

蛋白酶应用于外伤治疗的研究

I. 蛋白酶与抗生素、消毒剂之间活性关系

邱秀宝 程秀兰 袁影

(中国科学院微生物研究所,北京)

刘荫秋 程学明

(中国人民解放军第三军医大学野战外科研究所)

摘要 本文研究了中性蛋白酶、碱性蛋白酶与抗生素、消毒剂的相互活性关系,结果表明在适当的浓度下,混合后彼此的生物活性没有明显的影响。蛋白酶与 9000 u/ml 以下的庆大霉素混合,酶活性可保持 93% 以上。杜灭芬的浓度在 100 μ g/ml 以下,对酶的活性无影响。蛋白酶与抗生素混合后对金黄色葡萄球菌的抑制作用无影响。对临床应用提供了可靠依据。

关键词 蛋白酶;抗生素

细菌性中性蛋白酶对纤维蛋白,血浆蛋白的水解、消化效果最好,因此蛋白酶可以迅速溶解坏死组织,减轻炎症反应,促使伤口净化,有

利伤口愈合。蛋白酶用于外伤治疗早有报道,Connell 报告用蛋白酶治疗 139 例溃疡和烧伤有 80% 效果良好。1966 年 Prytz 报告用 Travase

(中性蛋白酶)进行烧伤脱痂治疗效果良好。Rodebeaver 用 Travase 放入豚鼠爪旁的切口,观察蛋白酶对伤口的影响。实验结果表明,蛋白酶对正常组织无损伤。为了提高治疗效果,蛋白酶常与抗生素合用,既可清创又可抑菌,但抗生素与蛋白酶合用时必须选择好两者的配比和使用条件,以保证两者活性不受影响,为此我们进行了一系列研究。

材料与方 法

中性蛋白酶 (90 万 u/g) 和碱性蛋白酶 (140 万 u/g) 均由作者等自制,庆大霉素(药用针剂),杜灭芬、新洁尔灭由第三军医大学野战外科研究所提供。其他抗生素均为医用市售。

指示菌 AS 1.89 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由中国科学院微生物所抗生素组刘肃先生提供。

蛋白酶活力测定: 用 Folin 试剂显色法。

结果与讨论

(一) 杜灭芬对中性蛋白酶活力的影响

1. 酶浓度的选择: 分别取 1ml 不同浓度中

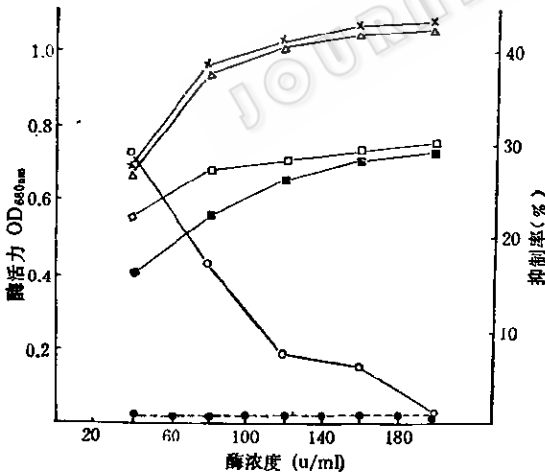


图 1 杜灭芬对酶活力的影响

- ×-× 碱性蛋白酶不加杜灭芬
- △-△ 碱性蛋白酶加杜灭芬
- 杜灭芬对碱性蛋白酶的抑制率
- 中性蛋白酶不加杜灭芬
- 中性蛋白酶加杜灭芬
- 杜灭芬对中性蛋白酶的抑制率

性和碱性酶液, 加到含 1ml 酪蛋白试管中(其中含 0.02% 杜灭芬) 37℃ 反应 10 分钟, 按常规测活力以不加杜灭芬为对照, 结果见图 1。表明杜灭芬对碱性蛋白酶稳定而对中性蛋白酶略有影响。

