

• 药剂与工艺 •

黑尾胡蜂磷脂酶 A1 的分离纯化和活性研究

曾 琳¹, 王 滢^{2#}, 刘代亿³, 张 云¹, 李文辉^{1*}

1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223

2. 云南民族大学民族医药学院, 云南 昆明 650500

3. 云南森林自然中心, 云南 昆明 650224

摘要: **目的** 对黑尾胡蜂磷脂酶的分离方法和活性进行研究, 为黑尾胡蜂的毒性机制研究和药用发掘提供实验数据。**方法** 通过葡聚糖凝胶 G-75 分子筛柱和肝素亲和柱对黑尾胡蜂毒液中的磷脂酶活性成分进行分离。利用质谱对目的蛋白进行肽指纹图谱分析, 利用蛋白测序仪测定目的蛋白 N 末端氨基酸序列, 从结构上对目的蛋白进行鉴定。利用磷脂酶 A1 检测试剂盒确认目的蛋白对底物磷脂的特异性水解位点, 从活性上对目的蛋白进行鉴定。通过血浆复钙时间的测定检测目的蛋白对凝血系统的影响。**结果** 通过葡聚糖凝胶 G-75 分子筛柱和肝素亲和柱两步分离纯化, 成功从黑尾胡蜂毒液中纯化到了 1 个磷脂酶活性组分。该组分在 SDS-PAGE 凝胶中表观相对分子质量约为 32 000, 因此命名为 Vtp32。肽指纹图谱分析及 N 端氨基酸序列比对结果显示 Vtp32 与 *Vespa* 属胡蜂磷脂酶 A1 (phospholipase A1, PLA1) 具有高度的序列相似性。Vtp32 可以特异性水解磷脂的 sn-1 位, 因此 Vtp32 为黑尾胡蜂 PLA1。Vtp32 水解磷脂可产生溶血性凝脂, 导致红细胞裂解。Vtp32 可显著延长人血浆的复钙时间, 具有抗凝活性。**结论** 黑尾胡蜂毒液中含有大量的 PLA1, 可通过葡聚糖凝胶 G-75 分子筛柱和肝素亲和柱两步分离方法进行纯化。黑尾胡蜂 PLA1 具有溶血和抗凝活性。

关键词: 黑尾胡蜂; 磷脂酶 A1; 分离纯化; 磷脂酶特异性; 抗凝

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)07-1548-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.010

Isolation and characterization of phospholipase A1 from *Vespa tropica ducalis*ZENG Lin¹, WANG Ying², LIU Dai-yi³, ZHANG Yun¹, LI Wen-hui¹

1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China

2. School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650500, China

3. Yunnan Forest Nature Center, Kunming 650224, China

Abstract: Objective To find an effective method to isolated phospholipase from *Vespa tropica ducalis* and characterize its biological activities to support the pathogenic mechanism research and officinal value exploitation in the future. **Methods** The component with phospholipase activity was isolated by successive gel filtration (Sephadex G-75, superfine) and heparin affinity chromatography steps (Hitrap Heparin HP). The protein was identified by peptide mass fingerprinting, N-terminal amino acid determination and blast analysis, as well as phospholipase A1 (PLA1) activity monitor. Plasma recalcification time test was employed to detect the effect of Vtp32 on coagulation. **Results** A protein with phospholipase activity was orderly separated and purified from *V. tropica ducalis* venom using gel filtration and heparin affinity chromatography. The purified protein was homogenous on the SDS-PAGE gel with relative molecular mass of 32 000, so it was termed as Vtp32. Peptide mass fingerprinting assay and N-terminal amino acid sequence blast result revealed that Vtp32 showed high homologous with PLA1 from wasp of *Vespa* genus. In addition, Vtp32 hydrolyzed the sn-1 ester linkage of phospholipids. These results indicated that Vtp32 was PLA1 from *V. tropica ducalis*. Vtp32 hydrolyzed

收稿日期: 2017-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373945, 31460571)

作者简介: 曾 琳 (1981—), 女, 博士, 工程师, 研究方向为蛋白质结构与功能。E-mail: zlmzmo@mail.kiz.ac.cn

*通信作者 李文辉 (1967—), 男, 博士, 研究员, 研究方向为蛋白质结构与功能。E-mail: leewh@mail.kiz.ac.cn

#并列第一作者 王 滢 (1984—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为药用活性分子的药理药效学。E-mail: wangying_814@163.com

phosphatidylcholine, and the hydrolysis product can lyse human erythrocytes. Vtp32 delayed the recalcification time of human plasma and hence had anti-coagulation activity. **Conclusion** PLA1 is widely existed in the venom from *V. tropica ducalis*. Gel filtration followed by heparin affinity chromatography is an effective isolation strategy for the purification of PLA1. The results show that *V. tropica ducalis* PLA1 has hemolytic and anticoagulative activity.

