

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00220

• 综述 •

基于重组组织因子凝血活酶试剂的研究进展

孙金霞¹, 郭振中³, 孙雷¹, 景元霞¹, 黄耀江^{1,2*}

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081
2. 中国民族地区环境资源保护研究所, 北京 100081
3. 冀中能源峰峰集团总医院, 邯郸 056200

[摘要] 在20世纪90年代出现可纯化组织因子(TF)之前,凝血活酶试剂由人或动物组织粗提物制成。近年来,已经改用高度纯化的重组组织因子(rTF)或可溶性组织因子(sTF)来制备凝血活酶试剂。本文综述了国内外基于重组组织因子的凝血酶原试剂研发技术的发展历程,归纳重组凝血活酶试剂优于组织提取物试剂的特点,分析凝血活酶的发展趋势,并指出高灵敏性和稳定性重组凝血活酶是未来凝血活酶的发展方向。

[关键词] 凝血活酶试剂;凝血酶原时间;组织因子;重组组织因子;可溶性组织因子

[中图分类号] R 446.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)02-0220-04

Recombinant tissue factor-based thromboplastin reagents: research progress

SUN Jin-xia¹, GUO Zhen-zhong³, SUN Lei¹, JING Yuan-xia¹, HUANG Yao-jiang^{1,2*}

1. College of Life and Environment Science, Minzu University of China, Beijing 100081, China
2. Chinese Institute of Environment and Resource Protection for Minority Areas, Beijing 100081, China
3. General Hospital of Fengfeng Group, Jizhong Energy Group, Handan 056200, Hebei, China

[Abstract] Thromboplastin reagents were made from natural tissues of human or animals before the emergence of tissue factor (TF) which can be purified in 1990s. In recent years, highly purified recombinant tissue factor (rTF) or soluble tissue factor (sTF) has been used to prepare thromboplastin reagents. This article reviewed the evolution of technique for preparing recombinant tissue factor-based thromboplastin reagents both at home and abroad, and summarized the advantages of recombinant tissue factor and analyzed the future of thromboplastin reagents. It has been pointed out that highly sensitive and stable thromboplastin reagents are needed in the future.

[Key words] thromboplastin reagent; prothrombin time; tissue factor; recombinant tissue factor; soluble tissue factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(2): 220-223]

凝血酶原时间(prothrombin time, PT)测定是外源性凝血系统的检测项目之一,常用做血栓形成前的诊断和口服抗凝剂治疗的监测指标。凝血活酶试剂(thromboplastin reagent)也可称为凝血酶原时间体外检测试剂(prothrombin time reagents)、PT试剂。其主要由凝血活酶,磷脂混合物,钙离子三部分组成。试剂中最重要的成分是凝血活酶,即凝血因子Ⅲ,通常称为组织因子(tissue factor, TF)。凝血活酶的优劣直接影响检测结果的准确性。

20世纪90年代出现可纯化组织因子之前,凝血活酶试剂由来源于人或动物的相对粗的组织提取物制成。基于组织提取的凝血活酶试剂,其组织因子长期以来主要来源于兔

脑^[1]、牛脑^[2]、人脑及人的胎盘^[2]等组织,其中人脑和人的胎盘制备的凝血活酶试剂的敏感性最高^[2-3]。但是各种基于组织提取的凝血活酶试剂在稳定性和生物活性方面均不尽人意。凝血活酶试剂的质量是PT实验的关键因素,其中一种能有效降低各实验室测定结果差异的方法是统一试剂中凝血活酶的化学组成和生化特性,采用基因工程方法制备的重组凝血活酶分子结构稳定,蛋白均一,有利于提高实验的敏感度、精密度和准确度。

市面上的凝血活酶试剂质量良莠不齐,以进口试剂居多,且价格昂贵。国内凝血活酶试剂的研发仅有上海、山西、河北等少数地区在进行,关于凝血活酶试剂生产技术的报道

[收稿日期] 2011-05-03 **[接受日期]** 2011-10-11

[基金项目] 高等学校学科创新引智计划(B08044),国家“985”及“211”工程项目(CUN985-3-3),北京市校企合作产学研项目。Supported by the “111” Project(B08044), National “985” Project & “211” Project(CUN985-3-3), and University-Enterprise Cooperation Project on Production, Education & Research Project of Beijing.

