

## 微生物源纤溶酶的研究进展\*

文浩平, 和七一, 邓疆渝, 李金波, 余晓东

(重庆师范大学 生命科学学院 重庆市动物生物学重点实验室 重庆市生物活性物质工程研究中心, 重庆 400047)

**摘要** 溶栓疗法是目前用于治疗血栓性疾病安全可靠并且有效的方法, 采用传统的溶栓药物在治疗血栓病上已经取得了显著的成绩, 但还是存在着一定的缺陷, 所以应用也受限制。目前, 利用微生物发酵产生的纤溶酶制成新型的溶栓药物已成为研究热点。本文对从不同微生物中所提取和纯化的纤溶酶的理化性质、结构特征、生物学活性及开发现状等方面的研究资料进行了全面系统的归纳总结。结果发现, 早期研究和发现的链激酶与葡激酶, 已通过临床试验用于血栓性疾病, 其效果稳定可靠, 前期深入研究的芽孢杆菌及链霉菌来源的纤溶酶, 其理化性质与酶学活性都已被研究清楚, 其中多种纤溶酶已被尝试用于制备新型溶栓药, 近期发现的粪链球菌、海洋假单胞菌、白色假丝酵母菌、镰孢菌、米曲霉菌、藤黄微球菌、黄绿蜜环菌等等, 所产生的纤溶酶也为新型溶栓药的开发提供了更多的可用之材。随着更为广泛和深入的研究, 自然界中的大量微生物会为人制备新型溶栓药提供更多可用的资源。

**关键词** 微生物; 发酵; 纤溶酶; 溶栓药物

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2011)03-0060-04

近年来, 由血栓及动脉粥样硬化引起的心血管系统疾病已成为人类最主要的死亡原因之一<sup>[1]</sup>。现今所用的溶栓药物存在一定的缺陷, 主要表现在初始再灌注延迟或失败、出血等不良反应, 以及再梗死等问题, 并且其大多数都价格昂贵, 所以, 人们开始寻找新的纤溶酶来源, 以便于研究和开发出高效、快速防止再栓塞及减低出血等不良反应的新型优良溶栓药物。自然界中存在的许多纤溶酶供体, 微生物种类多, 繁殖快, 容易培养。因此, 以微生物为来源生产溶栓剂—纤溶酶, 具有广阔的前景。

从不同微生物中提取和纯化的纤溶酶, 其理化性质和生物学活性均存在一定差异。本文着重就这些方面的研究进展作一综述。

### 1 链激酶 (Streptokinase, SK) 和葡激酶 (Staphylokinase, SaK)

早在 1949 年, 研究人员就从  $\beta$ -溶血链球菌 (*Streptococcus homolyticus*) 的发酵代谢产物中发现了链激酶, 它便成为最早用于临床的溶栓剂, 主要应用于治疗心肌梗塞, 其分子量为 47 ~ 50.2 kD。SK 进入血液循环后, 必须与纤溶酶原 (PLG) 以 1:1 比例结合形成 PLG-SK 复合物, 复合物中纤溶酶原活化位点通过三维结构的改变暴露在分子表面, 从而能

激活纤溶酶原使其成为有活性的纤溶酶<sup>[2]</sup>。由于天然产生的 SK 具有抗原性, 在应用 SK 治疗的过程中, 严重的免疫反应时有发生, 从而导致出血综合症, 另外 SK 半衰期短, 影响了药效的发挥。为了保证 SK 应用的安全性和有效性, 已有研究者通过杂交瘤技术制备抗 SK 单克隆抗体 (mAb), 通过竞争性结合实验, 研究其分子结构与免疫原性之间的关系, 现已取得了一定的成效, 并且已经应用于临床, 起到了一定的效用。

葡激酶 (Staphylokinase, SaK) 是由金黄色葡萄球菌分泌的一种胞外蛋白质, 是由 4 种纤溶酶原激活因子构成的蛋白质家族, 4 个成员分别是 STAN、STA-CM-I、STA-CN-II、STAR-C, 它们的分子量均为 16.5 kD。葡激酶的作用机制与 SK 有相似之处, 它也是必须先形成无活性的复合物 PLG-SaK, 继之在机体产生的少量纤溶酶启动下, 使得纤溶酶原活性部位暴露, 从而由单链变为双链的纤溶酶, 形成有活性的 Pli-SaK 复合物, 后者进一步激活纤溶酶原分子, 使之转变为纤溶酶并进一步溶解血栓<sup>[3]</sup>。动物血栓模型实验显示, SaK 溶解富含血小板的动脉血栓并使血管维持再通状态的疗效明显优于 SK, 其中 STAR-C 能使更多的栓塞血管畅通, 所用时间也较短。通过体内实验证明 SaK 具有极强的纤维蛋白特