Key words: *Vespa tropica ducalis* Smith; phospholipase A1; isolation and purification; phospholipase specificity; anti-coagulation

磷脂酶是一类可以特异性水解底物磷脂的酶类^[1]。根据其在磷脂分子上作用位点的不同,分为磷脂酶 A1 (phospholipase A1, PLA1)、磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2)、磷脂酶 B (phospholipase B, PLB)、磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 和磷脂酶 D (phospholipase D, PLD)^[2-4]。磷脂酶在自然界中广泛存在,如细菌^[5]、真菌^[2-3]、昆虫^[6]、爬行动物^[7]和哺乳动物^[8-10]的组织器官均有分布。胡蜂是膜翅目 (Hymenoptera) 细腰亚目 (Apocrita) 中胡蜂总科的统称,世界上已知有 5 000 多种,中国记载的有 200 余种,主要分布于我国南方山区的丛林中^[11]。在胡蜂毒液中,磷脂酶、透明质酸酶和抗原 5 等构成了胡蜂毒液致敏原的主要成分^[12-13]。目前已在胡蜂的毒液中发现了 3 种磷脂酶——PLA1、PLA2 和 PLB。文献报道从黄腰胡蜂 *Vespa affinis* Linnaeus、大胡蜂 *Vespa magnifica* Smith、黑腹虎头蜂 *Vespa basalis* Smith、*Vespa verutina*、黄胡蜂 *Vespula vulgaris* Linnaeus、白斑脸黄胡蜂 *Dolichovespula maculata* Linnaeus、巴西黄蜂 *Polybia paulista* Ihering, 马蜂属的欧洲纸黄蜂 *Polistes dominulus* Christ、*Polistes annularis* Linnaeus、*Polistes exclamans* Viereck、纸巢黄蜂 *Polistes fuscatus* Fabricius 蜂毒中分离纯化到了天然的 PLA1 蛋白,发现了致敏、诱导血小板聚集、诱导血栓、溶血、致死等多种活性^[12,14-25]。然而相较于庞大的胡蜂科家族成员而言,对胡蜂 PLA1 的研究是相当有限的。其他种属的胡蜂蜂毒中是否含有 PLA1,如何有效地对其进行分离,是否具有还未发现的全新活性,其毒理和药用价值等仍待研究。

黑尾胡蜂 *Vespa tropica ducalis* Smith 是一种广泛分布于亚洲南部的胡蜂。黑尾胡蜂是传统的中药材,民间将其泡酒用于治疗寒型膝痹、急性风湿病以及风湿性关节炎等。但黑尾胡蜂攻击性较强,除我国外,在东亚、南亚和东南亚国家胡蜂袭人事件均有报道^[26-29]。黑尾胡蜂蜂毒具有很强的毒性,可引起多种病理反应,如引起果蝇幼虫神经肌肉接头兴奋性神经递质的释放^[30]、麻痹瘫痪^[31]、皮肤病变^[27-28]、肾衰竭甚至死亡^[26,32]。然而,目前对黑尾

胡蜂蜂毒的成分和致病机制的研究还很少。对黑尾胡蜂毒液成分的深入研究,有助于阐明其毒液的致病机制,从而为临床上该类胡蜂蛰伤的治疗提供理论依据,也为黑尾胡蜂的药用提供指导。

本实验对黑尾胡蜂蜂毒中的 PLA1 进行分离纯化,并对其活性进行研究,为进一步研究黑尾胡蜂 PLA1 的结构、功能奠定了基础,并为黑尾胡蜂蜂毒致病机制和防治以及基于胡蜂的药用资源发掘提供理论依据。

1 仪器和材料

1.1 仪器

紫外分光光度计购自 Healthcare Bio-Sciences AB 公司;中效液相分离系统由 GE-Health 下属 Amersham Biosciences 生产;CR21N 低温冷冻离心机为日本 Hitachi 公司产品;电泳仪和电泳槽, BioRad 公司;Flex Station 3 多功能连续波长扫描微孔板分析系统为 Molecular Devices 公司生产;HWS12 型水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;PPSQ-31A 蛋白测序仪,日本岛津公司;4700 质谱仪为 ABI 公司产品。

1.2 材料

黑尾胡蜂 *Vespa tropica ducalis* Smith 采自云南普洱,属于胡蜂科 (*Vespidae*) 胡蜂亚科 (*Vespinae*) 的 *Vespa* 属 *tropica* 种,由原中国科学院昆明动物研究所梁醒财研究员鉴定;Sephadex G-75 (superfine)、Hitrap Heparin HP (1 mL) 购于 GE-Health 下属 Amersham Biosciences 公司;PLA1 分析试剂盒购于 Invitrogen 公司;蛋白定量试剂盒购于 Sigma 公司;蛋白相对分子质量对照品购于 Fermentas 公司; α -氰基-4-羟基肉桂酸购于布鲁克公司;人血浆、红细胞由云南省血液中心提供。其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黑尾胡蜂 PLA1 的分离纯化及 SDS 凝胶电泳检测

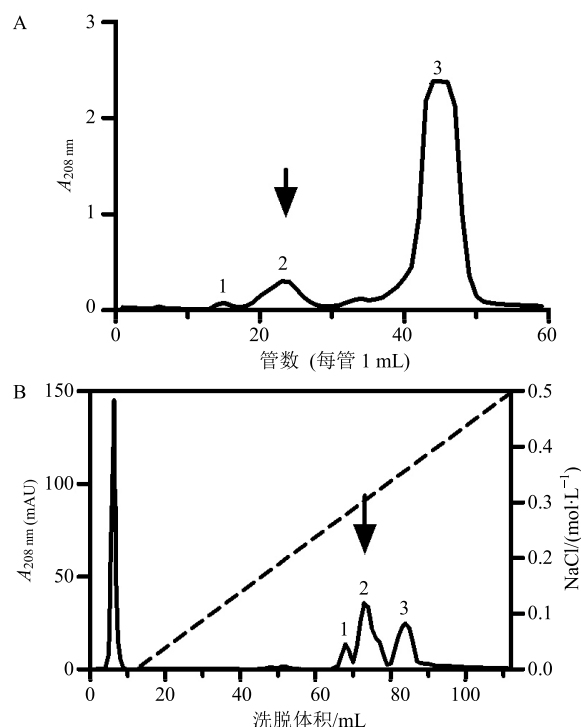
胡蜂毒腺分泌液通过电刺激的方法获得,并溶于 25 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L NaCl、pH 7.8 缓冲液中。胡蜂 PLA1 通过两步柱色谱进行分离纯化。第 1 步,收集的分泌液 (3.5 mL) 以 5 000×g