2. 杜灭芬处理不同时间对酶活力的影响: 照 1ml 酶液 50 u/ml 与杜灭芬 (0.02%) 在 37℃ 处理不同时间, 然后加酪蛋白溶液在 37℃ 反应 10 分钟, 以加杜灭芬不保温为对照, 按常规法测活力, 结果见图 2。

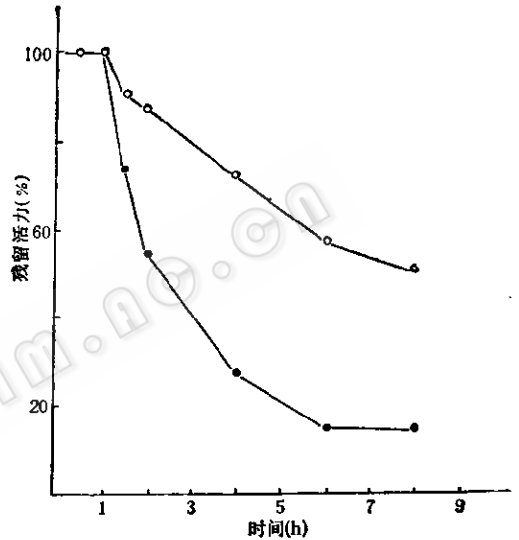


图 2 杜灭芬处理不同时间对酶活力的影响

- 中性蛋白酶
- 碱性蛋白酶

结果表明在 37℃ 条件下 1 小时内杜灭芬对二种酶活力是稳定的, 随时间延长酶活下降。

3. 杜灭芬浓度对酶活力的影响: 取 1ml 酶液 50 u/ml 与不同浓度的杜灭芬相混合, 在 37℃ 处理不同时间, 按常规法测酶活力, 结果见图 3、4。

从图 3、4 结果表明, 杜灭芬浓度在 0.02% 以下酶活力相对稳定, 超过 0.04% 的活力损失较大, 随着时间的延长酶活力损失也大。

4. 不同 pH 条件下杜灭芬对酶活力的影响: 取不同 pH 的酶液 (杜灭芬终浓度为 0.02%) 1 ml, 加入各种不同 pH 的酪蛋白溶液, 37℃ 反应 10 分钟, 按常规法测酶活力, 结

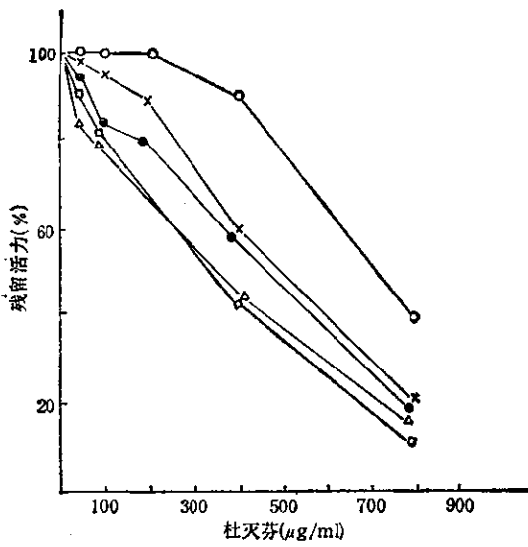


图3 不同浓度杜灭芬对中性蛋白酶活力的影响
处理时间(分)
○—○ 0', ×—× 15', ●—● 30',
△—△ 45', □—□ 60'

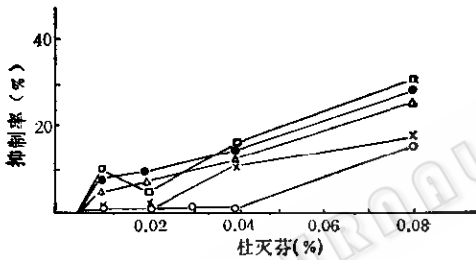


图4 不同浓度杜灭芬对碱性蛋白酶活力的影响
处理时间(分)
○—○ 0', ×—× 15', △—△ 30',
●—● 45', □—□ 60'

