

专论与综述

微生物溶栓酶研究概况及进展

刘晨光 王 鹏 刘万顺

(青岛海洋大学海洋生物工程系 青岛 266003)

摘 要: 微生物是溶栓酶的重要来源。阐述链激酶、葡激酶的作用机理, 并介绍纳豆激酶、枯草激酶、粪链球菌纤溶解、链霉菌纤溶酶的理化性质及在临床上的应用潜力。

关键词: 微生物, 溶栓酶

中图分类号: Q-551 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0046-04

血栓症 (如急性心肌梗塞 (AMI)、静脉血栓塞等) 是一类严重危及人类健康及生命的心血管疾病。目前, 溶栓疗法已是心肌梗塞和其它血栓病性疾病的常规治疗方法。

溶栓酶^[1]可来源于人体 [如尿激酶 (UK)、组织纤溶酶原激活剂 (t-PA) 等]、动物 (如腹蛇抗栓酶、蚓激酶等)、微生物等。其中, 微生物是溶栓剂的重要来源, 从作用机理上微生物来源的溶栓剂可以分成两类: 一类是纤溶酶原激活剂, 如链激酶 (SK)、葡激酶 (SaK), 其作用原理是纤溶酶原激活剂 (PA) 即能将纤溶酶原激活为纤溶酶, 而具有丝氨酸蛋白酶活性的纤溶酶则能降解构成血栓骨架的纤维蛋白, 从而引起溶栓的作用; 另一类是纤溶酶类物质, 其作用不通过激活纤溶酶原, 而是直接降解血块中的纤维蛋白, 溶解血栓, 这类物质有来源于芽孢枯草杆菌的纳豆激酶 (NK) 以及分别来源于芽孢杆菌、粪链球菌、链霉菌等的纤溶活性物质。本文对这两类物质的结构功能、临床应用用户研究趋势作简要介绍。

1 链激酶^[2,3]

链激酶 (SK) 使用的时间较早, 来源容易, 且价格比较便宜, 是一种广泛应用的溶栓药物, SK 是一种由 β -溶血性链球菌分泌的单链白酶, 其分子量为 47KD, 它的氨基端为异亮氨酸 (Ile), 羧基端为赖氨酸 (Lys)。

SK 进入血液循环后, 必须与纤溶酶原 (Pg) 以 1:1 比例结合成为 SK·Pg 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, 这样才能激活纤溶酶原成为有活性的纤溶酶。纤溶酶的作用有两个: 其一是迅速降解纤维蛋白原成小分子产物, 这些降解产物不能参与血纤维网形成过程从而阻碍血栓的形成; 另一方面纤溶酶可以直接降解纤维蛋白, 引起血栓溶解^[3], 见图 1。

这一作用过程进行的十分迅速, 会引起血液中纤维蛋白原含量的明显下降, 因此在治疗过程中, 常以血纤维蛋白原浓度的下降程度作为 SK 疗效的参考, 必须保证纤维蛋白含量大于 0.08%, 否则会引起严重的出血后果。

在血液循环中, 纤溶酶很快与专一性或非专一性的蛋白酶抑制因子作用而失活,

* 国家“863”青年基金资助项目 (819-Q-10)

收稿日期: 2000-12-09, 修回日期: 2001-03-20

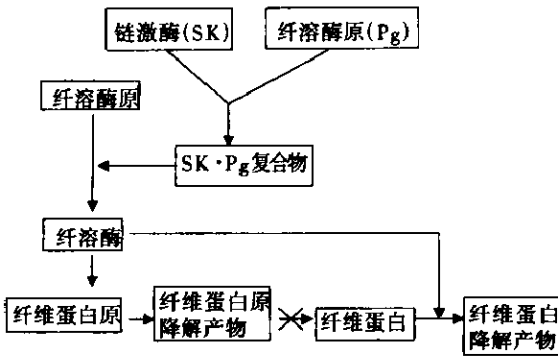


图 1 链激酶的作用机理

因而半衰期很短，仅仅 100ms。这种极短的存在时间保证了纤溶酶原不至被过分的降解；另一方面血栓外部的纤溶酶很快被抑制因子灭活，而血块内部则由于几乎不受抑制因子的影响可作用较长时间，因此血块的溶解比较均匀。同时链激酶不具有与纤维蛋白主动结合的活性只能以被动扩散的方式进入血凝块内。半衰期短和被动扩散两个特性决定了 SK 在临床应用中可以用较高的剂量，这有利于进一步提高 SK 的药用价值。