\* 收稿日期 2011-01-09 修回日期 2011-04-19 网络出版时间 2011-05-16 10:13:00

资助项目: 重庆市高校优秀成果转化项目 (No. kjzh08213), 重庆市教委科研项目 (No. KJ090824)

作者简介: 文浩平, 男, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质化学, 通讯作者: 余晓东, E-mail: yxd@cqu.edu.cn

异性,这一特点与 SK 完全不同。一期临床试验已经证明,STAR-C 对纤维蛋白原、纤溶酶原、 $\alpha_2$  抗纤溶酶都不存在系统的副作用。虽然,到目前为止尚未见 SaK 引起过敏反应的报道,但 SaK 来源于细菌,有着潜在的免疫原性。研究人员已正在尝试用蛋白质工程的技术来降低其免疫原性,并已取得了一定的成果<sup>[4]</sup>。

## 2 芽孢杆菌来源的纳豆激酶

纳豆是日本的传统大豆发酵食品。研究者发现,这些发酵食品具有产纤溶活性物质的微生物,它们主要是芽孢杆菌类微生物,而纳豆正是由枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)或纳豆杆菌(*Bacillus natto*)发酵大豆制成的。

1987年,日本学者 Sumi 等首先在纳豆中发现和提取出具有溶解血栓功能的活性物质,并定名为纳豆激酶(Nattokinase, NK)<sup>[5]</sup>。纳豆激酶在酶学分类上称为枯草杆菌蛋白酶 NAT(Subtilisin NAT)。根据纳豆激酶基因的 DNA 序列推测氨基酸的一级序列<sup>[6]</sup>,可知该激酶是由 275 个氨基酸残基组成的单链多肽,准确分子量应为 27.728 kD。纳豆激酶的序列中含有 8 个赖氨酸残基,没有半胱氨酸残基,内肽酶可将其水解成为 9 个小肽。纳豆激酶的活性部位在 Asp-32, His-64 和 Ser-221 处,与底物的结合部位在 Ser-125, Leu-64, Gly-127 处 3 个活性位点位于纳豆激酶底物结合口袋表面,而 3 个底物结合位点位于底物结合口袋的底部<sup>[7]</sup>。纳豆激酶与其他枯草杆菌蛋白酶同源性极高:与枯草杆菌蛋白酶 E 在核苷酸序列组成上一致性达 99.5%;与枯草杆菌蛋白酶 Amy-losacchariticus 一致性达 99.3%;与 Subtilisin Carlsberg, Subtilisin BNP 和 Subtilisin DY 分别具有 69%、85% 和 70% 的同源性。纳豆激酶在 pH 6~12、低于 50 °C 的条件下相对稳定,经过 5 个循环冻融后可保持 95% 活性,在粘性环境中可以提高其耐酸性,当温度超过 50 °C,纳豆激酶活力逐渐丧失,超过 60 °C 时则因蛋白变性而迅速失活,通过添加明胶可使其热稳定性提高 5 倍以上<sup>[8]</sup>。通过金属离子对纳豆激酶活性的影响研究表明:Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 和 Al<sup>3+</sup> 等金属离子对其有不同程度的抑制作用, Hg<sup>2+</sup> 可使其完全失活,而 Mg<sup>2+</sup> 和 Co<sup>2+</sup> 对该酶则有激活作用。此外,纳豆激酶可与血浆  $\alpha_2$ -巨球蛋白按摩尔比 2:1 结合而失去活性,并且,纳豆激酶的活性不因 5 mmol · L<sup>-1</sup> 半胱氨酸(Cys)的存在与否而改变,但是 1 mmol · L<sup>-1</sup> 的二异丙基氟代硫酸盐

(DFP)和 5 mmol · L<sup>-1</sup> 的敌百虫(Neguvon)则完全抑制酶的活性,从而证明纳豆激酶为一种丝氨酸蛋白酶,其 pI 值为 8.6 ± 0.3<sup>[8]</sup>。Sumi 等以几种人工合成的小分子短肽作反应底物,通过对纳豆激酶的酰胺水解活性的研究,发现纳豆激酶最敏感的底物是血浆纤溶酶底物 H-D-Val-Leu-Lys-pNA(S-2251)。而对于尿激酶底物 Pyro-Glu-Gly-Arg-pNA(S-2444)和弹性蛋白酶底物 Pyro-Glu-Pro-Val-pNA(S-2484)不起作用,表明纳豆激酶具有其特异的蛋白水解作用位点和识别位点<sup>[9]</sup>。与其他一些枯草杆菌蛋白酶不同的是,纳豆激酶对氧化型胰岛素 B 链 C 端 Tyr16-Ala30 之间的肽段却无任何酶切特性<sup>[10]</sup>。

