

蛇毒类抗血栓蛋白酶的研究进展

张丹丹^{1,2}, 王维亭¹, 赵专友^{1*}

1. 天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 血栓栓塞性疾病严重威胁人类健康, 研究具有优势的抗栓药物是当代医学的重点和热点之一。蛇毒中存在 3 类具有抗栓作用的蛋白酶, 分别为蛇毒类凝血酶、纤维蛋白(原)溶解酶、纤溶酶原激活剂。对这 3 类抗血栓蛋白酶进行了综述, 分别介绍了各类酶的分布、结构、生化性质以及作用机制, 并结合其性质及机制分析在抗栓方面存在的优点和不足。另外, 还介绍了蛇毒类抗血栓蛋白酶的研究现状, 临床应用情况, 以及临床常用的一些成熟药物。

关键词: 蛇毒; 抗血栓; 蛇毒类凝血酶; 纤维蛋白; 纤溶酶原激活剂

中图分类号: R943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2012)04-0409-05

Advances in studies on antithrombotic protease in snake venom

ZHANG Dan-dan^{1,2}, WANG Wei-ting¹, ZHAO Zhuan-you¹

1. Tianjin Center for New Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Thromboembolic disease seriously threatens human health, so the study on antithrombotic drugs with great advantages is one of the critical and hot spots of contemporary medicine. There are three types of proteases in snake venom, snake venom thrombin-like enzymes (SVTLEs), snake venom fibrin(ogen)olytic enzyme (FLE), and plasminogen activator (PA). This review summarizes the distribution, structure, biochemical properties, and mechanism of each protease, and analyzes the advantages and disadvantages of their antithrombosis. This review also introduces the research status, clinical application, and some commonly used drugs of snake venom in clinic.

Key words: snake venom; antithrombotic; snake venom thrombin-like enzymes (SVTLEs); fibrin (ogen) olytic enzyme (FLE); plasminogen activator (PA)

随着社会发展和人口老龄化进程的加速, 血栓栓塞性疾病的发病率逐年增加, 现已高居各种疾病之首, 严重威胁人类的生命健康, 成为当代医学研究的重点和热点之一。溶栓疗法是目前公认的临床治疗血栓性疾病最有效的方法, 因此研发强效、不良反应小的抗栓药具有重要的现实意义。蛇毒是从毒蛇的毒腺中分泌的一种毒液, 化学成分十分复杂, 主要是蛋白酶和多肽。蛇毒中不同的成分具有不同的药理作用, 其中部分蛇毒蛋白酶在体内可直接或间接作用于纤维蛋白原或纤维蛋白, 从而对纤溶系统产生影响, 提示研究者从中开发治疗血栓性疾病的新药。目前分离纯化得到的具有抗血栓作用的蛇毒蛋白酶根据分子结构、作用机制等的不同大

致可分为 3 类: 类凝血酶(凝血酶样酶)、纤维蛋白(原)溶解酶和纤溶酶原激活剂。

1 蛇毒类凝血酶

早在 1936 年, Klobusitzki 和 Konig 就从美洲矛头蝮蛇 *Bothrops jararaca* 蛇毒中首次获得类凝血酶, 由此开始了对蛇毒类凝血酶的研究。蛇毒类凝血酶(snake venom thrombin-like enzymes, SVTLEs)是蛇毒中与血浆凝血酶性质相似的一类酶的总称, 属于丝氨酸蛋白酶, 通常具有精氨酸酯酶和酰氨酶活性^[1], 也称凝血酶样酶。

1.1 SVTLEs 的分布

SVTLEs 最早发现于蝮亚科蛇毒中, 在蝮亚科蛇毒中分布最广、含量最丰富。近年来纯化得到的

收稿日期: 2012-04-25

基金项目: “十一五”重大新药创制科技重大专项(2010ZX09401-307)

作者简介: 张丹丹, 女, 硕士在读, 研究方向为心血管药理。Tel: (022)84845255 E-mail: zhangdandan00007@163.com

