

微生物——几种溶栓药物的重要来源

熊强¹ 梁剑光^{1,2} 熊晓辉^{1*}

(南京工业大学制药与生命科学学院 南京 210009)^{*} (常熟理工学院 常熟 215500)²

摘要: 综述了几种来源于微生物的重要溶栓剂的性质及研究状况。微生物是溶栓剂的重要来源, 从微生物中寻找溶栓药物是一种理想有效的途径。

关键词: 微生物, 激酶, 溶栓剂

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0116-04

MICROORGANISM——THE ORIGINATION OF THE THROMBOLYTIC AGENTS

XIONG Qiang¹ LIANG Jian-Guang XIONG Xiao-Hui

(Nanjing University of Technology Nanjing 210009)

Abstract: Some important thrombolytic agents from Microorganism were reviewed in this paper, including the character and research progress. It is a perfect and valid way to looking for the thrombolytic agents from Microbe.

Key words: Microbe, Kinase, Fibrinolysin activity

随着基础生命科学的发展和各种新的生物技术的应用, 由微生物产生的具有除抗感染、抗肿瘤作用以外的其他活性物质的报道日益增多, 如酶制剂、免疫调节剂、受体拮抗剂和氧化剂等。在微生物药物研究之中溶栓药物是近年来的又一大亮点。当前, 血塞性疾病已经成为严重危害人类健康的一大疾病。据世界卫生组织调查显示, 全世界血塞性疾病患者不少于1,500万人^[1], 其中以老年人占大多数。心脑血管疾病已跃居人类死因的首位, 发展高效特异性溶栓药物是防治心脑血管疾病的重要手段。因此, 溶栓药物的研究开发也相当活跃。由于微生物的生长速度快, 生长条件易于控制, 产物提取工艺也较简单, 因此, 微生物作为溶栓药物(纤溶活性物质)的重要来源, 已越来越受到重视。

1 微生物在药物研究中的重要地位

1929年英国细菌学家 A. Fleming 发现第一个有实用意义的抗生素——青霉素以来, 在巨大的医疗效益促进下, 各国的微生物学家掀起了一个广泛寻找土壤中拮抗性微生物的热潮。而近20年来不断发现和开发成功的非抗菌性的特异性酶抑制剂、免疫调节剂和受体拮抗剂等生理活性物质已经成为当今微生物药物研究与开发的主体。据统计^[2], 近20年来(1980~1999年)微生物的代谢活性生理物质的大致分布(见表1)。作为微生物药物, 其作用对象已不是简单的微生物感染或肿瘤细胞, 而已经迅速向生理活性物质拓宽(见表2)。我们有理由相信, 随着各种技术的飞速发展和应用, 会有更多更有效的微生物药物被发现, 为临床各种疾病的治疗提供更有力的武器, 使得微生物在药物研究中更为重要。

* 联系人 Tel: 025-3587340

收稿日期: 2002-09-12, 修回日期: 2002-10-15

表1 近20年(1980~1999)新微生物代谢产物活性的统计情况

年份	抗细菌	抗真菌	抗支原体	抗病毒	抗肿瘤	酶抑制剂	生理活性	农用抗生素	其他	合计
1980~	547	176	41	87	380	115	53	100	80	1609
1984	34%	10.9%	1.5%	5.4%	23.6%	7.1%	3.3%	6.2%	5.0%	
1990~	379	452	157	124	867	309	532	260	105	3189
1994	11.9%	14.2%	4.9%	3.9%	27.2%	9.6%	16.7%	8.2%	3.3%	
1995~	262	288	101	62	659	590	456	155	45	2635
1999	9.9%	10.9%	3.8%	2.4%	25%	22.4%	17.3%	5.9%	1.7%	