于 4 °C 离心 10 min, 取上清液 (3 mL) 上样于预平衡好的 Sephadex G-75 凝胶柱 (superfine, 31 cm × 1.5 mm; GE Healthcare 公司)。平衡缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.8, 体积流量为 1 mL/10 min, 10 min/管。通过活性检测, 确定含 PLA1 的组分; 第 2 步: 收集第 1 步目标组分, 于 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8 缓冲液中透析, 透析产物用 Hitrap Heparin HP (1 mL) 亲和柱分离纯化。平衡液为 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8 的缓冲液。洗脱缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl, pH 7.8。以每分钟上升 5 mmol/L NaCl 的梯度进行洗脱。分离产物用 SDS 凝胶电泳检测纯度。电泳及染色方法参照 Laemmli 等^[32]的方法进行。蛋白样品与还原和非还原上样缓冲液混合, 于沸水浴加热 5 min, 然后于 12% 的 SDS-PAGE 分离胶中分离纯化。电泳胶经考马斯亮蓝染色显示蛋白。

胡蜂蜂毒 (30 mg) 经 Sephadex G-75 凝胶分离主要得到 3 个分离峰 (图 1-A)。活性检测显示, 磷脂酶活性位于第 2 峰, 共计 4.5 mg, 得率为 15%; 收集第 2 峰, 用 Hitrap Heparin HP 亲和柱进一步分离纯化。采用线性盐离子梯度对吸附在柱子上的蛋白洗脱, 共获得 3 个洗脱峰 (图 1-B)。经检测, 目标蛋白位于洗脱峰第 2 峰, 得率为 19.8%。SDS-PAGE 凝胶电泳检测显示, 第 2 个峰样品在还原和非还原条件下, 均表现为单一条带, 相对分子质量为 32 000 左右 (图 2)。因此, 从 30 mg 初毒中, 共获得 PLA1 蛋白 0.89 mg, 命名为 Vtp32。

2.2 Vtp32 质谱鉴定

采用肽指纹图谱分析对分离纯化到的 Vtp32 蛋白进行鉴定。Vtp32 样品在还原条件下进行 SDS 凝胶电泳分析, 染色后切下含 Vtp32 蛋白的凝胶, 脱色并用胰蛋白酶于 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液酶切目的蛋白 (37 °C, 16 h)。取 1 μL 酶切产物与 1 μL α-氰基-4-羟基肉桂酸 (溶于 50% 乙腈、0.1% 三氟乙酸) 混合, 点样于靶板, 待混合物结晶后, 采用 ABI 4700 Proteomics Analyzer 质谱仪 (MALDI 离子源) 进行检测分析。激光强度设置为 3 200, 检测相对分子质量范围 m/z 700~4 000, 选用正离子反射模式进行质谱分析。质谱数据采用 MASCOT 分析软件进行分析。质谱检测结果显示: Vtp32 酶切后, 获得了多条多肽碎片, 这些碎片信息采用 Mascot 软件与 Swissport 数据库的理论数据比对, 揭示 Vtp32 蛋白与黄边胡蜂 *Vespa crabro* Linnaeus PLA1 为同一类



A-Sephadex G-75 凝胶分离结果 B-线性盐离子梯度洗脱结果
A-isolation of Vtp32 by Sephadex G-75 gel filtration
B-isolation of Vtp32 from the second peak in picture A by heparin affinity chromatography through linear NaCl gradient

图 1 黑尾胡蜂 Vtp32 的分离纯化

Fig. 1 Purification of Vtp32 from *V. tropica ducalis*

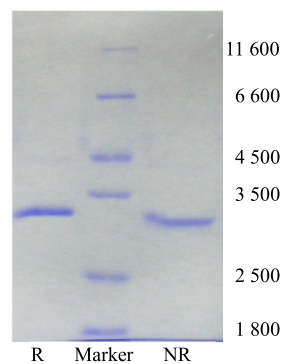


图 2 Vtp32 还原 (R) 及非还原 (NR) 条件下 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 2 SDS-PAGE profile of Vtp32 under reduced (R) and non-reduced (NR) conditions

蛋白 (表 1)。

2.3 蛋白质 N 端测序及序列比对分析

采用 Edman 降解的原理, 用岛津 PPSQ-31A 测序仪进行 N 端测序。获得的序列首先采用 NCBI 在线工具 Blast 进行同源性搜索。采用 Vector NTI 软件对胡蜂科不同物种间 PLA1 的 N 端序列相似性进行分析。除 Vtp32 外, 其他物种的 PLA1 蛋白的 N

表 1 Vtp32 肽指纹图谱实验数据与黄边胡蜂 PLA1 理论数据比对

Table 1 Comparison between Vtp32 peptide mass fingerprinting experimental data and *V. crabro* PLA1 theoretical data