*通讯作者 赵专友(1964—)男, 医学硕士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为心脑血管药理。Tel: (022)84845267 E-mail: zhaozy@tjipr.com

类凝血酶大多来自蝮亚科, 如 bhalternin 是从美丽矛头蝮 *Bothrops alternatus* 蛇毒中得到的一种新的类凝血酶^[2]。蝮亚科蛇毒也有类凝血酶分布, 甚至存在于游蛇科的非洲树蛇 *Dispholidus typus* 蛇毒中, 另外尖吻蝮蛇 *Deinagkistrodon acutus*^[3]等其他种属的蛇毒中也有类凝血酶。

1.2 SVTLEs 的结构研究

随着 SVTLEs 的全部或部分氨基酸序列被阐明, 发现它们的一级结构很相似, 差异很小。已知的 SVTLEs 均由一条肽链组成, 典型区别于凝血酶通过二硫键相连的双链结构, 大多数 SVTLEs 不含游离巯基 (flavoxobin 除外), 一般具有 6 个二硫键。大多数类凝血酶与胰蛋白酶类似, 具有高度保守的 N 末端, 且多为缬氨酸 (Val) 残基。几乎所有的 SVTLEs 都是糖蛋白, 寡糖链多与天冬酰胺连接。在蛋白质高级结构方面, Helen 等^[4]曾精细地模拟丛林巴西蝮蛇类凝血酶 (the *Lachesis muta* thrombin-like enzyme, LM-TL) 的高级结构。

目前对 SVTLEs 结构研究已经由蛋白质水平向分子水平转变。来自于岩栖蝮的 saxthrombin 被纯化结晶得到一种高质量的晶体, 并分析了其晶体构型, 这是 SVTLEs 晶体结构的首次报道^[5]。得到晶体构型后, 可利用晶体学手段研究生物大分子结构, 进行更加深入的结构及功能分析。

1.3 SVTLEs 的生化性质

大部分 SVTLEs 的相对分子质量在 $3 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$, 部分的相对分子质量较大, 如来自于美洲矛头蝮的 Botrombin 相对分子质量为 7.1×10^4 ^[6]。

蛇毒类凝血酶对纤维蛋白原的作用比凝血酶更为专一, 它主要作用于纤维蛋白原的一条链 (A α 或 B β), 极少数作用于两条链。除对纤维蛋白原的作用外, 蛇毒类凝血酶均可水解甲苯磺酰精氨酸甲酯 (TAME) 和苯甲酰精氨酸乙酯 (BAEE)。蛇毒类凝血酶都属于丝氨酸蛋白酶, 表现出丝氨酸蛋白酶特性, 能水解 TAME 及 BAEE, 且丝氨酸蛋白酶抑制剂二异丙基氟磷酸酯 (DFP) 和苯甲基磺酰氯 (PMSF) 可抑制其活性。各种蛇毒类凝血酶间表现高度的同源性, 属于胰蛋白酶/激肽释放酶家族, 其活性不被抗凝血酶 III (A-III)、肝素、水蛭素、大豆胰蛋白酶等抑制剂所抑制; 一般来说, 不同种属的血浆纤维蛋白原对类凝血酶的敏感性不同, 如凝血酶原对一种新型类凝血酶 purpurase 的敏感性为: 猫 > 人 > 狗 > 山羊 > 兔^[7]。