2 葡激酶^[4,5] (S_ak)

SaK 是一种由金黄色葡萄球菌分泌的具有纤溶活性的蛋白质。事实上，SaK 是一个由 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 16.5kD；而且它们的动力学常数也十分近似，K_m 在 6.2 ~ 8.1 μmol/L 之间，K_{cat} 0.17 ~ 0.31 μmol/Ls⁻¹ 之间；此外，四者的具有极为相近的纤溶活性。现在进行研究及临实验的主要是其中的一种：STAR-C。Sak 在血浆中的纤溶作用方式与 SK 相似，但是 Sak·Pg 复合物不同于 SK·Pg 复合物，Sak·Pg 复合物中的纤溶酶原的活性位点直接暴露在分子表面，进行自身催化变为有纤溶活性的 SaK·Pm 复合物，进而将游离的纤溶酶原激活成为纤溶酶，完成纤溶作用。

体内及体外的实验已经证明了 SaK 在纤溶作用中具有独特的优点。体内实验证明 SaK 具有极强的纤维蛋白特异性，这一点与 SK 完全不同。当血栓的溶解率达到 50% 时，需要 SaK、SK 浓度分别是 17nmol、68nmol 的，而在此用量时，纤维蛋白原的溶解率则分别是 50% 和 90%。与此相对照，溶解 50% 的纤维蛋白原需要 4.5nmol 的 SK、700nmol 的 SaK。以上数据可以充分说明 SaK 的纤维蛋白专一性。但这种专一性的机理还未完全研究清楚。Lijnen 通过实验提出一种比较合理的解释即：α₂ 抗纤溶酶与 SaK·Pm 复合物迅速结合，此时的 K_m/K_{cat} = 2.7nmol⁻¹s⁻¹，则血液中几乎没有未被抑制的复合物存在，而当血纤维蛋白存在时，复合物中的纤溶酶原与纤维蛋白上的赖氨酸位点相结合，阻碍了与 α₂ 抗纤溶酶的结合，从而激活大量纤溶酶原成为纤溶酶，达到较好的溶栓效果。

动物模型试验已经证明了其较高的纤溶活性。与 SK 相比，STAR-C 能使更多的栓塞血管畅通，而且所用的时间也较短。一期临床试验已经证明，STAR-C 对纤维蛋白原、纤溶酶原、α₂ 抗纤溶酶没有系统性的副作用。当药用剂量达到 30mg 时，SaK 与 rt-PA 有相似的溶栓效果，作用时间可以持续 30min，而且在这一剂量下，无纤维蛋白原的大量降解现象，这是其它无纤维蛋白专一性的激活剂无法达到的效果。

但是 SaK 来源于细菌，有着潜在的免疫原性，临床试验中的受试者在用 SaK 后的 10 ~ 12d 之间者产生了抗体，而且这些抗体可以存在达 7 个月之久，但是迄今为止未见有 SaK 引发过敏反应的报道。尽管如此，SaK 的使用仍受到很大的限制，最近科研工作者已尝试用蛋白质工程的手段来降低其免疫原性，并取得了一定的成果。

3 纳豆激酶^[6-8]

纳豆激酶 (NK) 是一种研究起步较晚但发展很快的新一代溶栓剂。NK 是一种由纳豆杆菌所产生的单链多肽, 分子量为 27.3kD, pH 值为 8.6。NK 在自然 pH 值下比较稳定, 当 pH < 5 时则极不稳定, 很快失活, 但是当与血清蛋白、胃粘液蛋白以及煮沸过的小麦或大米提取液和肉汤混合后, NK 的稳定性显著增加, 甚至在酸性环境下, 酶活性也不会完全丧失, 说明 NK 在胃环境中可以保持一定的活性, 可能通过食用纳豆来达到溶栓的目的。NK 是一种丝氨酸蛋白酶, 在 1mmol/L DFP 和 5mmol/L Neguron 作用下完全失活, 但不受 5mmol/L Cys 影响。现在已经由 NK 的 DNA 序列反推得出其氨基酸序列, 由 275 个氨基酸组成, 活性中心催化部位由 Asp₃₂、His₆₄ 和 Ser₁₂₅ 组成, 底物结合部位由 Ser₁₂₅、Leu₁₂₆、Glu₁₂₇ 组成。