果见图5。

图5表明中性蛋白酶与杜灭芬混合后酶的最适作用pH为7.0,碱性蛋白酶与杜灭芬混合后酶的最适作用pH为9.0。

(二) 庆大霉素对蛋白酶活力的影响

1. 不同浓度的庆大霉素对酶活力的影响: 不同浓度的庆大霉素(pH 6.5—7.0)分别与中性蛋白酶和碱性蛋白酶溶液混合(中性酶为30 u/ml,碱性酶为23 u/ml),置37℃水浴中保温30分钟,以未加庆大霉素为对照,再按常规法测定中性蛋白酶和碱性蛋白酶的活力(以OD值表示),表明庆大霉素对两种蛋白酶的活

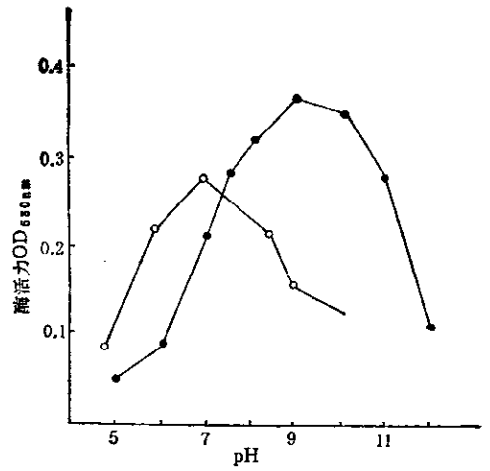


图5 不同pH杜灭芬对两种蛋白酶活力的影响

pH 5.0, 0.2 M 醋酸缓冲液
pH 6.0—7.5, 0.2 M 磷酸缓冲液
pH 8.0—9.0, 0.2 M 硼酸缓冲液
pH 10—12, 0.2 M 硼砂-NaOH 缓冲液
○—○, 中性蛋白酶 ●—●, 碱性蛋白酶

表1 不同浓度的庆大霉素对酶活力的影响

庆大霉素浓度 (u/ml)	酶 活 性			
	中性蛋白酶		碱性蛋白酶	
	OD 680nm	相对活力 (%)	OD 680nm	相对活力 (%)
0	0.47	100	0.56	100
1000	0.44	93.6	0.53	94.6
3000	0.45	95.7	0.54	96.4
5000	0.45	95.7	0.53	94.6
7000	0.45	95.7	0.53	94.6
9000	0.44	93.6	0.54	96.4

力都无明显影响(表1)。

2. 庆大霉素存在下pH对酶活性的影响: 庆大霉素(pH 6.5, 10000 u/ml)分别与中性蛋白酶和碱性蛋白酶溶液混合后,在不同pH条件下测定酶活力,结果见图6。

图6表明蛋白酶与庆大霉素合用时,中性蛋白酶的最适pH为7.0,碱性蛋白酶的最适pH为10.0。

3. 庆大霉素存在下酶的热稳定性: 庆大霉素分别与中性和碱性蛋白酶溶液混合(中性酶为30 u/ml,碱性酶为23 u/ml,庆大霉素为7000 u/ml),置于37℃水浴中分别处理不同时