1.4 SVTLEs 的作用机制

纤维蛋白原是人体凝血系统主要成分之一, 由 3 对非等同的多肽链 A α 、B β 和 γ 组成, 因此纤维蛋白原可用 $[\alpha(A)\beta(B)\gamma]_2$ 表示。蛇毒类凝血酶具有精氨酸活性, 可直接水解纤维蛋白原的 A α 链或 B β 链, 释放血纤肽 A (FPA) 或血纤肽 B (FPB), 从而促进纤维蛋白单体的形成及聚合, 在体外表现出凝血作用。但与凝血酶不同, SVTLEs 在体内不具有激活凝血因子 XIII 的作用, 生成的纤维蛋白单体只能首尾聚合而不能发生侧链交联, 为可溶性的非交联单体, 此聚合体对纤溶酶敏感, 因此十分不牢固, 容易被网状内皮系统吞噬, 或被纤溶系统清除或降解, 使血浆纤维蛋白原水平降低而呈良性的去纤维蛋白状态, 因此在机体内表现出抗凝和降纤功能。不同来源的蛇毒类凝血酶对血浆纤维蛋白原的作用方式不同, 根据降解机制不同, 可将蛇毒类凝血酶分为 3 类: 第一类是仅释放 FPA 的酶, 即 SVTLE-A; 第二类是仅释放 FPB 的酶, 即 SVTLE-B; 第三类是既释放 FPA 又释放 FPB 的酶, 即 SVTLE-AB。

对血小板及止血功能的影响, 一般认为类凝血酶与凝血酶相反, 不诱导血小板的聚集和释放, 且与富含血小板的血浆所形成的凝块不收缩。

以动态的观点看待血栓, 它实质处于纤维蛋白的不断沉积和溶解的平衡之中。因此类凝血酶清除纤维蛋白的前体可有效地预防前者而控制血栓的发展。

20 世纪 70 年代我国许多研究机构开发出类凝血酶抗栓药物, 并应用于临床。为了规范生产, 药政部门于 1997 将名称和产品规范化, 将此类药物统称为降纤酶 (defibrase)。目前用于临床的主要为安克洛酶 (ancrod) 和巴曲酶 (batroxobin)。同类的商品很多, 如日本东菱药厂生产的东菱精纯克栓酶属于巴曲酶。蕲蛇酶注射液是我国研制的蛇毒抗栓酶制剂类国家级二类西药, 并获国家专利, 已广泛应用于脑血栓或静脉血栓的治疗^[8]。

对蛇毒类凝血酶的研究还存在一些问题: 存在抗原性; 来源有限, 不利于大规模生产; 提取得到的 SVTLE 纯度难以控制。因此, 利用基因工程的方法生产蛇毒类凝血酶势在必行。另外, 蛇毒类凝血酶存在命名混乱的问题。如立止血和东菱精纯克栓酶所含的主要成分都叫巴曲酶, 药理作用和临床应用却截然不同, 是一种典型的同名异物现象。因为巴曲酶是世界卫生组织对毒蛇枪蛙、大具窝蝮蛇

或矛头蛇中所含的纤维蛋白原促凝蛋白酶的通用名^[9]。将它们都称为巴曲酶欠妥,且容易混淆,临床使用应特别注意。

2 蛇毒纤溶酶

纤维蛋白(原)溶解酶[fibrin(ogen)olytic enzyme, FLE],简称纤溶酶,是存在于蛇毒中的一类能直接溶解纤维蛋白原以及纤维蛋白的酶。自 1976 年 Ouyang 和 Huang 首次从尖吻蝮蛇毒中获得纯化的纤溶酶以来,对蛇毒纤溶酶进行了大量深入的研究。发现蛇毒纤溶酶具有抗栓、溶栓作用,可用于心脑血管血栓和心肌梗死的治疗^[10]。

2.1 蛇毒纤溶酶的分布

蛇毒纤溶酶的分布十分广泛,目前为止,研究者从蝰科、眼镜蛇科以及游蛇科中均得到了纯化的纤溶酶。其中,蛇毒纤溶酶在蝰科蝮亚科的分布最广,资源最丰富。响尾蛇属于蝮亚科,有报道称几乎所有的响尾蛇毒均含有纤溶成分。