表2 《J. Anti biotics》1991~1994年发表的生理活性物质的情况作用的领域

作用的领域	新抗数量	生理活性
与肿瘤相关	60	抑制拓扑异构酶 抑制基质酶 抑制黑色素的合成 抑制蛋白激酶
循环系统	27	抑制磷酸二酯酶 拮抗钙 抑制血小板凝集 拮抗内皮素
脂质代谢	24	抑制鲨烯合成 抑制羟甲基戊二酰辅酶A还原酶 抑制胆固醇酰基转移酶
炎症与过敏	20	抑制 PLA ₂ , 抑制 5-LO, 抑制花生四烯酸
免疫	13	免疫抑制等
爱滋病	13	抑制 HIV 蛋白酶
中枢神经	10	抑制磷酸二酯酶, NGF 产生 拮抗神经肽等

2 微生物与溶栓药物的发展

微生物药物是指具有抗微生物作用及其它生理活性的微生物次生代谢产物及其衍生物。具有抗微生物感染及抗肿瘤等作用的抗生素是人类在20世纪取得抗感染决定性胜利的最重要的武器,是经典的微生物药物,其在临床上占有不可替代的重要地位^[3]。到20世纪80年代,一批相继问世的酶制剂(或至少是由老药改进的药物)已用于临床^[4]。随着生物技术的改进,从细菌遗传学获得的知识促进我们寻找新药物,为我们在微生物上确定新的抗微生物靶位提供了帮助。目前,在临床使用的溶栓药物中除尿激酶和大部分第3代溶栓药物外,其他的如链激酶、葡激酶、豆豉酶、纳豆激酶等均来自微生物的代谢产物。微生物是溶栓药物的重要来源。正在研究的纳豆激酶、枯草芽孢杆菌激酶以及豆豉酶等都有可能成为新一代的溶栓药物。目前,溶栓药物的发展不仅从自然界之中的微生物筛选,更为重要的是通过改造的微生物——基因工程菌,提高了溶栓药物的应用专一性。在国内外,利用微生物寻找溶栓药物依然是最佳手段。因此,微生物在溶栓药物的发展过程中起了巨大的促进作用。

3 几种重要的来源于微生物的溶栓药物

3.1 链激酶 (Streptokinase, SK)^[5-6]

链激酶来源于 β -溶血链球菌 (*Streptococcus homolyticus*) 是最早用于临床的溶栓剂,发现于1949年,直到1958年才开始作为药物,主要用于治疗心肌梗塞。研究表明 SK 具有激活纤维蛋白溶酶原导致血栓溶解的活性,是一个单链蛋白,由414个氨基酸组成,N端245个氨基酸残基与丝氨酸蛋白酶具有同源性,但没有丝氨酸蛋白酶活性,分子量为47~50.2kD。临床应用表明,链激酶的优点是有效、价廉,冠状脉开通率为58%,缺点是具有抗原性。因为每个人都有可能被链球菌感染过,因此会在体内产生抗SK的抗体,从而导致出血综合症。另外,SK半衰期短影响了药效的发挥。据报道链激酶还可诱发成人呼吸窘迫综合症。由于天然产生的SK抗体广为存在,在应用SK的治疗过程中,严重的免疫反应时有发生。为了保

证 SK 应用的安全性和有效性, Reed 等深入研究了 SK 分子与其抗体的反应。SK 分子结构与其免疫原性的关系有待进一步研究。目前, 研究人员正在用基因重组的办法改造链激酶, 且已经应用于临床, 产生了一定的效果。