[作者简介] 孙金霞,硕士生。E-mail: sunjinxia126@sina.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 010-68933290, E-mail: yaojiangh@hotmail.com

很少。本文参考大量国内外文献和专利,研究了国内外重组凝血活酶试剂的生产技术。

1 基于重组组织因子的凝血活酶试剂

随着分子生物学技术的发展,人们越来越多的利用基因工程技术来生产人或兔的组织因子,如重组组织因子(recombinant tissue factor, rTF)包括组织因子的胞外区、跨膜区,可溶性组织因子(soluble tissue factor, sTF)即组织因子的胞外区。美国专利 US7049087(2008)^[4]采用嵌合蛋白结合磷脂酰丝氨酸,并对可溶性组织因子活性进行研究,以便替代兔脑粉用于PT实验。结果表明:在磷脂存在的条件下,sTF有明显的促凝血活性,可以替代兔脑粉用于PT实验。近年来,已经使用高度纯化的rTF和sTF来制备凝血活酶试剂。基于重组组织因子的凝血活酶试剂相比基于组织提取的凝血活酶试剂具有如下优点:(1)凝血酶原时间检测的精度和敏感性有所提高;(2)试剂质量稳定,保存时间更长;(3)试剂成分明确,有利于全国乃至全世界的实验室和医院检测结果的比较。

1.1 重组组织因子在原核微生物中的克隆和表达

重组组织因子在原核生物中的克隆和表达的报道很多,相关技术也很成熟。例如,美国专利 US5418141C1(2009)^[5]描述了在PT检测中使用重组凝血活酶来提高检测的精确度;美国专利 US20090162880A1(2009)^[6]公开了用于PT检测的一种凝血活酶试剂以及制备方法;美国专利 US7622437(2009)^[7]介绍了用脂质泡包含组织因子以使组织因子具有促凝血活性的方法。李代宗等^[8]研究了兔脑组织因子在大肠杆菌中的克隆与表达,其制成的试剂对血浆有明显的促凝活性。复旦大学的专利(2004)^[9]研究了人组织因子的制备和表达。该专利中sTF在大肠杆菌的表达是通过提高发酵温度诱导形成包涵体沉淀物,而较高的培养温度常会降低可溶性蛋白的表达水平,同时包涵体沉淀需要经过蛋白质变性及复性才能得到有活性的组织因子。该专利提供了sTF在大肠杆菌中的表达方法,但过程繁琐,产物均一性和活性都不够理想。太原博奥特生物技术有限公司专利(2005)^[10]进行了创新,该专利涉及人重组组织因子(rTF)的构建、表达、纯化方法及应用。该专利中rTF随培养基中磷的消耗而直接表达,不需增加诱导物和对蛋白质进行变性和复性,简化了发酵工艺,提高了表达率,采用组织因子单抗纯化rTF蛋白,不会受到不可逆损伤,获得rTF的纯度和收率有所提高,同时制备的rTF试剂的稳定性和敏感性也均得到了提高。但是,原核生物中有活性的人组织因子的表达还是受到了一些阻碍,原核生物中合成的真核蛋白因为缺乏蛋白合成后加工,或因折叠的方式不正确,或因折叠的效率低下,结果活性都很低,需要做更多的改进。

1.2 重组组织因子在真核微生物中的克隆和表达

与大肠杆菌相比,真核微生物(如酵母)非常有利于真核基因的表达,能有效克服大肠杆菌系统缺乏蛋白翻译后加工、不能正确修饰与折叠的不足。上海长岛生物技术有限公司专利^[11]

研究人的凝血活酶基因在酵母中的表达,得到的组织因子分子结构稳定,蛋白均一。更重要的是,以其为原料制成的凝血活酶试剂对凝血因子具有极高的敏感性,而且准确性好,从而提高了凝血活酶试剂质量,是临床检验上的新一代标准化试剂。王羽雄等^[12]将人的sTF在酵母中表达,sTF酯化后具有促凝血活性,且纯化工艺简便易行,蛋白回收率高。纯化后的sTF可用于组装PT测定试剂盒,为研制凝血活酶试剂及研究TF的构效关系创造条件。酵母表达系统表达水平较高,产物以活性状态分泌到培养液中,易于纯化,但是酵母菌中生产的组织因子仍然存在翻译后加工不足,不能充分糖基化、磷酸化、酰胺化、糖基化,因此生产的组织因子活性低。

