗凝血物质, 1904年 Jacoby 将这种物质命名为“水蛭素”(Hirudin)。直至 1955年德国的 Markwardt 首次从医蛭中分离出较纯的水蛭素, 此后水蛭素的纯化和标准化技术日臻完善。迄今已有不少有关的研究报道和专利, 绝大多数工作是利用欧洲医蛭 (*Hirudo medicinalis* L.) 的头部甚至整个身体做原料, 经乙醇脱水, 然后加丙酮沉淀等一系列步骤而得到水蛭素粗制品的。1970年 Markwardt 采用乙醇分级沉淀、阳离子交换、凝胶过滤以及阴离子交换等步骤获得了水蛭素纯品。1985年 Walsmann 和 Markwardt 改进了纯化方法, 采用离子交换与亲合色谱相结合而获得了高纯度的水蛭素。1986年 Johannes 等人报道了一种五步纯化法, 其中使用了高效液相色谱新技术。

根据前人研究得知水蛭素是已知最有效的天然凝血酶抑制剂^[1-9], 它是由 65 个氨基酸组成的低分子量 (7000) 多肽, 其中谷氨酰胺和天冬酰胺的含量较高并含有 3 个二硫键, 等电点为 3.8, 在 70℃ 以下可以保持活性。由于具有抗凝、溶栓等特性, 在临床医学上有着广泛的应用前景 (Sawyer, 1986)。1970年 Markwardt 首先报道了一种测定水蛭素含量的方法—凝血酶滴定法, 即根据水蛭素与凝血酶反应速度快, 在化学计量学上呈正相关, 可以用抗凝血酶单位来表示水蛭素的含量, 一个抗凝血酶单位 (AT-U) 是指在 37℃ 下使 1 个单位的凝血酶失活所需的水蛭素量。1983年 Chang 利用水蛭素能抑制凝血酶从生色底物 Chromonyl TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA) 中释放生色 P-N-*nitro*aniline 这一反应发展了一种新的水蛭素检测方法。目前国外已有不少公司生产并销售不同纯度的天然水蛭素制剂。我国医学蛭类种类繁多, 有着丰富的资源可以利用, 然而至今对天然水蛭素的研究还很少, 更无制剂的生产^[10,11]。为了摸索获得天然水

蛭素纯品的可能性以及为天然水蛭素产品的开发提供科学依据,作者用广泛分布我国的吸血水蛭——日本医蛭做了以下水蛭素的分离和纯化研究。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 HD-81-5B 型核酸蛋白检测仪、DU-70 贝克曼分光光度计 (DU-70 Beckman Spectrophotometer) 和 721 分光光度计、柱层析装置 (1.5cm × 50cm; 2cm × 60cm)、浓缩用透析袋、分析天平、微量进样器和滴定板。

1.2 实验材料和试剂 我国产的吸血水蛭——日本医蛭采自湖北省武汉市郊区的稻田,在室内充氧条件下让其充分饥饿,采用一种独特的技术从活体水蛭体内提取出唾液腺分泌物,置冰箱中冰冻待用。使用的主要试剂: pH7.4, 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.1mol/L NaCl); pH4.6, 0.1mol/L 柠檬酸钠缓冲液; 0.5mol/L NaOH-0.5 mol/L NaCl 混合液; 0.5 mol/L HCl; 100NIH/ml 凝血酶溶液; 0.5% 血纤维蛋白原溶液 (必须在使用前临时配制); 甘油 (分析纯); 牛血清白蛋白溶液 (6mg/ml); 双缩脲试剂 (每升溶液中含 1.50g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 6.0 $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 30NaOH); 二乙基氨基乙基纤维素阴离子交换剂 (DEAE- C_{25}); 交联葡聚糖离子交换剂 (Sephadex- G_{25})。

1.3 分离和纯化 唾液腺分泌物的制备是将 250—300 ml 从活体日本医蛭体内提取出的唾液腺分泌物提取液中加入 4 倍置冰箱中预冷的含水 15% 的丙酮,搅拌后置冰箱中过夜,吸出上清丙酮并离心,在沉淀中加入预冷的三氯乙酸 (约 25ml) 使其溶解,离心除去残渣,待上样进行柱层析。