序列起止位点	实验相对分子质量	理论相对分子质量	相对分子质量偏差	序列信息	备注
13~18	731.415 5	731.436 4	-0.020 9	MIVLTR	
108~118	1 177.634 4	1 177.670 7	-0.036 2	LVGNYIATVTK	
124~132	1 076.507 7	1 076.543 7	-0.035 9	YNVPMANIR	
124~132	1 092.502 1	1 092.538 6	-0.036 5	YNVPMANIR	Oxidation (M)
149~157	970.525 9	970.581 1	-0.055 3	KVQELGLGK	
150~157	842.476 7	842.486 2	-0.009 4	VQELGLGK	
280~290	1 212.557 5	1 212.602 7	-0.045 1	TGSFYVPVESK	
291~297	879.392 4	879.390 9	0.001 6	APYCNNK	Propionamide (C)

端序列参考 NCBI 蛋白数据库, 序列号如下: *V. crabro* Vesp c 1 (P0CH87); *V. affinis* ves.a1.01 (P0DMB4); *V. affinis* ves.a1.02 (P0DMB5); *V. velutina* VT-2a (P0DMB7); *V. velutina* VT-2b (P0DMB8); *V. magnifica* magnifin (P0CH87); *V. velutina* VT-1 (P0DMB6); *V. vulgaris* Ves v I (P49369); *V. maculifron* Ves m I (P51528); *V. germanica* Ves g 1 (Q3ZU95); *V. squamosal* Ves s 1 (P0CH86); *P. dominula* Pol d 1.04 (Q6Q249); *P. dominula* Pol d 1.03 (Q6Q250); *P. dominula* Pol d 1.02 (Q6Q251); *P. dominula* Pol d 1.01 (Q6Q252); *P. gallicus* Pol g 1 (P83542); *P. annularis* Pol a 1 (Q9U6W0); *P. paulista* Poly p 1 (A2VBC4); *D. maculata* Dol m 1.02 (P53357); *D. maculata* Dol m 1.01 (Q06478)。

经蛋白测序仪测定, 获得了 Vtp32 蛋白 N 末端 15 个氨基酸的序列信息。通过 NCBI Blastp 在线工具进行序列比对, 发现该蛋白 N 端与黄脚虎头蜂 *V. velutina* Lepeletier、黄腰胡蜂 *V. affinis* Linnaeus、黑腹虎头蜂 *V. basalis* Smith 等胡蜂的 PLA1 高度相似。采用 Vector NTI 对来源于胡蜂科的多个 PLA1 成熟蛋白 N 端的 15 个氨基酸进行序列比对, 发现 Vtp32 N 端序列与 *Vespa* 属来源的 PLA1 的 N 端序列具有高度一致性, 与同科来源的 *Vespula*、*Dolichovespula*、*Polybia*、*Polistes* 属 PLA1 的 N 端氨基酸序列的相似性很低 (图 3)。图中保守氨基酸残基以加粗字体标识, 相似性氨基酸残基以倾斜字体显示。

2.4 PLA1 活性的检测

肽指纹图谱和序列比对分析结果显示, Vtp32 蛋白与胡蜂属 PLA1 有高度的相似性, 因此检测了 Vtp32 的 PLA1 活性。方法参照 Invitrogen 说明书。

	1	17
Vtp32	(1)	--FNPCPYSDDTVKMIV
<i>V. affinis</i> ves.a1.01	(1)	--FNPCPYSDDTVKMI
<i>V. affinis</i> ves.a1.02	(1)	--FNPCPYSDDTVKMI
<i>V. velutina</i> VT-2a	(1)	--FNPCPYSDDTVKMI
<i>V. velutina</i> VT-2b	(1)	--FNPCPYSDDTVKMI
<i>V. crabro</i> Vesp c 1	(1)	--FNPCPYSDDTVKMIV
<i>V. magnifica</i> magnifin	(1)	GLIPKCKLVPEQISF--
<i>V. velutina</i> VT-1	(1)	GLLPKVKLVPEQISF--
<i>V. vulgaris</i> Ves v I	(1)	--GPKCPFNSDTSVSI
<i>V. maculifron</i> Ves m I	(1)	--GPKCPFNSDTSVSI
<i>V. germanica</i> Ves g 1	(1)	--GPKCPFNTDTSVSMI
<i>V. squamosal</i> Ves s 1	(1)	--GSKCPFSDDTVAMVI
<i>P. dominula</i> Pol d 1.04	(1)	GITPDCTFNEKDIEL--
<i>P. dominula</i> Pol d 1.03	(1)	GITPDCTFNEKDIEL--
<i>P. dominula</i> Pol d 1.02	(1)	GITPDCTFNEKDIEL--
<i>P. dominula</i> Pol d 1.01	(1)	GITPDCTFNEKDIEL--
<i>P. gallicus</i> Pol g 1	(1)	GITPDCTFNEKDIEL--
<i>P. annularis</i> Pol a 1	(1)	-MSPDCTFNEKD/VFY-
<i>P. paulista</i> Poly p 1	(1)	-LIPECPFNEYD/LFF-
<i>D. maculata</i> Dol m 1.02	(1)	GILPECKLVPEE/SF--
<i>D. maculata</i> Dol m 1.01	(1)	--FSVCPFNSDTVKMIF

