



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของโปรตีนจากต้น *Aloe barbadensis* Mill ต่อไฟบริโนเจนและ
ก้อนไฟบรินของมนุษย์

(Determination the effect of protein from *Aloe barbadensis* Mill on
human fibrinogen and fibrin clot)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของโปรตีนจากต้น *Aloe barbadensis* Mill ต่อไฟบริโนเจน
และก้อนไฟบรินของมนุษย์
(Determination the effect of protein from *Aloe barbadensis* Mill on
human fibrinogen and fibrin clot)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เทคนิคการแพทย์หญิง ดร. จารุวรรณ ศิริเทพทวี

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2556

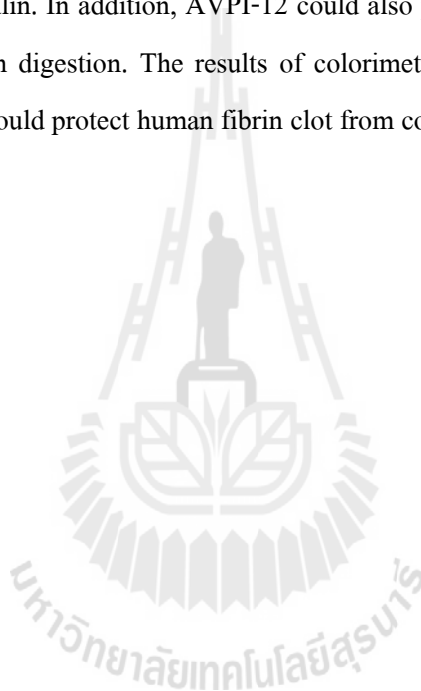
บทคัดย่อ

โปรตีนที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสขนาด 11,804.931 Da48 สามารถแยกและทำให้บริสุทธิ์จากส่วนของใบของต้น *Aloe barbadensis* Mill (*Aloe vera*) ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน ดังนั้นจึงเรียกโปรตีนชนิดนี้ว่า AVPI-12 โปรตีนมีค่าของจุดไอโซอิเล็กทริกประมาณ 7.43 และมีลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal คือ R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนที่ไม่มีความเหมือนกับกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสอื่น ๆ ใน databases ดังนั้นโปรตีน AVPI-12 จึงเป็นโปรตีนยับยั้งชนิดใหม่ โปรตีน AVPI-12 มีความทนทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มเซอรินโปรติเอสจากมนุษย์ คือ พลาสมิน และจากวัว คือ ทริปซิน AVPI-12 สามารถป้องกัน γ -subunit ของไฟบริโนเจนของมนุษย์จากการย่อยด้วยพลาสมินและทริปซิน ซึ่งคุณสมบัตินี้มีความคล้ายคลึงกับการทำงานของ α_2 -macroglobulin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งโปรติเอสที่สามารถพบได้ในพลาสมาของมนุษย์ นอกจากนี้ AVPI-12 ยังสามารถป้องกัน γ -subunit ของไฟบริโนเจนจากการย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มซิสเทอีนโปรติเอส คือ ปาเปน ผลการทดลองการศึกษาการยับยั้งการย่อยไฟบรินของมนุษย์ด้วยวิธี colorimetric และ small-angle X-ray scattering แสดงให้เห็นว่า AVPI-12 สามารถป้องกันไม่ให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ของก้อนไฟบรินจากพลาสมิน



Abstract

A protease inhibitor protein with the molecular mass of 11,804.931 Da was isolated and purified from *Aloe barbadensis* Mill (*Aloe vera*) leaf gel by ion exchange chromatography. Therefore, this protein was designated as AVPI-12. The isoelectric point of the protein was about 7.43. The first ten amino acid sequence from the N-terminal was R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y, which did not match with other protease inhibitors in database searches, indicating AVPI-12 is a novel protease inhibitor. AVPI-12 strongly resisted digestion by the serine proteases human plasmin and bovine trypsin. AVPI-12 could protect the γ -subunit of human fibrinogen from plasmin and trypsin digestion, similar to the human plasma serine protease inhibitor α_2 -macroglobulin. In addition, AVPI-12 could also protect the γ -subunit of fibrinogen from the cysteine protease papain digestion. The results of colorimetric method and small-angle X-ray scattering showed that AVPI-12 could protect human fibrin clot from complete degradation by plasmin.



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
กรอบแนวคิดของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
ข้อมูลทั่วไปของว่านหางจระเข้.....	4
ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของว่านหางจระเข้.....	5
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง	6
บทที่ 4 วิเคราะห์ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก	23
ประวัติผู้วิจัย	37

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจาก N-terminal ของโปรตีน AVPI-12 กับ Proteases inhibitors จากพืชชนิดต่าง ๆ.....	19



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะใบและดอกของว่านหางจระเข้.....	4
รูปที่ 2 Chromatogram ของการทำ AVPI-12 ให้บริสุทธิ์ด้วย cation exchange column chromatography ชนิด SP sepharose.....	7
รูปที่ 3 SDS-PAGE (12.5%) แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีน AVPI-12.....	8
รูปที่ 4 Intact mass ของ AVPI-12 วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOR mass spectrometry.....	9
รูปที่ 5 ผล 2D electrophoresis ของโปรตีน AVPI-12 ที่ทำให้บริสุทธิ์.....	10
รูปที่ 6 ความคงทนต่อการถูกย่อยด้วย proteases ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin.....	11
รูปที่ 7 Human fibrinogenolytic inhibitory patterns ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin.....	12
รูปที่ 8 Fibrinogenolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 แบบ dose dependence ต่อ human plasmin.....	13
รูปที่ 9 ผลของ AVPI-12 ต่อ fibrinolytic activity ของ human plasmin.....	15
รูปที่ 10 SAXS spectra แสดง fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 ต่อ human plasmin.....	16

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาของการวิจัย

ว่านหางจระเข้ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Aloe barbadensis* Mill มีชื่อพ้องคือ *Aloe vera* จัดเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือวุ้นหรือเจลจากใบ มีรายงานข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ว่าวุ้นในว่านหางจระเข้มีสารเคมีหลายชนิด เช่น aloe-emodin, aloesin และ aloin ยางที่อยู่ในใบว่านหางจระเข้มีสารจำพวก anthraquinone ที่ออกฤทธิ์ช่วยในการขับถ่าย การทดลองทางคลินิกพบว่าน้ำจากว่านหางจระเข้สามารถรักษาแผลไฟไหม้ในหนูขาว กระต่าย และคน และเมื่อมีการทดลองฉีดสารสกัดจากใบว่านหางจระเข้ในคน พบว่าสามารถลดการอักเสบของโรคเหงือกในระยะแรกและระยะที่สองได้ นอกจากนี้ว่านหางจระเข้ยังได้พัฒนาขึ้นเป็นตำรับยาที่สามารถนำมาใช้ทางคลินิกได้ เช่น รักษาแผลอักเสบจากรังสีบำบัด แผลไฟไหม้ และ โรคกลากเป็นต้น จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงว่าวุ้นจากว่านหางจระเข้สามารถพัฒนาได้เป็นทั้งยาทา ยากินและ ยาฉีดได้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์ทดลองและคน

เนื่องการศึกษาถึงการทำงานและประโยชน์ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ยังมีผู้ศึกษาอยู่น้อยมาก มีเพียงไม่กี่รายงาน เช่น Das และคณะ (2011) พบว่าโปรตีนขนาด 14 kDa ของวุ้นจากว่านหางจระเข้คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและต้านการอักเสบได้ และโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น protease inhibitor โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ trypsin จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าโปรตีนจากว่านหางจระเข้ยังมีอีกมากซึ่งหากได้มีการแยกและทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางเภสัชวิทยาจะสามารถนำมาเป็นข้อมูลเพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม หรืองานวิจัยต่อยอดได้ การวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้สกัดแยกโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 12 kDa ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น protease inhibitor ที่สามารถยับยั้งการย่อย fibrinogen และ ก้อน fibrin (fibrin clot) ของเลือดมนุษย์จากเอนไซม์ต่าง ๆ ได้ ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นตัวยับยั้ง fibrinogenolytic และ fibrinolytic ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่พบได้ในพลาสมาของมนุษย์ เช่น plasmin สามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาป้องกันและรักษาโรคที่มีภาวะเลือดออกง่ายได้ และการนำว่านหางจระเข้มาพัฒนาใช้ประโยชน์ในประเทศไทยมีความเป็นไปได้อย่างยิ่งเนื่องจากว่านหางจระเข้สามารถปลูกได้ในทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

12.1 เพื่อแยกโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ fibrinogen และ fibrin clot ของมนุษย์จากโปรตีนส่วนหยาบของวุ้นว่านหางจระเข้

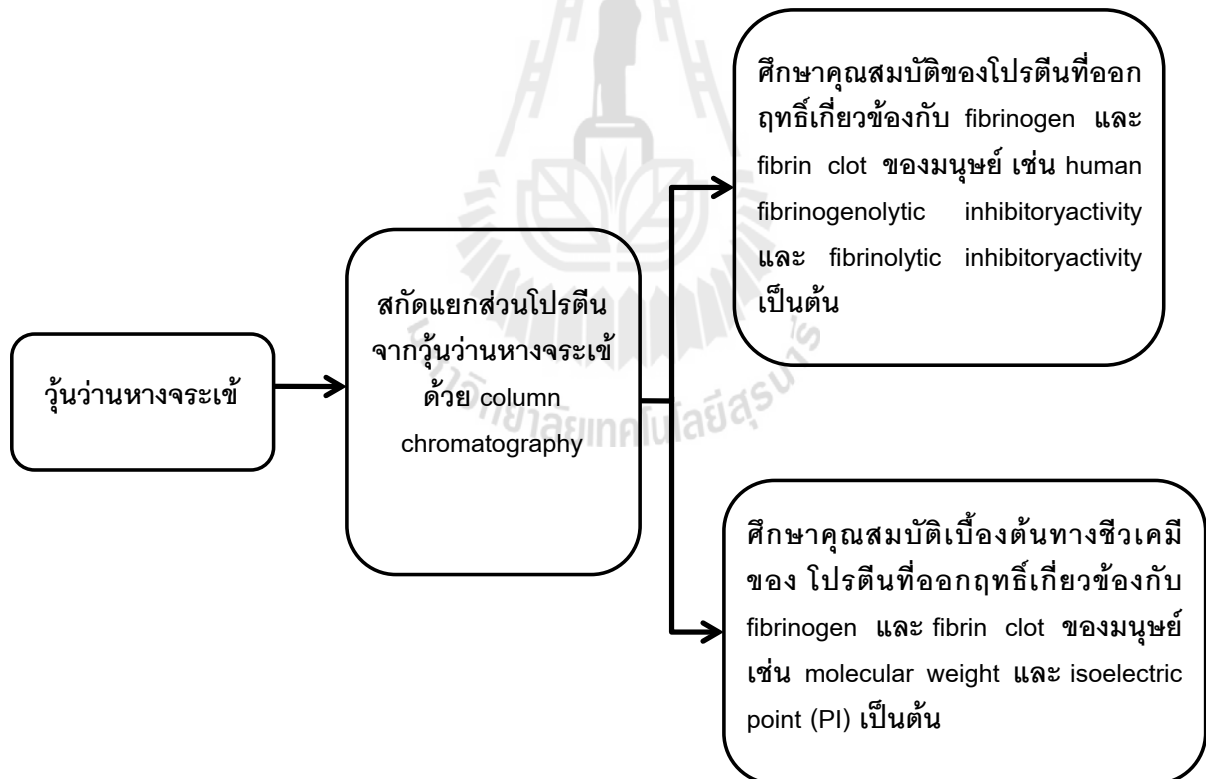
12.2 เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ของโปรตีนดังกล่าวในส่วนที่เกี่ยวข้องกับ fibrinogen และ fibrin clot ของมนุษย์ คือ fibrinogenolytic inhibitory activity และ fibrinolytic inhibitory activity

12.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ต่อ fibrinogen และ fibrin clot ของมนุษย์ เช่น protease inhibitor assay, molecular weight และ isoelectric point เป็นต้น

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ประกอบด้วย การแยกโปรตีนที่มีคุณสมบัติเกี่ยวข้องกับ fibrinogen และ fibrin clot ของมนุษย์ จาก โปรตีนส่วนหยาบของวัวผ่านทางกระเช้ด้วยการทำ purification column chromatography และนำแต่ละส่วนของโปรตีนที่แยกได้ศึกษาการออกฤทธิ์ต่อ fibrinogen และ fibrin clot ของมนุษย์ โดยการศึกษ human fibrinogenolytic inhibitory activity, fibrinolytic inhibitory activity และนำส่วนของโปรตีนที่ออกฤทธิ์ดังกล่าวมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น molecular weight, isoelectric point (PI) และ antioxidant เป็นต้น

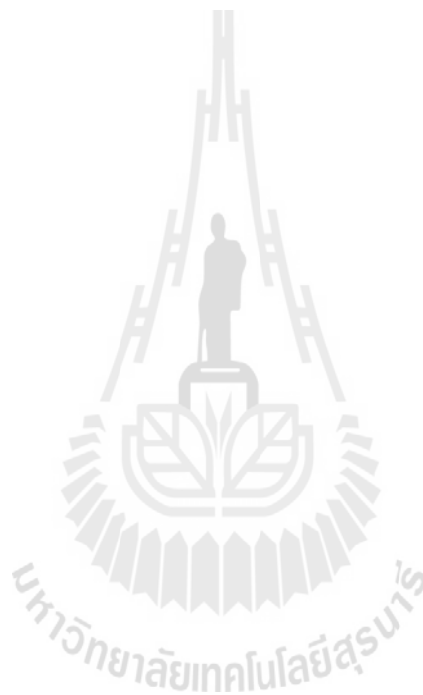
1.4 กรอบแนวคิดของการวิจัย



1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.5.1 เป็นข้อมูลสำหรับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและใช้ในการวิจัยต่อไปในอนาคตได้ เช่น การนำสารสกัดโปรตีนจากว่านหางจระเข้มาใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคที่เกิดภาวะที่เลือดออกง่ายหรือเลือดออกไม่หยุด หรือใช้เป็นต้นแบบในการออกแบบผลิตภัณฑ์ยารักษาสำหรับ antifibrinolytic treatment

11.2 ผลงานที่ได้สามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ หรือนำเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ



บทที่ 2

เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของว่านหางจระเข้ (ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Aloe barbadensis* Mill.