1.3 重组组织因子在动物细胞中的克隆和表达

rTF及sTF已分别在大肠杆菌和酵母中表达,并进行了性质研究。原核微生物和真核微生物体系均可表达有活性的rTF或sTF,但表达量相对低,且糖基化程度不同,相对分子质量不均一。于是人们开始了组织因子在哺乳动物细胞中表达的研究,蔡旭等^[13]用脾内微量注射免疫法制备抗重组可溶性组织因子单克隆抗体。王羽雄等^[14]构建组织因子表达质粒并转染小鼠骨髓瘤细胞SP2/0,分泌表达有活性的组织因子。方峻等^[15]研究人组织因子基因表达载体的构建及其在人卵巢癌细胞系中的表达,成功地构建了TF真核表达载体,并建立了稳定、高效表达TF的人卵巢癌细胞系。美国专利 US7592502(2009)^[16]用小鼠来表达人的组织因子,为研究凝血活酶在哺乳动物中的表达打下了一定的基础。除了哺乳动物外,国外学者研究了组织因子在蚕蛹中或蚕蛹细胞中的表达^[17-18]。重组蛋白在动物细胞中的克隆和表达,产物能够充分修饰并具有稳定的生物活性。另外,转基因动物提供了一个经济、安全的生产重组蛋白质系统^[19-20]。重组蛋白在动物细胞中的克隆和表达在短短几十年时间内已取得巨大成就,但目前仍处于发展阶段。某些产品已进入商业化生产,但仍有一些问题需要解决。目前该方面的研究存在理论基础薄弱、技术不完善等问题。

1.4 重组组织因子在植物细胞中的表达

虽然微生物被用来表达rTF和sTF的报道很多,可是从微生物提纯的组织因子必须与磷脂或合成脂类结合才能发挥启动凝血过程的作用,酯化过程增加了试剂制备的成本。美国专利 US20070292490A1(2007)^[21]用转基因植物来生产组织因子,即植物生物反应器。这是介于微生物和动物细胞之间的另外一种生产组织因子的系统,有许多关于植物生产蛋白的优点:(1)可以直接提纯和进行大批量的生产^[22-24]。(2)生产成本低^[25]。(3)植物细胞具有全能性,易于获得再生植株,培养周期较短;另外,转基因植物通过自交得到的后代遗传性状稳定,从而可以在植物体内积累多基因^[26]。(4)无毒副作用,安全性好^[27]。(5)植物中的蛋白加工途径相对保守,表达产物能正确进行糖基化、磷酸化、酰胺化及翻译后加工过程,因此表达产物具有与高等动物一样的免疫原性和生物活性^[28]。

2 其他成分说明

凝血活酶试剂中除了最主要的凝血活酶成分外还需要磷脂^[29],磷脂的作用非常重要,组织因子必须有磷脂存在时,才能表现活性。在磷脂存在下,sTF有明显的促凝血活性,可以替代兔脑粉用于PT实验。凝血活酶试剂中提到的磷脂是一种混合物,一般包括磷脂酰胆碱(PC)、磷脂丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰甘油(PG)、磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)。其中磷脂酰丝氨酸是最有效的带负电荷的磷脂。磷脂成分和比例对于组织因子活性影响较大,因此有必要进行研究发现最佳的磷脂组合。基于组织提取的凝血活酶试剂直接从兔脑、胎盘或其他组织中提取凝血活酶和磷脂混合物,磷脂的成分和比例不清楚。近期的专利 US20080260858 (2008)^[30]对凝血活酶试剂中磷脂的组成、各组成成分之间的比例和磷脂总体在试剂中比例进行研究,得出了最佳的组合范围。凝血活酶试剂中的另一个成分是Ca²⁺,Ca²⁺在溶液中的比例在不同的参考文献中较为一致,为0.025 mol/L。除此之外,缓冲液中加入甘氨酸、钠、钾、钙等成分。另外需添加防腐剂以确保试剂性质较长时间的稳定。

关于如何配制质量好、敏感性高的检测试剂,国外不少机构进行了研究和创新,例如,美国伊利诺斯大学的专利(2008)^[30]公开一种凝血活酶试剂,包含:活化的sTF、金属螯合脂质、金属离子和磷脂。该专利另辟蹊径,活化的sTF通过C-末端的组氨酸标签可以和金属螯合脂质的金属结合,容许sTF蛋白结合到含有金属螯合脂质的磷脂囊泡。这种方式与泡囊结合的活化sTF基本上表现出类似膜锚定的rTF的性质,并且具有rTF可比较的促凝血活性。另外,该专利对磷脂的组成比例进行了详细研究。此外在其他的美国专利中也提到用金属螯合剂来螯合组织因子,使组织因子具有促凝血的生物活性^[17-18]。