2.2 蛇毒纤溶酶的结构

按酶学特征,可将蛇毒纤溶酶分为单链的锌金属蛋白酶和单链或双链的丝氨酸蛋白酶,大多数蛇毒纤溶酶属于锌金属蛋白酶,相对分子质量变化较大,大多在 $2.2 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$ 。迄今为止,已测明氨基酸序列的蛇毒纤溶酶均为 Metzincin(含锌金属蛋白酶)家族中 adamalysin 亚家族的成员,有较强的结构同源性。其中比较有代表性的为 fibrolase,对其研究较多也较深入。fibrolase 是从南美铜头蝮蛇 *Agkistrodon contortrix contortrix* 蛇毒中分离出来的一种单链的金属蛋白酶,由 203 个氨基酸组成,相对分子质量为 2.28×10^4 。Bolger 等^[11]根据 adamalysin 的晶体结构模拟了它的三维同源模型,Swenson^[12]曾详细总结出了它的结构。另外,有些蛇毒纤溶酶中还含有 Ca^{2+} ,并且发挥重要作用。如来自 *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* 的蛇毒纤溶酶 ussurenase 结构中具有 Ca^{2+} ,其中 Ca^{2+} 对诱导蛋白正确折叠、稳定构象、维持其活性都起至关重要的作用^[13]。目前蛇毒纤溶酶的结构研究还不够深入,对其二级结构的研究很少,高级结构几乎没有,蛇毒类凝血酶中的丝氨酸蛋白酶的结构也少有报道。

2.3 蛇毒纤溶酶的性质

2.3.1 酶学特性 大多数蛇毒纤溶酶具有降解纤维蛋白原和纤维蛋白的作用,但不同种类的蛇毒纤溶酶对二者的溶解活力也并不完全相同。蛇毒纤溶酶主要作用于纤维蛋白原的 A α -链和 B β -链,优先

降解纤维蛋白原 A α -链和 B β -链的纤溶酶分别称为 α -纤溶酶和 β -纤溶酶。 α -纤溶酶大都是锌金属蛋白酶,表现金属蛋白酶的性质。 β -纤溶酶除个别外都是丝氨酸蛋白酶,受 DFP 或 PMSF 抑制,有酯水解活性,对热稳定。巯基蛋白酶抑制剂(如 1,10-巯基苏糖醇, L-半胱氨酸)既影响 α -纤溶酶活性,对 β -纤溶酶的活性亦有影响,表明二硫键可稳定二者结构,从而在维持其活性方面发挥重要作用。

另外,蛇毒纤溶酶对纤维蛋白原无活化作用,也不水解其他凝血因子及血小板膜,具有高度的底物特异性,因此具有较低的出血活性,比血纤溶酶更安全。另外,蛇毒纤溶酶还具有热稳定性高的特点,安全性和稳定性决定了其可被开发为具有重大优势的优良溶栓剂。

2.3.2 出血活性 部分蛇毒纤溶酶具有出血活性,它们基本上是金属蛋白酶。出血活性一般分为两类:一种是其内在活性,其结构一般同某些出血因子的氨基酸序列结构相似^[14];另一种是因为混杂了与其结构相似的出血因子引起的出血,高度纯化后可避免。出血的原因目前认为主要是某些蛇毒纤溶酶具有广阔的底物特异性,以至于广泛水解血管基底膜蛋白,并可摧毁细胞间的基质蛋白^[15]。

2.4 蛇毒纤溶酶的作用机制

蛇毒纤溶酶不存在无活性的酶原形式,不需要活化剂的激活,可以直接溶解纤维蛋白原以及纤维蛋白。主要作用于纤维蛋白原的 A α -链或 B β -链。锌金属蛋白酶与丝氨酸蛋白酶的作用机制有所不同,金属蛋白酶中水分子在锌离子作用下发生极化,质子转移至 144 位的谷氨酸残基,而后 OH-对底物的赖氨酸残基中的 H 原子发生攻击,使 413Lys-414Leu 键断裂,从而发生降纤作用。丝氨酸蛋白酶主要作用于 β -链的 N 端或 C 端,但是机制尚未完全明确。蛇毒纤溶酶降解人纤维蛋白原,产物为具有抗凝血作用的 X、Y、D、E 碎片,无出血活性的蛇毒纤溶酶通过上述 4 种碎片抑制血栓形成的作用而起到降纤和抗栓的作用^[16]。