ชื่อพ้อง: *Aloe vera*

ชื่อสามัญ: Star cactus, Aloe, Aloin, Jafferabad, Barbados

วงศ์: Asphodelaceae / Liliaceae

ชื่ออื่น: หางตะเข้ (ภาคกลาง) ว่านไฟไหม้ (ภาคเหนือ)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์: ไม้ล้มลุก ลำต้นเป็นข้อปล้องสั้น ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกเรียงเวียนรอบต้น ใบหนาและยาว โคนใบใหญ่ ส่วนปลายใบแหลม ขอบใบเป็นหนามแหลมห่างกัน แผ่นใบหนาสีเขียว มีจุดขาวสีเขียวอ่อน อวบน้ำ ข้างในเป็นวุ้นใสสีเขียวอ่อน ดอก ออกเป็นช่อกระจุกที่ปลายยอด ก้านช่อดอกยาว ดอกสีแดงอมเหลือง (ดังรูปที่ 1)

ส่วนที่ใช้: ขางในใบ น้ำวุ้น เนื้อวุ้น และเหง้า



รูปที่ 1 แสดงลักษณะใบและดอกของว่านหางจระเข้

(จาก <http://gustavothomasflowers.blogspot.com/2009/05/aloe-vera-flower-at-de-young-museum-san.html>)

9.2 ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของว่านหางจระเข้

นันทวัน และคณะ (2529) ได้ทดลองใช้ว่านหางจระเข้ในการรักษาแผลไฟไหม้ และแผลเรื้อรังจำนวน 16 รายพบว่าได้ผลดีทั้งที่ใช้ว่านสดและยาเตรียม (ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน)

โอภา วัชรคุปต์ และคณะ (2529) ได้ทำการพัฒนาต้นตำหรับว่านหางจระเข้ และทดลองทางคลินิก พบว่า ผลิตภัณฑ์ว่านหางจระเข้ในรูปเจลครีม และขี้ผึ้งสามารถรักษาโรคผิวหนังในผู้ป่วยที่มีอาการของ pityriasis, โรคกลาก และแผลอักเสบจากรังสีบำบัด (ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน)

มีการทดลองนิตสารสกัดจากใบว่านหางจระเข้ในคนไข้ 50 คน ซึ่งเป็นโรคเหงือกอักเสบระยะแรกและระยะที่สอง พบว่า ได้ผลลดการอักเสบ แต่ถ้าเป็นระยะที่ 3 จะไม่ได้ผล (ยาสมุนไพรสำหรับงานสาธารณสุขมูลฐาน)

โมเลกุลของน้ำตาล (polysaccharide) ในว่านหางจระเข้มีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นยารักษาได้ โดยเป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulation), ออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effects), การรักษาแผล (wound healing), กระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมของเซลล์ร่างกายหลังที่มีการรักษาโดยการฉายรังสี (promotion of radiation damage repair), ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacterial), ยับยั้งเชื้อไวรัส (anti-viral), ยับยั้งเชื้อรา (anti-fungal), ยาป้องกันหรือบรรเทาอาการโรคเบาหวาน (anti-diabetic), ยับยั้งเซลล์มะเร็ง (anti-neoplastic activities), กระตุ้นการสร้างเม็ดเลือด (stimulation of hematopoiesis) รวมทั้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant effects) (Hamman, 2008)

นอกจากนี้ยังได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดโปรตีนจากว่านหางจระเข้เพื่อหาคุณสมบัติทางชีวภาพ ดังนี้ ในปี 1980 นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Suzuki สามารถสกัด glycoprotein มีชื่อว่า aloctin A จากใบของว่านหางจระเข้ และได้จดสิทธิบัตรไว้ที่ European Patent Application โดยโปรตีนดังกล่าวมีคุณสมบัติ mitogenic activity และสามารถกระตุ้นระบบ complement ใน serum ของมนุษย์ (จาก United States Patent) และในปี 2011 Das และคณะสามารถแยกโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 14 kDa จากว่านของว่านหางจระเข้และพบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้โดยยับยั้งเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX)

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัยและผลการทดลอง

3.1 น้ำยาและสารเคมี

3.1.1 Bicinichonic acid (BCA) assay kit (Pierce, Rockford, USA)

3.1.2 IEF pH gradient strip 7.3 cm. pH 3-10 (GE Healthcare, Sweden)

3.1.3 น้ำยาและสารเคมีอื่น ๆ ใช้ของบริษัทต่าง ๆ คือ Sigma (USA), Fluka (USA), GE Healthcare (Sweden), Carlo Erba (Italy), Merck (Germany)

3.2 ฐานฐานทางจรเข้

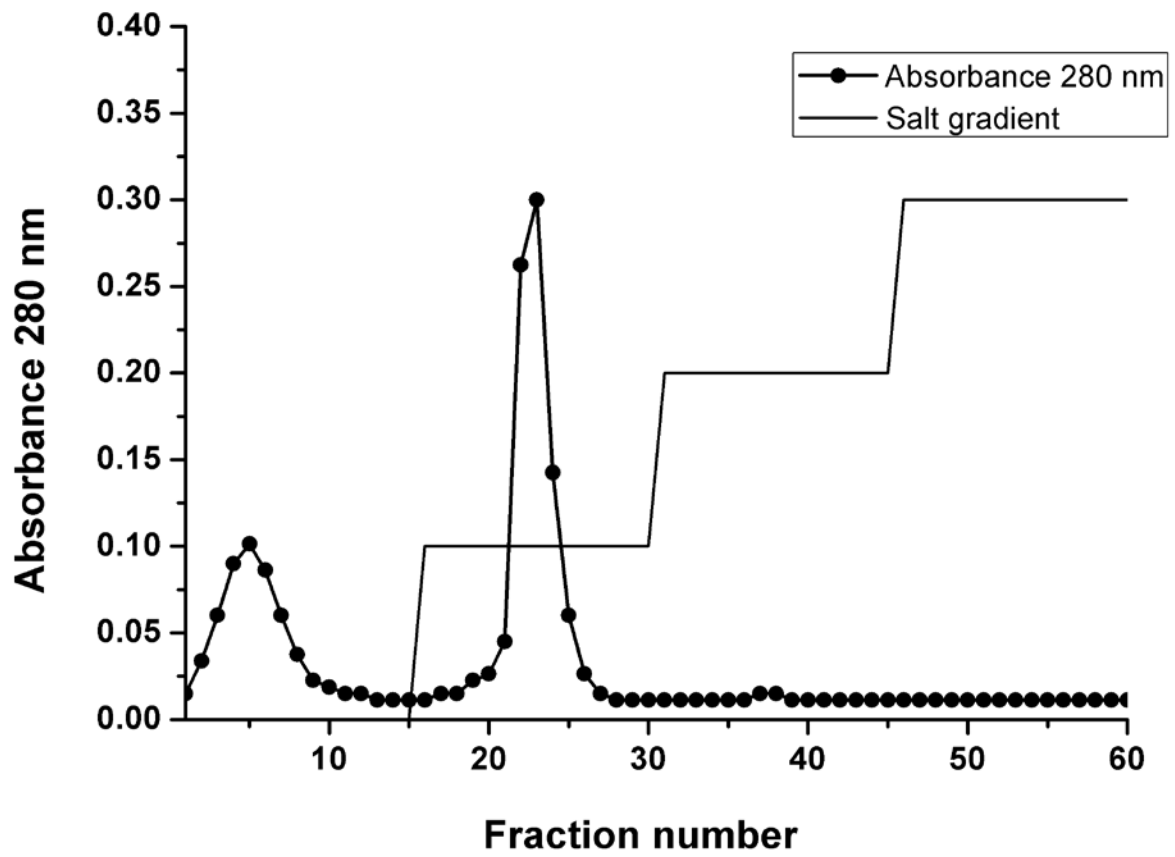
ฐานฐานทางจรเข้ได้จากใบของพืชที่ปลูกในเขตอำเภอเมือง จ.นครราชสีมา

3.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

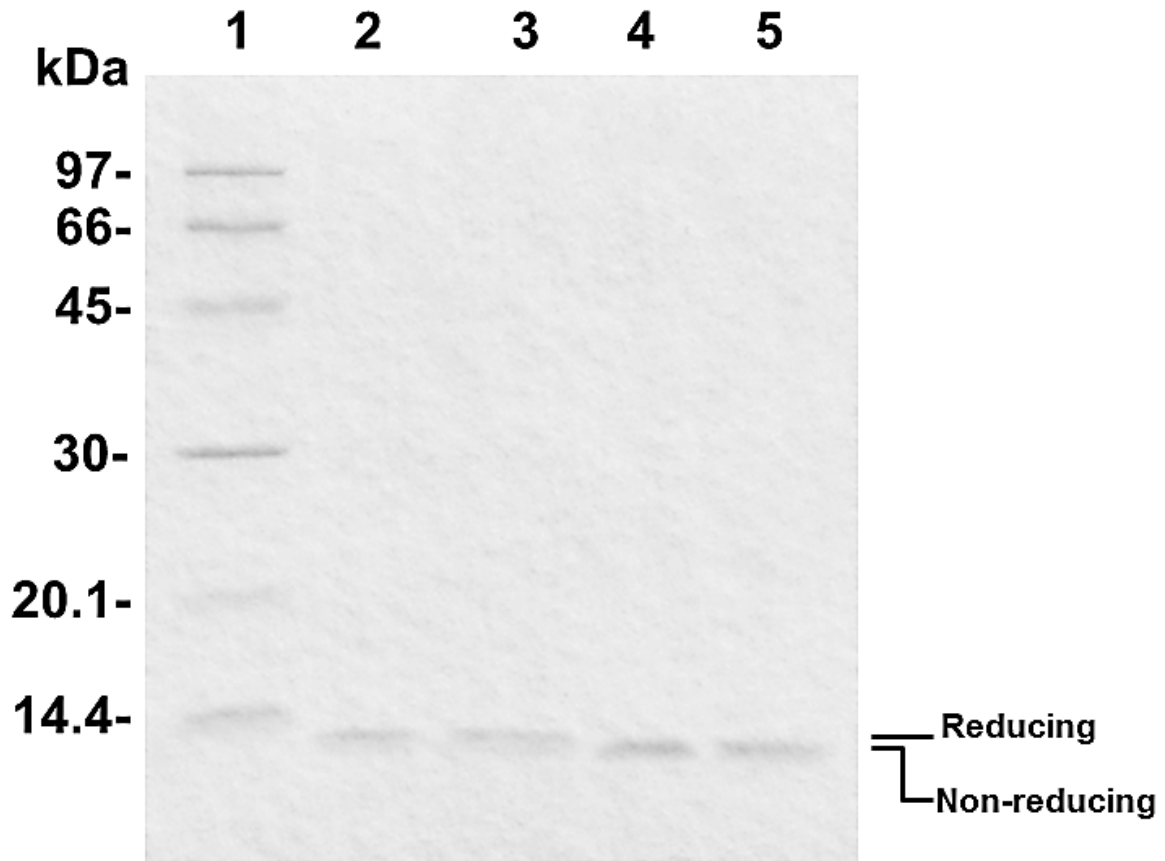
นำฐานที่ได้จากส่วนใบมาคั้นเอาน้ำ และกรองด้วยผ้าขาว ปั่นด้วย centrifuge (13,000xg) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ นำส่วนน้ำที่ได้มา dialysis ด้วย 25 mM sodium acetate buffer (NaOAc) pH 4.5 แล้วนำไปปั่นด้วย high speed centrifuge จะได้ส่วนตะกอนแยกออกจากส่วนน้ำใส นำส่วนใสไปทำให้บริสุทธิ์ (purify) ด้วย cation exchange chromatography (SP sepharose) โดยใช้ step gradient salt elution ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0-0.3 M NaCl ใน 25 mM sodium acetate buffer (NaOAc) pH 4.5 ด้วย flow rate 1 ml/min เก็บ fraction ละ 2 ml ติดตาม peak ของโปรตีนโดยวัดค่า OD ที่ 280 nm พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์เป็นทั้ง fibrinogenolytic และ fibrinolytic inhibitory activity (AVPI-12) จะถูกชะออกมาในช่วง 0.1 M NaCl (ดังรูปที่ 2) โปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 14 kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE (รูปที่ 3) หลังจากนั้น fraction ของโปรตีนที่ออกฤทธิ์จะ pool รวมกัน และ dialysis ด้วย 25 mM Tris-HCl pH 8.0 และนำไปใช้ในการทดสอบ activity ต่าง ๆ ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป นอกจากนี้พบว่าโปรตีนที่ออกฤทธิ์เมื่อวิเคราะห์ด้วย 12.5% SDS-PAGE จะเห็นแถบโปรตีน ในสภาวะ reducing ด้วย 2-mercaptoethanol จะเคลื่อนที่บนเจลได้ช้ากว่าในสภาวะที่ไม่มี 2-mercaptoethanol (non-reducing) ทั้งในสภาวะที่มีการต้มและไม่ต้มตัวอย่างที่ 95°C ก่อนที่จะแยกด้วย SDS-PAGE (รูปที่ 3)

3.2 การหาความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนด้วยน้ำยา BCA assay kit ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ นำสารละลายโปรตีน 0.1 ml ผสมกับสารละลาย BCA working reagent 2 ml นำไป incubate ที่ 37 °C นาน 30 นาที หาความเข้มข้นโดยวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 562 nm โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 2 Chromatogram ของการทำ AVPI-12 ให้บริสุทธิ์ด้วย cation exchange column chromatography ชนิด SP sepharose



รูปที่ 3 SDS-PAGE (12.5%) แสดงความบริสุทธิ์ของโปรตีน AVPI-12 เปรียบเทียบระหว่างแถบโปรตีนในสถานะที่มี 2-mercaptoethanol เป็น reducing agent (lane 2 และ 3) และ สถานะที่ไม่มี 2-mercaptoethanol หรือ non-reducing condition (lane 4 และ 5) รวมทั้งในสถานะที่ไม่ต้ม (lane 2 and 4) และ ต้ม ตัวอย่าง (lane 3 และ 5) ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที ก่อนแยกด้วย SDS-PAGE และ lane 1 คือ standard molecular weight protein markers

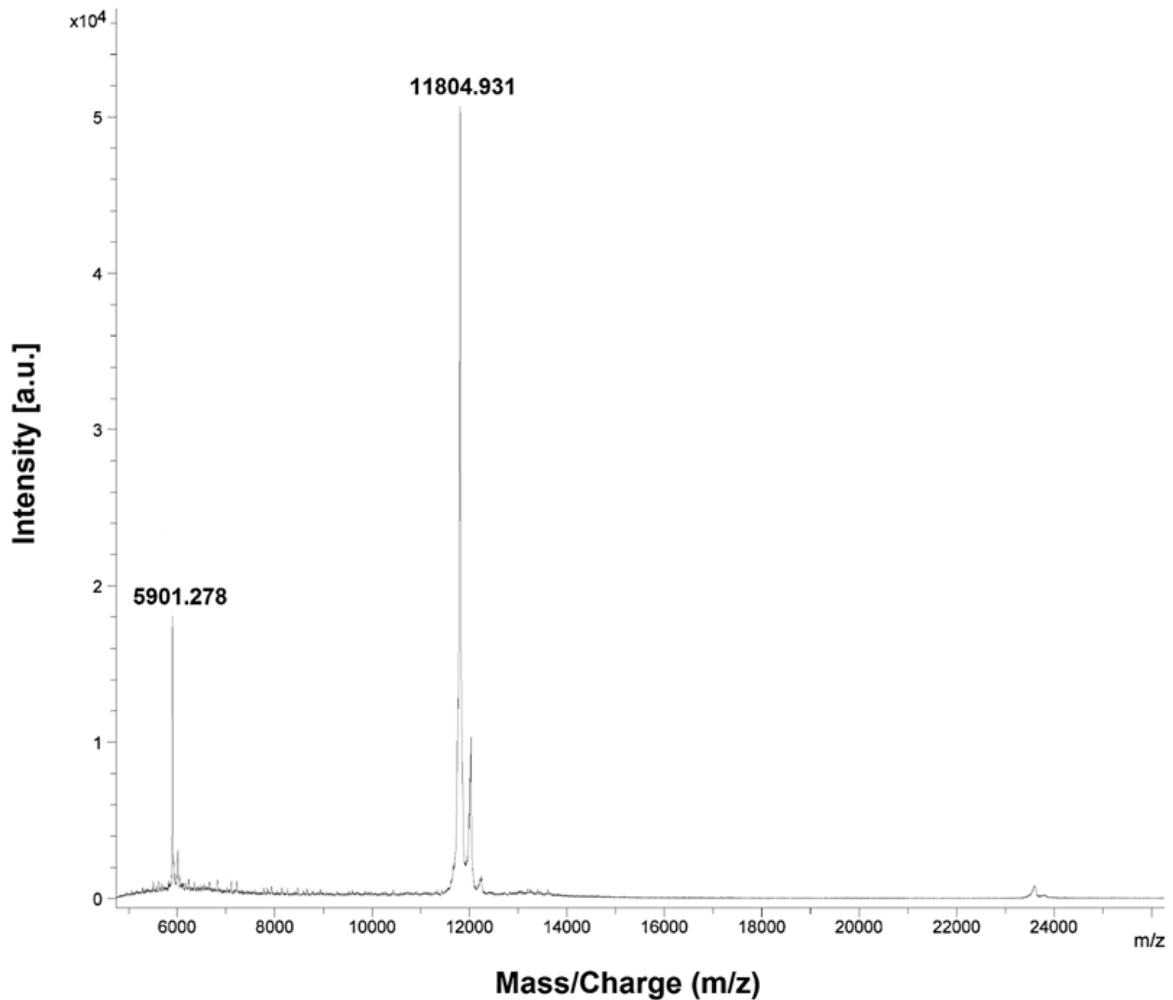
3.3 การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค N-terminal sequencing