阴离子交换柱层析 取适量 DEAE- C_{25} 加蒸馏水使其膨胀,按常规方法依次用 0.5mol/L NaOH-NaCl 混合液、0.5mol/L HCl 及 0.5mol/L NaOH-NaCl 混合液各浸泡 30min 后用蒸馏水洗涤至中性。装柱 (2cm × 60cm) 至所需高度,用 pH4.6 的 0.1mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液平衡,5ml 的唾液腺分泌物浓缩液或上述三氯乙酸溶液上样进行梯度洗脱并用记录仪绘出洗脱曲线,分段收集洗脱液,流速为 30ml/h。经检测,将有活力部分集中于透析袋中用甘油浓缩,再用双缩脲法测总蛋白含量,继续以下的柱层析。

凝胶过滤柱层析 取适量的 Sephadex- G_{25} 加蒸馏水浸泡 4h,按常规方法用 0.5 mol/L NaOH-0.5 mol/L NaCl 混合液浸泡 0.5h,抽滤除去碱液并用蒸馏水洗涤至中性,加热煮沸除去气泡。装柱 (1.5cm × 50cm) 至所需高度,用 pH7.4 的 0.1 mol/L Tris-HCl-NaCl 缓冲液平衡,将上述有活力洗脱液的浓缩液上样、洗脱并用记录仪绘出洗脱曲线,分段收集洗脱液,流速为 90ml/h。分别检测活力,将有活力部分集中于透析袋中用甘油浓缩。再测活力后,待用 DU-70 贝克曼分光光度计在 200nm 至 400nm 波长范围内扫描。

1.4 凝血酶滴定法检测水蛭素含量 用微量进样器将 50 μl 未知水蛭素含量的待测溶液加至溶有 0.5% 牛血纤维蛋白原的 200 μl pH7.4 的 Tris-HCl-NaCl 缓冲液中,混合均匀后以 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的速度递次加入 100IU/ml 标准凝血酶稀释液并及时搅拌,让其与牛血纤维蛋白原-水蛭素混合液充分混合均匀,当出现胶冻状凝块时即为滴定终点。从滴

定的凝血酶量，可以推算出被测溶液中水蛭素的活力单位数。

1.5 双缩脲法测总蛋白含量 取一系列试管分别加入 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0ml 标准牛血清白蛋白溶液(6mg /ml)，用水补足至 2ml，然后分别加入 4ml 双缩脲试剂在室温下放置 30min，用 721 分光光度计在 540nm 处比色，光密度分别为 0, 0.066, 0.135, 0.210, 0.285, 0.340。以光密度为纵坐标，牛血清白蛋白(BSA)含量为横坐标绘出标准曲线(图 1)。取 2.0ml 样品按上述方法测 A_{540} ，便可在标准曲线上查到对应的蛋白质含量微克数。用测得的蛋白质含量结合用凝血酶滴定测得的数据，便可求出样品中水蛭素的比活力。

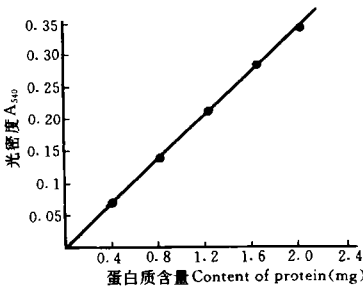


图 1 牛血清白蛋白标准曲线
Fig.1 Standard curve of bovine serum albumine (BSA)

1.6 DU-70 贝克曼分光光度计检测产物纯度 将经过 DEAE-C₅₂ 和 Sephadex-G₂₅ 两种沉析柱的最后洗脱液有水蛭素活力部分集中，用透析袋和甘油浓缩，再用 DU-70 贝克曼分光光度计在 200nm 至 400nm 波长范围内扫描，便能确定所得产物的纯度。

2 结果

2.1 唾液腺分泌物提取液中的水蛭素含量 共做过数十次唾液腺分泌物提取液的凝血酶滴定，在试剂可靠和温度适宜的情况下，水蛭素含量的绝大多数数据都很稳定，其结果为 4AT-U/ml。