通过纳豆激酶的动物体内血栓实验以及健康人群的体内溶栓实验研究表明,纳豆激酶除了具有显著的溶栓作用之外,还具有溶解纤溶酶原激活剂抑制物的作用,从而促进静脉内皮细胞产生纤溶酶原激活剂,保证了纤溶酶原激活剂的生理活性<sup>[11]</sup>。因此,通过这些芽孢杆菌发酵食品来产生纤溶酶,用于制备溶栓药物以达到治疗和预防血栓栓塞性疾病的目的,具有重要的医学价值。

## 3 链霉菌来源的纤溶酶

链霉菌是多数抗生素生产的重要菌种,能同时分泌多种蛋白酶,而且为非致病菌。因此,人们一直以来对其进行研究,希望获得更多可用于治疗人类疾病的物质。法国研究人员 Bono F<sup>[12]</sup>报道从链霉菌(*Streptomyce*)发酵液中分离纯化得到了具有纤溶活性的蛋白酶,印度的研究者 R. R. Chitte 亦报道了从链霉菌分离得到纤维蛋白专一性很强的纤溶酶,并对其产酶条件作了进一步的优化。中国医学科学院和中国协和医科大学等单位报道,在云南土壤中筛选到一株产多种纤溶活性成分的链霉菌 Y405<sup>[13]</sup>并分离出了其中的单亚基多肽链蛋白酶 SW-1 和 CGW-3。SW-1 分子量为 30 kD, pI 8.5, 在 4~37 °C 和 pH 4.0~9.0 时具较好的稳定性。将其 N-末端序列与目前已知的多种纤溶酶和纤溶酶原激活剂的序列对比,未发现相似性。CGW-3 为一丝氨酸蛋白,分子量 22.721 kD, pI 9.0, 通过比对,其 N 端氨基酸序列与微生物来源的胰蛋白酶类丝氨酸蛋白酶有较多的同源性。CGW-3 不仅可以直接降解纤维蛋白,而且具有激活纤溶酶原的作用。链霉菌与链球菌、金黄色葡萄球菌等致病菌相比具有较大的优越性<sup>[14]</sup>,并且链霉菌分泌多种蛋白水解酶,其中相当一部分属于丝氨酸蛋白酶,而人血液中的纤溶酶

及纤溶酶原激活剂也均属于丝氨酸蛋白酶。因此,对该种菌产生的活性物质研究具有重要的现实意义。利用链霉菌为来源产生的新型纤溶酶来制备溶栓药物亦可能是一种新的尝试。

#### 4 粪链球菌产生的纤溶酶

英国的 Walton Oaks 等人从粪链球菌中提取得到一种纤溶酶<sup>[15]</sup>,该酶为中性金属内肽酶,分子量为 19 kD。该酶对产色底物 FAGLA 有高度契合性,它的活性受 TL-CKT 和 TPCK 抑制作用不明显,但可被 EDTA 和  $Zn^{2+}$  所抑制,体外溶栓试验证明该酶是一种不依赖纤溶酶原即纤溶酶系统的纤溶酶类。但由于该酶热稳定性较差,至今还未有很完善有效的提纯方法。

#### 5 海洋假单胞菌产生的纤溶酶

海洋微生物与陆栖微生物相比,具有独特的生理特征,如耐盐、耐高压、嗜低温等,因此海洋微生物将成为获取新的生物活性物质的重要来源。青岛海洋大学刘晨光等<sup>[16]</sup>从海洋微生物中提取出纤溶酶,经研究发现该纤溶酶的分子量是 21 kD,  $pI$  7.4~7.5,最适 pH 是 8.0,最适温度是 50 °C,且该酶具有降解 Na-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)的活性,该酶的动力学分析表明<sup>[17]</sup>:  $K_m = 0.87 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $V_{\max} = 1.80 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{S}$ 。研究人员正对该酶的结构、催化特征以及毒理药效作用等进行研究,为该酶进一步开发和发酵工业生产提供科学依据。