โปรตีน spot ของ AVPI-12 ที่ได้จาก 2D gel electrophoresis ที่ได้รับการ blot ลง PVDF membrane แล้วย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 นำไปหาลำดับกรดอะมิโนแบบ N-terminal sequencing ด้วย Edman degradation method ผลการทดลองพบว่าโปรตีนดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโน 10 ตัวแรกจากปลาย N ของ polypeptide chain ดังนี้

R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y

3.4 การหาขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Mass spectrophotometry

ขนาดของโปรตีน AVPI-12 วิเคราะห์ด้วย matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry โดยใช้ sinapinic acid (SA) เป็น MALDI matrix โดยทำการวิเคราะห์ ณ หน่วยบริการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร ผลการทดลองพบว่า intact mass ของ AVPI-12 มีขนาด 11,804.931 Da (รูปที่ 4)

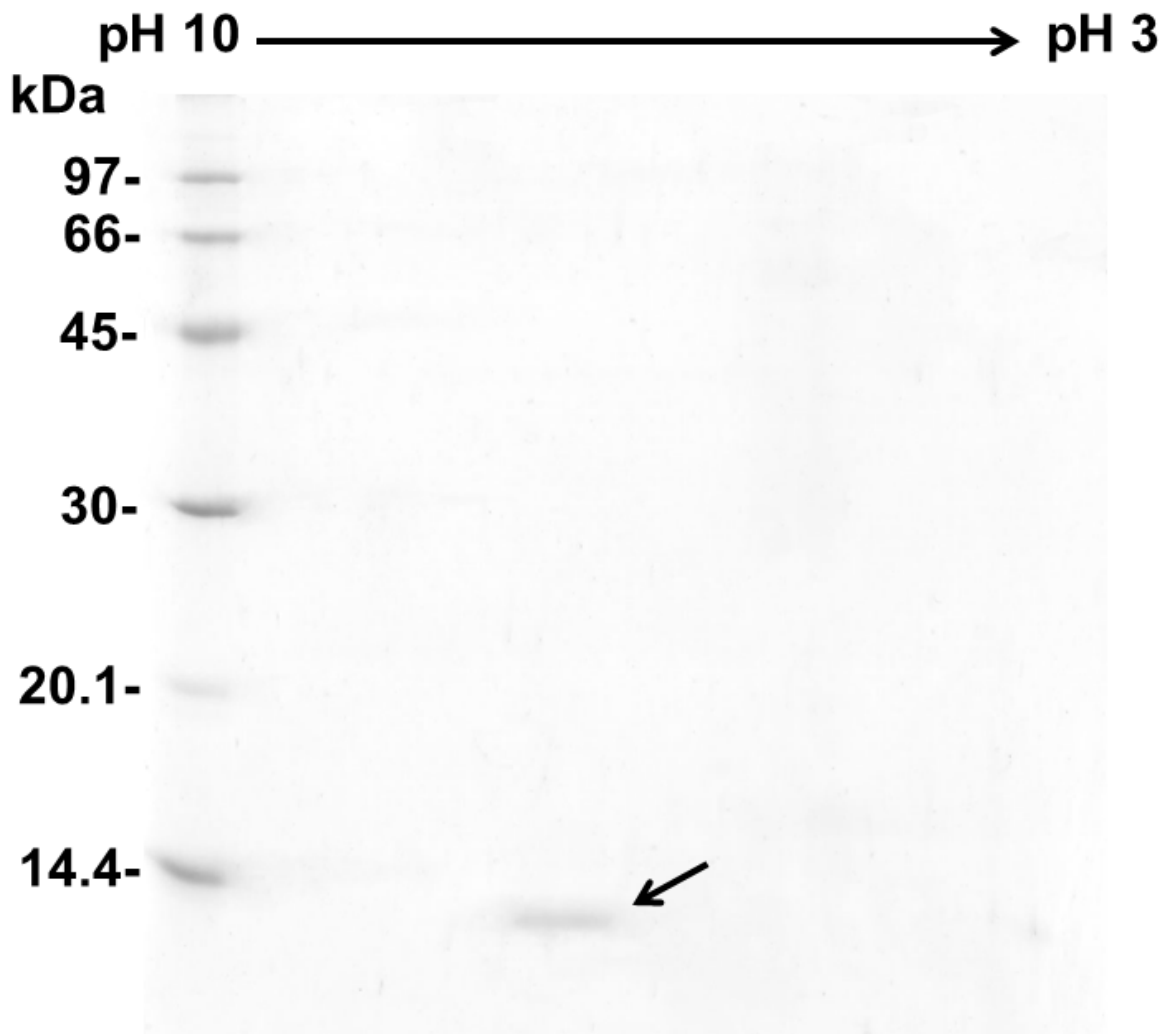


รูปที่ 4 Intact mass ของ AVPI-12 วิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF mass spectrometry

3.5 Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (2D SDS-PAGE)

โปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ความเข้มข้น 100 μg นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตามประจุใน first dimension โดยใช้ pH gradient strip pH 3-10 ยาว 7 cm และทำการแยกโปรตีนตามขนาด molecular weight อีกครั้งใน second dimension ด้วย 12.5% gel SDS-PAGE แล้วย้อมโปรตีนด้วย colloidal Coomassie brilliant blue G-250 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ImageMasterTM 2D Platinum software (GE Healthcare,

Uppsala, Sweden) พบว่าโปรตีนที่ขนาด molecular weight ประมาณ 12 kDa มีเพียงหนึ่ง subunit และมีค่า isoelectric point (pI) ประมาณ 7.43 (แสดงดังรูปที่ 5)



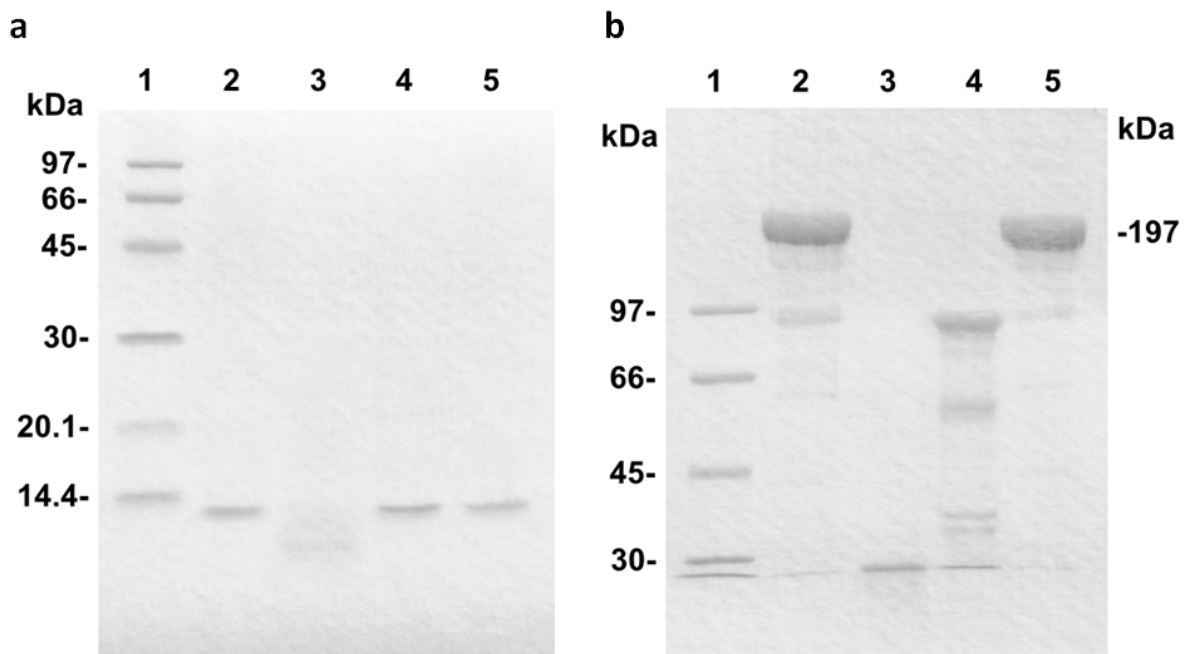
รูปที่ 5 ผล 2D gel electrophoresis ของโปรตีน AVPI-12 ที่ทำให้บริสุทธิ์ มีค่า pI ประมาณ 7.43 (ดังลูกศรชี้)

3.6 ความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วย proteases

ความต้านทานของโปรตีน AVPI-12 ต่อการถูกย่อยด้วย proteases ต่าง ๆ ทดสอบโดยการผสมโปรตีน (10 μg) กับ โปรติเอส (2 μg) แต่ละชนิด คือ human plasmin, papain และ bovine trypsin และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม SDS-PAGE sample buffer ต้มที่ 95 °C เป็นเวลา 5

นาที่ แล้ววิเคราะห์ผลด้วย 12.5% SDS-PAGE ตัวควบคุมของการทดสอบคือ ส่วนผสมที่ไม่มีเอนไซม์แต่ใช้ 25 mM Tris-HCl pH 8.0 แทน ผลการทดลองทำเปรียบเทียบกับ human plasma α_2 -macroglobulin ซึ่งเป็น protease inhibitor ที่พบได้ในเลือดของมนุษย์

ผลการทดลองพบว่า AVPI-12 สามารถทนต่อการย่อยด้วย human plasmin และ bovine trypsin และถูกย่อยเกือบหมดด้วยเอนไซม์ papain (รูปที่ 6a) ซึ่งต่างจาก α_2 -macroglobulin โดย α_2 -macroglobulin ทนทานต่อการย่อยด้วย human plasmin แต่ถูกย่อยเกือบหมดด้วย bovine trypsin และย่อยจนหมดด้วย papain (รูปที่ 6b)



รูปที่ 6 ความคงทนต่อการถูกย่อยด้วย proteases ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin (b)

แต่ละ inhibitor จะผสมกับ protease แต่ละชนิดคือ human plasmin (lane 2), papain (lane 3), bovine trypsin (lane 4) และ control ที่ปราศจาก protease (เติม 25 mM Tris-HCl pH 8.0 แทน) (lane 5) และ lane 1 คือ standard molecular weight protein markers

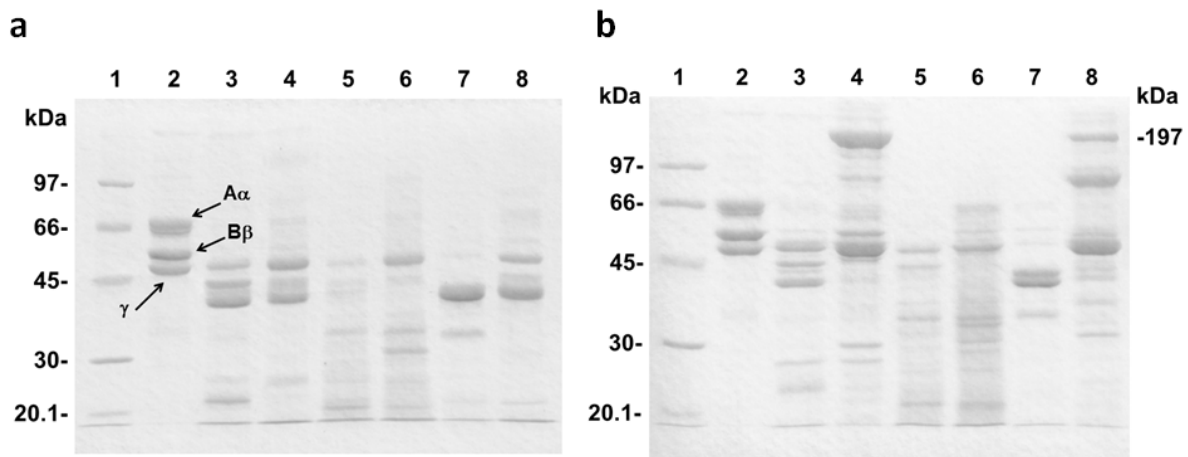
3.7 การทดสอบ fibrinogenolytic inhibitory activity

3.7.1 Fibrinogenolytic inhibitory pattern

รูปแบบการยับยั้งการย่อย human fibrinogen ด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ human plasmin, papain และ bovine trypsin 12 ศึกษาโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) ทำการทดสอบโดยนำแต่ละ protease (2 μ g) ผสมกับ AVPI-12 (10 μ g) ใน total volume 20 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นส่วนผสมระหว่าง AVPI-12 และเอนไซม์แต่ละชนิด จะเติมลงในหลอดทดลองที่มี 50 μ g

ของ human fibrinogen โดยใช้ 25 mM Tris-HCl pH 8.0 เป็นตัวทำละลาย ให้ได้ total volume 40 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 120 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย denaturing buffer (ประกอบด้วย 1M urea, 4% SDS และ 4% 2-mercaptoethanol) วิเคราะห์ผลด้วย 10% SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 ผลการทดลองที่ได้จะศึกษาเปรียบเทียบกับการเป็น fibrinogenolytic inhibitory activity ของ α_2 -macroglobulin

ผลการทดลองพบว่าทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin สามารถป้องกัน γ -subunit ของ human fibrinogen จากการย่อยด้วย human plasmin และ bovine trypsin ได้ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า AVPI-12 สามารถยับยั้ง γ -subunit ของ human fibrinogen จากการย่อยด้วย papain (รูปที่ 7a) แต่ α_2 -macroglobulin ไม่สามารถยับยั้งได้ (รูปที่ 7b)