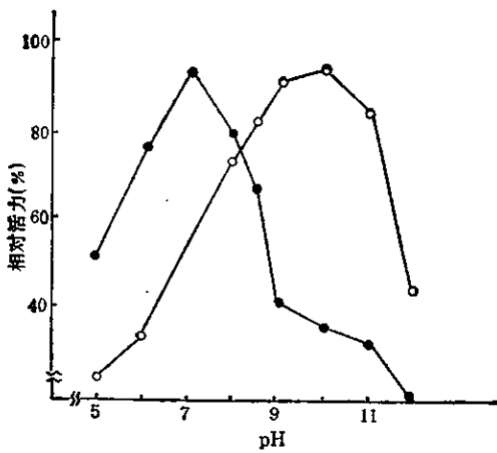


图6 不同 pH 庆大霉素对两种酶活力的影响
缓冲系统同图 5
●—● 中性蛋白酶 ○—○ 碱性蛋白酶

间,各以 0 时为对照,按常规法分别测其两种蛋白酶的活力,结果见图 7。

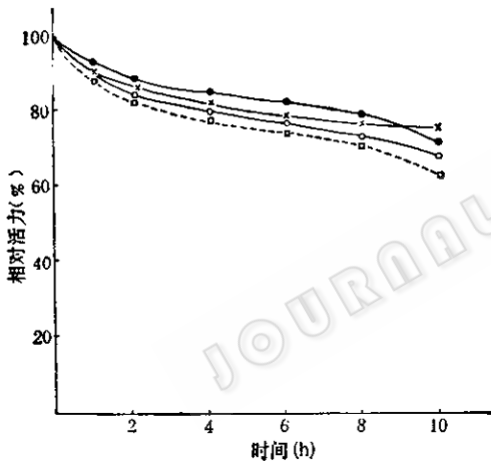


图 7 庆大霉素存在下酶的热稳定性

×—×,碱性蛋白酶 ●—●,碱性蛋白酶有庆大霉素
○—○,中性蛋白酶 □—□,中性蛋白酶有庆大霉素

图 7 表明蛋白酶与庆大霉素混合后,酶的热稳定性基本上不受影响,37°C 处理 8 小时,中性酶和碱性酶的活力均保留 70% 以上。

4. 庆大霉素存在下 pH 对蛋白酶稳定性的影响: 将庆大霉素分别与中性和碱性蛋白酶溶液混合(庆大霉素浓度为 7000 u/ml),在不同 pH 下于 37°C 处理 1 小时,以不加庆大霉素为对照,结果见图 8。