NK 在体内和体外具有明显的溶栓作用。M. Fujita 等人用纤维蛋白原激活剂活性试验证明 NK 能直接降解血纤维而不具有纤维蛋白原激活活性。目前 NK 的药效学研究已进入临床试验阶段。在临床试验中, 口服 NK 胶囊的健康人的优球蛋白溶解的时间明显缩短, 血浆中的纤溶活性很快升高, 并且可以持续 8d, 表明 NK 一旦进入血浆就会立即降解纤维蛋白, 达到快速溶栓的作用。此外 NK 还可以激活静脉内皮细胞产生 t-PA, 利于溶栓作用的更好发挥。NK 除具有良好的溶栓效果、可经口服达到纤溶目的之外还具有药效时间长、无免疫原性的优点, 很可能发展成为一种新一代溶栓药物。

4 其它

近年来又陆续从芽孢杆菌、曲霉菌、葡萄球菌等中筛选到新型的具纤溶活性的物质。并对其中的某些活性物质进行了分离提纯、性质、药理和药效研究。

韩国^[9]的 Wodeuk. Kim 等从芽孢杆菌 (*Bacillus* sp. CK-114) 的分泌物中分离纯化得到了一种分子量为 28.2kD 的纤溶酶, 命名为枯草激酶 (CK)。CK 的最适作用温度为 70℃, 具有较好的热稳定性, 与同类的枯草杆菌蛋白酶激酶相比, CK 具有明显的纤溶活性, 为其它酶的 8 倍。此外 CK 还具有促纤溶活性, 协助溶栓。目前 CK 已经在许多动物模型实验中表现出较理想的溶栓效果。

英国^[10] Walton Oaks 等从粪链球菌中提取得到一种具有纤溶作用的中性金属内肽酶, 分子量为 19kD。该酶对产色底物 FAGLA 有高度契合性, 它的活性受 TLCK 和 TPCK 抑制作用不明显, 但可被 EDTA 和 Zn²⁺ 所抑制, 体外溶栓实验证明该酶是一种不依赖纤溶酶原-纤溶酶系统的纤溶酶类。但由于该酶热稳定性较差, 至今不未有很完善有效的提纯方法。

我国^[11]也从链霉菌菌株 Y405 中, 得到一种新型具纤溶活性的酶 SW-1, 分子量 30kD, pH 8.5, 并测定了其 N 端的 17 个氨基酸序列。这种酶在 4℃ ~ 37℃ 和 pH 4.0 ~ 9.0 时具有较好的稳定性。SW-1 可以直接降解纤维蛋白, 是一种纤溶酶。通过体内及体外实验证明, SW-1 对血栓有显著的降解效果, 而对 t-PA 和 α₂-纤溶抑制剂无显著影响, 还可以降解纤维蛋白原, 但是由于 SW-1 不具有纤维蛋白特异性, 可能造成系统性纤溶, 在使用上受到一定限制。目前正准备用基因工程的方法对 SW-1 进行改构。

微生物的生长速度快, 生长条件易于控制, 因而可以通过人工控制发酵条件来获得大量的目的产物。现在世界各国的发酵工业都比较发达, 发酵产物的提取工艺也比

较完善。因此,对由微生物所分泌的纤溶酶类的研究将会为临床所大量使用这类溶栓药物提供广阔的前景。

参 考 文 献

- [1] 王 骏,王 敏,王以光,生物工程学报,1999,15: 147~152.
- [2] 丁 皓,朱运松.生物工程学报,1994,10: 56~60.
- [3] Gulga C, bode M S, Runge K. Huber. Fibrinolysis&Protelysis 1998, 12 (Suppl 2): 39~58.
- [4] 应蓓文. 国外医学, 1999, 22: 19~23.
- [5] M, Fujita Yito K, Hong S. Nishimuro. Fibrinolysis, 1995, 9: 157~164.
- [6] 王正刚,丁贵平. 中国生化药物杂志, 1998, 19: 401~403.
- [7] 付 利,杨志兴. 生物工程进展, 1995, 15: 46~49.
- [8] HiroyukiSumi, ect, Comp. Biochem. Physiol, 1995, 112B: 543~547.
- [9] Wonkeuk K, Keehyun C. Applied And Environmental Microbiology, 1996, 62: 2482~2488.
- [10] Richard A. G. ect. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1980, 202: 629~638.
- [11] 王 敏,王 军. 药学学报, 1997, 33: 481~485.