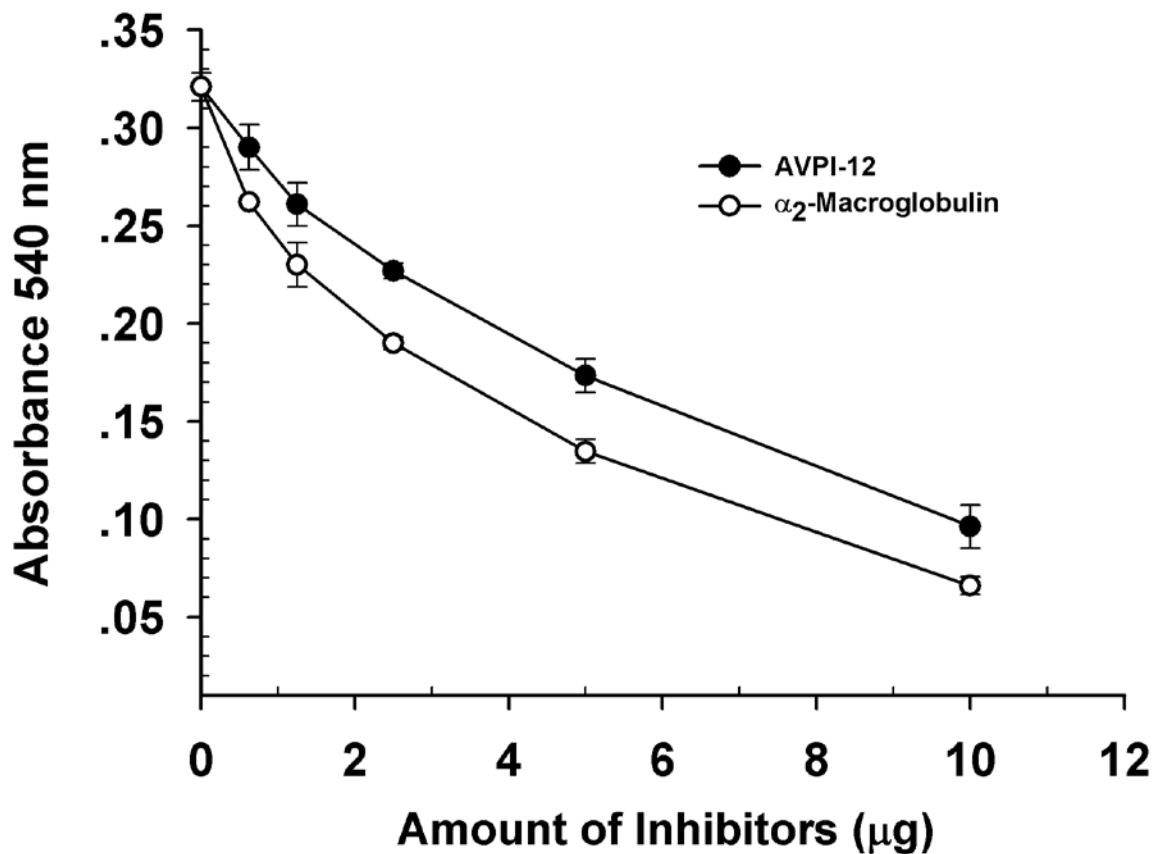
รูปที่ 7 Human fibrinogenolytic inhibitory patterns ของ AVPI-12 (a) และ α_2 -macroglobulin (b) ต่อเอนไซม์ plasmin (lane 4), papain (lane 6) และ trypsin (lane 8) ผลการทดลองเปรียบเทียบกับ human fibrinogen (lane 2) และ human fibrinogen ที่ถูกย่อยด้วย plasmin (lane 3), papain (lane 5) และ trypsin (lane 7) lane 1 แสดง standard protein molecular weight markers

3.7.2 Human plasmin fibrinogenolytic inhibitory activity

การออกฤทธิ์ยับยั้งการย่อย human fibrinogen ด้วย human plasmin ของ AVPI-12 ศึกษาโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Satake และคณะ (1963) ทำการทดสอบโดยการผสม human plasmin (2 μ g) กับ AVPI-12 ปริมาณต่าง ๆ (0-10 μ g) ใน total volume 40 μ l และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นนำส่วนผสมระหว่างเอนไซม์และตัวยับยั้งเติมลงในหลอดทดลองที่มี 10 mg/ml human fibrinogen ที่มี 25 mM Tris-HCl pH 8.0 เป็นตัวทำละลาย (40 μ l) และ incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 120 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 40 μ l และปั่นที่ 10,000xg นาน 20 นาที นำส่วนใสที่มี digested peptide ปริมาณ 25 μ l มาวัดความเข้มข้นด้วย BCA assay

kit (ดังแสดงในข้อ 3.2) ปฏิบัติการยับยั้งศึกษาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ที่ลดลง Blank ของการทดลองคือหลอดที่ไม่มีส่วนผสมของเอนไซม์และ human fibrinogen แต่ละการทำลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และ positive control คือ ปฏิบัติการที่มี α_2 -macroglobulin

ผลการทดลองพบว่าเมื่อปริมาณของ AVPI-12 หรือตัวยับยั้งเพิ่มขึ้นสามารถยับยั้งการทำงานของ human plasmin ได้มากขึ้นโดยทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ลดลงมากขึ้น (รูปที่ 8) หรือแสดงถึงว่าเอนไซม์ plasmin สามารถย่อย human fibrinogen ได้น้อยลงทำให้ได้ digested peptide products ลดลง ผลการทดลองสอดคล้องกับ positive control คือ α_2 -macroglobulin (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 Fibrinogenolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 แบบ dose dependence ต่อ human plasmin โดยใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control

3.8 การทดสอบ fibrinolytic inhibitory activity

3.8.1 ศึกษา fibrinolytic inhibitory activity ด้วย colorimetric detection

เตรียม fibrin clot โดยการตัดแปลงวิธีของ Rajesh และคณะ (2006) ทำได้โดยผสม 31 μM ของ human fibrinogen ที่มีความเข้มข้น 20 mg/ml ด้วย 3 μM ของ 0.5 M CaCl_2 และ 6 μM ของ 0.25 NIH units human thrombin และตั้งทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้น fibrin clot จะนำไปใส่ในหลอดทดลองที่มี plasmin 4 μg และ AVPI-12 12 μg ปริมาตรทั้งหมด 40 μL ที่ผ่านการทำปฏิกิริยาที่ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที หลังจากนั้นให้ส่วนผสมทั้งหมดทำปฏิกิริยากันที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 150 นาที จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA ปริมาตร 40 μL และนำไปปั่นที่ 10,000xg นาน 20 นาที วัดความเข้มข้นของ digested peptides ด้วย BCA assay kit (ดังแสดงในข้อ 3.2) ปฏิกิริยาการยับยั้งศึกษาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ที่ลดลง Blank ของการทดลองคือหลอดที่ไม่มีส่วนผสมของเอนไซม์และ human fibrinogen แต่ละการทำลองทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และ positive control คือ ปฏิกิริยาที่มี α_2 -macroglobulin สามารถคำนวณเปอร์เซ็นต์ fibrinolytic inhibition ได้ดังสมการข้างล่าง

$$\text{Fibrinolytic inhibition (\%)} = \frac{(E - I)}{E} \times 100$$

โดย E คือ activity ของ plasmin ในสถานะที่ไม่มี inhibitor

I คือ activity ของ plasmin ในสถานะที่มี inhibitor

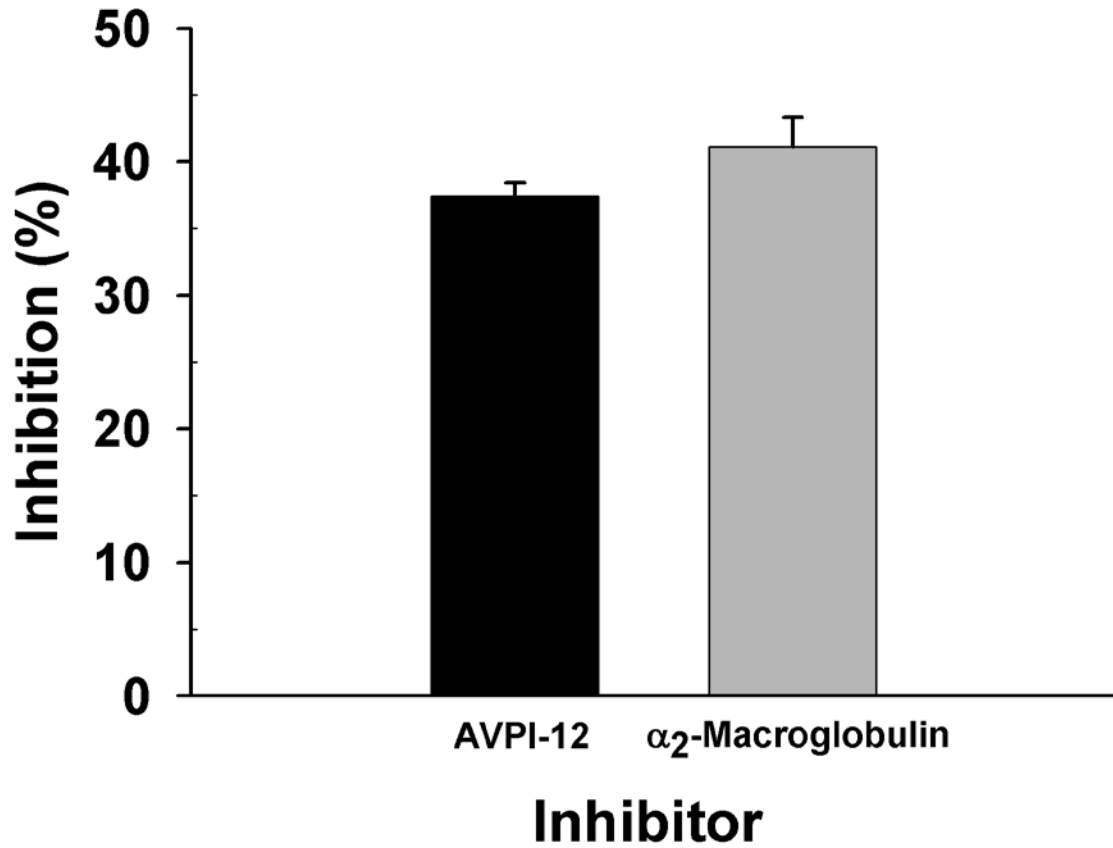
ผลการทดลองพบว่า fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin ต่อการทำงานของ plasmin มีค่าเท่ากับ $37.4 \pm 1.0\%$ และ $41.1 \pm 2.1\%$ ตามลำดับ (แสดงในรูปที่ 9)

3.8.2 ศึกษา fibrinolytic inhibitory activity ด้วย small-angle X-ray scattering (SAXS)

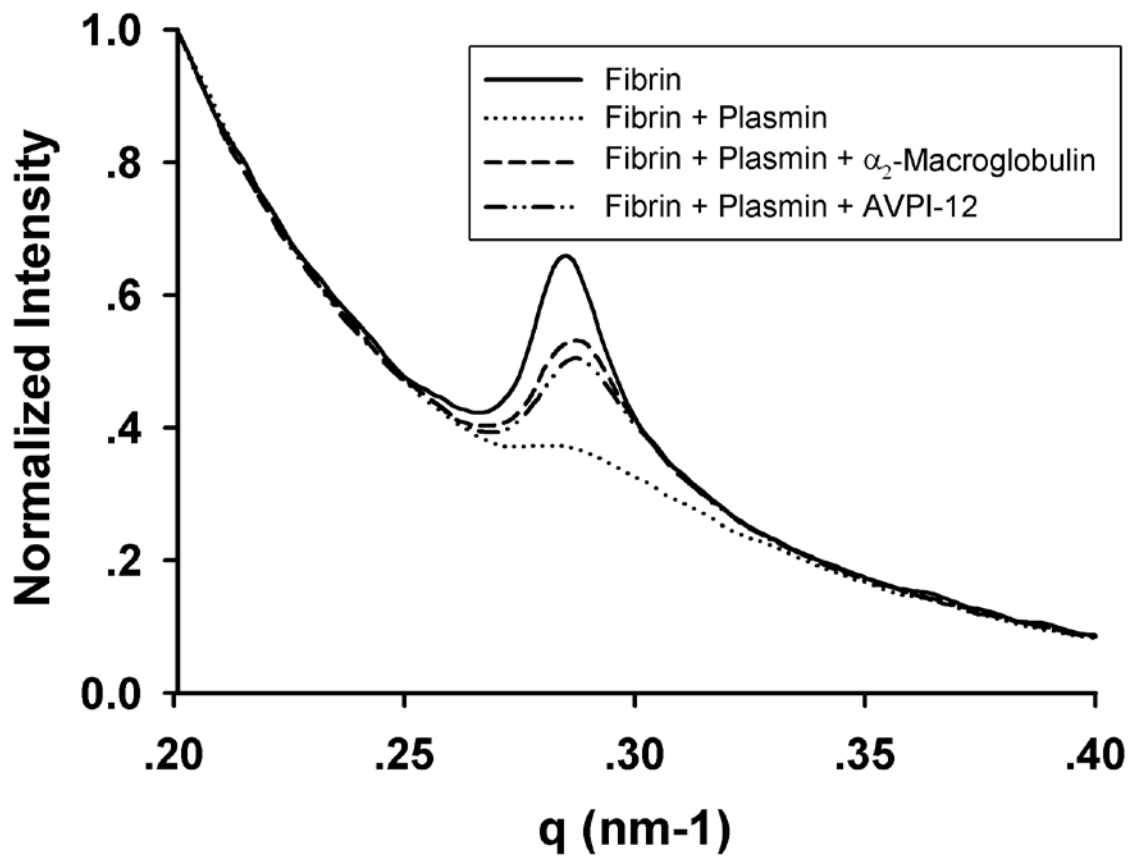
Small-angle X-ray scattering (SAXS) ใช้ในการทดสอบการเป็น fibrinolytic inhibitory activity โดยทำการทดลอง ณ ระบบลำแสงที่ BL-2.2 ของสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) จ. นครราชสีมา fibrin clot เตรียมโดยการผสม 77 μL ของ human fibrinogen (20 mg/ml) ด้วย 8 μL ของ 0.5 M CaCl_2 และ 15 μL ของ 0.25 NIH units thrombin ลงใน sample holder ที่ทั้งสองข้างปิดด้วย kapton tapes ที่วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นเติม 80 μL ของสารผสมระหว่าง plasmin 8 μg และ AVPI-12 24 μg ที่ได้ทำปฏิกิริยากันแล้วที่อุณหภูมิ 37 °C 60 min ตั้งส่วนผสมทั้งหมดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 150 นาที แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ fibrin clot ด้วย SAXS วิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรม SAXSIT version 3.61 α_2 -macroglobulin ใช้เป็น positive control ของการทดลอง

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 พบว่า peak position ของ fibrin clot ไม่ว่าจะในสถานะที่มี inhibitors ทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin หรือในสถานะที่มีแต่ plasmin และ fibrin clot เปล่า ๆ พบว่าตำแหน่ง