图 3 Vtp32 与胡蜂科其他物种 PLA1 N 端序列比对图

Fig. 3 Comparison on N-terminal amino acid sequences of Vtp32 with that of other PLA1 from *Vespidae* family

10 μL 10 mmol/L DOPC (二油酸磷脂酰胆碱) 与 10 μL 10 mmol/L DOPG (二油酰磷脂酰甘油), 10 μL 1 mmol/L PLA1 底物 (PED-A1, 其 sn-1 位已被荧光标记) 混匀, 并缓慢加入 3 mL 1×PLA1 反应缓冲液中, 充分混匀后加入 96 孔板, 50 μL/孔。然后将 Vtp32 蛋白梯度稀释于 1×PLA1 反应缓冲液中, 获

得不同质量浓度的 Vtp32 蛋白溶液。将 50 μL 不同质量浓度的 Vtp32 蛋白溶液或阳性对照样本加入 50 μL 反应底物中,于荧光酶标仪中检测 sn-1 位断裂时释放的荧光。激发波长为 460 nm,检测波长为 515 nm。以 Invitrogen 试剂盒提供的 PLA1(5 U/mL)作为阳性对照。每个浓度的 Vtp32 均加入 3 个复孔,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行分析。

检测结果显示,随着反应时间的延长和 Vtp32 质量浓度的增加, PED-A1 底物 sn-1 位断裂释放的荧光信号也不断增强(图 4)。

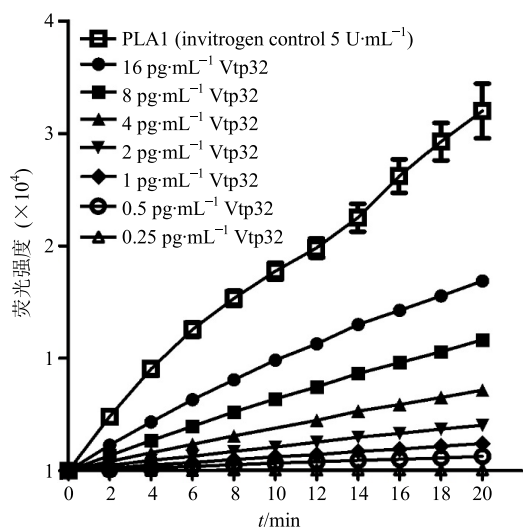


图 4 Vtp32 PLA1 活性的量-效关系

Fig. 4 Dose-dependent PLA1 activity response of Vtp32

2.5 Vtp32 溶血活性的检测

取抗凝处理的人红细胞,用 10 倍体积缓冲液 A (150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaH_2PO_4 , 4.2 mmol/L Na_2HPO_4 , 2.7 mmol/L KCl, pH 7.4) 洗涤,然后于 2 400 r/min 离心 5 min 沉淀红细胞。重复上述洗涤过程 3 次,直至上清中没有可见的红细胞为止。将洗好的红细胞用缓冲液 A 重悬(1%稀释)备用。溶血活性的检测参照 Fuly 等^[33]的方法,略有改动:采用蛋黄中的卵磷脂为底物,将蛋黄与等体积的缓冲液 A 充分混匀,15 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,取上清 50 μL 与不同质量浓度(质量浓度从小到大依次为 0、3.5、4.2、4.9、5.6、6.3、7.0 ng/mL)的 Vtp32 混合,并加入 CaCl_2 至终浓度 8 mmol/L(总体积 250 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min,然后加入 50 μL EDTA 终止反应。取 10 μL 反应液,加入 1 mL 缓冲液 A 稀释的红细胞中(1%稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min,然后 2 400 r/min 离心,于 540 nm 检测吸光度。以终浓度 0.05% 的 Triton X-100 作为阳性对照,其溶

血后在 540 nm 的吸光度值定义为 100%。每个质量浓度的样本均设置 3 个平行实验,检测结果采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式进行分析。检测结果显示,随着 Vtp32 质量浓度的增加,蛋黄温育产生的溶血性磷脂增加,溶血活性逐渐增强(图 5)。

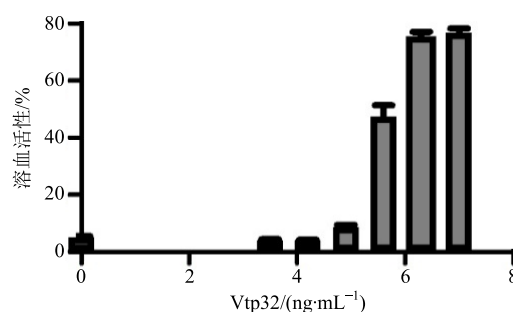


图 5 Vtp32 卵磷脂水解产物溶血活性

Fig. 5 Hemolytic activity of lecithin lysis product treated by Vtp32

2.6 Vtp32 对血浆复钙时间的影响

复钙时间即血浆再钙化时间,是在去掉钙的抗凝血浆中重新加入钙,使内源性凝血过程重现需要的时间。因此,Vtp32 对复钙时间的影响,可反映 Vtp32 对内源性凝血的影响。具体检测方法参照 Han 等^[34]的方法,略有改动。将人血浆与 0.9% NaCl 溶液等体积稀释。取 200 μL 稀释的血浆与 20 μL 不同质量浓度的 Vtp32 混合,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 20 min,然后加入 70 μL 25 mmol/L CaCl_2 ,继续于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育,检测血浆凝固的时间。每个质量浓度均设置 3 个平行实验,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验结果发现,当不加入 Vtp32 与血浆共温育,正常血浆在 CaCl_2 的激活下,162 s 即发生凝固;而加入 Vtp32 的血浆,在同等剂量 CaCl_2 的激活下,复钙时间显著延长,并且复钙时间延长的程度与 Vtp32 质量浓度呈正相关关系(图 6)。因此,Vtp32 具有抗凝活性。