#### 6 其它微生物来源的纤溶酶

杜连祥等<sup>[18]</sup>从南方小酒药中发现具有纤溶酶活性的中国根霉(*Rhizopus chiensis*)12#,该菌株以豆粕和麸皮为原料发酵可产生纤溶酶。根霉纤溶酶仅作用于枯草杆菌蛋白酶和胰蛋白酶的底物,而不作用于凝血酶、尿激酶和胰蛋白酶的底物,底物专一性好。能降解纤维蛋白原  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  链,还可激活血纤维蛋白溶酶原成纤溶酶,从而间接降解纤维蛋白。根霉纤溶酶 N 端氨基酸序列与其它生物来源的纤溶酶氨基酸序列比较,没有同源性。刘晓兰等<sup>[19]</sup>利用紫外线-氯化锂复合诱变的方式,筛选得到酶产量较出发菌株提高 32.9% 的一株稳定高产正突变株,通过固体发酵进一步筛选。分离纯化纤溶酶分子量为 18.0 kD 和 16.6 kD,等电点  $8.5 \pm 0.1$ ,有降解血纤维蛋白和激活血纤维蛋白溶酶原成

纤溶酶的双重溶栓作用。

Lee 等<sup>[20]</sup>从密环菌的菌丝体培养物中分离纯化到一种纤溶酶-密环菌金属蛋白酶,分子量 21 kD,为单个亚基,其最适 pH 值和温度分别为 6.0 和 33 °C。密环菌纤溶酶能有效水解纤维蛋白原,优先降解纤维蛋白原链。

此外,已有从白色假丝酵母菌<sup>[21]</sup>、镰孢菌<sup>[22]</sup>、米曲霉菌<sup>[23]</sup>、藤黄微球菌<sup>[24]</sup>、黄绿蜜环菌<sup>[25]</sup>发酵物中分离出纤溶酶的报道。

#### 7 结论与展望

近些年来,血栓栓塞性疾病严重危害着人类健康,传统的溶栓药物在治疗血栓病上已经取得了显著的成绩,但存在着缺陷,如尿激酶、蚓激酶、蛇激酶均为针剂,从动物体中提取,其周期长,提取成本高,价格昂贵,而且都有过敏反应或血管出血现象,使其应用受到限制。

在整个药物的发展过程中,微生物代谢产物一直以来都扮演着重要的角色。微生物种类繁多,具有广阔的研究空间,伴随着新微生物的不断被发现,新的溶栓药物也不断涌现。利用微生物技术生产纤溶酶具有周期短、产量高、生产工艺简单、成本低等特点,因此从微生物中寻找新型天然来源的溶栓药已成为生物医药发展的一个重要方向。

现今,人们不仅可以以自然界中筛选出的微生物为溶栓药物的来源,还可以通过改造的微生物——基因工程菌为来源,获取专一性更高的溶栓药物。因此,对微生物源纤溶酶的深入研究,将为人们研制出更为高效、快速,并能防止再栓塞及减低出血等不良反应的新型溶栓药物奠定基础。

参考文献:

- [1] 桂清. 血栓性疾病已成为威胁人类健康和生命的重要疾病[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 8(27): 487.
- [2] 丁文惠, 李建平, 张宝妮, 等. 基因重组链激酶静脉溶栓治疗急性心肌梗塞临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16(4): 259-261.
- [3] 李春坚, 黄峻, 杨志健, 等. 国产重组葡激酶对兔股动脉血栓溶栓疗效的对照研究[J]. 中国药物与临床, 2006, 6(11): 831-833.
- [4] 李莹, 陈斌, 何正波. 溶栓剂的研发现状及展望[J]. 重庆师范大学学报:自然科学版, 2010, 27(1): 69-73.
- [5] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1987, 43(10): 1110-