ของ peak หรือ ค่า q และ fibrin periodicity มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่ความสูงของ peak ซึ่งแสดงถึงปริมาณของ fibrin clot ลดลง หรือมีการเปลี่ยนจากภาวะ solid state ไปเป็น liquid state พบว่าในภาวะที่มี fibrin clot และ plasmin ความสูงของ peak จะต่ำสุด และเมื่อมีตัวยับยั้งหรือ inhibitor ทั้ง AVPI-12 และ α_2 -macroglobulin ความสูงของ peak จะต่ำกว่า peak ของ fibrin clot ในสภาวะที่ไม่มีทั้งเอนไซม์และ inhibitor เล็กน้อย



รูปที่ 9 ผลของ AVPI-12 ต่อ fibrinolytic activity ของ human plasmin การทดลองใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control



รูปที่ 10 SAXS spectra แสดง fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 ต่อ human plasmin โดยใช้ α_2 -macroglobulin เป็น positive control

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยสามารถสกัดโปรตีนและทำให้บริสุทธิ์จากวุ้นของวุ้นหางจระเข้ ได้โปรตีนดังกล่าวมีขนาดโมเลกุลประมาณ 12 kDa และตั้งชื่อว่า AVPI-12 ซึ่งโปรตีนดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม proteases ได้ หรือแสดงฤทธิ์เป็น protease inhibitor โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ด้วยเอนไซม์ serine proteases ชนิด human plasmin และ bovine trypsin และ เอนไซม์ในกลุ่ม cysteine proteases เช่น papain เป็นต้น นอกจากนี้ AVPI-12 ยังมีความต้านทานต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ plasmin และ trypsin ได้ดีกว่า papain นอกจากนี้ AVPI-12 ยังทนต่อการย่อยด้วย trypsin ดีกว่าโปรตีนที่เป็น serine protease inhibitor ที่พบได้ในเลือดของมนุษย์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบการแข็งตัวของเลือด คือ α_2 -macroglobulin ผลการทดลองนี้แสดงว่า AVPI-12 มีแนวโน้มที่จะทนทานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี proteases ได้ดีกว่า α_2 -macroglobulin เมื่อพิจารณาคุณสมบัติทั้งการเป็น protease inhibitor และ ขนาดโมเลกุลของ AVPI-12 พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนที่พบได้จากพืชที่มีคุณสมบัติเป็น proteases inhibitor เช่น cystatin family 1 ที่มีขนาดประมาณ 11 kDa (Ryan และคณะ, 1998), protease inhibitor ในกลุ่ม Kunitz และ Bowman-Brik ซึ่งโดยทั่วไปพบว่ามีขนาดประมาณ 18-24 และ 8-10 kDa (de Oliveira และคณะ, 2012) เมื่อพิจารณาจากลำดับของกรดอะมิโน 10 ตัวแรกจากปลาย N-terminal ของโปรตีน AVPI-12 คือ R-D-W-A-E-P-N-D-G-Y ซึ่งเป็นลำดับของกรดอะมิโนที่ไม่ซ้ำกับโปรตีนชนิดใด ๆ ใน databases รวมทั้ง protease inhibitor จากพืชชนิดต่าง ๆ (ดังแสดงในตารางที่ 1) ดังนั้น โปรตีนชนิดนี้จึงจัดว่าเป็น protease ชนิดใหม่ และจากความสามารถทนทานต่อการย่อย และการยับยั้งเอนไซม์ protease ในกลุ่ม serine protease ได้ดีของ AVPI-12 แสดงให้เห็นว่า AVPI-12 มีแนวโน้มเป็น serine protease inhibitor

จากการทดลองการเป็น fibrinogenolytic inhibitor ของ AVPI-12 ต่อ human plasmin พบว่า AVPI-12 มีฤทธิ์ยับยั้งการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ได้ดีเหมือนกับ α_2 -macroglobulin ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของ human plasmin ในกระแสเลือด และยังยับยั้ง human plasmin ได้แบบ dose dependent ซึ่งการออกฤทธิ์ยับยั้งการย่อย γ subunit ของ human fibrinogen ได้ ถือว่ามีความสำคัญ เนื่องจากในธรรมชาติของกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่จะต้องมีการสร้าง fibrin clot เพื่อให้เลือดหยุดไหลนั้น ต้องอาศัย γ -subunit ของ fibrinogen ในการที่จะช่วยรักษาหรือคงสภาพของ fibrin polymer ให้เหนียวแน่นไม่ให้ถูกย่อยสลายได้ง่าย ๆ ด้วยกระบวนการ fibrinolysis (Mosesson และคณะ, 2001)

นอกจากนี้ยังพบว่า AVPI-12 สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดการย่อย fibrin clot ได้อย่างสมบูรณ์จากการทดสอบด้วย colorimetric method และ SAXS ซึ่งผลการทดลองจาก SAXS จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่า AVPI-12 สามารถป้องกันการถูกย่อยได้อย่างสมบูรณ์ด้วย plasmin ได้ โดยดูจากความสูงของ peak ที่ยังคงสูงอยู่เมื่อเทียบกับ peak ของ fibrin clot ที่ถูกย่อยด้วย plasmin ในสภาวะที่ไม่มี inhibitor และ peak ของ fibrin clot ที่ไม่มีทั้ง inhibitor และ plasmin ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลที่ได้จากการใช้ α_2 -macroglobulin เป็น

inhibitor ซึ่งผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้จาก SAXS มีความเชื่อถือได้ โดยพบว่า SAXS spectrum ของ fibrin clot มีค่า q และ ลักษณะของ peak ใกล้เคียงกับที่เคยมีการรายงานโดย Brown และคณะ (2009) โดยค่า q ของ fibrin clot จะมีค่าประมาณ 0.285 nm^{-1} หรือ เท่ากับ $d = 22 \text{ nm}$ โดยความสัมพันธ์ของ q และ d หาได้จาก wave vector ซึ่งมีสมการดังนี้ $q = 2\pi/d$ ซึ่ง d คือ fibrin periodicity มีหน่วยเป็น nanometer (Brown และคณะ, 2009) และพบว่าค่า q ของ fibrin clot เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยทั้งในสถานะที่มีและไม่มี เอนไซม์ หรือ inhibitor เช่นในสถานะที่ fibrin clot ถูกย่อยด้วย plasmin ค่า q มีค่าประมาณ 0.288 nm^{-1} หรือ d ประมาณ 21.8 nm แต่ค่าความสูงของ peak ที่ต่ำลงเมื่อมี plasmin แสดงถึงว่ามีการลดลงของ fibrin clot จากภาวะที่เป็นของแข็ง (solid state) กลายเป็นของเหลว (liquid state) และเมื่อมีตัวยับยั้ง หรือ inhibitor ทำให้การถูกย่อยช้าลงหรือเกิดได้ไม่สมบูรณ์ความสูงของ peak จึงยังคงสูงอยู่หรือลดลงเล็กน้อยดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 10

จากผลการทดลอง N-terminal amino acid sequencing, fibrinogenolytic inhibitory activity, fibrinolytic inhibitory activity ผลการทดสอบทางชีวเคมี รวมทั้งผล SAXS พบว่า AVPI-12 เป็น serine protease inhibitor ชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ plasmin ได้คล้ายคลึงกับ plasma serine protease inhibitor คือ α_2 -macroglobulin แต่มีความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วย proteases มากกว่า แสดงว่า AVPI-12 มีแนวโน้มจะพัฒนาใช้เป็นยากลุ่ม antifibrinolytic treatment ได้



ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนจาก N-terminal ของโปรตีน AVPI-12 กับ proteases inhibitors จากพืชชนิดต่าง ๆ

Protease Inhibitor	The first 10-11 amino acids at N-terminus	Similarity (%)	References
AVPI-12	RDWAEPNDGY		
Cysteine protease Inhibitor (CPI)			
HCB-SunI	PYGGGGTESG	-	Zhang <i>et al.</i> (2006)
Oryzacystatin I	MSSDGGPVLG	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
CPI from apple fruit	DNQGSANSVE	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
CPI from soybean	AALEKVQELG	-	Ryan <i>et al.</i> (1998)
Heat-stable serine protease			
Potide-G	QICTMCCAGRK	-	Kim <i>et al.</i> (2006)
Kunitz trypsin inhibitor			
SSTI	KTQVLDANGNI	-	Macedo <i>et al.</i> (2011)
ERYLA	VLLDGNGEVVQ	-	Ramos <i>et al.</i> (2009)
PROJU	QELLDVDGEIL	-	Oliva <i>et al.</i> (2010) ¹
ACACO	KELLDADGDIL	-	Oliva <i>et al.</i> (2000) ²
EATI	NELKDMEGDIL	-	de Oliveira <i>et al.</i> (2012)

(-) มีความแตกต่างอย่างๆไม่มีนัยสำคัญ

HCB-SunI (*Helianthus annuus*, sunflower seeds cathepsin B inhibitor); Potide-G (potato tubers, *Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley serine protease inhibitor); SSTI (*Sapindus saponaria* L. seeds trypsin inhibitor); ERYLA (*Erythrina latissima* trypsin inhibitor); PROJU (*Prosopis juliflora* trypsin inhibitor); ACACO (*Acacia confusa* trypsin inhibitor); EATI (*Entazada acaciifolia* (Benth.) seeds trypsin inhibitor)

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

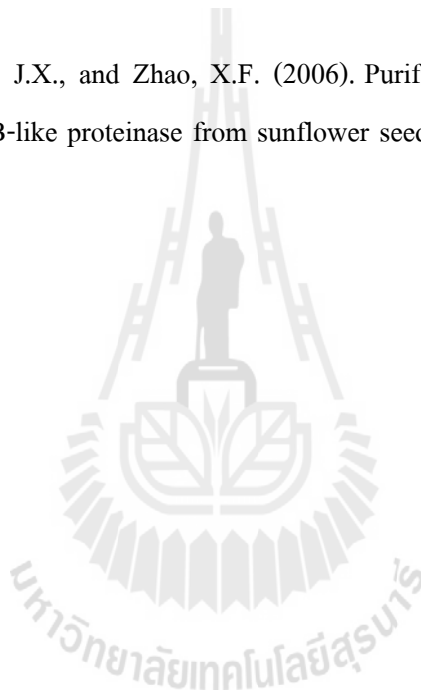
งานวิจัยครั้งนี้ได้โปรตีน AVPI-12 ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็น serine protease inhibitor ที่มีขนาดประมาณ 12 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนที่เป็น protease inhibitor ที่ได้จากพืชชนิดอื่น ๆ AVPI-12 สามารถป้องกัน γ -subunit ของ human fibrinogen จากการย่อยด้วย proteases ชนิดต่าง ๆ หรือมีฤทธิ์ fibrinolytic inhibitory activity นอกจากนี้พบว่ามีคุณสมบัติ fibrinolytic activity จากการทดลองด้วย colorimetric method และ SAXS โดยคุณสมบัติในการเป็น fibrinolytic inhibitory activity และ fibrinolytic inhibitory activity ของ AVPI-12 คล้ายคลึงกับ protease inhibitor ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ plasmin ในเลือดของมนุษย์ คือ α_2 -macroglobulin แต่มีข้อดีกว่าคือ AVPI-12 มีความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม serine และ cysteine protease ได้ดีกว่า α_2 -macroglobulin ดังนั้น AVPI-12 มีความทนทานมากกว่า α_2 -macroglobulin ซึ่งเหมาะที่จะพัฒนานำไปใช้เป็นยาในกลุ่ม antifibrinolytic agents

ซึ่งในการวิจัยครั้งต่อไปคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ของโปรตีนนี้ต่อกระบวนการและปัจจัยการแข็งตัวของเลือดมนุษย์อื่น ๆ ต่อไป รวมทั้งศึกษาการจับกัน (binding) ของ AVPI-12 กับเอนไซม์ต่าง ๆ และทดลองใช้ในสัตว์ทดลองเพื่อที่จะเป็นข้อมูลในการพัฒนานำ AVPI-12 ไปใช้ในการรักษาหรือป้องกันโรคได้จริง

บรรณานุกรม

- ยาสมุนไพรรักษาโรคผิวหนังตามโครงการทศวรรษการแพทย์แผนไทย 2537-2547. องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพมหานคร
- Brown, A.E., Litvinov, R.I., Discher, D.E., Purohit, P.K., and Weisel, J.W. (2009). Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. Science. 325. 741-744.
- Das, S., Mishra, B., Gill, K., Ashraf, M.S., Singh, A.K., Sinha, M., Sharma, S., Xess, I., Dalal, K., Singh, T. P., and Dey, S. (2011). Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from *Aloe vera* leaf gel. Int. J Biol Macromol. 48. 38-43.
- de Oliveira, C.F.R., Vasconcelos, I.M., Aparicio, R., Freire, M. das G.M., Baldasso, P.A., Marangoni, S., and Macedo, M.L.R. (2012). Purification and biochemical properties of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. Process Biochem. 47. 929-935.
- Hamman, J.H. (2008). Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. Molecules. 13. 1599-1616.
- Kim, M.H., Park, S.C., Kim, J.Y., Lee, S.Y., Lim, H.T., Cheong, H., Hahm, K.S., and Park, Y. (2006). Purification and characterization of a heat-stable serine protease inhibitor from the tubers of new potato variety "Golden Valley". Biochem Biophys Res Commun. 346. 681-686.
- Macedo, M.L., Diz Filho, E.B., Freire, M.G., Oliva, M.L., Sumikawa, J.T., Toyama, M.H., and Marangoni, S. (2011). A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. Protein J. 30. 9-19.
- Mosesson, M.W., Siebenlist, K.R., and Meh, D.A. (2001). The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. Ann. N Y Acad Sci. 936. 11-30.
- Oliva¹, M.L., Silva, M.C., Sallai, R.C., Brito, M.V., and Sampaio, M.U. (2010) A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. Biochimie. 92. 1667-1673.
- Oliva², M.L., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F., Araujo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M.U., and Sampaio, C.A. (2000). *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. Biochim Biophys Acta. 1477. 64-74.

- Rajesh, R., Nataraju, A., Gowda, C.D., Frey, B.M., Frey, F.J., and Vishwanath, B.S. (2006). Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. Biochimie. 88. 1313-1322.
- Ramos, S. Vda, Freire, M.G., Parra, J.R., and M.L. Macedo. (2009). Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 152. 255-261.
- Ryan, S.N., Laing, W.A., and McManus, M.T. (1998). A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. Phytochemistry. 49. 957-963.
- Satake, M., Murata, Y., and Suzuki, T. (1963). Studies on snake venom. XIII. Chromatographic separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. J Biochem. 53. 438-447.
- Zhang, X.C., Shao, H.L., Wang, J.X., and Zhao, X.F. (2006). Purification and characterisation of an inhibitor of a cathepsin B-like proteinase from sunflower seed. J Enzyme Inhib Med Chem. 21. 433-439.



ภาคผนวก

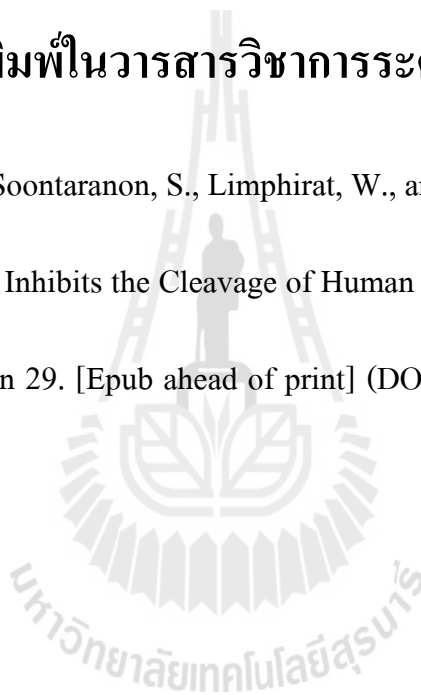


ผลงานที่ได้นำตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้

Siritapetawee, J., Sojikul, P., Soontaranon, S., Limphirat, W., and Thammasirirak, S. (2013).