蛇毒纤溶酶在溶栓方面具有独特的优势,同以往的抗栓药物相比,具有起效快、不良反应小等特点。多种蛇毒纤溶酶类溶栓药物都已进入临床使用,如广西医科大学研制的“注射用精制溶栓酶”,中国医科大学研制的主要成分为蛇毒纤溶酶和类凝血酶的“复合抗栓酶”,北京赛生药业研发的注射用纤溶酶也已在临床使用, fibrolase 的重组体 alfineprase

最近也已经进入临床试验期。但一些蛇毒纤溶酶存在出血特性,不利于开发及应用,因此利用基因工程手段改造其结构,去除其出血活性成为研究的重点。随着分子生物学的发展,相信这一问题能得到解决,并能得到高效、低毒、高产的蛇毒纤溶酶。

3 蛇毒纤溶酶原激活剂

对蛇毒纤溶酶原激活剂 (snake venom plasminogen activator) 的研究比蛇毒类凝血酶及纤溶酶要晚很多。张云等于 1993 年发现了竹叶青 *Trimeresurus stejnegeri* 蛇毒在体外能够显著活化人纤维蛋白原,并于 1995 年报道了一种从竹叶青蛇毒中分离纯化出的新型酶原激活剂——*Trimeresurus stejnegeri* venom plasminogen activator (TSV-PA)。这一发现为研制新的抗栓药提供了新思路。

3.1 蛇毒纤溶酶原激活剂的分布

目前发现的蛇毒纤溶酶原激活剂仅存在于蝰亚科及蝮亚科蛇毒中,如竹叶青、短尾蝮蛇、尖吻蝮等蛇毒中,在其他蛇科中还未见分布。除 TSV-PA 外,迄今发现的纤溶酶原激活剂还有从大陆蝮蛇 *Agkistrodon halys* 中分离纯化得到的 Haly-PA; 从林巴西蝮蛇 *Lachesis muta muta* (bushmaster) 提取的 LV-PA^[17]; 从长白山白眉蝮蛇分离纯化得到的 ABUSV-PA^[18]; 从短尾蝮蛇 *Gloydius brevicaudus* 分离纯化得到的 GBV-PA^[19]。

3.2 分子结构与生化性质

3.2.1 相对分子质量与等电点 从不同蛇种中分离纯化到的蛇毒 PA 相对分子质量与等电点各有不同。如: TSV-PA, 相对分子质量 3.3×10^4 , 等电点 (pI) 为 5.2; 而 ABUSV-PA 的相对分子质量较小, 为 2.78×10^4 ; 福建医科大学蛇毒研究所提取到的 GBV-PA 相对分子质量为 3.2×10^4 , 等电点为 5.2。

3.2.2 分子结构 目前为止,发现的蛇毒 PA 都是单链糖蛋白,一般由 200~300 个氨基酸组成,如 Haly-PA 和 LV-PA 均有 234 个氨基酸^[20]。蛇毒 PA 间一般具有较高的同源性,如 LV-PA 与 TSV-PA 的同源性达到了 90%。蛇毒 PA 都属于丝氨酸蛋白酶家族,因此和其他的蛇毒蛋白酶也具有高的序列同源性,同巴曲酶的同源性达 63%。相比之下,虽然蛇毒 PA、t-PA 及 u-PA 都具有纤溶酶原激活作用,同源性却只有 21%~23%,相似性低可能是由结构的差异造成的。