3.2 葡激酶 (Staphylokinase, SAK)^[7,8] 葡激酶即葡萄球菌激酶, 来源于金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 也是目前获准用于急性心肌梗塞的溶栓药物之一。葡激酶 (Staphylokinase, SAK) 是由金黄色葡萄球菌分泌的一种胞外蛋白质。葡激酶的作用机制与 SK 有相似之处, 它是一“间接型”纤溶酶原激活物, 其本身无生物学功能。该酶不能直接使纤溶酶原 (PLG) 转变为纤溶酶 (plasmin, PLi), 而是先与纤溶酶原按 1:1 比例结合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, 纤溶酶原活性部位暴露, 由单链变为双链的纤溶酶, 形成活性 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。Shishido 等研究发现, 在循环的人血浆系统中 (体外), 2h 内溶解 50% 血栓需 SAK 1.8mg/mL, SK 22.1mg/mL, t-PA 2.1mg/mL, u-PA 4.7mg/mL。其中仅 SAK 对纤维蛋白原浓度无显著影响。动物血栓模型显示, SAK 的溶栓疗效优于 SK, 有更强的纤维蛋白选择性。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显著优于 SK, 且重复给药溶栓效力未见下降。与 SK 相比, SAK 具有较弱的免疫原性, 不引起变态反应。同样由于基因工程的发展, 重组葡激酶也相继问世了, 并已经应用于临床, 取得了较好的效果。

3.3 链霉菌产生的新型纤溶酶^[9-11] 由中国医学科学院和中国协和医科大学等单位报道的链霉菌 Y405 所产生的新型的纤溶酶, 为一种活性蛋白酶 SW1。通过对该蛋白酶在体内和体外生理作用的研究表明, 这种蛋白酶是一种具有纤溶活性的蛋白酶, 它直接降解血栓中的纤维蛋白, 而不是纤溶酶原激活剂。研究表明, SW1 在体内对大鼠静脉血栓有显著的溶解作用, 其效果与同剂量的尿激酶相当。SW1 使大鼠血浆中纤溶酶和纤溶酶原水平提高, 而对内源组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 和 $\alpha 2$ 纤溶酶抑制剂无显著影响, 此外, SW1 对血栓中纤维蛋白的特异性不强, 在溶栓的同时有可能造成系统溶纤。SW1 的底物特异性及纤溶降解产物有待进一步的深入研究。关于这种新型的纤溶酶国内外报道不多, 研究者还就该酶的其他性质如分子量、等电点以及下游的分离纯化方面进行了阶段性的研究。需要指出的是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, 比起链球菌、金黄色葡萄球菌等致病菌有较大的优越性, 因此对该种菌产生的活性物质研究有重要的实际意义。

3.4 纳豆激酶 (Nattokinase NK)^[12] 纳豆激酶是目前研究比较多的一种即将应用于临床的有效溶栓药物。它属一种枯草杆菌蛋白激酶, 是纳豆在发酵过程中由纳豆枯草杆菌 (*Bacillus Subtilis*) 产生的一种丝氨酸蛋白酶。研究表明, 纳豆激酶具有纤溶活性, 可治疗和预防血栓病, 它还可激活体内的纤溶酶原, 从而增加内源性纤溶酶的量与作用。纳豆激酶的研究国内外起步均较晚, 至今只有 20 多年的时间。国内的研究集中在发酵和分离纯化方面。众多研究表明纳豆激酶是一个单链多肽酶, 由 275 个氨基酸组成, 中间无二硫键。分子量为 27, 728, 其 pI 值为 8.6 ± 0.3 。作为丝氨酸蛋白酶, 其活性中心为 Asp³²、His⁶⁴、Ser²²¹。Fujita 研究发现 NK 入血后直接结合在纤维蛋白原上形成 NK-纤维蛋白原复合物, 并经 270, 000u、200, 000u 中间体把纤维蛋白原最终降解成 105, 000u 的片段。动物血栓模型显示, 等摩尔的 NK、纤溶酶、弹性蛋白酶的血管再通率分别为 $62.0 + 5.3\%$ 、 $15.8 + 0.7\%$ 、 10% , 无论体外或体内实验, NK 的纤活性都为纤溶

酶的4倍以上。NK对交联纤维蛋白有很强的水解活性,但对纤维蛋白原却并不敏感。实验证明,NK的纤维蛋白原水解活性远低于纤溶酶和弹性蛋白酶,甚至尿激酶,而与t-PA相同。这提示NK在发挥纤溶作用的同时,不水解血浆蛋白原,不易引起出血倾向。基于纳豆激酶是来源于一种食源性的溶栓药物,无任何毒副作用,安全性好,因而有很大的开发价值。