A Protein from *Aloe vera* that Inhibits the Cleavage of Human Fibrin(ogen) by Plasmin. Appl Biochem Biotechnol. 2013 Jun 29. [Epub ahead of print] (DOI10.1007/s12010-013-0356-2).

Impact Factor: 1.893



A Protein from *Aloe vera* that Inhibits the Cleavage of Human Fibrin(ogen) by Plasmin

Jaruwan Siritapetawee · Panchapat Sojikul ·
Siriwat Soontaranon · Wanwisa Limphirat ·
Sompong Thammahirak

Received: 11 April 2013 / Accepted: 17 June 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract A protease inhibitor protein with the molecular mass of 11,804.931 Da (analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) was isolated from *Aloe vera* leaf gel and designated as AVPI-12. The isoelectric point of the protein is about 7.43. The first ten amino acid sequence from the N-terminal was found to be R–D–W–A–E–P–N–D–G–Y, which did not match other protease inhibitors in database searches and other publications, indicating AVPI-12 is a novel protease inhibitor. The band protein of AVPI-12 migrated further on nonreducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) than reducing SDS-PAGE. This result indicated that the molecule of AVPI-12 did not contain interchain disulfide bonds, but appeared to have intrachain disulfide bonds instead. AVPI-12 strongly resisted digestion by the serine proteases human plasmin and bovine trypsin. The protein could protect the γ -subunit of human fibrinogen from plasmin and trypsin digestion, similar to the natural plasma serine protease inhibitor α_2 -macroglobulin. The protein also could protect the γ -subunit of fibrinogen from the cysteine protease papain. AVPI-12 also exhibited dose-dependent inhibition of the fibrinolytic activity of plasmin, similar to α_2 -macroglobulin. The fibrinolytic inhibitory activity of AVPI-12 and the small-angle X-ray scattering showed that the protein could protect human fibrin clot from complete degradation by plasmin. The inhibition of the

J. Siritapetawee (✉)
School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima,
Thailand
e-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

P. Sojikul
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand

S. Soontaranon · W. Limphirat
Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand

S. Thammahirak
Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Department
of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand

fibrinogenolytic and fibrinolytic activities of plasmin by AVPI-12 suggests that the inhibitor has potential for use in antifibrinolytic treatment.

Keywords *Aloe vera* · Fibrinogen · Fibrin · Protease inhibitor · Fibrinolytic · Fibrinogenolytic

Introduction

Proteases or proteinases are proteolytic enzymes naturally found in all organisms. They are involved in a multitude of biological systems. Actions of proteases can be inhibited by proteolytic degradation and their inhibitors [1]. Protease inhibitors can be either high or low molecular weight substances including proteins [2]. They can affect many biological mechanisms, for instance, hormone metabolism, immune systems, blood coagulation, and fibrinolysis [3]. Almost all organisms contain protein protease inhibitors (PPIs) [2]. In plants, they distribute in tubers [4], seeds [5], fruits [6], flowers, and leaves [7]. They are produced in germination and in defense mechanisms [2]. At present, many researches have been published about the potential use of PPIs as therapeutic agents, for instance, anti-human tumor cell proliferation of *Enterolobium contortisiliquum*'s PPI [8], antimicrobial activity of plant PPIs [9], and anti-human blood coagulation and anti-fibrinolysis of Pau Brasil seed's PPI [10].

Aloe vera has been extensively used worldwide for various condition treatments ranging from dermatitis to cancer [11]. The constituents in *A. vera* leaf gel are polysaccharides, glycoproteins, minerals, etc. [12]. However, the active components in the *A. vera* gel especially protein contents have not been well elucidated. The present study describes isolation, purification, and biochemical properties of a novel protease inhibitor (AVPI-12) from crude protein extract of *A. vera* leaf gel. For elucidation of the potential use as an anti-fibrin clot lysis by human plasmin, its fibrinolysis and fibrinogenolysis (or fibrino(geno)lysis) inhibitory properties were also investigated.

Materials and Methods

Materials

Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, 7 cm immobilized pH gradient strip pH 3–10, molecular weight marker for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and SP Sepharose™ Fast Flow (1.5×3 cm) column were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Bicinchoninic acid (BCA) assay kit was purchased from Pierce (IL, USA). Human fibrinogen, human plasmin, human thrombin and human plasma α_2 -macroglobulin, papain, and bovine trypsin were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Other analytical grade chemicals were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium). *A. vera* gel was separated from plants located in Muang District, Nakhon Ratchasrima Province, Thailand.

Purification of AVPI-12 Protein

The *A. vera* gel (100 g) was separated from the leaves. The gel was homogenized and sieved through cheesecloth. The sieved gel was centrifuged (13,000×g for 1 h) at room temperature. Then, the supernatant was dialyzed against 25 mM sodium acetate (NaOAc) buffer, pH 4.5, and subjected to further purification by the SP Sepharose™ Fast Flow column chromatography with a 0–0.3 M step gradient of NaCl in 25 mM NaOAc, pH 4.5, at 1 ml/min flow rate. The proteins

were fractionated (2 ml) and measured at A280. The purity and molecular weight of proteins were determined by 12.5 % SDS-PAGE. The protein fractions of AVPI-12 were pooled and dialyzed against 25 mM Tris-HCl, pH 8.0. Total protein concentrations were analyzed by bicotinic acid (BCA) assay as described in the following method.

Protein Concentration Determination

Protein concentrations were measured following the manufacturer's instruction of the BCA assay kit. Protein (25 μ l) was mixed with BCA reagent (200 μ l) in a microwell plate. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and then, the absorbance was measured at a wavelength of 540 nm using a microwell plate reader (Labsystems iEMS, Labsystems Ltd. Oy, Finland) with Ascent Software™ version 2.4 (Labsystems Ltd. Oy, Finland). A standard calibration curve was set up using various concentrations of bovine serum albumin (0.025–2.0 mg/ml).

Electrophoresis

1D SDS-PAGE

One-dimensional (1D) SDS-PAGE was performed following the method of Laemmli [13]. Protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

In addition, the numbers of AVPI-12 subunits were also identified by 1D SDS-PAGE (12.5 % gel) with or without 5 % 2-mercaptoethanol (v/v). In each condition, the samples were prepared by heating (95 °C for 5 min) or not heating before separating by SDS-PAGE.

2D SDS-PAGE

The purified proteins (100 μ g) were analyzed with two-dimensional (2D) SDS-PAGE. The proteins were separated in the first dimension with 7 cm immobilized strip with gradient pH 3–10. For the second dimension, the proteins were separated by 12.5 % Tris-glycine SDS-PAGE. Proteins were observed by staining with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250. The isoelectric point (pI) and molecular weight of protein spots were analyzed by ImageMaster™ 2D Platinum software (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

N-terminal Protein Sequencing

N-terminal protein sequencing was performed by transferring the proteins from 2D SDS-PAGE into the PVDF membrane. Then, the membrane was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The protein spots were excised and then subjected to Edman degradation protein sequencing using an automatic amino acid sequencer. N-terminal protein sequencing was carried out by the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University, Songkla, Thailand. N-terminal sequence homology was performed by matching against BLAST database [14] and other publication reports.

Mass Spectrometry

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Bruker Daltonics MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometer Autoflex II, Bruker Daltonics®, Germany) was used for intact molecular mass detection and sinapinic acid (SA) was used as MALDI matrix. Mass spectrometric analyses were carried out in the linear, positive mode at 20 kV with a pulsed nitrogen laser, emitting at 337 nm.

Protease Tolerance Test

The protease tolerance of AVPI-12 protein was carried out by mixing the protein (10 μg) individually with 2 μg of protease (plasmin, papain, and bovine trypsin) and incubated at 37 °C for 24 h. The SDS-PAGE sample buffer containing 2-mercaptoethanol was added into each reaction and heated at 95 °C for 5 min. Protease-resistant property of AVPI-12 was observed by separating the hydrolytic products using 12.5 % SDS-PAGE. Tris-HCl (25 mM, pH 8.0) was used instead of enzyme in the negative control reaction. In addition, the protease-resistant property of the protein was also compared with a natural endoprotease inhibitor from human plasma (α_2 -macroglobulin).

Inhibition of Fibrinogenolytic Activity

Fibrinogenolytic Inhibitory Pattern

The effect of AVPI-12 on human fibrinogenolytic activity of various proteases (human plasmin, papain, and bovine trypsin) was determined by 1D SDS-PAGE with slightly modified method of Rajesh et al. [15]. Each protease (2 μg) was mixed individually with AVPI-12 (10 μg) in the total volume of 20 μl and incubated at 37 °C for 60 min. Then, the mixture of protease and inhibitor was added into the tube containing human fibrinogen (50 μg in 25 mM Tris-HCl buffer pH 8.0) in a total reaction volume of 40 μl and incubated at 37 °C for 120 min. The hydrolytic reaction was stopped by adding 20 μl of denaturing buffer (1 M urea, 4 % SDS, and 4 % β -mercaptoethanol). Then, the hydrolytic products were separated by 10 % SDS-PAGE. The inhibitory patterns of fibrinogenolytic activities of various enzymes by AVPI-12 were examined by stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The inhibitory effects of AVPI-12 on the proteases were also compared with α_2 -macroglobulin.

Human Plasmin Fibrinogenolytic Inhibitory Activity

The inhibitory activity of AVPI-12 for human plasmin fibrinogenolytic activity was analyzed by the method of Satake et al. [16] with some modification. Human plasmin (2 μg) was mixed with various amounts of AVPI-12 (0–10 μg in the total reaction volume of 40 μl) and then incubated at 37 °C for 60 min. Then, the effects of inhibitor on plasmin fibrinogenolytic activity were determined by adding the mixture of enzyme and inhibitor into the human fibrinogen (40 μl of 10 mg/ml human fibrinogen in 25 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0) and incubated at 37 °C for 120 min. The reaction was terminated by adding 40 μl of 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged at 10,000 $\times g$ for 20 min. The concentration of digested peptides (25 μl) was measured by the BCA assay kit (as described above). Inhibition of proteolytic activity was determined from the reduction of absorbance at 540 nm. The reaction without the mixture of enzyme and substrate was used as blank reaction. α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for inhibitory reaction. All reactions were done in triplicate.

Fibrinolytic Inhibitory Activity

Determination of Fibrinolytic Inhibitory Activity Using Colorimetric Detection

Fibrin clot was prepared by the method of Rajesh et al. [15] with slightly modification. Thirty-one microliters of human fibrinogen (20 mg/ml) was mixed with 3 μl of CaCl_2 (0.5 M) and 6 μl of human thrombin (0.25 NIH units). The fibrin was clotted at room

temperature for 30 min. Then, the fibrin clot was transferred to the new tube containing the mixture (40 μ l) of plasmin (4 μ g) and AVPI-12 (12 μ g), which was previously incubated at 37 °C for 60 min. After incubation at room temperature for 150 min, the reaction was stopped by adding 40 μ l of 10 % (w/v) TCA and incubated at room temperature for 10 min. Then, the mixture was centrifuged at 10,000 \times g for 20 min. The amounts of digested peptides were measured using BCA assay kit following the method in “Protein Concentration Determination” section. The reaction without the mixture of enzyme and substrate was used as a blank reaction. α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for inhibitory reaction. All reactions were done in triplicate. The percentage of fibrinolytic inhibition was calculated by following equation:

$$\text{Fibrinolytic inhibition (\%)} = \frac{(E-I)}{E} \times 100$$

where E is the activity of plasmin without inhibitor and I is the activity of enzyme with inhibitor.

Determination of Fibrinolytic Inhibitor Activity Using SAXS

Small-angle X-ray scattering (SAXS) was also used to determine the fibrinolytic inhibitory property of AVPI-12. The experiments were performed at BL-2.2 at the Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand using synchrotron radiation from a storage ring operated at energy of 1.2 GeV. The fibrin clot was prepared by mixing 77 μ l of human fibrinogen (20 g/ml) with 8 μ l of CaCl_2 (0.5 M) and 15 μ l of thrombin (0.25 NIH units) into the sample holder with a dimension 4.5 \times 8.5 \times 1 mm ($W\times L\times H$), which both sides are covered with kapton tapes. The fibrin was allowed to clot at room temperature for 30 min. Then, the mixture (total volume 80 μ l) of plasmin (8 μ g) and AVPI-12 (24 μ g) (previously incubated at 37 °C for 60 min) was added into the fibrin clot and incubated at room temperature for 150 min. After that, the alteration of fibrin clot was measured by SAXS using the exposure time of 10 min. The distance between sample and detector was set at 1.5 m. The data were collected using the Rayonix SX-165 Single CCD Detector (Marresearch GmbH, Norderstedt, Germany). All data were processed and analyzed using the SAXSIT version 3.61 software developed by BL-2.2 at SLRI. The fibrinolytic inhibitory manner of AVPI-12 for plasmin determined by SAXS was compared with the fibrin in the condition with or without enzyme. α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for inhibitory reaction.