2.2 分离和纯化结果 用浓缩五倍含有 100AT-U 水蛭素的 5ml 唾液腺分泌物提取液或前述方法制备的三氯乙酸溶液上样，先经 Sephadex-G₂₅ 柱层析后经 DEAE-C₅₂ 柱层析，或先经 DEAE-C₅₂ 柱层析后经 Sephadex-G₂₅ 柱层柱，共做实验数次，取得了可以重复的结果(图 2—3)，凝血酶滴定证实中央的大峰均具有水蛭素活力。经过第二次柱层析的洗脱液有水蛭素活力部分被浓缩为 2.5ml 水蛭素含量 6AT-U/ml 的浓缩液，其总得率为 $\frac{2.5\text{ml} \times 6\text{AT-U/ml}}{100\text{AT-U}} \times 100\% = 15\%$ 。经过多次测定蛋白质含量，便可算出所得产物中水蛭素比活力的平均值为 6708AT-U/mg 蛋白。

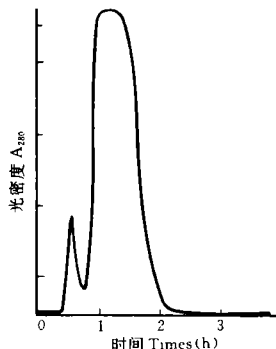


图 2 第一次(Sephadex-G₂₅)柱层析洗脱曲线
Fig.2 Elution curve of the first (Sephadex-G₂₅) column chromatography

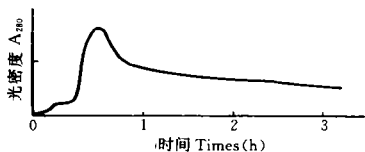


图 3 第二次(DEAE-C₅₂)柱层析洗脱曲线
Fig.3 Elution curve of the second (DEAE-C₅₂) column chromatography

2.3 DU-70 贝克曼分光光度计测定 在 180nm 至 598nm 波长范围对从活体日本医蛭体内提取到的唾液腺分泌物以及经过两种柱层析之后所得洗脱液有活力部分的浓缩液分别进行了扫描。图 4 说明唾液腺分泌物提取液在 410nm 波长附近有一杂质峰, 而在 190—300nm 波长附近的大峰则包含有水蛭素以及具有相近吸收光谱的成分。在图 5 中只出现一个明显的峰, 说明水蛭素产物基本上是纯净的。

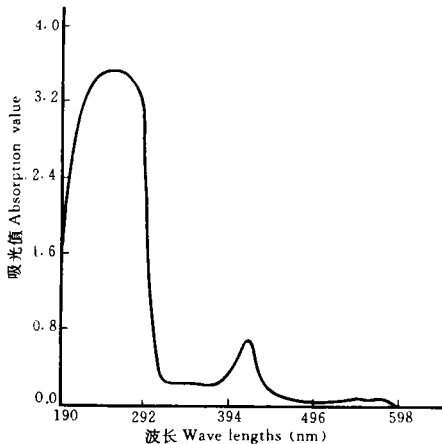


图 4 活体日本医蛭唾液腺分泌物提取液在 190—598nm 波长范围的吸收峰。

Fig.4 Absorption peaks of contents of salivary gland secretions from an alive leech, *H. nipponica* in wave lengths between 190—598 nm

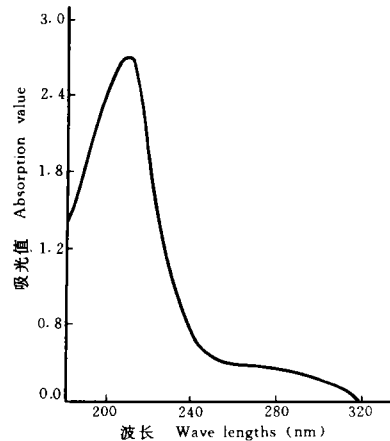


图 5 纯化产物在 180—320nm 波长范围的吸收峰

Fig.5 Absorption peak of purified product in wave lengths between 180—320 nm

3 讨论

3.1 在此项研究中采用了一种独特的技术从活体日本医蛭体内直接将唾液腺分泌物提取出来, 然后再进行分离和纯化。这种技术系根据 Elliott 发现的医蛭取食行为化学感受特异功能发展起来的。由于一条医蛭可以重复提取 7—8 次, 这就更有效地提高了对材料动物的利用, 也简化了提取和纯化的步骤, 节省了试剂, 并获得较多纯品。