3.5 海洋假单胞菌产生的纤溶酶^[13] 由青岛海洋大学刘晨光等报道的又一来自微生物有待开发的溶栓药物,不过该菌株来源特别-海洋。与陆栖微生物相比,海洋微生物具有其独特的生理特性,如:耐盐、耐高压、嗜低温等,所以海洋微生物是获取新生物活性物质的又一重要来源,为人类提供更好的生物制品。经研究发现这种纤溶酶的分子量是21kD,等电点是7.4~7.5,最适作用pH是8.0,最适作用温度是50℃。该酶具有降解苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐(BAEE)的活性,酶的动力学分析表明: $K_m = 0.87\text{mmol/L}$, $V_{max} = 1.80 \times 10^3 \text{mmol/Ls}^{-1}$ 。目前,从海洋微生物中筛选溶栓药物的研究趋于零星报道。对于该酶,还需进一步研究其结构、催化特征以及毒理药效作用等,为该酶进一步开发为新药和发酵工业生产提供科学的依据。

4 结论与展望

从以上列举的几种来源于不同的微生物溶栓药物来看,有的已经应用于临床,而有的还

在实验研究阶段。目前已用于临床或正在研究的溶栓药物的大致比较结果见表3。从给药途径、安全性和来源看,纳豆激酶是更为理想的溶栓药物。本实验室在研究纳豆激酶溶栓方面获得较好效果,有望进行工业化生产,为溶栓药物市场开辟新的方向。另外,其他的微生物如:根霉菌、大肠杆菌也能产生纤溶酶,并且有研究者在进行研究。微生物种类繁多,为溶栓药物的研究提供了广阔的空间。由此可见,微生物在整个药物的发展过程中扮演着重要的角色,新的微生物不断发现伴随着新的溶栓药物不断涌现。

表3 几种常见的溶栓药物比较结果

	来源	给药途径	半衰期	有无毒副作用
链激酶	链球菌	静脉注射	短	易全身出血
葡激酶	金黄色葡萄球菌	静脉注射	较短	有时出血
SW1	链霉菌	静脉注射	较短	不明(有待实验)
纳豆激酶	枯草芽孢杆菌	口服或注射	较长	不易出血、安全

参考文献

- [1] 张致平. 中国抗生素杂志, 1998, 23 (2): 81~91.
- [2] 吴萍茹, 林丽玉. 海峡药学, 2001, 13 (1): 7~9.
- [3] 司书毅, 黄明玉. 基础医学与临床, 2001, 21 (4): 294~297.
- [4] 孙奇志. 英国医学杂志(中文版), 1999, 2 (2): 72~80.
- [5] 丁文惠, 李建平. 中国临床药理学杂志, 2000, 10 (4): 259~261.
- [6] 张龙友, 任天华, 刘迎秋, 等. 中国药学杂志, 2000, 35 (6): 420~422.
- [7] 翟中金. 国外医学临床生物化学与检验学分册. 1998, 19 (4): 156~158
- [8] 张艳, 李卫平, 明亮, 等. 中国药理学通报, 2000, 16 (2): 187~189.
- [9] Lehrzi J, Abdelouahed M, Mirshabi M, et al. Fibrinolysis, 1995, 9 (2): 113.
- [10] 王敏, 王骏, 邵明远, 等. 药学报, 1998, 33 (7): 481~485.
- [11] 王骏, 王敏, 王以光. 生物工程学报, 1999, 15 (2): 148~152.
- [12] 凌均建, 罗立新, 杨汝德. 广东药学院学报, 1999, 15 (4): 301~303.
- [13] 刘晨光, 王鹏. 中国生化药物杂志, 2002, 23 (1): 34~35.