Results and Discussion

A protease inhibitor protein was purified from *A. vera* leaf gel using a cation exchange chromatography. The protein was eluted in the step of salt 0.1 M concentration (Fig. 1a). The purified protein migrated on 12.5 % SDS-PAGE as a single band and showed an apparent molecular weight lower than 14 kDa in both reducing and nonreducing conditions (Fig. 1b). The 2-mercaptoethanol-treated protein with either non-heated or heated at 95 °C before SDS-PAGE showed the same apparent molecular weight (Fig. 1b). Moreover, in the nonreducing SDS-PAGE, the protein migrated at the same molecular weight in either non-heated or heated at 95 °C conditions (Fig. 1b). However, the band protein on nonreducing SDS-PAGE migrated faster than those on the reducing SDS-PAGE (Fig. 1b). The result indicated that this protein was a monomeric protein and did not contain any interchain

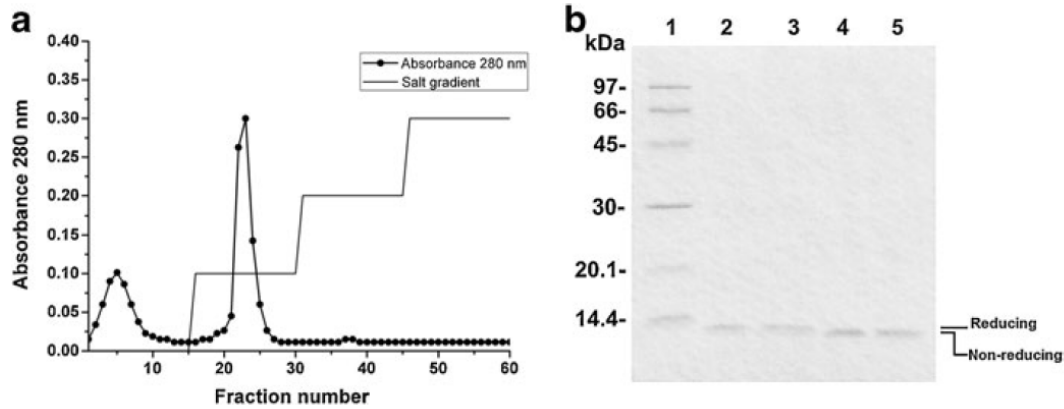


Fig. 1 Purification of AVPI-12 from *A. vera* leaf gel. **a** Chromatogram of the purification of AVPI-12 using the SP Sepharose™ Fast Flow column chromatography. The protein was eluted by 0.1 M NaCl (fraction numbers 20–27). **b** SDS-PAGE (12.5 %) of the purified protein. AVPI-12 (5 µg) was mixed with the SDS-PAGE sample buffer in the conditions of with (lanes 2 and 3) and without reducing agent (2-mercaptoethanol) (lanes 4 and 5). After mixing the protein with SDS-PAGE sample buffer, the protein mixture was also prepared by non-heating (lanes 1 and 4) and heating (lanes 2 and 5) at 95 °C for 5 min before SDS-PAGE. Lane 1 contains molecular weight protein markers

disulfide bond. In contrast, it might contain intrachain disulfide bonds [17]. The molecular mass of the protein was 11,804.931 Da, analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 2). Since the protein was purified from *A. vera* leaf gel and had molecular weight about 12 kDa including its proteolytic inhibition property, it was designated as AVPI-12. The molecular weight of AVPI-12 was similar to other plant protease inhibitors, which had been reported. For instance, cystatin family 1 generally has a molecular weight about 11 kDa [18]. In addition, the protease inhibitor proteins in the families Kunitz and Bowman-Brik usually have molecular weights about 18–24 and 8–10 kDa, respectively [5]. The pI of AVPI-12 was about 7.43 (Fig. 3). The N-terminal sequence of the protein analyzed by Edman degradation method was revealed as R–D–W–A–E–P–N–D–G–Y, and the sequence was different from other plant protease inhibitors in the BLAST databases and other reports (Table 1). In addition, AVPI-12 had amino acid sequence different from a 14-kDa protein isolated from *A. vera* leaf gel [19]. The protein had antifungal and anti-inflammatory properties which could inhibit trypsin activity using casein as a substrate [19]. Therefore, AVPI-12 was identified as a novel protease inhibitor based on the N-terminal amino acid sequences.

The tolerance of AVPI-12 for human plasmin, papain, and bovine trypsin digestions was tested by mixing the inhibitor with individual protease for 24 h, as described above. Since this study aimed to find an alternative antiplasmin from natural sources, a natural endoprotease inhibitor from human plasma (α_2 -macroglobulin) was used as a comparative inhibitor and also as a positive control on all AVPI-12 studies. By comparison with α_2 -macroglobulin, AVPI-12 could strongly resist to be digested by serine proteases, plasmin and trypsin, but partially be degraded by a cysteine protease, papain (Fig. 4a). The α_2 -macroglobulin strongly resisted to be digested by plasmin but was partially digested by trypsin. In addition, α_2 -macroglobulin was completely degraded by papain (Fig. 4b). The results showed that AVPI-12 could be more tolerant to proteolytic digestion than α_2 -macroglobulin.

AVPI-12 was characterized as a protease inhibitor by testing with some proteases (plasmin, papain, and trypsin) using human fibrinogen as a substrate. Both AVPI-12 and α_2 -macroglobulin could protect the γ -subunit of human fibrinogen from plasmin and trypsin digestions but not the A α and B β polypeptide chains (Fig. 5a, b). However, the inhibitory patterns of AVPI-12 and α_2 -macroglobulin for fibrinogenolysis by papain were different

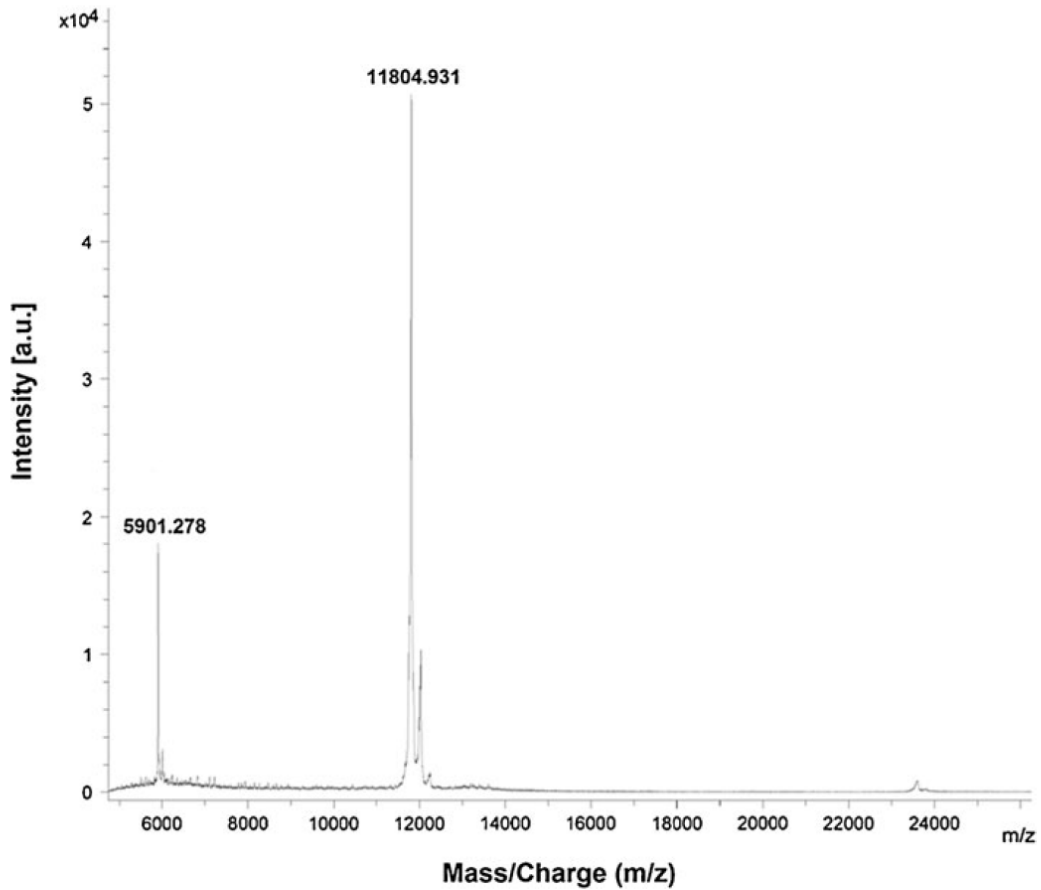


Fig. 2 MALDI-TOF mass spectrometry of AVPI-12. The molecular mass of AVPI-12 was 11,804.931 Da analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry in the positive ionization mode and using SA as the matrix

(Fig. 5a, b). AVPI-12 could protect γ -subunit of fibrinogen from papain digestion, in contrast, α_2 -macroglobulin could not. The results of protease tolerance test and fibrinolytic inhibitory pattern supported that AVPI-12 was a plant serine protease inhibitor. The inhibitor had properties similar to an unusual serine protease inhibitor (UPI) from the

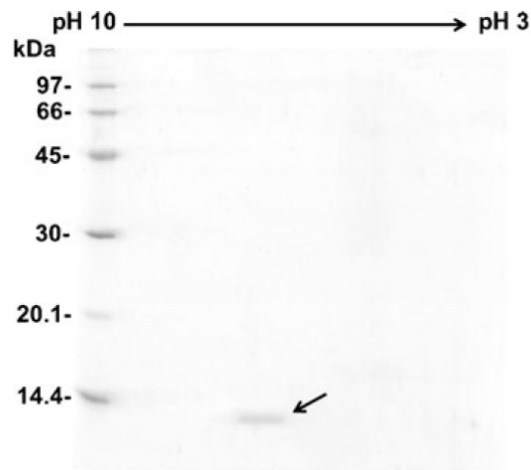


Fig. 3 2D SDS-PAGE of AVPI-12. The *arrow* indicates the protein band which has the estimated pI of about 7.43

Table 1 Comparison of the N-terminal amino acid sequences of AVPI-12 with other plant protease inhibitors

– no significant similarity found; *HCB-SunI*, *Helianthus annuus*, sunflower seeds cathepsin B inhibitor; *Potide-G*, potato tubers, *Solanum tuberosum* L. cv. Golden Valley serine protease inhibitor; *SSTI*, *Sapindus saponaria* L. seed trypsin inhibitor; *ERYLA*, *Erythrina latissima* trypsin inhibitor; *PROJU*, *Prosopis juliflora* trypsin inhibitor; *ACACO*, *Acacia confusa* trypsin inhibitor; *EATI*, *Entazada acaciifolia* (Benth.) seed trypsin inhibitor

Protease inhibitor	The first 10–11 amino acids at N-terminus	Similarity (%)
AVPI-12	RDWAEPNDGY	
Cysteine protease inhibitor (CPI)		
HCB-SunI [27]	PYGGGGTESG	–
Oryzacystatin I [18]	MSSDGGPVLG	–
CPI from apple fruit [18]	DNQGSANSVE	–
CPI from soybean [18]	AALEKVQELG	–
Heat-stable serine protease		
Potide-G [28]	QICTMCCAGRK	–
Kunitz trypsin inhibitor		
SSTI [29]	KTQVLDANGNI	–
ERYLA [30]	VLLDGNGEVVG	–
PROJU [31]	QELLDVDGEIL	–
ACACO [32]	KELLDADGDIL	–
EATI [5]	NELKDMEGDIL	–

Arabidopsis [20]. UPI could inhibit the serine protease but weakly against papain [20]. In addition, the fibrinolytic inhibitory activity of AVPI-12 against plasmin was shown in Fig. 6. AVPI-12 and positive control (α_2 -macroglobulin) could reduce the fibrinolytic activity of plasmin in the same manner in a dose-dependent fashion (Fig. 6).

The effect of AVPI-12 on fibrinolytic activity of plasmin was analyzed by preparing the partial cross-linked fibrin as the method described above and mixing with the enzyme prior

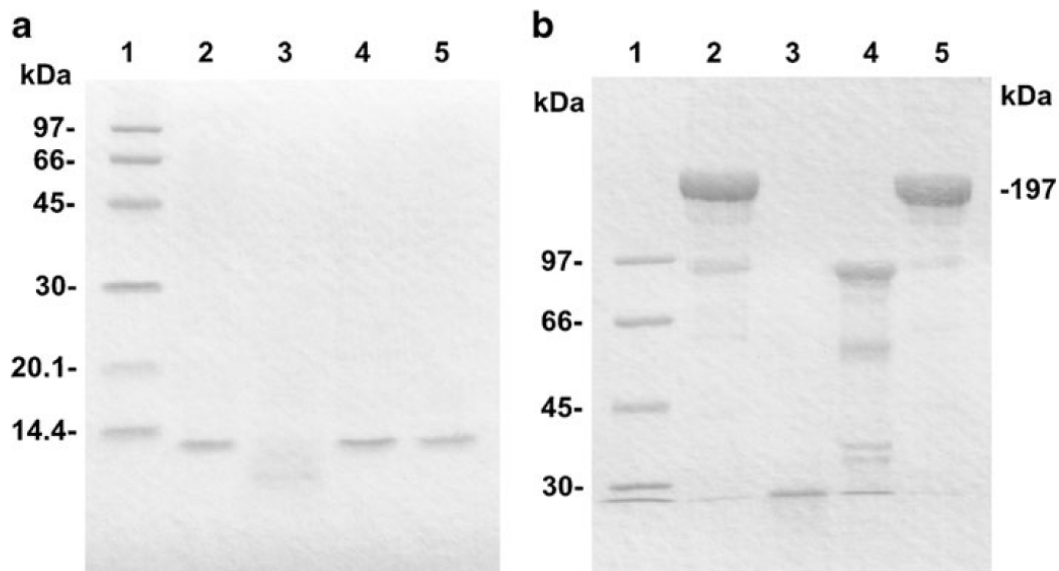


Fig. 4 Protease tolerance tests of both inhibitor proteins AVPI-12 (a) and human plasma α_2 -macroglobulin (b). Each inhibitor was individually mixed with protease, human plasmin (lane 2), papain (lane 3), and bovine trypsin (lane 4) and then incubated at 37 °C for 24 h. The degradation products are separated on 12.5 % SDS-PAGE for AVPI-12 and 7.5 % SDS-PAGE for α_2 -macroglobulin. The inhibitor in the condition without enzyme is used as control (lane 5). Lane 1 of all experiments contains standard molecular weight protein markers

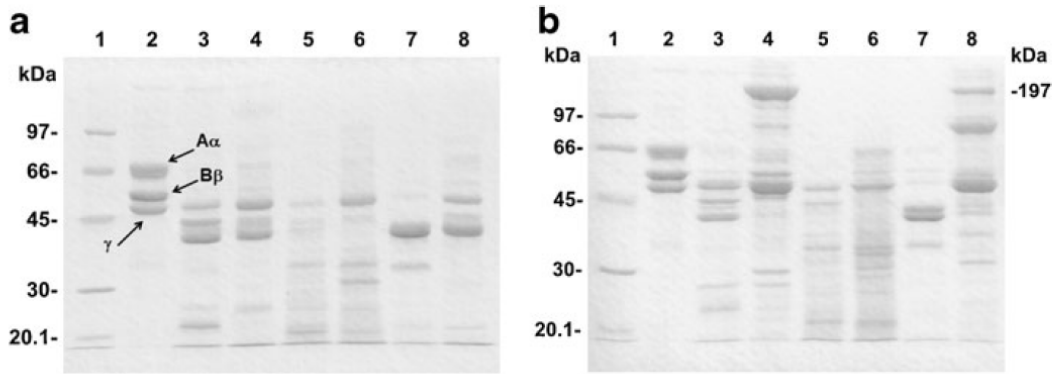


Fig. 5 Human fibrinogenolytic inhibitory patterns of AVPI-12 (a) by comparison with α_2 -macroglobulin (b). Each inhibitor (10 μg) was individually incubated with protease: plasmin (lane 4), papain (lane 6), and trypsin (lane 8) at 37 $^\circ\text{C}$ for 1 h. The mixture was individually added into a new tube containing human fibrinogen (50 μg) and then incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 120 min. The effect of inhibitors on fibrinogenolytic activity of all proteases is analyzed by separating the digested products on 10 % SDS-PAGE and observing the inhibitory patterns by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250. The experimental controls compose of human fibrinogen (lane 2); human fibrinogen in the condition without inhibitor which was individually digested by proteolytic enzyme: plasmin (lane 3), papain (lane 5), and trypsin (lane 7). Lane 1 of all experiments contains standard molecular weight protein markers

reacted to inhibitor. The fibrinolytic inhibitor activity of AVPI-12 by comparison with α_2 -macroglobulin was shown in Fig. 7. The inhibitory activities of AVPI-12 and α_2 -macroglobulin were 37.4 ± 1.0 and 41.1 ± 2.1 %, respectively. The result indicates that in the condition containing the same amounts of inhibitor and enzyme, AVPI-12 had slightly lower fibrinolytic inhibitory activity than the α_2 -macroglobulin. This result corresponded to the result of SAXS as shown in Fig. 8. The fibrin clot SAXS spectra presented in this study were similar to the spectra reported by Brown et al. [21]. The fibrin periodicity (d , presented its unit as nanometers) could be calculated from a function of the wave vector $q=2\pi/d$ [21]. The strong geometrical feature of the fibrin fiber (in the condition without plasmin) was located at the peak position $q=0.285 \text{ nm}^{-1}$, which was equal to the 22-nm periodicity (Fig. 8). The fibrin periodicity was changed slightly in the conditions containing only plasmin and plasmin combining with inhibitor. The peak positions of both conditions were located at $q \sim 0.288 \text{ nm}^{-1}$ or $d \sim 21.8 \text{ nm}$ (Fig. 8). However, the height of the peak in the condition digested by plasmin decreased significantly and could be observed as a nearly flat shape (Fig. 8). The solid gel state of fibrin