3.2 凝血酶滴定法是一种简易、省时、准确、稳定的水蛭素活力测定方法, 然而测定结果受到环境温度和凝血酶活力的影响很大, 也受到操作人员对方法掌握的熟练程度的影响。气温太高或太低、凝血酶活力丧失以及试剂稀释度不恰当, 均能造成测定结果的较大偏差。在 20℃ 以下的低温条件下测定结果偏高, 而在高于 37℃ 的高温条件下凝血酶变性或受到破坏, 从而不能测到结果。根据在不同温度下的数次测定结果, 可以得出凝血酶滴定法的最适温度范围应是 25—37℃。

3.3 用 DU-70 贝克曼分光光度计进行测定时, 需用标准品进行标定方可得出准确数据。由于未能获得较纯的水蛭素标准品, 只能从扫描的吸收峰得知纯化产物的纯度。

3.4 在实验过程中, 作者发现纯化步骤中先经过 DEAE-C₅₂ 柱层析、后经过 Sephadex-G₂₅ 柱层析与先经过 Sephadex-G₂₅ 柱层析、后经过 DEAE-C₅₂ 的效果几乎一样, 最后产物的比活力和总得率也都相差不大。

3.5 天然水蛭素具有活性高、结构稳定、不易失活以及后期纯化成本低的优点, 是开发抗凝、溶栓新药的理想原料。然而要使日本医蛭实现规模化的饲养、繁殖来满足制药原料的大量需求, 并不是一件容易的工作, 仍需多方面的研究和探索。

参 考 文 献

- [1] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of Thrombin—Naturally occurring activators and inhibitors. *Methods in Enzymology*, 1970, 19: 924—930.
- [2] Walsmann P. et al. On the isolation of the Thrombin inhibitor Hirudin. *Thrombosis Research*, 1985, 40: 563—569.
- [3] Sawyer R T. Leech Biology and Behaviour. Oxford: Clarendon Press, 1986, 2: 484—501.
- [4] Griefsbach U. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate. *Thrombosis Research*, 1985, 37: 347—350.
- [5] Baskova I P, et al. Thrombolytic agents of the preparation from the medicinal leeches. *Folia Haematol.*, Leipzig 115. 1988. 1—2: 166—170.
- [6] Dodt J, et al. Isolation and characterization of hirudin isohibitors and sequence analysis of hirudin PA. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1986, 367: 803—811.
- [7] Nikonov G I. et al. Antithrombotic effect of the preparations from the leeches *Hirudo medicinalis*. *Folia Haematol.*, Leipzig 115. 1988. 1—2: 47—51.

ISOLATION AND PURIFICATION OF HIRUDIN FROM A BLOOD-SUCKING LEECH, *HIRUDO NIPPONIA*, IN CHINA

Yang Tong, Li Jianqiu and Yin Ping¹⁾

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

¹⁾ (Biochemistry Department, Wuhan University 430072)

Abstract

This paper deals with the isolation and purification of hirudin from a blood-sucking leech, *Hirudo nipponia* in China. Essentially, the experimental process requires an anion exchange chromatography on DEAE-C₅₂ and a gel filtration chromatography on Sephadex-G₂₅. The hirudin activity were measured by the method of titration with thrombin. The salivary gland secretions have been obtained from the alive leeches. The hirudin content in salivary gland secretions is 4 AT-U /ml; the hirudin production rate is 15%; ratio activity after purifying is 6708 AT-U /ml protein.

Key words Hirudin, Anion exchange chromatography, Gel filtration chromatography, Method of titration with thrombin