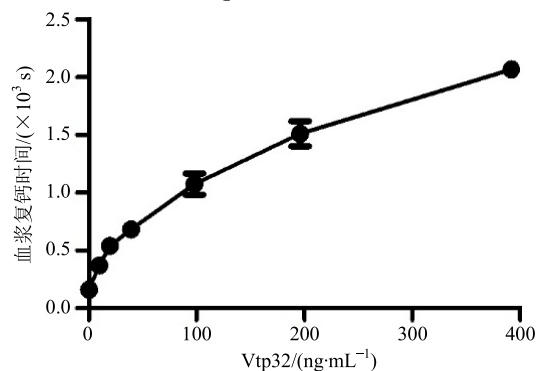


图 6 Vtp32 对血浆复钙时间的影响

Fig. 6 Effect of Vtp32 on plasma recalcification time

3 讨论

PLA1 是胡蜂致敏原的主要成分之一。全世界有记录的 *Veapidea* 科物种大约有 5 000 余种, 其中胡蜂亚科有 71 种^[11]。仅从文献中发现了胡蜂亚科的 6 个物种 PLA1 得到了分离纯化, 分属于 3 个属。Rungsa 等^[28]通过蛋白质组学的策略采用双向电泳对 *Vespa tropica* 蛋白组分进行了分析, 从双向电泳的胶点上鉴定到其蜂毒中含有白斑脸黄胡蜂 *Dolichovespula maculata* Linnaeus 磷脂酶的类似物, 但是没有获得纯化的磷脂酶蛋白, 也并没有对该磷脂酶进行磷脂底物降解脂位点的进一步确认及活性研究。本实验中, 通过 Sephadex G-75 分子筛和 Heparin 亲和柱两步分离纯化, 从黑尾胡蜂蜂毒中获得了纯化的 PLA1, 该酶特异性降解磷脂底物 sn-1 位亦经 PLA1 检测试剂盒确认。这是迄今为止, 第一次对黑尾胡蜂磷脂酶 A1 分离纯化的报道。这种胡蜂 PLA1 的分离方法, 也可以为其他胡蜂 PLA1 的分离纯化提供参考。

胡蜂 PLA1 具有多种生物学活性, 除致敏作用外^[17-18,35-39], 已经报道的生物活性还包括诱导血小板聚集^[14]、诱导动脉血管血栓^[14]、溶解红细胞^[17,22-23,40]、导致发炎水肿^[20,24]、致死^[22-23]等。本实验中, 也对黑尾胡蜂 PLA1 对血液系统的影响进行了研究。黑尾胡蜂 PLA1 可以水解卵磷脂, 产生溶血性卵磷脂, 导致红细胞的裂解从而产生溶血现象, 这与已有的关于磷脂酶 A 活性的报道一致。在研究中还发现, Vtp32 处理的血浆, 随着 Vtp32 质量浓度的增加, 复钙时间不断延长。这表明黑尾胡蜂 PLA1 具有抗凝活性。这是迄今为止, 关于胡蜂 PLA1 抗凝活性的首次报道。PLA1 抗凝的机制尚未解析, 但 PLA2 的抗凝作用已经在许多的物种中被发现和研究。如在蜜蜂 *Apis mellifera* Linnaeus 的蜂毒中, 就发现了具有抗凝活性的 PLA2^[41]。在蛇毒中, 抗凝 PLA2 更是广泛存在, 如眼镜蛇 *Naja naja* Linnaeus^[42]、圆斑蝥 *Daboia russelii russelii* Shaw^[43-45]、黑颈喷毒眼镜蛇 *Naja nigricollis* Anderson^[46-47]、东部沙蝥蛇 *Vipera ammodytes ammodytes* Linnaeus^[48]、欧洲长鼻蝥蛇 *Vipera ammodytes ammodytes* Linnaeus^[49]、南美响尾蛇 *Crotalus durissus terrificus* Laurenti^[50]、三色矛头蝥 *Bothrops asper* Garman^[50]、菜花烙铁头 *Trimeresurus jerdonii* Guenther^[51]等。蛇毒 PLA2 主要通过 3 种不同的机制实现其抗凝活性: (1) 水解血浆中的促凝

血的磷脂, 从而破坏内源性或外源性因子 X 酶复合物 *tenase complex* 的形成^[42-44,47-48]; (2) 与凝血系统中的多种凝血因子相互作用从而抗凝。如黑颈喷毒眼镜蛇 *Naja nigricollis* Anderson 来源的 CM-IV^[46], 东部沙蝥蛇 *Vipera ammodytes ammodytes* Linnaeus 来源的 ammodytoxin A^[49], 南美响尾蛇 *Crotalus durissus terrificus* Laurenti 来源的 CBc 和三色矛头蝥 *Bothrops asper* Garman 来源的 MtxII^[50]可与凝血酶原复合物中的 FXa 结合, 从而阻碍凝血酶的形成; 圆斑蝥 *Daboia russelii russelii* Shaw 来源的 daboxin P 可与 Fx 和 Fxa 结合^[45]; 眼镜蛇 *Naja naja* Linnaeus 来源的 Nn-PLA2^[42]可直接与凝血酶结合, 从而抑制凝血。(3) 抑制血小板聚集。如菜花烙铁头 *jerdoxin* 抑制 ADP 诱导的血小板聚集^[51]。黑尾胡蜂 PLA1 是否通过类似的机制影响凝血有待进一步研究。