3 凝血活酶试剂的研制展望

重组组织因子,蛋白质均一稳定,是WHO(World Health Organization)推荐的新一代凝血活酶试剂之一,其敏感度趋向统一。重组组织因子消除了不同来源试剂ISI值尚存在的差异因素,对凝血因子缺乏具有极高的敏感性,准确性好,提高了PT试剂的质量,向PT试验的标准化又迈进了一步。重组组织因子进而与磷脂结合构建重组的PT试剂,彻底克服了基于组织提取PT试剂的缺点,为PT实验标准化提供重要保障。

相比组织因子在原核生物和真核生物中表达情况,哺乳动物细胞容易被重组DNA质粒转染,具有遗传稳定性和可重复性,表达的蛋白质在翻译后被加工的机会较多,可提高产物正确构型的概率。但是生产成本高,不利于大规模生产。另外,在产生转基因动物的过程中会导致意想不到的结果,如:转基因效率低、基因表达效率低、表达载体仍然需要进一步的完善等。植物生物反应器被誉为“分子农田”,它具有无限生产重组蛋白的巨大潜力。利用转基因植物表达的

重组蛋白具备原有的理化性质和生物活性,从而为人类提供了一种大量生产药用蛋白的安全、经济、方便的新生产体系。目前已广泛应用于工业、农业尤其是生命科学以及医学制造领域。然而,转基因植物产物的表达量、下游加工等问题却也成为利用植物生物应用器应用的限制因素。但以植物作为“生产工厂”是一种经济并极具诱惑力的生产方式,若对影响基因表达水平的研究有了突破,我们将通过植物生产系统得到高收率、高质量的组织因子,从而在提高凝血活酶试剂质量的同时降低凝血活酶试剂的生产成本。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 上海太阳生物技术有限公司. 临床检验凝血酶原时间(PT)测定体外诊断试剂盒:中国,1952169A[P]. 2007-04-25.
- [2] Baxter R Diagnostics Inc. Extraction methods for preparing thromboplastin reagent:US,5426031A[P/OL]. 1995-06-20. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO2&Sect2 = HITOFF&p = 1&u = % 2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsearch-bool. html&r = 10&f = G&l = 50&co1 = AND&d = PTXT&s1 = 5426031&OS = 5426031&RS = 5426031](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=10&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=5426031&OS=5426031&RS=5426031)
- [3] Helena Laboratories Corporation. Method for preparing a thromboplastin extract:US,5512304A[P/OL]. 1996-04-30. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO2&Sect2 = HITOFF&p = 1&u = % 2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsearch-bool. html&r = 5&f = G&l = 50&co1 = AND&d = PTXT&s1 = 5512304&OS = 5512304&RS = 5512304](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=5&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=5512304&OS=5512304&RS=5512304)
- [4] Lifescan Inc. Method for manufacturing a tissue factor-based prothrombin time reagent: US, 7049087 [P/OL]. 2006-05-23. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO2&Sect2 = HITOFF&p = 1&u = % 2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsearch-bool. html&r = 22&f = G&l = 50&co1 = AND&d = PTXT&s1 = 7049087&OS = 7049087&RS = 7049087](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=22&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7049087&OS=7049087&RS=7049087)
- [5] Avocet Medical Inc. Test articles for performing dry reagent prothrombin time assays:US,5418141C1[P/OL]. 1995-05-23. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO2&Sect2 = HITOFF&p = 1&u = % 2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsearch-bool. html&r = 29&f = G&l = 50&co1 = AND&d = PTXT&s1 = 5418141&OS = 5418141&RS = 5418141](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=29&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=5418141&OS=5418141&RS=5418141)
- [6] Andreas R. Thromboplastin reagent with long-term stability: US,20090162880A1[P]. 2009-06-25.
- [7] The Board of Trustees of the University of Illinois. Tissue factor compositions and methods:US,7622437[P/OL]. 2009-11-24. [http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser? Sect1 = PTO2&Sect2 = HITOFF&p = 1&u = % 2Fnethtml% 2FPTO% 2Fsearch-bool. html&r = 29&f = G&l = 50&co1 = AND&d = PTXT&s1 = 7622437&OS = 7622437&RS = 7622437](http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=29&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7622437&OS=7622437&RS=7622437)