3.2.3 酶学性质 蛇毒 PA 为丝氨酸蛋白酶,可被苯甲磺酰氯所抑制。分子中含有由半胱氨酸组成的

二硫键,故其活性受二巯苏糖醇抑制。

3.3 作用机制

蛇毒 PA 主要是通过激活纤溶酶原使其转变成纤溶酶,从而间接发挥溶解纤维蛋白的作用。但蛇毒 PA、t-PA 和 u-PA 作用机制并不完全相同,t-PA 主要通过结合纤维蛋白从而加强对凝集的纤溶酶原的催化活性,u-PA 主要通过结合细胞表面特殊的膜受体而产生作用,t-PA 和 u-PA 的相似处为两者均需结合在纤维蛋白表面,因此纤维蛋白能大大增强二者的作用^[21-22]。而蛇毒 PA 的激活作用不是由于交聚的纤维蛋白片段的刺激作用,它含有类似 t-PA 的催化结构域,因此同 t-PA 具有相同的激活纤溶酶原的生物活性,但活性约为 t-PA 的 1/50^[23]。因结构不同,同 t-PA 相比,蛇毒 PA 具有突出的作用特点:(1) 半衰期长:蛇毒 PA 缺乏与肝脏代谢密切相关的 F 区、EGF 区和 Kringle1 区,不易被肝脏代谢,因此半衰期长。(2) 较小剂量即可发挥活性作用:由于蛇毒 PA 缺乏与内源性抑制剂 PAI-1 结合的 KHRR 区域,不易被 PAI-1 灭活。(3) 底物特异性高:蛇毒 PA 仅通过激活纤维蛋白原间接发挥作用,且对其他血浆因子如第 X 因子、凝血酶原、蛋白 C 等并无作用,安全性高。(4) 缺乏溶栓特异性:蛇毒 PA 不含结合纤维蛋白的 Kringle2 区和指形区,对纤维蛋白缺乏敏感性,溶栓时对纤维蛋白选择性差,是其一项缺点。

目前蛇毒 PA 仍处于基础研究阶段,尚无药物进入临床应用。由于蛇毒 PA 具有半衰期长、不易被 PAI-1 灭活、高度的底物特异性等优点,近年来受到关注,现在对其研究较多的是福建医科大学蛇毒研究所。但蛇毒 PA 对纤维蛋白的选择性低,这是目前需要解决的问题,今后有望对它进行结构改造,增强溶栓特异性,分子生物学技术的发展也将进一步推动蛇毒 PA 的发展。由于蛇毒 PA 自身的特点,具有潜在的临床应用价值,值得研发与应用。

4 结语

近年来抗栓药物的研究有很大的进展,在天然产物中发现许多抗栓化合物^[24-25]。但目前临床应用的血栓治疗药仍存在不足。理想的抗栓药物应具有下述优点:作用快速、持久、特异性高、出血活性低、价格合理。近年来,已从蛇毒类抗血栓蛋白酶中开发出一系列快速、高效的新型抗栓药物,一些已广泛应用于临床,多属于蛇毒类凝血酶或蛇毒纤溶酶。但是蛇毒抗血栓蛋白酶由于自身的特点,亦

存在一些不足之处。蛇毒类凝血酶来源有限,且纯度不好控制,存在抗原性;一些蛇毒纤溶酶具有出血活性,限制了其使用;蛇毒纤溶酶原激活剂对纤维蛋白敏感性差,溶栓时缺乏特异性。目前主要利用基因工程的方法解决这些问题,如合成蛇毒类凝血酶、提高纯度、降低抗原性;利用基因工程进行结构改造,去除出血活性;改造纤溶酶原激活剂结构,增强其溶栓特异性。相信随着基因工程及分子生物学的发展,这些问题都会得到解决。