参考文献

- [1] Aoki J, Inoue A, Makide K, *et al.* Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family [J]. *Biochimie*, 2007, 89(2): 197-204.
- [1] Kohler G A, Brenot A, Haas-Stapleton E, *et al.* Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1761(11): 1391-1399.
- [2] Djordjevic J T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development-lessons from *Cryptococcus neoformans* [J]. *Front Microbiol*, 2010, doi: 10.3389/fmicb.2010.00125
- [3] Richmond G S, Smith T K. Phospholipases A (1) [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(1): 588-612.
- [4] Flores-Diaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, *et al.* Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 597-628.
- [5] Muller U R. Hymenoptera venom proteins and peptides for diagnosis and treatment of venom allergic patients [J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2011, 10(5): 420-428.
- [6] de Paula R C, Castro H C, Rodrigues C R, *et al.* Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms [J]. *Protein Pept Lett*, 2009, 16(8): 899-907.
- [7] Nakamura Y, Fukami K. Regulation and physiological functions of mammalian phospholipase C [J]. *J Biochem*, 2017, 161(4): 315-321.
- [8] Nelson R K, Frohman M A. Physiological and pathophysiological roles for phospholipase D [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(12): 2229-2237.

- [9] Leslie C C. Cytosolic phospholipase A (2): physiological function and role in disease [J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(8): 1386-1402.
- [10] 谭江丽, van Achterberg C, 陈学新. 致命的胡蜂: 中国胡蜂亚科 [M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [11] King T P, Kochoumian L, Joslyn A. Wasp venom proteins: Phospholipase A1 and B [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1984, 230(1): 1-12.
- [12] Zhang Y. Why do we study animal toxins? [J] *Zoolog Res*, 2015, 36(4): 183-222.
- [13] Yang H, Xu X, Ma D, *et al.* A phospholipase A1 platelet activator from the wasp venom of *Vespa magnifica* (Smith) [J]. *Toxicon*, 2008, 51(2): 289-296.
- [14] Sukprasert S, Rungsa P, Uawonggul N, *et al.* Purification and structural characterisation of phospholipase A1 (Vesapase, Ves a 1) from Thai banded tiger wasp (*Vespa affinis*) venom [J]. *Toxicon*, 2013, 61: 151-164.
- [15] Soldatova L, Kochoumian L, King T P. Sequence similarity of a hornet (*D. maculata*) venom allergen phospholipase A1 with mammalian lipases [J]. *FEBS Lett*, 1993, 320(2): 145-149.
- [16] Santos L D, Santos K S, de Souza B M, *et al.* Purification, sequencing and structural characterization of the phospholipase A1 from the venom of the social wasp *Polybia paulista* (Hymenoptera, Vespidae) [J]. *Toxicon*, 2007, 50(7): 923-937.
- [17] Perez-Riverol A, Pereira F D C, Lasa A M, *et al.* Molecular cloning, expression and IgE-immunore activity of phospholipase A1, a major allergen from *Polybia paulista* (Hymenoptera: Vespidae) venom [J]. *Toxicon*, 2016, 124: 44-52.
- [18] Moawad T I, Hoffman D R, Zalat S. Isolation, cloning and characterization of *Polistes dominulus* venom phospholipase A1 and its isoforms [J]. *Acta Biol Hung*, 2005, 56(3/4): 261-274.
- [19] King T P, Jim S Y, Wittkowski K M. Inflammatory role of two venom components of yellow jackets (*Vespula vulgaris*): A mast cell degranulating peptide mastoparan and phospholipase A1 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003, 131(1): 25-32.
- [20] Hou M H, Chuang C Y, Ko T P, *et al.* Crystal structure of vespid phospholipase A (1) reveals insights into the mechanism for cause of membrane dysfunction [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2016, 68: 79-88.
- [21] Ho C L, Lin Y L, Li S F. Three toxins with phospholipase activity isolated from the yellow-legged hornet (*Vespa verutina*) venom [J]. *Toxicon*, 1999, 37(7): 1015-1024.
- [22] Ho C L, Ko J L. Purification and characterization of a lethal protein with phospholipase A1 activity from the hornet (*Vespa basalis*) venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 963(3): 414-422.
- [23] Ho C L, Hwang L L, Chen C T. Edema-inducing activity of a lethal protein with phospholipase A1 activity isolated from the black-bellied hornet (*Vespa basalis*) venom [J]. *Toxicon*, 1993, 31(5): 605-613.
- [24] Chou C C, Hou M H. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of phospholipase A1 isolated from hornet (*Vespa basalis*) venom [J]. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2008, 64(Pt 12): 1118-1120.
- [25] Barss P. Renal failure and death after multiple stings in Papua New Guinea. Ecology, prevention and management of attacks by vespids wasps [J]. *Med J Aust*, 1989, 151(11/12): 659-663.
- [26] Witharana E W, Wijesinghe S K, Pradeepa K S, *et al.* A characteristic cutaneous lesion over the sting site of the wasp, *Vespa tropica* [J]. *Ceylon Med J*, 2014, 59(1): 24-25.
- [27] Witharana E W, Wijesinghe S K, Pradeepa K S, *et al.* Bee and wasp stings in Deniyaya; a series of 322 cases [J]. *Ceylon Med J*, 2015, 60(1): 5-9.
- [28] Rungsa P, Incamnoi P, Sukprasert S, *et al.* Comparative proteomic analysis of two wasps venom, *Vespa tropica* and *Vespa affinis* [J]. *Toxicon*, 2016, 119: 159-167.
- [29] Gawade S P. The effect of venom from the Indian tropical wasp *Vespa tropica* on nerve-muscle preparations from *Drosophila larvae* [J]. *Toxicon*, 1983, 21(6): 882-886.
- [30] Rungsa P, Incamnoi P, Sukprasert S, *et al.* Cloning, structural modelling and characterization of VesT2s, a wasp venom hyaluronidase (HAase) from *Vespa tropica* [J]. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 2016, doi: 10.1186/s40409-016-0084-5
- [31] Schmidt J O, Yamane S, Matsuura M, *et al.* Hornet venoms: Lethalities and lethal capacities [J]. *Toxicon*, 1986, 24(9): 950-954.
- [32] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [33] Fuly A L, de Miranda A L, Zingali R B, *et al.* Purification and characterization of a phospholipase A2 isoenzyme isolated from *Lachesis muta* snake venom [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(9): 1589-1597.
- [34] Han J, You D, Xu X, *et al.* An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica* [J]. *Toxicon*, 2008, 51(5): 914-922.
- [35] Seismann H, Blank S, Cifuentes L, *et al.* Recombinant