- 1111.
- [ 6 ] 宁树成,赵丽娜,张岸平,等. 纳豆激酶研究进展[ J ]. 华北煤炭医学院学报, 2006, 8( 5 ): 632-633.
- [ 7 ] 奚新伟,王佳龙,赵晓宇. 纳豆激酶基因工程研究进展[ J ]. 生物技术, 2004, 14( 3 ): 69-70.
- [ 8 ] 逯京华,孙智杰. 纳豆激酶的研究现状与展望[ J ]. 生物技术通报, 2009, 8: 40-45.
- [ 9 ] Murayama M, Sumi H. Basic and clinical aspects of japanese traditional food natto[ M ]. Miyazaki, Japan: Department of Physiology, Miyazaki Medical College, 1998.
- [ 10 ] 纪红蕊. 纳豆激酶最新研究进展[ J ]. 亚太传统医学, 2010, 5( 5 ): 144-146.
- [ 11 ] 马子川,张英锋,范林. 溶栓新药—纳豆激酶[ J ]. 化学世界, 2009( 2 ): 126-128.
- [ 12 ] Bono F, Savi P, Tuong A, et al. Purification and characterization of a novel protease from culture filtrates of a strptomyces sp[ J ]. FEMS Microbiol Letters, 1996, 141: 213-222.
- [ 13 ] 王骏,王敏,王以光. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质研究[ J ]. 生物工程学报, 1999, 15( 2 ): 147-153.
- [ 14 ] 付雯,张晓勇. 链霉菌的分子育种研究进展[ J ]. 广东农业科学, 2010, 9: 190-201.
- [ 15 ] 史丰坤,刘建军,赵祥颖,等. 微生物来源溶栓药物的研究进展[ J ]. 山东轻工业学院学报, 2008, 22( 4 ): 26-29.
- [ 16 ] 刘晨光,魏香,刘万顺. 海洋假单胞菌纤溶酶的酶学性质的研究[ J ]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31( 5 ): 730-734.
- [ 17 ] 刘晨光,王鹏. 海洋假单胞菌纤溶酶的体外溶栓实验研究[ J ]. 中国生化药物杂志, 2002, 23( 1 ): 34.
- [ 18 ] 杜连祥,刘晓兰,路福平,等. 根霉 12# 发酵产生纤溶酶的酶学性质[ J ]. 生物工程学报, 2005, 21( 2 ): 323-327.
- [ 19 ] 刘晓兰,杜连祥,路福平. 根霉 12# 固体发酵产生纤溶酶的工艺条件的研究[ J ]. 菌物系统, 2003, 22( 3 ): 481-488.
- [ 20 ] Lee S Y, Kim J S, Kim J E, et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of armillaria mellea[ J ]. Protein Express Purif, 2005, 43( 1 ): 10.
- [ 21 ] Oshiaki N, Yoshiyuki O, Youichi H, et al. Isolation and characterization of fibrinogenase from candida albicans NH-1[ J ]. Int J Biochem, 1993, 25( 12 ): 1815-1822.
- [ 22 ] Su T, Liu B H, Li P, et al. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by fusarium oxysporum[ J ]. Process Biochem, 1998, 33( 4 ): 419-422.
- [ 23 ] 高占争,赵允麟. 产纤溶酶的米曲霉筛选及测定方法的研究[ J ]. 中国酿造, 2006( 1 ): 14-17.
- [ 24 ] 肖璐,张仁怀,张义正. 纤溶酶产生菌—藤黄微球菌的筛选、鉴定及纤溶酶基因的克隆[ J ]. 微生物学通报, 2008, 35( 9 ): 1443-1449.
- [ 25 ] 徐德钦,陈海燕,章海锋,等. 黄绿蜜环菌产纤溶酶的发酵条件优化研究[ J ]. 中国食品学报, 2009, 9( 6 ): 96-103.

## Advances in Research of Fibrinolytic Enzyme from Microorganism

WEN Hao-ping, HE Qi-yi, DENG Jiang-yu, LI Jin-bo, YU Xiao-dong

( Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Engineering Research Center of Bioactive Substance, College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China )

**Abstract** : Currently, thrombolytic therapy is used for treating thrombotic diseases and it is safe and reliable. The traditional thrombolytic drugs in the thrombotic diseases has made remarkable achievements, however, it still has some defects which restrict its application. At present, by using fibrinolytic enzyme produced by microbial fermentation to make new thrombolysis drugs had become a research hotspot. This paper introduces the physical and chemical properties, structure characteristics, biological activity and other aspects of the development status of fibrinolytic enzyme which extracted and purified from different microbes comprehensive system. The results showed that early research and discovery of streptokinase and staphylokinase has been through clinical trials for thrombotic diseases, the effects are stable and reliable. The physical and chemical properties and the enzyme activity of the fibrinolytic enzyme from *Bacillus* and *Streptomyces* have been researched entirely clearly, variety of fibrinolytic enzyme has been tried for the preparation of new thrombolysis drugs. Researchers recently discovered several fibrinolytic enzyme generated by bacteria( *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonassp*, *Candida albicans*, *Fusarium*, *Aspergillus oryzae*, *Micrococcus luteus*, *Armillarialuteo-virens* ) can provide more material for the development of new thrombolytic drugs. We can believe that with more extensive and in-depth study, a large number of microorganisms in nature will provide more available and extensive resources for preparation of new thrombolytic drugs.

**Key words** : microorganism ; ferment ; fibrinolytic enzyme ; thrombolytics drugs