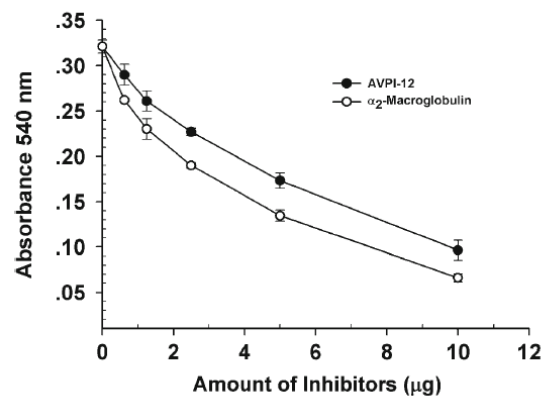


Fig. 6 The dose dependence of AVPI-12 for inhibition of human plasmin fibrinogenolytic activity. Various amounts of AVPI-12 were used to monitor the fibrinogenolytic inhibitory activity of human plasmin (2 μg). α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for plasmin inhibition activity

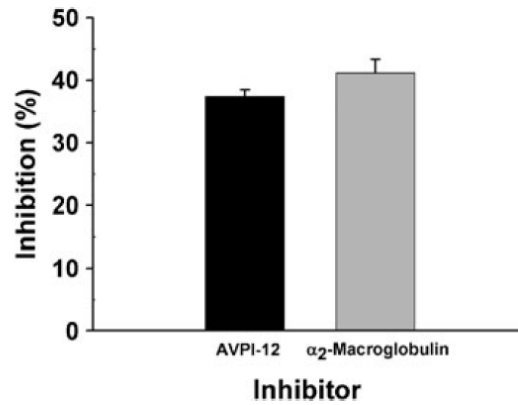


Fig. 7 The effect of AVPI-12 on human plasmin fibrinolytic activity. The partial fibrin clot was prepared and subjected to be digested by human plasmin in the condition with and without inhibitor. α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for the inhibition of plasmin fibrinolytic activity

clot was changed to liquid state after plasmin digestion, which is time dependent; therefore, the height of the peak was decreased by reducing the amount of fibrin packing. Figure 8 also showed that both inhibitors (AVPI-12 and α_2 -macroglobulin) contributed to the resistance from clot degradation by plasmin. The shape features of peak of fibrin clot in SAXS spectra in the conditions containing inhibitor–enzyme were similar to the clot spectra without enzyme, but the heights of peaks were lower (Fig. 8).

The combination between the results of fibrinogenolytic and fibrinolytic inhibitory activities of AVPI-12 in this study supported that AVPI-12 could inhibit the enzymatic activity of plasmin. AVPI-12 could protect the γ -subunit of human fibrinogen from plasmin digestion. This inhibitory activity was important because formation of the γ -subunit into polymers could produce the mature fibrin network structure and increase the resistance to fibrinolysis [22]. Moreover, the SAXS results also promoted that AVPI-12 could protect the fibrin clot from complete degradation by plasmin. Since the effects of AVPI-12 on plasmin digestion were similar to that of the natural plasma inhibitor (α_2 -macroglobulin), AVPI-12 could be used as a potential agent for the treatment of a disease or disorder, which involves the imbalance of homeostasis, for instance, a bleeding disorder caused by α_2 -antiplasmin

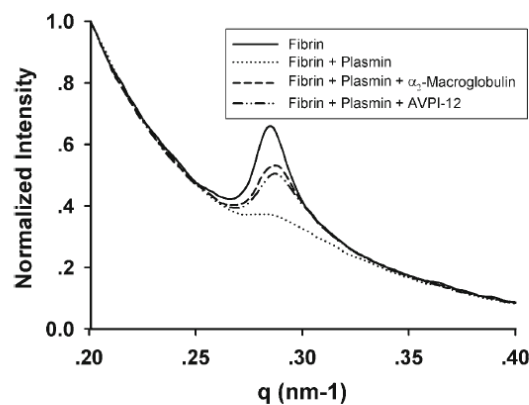


Fig. 8 The SAXS spectra in the determination of plasmin fibrinolytic inhibitory activity. Human fibrin clot was individually subjected to be digested by human plasmin at room temperature for 150 min in the condition with and without AVPI-12. The alteration of fibrin clot was determined by SAXS. α_2 -Macroglobulin was used as a positive control for the inhibition of plasmin fibrinolytic activity. All spectra are normalized and compared to the fibrin clot spectrum in the condition without enzyme and inhibitor

deficiency [23]. The imbalance of homeostasis can occur if the fibrin formation does not relate to fibrinolysis, which generally is regulated by activation and inhibition of plasmin activity [23, 24]. Moreover, antiplasmin drug, for example, aprotinin (a Kunitz-type protein [25]), can be used as antifibrinolytic treatment for reducing blood loss during surgery and in trauma [26]. These evidences suggested the potential use of AVPI-12 as an alternative drug for antifibrinolytic treatment in the future.

Conclusions

This study had achieved to isolate a novel monomeric protease inhibitor with molecular weight about 12 kDa (AVPI-12) from *A. vera* leaf gel. AVPI-12 had inhibitory property against protease similar to serine protease inhibitor. Moreover, the protein also acted as an unusual serine protease according to its papain inhibitor activity. The protein could strongly resist to serine protease enzymes (plasmin and trypsin) but weakly tolerate to cysteine protease (papain). In contrast, a natural plasma serine protease inhibitor, α_2 -macroglobulin, could only tolerate to plasmin. This indicated that AVPI-12 was more stable in the environment surrounding with proteases than α_2 -macroglobulin. AVPI-12 could protect the γ -subunit of human fibrinogen from plasmin and trypsin digestions similar to the inhibitory activity of α_2 -macroglobulin. In contrast with α_2 -macroglobulin, AVPI-12 could protect the γ -subunit of human fibrinogen from papain digestions. AVPI-12 could inhibit the activity of plasmin in a dose-dependent manner, which was the same manner as α_2 -macroglobulin. In addition, AVPI-12 had an effect on fibrinolytic activity of plasmin. The inhibitor could protect the fibrin clot from complete digestion by plasmin. This property was supported by the colorimetric fibrinolytic inhibitory test and SAXS analysis.

The inhibitory activity of AVPI-12 on fibrinogenolytic and fibrinolytic activities of plasmin promoted that the inhibitor had a potential to be used for antifibrinolytic treatment. However, further biochemical characterizations are needed, for instance, the inhibitory mechanism on plasmin and other blood coagulations.

Acknowledgments This research was supported by the Suranaree University of Technology Research Grant (SUT1-102-55-12-34). We also thank the Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, Thailand for providing facilities to do the SAXS experiment at BL-2.2 and analyses.

References

1. Batista, I. F., Oliva, M. L., Araujo, M. S., Sampaio, M. U., Richardson, M., Fritz, H., & Sampaio, C. A. (1996). *Phytochemistry*, *41*, 1017–1022.
2. Filho, J. X. (1992). *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, *4*, 1–6.
3. Carter, T. H., Everson, B. A., & Ratnoff, O. D. (1990). *Blood*, *75*, 108–115.
4. Bauw, G., Nielsen, H. V., Emmersen, J., Nielsen, K. L., Jørgensen, M., & Welinder, K. G. (2006). *FEBS Journal*, *273*, 3569–3584.
5. de Oliveira, C. F. R., Vasconcelos, I. M., Aparicio, R., Freire, M. d. G. M., Baldasso, P. A., Marangoni, S., & Macedo, M. L. R. (2012). *Process Biochemistry*, *47*, 929–935.
6. Popovic, M. M., Bulajic, A., Ristic, D., Krstic, B., Jankov, R. M., & Gavrovic-Jankulovic, M. (2012). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 3072–3078.
7. Padul, M. V., Tak, R. D., & Kachole, M. S. (2012). *Plant Physiol. Biochemistry*, *52*, 77–82.
8. Nakahata, A. M., Mayer, B., Ries, C., de Paula, C. A., Karow, M., Neth, P., Sampaio, M. U., Jochum, M., & Oliva, M. L. (2011). *Biological Chemistry*, *392*, 327–336.
9. Kim, J. Y., Park, S. C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J. W., Hahn, K. S., & Park, Y. (2009). *International Journal of Molecular Sciences*, *10*, 2860–2872.

10. Cruz-Silva, I., Gozzo, A. J., Nunes, V. A., Carmona, A. K., Faljoni-Alario, A., Oliva, M. L., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A., & Araujo, M. S. (2004). *Biological Chemistry*, 358, 1083–1086.
11. Hamman, J. H. (2008). *Molecules*, 13(2008), 1599–1616.
12. Bum, F. (2003). *Aloe vera in medicinal plants of the world* (2nd ed.). Totowa: Humana.
13. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.
14. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1993). *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
15. Rajesh, R., Nataraju, A., Gowda, C. D., Frey, B. M., Frey, F. J., & Vishwanath, B. S. (2006). *Biochimie*, 88, 1313–1322.
16. Satake, M., Murata, Y., & Suzuki, T. (1963). *Journal of Biochemistry*, 53, 438–447.
17. Primakoff, P., Hyatt, H., & Tredick-Kline, J. (1987). *The Journal of Cell Biology*, 104, 141–149.
18. Ryan, S. N., Laing, W. A., & McManus, M. T. (1998). *Phytochemistry*, 49, 957–963.
19. Das, S., Mishra, B., Gill, K., Ashraf, M. S., Singh, A. K., Sinha, M., Sharma, S., Xess, I., Dalal, K., Singh, T. P., & Dey, S. (2011). *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 38–43.
20. Laluk, K., & Mengiste, T. (2011). *The Plant Journal*, 68, 480–494.
21. Brown, A. E., Litvinov, R. I., Discher, D. E., Purohit, P. K., & Weisel, J. W. (2009). *Science*, 325, 741–744.
22. Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R., & Meh, D. A. (2001). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 936, 11–30.
23. Miles, L. A., Plow, E. F., Donnelly, K. J., Hougie, C., & Griffin, J. H. (1982). *Blood*, 59, 1246–1251.
24. Yeromonahos, C., Polack, B., & Caton, F. (2010). *Biophysical Journal*, 99, 2018–2027.
25. Kang, H. M., Kalnoski, M. H., Frederick, M., & Chandler, W. L. (2005). *Thrombosis Research*, 115, 327–340.
26. Roberts, I., Shakur, H., Ker, K., & Coats, T. (2012). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD004896.
27. Zhang, X. C., Shao, H. L., Wang, J. X., & Zhao, X. F. (2006). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21, 433–439.
28. Kim, M. H., Park, S. C., Kim, J. Y., Lee, S. Y., Lim, H. T., Cheong, H., Hahm, K. S., & Park, Y. (2006). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 681–686.
29. Macedo, M. L., Filho, E. B. D., Freire, M. G., Oliva, M. L., Sumikawa, J. T., Toyama, M. H., & Marangoni, S. (2011). *The Protein Journal*, 30, 9–19.
30. Ramos, S. V., Freire, M. G., Parra, J. R., & Macedo, M. L. (2009). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 152, 255–261.
31. Oliva, M. L., Silva, M. C., Sallai, R. C., Brito, M. V., & Sampaio, M. U. (2010). *Biochimie*, 92, 1667–1673.
32. Oliva, M. L., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F., Araujo, M. S., Silveira, V. F., Auerswald, E. A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M. U., Sampaio, C. A. (2000). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1477, 64–74.

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ นางสาวจรรววรรณ ศิริเทพทวิ

การศึกษา/คุณวุฒิ: พ.ศ. 2538 ปริญญาตรี: วท.บ. (เทคนิคการแพทย์)

พ.ศ. 2541 ปริญญาโท: วท.ม. (ชีวเคมี)

พ.ศ. 2547 ปริญญาเอก: วท.ด. (ชีวเคมี)

ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงาน: สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ที่อยู่ติดต่อได้: สาขาชีวเคมี สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง
จ.นครราชสีมา 30000 E-mail: jaruwan_siritape@yahoo.com

ผลงานทางวิชาการ/ผลงานวิจัย (ภายใน 5 ปี)

Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W. (2008) An attempt of kidney stone analysis with the application of synchrotron radiation. *J Synchrotron Radiat.* 15: 158-161.

Pattanasiriwisawa, W., Siritapetawee, J., Patarapaibblich, O., Klinpituksa, P., and Klysubun, W. (2008) Structural analysis of sulfur in natural rubber using X-ray absorption near edge spectroscopy. *J Synchrotron Radiat.* 15: 510-513.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J. (2009) The 1.9 Å X-ray structure of egg-white lysozyme from Taiwanese soft-shelled turtle (*Trionyx Sinensis* Wiegmann) exhibits structural differences from the standard chicken-type lysozyme. *J Biochem.* 145: 193-198.

Pattanasiriwisawa, W., Sirinupong, N., Suwanmanee, P., Daengkanit, C., Siritapetawee, J. (2009) An attempt to analyze the bark disease in *Havea brasiliensis* using X-ray absorption near-edge spectroscopy. *J Synchrotron Radiat.* 16(Pt5): 622-627.

Siritapetawee, J., Pattanasiriwisawa, W., Sirithethawee, U. (2010) Trace element analysis of hairs in patients with dementia. *J Synchrotron Radiat.* 17(Pt2): 268-272.

Siritapetawee, J., Thammasirirak, S. (2011) Purification and characterization of a heteromultimeric glycoprotein from *Artocarpus heterophyllus* latex with an inhibitory effect on human blood coagulation. *Acta Biochim Pol.* 58: 521-528.

Jandaruang, J., Siritapetawee, J., Thumanu, K., Songsiriritthigul, C., Krittanai, C., Daduang, S., Dhiravisit, A., Thammasirirak, S. (2012) The effects of temperature and pH on secondary structure and antioxidant activity of *Crocodylus siamensis* hemoglobin. *Protein J.* 31: 43-50.

- Siritapetawee, J., Thammasirirak, S., Samosornsuk, W. (2012) Antimicrobial activity of a 48-kDa protease (AMP48) from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 16:132-137.
- Siritapetawee, J., Thumanu, K., Sojikul, P., Thammasirirak, S. (2012) A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. *Biochim Biophys Acta.* 1824: 907-912.
- Siritapetawee, J., Sojikul, P., Soontaranon, S., Limphirat, W., and Thammasirirak, S. (2013). A Protein from *Aloe vera* that Inhibits the Cleavage of Human Fibrin(ogen) by Plasmin. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013 Jun 29. [Epub ahead of print] (DOI10.1007/s12010-013-0356-2).