图 8 表明加入庆大霉素后,碱性酶在 pH

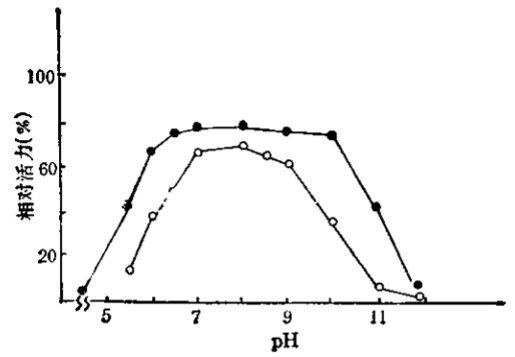


图 8 pH 对酶稳定性的影响
缓冲系统同图 5

●—●,碱性蛋白酶 ○—○,中性蛋白酶

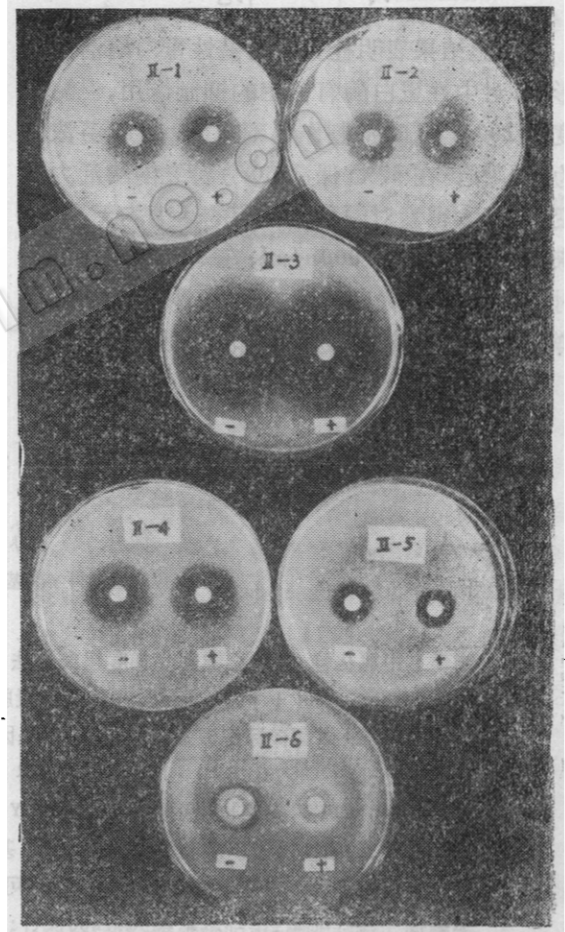


图 9 蛋白酶对抗生素抑菌作用的影响
II-1 硫酸庆大霉素, II-2 链霉素, II-3 青霉素,
II-4 新霉素, II-5 新洁尔灭

6.5—10 稳定,中性酶在 pH 7—8.5 较稳定。

(三) 蛋白酶对抗生素效价的影响

将青霉素(4万/ml),庆大霉素(2000u/ml),链霉素,新霉素、杜灭芬分别配成 0.1mg/ml,新洁尔灭 0.5% 各取 5 ml,加入 0.5 ml 中性蛋白酶 (4500u/ml) 37℃ 处理 15 分钟,用 0.5cm 直径的小滤纸片沾取,放在预先涂好指示菌的牛肉汁琼脂平板上,30℃ 培养 24 小时,出现明显的抑菌圈,以 A. S 1.89 金黄色葡萄球菌为指示菌,结果见图 9。

从图 9 可看出,抗生素与蛋白酶混合后对金黄色葡萄球菌的抑菌作用没有明显的影响,因此两者可以配合使用。

讨 论

实验结果表明杜灭芬对碱性蛋白酶活力无影响,对中性蛋白酶有一定的抑制作用,但酶浓度达 200u/ml 时抑制作用不明显,杜灭芬浓度为 0.02%,在 37℃ 保温 60 分钟之内酶活力稳定。庆大霉素对两种蛋白酶的活力均无影响,庆大霉素浓度为 7000u/ml,在 37℃ 保温 10 小时,两种酶的活力都能保持在 60% 以上,与在同样情况下不加庆大霉素相比较,结果基本一致,

只是加入庆大霉素以后碱性蛋白酶的热稳定性略有提高,杜灭芬和庆大霉素与中性酶及碱性酶混合后,中性酶的最适 pH 为 7.0,碱性酶的最适 pH 为 9—10,与不加抗生素时一样。由此看来,蛋白酶与抗生素及消炎药物在一定条件下合用不影响酶活力,反之从图 9 结果看我们认为蛋白酶处理后的抗生素仍能保持它原有的抑菌作用,所以在外伤实际应用中具有一定的意义。

上述研究结果为蛋白酶与抗生素配合使用提供了经验数据,有助于蛋白酶在外伤治疗中的应用。

参 考 文 献

- [1] Connell. J. F.: Surg Gyn. and Obst., 108: 93, 1959.
- [2] Connell. J. F.: Am. J. Of Surg, 97: 429, 1959.
- [3] Dimic. A. R.: J. of Trauma, 17: 948, 1977.
- [4] Prytz. P. H. D.: Clin Pharn Therap, 7: 347, 1966.
- [5] Rodeheaver, G.: Surg Gyne and Obst, 148: 562, 1979.
- [6] Rodeheaver. G.: Am. J. Of Surg, 129: 537, 1975.
- [7] 程学明等: 解放军医学杂志, 11: 99—101, 1986.
- [8] 邱秀宝等: 微生物学报, 22(2): 169—174, 1982.
- [9] 邱秀宝等: 微生物学报, 24(1): 66—73, 1984.