- 2FPTO% 2Fsearch-adv. htm&r = 1&f = G&l = 50&d = PTXT&S1=7622437&OS=7622437&RS=7622437
- [8] 李代宗,倪志华,赵晓瑜. 兔脑组织因子基因在大肠杆菌中的克隆与表达[J]. 河北大学学报:自然科学版,2007,27:83-86.
- [9] 复旦大学. 重组可溶性组织因子及其制备方法和应用:中国,1496992A[P]. 2004-05-19.
- [10] 太原博奥特生物技术有限公司. 人重组组织因子的构建表达、纯化方法及其应用:中国,1687125A[P]. 2005-10-26.
- [11] 上海长岛生物技术有限公司. 一种基于人重组凝血活酶的液体型PT试剂的制备方法:中国,101294163A[P]. 2008-10-29.
- [12] 王羽雄,于敏,顾银良,宋后燕. 人组织因子在毕赤酵母中的表达和纯化[J]. 复旦学报:医学版,2008,35:811-814.
- [13] 蔡旭,彭卓醇,孔德升,郭泓坤,白浩,宋后燕,等. 脾内微量注射免疫法制备抗重组可溶性组织因子单克隆抗体[J]. 复旦学报:医学版,2006,33:92-96.
- [14] 王羽雄,马春娟,顾银良,宋后燕,于敏. 人源性组织因子在SP2/0细胞中的初步表达[J]. 药物生物技术,2009,16:194-197.
- [15] 方峻,魏文宁,刘仲萍,宋善俊. 人组织因子基因表达载体的构建及其在人卵巢癌细胞系中的表达[J]. 中国实验血液学杂志,2003,11:579-582.
- [16] Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha. Knock-in non-human animal producing human tissue factor: US,7592502[P/OL]. 2009-09-22. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=2&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7592502&OS=7592502&RS=7592502>
- [17] Sysmex Corporation. Reagent for measuring clotting time and method for stabilizing tissue factor: US,7867771A1[P/OL]. 2011-01-11. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7867771&OS=7867771&RS=7867771>
- [18] Sysmex Corporation. Reagent for measuring clotting time and method for manufacturing the reagent: US,7897333B2[P/OL]. 2011-03-01. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PTXT&s1=7897333&OS=7897333&RS=7897333>
- [19] Boland M J, Hazen J L, Nazor K L, Rodriguez A R, Gifford W, Martin G, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2009, 461: 91-94.
- [20] Echelard Y, Williams J L, Destremes M M, Koster J A, Overton S A, Pollock D P, et al. Production of recombinant albumin by a herd of cloned transgenic cattle[J]. Transgenic Res, 2009, 18: 361-376.
- [21] Valentin N, Hing C W, Dean T, Kai-Ping H. Production of tissue factor in plants: US, 20070292490A1[P]. 2007-12-20.
- [22] Metanomics GmbH. Process for the production of fine chemicals: US, 20070118916A1[P]. 2007-05-24.
- [23] Novo Nordisk Healthcare A/G. Method for the production of recombinant proteins: US, 20090221800 A1[P]. 2009-09-03.
- [24] iBio Inc. Production of foreign nucleic acids and polypeptides in sprout systems: US, 7692063B2 [P/OL]. 2010-04-06. <http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnethtml%2FPTO%2Fsearch-adv.html&r=2&f=G&l=50&d=PTXT&S1=7692063&OS=7692063&RS=7692063>
- [25] Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, et al. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 14701-14706.
- [26] Thompson P B, Hannah W. Food and agricultural biotechnology: a summary and analysis of ethical concerns[J]. Adv Biochem Eng/Biotechnol, 2008, 111: 229-264.
- [27] Delaney B, Astwood J D, Cunny H, Conn R E, Herouet-Guicheney C, Macintosh S, et al. Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46 Suppl 2: S71-S97.
- [28] Chichester J A, Musiychuk K, de la Rosa P, Horsey A, Stevenson N, Ugulava N, et al. Immunogenicity of a subunit vaccine against Bacillus anthracis[J]. Vaccine, 2007, 25: 3111-3114.
- [29] Koeppe J R. Biophysical Characterization of the Activity State of Thrombin[D]. US: University of California, 2006.
- [30] The Board of Trustees of the University of Illinois. Universal procoagulant: US, 20080260858A1[P]. 2008-10-23.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