参考文献

- [1] Castro H C, Zingali R B, Albuquerque M G, *et al.* Snake venom thrombin-like: from reptilase to now [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(7/8): 843-856.
- [2] Costa J O, Fonseca K C, Mamede C C, *et al.* Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom [J]. *Toxicon*, 2010, 55(7): 1365-1377.
- [3] 郭水英. 蕲蛇酶注射液临床应用探讨 [J]. 蛇志, 2003, 15(2): 71-75.
- [4] Helena C, Dione M S, Charles C, *et al.* Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 15(47): 183-195.
- [5] Huang K, Zhao W, Gao Y, *et al.* Structure of saxthrombin, a thrombin-like enzyme from *Gloydius saxatilis* [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2011, 67(Pt 8): 862-865.
- [6] 陈小飞, 马海泉, 赵冠人. 蛇毒类凝血酶的研究现状 [J]. 中国药物应用与监测, 2007(6): 51-54.
- [7] Tan N H. Isolation and characterization of the thrombin-like enzyme from *Cryptelytrops purpureomaculatus* venom [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2010, 151(1): 131-136.
- [8] 王晴川, 刘广芬. 蛇毒类抗血栓药蕲蛇酶 [J]. 海峡药学, 2009, 21(12): 1-8.
- [9] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新版药理学 [M]. 第 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 522.
- [10] Paraskevas K I, Baker D M, Vrentzos G E, *et al.* The role of fibrinogen and fibrinolysis in peripheral arterial disease [J]. *Thromb Res*, 2008, 122(1): 1-12.
- [11] Bolger M B, Swenson S, Markland J F S. Three-dimensional structure of fibrolase, the fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, modeled from the X-ray structure of adamalysin II and atrolysin C [J]. *APPS Pharmsci*, 2001, 3(2): E16.
- [12] Swenson S, Markland J F S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes [J]. *Toxicon*, 2005, 45(8): 1021-1039.
- [13] Sun M Z, Liu S, Greenaway F T. Characterization of a fibrinolytic enzyme (ussurenase) from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom: insights into the effects of Ca^{2+} on function and structure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1764(8): 1340-1348.
- [14] 冬黎黎, 刘玉芬, 张竹, 等. 蛇毒纤维蛋白(原)溶解酶的研究现状及其应用 [J]. 中国农学通报, 2010, 26(24): 71-74.
- [15] Guti é rrez J M, Rucavado A, Escalante T, *et al.* Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage [J]. *Toxicon*, 2005, 45(8): 997-1011.
- [16] 周先丽, 雷丹青, 雷卓青. 尖吻蝮蛇毒抗凝与纤溶组分对动物血栓的溶栓效果 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(3): 77-79.
- [17] Sanchez E F, Santos C I, Magalhaes A, *et al.* Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 378(1): 131-141.
- [18] Liu S, Sun M Z, Greenaway F T. A novel plasminogen activator from *Agkistrodon blomhoffii* Ussurensis venom (ABUSV-PA): purification and characterization [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(4): 1279-1287.
- [19] 张志强, 张进华, 余瑞铭, 等. 短尾蝮蛇毒纤溶酶原激活剂的分离纯化及活性测定 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(12): 1639-1644.
- [20] Sanchez E F, Felicori L F, Chavez-Olortegui C, *et al.* Biochemical characterization and molecular cloning of a plasminogen activator proteinase (LV-PA) from bushmaster snake venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(12): 1762-1771.
- [21] Wisner A, Braud S, Bon C. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom [J]. *Haemostasis*, 2001, 31(3/6): 133-140.
- [22] Braus S, Le Bonniec B F, Bon C, *et al.* The stratagem utilized by the plasminogen activator the snake *Trimeresurus Stejnegeri* to escape serpins [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(26): 8478-8484.
- [23] 李玉娜, 许云禄. 短尾蝮蛇毒纤溶酶原激活剂的分离纯化及活性测定 [D]. 福州: 福建医科大学, 2006.
- [24] 张姐, 金城, 骆骄阳, 等. 姜黄素类化合物体外抗凝血与抗血栓作用研究 [J]. 中草药, 2011, 42(10): 2070-2073.
- [25] 赵娜夏, 韩英梅, 张士俊. 穿龙薯蓣中抗血栓活性成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 652-655.