- phospholipase A1 (Ves v 1) from yellow jacket venom for improved diagnosis of hymenoptera venom hypersensitivity [J]. *Clin Mol Allergy*, 2010, doi: 10.1186/1476-7961-8-7.
- [36] Galindo-Bonilla P A, Galan-Nieto A, Alfaya-Arias T, *et al.* Component-resolved diagnosis in vespid venom-allergic individuals [J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2015, 43(4): 398-402.
- [37] dos Santos L D, da Silva Menegasso A R, dos Santos Pinto J R, *et al.* Proteomic characterization of the multiple forms of the PLAs from the venom of the social wasp *Polybia paulista* [J]. *Proteomics*, 2011, 11(8): 1403-1412.
- [38] Borodina I, Jensen B M, Wagner T, *et al.* Expression of enzymatically inactive wasp venom phospholipase A1 in *Pichia pastoris* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21267.
- [39] Binder M, Fierlbeck G, King T, *et al.* Individual hymenoptera venom compounds induce upregulation of the basophil activation marker ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (CD203c) in sensitized patients [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 129(2): 160-168.
- [40] de Oliveira M R, Palma M S. Polybitoxins: A group of phospholipases A2 from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia paulista*) [J]. *Toxicon*, 1998, 36(1): 189-199.
- [41] Zolfagharian H, Mohajeri M, and Babaie M. Honey bee venom (*Apis mellifera*) contains anticoagulation factors and increases the blood-clotting time [J]. *J Pharmacopuncture*, 2015, 18(4): 7-11.
- [42] Dutta S, Gogoi D, Mukherjee A K. Anticoagulant mechanism and platelet deaggregation property of a non-cytotoxic, acidic phospholipase A2 purified from Indian cobra (*Naja naja*) venom: Inhibition of anticoagulant activity by low molecular weight heparin [J]. *Biochimie*, 2015, 110: 93-106.
- [43] Mukherjee A K. A major phospholipase A2 from *Daboia russelii russelii* venom shows potent anticoagulant action via thrombin inhibition and binding with plasma phospholipids [J]. *Biochimie*, 2014, 99: 153-161.
- [44] Saikia D, Majumdar S, Mukherjee A K. Mechanism of *in vivo* anticoagulant and haemolytic activity by a neutral phospholipase A (2) purified from *Daboia russelii russelii* venom: Correlation with clinical manifestations in Russell's viper envenomed patients [J]. *Toxicon*, 2013, 76: 291-300.
- [45] Sharma M, Iyer J K, Shih N, *et al.* Daboxin P, a major phospholipase A2 enzyme from the Indian *daboia russelii russelii* Venom targets factor X and factor Xa for its anticoagulant activity [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153770.
- [46] Stefansson S, Kini R M, Evans H J. The basic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(33): 7742-7746.
- [47] Kini R M, Evans H J. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom [J]. *Toxicon*, 1995, 33(12): 1585-1590.
- [48] Atanasov V N, Danchev D, Mitewa M, *et al.* Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components——basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2009, 74(3): 276-280.
- [49] Prijatelj P, Charnay M, Ivanovski G, *et al.* The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A2 from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect [J]. *Biochimie*, 2006, 88(1): 69-76.
- [50] Faure G, Gowda V T, Maroun R C. Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on *Viperidae* snake venom phospholipases A2 by affinity binding studies and molecular bioinformatics [J]. *BMC Struct Biol*, 2007, doi: 10.1186/1472-6807-7-82
- [51] Lu Q M, Jin Y, Wei J F, *et al.* Characterization and cloning of a novel phospholipase A (2) from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake [J]. *Toxicon*, 2002, 40(9): 1313-1319.